



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MAYARA BOCCHI FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DAS MUTAÇÕES NOS GENES
KRAS E *EGFR* E O ENVOLVIMENTO DA EXPRESSÃO
PROTEICA DO RECEPTOR CXCR4 EM PACIENTES COM
CÂNCER COLORRETAL**

Londrina
2024

MAYARA BOCCHI FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DAS MUTAÇÕES NOS GENES
KRAS E *EGFR* E O ENVOLVIMENTO DA EXPRESSÃO
PROTEICA DO RECEPTOR CXCR4 EM PACIENTES COM
CÂNCER COLORRETAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Marla Karine Amarante.

Coorientadora: Profa. Dra. Karen Brajão de Oliveira

Londrina
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

F363a Fernandes, Mayara Bocchi .

Avaliação da presença das mutações nos genes *KRAS* e *EGFR* e o envolvimento da expressão proteica do receptor CXCR4 em pacientes com câncer colorretal / Mayara Bocchi Fernandes. - Londrina, 2024.
88 f. : il.

Orientador: Marla Karine Amarante.

Coorientador: Karen Brajão de Oliveira.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2024.

Inclui bibliografia.

1. Neoplasia colorretal - Tese. 2. Oncogenes - Tese. 3. Biomarcadores tumorais - Tese. I. Amarante, Marla Karine. II. Oliveira, Karen Brajão de. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. IV. Título.

CDU 616

MAYARA BOCCHI FERNANDES

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DAS MUTAÇÕES NOS GENES *KRAS* E *EGFR* E O ENVOLVIMENTO DA EXPRESSÃO PROTEICA DO RECEPTOR CXCR4 EM PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Marla Karine Amarante
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Bruna Karina Banin Hirata
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof. Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira
Pontifícia Universidade Católica do Paraná-
PUCPR

Prof. Dr. Glauco Akelington Freire Vitiello
A.C. Camargo Cancer Center – São Paulo

Prof. Dra. Nathália de Sousa Pereira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 23 de fevereiro de 2024.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus**, pela minha vida e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da minha caminhada.

Aos meus pais, **Edson Bocchi** e **Sueli Michelângelo Bocchi**, pelo apoio, torcida e confiança que sempre depositam em mim. Obrigada por serem meu porto seguro. Agradeço também à minha irmã, **Mayra Bocchi**, por sempre torcer por mim. Amo vocês!

Ao meu esposo, **Eduardo Vignoto Fernandes**, por sempre me motivar, aconselhar e acalmar em meio as turbulências. Obrigada por acreditar no meu potencial. Te amo!

À minha orientadora **Prof^a Dra. Marla Karine Amarante**, por ter aceitado o desafio de me acompanhar em mais uma jornada. Obrigada pelas valiosas contribuições e por sua dedicação.

À minha coorientadora, **Prof^a Karen Brajão de Oliveira**, por toda disponibilidade e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

À **Prof^a Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe**, pelo voto de confiança e oportunidade em fazer parte dessa família científica.

À **banca examinadora**, que gentilmente aceitou o convite para a avaliação e correção do presente trabalho, contribuindo com todo o seu conhecimento e experiência.

Aos **colegas e amigos de laboratório**, agradeço todo o companheirismo e parceria ao longo desses anos.

À **CAPES**, pelo auxílio financeiro, sem o qual este trabalho não poderia ser realizado.

A todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

“Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível”. (Charles Chaplin)

FERNANDES, Mayara Bocchi. **Avaliação da presença das mutações nos genes *KRAS* e *EGFR* e o envolvimento da expressão proteica do receptor CXCR4 em pacientes com câncer colorretal.** 2024. 88 páginas. Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é uma doença multifacetada na qual ocorre um complexo processo de carcinogênese. Mutações nos genes *KRAS* e *EGFR* estão envolvidas no desenvolvimento e progressão do CCR, associadas a mau prognóstico e resistência a certas terapias. Além disso, o eixo CXCL12/CXCR4 e outras vias podem desempenhar papéis essenciais na criação de um ambiente de suporte para o avanço do tumor, evasão imunológica, angiogênese e metástase na carcinogênese do CCR. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar mutações nos genes *KRAS* e *EGFR*, perfil MSI e a expressão do receptor CXCR4 no CCR. Tratou-se de um estudo transversal, no qual foram avaliados 66 pacientes atendidos no Hospital do Câncer de Londrina (HCL), de ambos os sexos. A análise das mutações nos genes *KRAS* e *EGFR* foi realizada por meio de reação em cadeia da polimerase, seguida de restrição enzimática (PCR-RFLP) e a expressão de CXCR4 foi realizada através de imunohistoquímica (IHQ). O HCL analisou a instabilidade de microssatélites através da expressão das proteínas de reparo de incompatibilidade do DNA (MSH6, MSH2, MLH1, PMS2) por técnica de IHQ. Os demais parâmetros clinicopatológicos analisados, foram obtidos partir dos prontuários dos pacientes. A análise dos dados foi realizada por meio do coeficiente Tau de Kendall, adotando um nível de significância de 5%. A mediana da idade dos pacientes foi de 64 anos, com intervalo interquartil de 57,5 - 69,5 anos e 51,5% eram do sexo feminino. As frequências de mutações nos genes foram as seguintes: 40,9% no códon 12 de *KRAS*, 31,8% no códon 13 de *KRAS* e 1,5% no códon 21 do *EGFR*. Nenhum paciente apresentou mutação no códon 19 do *EGFR*. No presente estudo, a mutação no códon 13 de *KRAS* correlacionou-se com um maior estadiamento da doença (Tau = 0,259; p = 0,031), número de linfonodos regionais acometidos (Tau = 0,267; p = 0,040) e com a expressão de MSH6 (Tau = 0,174; p = 0,04). Já a mutação no códon 12 de *KRAS*, correlacionou-se com a idade avançada (Tau = 0,358; p = 0,006). Com relação a MSI, a maioria dos pacientes expressavam as proteínas de reparo de incompatibilidade do DNA, indicando uma estabilidade de microssatélites. Além disso, a expressão de MSH6 correlacionou-se com menor idade e a expressão de MLH1 e PSM2 correlacionou-se com um menor tamanho tumoral. Quanto ao perfil de imunomarcagem do CXCR4, a expressão do receptor no tecido tumoral foi encontrada, em sua maioria, em pacientes positivos para o acometimento de linfonodos, com tamanho tumoral T3, estadiamento III, positivos para as proteínas de reparo de DNA e negativos para mutação nos códons 12 e 13 de *KRAS*. As mutações em genes associados com o processo de carcinogênese colorretal encontradas no presente estudo, estão diretamente relacionadas com condições clinicopatológicas mais avançadas da doença. Portanto, a utilização de biomarcadores na prática clínica faz-se importante para as decisões diagnósticas, prognósticas e preditivas do CCR, além de constituir a base da medicina personalizada.

Palavras-chave: Neoplasia colorretal; oncogenes; biomarcadores tumorais.

FERNANDES, Mayara Bocchi. **Assessment of the presence of mutations in the KRAS and EGFR genes and the involvement of protein expression of the CXCR4 receptor in patients with colorectal cancer.** 2024. 88 pages. Master's degree in Clinical and Laboratory Physiopathology – Londrina State University, Londrina, 2024.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is a multifaceted disease in which a complex process of carcinogenesis occurs. Mutations in the *KRAS* and *EGFR* genes are involved in the development and progression of CRC, associated with poor prognosis and resistance to certain therapies. Furthermore, the CXCL12/CXCR4 axis and other pathways may play essential roles in creating a supportive environment for tumor advancement, immune evasion, angiogenesis, and metastasis in CRC carcinogenesis. Therefore, the objective of the present study was to evaluate mutations in the *KRAS* and *EGFR* genes, MSI profile and the expression of the CXCR4 receptor in CRC. This was a cross-sectional study, in which 66 patients treated at the Hospital do Câncer de Londrina (HCL), of both sexes, were evaluated. The analysis of mutations in the *KRAS* and *EGFR* genes was performed using polymerase chain reaction, followed by enzymatic restriction (PCR-RFLP) and the expression of CXCR4 was performed using immunohistochemistry (IHC). HCL analyzed microsatellite instability through the expression of DNA mismatch repair proteins (MSH6, MSH2, MLH1, PMS2) using the IHC technique. The other clinicopathological parameters analyzed were obtained from the patients' medical records. Data analysis was performed using Kendall's Tau coefficient, adopting a significance level of 5%. The median age of the patients was 64 years, with an interquartile range of 57.5 - 69.5 years and 51.5% were female. The frequencies of mutations in the genes were as follows: 40.9% in *KRAS* codon 12, 31.8% in *KRAS* codon 13 and 1.5% in *EGFR* codon 21. No patient had a mutation in *EGFR* codon 19. In the present study, the mutation in *KRAS* codon 13 correlated with a higher stage of the disease (Tau = 0.259; p = 0.031), number of regional lymph nodes affected (Tau = 0.267; p = 0.040) and with the expression of MSH6 (Tau = 0.174; p = 0.04). The mutation in *KRAS* codon 12 correlated with advanced age (Tau = 0.358; p = 0.006). Regarding MSI, the majority of patients expressed DNA mismatch repair proteins, indicating microsatellite stability. Furthermore, MSH6 expression correlated with younger age and MLH1 and PSM2 expression correlated with smaller tumor size. Regarding the CXCR4 immunostaining profile, the expression of the receptor in the tumor tissue was mostly found in patients positive for lymph node involvement, with tumor size T3, stage III, positive for DNA repair proteins and negative for mutation in codons 12 and 13 of *KRAS*. The mutations in genes associated with the process of colorectal carcinogenesis found in the present study are directly related to more advanced clinicopathological conditions of the disease. Therefore, the use of biomarkers in clinical practice is important for diagnostic, prognostic and predictive decisions regarding CRC, in addition to constituting the basis of personalized medicine.

Keywords: Colorectal neoplasm; oncogenes; tumor biomarkers.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Por cento
µL	Microlitros
BRAF	Homólogo B1 do oncogene do sarcoma murino viral v-raf
CCHNP	Câncer colorretal hereditário não poliposo
CCR	Câncer colorretal
CTLA-4	Inibidor do antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos
CXCL12	Quimiocina 12 da família CXC
CXCR4	Receptor 4 da família CXC
FAP	Polipose adenomatosa familiar
HCL	Hospital de Câncer de Londrina
KRAS	Sarcoma de rato Kirsten
MLH1	Homólogo Mut-L
MSH2	Homólogo Mut-S 2
MSH6	Homólogo humano Mut-S 6
MSI	Instabilidade de microssatélites
ng	Nanograma
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pm	Picômetro
PSM2	Segregação pós-meiótica humana 2
RFLP	Análise de polimorfismo de comprimento de restrição

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	METODOLOGIA	15
3.1	SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	15
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA	15
3.3	ANÁLISE DAS MUTAÇÕES NOS CÓDONS 12 E 13 DO GENE <i>KRAS</i>	16
3.4	ANÁLISE DAS MUTAÇÕES NOS CÓDONS 19 E 21 DO GENE <i>EGFR</i>	16
3.5	SEQUENCIAMENTO	19
3.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CXCR4	19
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
4	RESULTADOS	21
4.1	ARTIGO 1	22
4.2	ARTIGO 2	32
4.3	ARTIGO 3	60
5	CONCLUSÃO	78
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
	REFERÊNCIAS	80
	ANEXOS	83
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.....	84

1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) humano abrange tumores que acometem um segmento do intestino grosso, o cólon, e o reto (Malik et al., 2020). A mais recente estimativa mundial, aponta que nos homens, ocorreram cerca de 1,066 milhões de casos novos de CCR em 2020, sendo o terceiro tumor mais incidente entre todos os cânceres, com um risco estimado de 23,4/100 mil. Para as mulheres, foram cerca de 865 mil casos novos no mesmo ano, sendo o segundo tumor mais frequente com taxa de incidência de 16,2/100 mil (IARC, 2020).

No Brasil, estima-se que, para cada ano do triênio 2023-2025, sejam detectados 45.630 novos casos de CCR, correspondendo a um risco estimado de 21,1 casos por 100 mil habitantes, sendo 21.970 entre os homens e 23.660 entre as mulheres (INCA, 2022). Os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento da doença incluem: história familiar de CCR, idade avançada, sedentarismo, obesidade, a presença de algumas doenças inflamatórias intestinais, como doença de Crohn e retocolite ulcerativa crônica; e doenças intestinais hereditárias, como polipose adenomatosa familiar (FAP) e câncer colorretal hereditário não poliposo (CCHNP) (Mármol et al., 2017).

A etiologia do CCR depende da origem da mutação, podendo ser classificada em carcinomas esporádicos, hereditários e familiares (Dekker et al., 2019). A forma esporádica representa cerca de 70% dos casos e é comum em pessoas com mais de 50 anos (Keum; Giovannucci, 2019). Menos de 10% dos pacientes apresentam predisposição hereditária para o CCR, acometendo indivíduos que herdaram de seus pais uma alteração em um gene supressor, como por exemplo, mutações germinativas nos genes de reparo do DNA (Mármol et al., 2017). A terceira forma dessa doença é conhecida como câncer colorretal familiar e nas famílias afetadas, a doença aparece em uma frequência alta o suficiente para não ser considerado como esporádico, mas não segue o padrão das síndromes hereditárias. Cerca de 20% de todos os casos de CCR são incluídos nesta categoria (Jasperson et al., 2010).

O CCR é considerado uma doença multifacetada devido a sua biologia tumoral dinâmica, caracterizada por alterações genéticas e epigenéticas em oncogenes e genes supressores de tumor (Sullivan; Noujaim; Roper, 2022). Mutações somáticas em oncogenes pertencentes à via de sinalização do receptor do fator de

crescimento epidérmico (EGFR) desempenham um papel crucial no processo de carcinogênese colorretal, contribuindo com o crescimento celular desordenado (Brinzan et al., 2022).

O EGFR é um receptor transmembrana com atividade tirosina quinase pertencente à família ErB, sendo constituído por um domínio de ligação extracelular N-terminal, um domínio lipofílico transmembrana e um domínio C-terminal intracelular de tirosina quinase (Segatto et al., 2011). Ligações específicas ao domínio extracelular resultam na ativação da via de sinalização Ras/Raf/MAPK, dando início a cascata de transmissão de sinais, com conseqüente crescimento e proliferação celular. Essas moléculas-chave de sinalização podem ser afetadas por mutações genéticas, alterando o processo de carcinogênese e levando a proliferação descontrolada, angiogênese, inibição da apoptose, invasão e metástase (Jorissen et al., 2003; Normanno et al., 2006; Segatto et al., 2011).

As mutações somáticas no gene *EGFR* mais comuns são as deleções no éxon 19 (dels746-750) ou uma substituição da leucina pela arginina no códon 858 do éxon 21 (L858R). Esses dois tipos de mutação existem no domínio de ligação de ATP da tirosina quinase, sendo consideradas mutações ativadoras de EGFR. Tais alterações geralmente ocorrem concomitantemente com o aumento da produção de ligantes de EGFR devido a alças autócrinas ou parácrinas. Sendo assim, mutações em *EGFR* determinam o tráfego anormal do receptor, o que contribui para o aumento da sinalização e para o desenvolvimento do tumor (Jurišić et al., 2018; Sigismund et al., 2018).

Também podem ocorrer mutações no oncogene conhecido como sarcoma de rato Kirsten (*KRAS*), levando à ativação constitutiva das vias de sinalização à jusante, corroborando com o crescimento celular desordenado (Hardiman, 2018; Huang et al., 2018). As mutações no gene *KRAS* ocorrem em aproximadamente 30% a 40% dos pacientes com CCR (Haigis, 2017), sendo mais frequentemente observadas nos códon 12 e 13 do gene. As principais mutações que ocorrem no códon 12 incluem a mudança do aminoácido glicina nesta posição para o ácido aspártico (p.G12D), mudança da glicina para valina (p.G12V) ou mudança para cisteína (p.G12C). Já no códon 13, a mutação mais frequente é o c.38G>C, resultando na mudança do aminoácido glicina para o ácido aspártico (p.G13D) (Kampman et al., 2000; Lièvre et al. 2010; Sameer et al. 2009).

Pacientes com *KRAS* mutado normalmente estão associados a um estado avançado da doença, má diferenciação tumoral, metástases à distância e baixa sobrevida (Zhu et al., 2021). Somado a isso, tais mutações têm sido diretamente relacionadas à resistência aos anticorpos monoclonais anti-EGFR (panitumumabe e cetuximabe), devido a ativação constitutiva da via de sinalização à jusante independente de EGFR (Huang et al., 2018).

A instabilidade de microssatélites (MSI) também participa do processo de carcinogênese colorretal, servindo como um indicador molecular de reparo defeituoso de incompatibilidade de DNA. A MSI ocorre por um defeito na atividade do sistema de reparo de incompatibilidade do DNA. Tal sistema é composto por genes como o homólogo mut-L (*MLH1*), homólogo mut-S 2 (*MSH2*), homólogo humano Mut-S 6 (*MSH6*) e o gene de segregação pós-meiótica humana 2 (*PSM2*) que reconhecem e corrigem bases mal incorporadas durante a replicação do DNA. Qualquer inconsistência nesse sistema, quando comparada ao tecido normal, é referida como MSI resultante de uma falha do mecanismo de reparo de incompatibilidade em corrigir erros de base de DNA (Raskov et al., 2020).

Aproximadamente 15% dos CCR apresentam MSI, sendo 3% dos casos associados à síndrome de Lynch, caracterizada por mutações germinativas nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*; e os outros 12% são de CCR esporádico, caracterizado por mutações no gene homólogo B1 do oncogene do sarcoma murino viral v-raf (*BRAF*) e por hipermetilação do gene *MLH1* (Afrăsânie et al., 2019).

A alta carga mutacional tumoral e a carga de neoantígenos nos tumores MSI favorecem a infiltração de células efetoras imunes, como linfócitos infiltrantes de tumor CD8+, células T *helper* 1 CD4+ e macrófagos, resultando em respostas imunes antitumorais. A fim de promover o escape imunológico, as células tumorais MSI regulam positivamente os ligantes inibitórios de células T, como o PD-L1 e CTLA-4 (Battaglin et al., 2018; Fan et al., 2021; Frank et al., 2021; Zhang et al., 2022).

A presença de células imunes em CCR MSI apoia a noção de que um tratamento baseado em imunoterapias deve proporcionar benefícios clínicos para esse grupo de pacientes. Desse modo, a utilização de técnicas que identificam a MSI auxilia na tomada de decisão frente ao regime terapêutico, uma vez que os pacientes que apresentam esse tipo de tumor, são beneficiados com uso de anticorpos monoclonais imunomoduladores, como os inibidores de checkpoint anti-PD1

pembrolizumabe ou nivolumabe, associado ou não ao inibidor do antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4), como o ipilimumabe (Picard et al., 2020; Martianov et al., 2023).

Além das principais vias de carcinogênese do CCR, a ligação da quimiocina 12 da família C-X-C (CXCL12) com o receptor 4 da família C-X-C (CXCR4) tem recebido atenção considerável no CCR primário e principalmente no processo metastático. A expressão aberrante do CXCR4 foi encontrada durante a malignidade do CCR, onde desempenha um papel crucial na proliferação, angiogênese e disseminação metastática (Ottiano et al., 2020). Estudos demonstram que a expressão de CXCR4 aumenta com os estágios clínicos do CCR (Yoshuantari et al., 2018; Zielińska; Katanaev, 2020). Além disso, a superexpressão do receptor reflete a progressão da doença e, portanto, está associada à agressividade do tumor, diminuição da sobrevida e mau prognóstico (Shi; Riese; Shen, 2020).

Apesar da complexa carcinogênese, o CCR é potencialmente curável. O atual tratamento tem como base a presença de marcadores como MSI, *KRAS* e *BRAF*, além do estadiamento da doença, fatores relacionados ao paciente (idade e presença de comorbidades) e com os perfis de eficácia e toxicidade dos medicamentos (Kim et al., 2015).

A terapia consiste principalmente na ressecção cirúrgica para tumores iniciais, radioterapia e quimioterapia (Benson et al., 2021). Já para tumores metastáticos, são indicados o uso anticorpos monoclonais anti-EGFR (cetuximabe e panitumumabe), anti-VEGF (bevacizumabe), inibidores de *BRAF*^{V600E} (encorafenibe) e de imunoterapias que visam pontos de controle imunológico, como pembrolizumabe, nivolumabe e ipilimumabe (Shin; Giancotti; Rustgi, 2023). Como pode-se observar, além dos regimes terapêuticos clássicos, a imunoterapia e os regimes de terapia direcionados estão se tornando cada vez mais importantes no cenário de tratamento do CCR metastático, auxiliando no aumento da progressão livre de doença e da sobrevida global desses pacientes (Benson et al., 2021; Potocki et al., 2023).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto clínico das mutações nos códons 12 e 13 do gene *KRAS* e nos códons 19 e 21 do gene *EGFR*, perfil MSI e da expressão do receptor CXCR4 em pacientes com CCR.

2.2 Objetivos específicos

- Detectar mutações nos códons 12 e 13 do gene *KRAS* e nos códons 19 e 21 do gene *EGFR* em pacientes com CCR;
- Identificar possíveis correlações e/ou associações entre as mutações genéticas avaliadas e a presença de MSI;
- Avaliar a expressão proteica do CXCR4 e analisar suas possíveis correlações e/ou associações entre as mutações genéticas avaliadas e os dados clinicopatológicos;
- Identificar possíveis correlações e/ou associações entre o *status* mutacional e os dados clinicopatológicos dos pacientes com CCR.

3 METODOLOGIA

3.1 Seleção e Caracterização das Amostras

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (Registro Plataforma Brasil No. CAAE 73557317.0.0000.5231) e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes da coleta.

Tratou-se de um estudo transversal, no qual foram selecionadas 66 amostras de pacientes de ambos os sexos, diagnosticados com CCR e atendidos no Hospital do Câncer de Londrina (HCL).

Considerou-se elegível para a pesquisa os pacientes com neoplasia de cólon direito, esquerdo e reto, independentemente do recebimento ou não de quimioterapia, uso de anticorpos monoclonais ou radioterapia prévia. As amostras incluídas em parafina cuja extração de DNA não suscitou quantidade suficiente de material genético, foram excluídas do estudo.

A expressão das proteínas de reparo de incompatibilidade do DNA (MSH6, MSH2, MLH1 e PSM2) foi realizada no HCL por meio de técnica imuno-histoquímica. Os resultados foram obtidos a partir de consulta aos prontuários dos pacientes. Os dados clínicos e anatomopatológicos como idade, sexo, acometimento de linfonodos, tamanho tumoral e estadiamento Tumor-Nódulo-Metástase (TNM) (NCCN, 2018), também foram obtidos a partir dos prontuários dos pacientes atendidos no HCL.

3.2 Extração de DNA

O DNA genômico das amostras foi extraído a partir de tecido tumoral incluído em parafina utilizando o kit de extração *QIAamp® DNA FFPE Tissue*, seguindo instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria em aparelho *NanoDrop 2000c® Spectrophotometer* (ThermoScientific, Wilmington, Delaware, EUA) nos comprimentos de onda 260/280nm.

3.3 Análise das mutações nos códons 12 e 13 do gene *KRAS*

A análise das mutações somáticas nos códons 12 e 13 de foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida de análise de polimorfismo de comprimento de restrição (RFLP), de acordo com o protocolo descrito por Nollau et al. (1996). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para ambas as mutações, estão descritos na tabela 1.

Na etapa de amplificação por PCR para a análise de ambas as mutações foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes: 1x PCR *buffer*, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,3 µM de cada *primer*, 0,04 U/µL de Taq DNA polimerase (todos adquiridos da Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA), 5 ng/µL de DNA alvo e água ultrapura para completar 15 µL de volume final. As condições de PCR foram as seguintes: 5 minutos a 95 °C seguidos de 40 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 50 °C e 2 minutos a 72 °C seguidos de 10 minutos de extensão final a 72 °C.

Para a etapa de restrição enzimática, foram seguidos os protocolos dos fabricantes das enzimas de restrição (Invitrogen®), BstNI (sítio de restrição: 5'-CCWGG-3') para o códon 12 de *KRAS* e a BglII (sítio de restrição: 5'-GCCN5GGC-3'), para o códon 13 de *KRAS* (Tabela 1). Os fragmentos amplificados por PCR e clivados com enzimas foram visualizados por eletroforese em géis de poliacrilamida (10%), corados por nitrato de prata (AgNO₃) (Figura 1A).

3.4 Análise das mutações nos códons 19 e 21 do gene *EGFR*

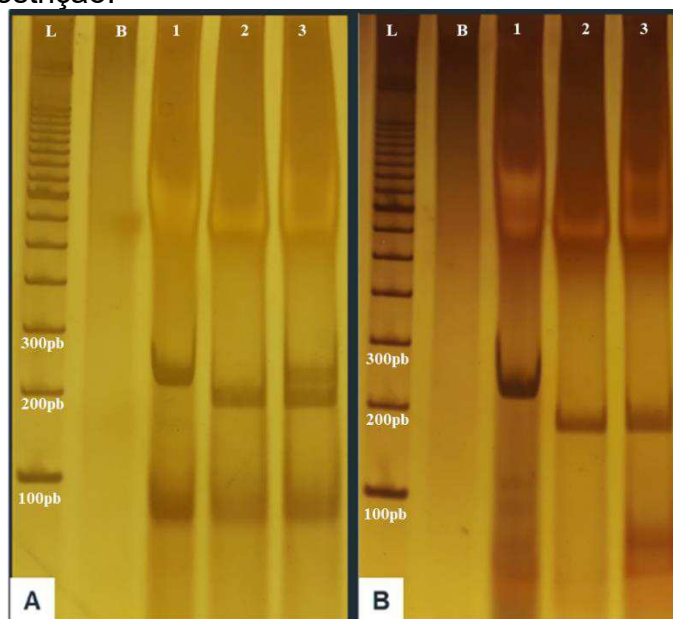
A análise da mutação do *EGFR* nos códons 19 (dels746-750) e 21 (L858R) foram realizadas por PCR de acordo com o protocolo descrito por Pam et al. (2005). Para a mutação no códon 21, foi realizada técnica de RFLP após a amplificação. Já para a mutação no códon 19, por tratar-se de uma deleção, não foi realizada etapa de restrição enzimática. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para ambas as mutações estão descritos na tabela 1.

As concentrações de reagentes utilizadas para a etapa de amplificação por PCR seguiram o mesmo protocolo das mutações nos códons 12 e 13 de *KRAS*. As condições de PCR para o códon 19 foram as seguintes: 10 minutos a 95 °C seguidos de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C e 1 minuto a 72 °C seguidos de 10 minutos de extensão final a 72 °C. Já as condições de PCR para o códon 21

foram: 10 minutos a 95 °C seguidos de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 65 °C e 1 minuto a 72 °C seguidos de 10 minutos de extensão final a 72 °C.

Para a etapa de restrição enzimática do códon 21, foram seguidos os protocolos de recomendações dos fabricantes da enzima de restrição Sau96I (G'GNC'C) (Invitrogen®) (Tabela 1). Os fragmentos amplificados por PCR e clivados com enzimas foram visualizados por eletroforese em géis de poliacrilamida (10%), corados por nitrato de prata (AgNO_3) (Figura 1B).

Figura 1: Gel de poliacrilamida dos fragmentos amplificados por PCR e clivados com enzimas de restrição.



Legenda: A) Gel de eletroforese para *KRAS* 12 e 13 - O produto da PCR é um fragmento de 194pb (1). Nos pacientes que não tem mutação, ocorre à clivagem do fragmento 194pb, sendo observado, portanto, um fragmento em 163pb (2). Já nos pacientes em que a mutação está presente, ocorre perda do sítio de restrição, portanto, quando a enzima é adicionada, não ocorre clivagem do fragmento de 194pb (3). B) Gel de eletroforese para *EGFR* 21 - O produto da PCR é um fragmento de 222 pb (1). Nos pacientes em que a mutação está presente, ocorre à clivagem do fragmento 173pb, sendo observado, portanto, um fragmento em 87pb e 86pb (3). L – ladder 100pb; B – branco.

Tabela 1: Sequência de *primers* para as mutações em *KRAS* e *EGFR*.

Gene	Sequência	pb ¹	Enzima de Restrição	FRAGMENTOS DOS GENÓTIPOS (pb ²)		
				Selvagem	Mutado Heterozigoto	Mutado Homozigoto
KRAS 12	F: 5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3' R: 5'-ACTCATGAAAATGGTCAGAGAAACCTTTAT-3'	194	BstNI	163	194, 163	194
KRAS 13	F: 5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGCCCTGGT-3' R: 5'-ACTCATGAAAATGGTCAGAGAAACCTTTAT-3'	194	BglI	163	194, 163	194
EGFR 19	F: 5'-GCACCATCTCACAATTGCCAGTTA-3' R: 5'-AAAAGGTGGGCCTGAGGTTCA-3'	207	-	207	207, 198, 195, 192, 189	198, 195, 192, 189
EGFR 21	F: 5'- CCTCACAGCAGGGTCTTCTCTGT -3' R: 5'-TCAGGAAAATGCTGGCTGACCTA-3'	222	Sau96I	173, 49	173, 87, 86, 49	87, 86, 49

Legenda: F – Forward; R – Reverse; pb – pares de base após reação em cadeia da polimerase; pb² – pares de base após etapa de restrição enzimática.

3.5 Sequenciamento

Os produtos de PCR para os códons 12 e 13 de *KRAS* e códons 19 e 21 de *EGFR* foram purificados utilizando PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen®), seguindo as instruções do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o *kit BigDye® Terminator v3.1* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), 50ng de *template* e 5pM de *primer* em um volume final de 10µl. Os fragmentos amplificados foram sequenciados em *Genetic Analyzer 3500XL 24 capilares* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) para validação do método de PCR-RFLP.

3.6 Análise da Expressão de CXCR4

A análise da expressão de CXCR4 foi realizada por meio de imunohistoquímica, na qual foram utilizados cortes histológicos de 5µm de tecido tumoral embebidos em blocos de parafina. As secções de tecidos foram desparafinadas, hidratadas e tratadas termicamente em tampão EDTA 1 mM para recuperação antigênica em panela de pressão a 95, 8 °C durante 20 minutos.

As secções foram incubadas durante a noite à temperatura ambiente com anticorpo monoclonal primário-IgG de coelho anti-CXCR4 (R&D System, Minneapolis, MN, cat. MAB172, 1:100), seguido de incubação com anticorpo secundário apropriado (ImmunoDetector HRP/DAB, BioSB, Santa Bárbara, CA, EUA). Os cortes foram lavados, corados com cromógeno 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e contra corados com hematoxilina (Sigma-Aldrich). Um controle negativo passou pela primeira etapa do procedimento por incubação com o diluente em vez do anticorpo primário.

As lâminas histológicas foram analisadas ao microscópio óptico por um patologista experiente. Para cada amostra, três áreas tumorais com maior intensidade de imunomarcação CXCR4 foram fotografadas (800 × 600 pixels) a partir de campos de ampliação de 400X usando uma câmera Amscope (FMA050) adaptada no microscópio.

As imagens adquiridas digitalmente foram então analisadas usando o software ImageJ 1.53 para Windows (software de imagem Java de domínio público: [//rsb.info.nih.gov/ij/](http://rsb.info.nih.gov/ij/)), usando a ferramenta de limite com seleção baseada em cores

para coloração positiva. Rotinas para análise de imagens foram definidas na linguagem macro ImageJ e realizadas em imagens RGB sem tratamento adicional. O número de pixels na faixa de cores selecionada foi dividido pelo número total de pixels em cada campo. Os resultados foram expressos pela relação entre a fração de área positiva por fração de área total como a porcentagem (%) de coloração com CXCR4.

3.7 Análise Estatística

As análises foram realizadas por meio do programa SPSS versão 22 (IBM®, Armonk, Nova York, NY, EUA), com índice de significância mínimo de $p < 0,05$.

Inicialmente, os dados patológicos foram demonstrados em uma tabela descritiva, onde o número de linfonodos regionais e o tamanho tumoral foram classificados de acordo com o estadiamento TNM. Já as proteínas de reparo do DNA foram consideradas positivas em casos de expressão das mesmas por meio de técnica de imuno-histoquímica e negativas em casos de deficiência no sistema de reparo de incompatibilidade do DNA.

Os dados referentes a idade dos pacientes foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Por não serem paramétricos, os mesmos foram apresentados como mediana e intervalo interquartil. Para as análises de correlação entre as mutações nos genes *KRAS* e *EGFR*, a expressão do receptor CXCR4, perfil MSI e os parâmetros clinicopatológicos, foi utilizado o coeficiente Tau de Kendall. Os resultados da expressão de CXCR4 obtidos a partir de tecido tumoral foram divididos em dois grupos: CXCR4_S e CXCR4_I. O grupo CXCR4_S representou a análise de intensidade de marcação realizada ao microscópio óptico por patologista experiente. Já as imagens adquiridas digitalmente e analisadas pelo software ImageJ, compuseram o grupo CXCR4_I.

4 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo foram apresentados e discutidos em três artigos científicos.

O primeiro artigo intitulado “**Involvement of CXCL12/CXCR4 axis in colorectal cancer: a mini-review**” foi publicado no periódico científico *Molecular Biology Reports* (Fator de Impacto: 2,8).

- **Artigo 1:**

Molecular Biology Reports (2023) 50:6233–6239
<https://doi.org/10.1007/s11033-023-08479-1>

MINI REVIEW ARTICLE



Involvement of CXCL12/CXCR4 axis in colorectal cancer: a mini-review

Mayara Bocchi¹ · Nathália de Sousa Pereira¹ · Karen Brajão de Oliveira^{1,2} · Marla Karine Amarante¹

Received: 19 January 2023 / Accepted: 19 April 2023 / Published online: 23 May 2023
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2023

Abstract

Migration of metastatic tumor cells is similar to the traffic of leukocytes and has been reported that can be guided by chemokines and their receptors, through the circulation to distant organs. The chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 play an essential role in hematopoietic stem cell homing and the activation of this axis supports malignant events. Binding of CXCL12 to CXCR4 activates signal transduction pathways, with broad effects on chemotaxis, cell proliferation, migration and gene expression. Thus, this axis serves as a bridge for tumor-stromal cell communication, creating a permissive microenvironment for tumor development, survival, angiogenesis and metastasis. Evidence suggests that this axis may be involved in the colorectal cancer (CRC) carcinogenesis. Therefore, we review emerging data and correlations between CXCL12/CXCR4 axis in CRC, the implications for cancer progression and possible therapeutic strategies that exploit this system.

Keywords Chemokines · Chemokine receptors · Colorectal cancer · CXCL12 · CXCR4

Involvement of CXCL12/CXCR4 axis in colorectal cancer: a mini-review

Mayara Bocchi¹, Nathália de Sousa Pereira¹; Karen Brajão de Oliveira¹; Marla Karine Amarante^{1*}

¹Department of Pathological Sciences, Biological Sciences Center, Londrina State University, PR445, Km 380 Celso Garcia Cid highway, Londrina, PR 86057-970, Brazil

***Corresponding author:** Prof. Dr. Marla Karine Amarante

Department of Pathological Sciences, Biological Sciences Center, Londrina State University, PR445, Km 380 Celso Garcia Cid highway, Londrina, PR 86057-970, Brazil. Telephone: +55 43 3371-5630.

Email: marla@uel.br

ORCID:

Mayara Bocchi: 0000-0001-6609-7683

Nathália de Sousa Pereira: 0000-0001-7292-9861

Karen Brajão de Oliveira: 0000-0001-9666-6963

Marla Karine Amarante: 0000-0001-8218-8518

Abstract

Migration of metastatic tumor cells is similar to the traffic of leukocytes and has been reported that can be guided by chemokines and their receptors, through the circulation to distant organs. The chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 play an essential role in hematopoietic stem cell homing and the activation of this axis supports malignant events. Binding of CXCL12 to CXCR4 activates signal transduction pathways, with broad effects on chemotaxis, cell proliferation, migration and gene expression. Thus, this axis serves as a bridge for tumor-stromal cell communication, creating a permissive microenvironment for tumor development, survival, angiogenesis and metastasis. Evidence suggests that this axis maybe involved in the colorectal cancer (CRC) carcinogenesis. Therefore, we review emerging data and correlations between CXCL12/CXCR4 axis in CRC, the implications for cancer progression and possible therapeutic strategies that exploit this system.

Keywords Chemokines, Chemokine receptors, Colorectal cancer, CXCL12, CXCR4.

Introduction

Cancer is characterized by unregulated proliferation of host cells, arising from alterations in cell physiology, such as: sufficiency in relation to growth factors, insensitivity to growth inhibitors, evasion of apoptosis and the immune system, dysregulation of energy metabolism, genomic instability, phenotypic plasticity, epigenetic reprogramming, tissue invasion and development of metastases [1, 2]. Although the tumor cell represents the main focus in the development of a neoplasm, it is important to consider that the tumor mass is not composed only of neoplastic cells, but of a set of tumor cells, mesenchymal cells and components of the vascular and immune system, which contribute substantially to carcinogenesis, tumor progression and metastasis of transformed cells [3].

Evidence indicates that interactions between tumor cells and stromal cells contribute to tumor initiation and progression. In this process, the role of chemokines and their receptors is highlighted, which can serve as a

bridge for tumor-stromal cell communication, creating a permissive microenvironment for tumor growth and metastasis [4], sometimes facilitating tumor dissemination in each of the events of the process, including adherence of tumor cells to the endothelium, extravasation into blood vessels, metastatic colonization, angiogenesis, proliferation and protection against host response through activation of cell survival pathways [5, 6].

Bowel cancer encompasses tumors that start in the part of the large intestine: colon, rectum and anus. It is also known as colon and rectum or colorectal cancer (CRC). This cancer is the third most common cancer type worldwide; in 2020, almost 2 million cases were diagnosed. It is the second most common cause of cancer death, leading to almost 1 million deaths per year [7]. Although environmental and genetic factors play an important role in the pathogenesis of CRC, research suggests the involvement of chemokines and their receptors in the development of colon cancer [8, 9].

Binding of the C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12) with its C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4) has been associated with several types of malignant neoplasms [10–13]. Studies have demonstrated increased expression of CXCR4 during CRC malignancy [14, 15]. However, despite contributing to tumor development and maintenance, the signaling mechanism through CXCR4 may be clinically relevant for CRC patients and represents a potential target for disease-directed therapy [16, 17].

Chemokines and their receptors

Chemokines are a large family of structurally homologous cytokines responsible for inducing chemotaxis, through binding to a receptor. They are divided into subfamilies according to the number and position of cysteine residues in the N-terminal portion: C, CC, CXC, and CX₃C, where C represents the cysteine molecule and X or X₃ refer to the number of variable amino acid residues separating these cysteines [18].

Produced by different cell types, both constitutively and after induction stimuli, chemokines exert their effects in an autocrine or paracrine manner, acting via G protein-coupled receptors [19]. In addition to its chemotactic activity, stimulating the migration of immune, endothelial, mesenchymal stem and malignant epithelial cells [20], chemokines have other functions, such as participating in embryonic development, acting in hematopoiesis, angiogenesis, lymphocyte development, cell maturation and directing the movement of mononuclear cells through the blood [21].

Chemokines are also gaining scientific prominence because of their crucial roles in diseases development and pathological processes, such as inflammation, autoimmune and infectious diseases, like in human immunodeficiency virus (HIV) infection and in cancer [5, 6]. They are considered key mediators for tumor growth, angiogenesis, metastases and cellular recruitment for the composition of the tumor microenvironment [20].

Chemokines mediate their functions in target cells through their receptors, which are composed of transmembrane G protein-coupled receptors. In general, they are 320 to 380 amino acids in length and show significant sequence homology. In addition, receptors have an N-terminal portion on the outside of the cell surface, 3 intracellular loops, 3 extracellular loops and a C-terminal portion in the cytoplasm [22]. The binding of chemokines to their ligands triggers conformational alterations in the receptor that culminate in the activation of the G protein. In this way, the subunits of this protein dissociate, leading to the activation of several signal transduction pathways [19, 21].

Receptors are classified as CC, CXC, CX3C, or XC according to the subfamily of their ligands, followed by the letter R (receptor) and a number that reflects the order of their discovery [22]. Furthermore, the receptors are divided into two groups: G-protein-coupled chemokine receptors, which act in several signal transduction pathways, and atypical chemokine receptors, that appear to remove chemokines and contribute to the control of inflammation in a G protein-independent manner [16].

The CXCL12/CXCR4 axis

Among the chemokines, we can highlight the role of CXCL12 in tumor progression and metastasis. Its gene, *CXCL12*, is located at position 10q11.1 and was first cloned into a bone marrow-derived cell line and later identified as pre-B cell growth stimulating factor (PBSF) [23]. Also called stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), this chemokine is constitutively produced in the bone marrow by immature osteoblasts and endothelial cells, as well as by epithelial cells in various organs, such as the lung, liver, adrenal glands and lymphnodes [24].

CXCL12 has six isoforms (CXCL12 α to ϕ) derived from alternative splicing, with CXCL12 α and CXCL12 β being the most widely studied subtypes. The α isoform is increased in tissue damage but is rapidly degraded in the blood. In addition, it is the main form secreted by bone marrow cells and endothelial cells, found in almost all organs. The β isoform is more resistant to degradation, stimulates angiogenesis and is present in highly vascularized organs such as liver, spleen and kidney [16].

Literature data suggest that CXCL12 acts as a modulator of cell growth and survival by binding to its receptor, CXCR4, playing a key role in the homing of stem and hematopoietic progenitor cells. The gene encoding CXCR4 is located on chromosome 2q2 and is expressed in dendritic cells, naive T cells, natural killer cells and monocytes [25]. In addition, the production of this chemokine in the initial stage of the disease aids in the process of angiogenesis and in the growth of tumor cells, while in more advanced stages, production decreases in order to avoid the recruitment of cytotoxic lymphocytes and increases the metastatic potential of tumor cells [26], being implicated in the spread of malignant tumors from the primary site, transendothelial migration of tumor cells and homing of precursor tumor cells [27]. The expression of CXCR4 in malignant cells indicates that the CXCL12/CXCR4 axis can influence tumor biology and play a key role in directing metastasis of CXCR4+ tumor cells towards organs that express CXCL12 [28].

The CXCL12/CXCR4 interaction was believed to be unique, until the description of another receptor, CXCR7, with a strong affinity for CXCL12 [29]. CXCR7 is part of the G protein-coupled cell surface receptor family and is also associated with tumor cell survival, migration, adhesion, angiogenesis and metastasis [25]. CXCR7-mediated activation of intracellular signals remains controversial since, unlike typical chemokine receptors, CXCR7 does not activate heterotrimeric G proteins [16]. The CXCR7 sequence presents a small modification and when bound to CXCL12, there is no increase in intracellular Ca²⁺ release, an essential step in the recruitment and activation of G proteins [30]. The CXCR7 receptor is reported to be highly expressed in many tumors and tumor-associated blood vessels, including cancers of the liver, colon, pancreas, prostate and lungs [16, 31–33]. In CRC, its role in tumorigenesis probably occurs by means of histone demethylation, through the formation of heterodimers with CXCR4 [34]. Furthermore, overexpression of CXCR7 is significantly correlated with the presence of distant metastasis, advanced TNM stage, reduced overall survival and disease-free survival in patients with CRC [35].

Actuation of the CXCL12/CXCR4 axis in the CRC

The CXCL12 chemokine acts in cancer biology by two main mechanisms. The first is related to direct autocrine effects, through the activation of signaling pathways that promote tumor cell growth, metastasis and angiogenesis. The second occurs through indirect effects, where high levels of CXCL12 in tumors attract CXCR4+ inflammatory, vascular and stromal cells to the tumor mass. This favorable microenvironment supports tumor growth through the secretion of growth factors, cytokines, chemokines and pro-angiogenic factors, so an indirect effect is that CXCR4+ tumor cells can be recruited to CXCL12-rich mesenchymal stromal niches to initiate metastasis [4], which can be seen in CRC [28]. Overall, a high CXCR4 expression is clearly associated with an advanced stage of the tumor, an increased risk of recurrence and distant metastases and poor overall survival of CRC [13], with an increased risk of death and progression in patients (Figure 1) [17].

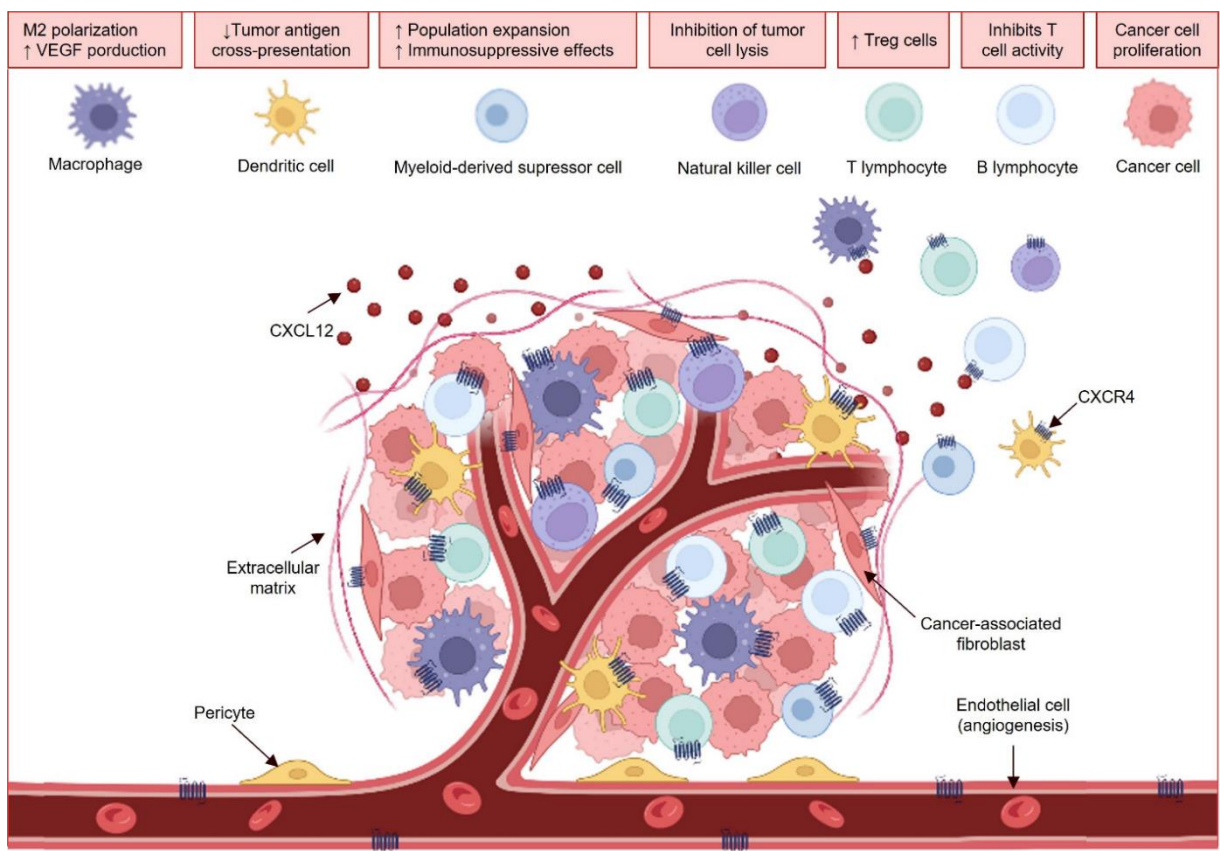


Fig. 1 The tumor microenvironment in CRC. The tumor microenvironment includes both the cellular components surrounding the tumor mass such as immune cells, fibroblasts and epithelial cells and the acellular components including the extracellular matrix and blood vessels. Cancer cells release molecules (CXCL12) that modulate the TME and contribute to cancer growth through immune evasion, metastatic niche formation, neoangiogenesis among other functions that contribute to the hallmarks of cancer. “Created with BioRender.com.”

The CXCL12/CXCR4 axis can be regulated by epigenetic, transcriptional and post-transcriptional factors. Regulation of CXCL12/CXCR4 expression by promoter hypermethylation is common in cancer and studies show that the *CXCL12* gene modulates metastatic potential, where it controls its own regulation in an autocrine loop [4]. CRC tumor cells can also undergo DNA hypermethylation at the *CXCL12* promoter, resulting in an imbalance in CXCL12/CXCR4 expression. In this way, tumor cells that lack CXCL12 expression but maintain overexpression of CXCR4 can selectively spread to target organs in which CXCL12 is highly secreted [36, 37].

CXCL12 significantly increases several genes associated with angiogenesis in tumor cells, such as the *IL-6* gene [10]. In CRC, IL-6 activates the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT3) to promote tumor initiation and tumor growth. Thus, the IL-6/STAT3 pathway activates target genes to protect tumor cells from apoptosis, promote angiogenesis and drive tumor cell proliferation, cell cycle progression, invasion and metastasis [38].

Studies demonstrate that transcription factors, such as NF- κ B, Sp1 and C/EBP- β can be activated through mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways in CRC cells [39]. Tung et al. [40] proposed a relationship between this signal transduction pathway, the chemokine CXCL12 and the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). According to the authors, CXCL12 induces extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation, c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38, which consequently activates NF- κ B, Sp1 and C/EBP- β , leading to their binding to the respective sites on the *ICAM-1* promoter, thus resulting in the transcriptional activation of ICAM-1, facilitating the adhesion of cancer cells to the vascular endothelium and later the promotion of metastases.

The increase in NF- κ B mediated by the activation of the MAPK pathway can also occur by stimulation of an external factor, such as visfatin, an adipokine produced by adipose tissue. Huang et al. [41] suggest that visfatin induces the expression of CXCL12 through the activation of β 1 integrin, the ERK and p38 intracellular signaling cascades, and the NF- κ B transcription factors and activator protein 1 (AP-1), thus contributing to the progression of CRC. In addition, lipopolysaccharides (LPS), normally produced by the microbiota, also use NF- κ B signaling to induce CXCR4 expression in tumor cells, promoting epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis in the CRC [39, 42].

A study by Hu et al. [43] demonstrated a cross-relationship between the CXCL12/CXCR4 and Wnt/ β -catenin axis in the CRC, where the CXCR4 receptor could aid in disease progression, invasion and the EMT through the activation of this signaling pathway. Constitutive activation of the Wnt/ β -catenin pathway in CRC can occur through aberrant secretion of Wnt factors or a mutation in the *adenomatous polyposis coli (APC)* gene [44].

Activation of CXCL12 indirectly exerts anti-apoptotic effects on tumor cells. The CXCL12/CXCR4 axis activates serine-threonine kinase (AKT) and ERK, leading to the accumulation of NF- κ B. Accumulation of this transcription factor can suppress apoptotic signaling. In addition, CXCL12 can suppress tumor cell apoptosis by inducing the MAPK-ERK and PI3K pathways, which inactivate the pro-apoptotic protein Bcl-2-associated cell death agonist (BAD), leading to upregulation of the anti-apoptotic gene *Bcl-2* [25, 45].

A hypoxic tumor microenvironment also favors tumor progression during carcinogenesis through upregulation of CXCR4 expression in tumor cells by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), a heterodimeric transcription factor that responds to tissue oxygen concentrations. Thus, in hypoxic regions of expanding tumors, CXCR4 levels can be increased to facilitate tumor survival and invasion [14, 46]. Figure 2 presents the main mechanisms of action of the CXCL12/CXCR4 axis in the CRC.

Therapeutic strategies targeting the CXCL12/CXCR4 axis in CRC

This axis is directly involved in the progression of cancer, which, therefore, have an important role in the signaling net-work, attracting great interest on the part of researchers in exploring therapeutic measures for this target. Thus, studies are seeking inhibitory or antagonist molecules of CXCR4 and CXCL12 that can be used in the treatment of various types of tumors, including CRC [16, 47].

The first therapy targeted at CXCR4 was AMD3100 (Plerixafor), which acts as an antagonist by binding to the CXCR4 receptor, preventing the conformational change necessary to activate intracellular kinases [48]. In addition, its mechanism of action may be related to the mobilization of CD34+ hematopoietic progenitor cells (HPCs), an increase in circulating neutrophils, lymphocytes and monocytes, a reduction in myeloid-derived suppressor cells and increased infiltration of cytotoxic T cells into tumors [47]. Because of these functions, its use was cleared by the Food and Drug Administration (FDA) in 2008 to mobilize HPCs cells for autologous transplantation in patients with non- Hodgkin lymphoma and multiple myeloma [49].

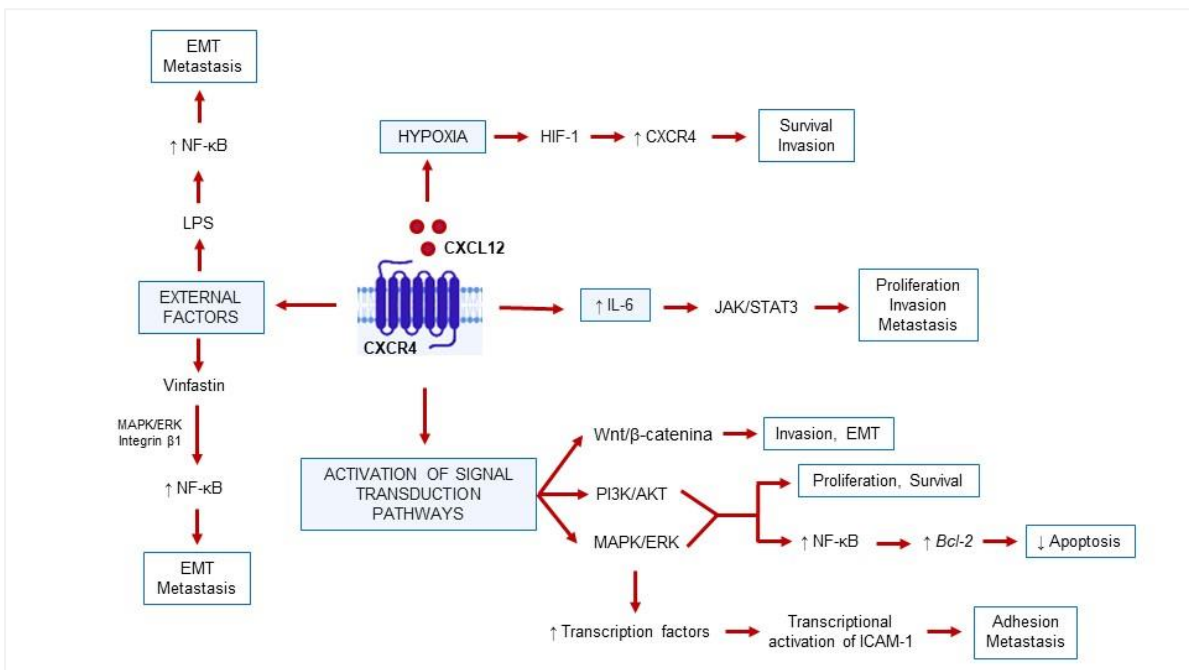


Fig. 2 CXCL12/CXCR4 signaling pathway. *Bcl-2* - anti-apoptotic gene; EMT – Epithelial-to-mesenchymal transition; MAPK – mitogen-activated protein kinase; ERK – extracellular signal-regulated kinase; PI3K – phosphatidylinositol-3-kinase; AKT - serine-threonine kinase; JAK/STAT - Janus kinase /signal transducer and activator of transcription; IL-6 – interleukin 6; ICAM-1- Intercellular Adhesion Molecule 1; NF-κB – nuclear factor kappa B; LPS - Lipopolysaccharide; HIF-1 – hypoxia-inducible factor 1.

Recent studies have shown that AMD3100 can inhibit tumor growth and metastasis, in addition to acting as a potent immunomodulator to enhance antitumor immune responses and prevent the development of a multifaceted immunosuppressive intratumoral microenvironment [50]. Fearon, Janowitz [51] showed that infusion of AMD3100 in patients with CRC for only 1 week induced intratumoral immune responses that involved multiple mediators and cells of both innate and adaptive immune responses. According to the authors, inhibition of CXCR4 by AMD3100 in patients with CRC allowed their pre-existing anticancer immune responses to overcome intratumoral immunosuppression mediated by CXCL12, through increased expression of genes whose products mediate cytotoxicity by CD8+ T cells, that correlate with decreased expression of genes characteristic of tumor cells. Biasci

et al. [52] also demonstrate that continuous administration of AMD3100 promotes an integrated immune response in metastatic lesions of patients with CRC.

Another drug under clinical study is LY2510924, which also acts as a potent and selective antagonist of CXCR4 [53]. LY2510924 showed dose-dependent inhibition of tumor growth in human xenograft models developed with non-Hodgkin's lymphoma, renal cell carcinoma, lung cancer cells and CRC expressing functional CXCR4. Furthermore, its mechanism of action involves the inhibition of the CXCL12/CXCR4 interaction, with consequent blocking of signaling [54]. In addition, several clinical studies show that the administration of LY2510924 was associated with a significant increase in CD34⁺HSCs and leukocytes in circulation [55, 56].

The CXCL12 chemokine has also been studied as a possible therapeutic target in different types of tumors, including CRC. CXCL12 acts as a communication bridge between tumor cells and their environment and may confer resistance to *checkpoint* inhibitors by excluding T cells in preclinical models. Studies show that the use of molecules that interfere with the mechanisms of failure of cytotoxic T cells to physically reach tumor cells can support combined cancer immunotherapy treatments [57, 58].

Evidence indicates that inactivation of CXCL12 by Olaptased Pegol (NOX-A12) induces alterations in the tumor microenvironment of patients with CRC and pancreatic cancer, making tumors more susceptible to immunological approaches, such as checkpoint inhibition by anti-PD-1. NOX-A12 is an L-configured aptamer (Spiegelmer) that binds to CXCL12 with high affinity and specificity, blocking the CXCL12/CXCR4 axis. Thus, inhibition of CXCL12 leads to an increase in the infiltration of T cells and natural killer (NK) cells into the tumor [58, 59].

A phase I/II clinical trial (NCT03168139) evaluated the effects of a combination treatment with NOX-A12 and anti-PD-1 in patients with later-line CRC and pancreatic ductal adenocarcinoma [60]. According to the authors, the new approach of specifically inhibiting CXCL12 through a Spiegelmer showed activity alone and in combination with anti-PD-1 in these patients, where the mechanisms of NOX-A12-mediated transformation of the tumor immune micro-environment included the migration of T and NK cells into the tumor.

New molecules targeting the CXCL12/CXCR4 axis have been proposed as possible therapies for CRC. D'Alterio et al. [61] demonstrated in a preclinical trial that the newly developed CXCR4 antagonist, Peptide R (Pep R) is able to improve the efficacy of standard CRC therapy targeting cell growth and mesenchymal transition, through inactivation of CXCR4.

Therapeutic strategies have focused on the potential of CXCR4 antagonists to enhance the cytotoxic effect of chemotherapy and immunotherapy. Furthermore, future therapies may also involve genome editing technologies to remove harmful "driver mutations" and insert "preventive mutations" on the CXCL12/CXCR4 axis [16].

Conclusion

The CXCL12/CXCR4 plays an important role in the development of several types of malignant neoplasms. Activation of this axis results in the induction of signal transduction pathways, with effects on chemotaxis, cell migration and gene expression. In CRC, increased expression of this axis leads to tumor progression and the development of metastases, with unfavorable disease progression and poor patient survival.

Preclinical and clinical studies have been carried out in order to study several drugs that can inhibit CXCL12/CXCR4 and used in combination with chemotherapy or immunotherapy for the treatment of CRC. In addition, the development of new research involving genome editing technologies may also represent a future strategy, allowing a more effective therapeutic targeting against the disease.

References

- Hanahan D (2022) Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 12(1):31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1059>
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Kerkar SP, Restifo NP (2012) Cellular constituents of Immune escape within the Tumor Microenvironment. *Cancer Res* 72(13):3125–3130. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-11-4094>
- Guo F, Wang Y, Liu J, Mok SC, Xue F, Zhang W (2016) CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. *Oncogene* 35(7):816–826. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.139>
- Singh S, Sadanandam A, Singh R (2007) Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 26(3):453–467. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9068-9>
- Kakinuma T, Hwang ST (2006) Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol* 79(4):639–651. <https://doi.org/10.1189/jlb.1105633>
- IARC: Colorectal Cancer Awareness Month 2022 (2022) Accessed
- Zou Q, Lei X, Xu A, Li Z, He Q, Huang X et al (2022) Chemokines in progression, chemoresistance, diagnosis, and prognosis of colorectal cancer. *Front Immunol* 13:724139. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.724139>
- Braoudaki M, Ahmad MS, Mustafaov D, Seriah S, Siddiqui MN, Siddiqui SS (2022) Chemokines and chemokine receptors in colorectal cancer; multifarious roles and clinical impact. *Semin Cancer Biol* 86(Pt 2):436–449. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.06.002>
- Li M, Lu Y, Xu Y, Wang J, Zhang C, Du Y et al (2018) Horizontal transfer of exosomal CXCR4 promotes murine hepatocarcinoma cell migration, invasion and lymphangiogenesis. *Gene* 676:101–109. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.07.018>
- Mushtaq M, Jensen L, Davidsson S, Grygoruk OV, Andr n O, Kashuba V et al (2018) The MRPS18-2 protein levels correlate with prostate tumor progression and it induces CXCR4-dependent migration of cancer cells. *Sci Rep* 8(1):2268. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20765-8>
- Truong D, Fiorelli R, Barrientos ES, Melendez EL, Sanai N, Mehta S et al (2019) A three-dimensional (3D) organotypic microfluidic model for glioma stem cells – vascular interactions. *Biomaterials* 198:63–77. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.048>
- Zielińska KA, Katanaev VL (2020) The signaling duo CXCL12 and CXCR4: chemokine fuel for breast Cancer tumorigenesis. *Cancers* 12(10):3071
- Yoshuantari N, Heriyanto DS, Hutajulu SH, Kurnianda J, Ghazali A (2018) Clinicopathologic significance of CXCL12 and CXCR4 expressions in patients with colorectal Cancer. *Gastroenterol Res Pract* 2018:9613185. <https://doi.org/10.1155/2018/9613185>
- Zhou Y, Cao H-B, Li W-J, Zhao L (2018) The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 chemokine axis: oncogenic properties, molecular targeting, and synthetic and natural product CXCR4 inhibitors for cancer therapy. *Chin J Nat Med* 16(11):801–810. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(18\)30122-5](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(18)30122-5)
- Khare T, Bissonnette M, Khare S (2021) CXCL12-CXCR4/ CXCR7 Axis in Colorectal Cancer: therapeutic target in preclinical and clinical studies. *Int J Mol Sci* 22(14):7371
- Ottaiano A, Scala S, Normanno N, Botti G, Tatangelo F, Di Mauro A et al (2020) Prognostic and predictive role of CXCR4 chemokine receptor 4 in metastatic colorectal Cancer patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphology* 28(10):755–760. <https://doi.org/10.1097/pai.0000000000000828>
- Miller MC, Mayo KH (2017) Chemokines from a structural perspective. *Int J Mol Sci* 18(10):2088
- Bar-Shavit R, Maoz M, Kancharla A, Nag JK, Agranovich D, Grisaru-Granovsky S et al (2016) G protein-coupled receptors in Cancer. *Int J Mol Sci* 17(8):1320
- Bhusal RP, Foster SR, Stone MJ (2020) Structural basis of chemokine and receptor interactions: key regulators of leukocyte recruitment in inflammatory responses. *Protein Sci* 29(2):420–432. <https://doi.org/10.1002/pro.3744>
- Hughes CE, Nibbs RJB (2018) A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J* 285(16):2944–2971.

- <https://doi.org/10.1111/febs.14466>
22. Lacalle RA, Blanco R, Carmona-Rodríguez L, Martín-Leal A, Mira E, Mañes S (2017) Chapter five - chemokine receptor signaling and the Hallmarks of Cancer. In: Galluzzi L (ed) International Review of Cell and Molecular Biology. Academic Press, pp181–244
 23. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T et al (1995) Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28(3):495–500. <https://doi.org/10.1006/geno.1995.1180>
 24. Janssens R, Struyf S, Proost P (2018) The unique structural and functional features of CXCL12. *Cell Mol Immunol* 15(4):299–311. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.107>
 25. Shi Y, Riese DJ, Shen J (2020) The role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis in Cancer. *Front Pharmacol* 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.574667>
 26. Goïta AA, Guenot D (2022) Colorectal Cancer: the contribution of CXCL12 and its receptors CXCR4 and CXCR7. *Cancers* 14(7):1810
 27. Santagata S, Ieranò C, Trotta AM, Capiluongo A, Auletta F, Guardascione G et al (2021) CXCR4 and CXCR7 signaling pathways: a focus on the Cross-Talk between Cancer cells and Tumor Microenvironment. *Front Oncol* 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.591386>
 28. Teicher BA, Fricker SP (2010) CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in Cancer. *Clin Cancer Res* 16(11):2927–2931. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-09-2329>
 29. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B et al (2005) The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280(42):35760–35766. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508234200>
 30. Wang C, Chen W, Shen J (2018) CXCR7 targeting and its Major Disease Relevance. *Front Pharmacol* 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00641>
 31. Gentilini A, Caligiuri A, Raggi C, Rombouts K, Pinzani M, Lori G et al (2019) CXCR7 contributes to the aggressive phenotype of cholangiocarcinoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - molecular basis of Disease*. 1865(9):2246–2256. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.04.020>
 32. Li X, Wang X, Li Z, Zhang Z, Zhang Y (2019) Chemokine receptor 7 targets the vascular endothelial growth factor via the AKT/ERK pathway to regulate angiogenesis in colon cancer. *Cancer Med* 8(11):5327–5340. <https://doi.org/10.1002/cam4.2426>
 33. Lounsbury N (2020) Advances in CXCR7 modulators. *Pharmaceuticals* 13(2):33
 34. Song Z-Y, Wang F, Cui S-X, Gao Z-H, Qu X-J (2019) CXCR7/CXCR4 heterodimer-induced histone demethylation: a new mechanism of colorectal tumorigenesis. *Oncogene* 38(9):1560–1575. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0519-2>
 35. Zhao Q, Zhang P, Qin G, Ren F, Zheng Y, Qiao Y et al (2018) Role of CXCR7 as a common predictor for prognosis in solid tumors: a Meta-analysis. *J Cancer* 9(17):3138–3148. <https://doi.org/10.7150/jca.25377>
 36. Wendt MK, Johannesen PA, Kang-Decker N, Binion DG, Shah V, Dwinell MB (2006) Silencing of epithelial CXCL12 expression by DNA hypermethylation promotes colonic carcinoma metastasis. *Oncogene* 25(36):4986–4997. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209505>
 37. Zhou W, Jiang Z, Liu N, Xu F, Wen P, Liu Y et al (2009) Down-regulation of CXCL12 mRNA expression by promoter hypermethylation and its association with metastatic progression in human breast carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 135(1):91–102. <https://doi.org/10.1007/s00432-008-0435-x>
 38. Lin Y, He Z, Ye J, Liu Z, She X, Gao X et al (2020) Progress in understanding the IL-6/STAT3 pathway in Colorectal Cancer. *OncoTargets and therapy* 13:13023–13032. <https://doi.org/10.2147/ott.s278013>
 39. Tian X, Xie G, Xiao H, Ding F, Bao W, Zhang M (2019) CXCR4 knockdown prevents inflammatory cytokine expression in macrophages by suppressing activation of MAPK and NF-κB signaling pathways. *Cell & Bioscience* 9(1):55. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0315-x>
 40. Tung S-Y, Chang S-F, Chou M-H, Huang W-S, Hsieh Y-Y, Shen C-H et al (2012) CXCL12 chemokine ligand 12/Stromal cell-derived factor-1 regulates cell adhesion in human colon cancer cells by induction of intercellular adhesion molecule-1. *J Biomed Sci* 19(1):91. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-91>
 41. Huang W-S, Chen C-N, Sze C-I, Teng C-C (2013) Visfatin induces stromal cell-derived factor-1 expression by β1 integrin signaling in colorectal cancer cells. *J Cell Physiol* 228(5):1017–1024. <https://doi.org/10.1002/jcp.24248>
 42. Liu W-T, Jing Y-Y, Yan F, Han Z-P, Lai F-B, Zeng J-X et al (2017) LPS-induced CXCR4-dependent migratory properties and a mesenchymal-like phenotype of colorectal cancer cells. *Cell Adhes Migr* 11(1):13–23. <https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1134404>
 43. Hu T-h, Yao Y, Yu S, Han L-l, Wang W-j, Guo H et al (2014) SDF-1/CXCR4 promotes epithelial-mesenchymal transition and progression of colorectal cancer by activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway. *Cancer Lett* 354(2):417–426. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.08.012>
 44. Bian J, Dannappel M, Wan C, Firestein R (2020) Transcriptional regulation of Wnt/β-Catenin pathway in

- Colorectal Cancer. *Cells*9(9):2125
45. Peng C, Ouyang Y, Lu N, Li N (2020) The NF- κ B signaling pathway, the Microbiota, and gastrointestinal tumorigenesis: recent advances. *Front Immunol* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01387>
 46. Romain B, Hachet-Haas M, Rohr S, Brigand C, Galzi J-L, Gaub M-P et al (2014) Hypoxia differentially regulated CXCR4 and CXCR7 signaling in colon cancer. *Mol Cancer* 13(1):58. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-58>
 47. Wang J, Tannous BA, Poznansky MC, Chen H (2020) CXCR4 antagonist AMD3100 (plerixafor): from an impurity to a therapeutic agent. *Pharmacol Res* 159:105010. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105010>
 48. De Clercq E (2015) AMD3100/CXCR4 inhibitor. *Front Immunol* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00276>
 49. Brave M, Farrell A, Ching Lin S, Ocheltree T, Pope Miksinski S, Lee SL et al (2010) FDA Review Summary: Mozobil in Combination with Granulocyte colony-stimulating factor to mobilize hematopoietic stem cells to the Peripheral blood for Collection and subsequent autologous transplantation. *Oncology* 78(3–4):282–288. <https://doi.org/10.1159/000315736>
 50. Liu Z, Wang J, Chen H (2021) CXCR4 antagonist AMD3100 (Plerixafor) modulates Immune responses in the Tumor Microenvironment. *Int J Cancer Clin Res* 8(1). <https://doi.org/10.23937/2378-3419/1410144>
 51. Fearon DT, Janowitz T (2021) AMD3100/Plerixafor overcomes immune inhibition by the CXCL12–KRT19 coating on pancreatic and colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 125(2):149–151. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01315-y>
 52. Biasci D, Smoragiewicz M, Connell CM, Wang Z, Gao Y, Thaven-thiran JED et al (2020) CXCR4 inhibition in human pancreatic and colorectal cancers induces an integrated immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. ;117(46):28960–70. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.2013644117>
 53. O’Hara MH, Messersmith W, Kindler H, Zhang W, Pitou C, Szpurka AM et al (2020) Safety and Pharmacokinetics of CXCR4 peptide antagonist, LY2510924, in combination with Durvalumab in Advanced Refractory Solid Tumors. *J Pancreat Cancer* 6(1):21–31. <https://doi.org/10.1089/pancan.2019.0018>
 54. Peng S-B, Zhang X, Paul D, Kays LM, Gough W, Stewart J et al (2015) Identification of LY2510924, a Novel cyclic peptide CXCR4 antagonist that exhibits Antitumor Activities in solid tumor and breast Cancer metastatic models. *Mol Cancer Ther* 14(2):480–490. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-14-0850>
 55. Peng S-B, Van Horn RD, Yin T, Brown RM, Roell WC, Obungu VH et al (2017) Distinct mobilization of leukocytes and hematopoietic stem cells by CXCR4 peptide antagonist LY2510924 and monoclonal antibody LY2624587. *Oncotarget*. ; 8(55)
 56. Salgia R, Stille JR, Weaver RW, McCleod M, Hamid O, Polzer J et al (2017) A randomized phase II study of LY2510924 and carboplatin/etoposide versus carboplatin/etoposide in extensive-disease small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam Netherlands)* 105:7–13. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.12.020>
 57. Sharma P, Allison JP (2015) The future of immune checkpoint therapy. *Science* 348(6230):56–61. <https://doi.org/10.1126/sci-ence.aaa8172>
 58. Zboralski D, Hoehlig K, Eulberg D, Frömming A, Vater A (2017) Increasing tumor-infiltrating T cells through inhibition of CXCL12 with NOX-A12 synergizes with PD-1 blockade. *Cancer Immunol Res* 5(11):950–956. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.cir-16-0303>
 59. Vater A, Klussmann S (2015) Turning mirror-image oligonucleotides into drugs: the evolution of Spiegelmer® therapeutics. *Drug Discovery Today* 20(1):147–155. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.09.004>
 60. Suarez-Carmona M, Williams A, Schreiber J, Hohmann N, Pruefer U, Krauss J et al (2021) Combined inhibition of CXCL12 and PD-1 in MSS colorectal and pancreatic cancer: modulation of the microenvironment and clinical effects. *J Immunother Cancer*9(10):e002505. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-002505>
 61. D’Alterio C, Zannetti A, Trotta AM, Ieranò C, Napolitano M, Rea G et al (2020) New CXCR4 antagonist peptide R (pep R) improves Standard Therapy in Colorectal Cancer. *Cancers* 12(7):1952

A segunda produção científica intitulada: “**Etiopathogenesis and treatment of colorectal cancer**” será submetida ao periódico científico *EXCLI Journal* (Fator de Impacto: 4,6).

- **Artigo 2:**

ETIOPATHOGENESIS AND TREATMENT OF COLORECTAL CANCER

ABSTRACT:

Human colorectal cancer (CRC) encompasses tumors affecting a segment of the large intestine (colon) and rectum, and is the third most commonly diagnosed malignancy and the second leading cause of cancer deaths worldwide. It is a multifactorial disease, whose carcinogenesis process involves genetic and epigenetic alterations in oncogenes and tumor suppressor genes, including genes related to DNA repair. The pathogenic mechanisms are described based on the pathways of chromosomal instability, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. When detected early, colorectal cancer is potentially curable, and its treatment is based on the pathological characteristics of the tumor and factors related to the patient, as well as on drug efficacy and toxicity studies. Therefore, the objective of this review is to discuss epidemiological patterns of colorectal cancer, highlight the main risk factors, explain the pathogenesis and molecular subtypes, and describe the main targets of disease-directed therapy used in patients who are refractory to current treatments.

Keywords: colorectal neoplasms; carcinogenesis; mutations.

INTRODUCTION

Human colorectal cancer (CRC) encompasses tumors that affect a segment of the large intestine (the colon) and the rectum (INCA, 2020). The most recent global estimate shows around 1.066 million new cases of CRC in men, being the third most common tumor among all cancers, with an estimated risk of 23.4/100 thousand. For women, there were around 865 thousand new cases, being the second most common tumor, with an incidence rate of 16.2/100 thousand (IARC, 2020).

The main risk factors associated with the development of the disease include: a family history of CRC, age, sedentary lifestyle habits, obesity, and the presence of some inflammatory bowel diseases, such as Crohn's disease and chronic ulcerative colitis; and hereditary intestinal diseases, such as familial adenomatous polyposis (FAP) and hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) (MÁRMOL et al., 2017).

CRC carcinogenesis occurs through genetic and epigenetic alterations in oncogenes and tumor suppressor genes, including genes related to DNA repair mechanisms (DEKKER et al., 2019; FEARON and VOGELSTEIN, 1990). The pathogenic mechanisms involve chromosomal instability (CIN), microsatellite instability (MSI), and CpG island methylator phenotype (CIMP) (KEUM et al., 2019) and, depending on the origin of the mutation, colorectal carcinomas can be classified as sporadic, hereditary, and family (MÁRMOL et al., 2017).

CRC is treatable and, in most cases, is curable when detected early (INCA, 2020). Assessment of the anatomical extent of the disease through clinicopathological staging is an important prognostic factor for defining CRC treatment, which involves surgical resection for initial tumors, radiotherapy, and chemotherapy (BENSON et al., 2021). Furthermore, new therapies have been introduced, such as the use of monoclonal antibodies and immunotherapy, aiming at a more targeted treatment, with an improvement in the prognosis and overall survival of patients with CRC (SANTOS et al., 2018). Therefore, the objective of the current review was to discuss epidemiological patterns of CRC, highlight the main risk factors, explain the pathogenesis and molecular subtypes, and describe the main treatments used in the disease.

1.1 Incidence and Mortality

According to the International Agency for Research on Cancer (IARC), for the year 2020, approximately 1.9 million new cases of CRC and 935 thousand deaths from the disease were estimated, making it the third most commonly diagnosed malignancy and the second leading cause of cancer deaths worldwide (IARC, 2020).

Geographic variations in incidence are wide: continents such as North America (26.2 per 100,000), Europe (30.4 per 100,000), and Oceania (29.8 per 100,000) have high incidence rates, while Africa (8.4 per 100,000), Latin America and the Caribbean (16.6 per 100,000), and Asia (17.6 per 100,000) have the lowest incidence rates. This variation is due to multiple factors, such as life expectancy, the genetics of each population, lifestyle habits, and quality of disease registry data (IARC, 2020).

According to Arnold and collaborators (2017), it is possible to identify three distinct global temporal patterns linked to the development of CRC. The first is related to the increase in incidence and mortality in the most recent decade, mainly in the Baltic countries, Russia, China, and Brazil. In the second pattern, an increase in the incidence is observed but with a decrease in mortality, in Canada, the United Kingdom, Denmark, and Singapore. In the third

pattern, there is a decrease in both the incidence and mortality in the United States, Japan, and France.

The increase in incidence in some countries is due to the process of economic growth and westernization, which may result in a sedentary lifestyle and an increase in obesity in the population, important risk factors for CRC (WCRF, 2017). The decrease in mortality in developed countries is mainly due to improvements in diagnosis, with an increase in early detection, and advances in the treatment of the disease (ARNOLD et al., 2017).

1.2 Risk Factors

Family and hereditary factors:

The risk of developing CRC increases by more than twice in individuals who have a first-degree relative (e.g., parents and siblings) with the disease and, when two or more first-degree relatives have CRC, this risk almost doubles, rising to four times, becoming even more alarming when relatives are diagnosed with CRC before age 50 (AHMAD et al., 2021; BUTTERWORTH et al., 2006). This occurs when the germ cells of the progenitors present mutations shortly after fertilization, leading to hereditary cancer syndrome (GOODENBERGER et al., 2016).

Among hereditary CRC, HNPCC is the most common syndrome, representing approximately 3% of all cases of the disease. Its main characteristic is high microsatellite instability (MSI-h), caused by genetic mutations in germ cells that affect some DNA mismatch repair (MMR) genes, such as the mut-L homolog (*MLH1*), mut-S homolog 2 (*MSH2*), human mut-S homolog 6 (*MSH6*), and human postmeiotic segregation gene 2 (*PSM2*) (KEUM and GIOVANNUCCI, 2019).

Age:

Around 90% of global cases and deaths from CRC occur in patients over 50 years of age, meaning it is considered a disease of aging (IARC, 2020). However, it has been observed that, in recent years, there has been a global increase in the incidence of individuals under the age of 50 years affected by the disease (LOW et al., 2020). The reasons for this increase are still unknown, but it is believed that they may be related to factors such as: obesity, lack of physical exercise, alcohol consumption, processed foods, in addition to the urbanization process, and environmental pollution (VUIK et al., 2019).

CRC in young adults is also due to hereditary factors and family history, however, the vast majority of cases appear sporadically in individuals who present an average risk. It is a tumor characterized by a more advanced stage at diagnosis and less cellular differentiation (MAURI et al., 2019). Due to the increased incidence in young adults, the American Cancer Association recommends that screening of adults with a family history of CRC should be performed, starting at age 45 (KEUM and GIOVANNUCCI, 2019).

Active lifestyle and nutritional factors:

Regarding quality of life, it has been shown that practicing at least 150 minutes/week of moderate-intensity physical exercise (MIPE) and eating a balanced diet, rich in unprocessed foods, such as fruits and cereals, provide greater protection against the development of CRC (HULTCRANTZ et al., 2021; SONG et al., 2019).

The protective role of MIPE in preventing the emergence of CRC has not yet been fully elucidated. However, it has been shown that the practice increases metabolic rates and intestinal motility, conditions directly related to the lower incidence of this cancer (ROBERTSON, 2012). Therefore, a sedentary lifestyle is an important risk factor for the emergence of CRC (DE REZENDE et al., 2018).

Excessive intake of ultra-processed foods, rich in fat, also predisposes to the development of CRC. This is because visceral fat causes inflammation in the colorectal region, stimulated by pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6), released by adipocytes. In this context, an inadequate diet can increase the chances of developing CRC by up to 70% (WILLETT, 2005).

Alcohol:

Daily intake of alcoholic beverages, even in low quantities, leads to an increased risk of developing the disease when compared to people who do not drink alcohol or those who drink it sporadically (CHOI et al., 2018).

Acetaldehyde represents the main carcinogenic metabolite derived from alcohol (MÁRMOL et al., 2017). In the intestine, acetaldehyde causes damage to the mucosa and it accumulates in this region due to the low capacity of intestinal cells to metabolize this metabolite. Thus, acetaldehyde destroys folic acid, which is important for adequate DNA synthesis and methylation, contributing to the development of CRC (ZHANG et al., 2021).

Cigarettes:

Cigarettes are composed of components that are harmful to the body (e.g., aromatic polycyclic hydrocarbons and nicotine). Data from the literature indicate that smoking leads to a 2 to 3 times greater risk of developing CRC compared to non-smokers. Furthermore, the risk increases with the dose and duration of exposure (SAWICKI et al., 2021; SONG et al., 2019).

This greater predisposition to developing CRC in smokers can be better understood by the fact that cigarette components, inhaled in the smoke, easily reach various organs, including the colorectal mucosa via the circulatory system. In contact with colorectal cells, toxic substances can induce genetic and epigenetic alterations (GIOVANNUCCI and MARTINEZ, 1996). According to Amitay and colleagues (2020), smokers are at an increased risk of developing CRC with the following molecular characteristics: the presence of MSI, a high level of CpG island methylator phenotype (CIMP-h), and mutations in the v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 gene (*BRAF*).

1.3 Etiology

The etiology of CRC depends on the origin of the mutation and can be classified into sporadic, hereditary, and familial carcinomas (DEKKER et al., 2019). Approximately 70% of CRC are sporadic, that is, they occur in individuals without a family history of the disease or hereditary genetic mutations (KEUM and GIOVANNUCCI, 2019). The molecular pathogenesis of these cancers is heterogeneous, as they arise from somatic genetic mutations and epigenetic alterations, largely attributable to potentially modifiable risk factors (JASPERSON et al., 2010). Sporadic CRC is common among older adults, likely as a result of greater temporal exposure to environmental, dietary, and aging factors (ARVELO et al., 2015).

Hereditary tumors are responsible for around 5% of CRC, originating from an inherited mutated allele. For the caecinoma to be triggered, a point mutation in the other allele is necessary (MÁRMOL et al., 2017). These tumors are classified by the presence or absence of associated polyposis. CRC with polyposis mainly involves FAP, characterized by the formation of multiple potentially malignant polyps in the colon (LYNCH; DE LA CHAPELLE, 2003). It is an autosomal dominant disease caused by a mutation in the tumor suppressor gene adenomatous polyposis coli (*APC*), located on the short arm q21 of chromosome 5. Mutations in this gene lead to loss of function of the APC protein, resulting in hyperactivation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, with a consequent increase in cell growth, differentiation, dissemination, and adhesion of colorectal cells (NOJADEH et al., 2018).

Regarding HNPCC, the main cause is Lynch syndrome, which occurs due to mutations in the germline in one of several MMR genes (*MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, and *PSM2*) (LYNCH et al., 2009; UMAR, 2004). Inactivation of these genes hinders DNA repair, causing a change in the DNA's *tandem* repetitive sequences or microsatellites, resulting in the development of a phenotype known as MSI (NOJADEH et al., 2018). Importantly, this instability is not specific to Lynch syndrome and approximately 12% of sporadic CRC cases also present with MSI (DEKKER et al., 2019).

The third form is known as familial CRC, representing around 20-30% of all cases of the disease. The etiology of this form of CRC is heterogeneous, as multiple genes can contribute to the development of the disease. This is believed to be related to alterations in a series of less penetrant susceptibility genes different from those associated with well-defined hereditary syndromes (JASPERSON et al., 2010).

1.4 Pathophysiology of CRC

The process of colorectal carcinogenesis begins in stem cells present in colonic crypts. Through the progressive accumulation of genetic and epigenetic alterations that inactivate tumor suppressor genes and activate oncogenes, these stem cells become cancerous. As a result, an aberrant crypt forms, evolving into a neoplastic precursor lesion (defined as a polyp) and, subsequently, progressing to carcinoma (MEDEMA, 2013; NASSAR e BLANPAIN, 2016).

There are two main precursor lesion pathways: the adenoma-carcinoma sequence (also known as the classical pathway or chromosomal instability pathway) leading to 70-90% of colorectal cancers and the serrated neoplasia pathway, representing 10-20% of cases of the disease (DEKKER et al., 2019).

The adenoma-carcinoma sequence was initially described by Fearon and Volgestein in 1990 (Figure 1). In this pathway, the adenoma acts as a precursor to CRC, where the initial adenomatous polyp (<1cm in size, with tubular or tubulovillous histology) slowly progresses to an advanced adenoma (>1cm in size and/or with villous histology) until the appearance of cancer, as a result of the gradual accumulation of genetic and epigenetic alterations (FEARON and VOLGESTEIN, 1990; MÁRMOL et al., 2017).

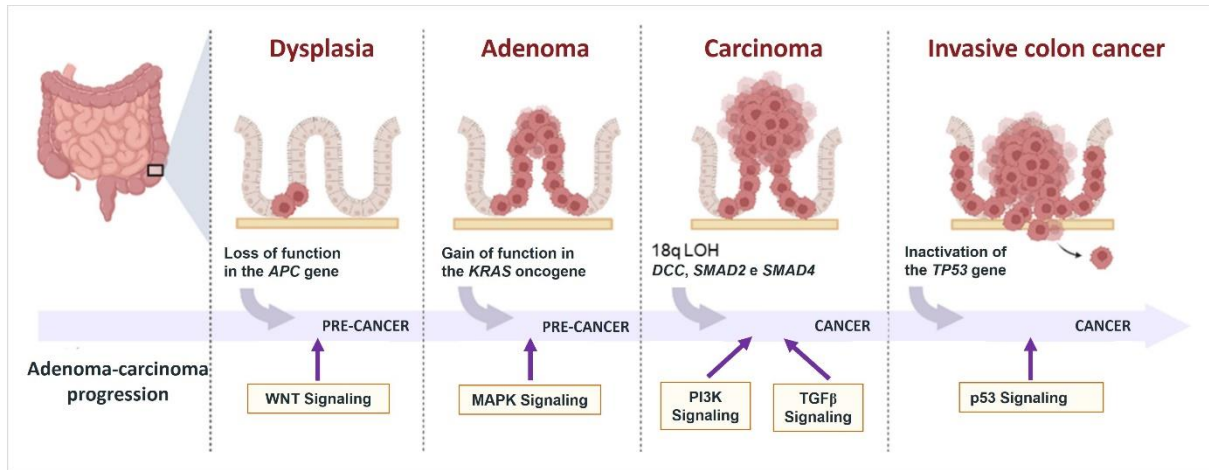


Figure 1: Adenoma-carcinoma progression model in CRC. In the adenoma-carcinoma sequence, an initial adenomatous polyp slowly progresses to advanced adenoma and subsequent cancer through genetic and epigenetic alterations, such as loss of function of the *APC* gene, with changes in the Wnt signaling pathway; gain-of-function in the oncogene *KRAS*, through activation of the MAPK pathway; loss of heterozygosity on chromosome 18q in tumor suppressor genes, such as *DCC*, *SMAD2*, and *SMAD4*, activating the PI3K and TGF β signaling pathways; Furthermore, inactivation of the *TP53* tumor suppressor gene may also occur. Alterations in the aforementioned signaling pathways contribute to uncontrolled proliferation and survival of cancer cells, culminating in the development of CRC. *APC* - adenomatous polyposis coli; *KRAS* - Kirsten rat sarcoma; MAPK – Mitogen-activated protein kinase; LOH – loss of heterozygosity; *DCC* - netrin-1 receptor; PI3K - Phosphatidylinositol 3-kinase; TGF β - Transforming growth factor-beta; *TP53* - gene that encodes the tumor protein p53. Source: author's own work (Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com)).

The etiology of this pathway is heterogeneous, as multiple genes contribute to the development of the disease, including loss-of-function of the *APC* tumor suppressor gene, gain-of-function of the Kirsten rat sarcoma oncogene (*KRAS*), in addition to loss-of-function of tumor suppressor genes encoding the netrin-1 receptor (*DCC*), and the tumor protein p53 (*TP53*), assisting in the transition from advanced adenoma to adenocarcinoma (FEARON and VOLGESTEIN, 1990; MORÁN et al., 2010).

In addition to the development of CRC via the adenoma-carcinoma sequence, approximately 10-20% of colon and rectal tumors may arise via the serrated pathway (MÜLLER et al., 2016). Serrated polyps form a heterogeneous group of colorectal lesions that include hyperplastic polyps (HPs), sessile serrated adenomas/polyps (SSA/P), traditional serrated adenomas (TSA), and a combination of two or more features, previously classified as mixed polyps (MP) (MÄKINEN et al., 2001).

Serrated CRC can occur via two different molecular pathways: the sessile serrated pathway and the traditional serrated pathway (Figure 2). The sessile serrated pathway occurs most frequently in the proximal colon and begins with a *BRAF* gene mutation (KAMBARA et al., 2004; O'BRIEN et al., 2006). This mutation leads to constitutive activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and uncontrolled cell division. As a result, normal

mucosa is transformed into HPs which, after hypermethylation of the *p16* tumor suppressor gene and the gene encoding insulin-like growth factor binding protein 7 (*IGFBP7*), evolve into SSA/P (KRIEGL et al., 2011; WAJAPYEYEE et al., 2010).

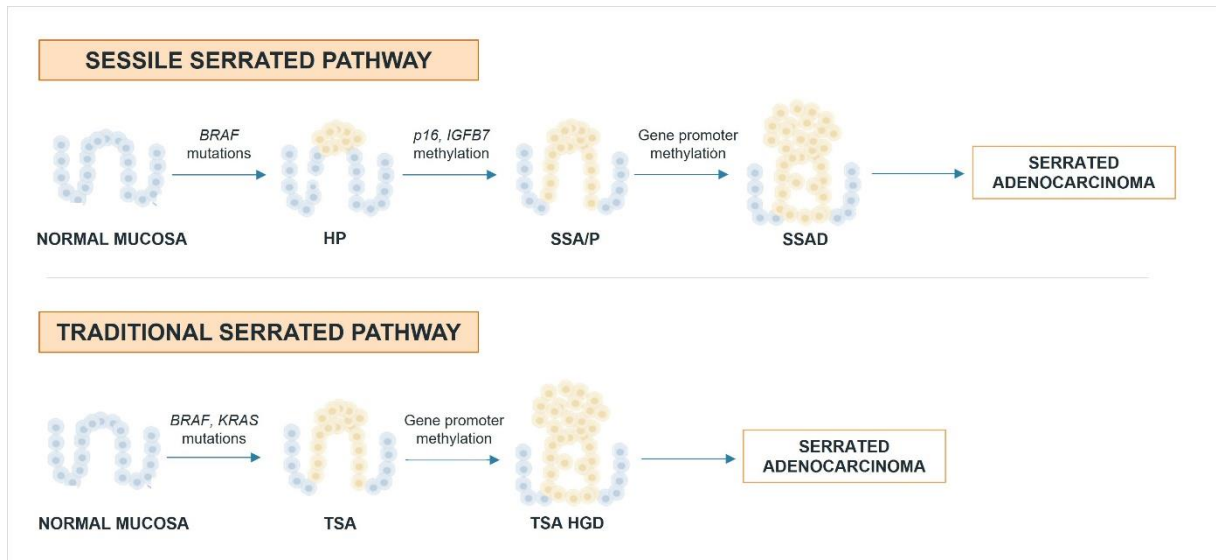


Figure 2: CRC serrated pathway. Transformation of normal colon mucosa to serrated adenocarcinoma by two different molecular pathways: the sessile serrated pathway and the traditional serrated pathway. *BRAF* - v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 gene; *KRAS* - Kirsten rat sarcoma; *p16* - tumor suppressor gene *p16*; *IGFB7* - insulin-like growth factor-binding protein 7; HPs - hyperplastic polyps; SSA/P - sessile serrated adenoma/polyp; SSAD - sessile serrated adenoma with high-grade dysplasia; TSA - traditional serrated adenoma; TSA HGD - traditional serrated adenoma with high-grade dysplasia. Source: author's own work.

Transformation into sessile serrated adenoma with high-grade dysplasia (SSAD) occurs mainly due to epigenetic alterations in the *MLH1* gene, with consequent amplification of MSI or, less frequently, due to hypermethylation in other genes, such as O(6)-Methylguanine-DNA Methyltransferase (*MGMT*), with a stable number of microsatellites (MSE). When *MLH1* methylation occurs, the tumor presents the following phenotype: mutations in the *BRAF* gene, CIMP-h, and MSI-h. When methylation occurs in other gene promoters, the tumor is characterized by mutations in *BRAF*, CIMP-h, and MSE (DE PALMA et al., 2019).

The traditional serrated pathway frequently occurs in the distal colon and rectum. The carcinogenic mechanism driving malignant transformation are mutations in the *KRAS* or *BRAF* genes in the normal colon that, together with *MGMT* or other genetic methylation alterations, progress malignantly to TSA, high-grade dysplasia, and serrated adenocarcinoma (NGUYEN et al., 2020).

In addition to the adenoma-carcinoma sequence and the serration pathway, some authors propose an alternative pathway to explain MSI (DEKKER et al., 2019). According to Raskov et al. (2020), this pathway occurs through germline mutations in the DNA repair genes *MLH1*,

MSH2, *MSH6*, and *PMS2*, epigenetic silencing, mainly through hypermethylation of the *MLH1* gene, and somatic mutations in the *BRAF* gene.

1.5 CRC Molecular Pathways

The process of colorectal carcinogenesis involves genetic alterations, described through the CIN and MSI pathways, and epigenetic alterations, such as the CIMP pathway (HULTCRANTZ et al., 2021). Initially, these pathways were described as independent mechanisms, however, recent evidence indicates a *crossstalk* between them (HONG, 2018).

1.5.1 Chromosomal Instability (CIN)

The CIN pathway is characterized by changes in the number of chromosome copies, resulting in the activation of growth-promoting pathways and/or decreased activity of apoptotic pathways (JUNG et al., 2020). This imbalance favors the emergence of tumors with aneuploidy (abnormal number of chromosomes) and loss of heterozygosity (LOH) (AALTONEN et al., 1994). The mechanisms of this pathway include chromosomal segregation, telomere dysfunction, and changes in the response to DNA damage, which can disrupt tumor suppressor genes and activate oncogenes (HONG, 2018).

Mutations can occur that inactivate the *APC* tumor suppressor gene, resulting in hyperactivation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. This, in turn, plays a fundamental role in the differentiation of stem cells and cell growth. Therefore, alterations in this pathway can lead to unregulated cell proliferation and tumor development (ZHAO et al., 2022). Another mutation occurs in the *KRAS* oncogene. This gene encodes small proteins (21 kDa) that bind guanosine triphosphate (GTP) (JIMENO et al., 2009; LIÈVRE et al., 2008) and, when in the mutated state, result in its constitutive activation, leading to disordered cell growth (AHMAD et al., 2021).

LOH at chromosome 18q is found in more than 70% of advanced stage colorectal tumors. This change occurs mainly in the *DCC* gene and in genes that encode proteins present in the transforming growth factor-beta (TGF- β) pathway, such as SMAD2/4. Normally, TGF- β signaling inhibits the cell cycle, acting on processes such as growth, differentiation, and apoptosis. Therefore, the loss or inactivation of these genes may allow uncontrolled cell growth and evasion of apoptosis (JUNG et al., 2017).

Furthermore, inactivation of the tumor suppressor gene *TP53* may also occur, which contributes to the progression of CRC (ARMAGHANY et al., 2012). This gene is located on the short arm of chromosome 17 (17p13.1) and encodes a 53 kDa phosphoprotein, which plays an important role in cell cycle control, inducing DNA repair or apoptosis (HAINAUT and HOLLSTEIN, 2000; LANE and LEVINE, 2010). Mutations in this gene make DNA repair impossible, allowing the proliferation of tumor cells and the accumulation of other mutations (MALKI et al., 2020).

Clinically, colorectal tumors with CIN are associated with distal location and have a worse prognosis (LIPKIN et al., 2001; LYNCH and DE LA CHAPELLE, 2003; RASKOV et al., 2014). CIN-positive CRC is predominantly associated with the adenoma-carcinoma sequence, but it is unclear whether this instability is behind the accumulation of mutations in critical tumor suppressor genes and oncogenes, or vice versa (PINO and CHUNG, 2010).

1.5.2 *Microsatellite Instability (MSI)*

The process of CRC carcinogenesis involves the DNA repair system. This system acts during replication, being responsible for replacing nucleotides that present incorrect pairing (VASEN, 2000). Its inactivation can lead to the erroneous accumulation of paired nucleotides and a predisposition to carcinogenesis. Mutations in MMR genes cause a deficiency in this system, producing MSI (AFRĂȘĂNIE et al., 2019).

Microsatellites are short sequences (1 to 6 base pairs) repeated throughout the genome. Any inconsistency in the number of microsatellite nucleotide repeats, when compared to normal tissue, is referred to as MSI, resulting from a failure of the mismatch repair mechanism to correct DNA base errors (RASKOV et al., 2020).

MSI is detected in approximately 15% of patients with CRC, with 3% of cases associated with Lynch syndrome, the most common form of hereditary CRC. Lynch syndrome is an autosomal dominant condition with incomplete but high penetrance, caused by germline mutations in the genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, and *PMS2* (GELSOMINO et al., 2016). The other 12% of patients have sporadic CRC with MSI, characterized by mutations in the *BRAF* gene and hypermethylation of the *MLH1* gene, through association with CIMP (AFRĂȘĂNIE et al., 2019; COLLE et al., 2017).

The National Cancer Institute (INCA) recommends, for the assessment of MSI status in CRCs, the use of a panel containing 5 markers, analyzed by polymerase chain reaction (PCR), where 3 are dinucleotide repeat markers (D2S123, D5S346, and D17S250) and 2 are

mononucleotide repeat markers (BAT 26 and BAT 25) (BOLAND et al., 1998). Based on this assessment, the MSI status of CRCs can be classified as MSI-high, when there is the presence of instability of at least two markers; MSI-low in cases of instability in a marker, and microsatellite stable (MSE), when there is no marker present (HONG, 2018).

Studies have revealed that the MSE/MSI-l and MSI-h groups present distinct genomic profiles, in addition to different phenotypes and prognoses, where the MSI-h group demonstrates, from a clinical point of view, a predominance of the proximal colon, little histological differentiation and /or mucin production, and an increase in tumor-infiltrating lymphocytes (RYAN et al., 2017). Furthermore, MSI-h tumors diagnosed at a younger age, often originate from sessile serrated adenoma, and are diagnosed at an earlier stage compared to MSE CRCs, most commonly in stage II (POLOM et al., 2018; VILA et al., 2023).

1.5.3 CpG Island Methylation Phenotype (CIMP)

Epigenetic instability, responsible for CIMP, is also found in CRC. This pathway is characterized by epigenetic molecular changes that lead to alterations in gene expression or function (VAN ENGELAND et al., 2011). The process of DNA methylation is one of the most common modifications, involving the addition of a methyl group (CH₃) to the C5 position of the cytosine ring by DNA methyltransferases (DNMTs), resulting in 5-methylcytosine. This modification occurs in CpG dinucleotides, which are regions of DNA where cytosine residues are followed by guanine residues and linked by a phosphodiester bond (JUNG et al., 2020).

DNA hypermethylation usually occurs in CpG islands present in gene promoters. Therefore, this promoter CpG hypermethylation is associated with transcriptional suppression of tumor suppressor genes in cancer cells. In the case of CRC, this event was identified in the promoter regions of important tumor suppressor genes, including *APC* and *MLH1* (KEUM and GIOVANNUCCI, 2019).

CIMP is found in approximately 35% of colorectal tumors and is frequently associated with a proximal location, the female sex, advanced age, mucinous histological features, and an advanced stage (JUNG et al., 2020). Furthermore, it is highly associated with the serrated pathway of colorectal carcinogenesis and with mutations in the *BRAF* gene (GALLOIS et al., 2018). The mutation of this oncogene is considered an initial event for the formation of hyperplastic polyps, as it induces uncontrolled cell proliferation through the constitutive activation of the MAPK pathway. After hyperplastic polyp formation, CIMP promotes progression to sessile serrated adenoma and subsequent cancer (LI et al., 2021).

1.6 Molecular classification of CRC subtypes

CRC is a heterogeneous disease, therefore, stratifying patients based on gene expression profiles aids in clinical accuracy and understanding of the disease (KOMOR et al., 2018). With this in mind, the International CRC Subtyping Consortium analyzed 4,151 patients with the disease and, after applying grouping techniques, 4 consensus molecular subtypes (CMS) were classified, as shown in table 1 (GUINNEY et al., 2015).

Table 1: Consensus molecular subtypes of CRC.

	CMS1 (MSI-immune)	CMS2 (Canonic)	CMS3 (Metabolic)	CMS4 (Mesenchymal)
Genetic Alterations	- MSI and CIMP-h - Mutated <i>BRAF</i> and <i>TGFBR2</i> - Immune infiltration and activation	- WNT and MYC pathways - ↑ ANCS - Negative CIMP, MSE or MSI-I	- Mixed MSI, CIMP-I - Mutated <i>KRAS</i> - ↓ ANCS - Epithelial signature and metabolic dysregulation	- Mesenchymal activation - Stromal infiltration, EMT activation - CIMP-I, MSE, or MSI-I - Angiogenesis
Characteristics	- 14% of CRC - Female, advanced age, right colon.	- 37% of CRC - Left colon and rectum	- 13% of CRC	- 23% of CRC - Stages III and IV
Prognostic	Very low survival rate after relapse	Better survival rate after relapse compared to other subtypes	Better survival rate after relapse compared to other subtypes	Worse overall and relapse-free survival compared with other subtypes

Legend: ↑ - increase; ↓ - decrease; CNAS – Somatic Copy Number Alterations; EMT - Epithelial-mesenchymal transition. Source: author's own work.

In addition to the 4 subtypes, there are samples with mixed characteristics (13%) that possibly represent a transitional phenotype or intratumoral heterogeneity (GUINNEY et al., 2015). It is important to highlight that although CMS classification aids understanding of the complexity of the molecular characteristics of CRC, it does not suggest a therapeutic stratification (HONG et al., 2018; KOMOR et al., 2018).

1.7 Treatment

CRC treatment is based on factors related to the pathological characteristics of the tumor, such as disease staging, the presence of markers such as MSI, *KRAS*, and *BRAF*, as well

as factors related to the patient (age and presence of comorbidities) and the efficacy and toxicity profiles of the medications. All of these factors help in decision-making regarding the use of adjuvant therapy for these patients (KIM et al., 2015).

Non-metastatic CRC is initially treated with surgery and, depending on the stage of the disease, adjuvant chemotherapy is recommended (MÁRMOL et al., 2017). The treatment of high-risk stage II and III patients, i.e., patients with T4 tumors, poorly differentiated histology, lymphovascular and/or perineural invasion, the presence of intestinal obstruction or perforation, positive or indeterminate margins, and inadequate lymph node sampling (< 12 dissected lymph nodes) is performed with combined regimens of 5-fluorouracil (5-FU), capecitabine, leucovorin (LV), oxaliplatin and irinotecan, such as the FOLFOX (LV + 5-FU + oxaplatin) and XELOX regimens (capecitabine + oxaplatin) (Protásio, 2010).

Approximately 50 to 60% of patients diagnosed with CRC develop metastases (VAN CUTSEM, et al., 2006). Treatment of metastatic disease involves the administration of single or combined drugs, considering the goals of therapy, the type and timing of previous therapy, the mutational profile of the tumor, and the different toxicity profiles of the drugs. Based on these aspects, the first line of treatment for patients with metastatic CRC able to receive intensive therapy involves the use of chemotherapy regimens, such as FOLFOX, XELOX, or FOLFIRI (LV + 5-FU + irinotecan), associated with the anti-VEGF bevacizumab (BENSON et al., 2021).

When the tumor is located on the left side of the colon, and has wild-type *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* genes and MSE, FOLFOX and FOLFIRI can be combined with anti-EGFR monoclonal antibodies (cetuximab and panitumumab). For tumors with the mutation *BRAF*^{V600E} previously treated with chemotherapy, the combination of encorafenib with cetuximab is indicated. In cases of MSI tumors, pembrolizumab or nivolumab, alone or in combination with ipilimumab, should be offered as first-line therapy due to longer progression-free survival compared to chemotherapy with or without bevacizumab or cetuximab (MORRIS et al., 2023).

As can be seen, in addition to classical therapeutic regimens, immunotherapy and targeted therapy regimens are becoming an increasingly important part of the metastatic CRC treatment landscape, helping to increase the overall survival of these patients (BENSON et al., 2021; POTOCKI et al., 2023).

1.8 Key molecular targets for CRC targeted therapy

1.8.1 RAS/MAPK/MEK Signaling

- *EGFR* and *KRAS*:

The epidermal growth factor receptor (EGFR), originally isolated and sequenced by S. Cohen (1980), is a transmembrane receptor with tyrosine kinase (RTK) activity belonging to the ErB family. It is located on the short arm of chromosome 7 and has 28 exons (RIELY et al., 2006). EGFR is comprised of an N-terminal extracellular binding domain, a lipophilic transmembrane domain, and a C-terminal intracellular tyrosine kinase domain (SEGATTO et al., 2011). Specific bindings to the extracellular domain lead to the formation of homo- or heterodimers. This dimerization causes a change in the receptor conformation and promotes the activation of the tyrosine kinase domain, resulting in the transphosphorylation of tyrosine residues in the C-terminal domain (MITSUDOMI and YASUSHI, 2010).

The Ras/MAPK, PI3K/Akt, and JAK/STAT signaling pathways are activated, initiating the signal transmission cascade, with consequent cell growth and proliferation. These key signaling molecules can be affected by genetic mutations, altering the process of carcinogenesis and leading to uncontrolled proliferation, angiogenesis, inhibition of apoptosis, invasion, and metastasis (JORISSEN et al., 2003; NORMANNO et al., 2006; SEGATTO et al., 2011).

The most common somatic mutations in the *EGFR* gene are deletions in exon 19 (dels746-750) or a substitution of leucine for arginine in codon 858 of exon 21 (L858R). These two types of mutations exist in the ATP-binding domain of tyrosine kinase and are considered EGFR-activating mutations. Such alterations often occur concomitantly with increased production of EGFR ligands due to autocrine or paracrine loops. Furthermore, mutations in *EGFR* determine abnormal receptor trafficking, which contributes to increased signaling and tumor development (JURIŠIĆ et al., 2018; SIGISMUND et al., 2018).

In recent years, antineoplastic drugs that act on receptors and oncogenic signaling pathways have been developed and demonstrated efficacy in the treatment of CRC. Therapy can be carried out through the use of monoclonal antibodies directed against the external portion of EGFR, such as panitumumab or cetuximab (JIANG et al., 2013; VAN CUTSEM et al., 2007).

Cetuximab is a chimeric IgG1 monoclonal antibody that binds to the extracellular portion of EGFR. This binding inhibits phosphorylation of the receptor and the consequent cascade of biochemical events that would result in stimulation of cell proliferation (BASELGA,

2001). In metastatic CRC refractory to previous treatments and irinotecan, the addition of cetuximab appears to reverse resistance to this chemotherapeutic drug (CUNNINGHAM et al., 2004; VAN CUTSEM et al., 2007). Panitumumab is a humanized antibody that also recognizes EGFR and can be used in patients with metastatic CRC refractory to chemotherapy (VAN CUTSEM et al., 2007). It has been demonstrated that these drugs are effective for the treatment of patients with CRC who do not have a mutation in the *KRAS* gene (BOKEMEYER et al., 2011; MAUGHAN et al., 2011; TVEIT et al., 2012).

The *KRAS* gene was initially described by Scolnick *et al.* as a cancer-causing virus, known as *Kirsten Sarcoma virus* (MALUMBRES and BARBACID, 2003) and in the 1980s, it was identified as an oncogene involved in the pathogenesis of many cancers (BAINES et al., 2011). *KRAS* belongs to the superfamily of Ras proteins, and, together with the genes *Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog (NRAS)* and *Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog (HRAS)*, acts *downstream* of tyrosine kinase receptors, for example EGFR, controlling processes, such as cell proliferation, cell differentiation, cell adhesion, apoptosis and cell migration (AFRĂȘĂNIE et al., 2019).

Ras proteins have intrinsic GTPase activity, that is, their activation and regulation mechanism depends on GTP binding and hydrolysis. Under normal conditions, in which the *KRAS* gene encodes the protein in its so-called wild-type state, the binding of a growth factor to its membrane receptor (EGFR) activates the Ras protein, providing enzymatic events that culminate in the activation of genes for the maintenance of the neoplastic phenotype (PORRU et al., 2018). *KRAS* is deactivated when the GTP molecule is converted into a guanosine diphosphate (GDP) molecule (MCCORMICK, 2015). However, in the presence of somatic mutations in this gene, protein activation occurs independently of the presence of the growth factor, leading to the constitutive activation of *downstream* pathways, including the RAF-MEK-ERK and PI3K pathways, in addition to corroborating disordered cell growth (HARDIMAN, 2018; HUANG et al., 2018).

Mutations in the *KRAS* gene occur in approximately 30% to 40% of CRC patients (HAIGIS, 2017), being most frequently observed in codons 12 and 13 of the gene. The main mutations that occur in codon 12 include the change in the amino acid glycine at this position to aspartic acid (p.G12D), and in glycine to valine (p.G12V) or to cysteine (p.G12C). In codon 13, the most frequent mutation is c.38G>C, resulting in the change in the amino acid glycine to aspartic acid (p.G13D) (KAMPMAN et al., 2000; LIÈVRE et al. 2010; SAMEER et al. 2009).

The glycine to cysteine mutation at position 12 resides close to a pocket called switch-II (S-IIP) and favors the active form of the *KRAS* protein, resulting in an oncoprotein

predominantly linked to GTP, with greater proliferation and survival in tumor cells. The discovery of this allosteric site allowed the development of the first inhibitor specifically targeting KRAS p.G12C approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 2021, called sotorasib. The drug specifically and irreversibly binds to cysteine 12 (Cys12) in the S-IIP pocket, locking the KRAS protein p.G12C in an inactive state (HUANG et al., 2021; ZHU et al., 2022).

According to studies, the use of sotorasib produces considerable clinical benefits and lower gastrointestinal and hepatic adverse effects. Furthermore, the majority of CRC patients presented disease control, with a median duration of stable disease of 5.4 months and a median progression-free survival of 4 months, with conventional therapies having a median progression-free survival rate of 1.9 to 2.1 months (HONG et al. 2020).

- *BRAF*:

The *BRAF* gene encodes a cytoplasmic serine-threonine kinase (B-raf) protein, playing a role in activating the MAPK pathway, through *downstream* action on the Ras protein (GARCIA-CARBONERO et al., 2020). Activation of this signaling cascade contributes to cell growth, proliferation, differentiation, migration, survival, and angiogenesis (AFRĂȘĂNIE et al., 2019).

More than 40 *missense* mutations in *BRAF*, involving 24 different codons, have been identified in human cancer (XING, 2005). Approximately 90% of cases of *BRAF* mutation occur due to the exchange of thymine for an adenosine at nucleotide T1799A in exon 15, resulting in a substitution of valine for glutamate at codon 600, called V600E (WAN et al., 2004). This mutation leads to constitutive activation of the pro-proliferative MAPK pathway (CAPUTO et al., 2019).

Around 10% of all patients suffering from CRC present a mutation in the *BRAF* gene (COHEN et al., 2017) and studies show that several clinicopathological parameters in metastatic CRC are associated with this. Colorectal tumors mutated in this gene most commonly arise from serrated adenomas, located mainly in the right colon, with a higher incidence in women over 60 years of age. Furthermore, these tumors are histologically of the mucinous type and poorly differentiated (YAEGGER et al., 2019).

In recent years, CRC with the *BRAF*^{V600E} mutation has emerged as a distinct biological entity, typically refractory to standard chemotherapy regimens approved for the treatment of metastatic CRC and associated with a worse prognosis (URSEM et al., 2018), presenting

reduced overall survival and shorter progression-free survival compared with patients with BRAF wild-type CRC (BYLSMA et al., 2019).

Therefore, therapies directed against the mutation in the *BRAF* gene have been proposed, such as vemurafenib, dabrafenib, and encorafenib. However, preclinical models of CRC with the *BRAF*^{V600E} mutation showed that BRAF inhibition causes rapid feedback activation through EGFR; therefore, treatment with *BRAF* inhibitors alone does not sufficiently inhibit signaling of the pathway, which explains the lack of clinical efficacy of *BRAF* inhibition in this type of tumor (CIOMBOR et al., 2022; YEH et al., 2021).

In order to avoid this paradoxical activation, the addition of an EGFR inhibitor (cetuximab, panitumumab) together with a MEK inhibitor (binimetinib, trametinib) has been proposed (GROTHERY et al., 2021). According to the BEACON study, a combination of encorafenib, cetuximab, and binimetinib resulted in significantly longer overall survival and a higher response rate than standard therapy in patients with metastatic CRC with the *BRAF*^{V600E} mutation (TABERNERO et al., 2021; VAN CUTSEM et al., 2019). Figure 4 represents the RAS/MAPK/ERK signaling pathway, with their respective targets for CRC-directed therapy.

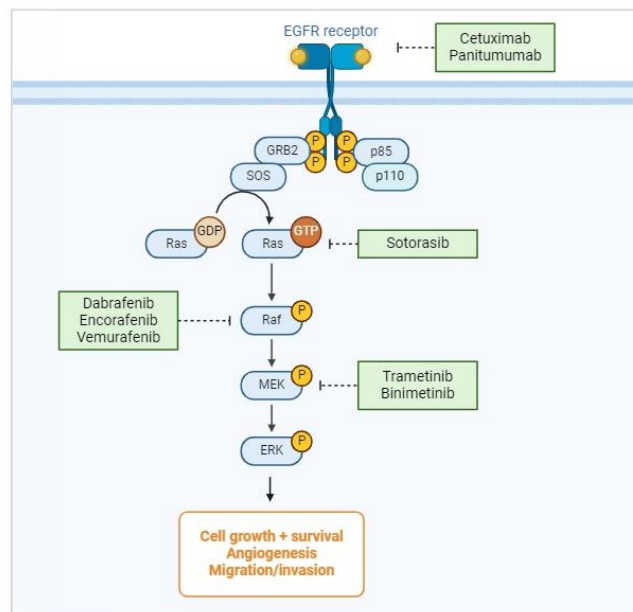


Figure 4: RAS/MAPK/ERK signaling pathway. Comprehensive overview of FDA-approved targeted drugs for mCRC. EGFR - epidermal growth factor receptor; GDP - guanosine diphosphate; GTP - guanosine triphosphate; RAS - Rat sarcoma virus; RAF - viral murine sarcoma; MEK - mitogen-activated protein kinase; ERK - extracellular signal-regulated kinase. Source: author's own work (Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com)).

1.8.2 MSI

Approximately 15% of CRC present MSI, a molecular indicator of defective DNA mismatch repair. The high tumor mutational burden and neoantigen load in MSI tumors favor

the infiltration of immune effector cells, such as CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes, CD4⁺ T helper 1 cells, and macrophages, resulting in antitumor immune responses. In order to promote immune escape, MSI tumor cells upregulate T cell inhibitory ligands, such as PD-L1 and CTLA-4 (BATTAGLIN et al., 2018; FAN et al., 2021; FRANK et al., 2021; ZHANG et al., 2022).

The presence of immune cells in MSI CRC supports the notion that a treatment based on immunotherapies should provide clinical benefits for this group of patients. Thus, the use of immunomodulatory monoclonal antibodies targeting immune control points has been studied and, in recent years, programmed cell death protein 1 (PD-1) inhibitors, such as pembrolizumab or nivolumab, associated or not with a cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) inhibitor, such as ipilimumab were approved by the FDA for the treatment of patients with refractory or metastatic CRC with MSI, increasing progression-free survival and overall survival (MARTIANOV et al., 2023; PICARD et al., 2020).

CONCLUSION

CRC results from uncontrolled inspection of cells due to factors, whether environmental or genetic, which can culminate in tissue invasion close to the primary tumor or even the development of several metastases. Therefore, the research and review of the genetic and immunological aspects of molecules involved in this disease contribute to better understanding of the pathogenesis and evolution of CRC, providing clinically relevant data that could be of great value in evaluating the prognosis and in designing therapy for patients. Although research related to CRC has advanced, there remain significant gaps that need to be addressed in order to understand the etiology of the disease, improve treatment responses, and prolong patient survival while preserving their quality of life.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaltonen LA, Peltomäki P, Mecklin JP, Järvinen H, Jass JR, Green JS, et al. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 1994 Apr 1;54(7):1645-8.

Afrăsânie VA, Marinca MV, Alexa-Stratulat T, Gafton B, Păduraru M, Adavidoaiei AM, et al. KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and microsatellite instability in metastatic colorectal cancer - practical implications for the clinician. *Radiol Oncol.* 2019 Sep 24;53(3):265-274. doi: 10.2478/raon-2019-0033.

Ahmad R, Singh JK, Wunnava A, Al-Obeed O, Abdulla M, Srivastava SK. Emerging trends in colorectal cancer: Dysregulated signaling pathways (Review). *Int J Mol Med*. 2021 Mar;47(3):14. doi: 10.3892/ijmm.2021.4847.

Amitay EL, Carr PR, Jansen L, Roth W, Alwers E, Herpel E, et al. Smoking, alcohol consumption and colorectal cancer risk by molecular pathological subtypes and pathways. *Br J Cancer*. 2020 May;122(11):1604-1610. doi: 10.1038/s41416-020-0803-0.

Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res*. 2012 Jan;5(1):19-27.

Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017 Apr;66(4):683-691. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310912.

Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalscience*. 2015 Apr 9;9:520. doi: 10.3332/ecancer.2015.520.

Baines AT, Xu D, Der CJ. Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Med Chem*. 2011 Oct;3(14):1787-808. doi: 10.4155/fmc.11.121.

Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer*. 2001 Sep;37 Suppl 4:S16-22. doi: 10.1016/s0959-8049(01)00233-7.

Battaglin F, Naseem M, Lenz HJ, Salem ME. Microsatellite instability in colorectal cancer: overview of its clinical significance and novel perspectives. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2018 Nov;16(11):735-745.

Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Arain MA, Chen YJ, Ciombor KK, et al. NCCN Guidelines Insights: Colon Cancer, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2021 Mar 2;19(3):329-359. doi: 10.6004/jnccn.2021.0012.

Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zubel A, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol*. 2011 Jul;22(7):1535-1546. doi: 10.1093/annonc/mdq632.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998 Nov 15;58(22):5248-57.

Butterworth AS, Higgins JP, Pharoah P. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2006 Jan;42(2):216-27. doi: 10.1016/j.ejca.2005.09.023.

Bylsma LC, Gillezeau C, Garawin TA, Kelsh MA, Fryzek JP, Sangaré L, et al. Prevalence of RAS and BRAF mutations in metastatic colorectal cancer patients by tumor sidedness: A

- systematic review and meta-analysis. *Cancer Med.* 2020 Feb;9(3):1044-1057. doi: 10.1002/cam4.2747.
- Caputo F, Santini C, Bardasi C, Cerma K, Casadei-Gardini A, Spallanzani A, et al. BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 28;20(21):5369. doi: 10.3390/ijms20215369.
- Choi YJ, Myung SK, Lee JH. Light Alcohol Drinking and Risk of Cancer: A Meta-Analysis of Cohort Studies. *Cancer Res Treat.* 2018 Apr;50(2):474-487. doi: 10.4143/crt.2017.094.
- Ciombor KK, Strickler JH, Bekaii-Saab TS, Yaeger R. *BRAF*-Mutated Advanced Colorectal Cancer: A Rapidly Changing Therapeutic Landscape. *J Clin Oncol.* 2022 Aug 20;40(24):2706-2715. doi: 10.1200/JCO.21.02541.
- Cohen R, Cervera P, Svrcsek M, Pellat A, Dreyer C, de Gramont A, et al. BRAF-Mutated Colorectal Cancer: What Is the Optimal Strategy for Treatment? *Curr Treat Options Oncol.* 2017 Feb;18(2):9. doi: 10.1007/s11864-017-0453-5.
- Colle R, Cohen R, Cochereau D, Duval A, Lascols O, Lopez-Trabada D, et al. Immunotherapy and patients treated for cancer with microsatellite instability. *Bull Cancer.* 2017 Jan;104(1):42-51. doi: 10.1016/j.bulcan.2016.11.006.
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004 Jul 22;351(4):337-45. doi: 10.1056/NEJMoa033025.
- De Palma FDE, D'Argenio V, Pol J, Kroemer G, Maiuri MC, Salvatore F. The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel).* 2019 Jul 20;11(7):1017. doi: 10.3390/cancers11071017.
- Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet.* 2019 Oct 19;394(10207):1467-1480. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32319-0.
- Fan A, Wang B, Wang X, Nie Y, Fan D, Zhao X, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: current achievements and future perspective. *Int J Biol Sci.* 2021 Sep 3;17(14):3837-3849. doi: 10.7150/ijbs.64077.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990 Jun 1;61(5):759-67. doi: 10.1016/0092-8674(90)90186-i.
- Frank MH, Wilson BJ, Gold JS, Frank NY. Clinical Implications of Colorectal Cancer Stem Cells in the Age of Single-Cell Omics and Targeted Therapies. *Gastroenterology.* 2021 May;160(6):1947-1960. doi: 10.1053/j.gastro.2020.12.080.
- Gallois C, Pernet S, Zaanani A, Taieb J. Colorectal Cancer: Why Does Side Matter? *Drugs.* 2018 Jun;78(8):789-798. doi: 10.1007/s40265-018-0921-7.
- Garcia-Carbonero N, Martinez-Useros J, Li W, Orta A, Perez N, Carames C, et al. *KRAS* and *BRAF* Mutations as Prognostic and Predictive Biomarkers for Standard Chemotherapy Response in Metastatic Colorectal Cancer: A Single Institutional Study. *Cells.* 2020 Jan 15;9(1):219. doi: 10.3390/cells9010219.

Gelsomino F, Barbolini M, Spallanzani A, Pugliese G, Cascinu S. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treat Rev.* 2016 Dec;51:19-26. doi: 10.1016/j.ctrv.2016.10.005.

Giovannucci E, Martínez ME. Tobacco, colorectal cancer, and adenomas: a review of the evidence. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Dec 4;88(23):1717-30. doi: 10.1093/jnci/88.23.1717.

Goodenberger ML, Thomas BC, Riegert-Johnson D, Boland CR, Plon SE, Clendenning M, et al. PMS2 monoallelic mutation carriers: the known unknown. *Genet Med.* 2016 Jan;18(1):13-9. doi: 10.1038/gim.2015.27.

Grothey A, Fakih M, Tabernero J. Management of BRAF-mutant metastatic colorectal cancer: a review of treatment options and evidence-based guidelines. *Ann Oncol.* 2021 Aug;32(8):959-967. doi: 10.1016/j.annonc.2021.03.206.

Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015 Nov;21(11):1350-6. doi: 10.1038/nm.3967.

Haigis KM. KRAS Alleles: The Devil Is in the Detail. *Trends Cancer.* 2017 Oct;3(10):686-697. doi: 10.1016/j.trecan.2017.08.006.

Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res.* 2000;77:81-137. doi: 10.1016/s0065-230x(08)60785-x.

Hardiman KM. Update on Sporadic Colorectal Cancer Genetics. *Clin Colon Rectal Surg.* 2018 May;31(3):147-152. doi: 10.1055/s-0037-1602234.

Hong SN. Genetic and epigenetic alterations of colorectal cancer. *Intest Res.* 2018 Jul;16(3):327-337. doi: 10.5217/ir.2018.16.3.327.

Huang D, Sun W, Zhou Y, Li P, Chen F, Chen H, et al. Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2018 Mar;37(1):173-187. doi: 10.1007/s10555-017-9726-5.

Huang L, Guo Z, Wang F, Fu L. KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2021 Nov 15;6(1):386. doi: 10.1038/s41392-021-00780-4.

Hultcrantz R. Aspects of colorectal cancer screening, methods, age and gender. *J Intern Med.* 2021 Apr;289(4):493-507. doi: 10.1111/joim.13171.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Globocan 2020: Cancer Fact Sheets — Colorectal Cancer. IARC, 2020.

Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2044-58. doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.054.

Jiang Z, Li C, Li F, Wang X. EGFR gene copy number as a prognostic marker in colorectal cancer patients treated with cetuximab or panitumumab: a systematic review and meta analysis. *PLoS One*. 2013;8(2):e56205. doi: 10.1371/journal.pone.0056205.

Jimeno A, Messersmith WA, Hirsch FR, Franklin WA, Eckhardt SG. KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 1;27(7):1130-6. doi: 10.1200/JCO.2008.19.8168.

Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*. 2003 Mar 10;284(1):31-53. doi: 10.1016/s0014-4827(02)00098-8.

Jung B, Staudacher JJ, Beauchamp D. Transforming Growth Factor β Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2017 Jan;152(1):36-52. doi: 10.1053/j.gastro.2016.10.015.

Jung G, Hernández-Illán E, Moreira L, Balaguer F, Goel A. Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020 Feb;17(2):111-130. doi: 10.1038/s41575-019-0230-y.

Jurišić V, Obradovic J, Pavlović S, Djordjevic N. Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Non-Small-Cell Lung Cancer: The Importance of Promoter Polymorphism Investigation. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2018 Oct 14;2018:6192187. doi: 10.1155/2018/6192187.

Kambara T, Simms LA, Whitehall VL, Spring KJ, Wynter CV, Walsh MD, et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut*. 2004 Aug;53(8):1137-44. doi: 10.1136/gut.2003.037671.

Kampman E, Voskuil DW, van Kraats AA, Balder HF, van Muijen GN, Goldbohm RA, et al. Animal products and K-ras codon 12 and 13 mutations in colon carcinomas. *Carcinogenesis*. 2000 Feb;21(2):307-9. doi: 10.1093/carcin/21.2.307.

Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Dec;16(12):713-732. doi: 10.1038/s41575-019-0189-8.

Kim JE, Hong YS, Kim HJ, Kim KP, Lee JL, Park SJ, et al. Defective Mismatch Repair Status was not Associated with DFS and OS in Stage II Colon Cancer Treated with Adjuvant Chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2015 Dec;22 Suppl 3:S630-7. doi: 10.1245/s10434-015-4807-6.

Komor MA, Bosch LJ, Bounova G, Bolijn AS, Delis-van Diemen PM, Rausch C, et al. Consensus molecular subtype classification of colorectal adenomas. *J Pathol*. 2018 Nov;246(3):266-276. doi: 10.1002/path.5129.

- Kriegl L, Neumann J, Vieth M, Greten FR, Reu S, Jung A, et al. Up and downregulation of p16(Ink4a) expression in BRAF-mutated polyps/adenomas indicates a senescence barrier in the serrated route to colon cancer. *Mod Pathol*. 2011 Jul;24(7):1015-22. doi: 10.1038/modpathol.2011.43.
- Lane D, Levine A. p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Dec;2(12):a000893. doi: 10.1101/cshperspect.a000893.
- Li J, Ma X, Chakravarti D, Shalapour S, DePinho RA. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. *Genes Dev*. 2021 Jun;35(11-12):787-820. doi: 10.1101/gad.348226.120.
- Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2008 Jan 20;26(3):374-9. doi: 10.1200/JCO.2007.12.5906.
- Lièvre A, Blons H, Laurent-Puig P. Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. *Oncogene*. 2010 May 27;29(21):3033-43. doi: 10.1038/onc.2010.89.
- Lipkin SM, Wang V, Stoler DL, Anderson GR, Kirsch I, Hadley D, et al. Germline and somatic mutation analyses in the DNA mismatch repair gene MLH3: Evidence for somatic mutation in colorectal cancers. *Hum Mutat*. 2001 May;17(5):389-96. doi: 10.1002/humu.1114.
- Low EE, Demb J, Liu L, Earles A, Bustamante R, Williams CD, et al. Risk Factors for Early-Onset Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2020 Aug;159(2):492-501.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2020.01.004.
- Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003 Mar 6;348(10):919-32. doi: 10.1056/NEJMra012242
- Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet*. 2009 Jul;76(1):1-18. doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01230.x.
- Mäkinen MJ, George SM, Jernvall P, Mäkelä J, Vihko P, Karttunen TJ. Colorectal carcinoma associated with serrated adenoma--prevalence, histological features, and prognosis. *J Pathol*. 2001 Mar;193(3):286-94. doi: 10.1002/1096-9896
- Malki A, ElRuz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Al Moustafa AE. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 24;22(1):130. doi: 10.3390/ijms22010130.
- Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):459-65. doi: 10.1038/nrc1097.
- Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 19;18(1):197. doi: 10.3390/ijms18010197.

- Martianov AS, Mitiushkina NV, Ershova AN, Martynenko DE, Bubnov MG, Amankwah P, et al. *KRAS, NRAS, BRAF, HER2* and MSI Status in a Large Consecutive Series of Colorectal Carcinomas. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 2;24(5):4868. doi: 10.3390/ijms24054868.
- Maughan TS, Adams RA, Smith CG, Meade AM, Seymour MT, Wilson RH, et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet.* 2011 Jun 18;377(9783):2103-14. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60613-2.
- Mauri G, Sartore-Bianchi A, Russo AG, Marsoni S, Bardelli A, Siena S. Early-onset colorectal cancer in young individuals. *Mol Oncol.* 2019 Feb;13(2):109-131. doi: 10.1002/1878-0261.12417.
- McCormick F. *KRAS* as a Therapeutic Target. *Clin Cancer Res.* 2015 Apr 15;21(8):1797-801. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2662.
- Medema JP. Cancer stem cells: the challenges ahead. *Nat Cell Biol.* 2013 Apr;15(4):338-44. doi: 10.1038/ncb2717.
- Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J.* 2010 Jan;277(2):301-8. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07448.x.
- Morán A, Ortega P, de Juan C, Fernández-Marcelo T, Frías C, Sánchez-Pernaute A, et al. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol.* 2010 Mar 15;2(3):151-8. doi: 10.4251/wjgo.v2.i3.151.
- Morris VK, Kennedy EB, Baxter NN, Benson AB 3rd, Cercek A, Cho M, et al. Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: ASCO Guideline. *J Clin Oncol.* 2023 Jan 20;41(3):678-700. doi: 10.1200/JCO.22.01690.
- Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch.* 2016 Aug;469(2):125-34. doi: 10.1007/s00428-016-1956-3.
- Nassar D, Blanpain C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol.* 2016 May 23;11:47-76. doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044438.
- Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2020 Jan;158(2):291-302. doi: 10.1053/j.gastro.2019.08.059.
- Nojadeh JN, Behrouz Sharif S, Sakhinia E. Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI J.* 2018 Jan 22;17:159-168. doi: 10.17179/excli2017-948.
- Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene.* 2006 Jan 17;366(1):2-16. doi: 10.1016/j.gene.2005.10.018.
- O'Brien MJ, Yang S, Mack C, Xu H, Huang CS, Mulcahy E, et al. Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and

- traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am J Surg Pathol*. 2006 Dec;30(12):1491-501. doi: 10.1097/01.pas.0000213313.36306.85.
- Picard E, Verschoor CP, Ma GW, Pawelec G. Relationships Between Immune Landscapes, Genetic Subtypes and Responses to Immunotherapy in Colorectal Cancer. *Front Immunol*. 2020 Mar 6;11:369. doi: 10.3389/fimmu.2020.00369.
- Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2059-72. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.065.
- Polom K, Marano L, Marrelli D, De Luca R, Roviello G, Savelli V, et al. Meta-analysis of microsatellite instability in relation to clinicopathological characteristics and overall survival in gastric cancer. *Br J Surg*. 2018 Feb;105(3):159-167. doi: 10.1002/bjs.10663.
- Porru M, Pompili L, Caruso C, Biroccio A, Leonetti C. Targeting KRAS in metastatic colorectal cancer: current strategies and emerging opportunities. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Mar 13;37(1):57. doi: 10.1186/s13046-018-0719-1.
- Potocki PM, Wójcik P, Chmura Ł, Goc B, Fedewicz M, Bielańska Z, et al. Clinical Characterization of Targetable Mutations (BRAF V600E and KRAS G12C) in Advanced Colorectal Cancer-A Nation-Wide Study. *Int J Mol Sci*. 2023 May 22;24(10):9073. doi: 10.3390/ijms24109073.
- Protásio BM, Matutino A, Lage LV, Santana I, Ramos R, Sabbaga J, et al. Safety and Efficacy of a Modified FLOX Adjuvant Regimen for Patients With Stage III Colorectal Cancer Treated in the Community. *Clin Colorectal Cancer*. 2017 Mar;16(1):65-72. doi: 10.1016/j.clcc.2016.07.001.
- Raskov H, Pommergaard HC, Burcharth J, Rosenberg J. Colorectal carcinogenesis--update and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014 Dec 28;20(48):18151-64. doi: 10.3748/wjg.v20.i48.18151.
- Raskov H, Søby JH, Troelsen J, Bojesen RD, Gögenur I. Driver Gene Mutations and Epigenetics in Colorectal Cancer. *Ann Surg*. 2020 Jan;271(1):75-85. doi: 10.1097/SLA.0000000000003393.
- Rezende LFM, Sá TH, Markozannes G, Rey-López JP, Lee IM, Tsilidis KK, et al. Physical activity and cancer: an umbrella review of the literature including 22 major anatomical sites and 770 000 cancer cases. *Br J Sports Med*. 2018 Jul;52(13):826-833. doi: 10.1136/bjsports-2017-098391.
- Riely GJ, Politi KA, Miller VA, Pao W. Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Dec 15;12(24):7232-41. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0658.
- Robertson, DJ. ABC of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2012 Jul 143(3): 868-69. doi: [10.1053/j.gastro.2012.07.090](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.07.090).

Ryan E, Sheahan K, Creavin B, Mohan HM, Winter DC. The current value of determining the mismatch repair status of colorectal cancer: A rationale for routine testing. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 Aug;116:38-57. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.05.006.

Sameer AS, ul Rehman S, Pandith AA, Syeed N, Shah ZA, Chowdhri NA, et al. Molecular gate keepers succumb to gene aberrations in colorectal cancer in Kashmiri population, revealing a high incidence area. *Saudi J Gastroenterol*. 2009 Oct-Dec;15(4):244-52. doi: 10.4103/1319-3767.56102.

Santos ML, Quintilio W, Manieri TM, Tsuruta LR, Moro AM. Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development. *Braz J Pharm Sci*. 2018 54(spe):e01007. doi: 10.1590/s2175-97902018000001007.

Sawicki T, Ruzkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T, Przybyłowicz KE. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 22;13(9):2025. doi: 10.3390/cancers13092025.

Segatto O, Anastasi S, Alemà S. Regulation of epidermal growth factor receptor signalling by inducible feedback inhibitors. *J Cell Sci*. 2011 Jun 1;124(Pt 11):1785-93. doi: 10.1242/jcs.083303.

Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol*. 2018 Jan;12(1):3-20. doi: 10.1002/1878-0261.12155.

Song M, Chan AT. Environmental Factors, Gut Microbiota, and Colorectal Cancer Prevention. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019 Jan;17(2):275-289. doi: 10.1016/j.cgh.2018.07.012.

Taberero J, Grothey A, Van Cutsem E, Yaeger R, Wasan H, Yoshino T, et al. Encorafenib Plus Cetuximab as a New Standard of Care for Previously Treated *BRAF* V600E-Mutant Metastatic Colorectal Cancer: Updated Survival Results and Subgroup Analyses from the BEACON Study. *J Clin Oncol*. 2021 Feb 1;39(4):273-284. doi: 10.1200/JCO.20.02088.

Tveit KM, Guren T, Glimelius B, Pfeiffer P, Sorbye H, Pyrhonen S, et al. Phase III trial of cetuximab with continuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX) versus FLOX alone in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: the NORDIC-VII study. *J Clin Oncol*. 2012 May 20;30(15):1755-62. doi: 10.1200/JCO.2011.38.0915.

Umar A. Lynch syndrome (HNPCC) and microsatellite instability. *Dis Markers*. 2004;20(4-5):179-80. doi: 10.1155/2004/486032.

Ursem C, Atreya CE, Van Loon K. Emerging treatment options for *BRAF*-mutant colorectal cancer. *Gastrointest Cancer*. 2018;8:13-23. doi: 10.2147/GICTT.S125940.

Van Cutsem E, Nordlinger B, Adam R, Köhne CH, Pozzo C, Poston G, et al. Towards a pan-European consensus on the treatment of patients with colorectal liver metastases. *Eur J Cancer*. 2006 Sep;42(14):2212-21. doi: 10.1016/j.ejca.2006.04.012.

Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in

patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2007 May 1;25(13):1658-64. doi: 10.1200/JCO.2006.08.1620.

Van Cutsem E, Huijberts S, Grothey A, Yaeger R, Cuyle PJ, Elez E, et al. Binimetinib, Encorafenib, and Cetuximab Triplet Therapy for Patients With *BRAF* V600E-Mutant Metastatic Colorectal Cancer: Safety Lead-In Results From the Phase III BEACON Colorectal Cancer Study. *J Clin Oncol*. 2019 Jun 10;37(17):1460-1469. doi: 10.1200/JCO.18.02459.

Van Engeland M, Derks S, Smits KM, Meijer GA, Herman JG. Colorectal cancer epigenetics: complex simplicity. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 1;29(10):1382-91. doi: 10.1200/JCO.2010.28.2319.

Vasen HF. Clinical diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes. *J Clin Oncol*. 2000 Nov 1;18(21 Suppl):81S-92S.

Vila APS, Rodrigues GH, Marzochi LL, Oliveira-Cucolo JG, Galbiatti-Dias ALS, Andrade RFM, et al. Epidemiological and molecular evaluation of *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* genes and MSI in the development of colorectal cancer. *Gene*. 2023 Jun 20;870:147395. doi: 10.1016/j.gene.2023.147395.

Vuik FE, Nieuwenburg SA, Bardou M, Lansdorp-Vogelaar I, Dinis-Ribeiro M, Bento MJ, et al. Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut*. 2019 Oct;68(10):1820-1826. doi: 10.1136/gutjnl-2018-317592.

Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. Role for IGFBP7 in senescence induction by *BRAF*. *Cell*. 2010 May 28;141(5):746-7. doi: 10.1016/j.cell.2010.05.014.

Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004 Mar 19;116(6):855-67. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00215-6.

Willett WC. Diet and cancer: an evolving picture. *JAMA*. 2005 Jan 12;293(2):233-4. doi: 10.1001/jama.293.2.233.

WORLD CANCER RESEARCH FUND INTERNATIONAL/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Continuous update project report: diet, nutrition, physical activity and colorectal cancer. 2017.

Xing M. *BRAF* mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Jun;12(2):245-62. doi: 10.1677/erc.1.0978.

Yaeger R, Kotani D, Mondaca S, Parikh AR, Bando H, Van Seventer EE, et al. Response to Anti-EGFR Therapy in Patients with *BRAF* non-V600-Mutant Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2019 Dec 1;25(23):7089-7097. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-2004.

Yeh JH, Tsai HL, Chen YC, Li CC, Huang CW, Chang TK, et al. *BRAF*, *MEK*, and *EGFR* Triplet Inhibitors as Salvage Therapy in *BRAF*-Mutated Metastatic Colorectal Cancer-A Case Series Study *Target Therapy of BRAF-Mutated mCRC*. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Dec 7;57(12):1339. doi: 10.3390/medicina57121339.

Zhang H, Xia Y, Wang F, Luo M, Yang K, Liang S, et al. Aldehyde Dehydrogenase 2 Mediates Alcohol-Induced Colorectal Cancer Immune Escape through Stabilizing PD-L1 Expression. *Adv Sci (Weinh)*. 2021 Mar 24;8(10):2003404. doi: 10.1002/advs.202003404.

Zhang X, Wu T, Cai X, Dong J, Xia C, Zhou Y, et al. Neoadjuvant Immunotherapy for MSI-H/dMMR Locally Advanced Colorectal Cancer: New Strategies and Unveiled Opportunities. *Front Immunol*. 2022 Mar 17;13:795972. doi: 10.3389/fimmu.2022.795972.

Zhao H, Ming T, Tang S, Ren S, Yang H, Liu M, et al. Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target. *Mol Cancer*. 2022 Jul 14;21(1):144. doi: 10.1186/s12943-022-01616-7.

Zhu C, Guan X, Zhang X, Luan X, Song Z, Cheng X, et al. Targeting KRAS mutant cancers: from druggable therapy to drug resistance. *Mol Cancer*. 2022 Aug 4;21(1):159. doi: 10.1186/s12943-022-01629-2.

A terceira produção científica intitulada: “**Avaliação molecular dos genes *KRAS* E *EGFR*, perfil MSI E expressão do receptor CXCR4 no câncer colorretal em uma população brasileira**” será submetida ao periódico científico *Gene* (Fator de Impacto: 3,5).

- **Artigo 3:**

AVALIAÇÃO MOLECULAR DOS GENES *KRAS* E *EGFR*, PERFIL MSI E EXPRESSÃO DO RECEPTOR CXCR4 NO CÂNCER COLORRETAL EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA

RESUMO:

O câncer colorretal (CCR) é caracterizado por alterações genéticas e epigenéticas em vias de sinalização e mutações em genes relacionados a mecanismos de reparo de DNA. Além disso, quimiocinas e seus receptores, como o eixo CXCL12/CXCR4, também vêm ganhando destaque na participação da carcinogênese colorretal. Desse modo, os avanços na pesquisa molecular do CCR aumentaram a busca por novos biomarcadores relacionados ao entendimento da fisiopatologia e prognóstico, fornecendo informações clinicamente relevantes sobre o curso da doença e direcionamento terapêutico dos pacientes. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto clínico das mutações nos genes *KRAS* e *EGFR*, a instabilidade de microssatélite (MSI) e a expressão do receptor CXCR4 no CCR. Tratou-se de um estudo transversal, no qual foram avaliados 66 pacientes do Hospital do Câncer de Londrina (HCL), de ambos os sexos. A análise das mutações nos genes *KRAS* e *EGFR* foi realizada por meio de reação em cadeia da polimerase, seguida de restrição enzimática (PCR-RFLP) e a expressão de CXCR4 foi realizada através de imunohistoquímica (IHQ). A instabilidade de microssatélites e os demais parâmetros foram obtidos a partir dos prontuários dos pacientes. A mediana da idade dos pacientes foi de 64 anos, com intervalo interquartil de 57,5 - 69,5 anos e 51,5% eram do sexo feminino. As frequências de mutações nos genes foram as seguintes: 40,9% no códon 12 de *KRAS*, 31,8% no códon 13 de *KRAS* e 1,5% no códon 21 do *EGFR*. Nenhum paciente apresentou mutação no códon 19 do *EGFR*. No presente estudo, a mutação no códon 13 de *KRAS* correlacionou-se com um maior estadiamento da doença (Tau = 0,259; p = 0,031), número de linfonodos regionais acometidos (Tau = 0,267; p = 0,040) e com a expressão de MSH6 (Tau = 0,174; p = 0,04). Já a mutação no códon 12 de *KRAS*, correlacionou-se com a idade avançada (Tau = 0,358; p = 0,006). Com relação a MSI, a maioria dos pacientes expressavam as proteínas de reparo de incompatibilidade do DNA, indicando uma estabilidade de microssatélites. Além disso, a expressão de MSH6 correlacionou-se com menor idade e a expressão de MLH1 e PSM2 correlacionou-se com um menor tamanho tumoral. Quanto ao perfil de imunomarcação do receptor CXCR4, não foram encontradas correlações significativas com os parâmetros clinicopatológicos e nem com as mutações nos genes *KRAS* e *EGFR*. Porém, a expressão do receptor CXCR4 no tecido tumoral foi encontrada, em

sua maioria, em pacientes positivos para o acometimento de linfonodos, com tamanho tumoral T3, estadiamento III, positivos para as proteínas de reparo de DNA e negativos para mutação nos códons 12 e 13 de *KRAS*. As mutações em genes associados com o processo de carcinogênese colorretal encontradas no presente estudo, estão diretamente relacionadas com condições clinicopatológicas mais avançadas da doença. Portanto, a utilização de biomarcadores na prática clínica faz-se importante para as decisões prognósticas do CCR, além de constituir a base da medicina personalizada.

Palavras-chave: Neoplasia colorretal; oncogenes; biomarcadores tumorais.

INTRODUÇÃO

O carcinoma colorretal (CCR) é o terceiro tumor mais frequentemente diagnosticado em homens e mulheres, com mais de 1,9 milhões de novos casos em todo o mundo em 2020 (IARC, 2020). As taxas de sobrevivência em 5 anos são de 90% para tumores localizados, 71% para tumores regionais e de 14% em casos de metástases à distância (Picard et al., 2020). A evolução clínica dos pacientes está intimamente relacionada às características do tumor e ao estadiamento, embora ocorram discrepâncias em termos de prognóstico entre pacientes com o mesmo estágio da doença e associadas a diferentes mutações genéticas, destacando a heterogeneidade molecular do CCR (Zhu et al., 2021).

O CCR é considerado uma doença multifacetada devido a sua biologia tumoral dinâmica, caracterizada por alterações genéticas e epigenéticas em oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados ao reparo de DNA (Sullivan; Noujaim; Roper, 2022). Mutações somáticas em oncogenes pertencentes à via de sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), como por exemplo nos genes *KRAS*, *BRAF* e *EGFR* desempenham um papel crucial no processo de carcinogênese colorretal, contribuindo com o crescimento celular desordenado (Brinzan et al., 2022).

Pacientes com *KRAS* mutado normalmente estão associados a um estado avançado da doença, má diferenciação tumoral, metástases à distância e baixa sobrevida (Zhu et al., 2021). Somado a isso, tais mutações têm sido diretamente relacionadas à resistência aos anticorpos monoclonais anti-EGFR (panitumumabe e cetuximabe), devido a ativação constitutiva da via de sinalização à jusante independente de EGFR (Huang et al., 2018).

A instabilidade de microssatélites (MSI) também participa do processo de carcinogênese colorretal, servindo como um indicador molecular de reparo defeituoso de incompatibilidade de DNA. A utilização de técnicas que identificam a MSI auxilia na tomada de decisão frente ao regime terapêutico, uma vez que os pacientes que apresentam esse tipo de tumor, são beneficiados com uso de anticorpos monoclonais imunomoduladores, como os inibidores de checkpoint anti-PD1 pembrolizumabe ou nivolumabe, associado ou não ao inibidor do antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4), como o ipilimumabe (Picard et al., 2020; Martianov et al., 2023).

Além das principais vias de carcinogênese do CCR, a ligação da quimiocina 12 da família C-X-C (CXCL12) com o receptor 4 da família C-X-C (CXCR4) tem recebido atenção considerável no CCR primário e principalmente no processo metastático. A expressão aberrante do CXCR4 foi encontrada durante a malignidade do CCR, participando dos processos de proliferação, angiogênese e disseminação metastática (Khare; Bissonnette; Khare, 2021). Além disso, a superexpressão desse receptor reflete a progressão do CCR e, portanto, está associada à agressividade do tumor, diminuição da sobrevida e mau prognóstico (Shi; Riese; Shen, 2020).

Explorar associações entre marcadores moleculares e parâmetros clinicopatológicos contribui para refinar as avaliações prognósticas e a capacidade de resposta ao tratamento, avançando, em última análise, a medicina de precisão no tratamento do CCR (Alizadeh-Sedigh et al., 2022). Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto clínico das mutações nos genes *KRAS* e *EGFR*, o perfil MSI e a expressão do receptor CXCR4 no CCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção e Caracterização das Amostras

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (Registro Plataforma Brasil No. CAAE 73557317.0.0000.5231) e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes da coleta.

Tratou-se de um estudo transversal, no qual foram selecionadas 66 amostras de pacientes de ambos os sexos, diagnosticados com CCR e atendidos no Hospital do Câncer de Londrina (HCL).

Considerou-se elegível para a pesquisa os pacientes com neoplasia de cólon direito, esquerdo e reto, independentemente do recebimento ou não de quimioterapia, uso de anticorpos monoclonais ou radioterapia prévia. As amostras incluídas em parafina cuja extração de DNA não suscitou quantidade suficiente de material genético, foram excluídas do estudo.

A expressão das proteínas de reparo de incompatibilidade do DNA (MSH6, MSH2, MLH1 e PSM2) foi realizada no HCL por meio de técnica imuno-histoquímica. Os resultados foram obtidos a partir de consulta aos prontuários dos pacientes. Os dados clínicos e anatomopatológicos como idade, sexo, acometimento de linfonodos, tamanho tumoral e estadiamento Tumor-Nódulo-Metástase (TNM) (NCCN, 2018), também foram obtidos a partir dos prontuários dos pacientes atendidos no HCL.

Extração de DNA

O DNA genômico das amostras foi extraído a partir de tecido tumoral incluído em parafina utilizando o kit de extração *QIAamp® DNA FFPE Tissue*, seguindo instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria em aparelho *NanoDrop 2000c® Spectrophotometer* (ThermoScientific, Wilmington, Delaware, EUA) nos comprimentos de onda 260/280nm.

Análise das mutações nos códons 12 e 13 do gene *KRAS*

A análise das mutações somáticas nos códons 12 e 13 de foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida de análise de polimorfismo de comprimento de restrição (RFLP), de acordo com o protocolo descrito por Nollau et al. (1996). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para ambas as mutações, estão descritos na tabela 1.

Na etapa de amplificação por PCR para a análise de ambas as mutações foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes: 1x PCR *buffer*, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,3 µM de cada *primer*, 0,04 U/µL de Taq DNA polimerase (todos adquiridos da Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA), 5 ng/µL de DNA alvo e água ultrapura para completar 15 µL de volume final. As condições de PCR foram as seguintes: 5 minutos a 95 °C seguidos de 40 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 50 °C e 2 minutos a 72 °C seguidos de 10 minutos de extensão final a 72 °C.

Para a etapa de restrição enzimática, foram seguidos os protocolos dos

fabricantes das enzimas de restrição (Invitrogen®), BstNI (sítio de restrição: 5'-CCWGG-3') para o códon 12 de *KRAS* e a BglI (sítio de restrição: 5'-GCCN5GGC-3'), para o códon 13 de *KRAS* (Tabela 1). Os fragmentos amplificados por PCR e clivados com enzimas foram visualizados por eletroforese em géis de poliacrilamida (10%), corados por nitrato de prata (AgNO₃).

Análise das mutações nos códons 19 e 21 do gene *EGFR*

A análise da mutação do *EGFR* nos códons 19 (dels746-750) e 21 (L858R) foram realizadas por PCR de acordo com o protocolo descrito por Pam et al. (2005). Para a mutação no códon 21, foi realizada técnica de RFLP após a amplificação. Já para a mutação no códon 19, por tratar-se de uma deleção, não foi realizada etapa de restrição enzimática. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para ambas as mutações estão descritos na tabela 1.

As concentrações de reagentes utilizadas para a etapa de amplificação por PCR seguiram o mesmo protocolo das mutações nos códons 12 e 13 de *KRAS*. As condições de PCR para o códon 19 foram as seguintes: 10 minutos a 95 °C seguidos de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C e 1 minuto a 72 °C seguidos de 10 minutos de extensão final a 72 °C. Já as condições de PCR para o códon 21 foram: 10 minutos a 95 °C seguidos de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 65 °C e 1 minuto a 72 °C seguidos de 10 minutos de extensão final a 72 °C.

Para a etapa de restrição enzimática do códon 21, foram seguidos os protocolos de recomendações dos fabricantes da enzima de restrição Sau96I (G'GNC'C) (Invitrogen®) (Tabela 1). Os fragmentos amplificados por PCR e clivados com enzimas foram visualizados por eletroforese em géis de poliacrilamida (10%), corados por nitrato de prata (AgNO₃).

Tabela 1: Sequência de *primers* para as mutações em *KRAS* e *EGFR*.

Gene	Sequência	pb ¹	Enzima de Restrição	FRAGMENTOS DOS GENÓTIPOS (pb ²)		
				Selvagem	Mutado Heterozigoto	Mutado Homozigoto
KRAS 12	F: 5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3' R: 5'-ACTCATGAAAATGGTCAGAGAAACCTTTAT-3'	194	BstNI	163	194, 163	194
KRAS 13	F: 5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGCCCTGGT-3' R: 5'-ACTCATGAAAATGGTCAGAGAAACCTTTAT-3'	194	BglI	163	194, 163	194
EGFR 19	F: 5'-GCACCATCTCACAATTGCCAGTTA-3' R: F5'-AAAAGGTGGGCCTGAGGTTCA-3'	207	-	207	207, 198, 195, 192, 189	198, 195, 192, 189
EGFR 21	F: 5'- CCTCACAGCAGGGTCTTCTCTGT -3' R: 5'-TCAGGAAAATGCTGGCTGACCTA-3'	222	Sau96I	173, 49	173, 87, 86, 49	87, 86, 49

Legenda: F – Forward; R – Reverse; pb – pares de base após reação em cadeia da polimerase; pb² – pares de base após etapa de restrição enzimática.

Sequenciamento

Os produtos de PCR para os códons 12 e 13 de *KRAS* e códons 19 e 21 de *EGFR* foram purificados utilizando PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen®), seguindo as instruções do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o *kit BigDye® Terminator v3.1* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), 50ng de *template* e 5pM de *primer* em um volume final de 10µl. Os fragmentos amplificados foram sequenciados em *Genetic Analyzer 3500XL* 24 capilares (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) para validação do método de PCR-RFLP.

Análise da Expressão de CXCR4

A análise da expressão de CXCR4 foi realizada por meio de imunohistoquímica, na qual foram utilizados cortes histológicos de 5µm de tecido tumoral, embebidos em blocos de parafina. As secções de tecidos foram desparafinadas, hidratadas e tratadas termicamente em tampão EDTA 1 mM para recuperação antigênica em panela de pressão a 95, 8 °C durante 20 minutos.

As secções foram incubadas durante a noite à temperatura ambiente com anticorpo monoclonal primário-IgG de coelho anti-CXCR4 (R&D System, Minneapolis, MN, cat. MAB172, 1:100), seguido de incubação com anticorpo secundário apropriado (ImmunoDetector HRP/DAB, BioSB, Santa Bárbara, CA, EUA). Os cortes foram lavados, corados com cromógeno 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e contra corados com hematoxilina (Sigma-Aldrich). Um controle negativo passou pela primeira etapa do procedimento por incubação com o diluente em vez do anticorpo primário.

As lâminas histológicas foram analisadas ao microscópio óptico por um patologista experiente. Para cada amostra, três áreas tumorais com maior intensidade de imunomarcação CXCR4 foram fotografadas (800 × 600 pixels) a partir de campos de ampliação de 400X usando uma câmera Amscope (FMA050) adaptada no microscópio.

As imagens adquiridas digitalmente foram então analisadas usando o software ImageJ 1.53 para Windows (software de imagem Java de domínio público: //rsb.info.nih.gov/ij/), usando a ferramenta de limite com seleção baseada em cores para coloração positiva. Rotinas para análise de imagens foram definidas na linguagem macro ImageJ e realizadas em imagens RGB sem tratamento adicional. O número de pixels na faixa de cores selecionada foi dividido pelo número total de pixels

em cada campo. Os resultados foram expressos pela relação entre a fração de área positiva por fração de área total como a porcentagem (%) de coloração com CXCR4.

Análise Estatística

As análises foram realizadas por meio do programa SPSS versão 22 (IBM®, Armonk, Nova York, NY, EUA), com índice de significância mínimo de $p < 0,05$.

Inicialmente, os dados patológicos foram demonstrados em uma tabela descritiva, onde o número de linfonodos regionais e o tamanho tumoral foram classificados de acordo com o estadiamento TNM. Já as proteínas de reparo do DNA foram consideradas positivas em casos de expressão das mesmas por meio de técnica de imuno-histoquímica e negativas em casos de deficiência no sistema de reparo de incompatibilidade do DNA.

Os dados referentes a idade dos pacientes foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Por não serem paramétricos, os mesmos foram apresentados como mediana e intervalo interquartil. Para as análises de correlação entre as mutações nos genes *KRAS* e *EGFR*, a expressão do receptor CXCR4, perfil MSI e os parâmetros clinicopatológicos, foi utilizado o coeficiente Tau de Kendall. Os resultados da expressão de CXCR4 obtidos a partir de tecido tumoral foram divididos em dois grupos: CXCR4_S e CXCR4_I. O grupo CXCR4_S representou a análise de intensidade de marcação realizada ao microscópio óptico por patologista experiente. Já as imagens adquiridas digitalmente e analisadas pelo software ImageJ, compuseram o grupo CXCR4_I.

RESULTADOS

A mediana da idade dos pacientes foi de 64 anos, com intervalo interquartil de 57,5 - 69,5 anos e 51,5% eram do sexo feminino. As características clinicopatológicas dos pacientes com CCR estão apresentadas na Tabela 2. A frequência de pacientes com mutações nos códons 12 e 13 do gene *KRAS* foram de 40,9% e 31,8%, respectivamente. Já para a mutação em *EGFR* códon 21, a frequência foi de 1,5%. Nenhum paciente apresentou mutação no códon 19 do gene *EGFR*.

O coeficiente de Kendall indicou uma tendência inversamente proporcional entre as mutações nos códons 12 e 13 do gene *KRAS* (Tau = -0,238; $p = 0,055$). O presente resultado pode sugerir que as mutações em *KRAS* 12 e *KRAS* 13 podem ser

mutuamente exclusivas, ou seja, o paciente tende a ter uma ou outra, mas raramente as duas.

Os pacientes portadores da mutação no códon 12 do gene *KRAS* estavam classificados, em sua maioria, nos estágios II e III (43,5% em ambos), eram negativos para o acometimento de linfonodos (56,5%) e apresentavam tamanho tumoral T3 (69,6%). Com relação ao perfil de imunomarcagem para a expressão das proteínas pertencentes ao sistema de reparo de mal pareamento do DNA, os pacientes com mutações no códon 12 do gene *KRAS* foram em sua maioria positivos para MSH6, MSH2, MLH1 e PSM2 (Tabela 2).

Tabela 2: Características clinicopatológicas e mutações no gene *KRAS*.

PARÂMETROS	n (%)	KRAS 12		KRAS 13	
		Selvagem n (%)	Mutado n (%)	Selvagem n (%)	Mutado n (%)
n_LN					
Negativo	29 (49,2)	16 (44,4)	13 (56,5)	22 (56,4)	7 (35,0)
N1	16 (27,1)	10 (27,8)	6 (26,1)	11 (28,2)	5 (25,5)
N2	14 (23,7)	10 (27,8)	4 (17,4)	6 (15,4)	8 (40,0)
Tamanho tumoral					
T1	3 (5,1)	2 (5,6)	1 (4,3)	2 (5,1)	1 (5,0)
T2	9 (15,3)	5 (13,9)	4 (17,4)	8 (20,5)	1 (5,0)
T3	44 (74,6)	28 (77,8)	16 (69,6)	26 (66,7)	18 (90,0)
T4	3 (5,1)	1 (2,8)	2 (8,7)	3 (7,7)	0 (0)
Estadiamento					
I	10 (16,9)	7 (19,4)	3 (13,0)	9 (23,1)	1 (5,0)
II	19 (32,2)	9 (25,0)	10 (43,5)	13 (33,3)	6 (30,0)
III	29 (49,2)	19 (52,8)	10 (43,5)	17 (43,6)	12 (60,0)
IV	1 (1,7)	1 (2,8)	0 (0)	0 (0)	1 (5,0)
MSH6					
Negativo	4 (6,1)	2 (5,1)	2 (7,4)	4 (8,9)	0 (0)
Positivo	62 (93,9)	37 (94,9)	25 (92,6)	41 (91,1)	21 (100,0)
MSH2					
Negativo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Positivo	66 (100)	39 (100,0)	27 (100,0)	45 (100,0)	21 (100,0)
MLH1					
Negativo	2 (3,0)	2 (5,1)	0 (0)	2 (4,4)	0 (0)
Positivo	64 (97,0)	37 (94,9)	27 (100,0)	43 (95,6)	21 (100,0)
PSM2					
Negativo	2 (4,9)	2 (8,3)	0 (0)	2 (7,7)	0 (0)
Positivo	39 (95,1)	22 (91,7)	17 (100,0)	24 (92,3)	15 (100,0)

Legenda: %: porcentagem; n: número; n_LN: número de linfonodos regionais acometidos segundo o estadiamento TNM; MLH1: *Mut-L homologue*; MSH2: *Mut-S homologue 2*; MSH6: *Human mut-S homologue 6*; PSM2: *Human postmeiotic segregation 2*.

Os pacientes com CCR portadores da mutação no códon 13 do gene *KRAS* apresentaram expressão positiva para as proteínas de reparo do DNA (MSH6, MSH2, MLH1 e PSM2), indicando estabilidade de microssatélites. Além disso, a maioria foi classificada no estágio III (60,0%), com tamanho tumoral T3 (90,0%) e positivos para o acometimento de linfonodos, principalmente N2 (40,0%) (Tabela 2).

Em relação a análise de correlação entre as características clinicopatológicas e as mutações no códon 12 de *KRAS*, o coeficiente de Kendall apontou uma correlação positiva entre esse gene e a idade (Tau = 0,358; p = 0,006), sugerindo que a mutação em *KRAS* 12 pode ser uma característica de pacientes com idade mais avançada (Tabela 3).

No presente estudo, foi identificada uma correlação positiva entre a mutação no códon 13 do gene *KRAS* e estadiamento (Tau = 0,259; p = 0,031) e o número de linfonodos regionais acometidos (Tau = 0,267; p = 0,040). Também foi encontrada uma correlação positiva entre o códon 13 de *KRAS* e a proteína MSH6 (Tau = 0,174; p = 0,04). Portanto, a mutação no códon 13 do gene *KRAS* pode indicar maior estadiamento da doença e associação com a expressão da proteína MSH6 (Tabela 3).

Tabela 3: Correlação entre parâmetros clinicopatológicos e a presença de mutações nos códons 12 e 13 de *KRAS*.

Parâmetros	Correlação com características clinicopatológicas [Tau (p)]	
	<i>KRAS</i> 12	<i>KRAS</i> 13
Idade	0,358 (0,006)*	0,071 (0,487)
n_LN	-0,126 (0,311)	0,267 (0,040)*
Tamanho tumoral	0,031 (0,807)	0,083 (0,515)
Estadiamento	-0,071 (0,571)	0,259 (0,031)*
MSH6	-0,047 (0,705)	0,174 (0,040)*
MSH2	-	-
MLH1	0,147 (0,236)	0,121 (0,330)
PSM2	0,191 (0,746)	0,172 (0,277)
CXCR4_S	-0,017 (0,923)	0,179 (0,306)
CXCR4_I	-0,103 (0,520)	0,164 (0,304)

Legenda: n_LN: número de linfonodos regionais acometidos segundo o estadiamento TNM; MLH1: *Mut-L homologue*; MSH2: *Mut-S homologue 2*; MSH6: *Human mut-S homologue 6*; PSM2: *Human postmeiotic segregation 2*; *: p < 0.05.

O coeficiente de Kendall indicou uma correlação negativa entre o tamanho tumoral e a expressão das proteínas MLH1 e PSM2; e uma correlação negativa entre MSH6, idade e número de linfonodos regionais acometidos. Além disso, MSH6 correlacionou-se positivamente com MLH1 e PSM2, uma vez que essas proteínas

atuam de forma conjunta a fim de corrigir o mal pareamento do DNA no processo de replicação (Tabela 4).

Tabela 4: Correlação entre parâmetros clinicopatológicos e a expressão das proteínas de reparo do DNA.

Parâmetros	Proteínas de Reparo do DNA [Tau (p)]		
	MSH6	MLH1	PSM2
Idade	-0,173 (0,048)*	-0,154 (0,069)	-0,162 (0,113)
n_LN	-0,245 (0,049)*	-0,179 (0,151)	-0,244 (0,119)
Tamanho tumoral	-0,212 (0,094)	-0,273 (0,031)*	-0,324 (0,040)*
Estadiamento	-0,196 (0,115)	-0,111 (0,371)	-0,144 (0,352)
MSH6	1,000	0,696 (<0,001)*	0,806 (<0,001)*
MSH2	-	-	-
MLH1	0,696 (<0,001)*	1,000	1,000**
PSM2	0,806 (<0,001)*	1,000**	1,000
CXCR4_S	0,208 (0,234)	0,208 (0,234)	0,248 (0,240)
CXCR4_I	0,200 (0,208)	0,200 (0,208)	0,220 (0,258)

Legenda: n_LN: número de linfonodos regionais acometidos segundo o estadiamento TNM; *: $p < 0,05$; **: A correlação é significativa no nível 0,01.

Com relação ao perfil de imunomarcção para a expressão do receptor CXCR4, não foram encontradas correlações significativas com os parâmetros clinicopatológicos e nem com as mutações em *KRAS* (12 e 13) e *EGFR* (19 e 21), $p > 0,05$. Porém, a expressão do receptor CXCR4 no tecido tumoral foi encontrada, em sua maioria, em pacientes do sexo feminino (57,9%), positivos para o acometimento de linfonodos (57,9%), com tamanho tumoral T3 (88,9%), estadiamento III (55,5%), positivos para as proteínas de reparo de DNA (100,0%) e negativos para mutação nos códons 12 (68,4%) e 13 (63,2%) de *KRAS*.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a integração de conhecimentos moleculares envolvidos na patogênese do CCR tem proporcionado crescente aumento no número de pesquisas, introduzindo novas terapias no combate à doença, como o uso de anticorpos monoclonais e imunoterapias, além de auxiliar no desenvolvimento de testes moleculares que identificam mutações genéticas específicas relacionadas ao CCR (Santos et al., 2018; Zhu et al., 2021).

O presente estudo avaliou as frequências de mutação somática nos genes *KRAS* e *EGFR* em pacientes com CCR, que foram de 40,9% para o códon 12 do gene *KRAS*, 31,8% para códon 13 do gene *KRAS* e 1,5% para o códon 21 do gene *EGFR*. Dados da literatura apontam uma frequência de mutações em *KRAS* de 30-50% dos casos de CCR, afetando principalmente os códons 12 e 13 (Lavacchi et al., 2022; Tran et al., 2022; Minh Cuong et al., 2023). Tal mutação tem sido associada à resistência ao tratamento com anticorpos monoclonais anti-EGFR em pacientes com CCR metastático (CCRm), uma vez que ocorre ativação da proteína independente do *status* de ativação/inibição do receptor (Abbasabadi et al., 2023).

Além disso, a falta de resposta aos anticorpos anti-EGFR em pacientes com CCRm com *KRAS* do tipo selvagem, pode indicar que mutações adicionais também resultam em ineficácia de tais drogas (Brinzan et al., 2022). Alguns estudos sugerem que podem ocorrer mutações secundárias no próprio receptor do fator de crescimento epidérmico (Mancini; Yarden, 2016; Sigismund; Avanzato; Lanzetti, 2017), alterando a sua sinalização em vários tipos de tumores humanos através de mecanismos como a amplificação do gene *EGFR*, superexpressão de proteínas, mutações ou deleções *in-frame* (Roskoski, 2014),

O CCR é considerado uma doença do envelhecimento, pois cerca de 90% dos casos globais e mortes ocorrem em pacientes com mais de 50 anos (IARC, 2020). No presente estudo, os pacientes apresentaram mediana da idade de 64 anos, com intervalo interquartil de 57,5 - 69,5 anos, na qual, 88% dos pacientes estavam acima dos 50 anos. Dados da literatura também corroboram com os resultados encontrados no estudo (Wang; Pan, 2022; Alkader et al., 2023; Potocki, et al., 2023).

Além disso, uma correlação positiva entre a idade e a mutação no códon 12 *KRAS* foi observada, sugerindo que esta pode ser uma característica de pacientes com idade mais avançada. Tal fato pode estar associado, pois a patogênese do CCR decorre de um processo cumulativo e progressivo de alterações genéticas e epigenéticas, atribuíveis a fatores de risco potencialmente modificáveis, como fatores ambientais, dietéticos e do próprio envelhecimento (Nassar; Blanpain, 2016; Keum; Giovannucci, 2019).

No presente estudo, além da idade mais avançada, os pacientes mutados para o gene *KRAS* apresentaram, em sua maioria, tamanho tumoral pT3 e estágio II-III. Abbasabadi et al. (2023), demonstraram que os pacientes com CCR mutados para *KRAS* também apresentaram maior tamanho tumoral, acometendo principalmente a

região do cólon proximal. Somado a isso, os tumores se encontravam em estágios III e IV, estando relacionados a um pior prognóstico.

Segundo Brinzan et al. (2023), as mutações no códon 13 de *KRAS* são caracterizadas por agressividade do tumor e aumento do potencial metastático, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo, no qual foi observado uma correlação positiva entre a mutação no gene *KRAS 13*, o acometimento de linfonodos regionais e o estadiamento tumoral.

Tal correlação deve-se ao fato de que mutações somáticas no gene *KRAS* resultam na ativação das vias de sinalização a jusante, como a via RAF/MEK/ERK pró-proliferativa, corroborando com o crescimento celular desordenado (Wan et al., 2019). Além disso, a literatura demonstra uma associação entre a mutação *KRAS*, pior desfecho de sobrevida e maior risco de recorrência do CCR nos pacientes (Andreyev et al., 2001; Goffredo et al., 2019; Ozer et al., 2021).

O processo de carcinogênese do CCR também envolve genes de reparo de incompatibilidade de DNA, que codificam 4 proteínas: MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. Desse modo, mutações ou perda de função desses genes, resultam na perda de expressão das proteínas e, conseqüentemente, à deficiência do processo de reparo do DNA, causando instabilidade de microssatélites (MSI) (Raskov et al., 2020). O presente estudo apontou uma correlação positiva entre a mutação no códon 13 de *KRAS* e a expressão da proteína MSH6, indicando que os pacientes CCR mutados para o *KRAS 13* mantiveram o sistema de reparo do DNA estável. Tal resultado está de acordo com dados da literatura, onde a frequência de mutação no gene *KRAS* é maior em pacientes com microssatélites estáveis (MSE) (Lin; Zhang; Luo, 2020; Fan et al., 2021).

Além disso, o presente estudo também encontrou uma correlação negativa entre a expressão de MLH1-PSM2 e o tamanho tumoral; e uma correlação negativa entre MSH6 e a idade. O perfil genômico entre os grupos MSE e MSI são distintos. Os tumores MSE se localizam na região do cólon distal e reto, afetam mais o sexo masculino e apresentam mutações que envolvem a via CIN (Polom et al., 2028; Vila et al., 2023). Já os tumores MSI são predominantemente encontrados no cólon proximal, apresentam pouca diferenciação histológica e aumento de linfócitos infiltrantes de tumor (Ryan et al., 2017). Além disso, são diagnosticados em uma idade mais jovem e em um estágio anterior em comparação com os CCR MSE (Raut; Pawlik; Rodriguez-Bigas, 2004; Lochhead et al., 2013).

Com relação ao eixo CXCL12/CXCR4, o presente estudo não encontrou nenhuma correlação estatisticamente significativa entre a expressão do receptor CXCR4, os parâmetros clinicopatológicos e as mutações em *KRAS*, *EGFR* e MSI. Porém, a expressão do receptor CXCR4 no tecido tumoral foi encontrada, em sua maioria, em pacientes positivos para o acometimento de linfonodos, com tamanho tumoral T3, estadiamento III, positivos para as proteínas de reparo de DNA e negativos para mutação nos códons 12 e 13 de *KRAS*. Evidências demonstram que a expressão de CXCR4 em pacientes com CCR está correlacionada com um estágio avançado do tumor, um risco aumentado de recorrência e metástases à distância e uma baixa sobrevida global (Yoshuantari et al., 2018; Ottaiano et al., 2020; Braoudaki et al., 2022; Zou et al., 2022).

Como limitações, o tamanho relativamente pequeno da amostra pode não fornecer dados estatisticamente significativos para explorar o *status* mutacional dos pacientes com CCR e a expressão do receptor CXCR4. Somado a isso, tratou-se de um estudo retrospectivo e unicêntrico, no qual foram avaliados dados dos prontuários dos pacientes que estavam incompletos e não incluíam informações como tratamento, sobrevida, recaída e óbito devido o próprio tumor. Apesar das limitações, o estudo conseguiu comprovar que as frequências das mutações nos genes *KRAS* e *EGFR* estão de acordo com os dados encontrados na literatura.

CONCLUSÃO

Os dados encontrados no presente estudo forneceram uma melhor compreensão entre as características clinicopatológicas e o *status* mutacional do CCR. Os pacientes portadores das mutações nos códons 12 e 13 de *KRAS* apresentam condições tumorais mais avançadas, como acometimento de linfonodos, tamanho tumoral e estadiamento. Tais alterações genéticas estão intimamente relacionadas ao prognóstico, resultando em pior desfecho de sobrevida e maior risco de recorrência do CCR nos pacientes.

A identificação de biomarcadores relacionados com o processo de carcinogênese da doença faz-se necessário, uma vez que são de grande valia na avaliação do prognóstico e no delineamento terapêutico dos pacientes. Portanto, um desafio para o futuro é o desenvolvimento e utilização de biomarcadores associados

ao CCR no contexto clínico, com protocolos padronizados, de implementação simples e acessível, como foi demonstrado no presente estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASABADI, Z. M. et al. KRAS, NRAS, BRAF, and PIK3CA mutation rates, clinicopathological association, and their prognostic value in Iranian colorectal cancer patients. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 37, n. 5, p. e24868, 2023.

AFRĂȘĂNIE, V. A. et al. KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and microsatellite instability in metastatic colorectal cancer – practical implications for the clinician. **Radiol Oncol**, v. 53, n. 3, p. 265-274, 2019.

ALIZADEH-SEDIGH, Maryam et al. The potential of PIK3CA, KRAS, BRAF, and APC hotspot mutations as a non-invasive detection method for colorectal cancer. **Molecular and Cellular Probes**, v. 63, p. 101807, 2022.

ALKADER, M. S. et al. Impact of KRAS Mutation on Survival Outcome of Patients With Metastatic Colorectal Cancer in Jordan. **Cureus**, v. 15, n. 1, 2023.

ANDREYEV, H. J. N. et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. **British journal of cancer**, v. 85, n. 5, p. 692-696, 2001.

BRAOUDAKI, M, A. M. S., MUSTAFOV, D., SERIAH, S. et al. Chemokines and chemokine receptors in colorectal cancer; multifarious roles and clinical impact. *Semin Cancer Biol.* 2022;86(Pt 2):436-49. doi: 10.1016/j.semcancer.2022.06.002.

BRINZAN, C. S. et al. KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, and AKT1 signatures in colorectal cancer patients in south-eastern Romania. **Medicine**, v. 101, n. 40, 2022.

FAN, J. Z. et al. Relationship between mismatch repair protein, RAS, BRAF, PIK3CA gene expression and clinicopathological characteristics in elderly colorectal cancer patients. **World journal of clinical cases**, v. 9, n. 11, p. 2458, 2021.

FERLAY, J. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International journal of cancer**, v. 149, n. 4, p. 778-789, 2021.

GOFFREDO, P. et al. The prognostic impact of KRAS mutation in patients having curative resection of synchronous colorectal liver metastases. **Journal of gastrointestinal surgery**, v. 23, p. 1957-1963, 2019.

HUANG, D. et al. Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 37, n. 1, p. 173-187, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2022.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Globocan 2020: Cancer Fact Sheets — Colorectal Cancer. IARC, 2020.

KEUM, N.; GIOVANNUCCI, E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 16, n. 12, p. 713-732, 2019.

KHARE, T.; BISSONNETTE, M.; KHARE, S. CXCL12-CXCR4/CXCR7 Axis in Colorectal Cancer: Therapeutic Target in Preclinical and Clinical Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 14, p. 7371, 2021.

LAVACCHI, D. et al. Mutations matter: An observational study of the prognostic and predictive value of KRAS mutations in metastatic colorectal cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 1055019, 2022.

LIN, A.; ZHANG, J.; LUO, P. Crosstalk between the MSI status and tumor microenvironment in colorectal cancer. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 2039, 2020.

LOCHHEAD, P. et al. Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 15, p. 1151-1156, 2013.

MANCINI, M.; YARDEN, Y. Mutational and network level mechanisms underlying resistance to anti-cancer kinase inhibitors. **Semin Cell Dev Biol**, v. 50, p. 164-176, 2016.

MARTIANOV, A. S. et al. KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and MSI status in a large consecutive series of colorectal carcinomas. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4868, 2023.

MINH CUONG, H. et al. KRAS mutations and their associations with clinicopathological features and survival in Vietnamese non-polyp colon cancer patients. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 19, n. 2, p. 1-9, 2023.

NASSAR, D.; BLANPAIN, C. Cancer stem cells: basic concepts and therapeutic implications. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, p. 47-76, 2016.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK (NCCN). Colon Cancer. NCCN Guidelines, p. 1–832, 2018.

NOLLAU, P. et al. Detection of K-ras mutations in stools of patients with colorectal cancer by mutant-enriched PCR. **International journal of cancer**, v. 66, n. 3, p. 332-336, 1996.

OTTAIANO, A. et al. Prognostic and predictive role of CXC chemokine receptor 4 in metastatic colorectal cancer patients. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 28, n. 10, p. 755-760, 2020.

OZER, M. et al. Age-dependent prognostic value of KRAS mutation in metastatic colorectal cancer. **Future Oncology**, v. 17, n. 35, p. 4883-4893, 2021.

OZGA, A. J.; CHOW, M. T.; LUSTER, A. D. Chemokines and the immune response to cancer. **Immunity**, v. 54, n. 5, p. 859-874, 2021.

PAM, Q.; PAO, W.; LADANYI, M. Rapid Polymerase Chain Reaction-Based Detection of Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations in Lung Adenocarcinomas. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 3, p. 396-403, 2005.

PICARD, E. et al. Relationships between immune landscapes, genetic subtypes and responses to immunotherapy in colorectal cancer. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 369, 2020.

POLOM, K. et al. Meta-analysis of microsatellite instability in relation to clinicopathological characteristics and overall survival in gastric cancer. **Journal of British Surgery**, v. 105, n. 3, p. 159-167, 2018.

POTOCKI, P. M. et al. Clinical Characterization of Targetable Mutations (BRAF V600E and KRAS G12C) in Advanced Colorectal Cancer—A Nation-Wide Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 10, p. 9073, 2023.

RASKOV, H. et al. Driver gene mutations and epigenetics in colorectal cancer. **Annals of Surgery**, v. 271, n. 1, p. 75-85, 2020.

RAUT, C. P.; PAWLIK, T. M.; RODRIGUEZ-BIGAS, M. A. Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 568, n. 2, p. 275-282, 2004.

ROSKOSKI, R. Jr. The ErbB/HER family of proteintyrosine kinases and cancer. **Pharmacol Res**, v. 79, p. 34-74, 2014.

RYAN, E. et al. The current value of determining the mismatch repair status of colorectal cancer: a rationale for routine testing. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 116, p. 38-57, 2017.

SANTOS, M. L. et al. Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development. **Braz J Pharm Sci**, v. 54, p. 1-15, 2018.

SIGISMUND, S.; AVANZATO, D.; LANZETTI, L. Emerging functions of the EGFR in cancer. **Mol Oncol**, v. 12, n. 1, p. 3-20, 2018.

SULLIVAN, B. A.; NOUJAIM, M.; ROPER, J. Cause, epidemiology, and histology of polyps and pathways to colorectal cancer. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics**, v. 32, n. 2, p. 177-194, 2022.

TRAN, C. G. et al. The impact of KRAS mutation, microsatellite instability, and tumor laterality on the prognosis of nonmetastatic colon cancer. **Surgery**, v. 171, n. 3, p. 657-665, 2022.

VILA, A. P. S. et al. Epidemiological and molecular evaluation of BRAF, KRAS, NRAS genes and MSI in the development of colorectal cancer. **Gene**, v. 870, p. 147395, 2023.

WAN, X. B. et al. Relationships among KRAS mutation status, expression of RAS pathway signaling molecules, and clinicopathological features and prognosis of patients with colorectal cancer. **World journal of gastroenterology**, v. 25, n. 7, p. 808, 2019.

WANG, C.; PAN, D. Mutation patterns and prognostic analysis of BRAF/KRAS/PIK3CA in colorectal cancer. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 36, n. 6, p. e24444, 2022.

YOSHUANTARI, Naomi et al. Clinicopathologic significance of CXCL12 and CXCR4 expressions in patients with colorectal cancer. **Gastroenterology research and practice**, v. 2018, 2018.

ZHU, G. et al. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer. **Molecular cancer**, v. 20, n. 1, p. 1-17, 2021.

ZOU, Qian et al. Chemokines in progression, chemoresistance, diagnosis, and prognosis of colorectal cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 724139, 2022.

5 CONCLUSÃO

- A frequência de pacientes com mutações no códon 12 e 13 de *KRAS* foram de 40,9% e 31,8%, respectivamente;
- Para a mutação no códon 21 de *EGFR*, a frequência foi de 1,5% e nenhum paciente apresentou mutação no códon 19 do *EGFR*;
- No presente estudo, foi identificada uma correlação positiva entre a mutação no códon 13 de *KRAS* e estadiamento TNM, além de uma correlação positiva entre o *KRAS* 13 e MSH6;
- Em relação às mutações no códon 12 de *KRAS*, o coeficiente de Kendall apontou uma correlação positiva entre esse gene e a idade;
- Houve uma correlação negativa entre o tamanho tumoral e a expressão de MLH1 e PSM2 e uma correlação negativa entre idade e MSH6.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O CCR decorre da proliferação descontrolada das células devido a vários fatores, sejam eles ambientais ou genéticos, que podem culminar com invasão tecidual próxima ao tumor primário ou até mesmo o desenvolvimento de metástases. Sabe-se que o grau de heterogeneidade molecular e celular no câncer e o grande número de eventos moleculares envolvidos no controle do crescimento celular, diferenciação, proliferação e metástases dependem da interação tumor-hospedeiro.

Embora as pesquisas dos aspectos genéticos e imunológicos de moléculas envolvidas no desenvolvimento do CCR tenham avançado, continuam a existir lacunas significativas que precisam ser respondidas a fim de compreender a etiologia da doença, melhorar as respostas ao tratamento e prolongar a sobrevida dos pacientes, preservando sua qualidade de vida.

Os dados encontrados no presente estudo forneceram uma melhor compreensão entre as características clinicopatológicas e o *status* mutacional do CCR. Os pacientes portadores das mutações nos códons 12 e 13 de *KRAS* apresentam condições tumorais mais avançadas, como acometimento de linfonodos, tamanho tumoral e estadiamento. Tais alterações genéticas estão intimamente relacionadas ao prognóstico, resultando em pior desfecho de sobrevida e maior risco de recorrência do CCR nos pacientes.

Portanto, a identificação de biomarcadores relacionados com o processo de carcinogênese da doença faz-se necessário, uma vez que são de grande valia nas avaliações prognósticas e na medicina de precisão no tratamento do CCR. Nesse sentido, um desafio para o futuro é o desenvolvimento e utilização de biomarcadores associados ao CCR no contexto clínico, com protocolos padronizados, de implementação simples e acessível, como foi demonstrado no presente estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFRĂȘĂNIE, V. A.; MARINCA, M. V.; STRATULAT, T. A. et al. KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and microsatellite instability in metastatic colorectal cancer – practical implications for the clinician. **Radiol Oncol**, v. 53, n. 3, p. 265-274, 2019.

BATTAGLIN, F. et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: overview of its clinical significance and novel perspectives. **Clinical advances in hematology & oncology: H&O**, v. 16, n. 11, p. 735, 2018.

BENSON, A. B. et al. Colon cancer, version 2.2021, NCCN clinical practice guidelines in oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 19, n. 3, p. 329-359, 2021.

BRINZAN, C. S. et al. KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, and AKT1 signatures in colorectal cancer patients in south-eastern Romania. **Medicine**, v. 101, n. 40, 2022.

DEKKER, E. et al. Colorectal cancer. **Lancet**, v. 394, n. 10207, p. 1467-1480, 2019.

FAN, A. et al. Immunotherapy in colorectal cancer: current achievements and future perspective. **International journal of biological sciences**, v. 17, n. 14, p. 3837, 2021.

FRANK, M. H. et al. Clinical implications of colorectal cancer stem cells in the age of single-cell omics and targeted therapies. **Gastroenterology**, v. 160, n. 6, p. 1947-1960, 2021.

HAIGIS, K. M. KRAS alleles: the devil is in the detail. **Trends in cancer**, v. 3, n. 10, p. 686-697, 2017.

HARDIMAN, K. M. Update on sporadic colorectal cancer genetics. **Clinics in colon and rectal surgery**, v. 31, n. 03, p. 147-152, 2018.

HUANG, D. et al. Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 37, n. 1, p. 173-187, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2022.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Globocan 2020: Cancer Fact Sheets — Colorectal Cancer. IARC, 2020.

JASPERSON, K. W. et al. Hereditary and familial colon cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2044-2058, 2010.

JORISSEN, R. N. et al. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. **The EGF receptor family**, p. 33-55, 2003.

JURIŠIĆ, V. et al. Epidermal growth factor receptor gene in non-small-cell lung cancer: the importance of promoter polymorphism investigation. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2018, 2018.

KAMPMAN, E. et al. Animal products and K-ras codon 12 and 13 mutations in colon carcinomas. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 2, p. 307-309, 2000.

KEUM, N.; GIOVANNUCCI, E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 16, n. 12, p. 713-732, 2019.

KIM, J. E. et al. Defective mismatch repair status was not associated with DFS and OS in stage II colon cancer treated with adjuvant chemotherapy. **Annals of surgical oncology**, v. 22, p. 630-637, 2015.

LIEVRE, A.; BLONS, H.; LAURENT-PUIG, P. Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 21, p. 3033-3043, 2010.

MALKI, A.; ELRUZ, R. A.; GUPTA, I. et al. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *Int J Mol Sci*, v. 22, n. 1, p.130, 2020.

MÁRMOL, I. et al. Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 1, p. 197, 2017.

MARTIANOV, A. S. et al. KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and MSI status in a large consecutive series of colorectal carcinomas. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4868, 2023.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK (NCCN). Colon Cancer. NCCN Guidelines, p. 1–832, 2018.

NOLLAU, P. et al. Detection of K-ras mutations in stools of patients with colorectal cancer by mutant-enriched PCR. **International journal of cancer**, v. 66, n. 3, p. 332-336, 1996.

NORMANNO, N. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. **Gene**, v. 366, n. 1, p. 2-16, 2006.

OTTAIANO, A. et al. Prognostic and predictive role of CXC chemokine receptor 4 in metastatic colorectal cancer patients. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 28, n. 10, p. 755-760, 2020.

PAM, Q.; PAO, W.; LADANYI, M. Rapid Polymerase Chain Reaction-Based Detection of Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations in Lung Adenocarcinomas. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 3, p. 396-403, 2005.

PICARD, E. et al. Relationships between immune landscapes, genetic subtypes and responses to immunotherapy in colorectal cancer. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 369, 2020.

POTOCKI, P. M. et al. Clinical Characterization of Targetable Mutations (BRAF V600E and KRAS G12C) in Advanced Colorectal Cancer—A Nation-Wide Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 10, p. 9073, 2023.

RASKOV, H. et al. Driver gene mutations and epigenetics in colorectal cancer. **Annals of surgery**, v. 271, n. 1, p. 75-85, 2020.

SAMEER, A. S. et al. Molecular gate keepers succumb to gene aberrations in colorectal cancer in Kashmiri population, revealing a high incidence area. **Saudi Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association**, v. 15, n. 4, p. 244, 2009.

SEGATTO, O.; ANASTASI, S.; ALEMÀ, S. Regulation of epidermal growth factor receptor signalling by inducible feedback inhibitors. **Journal of cell science**, v. 124, n. 11, p. 1785-1793, 2011.

SHI, Y.; RIESE, D. J.; SHEN, J. The role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis in cancer. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 574667, 2020.

SHIN, A. E.; GIANCOTTI, F. G.; RUSTGI, A. K. Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics. **Trends in Pharmacological Sciences**, 2023.

SIGISMUND, S.; AVANZATO, D.; LANZETTI, L. Emerging functions of the EGFR in cancer. **Mol Oncol**, v. 12, n. 1, p. 3-20, 2018.

SULLIVAN, B. A.; NOUJAIM, M.; ROPER, J. Cause, epidemiology, and histology of polyps and pathways to colorectal cancer. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics**, v. 32, n. 2, p. 177-194, 2022.

YOSHUANTARI, N. et al. Clinicopathologic significance of CXCL12 and CXCR4 expressions in patients with colorectal cancer. **Gastroenterology research and practice**, 2018.

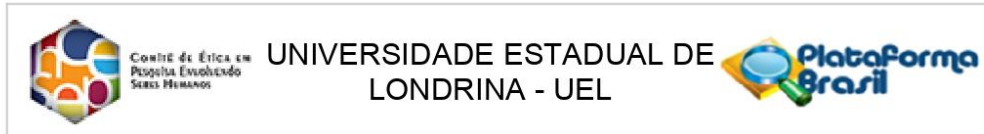
ZHANG, X. et al. Neoadjuvant immunotherapy for MSI-H/dMMR locally advanced colorectal cancer: New strategies and unveiled opportunities. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 795972, 2022.

ZHU, G. et al. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer. **Molecular cancer**, v. 20, n. 1, p. 1-17, 2021.

ZIELIŃSKA, K. A.; KATANAEV, V. L. The signaling duo CXCL12 and CXCR4: Chemokine fuel for breast cancer tumorigenesis. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 3071, 2020.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Implicações Prognósticas e Terapêuticas de Marcadores Genéticos e Imunológicos no Câncer

Pesquisador: Maria Angelica Ehara Watanabe

Área Temática: Genética Humana;
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 7

CAAE: 73557317.0.0000.5231

Instituição Proponente: Programa de PG em Patologia Experimental

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.125.375

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo vinculado ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental/UEL. Segundo a pesquisadora o câncer ocorre decorrente da proliferação descontrolada das células devido a vários fatores, sejam eles ambientais ou genéticos, que podem culminar com invasão tecidual próxima ao tumor primário ou até mesmo o desenvolvimento de metástases. Trata-se de uma doença complexa, heterogênea, e sua evolução é dependente da interação tumor-hospedeiro. O conhecimento sobre os diferentes tipos de tumores tem sido muito explorado mas o grande desafio da oncologia tem sido o entendimento dos mecanismos moleculares que envolvem estes tumores malignos. Dentro deste contexto, os aspectos imunológicos, moleculares e epigenéticos, das citocinas e dos receptores de quimiocinas e receptores de citocinas, dos genes JAK2, ROR e p53, e também das enzimas de metabolização foram os temas escolhidos para serem abordados neste projeto, uma vez que todos estes parâmetros podem ter relevância clínica e também constituir alvos promissores que no futuro podem ser valiosos na avaliação do prognóstico e no delineamento terapêutico. A pesquisa será realizada no Laboratório de Polimorfismos DNA e Imunologia, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas da UEL. Serão selecionadas um total de 1150 amostras provenientes do Hospital de Câncer de Londrina: -

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

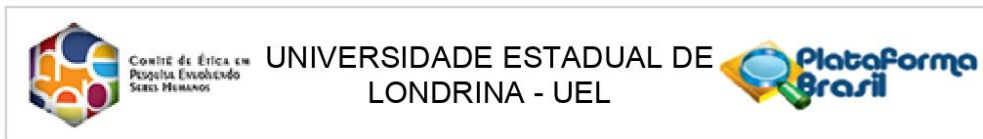
UF: PR

Telefone: (43)3371-5455

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 3.125.375

300 Amostras de tecido normal e tumoral de pacientes diagnosticadas com câncer de mama, câncer de laringe, câncer colorretal, meduloblastoma, neuroblastoma e tumor adrenocortical. A realização do ensaio de imuno-histoquímica. Essas análises serão realizadas no Laboratório de Polimorfismos DNA e Imunologia da UEL. - 200 Amostras de tecido tumoral e saudável a fresco, de pacientes diagnosticados com cancer de mama, laringe e colorretal, provenientes de cirurgia para excisão do tumor do mesmo hospital para extração de DNA, RNA e sobrenadante. - 300 Amostras de sangue de pacientes diagnosticadas com câncer de mama, câncer de laringe e câncer colorretal e tumores pediátricos, que serão coletadas para obtenção de DNA, RNA e plasma para estudos de polimorfismos genéticos, expressão gênica e proteica. - 50 Amostras de medula de pacientes pediátricos diagnosticados com leucemias agudas (linfóide e mieloide) para extração de RNA e plasma. - 300 Amostras de sangue periférico e/ou saliva de controles saudáveis, sem histórico de neoplasia, para extração de DNA, RNA e plasma. Serão realizados análise de PCR-RFLP para estudo das variantes alélicas polimórficas, análise de imunohistoquímica, análise da expressão gênica por PCR quantitativo, análise da Expressão Proteica por ELISA. Os participantes da pesquisa serão convidados a participar do estudo durante o atendimento clínico no Serviço de Oncologia do Hospital do Câncer de Londrina. No grupo caso serão incluídas todos os pacientes que tiverem diagnóstico para câncer de mama, câncer laringe e câncer colorretal e tumores pediátricos. E no grupo controle serão incluídos indivíduos saudáveis sem histórico de neoplasias, doenças autoimunes e infecções. Serão excluídos pacientes com doenças infecciosas ou autoimunes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar a presença dos polimorfismos genéticos, expressão gênica e expressão proteica do fator de transcrição FOXP3, das citocinas TGFB1, IL10, IL12A, IL35 IL1B, TNFa e INFg, das quimiocinas CXCL12 e CCL5, das proteínas SMAD, IGF1, CTLA4, dos receptores de quimiocinas CXCR4, CXCR7 e CCR5 e receptores de citocinas TRII, TRIII, GIPR, IL1RN e IL7R, dos genes JAK2, ROR e p53, e também das enzimas de metabolização NQOI, GSTT1 e GSTM1, no tecido tumoral e normal, e no sangue periférico dos pacientes com câncer de mama, laringe e colorretal e nos tumores pediátricos.

Objetivos Secundários:

- Detectar a presença dos polimorfismos genéticos do FOXP3, TGF, IL10, IL12A, IL35 IL1B, TNFa e

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

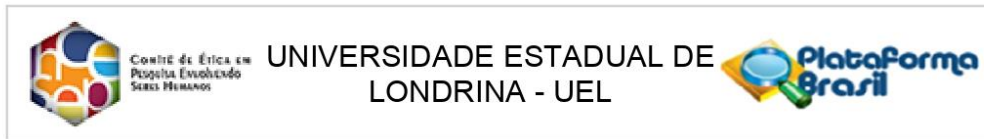
UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 3.125.375

INF gama, das quimiocinas CXCL12 e CCL5 dos receptores de quimiocinas CXCR4, CXCR7 e CCR5 e receptores de citocinas TRII, TRIII, GIPR, IL1RN e IL7R, dos genes JAK2, ROR e p53, e também das enzimas de metabolização NQOI, GSTT1 e GSTM1 nos DNAs extraídos do câncer de mama, câncer de cólon, tumores de laringe e câncer colorretal e para os tumores pediátricos (tumor de Wilms, meduloblastoma, neuroblastoma, leucemias agudas, linfomas e tumor adrenocortical).

- Avaliar a expressão gênica dos genes acima citados por PCR quantitativo.
- Realizar imunohistoquímica para FOXP3, TGFb1, IL10, IL12A, IL35 IL1B, CXCL12 CCL5, SMAD, CXCR4, CCR5, p53 nos tecidos tumoral e saudável fixados em formalina tamponada e embebido em parafina, para avaliar a expressão proteica.
- Avaliar a expressão proteica por ELISA dos genes CXCL12, TGF-, FOXP3, CCL5 e INF gama.
- Avaliar a influência dos polimorfismos genéticos na expressão gênica e proteica desses genes.
- Comparar a frequência alélica dos polimorfismos dos genes supracitados e compará-los com os dados clinicopatológicos dos pacientes com os diferentes tipos de câncer.

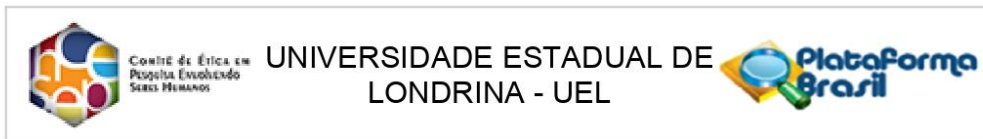
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora o risco que os participantes da pesquisa podem ter neste projeto é quanto ao desconforto na hora da coleta de sangue periférico, porém a coleta será efetuada por profissional habilitado seguindo-se todas as normas de biossegurança, e caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pelos coletores responsáveis. O estudo não trará benefícios diretos aos participantes, mas pretende-se obter marcadores que possam fornecer subsídios adicionais de auxílio prognóstico e delineamento terapêutico de pacientes com câncer de mama, cancer laringe e cancer colorretal e tumores pediátricos. Espera-se também obter uma integração maior entre as instituições colaboradoras, Universidade Estadual de Londrina e Hospital do Câncer de Londrina. O envolvimento de pesquisadores colaboradores permitirá a formação de profissionais qualificados para atuarem nas áreas de Imunologia e Genética do câncer, disseminando o conhecimento. Pretende-se contribuir com um maior conhecimento dos mecanismos envolvidos com a patogênese das doenças acima referidas e futuramente com a melhoria na qualidade de vida dos pacientes, através da inclusão de marcadores que, de alguma forma, possam ser aplicados futuramente na prática clínica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante.

Endereço: LABESC - Sala 14	CEP: 86.057-970
Bairro: Campus Universitário	
UF: PR Município: LONDRINA	
Telefone: (43)3371-5455	E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 3.125.375

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora apresentou folha de rosto devidamente assinada pelo Coordenador do Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental, cronograma adequado e orçamento detalhado. Apresentou 04 modelos de TCLE adequados em forma de convite (adultos e crianças caso e adulto e crianças controle saudáveis). Apresentou ainda termo de autorização do hospital e declaração de 02 bioquímicas responsáveis pelas coletas das amostras.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata se de emenda de projeto já aprovado. Justificativa da Emenda: Inclusão de metodologia. Será realizado análise de mutações dos genes KRAS e EGFR nas amostras dos pacientes e participantes saudáveis do projeto intitulado "Implicações Prognósticas e Terapêuticas de Marcadores Genéticos e Imunológicos Câncer". Para as amostras de DNA já extraídas será também realizada a análise da mutação somática no gene KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog) no exon 12 e 13 e análise da mutação somática no gene EGFR (epidermal growth factor receptor) no exon 19.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezada pesquisador a emenda apresentada está aprovada.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_128820_0_E5.pdf	23/01/2019 15:25:47		Aceito
Outros	Adendo_KRAS_EGFR.pdf	23/01/2019 15:22:12	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2_TCLE_controles_saudaveis_crianças.pdf	25/04/2018 10:45:28	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	3_TCLE_crianças.pdf	25/04/2018 10:44:43	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	4_TCLE_pacientes_adultos.pdf	25/04/2018 10:43:35	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	1_TCLE_controles_saudaveis_adultos.pdf	25/04/2018 10:42:37	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Centro de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Seres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 3.125.375

Justificativa de Ausência	1_TCLE_controles_saudaveis_adultos.pdf	25/04/2018 10:42:37	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	adendo_anamnese.doc	09/04/2018 14:04:18	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	anamnese.doc	09/04/2018 14:00:50	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	adendo_APOBEC.pdf	08/03/2018 22:07:23	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	Emenda.docx	29/11/2017 16:03:16	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	24/07/2017 16:01:36	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Cronograma	9_cronograma.pdf	18/07/2017 15:57:53	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	8_Projeto_Cancer_2017.pdf	18/07/2017 15:30:16	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	6_Declaracao_HCL.pdf	18/07/2017 15:29:55	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Declaração de Pesquisadores	7_Termo_responsabilidade_coleta.pdf	18/07/2017 15:24:58	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Declaração de Pesquisadores	5_Termo_de_Confidencialidade_e_Sigilo.pdf	18/07/2017 15:22:23	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 29 de Janeiro de 2019

Assinado por:
Clisia M. Carreira
(Coordenador(a))

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br