

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE
LISBOA

***GUCY2C como biomarcador de metástase oculta
em nódulos linfáticos de pacientes com Cancro
Colorretal***

Amanda Vilefort de Melo

Orientador: Especialista Mário Maia Matos - Escola Superior de
Tecnologia da Saúde de Lisboa

Mestrado em Tecnologias Clínico- Laboratoriais

Lisboa 2024

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE
LISBOA

***GUCY2C como biomarcador de metástase oculta
em nódulos linfáticos de pacientes com Cancro
Colorretal***

Amanda Vilefort de Melo

Orientador: Especialista Mário Maia Matos - Escola Superior de
Tecnologia da Saúde de Lisboa

Júri

Presidente: Doutora Edna Soraia Ribeiro - Escola Superior de
Tecnologia da Saúde de Lisboa

Arguente: Doutora Fernanda Stumpf Tonin - Centro de Investigação
em Saúde e Tecnologia da Escola Superior de Tecnologia da Saúde
de Lisboa - H&TRC-ESTeSL

Mestrado em Tecnologias Clínico- Laboratoriais

Lisboa 2024

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me ter dado sabedoria para superar obstáculos e por ter iluminado o meu caminho durante todo mestrado.

Agradeço também a minha família e noivo por todo apoio que me deram durante esse tempo.

Agradeço também ao meu orientador Mário Maia Matos, por todo esforço e dedicação para me ajudar na orientação deste estudo.

Muito obrigada

Resumo

O cancro colorretal (CCR) é o terceiro tipo de cancro mais comum no mundo e a quarta principal causa de morte associada ao cancro. A guanilato ciclase 2C (*GUCY2C*) é uma proteína transmembranar seletivamente expressa nas células epiteliais intestinais, tendo sido descrita em diversos estudos como um marcador em CCR. O objetivo do trabalho é estudar a *GUCY2C* e as respetivas vias de sinalização em doentes com CCR metastático em bases de dados públicas. Foi realizada uma pesquisa na base de dados pública cBioportal, sendo selecionada informação curada e anónima de 209 doentes com CCR.

A informação sobre gânglios era escassa não sendo possível realizar análise, tendo-se efetuado apenas o estudo genético. Os resultados revelaram uma associação entre o estágio e mutações de *KRAS* ($p=0,011$) com mais mutações nos estádios mais elevados, ao contrário de *BRAF* onde não se encontrou associação ($p=0,626$). Verificou-se que mutações de perda de função da *GUCY2C* estão mais relacionadas aos estádios iniciais do cancro colorretal ($p=3,735 \times 10^{-13}$), o que aponta que a mutação de *GUCY2C* pode proteger da progressão do CRC. A mesma relação se verificou com as mutações de *AKT* ($p=0,026$) mas não com *PTEN*. Nenhuma associação foi encontrada entre as mutações de *GUCY2C* e as restantes mutações estudadas.

Concluiu-se que há uma relação entre as mutações de *GUCY2C* e os estádios I e II em CCR, o que pode apontar à importância de *GUCY2C* como um biomarcador de prognóstico, e levar ao estudo de uma terapêutica de bloqueio que possa melhorar a sobrevida dos doentes. É necessária mais investigação para verificar estas associações do ponto de vista experimental.

Descritores: Cancro colorretal, *GUCY2C*, mutação e metástases.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the third most common type of cancer in the world and the fourth leading cause of cancer-related death. Guanylate cyclase 2C (*GUCY2C*) is a transmembrane protein selectively expressed in intestinal epithelial cells and has been described in several studies as a marker in CRC. The aim of this work was to study *GUCY2C* and its signalling pathways in patients with metastatic CRC in public databases. A search was carried out on the public database cBioportal, selecting curated and anonymised information from 209 patients with CRC. Information on lymph nodes was scarce and could not be analysed; only the genetic study was carried out. The results revealed an association between stage and *KRAS* mutations ($p=0.011$) with more mutations in the higher stages, unlike *BRAF* where no association was found ($p=0.626$). *GUCY2C* loss-of-function mutations were found to be more related to the early stages of colorectal cancer ($p=3.735 \times 10^{-13}$), indicating that *GUCY2C* mutation may protect against CRC progression. The same relationship was found with *AKT* mutations ($p=0.026$) but not with *PTEN*. No association was found between *GUCY2C* mutations and the other mutations studied.

It was concluded that there is a relationship between *GUCY2C* mutations and stages I and II in CRC, which could point to the importance of *GUCY2C* as a prognostic biomarker, and lead to the study of a blocking therapy that could improve patient survival. More research is needed to verify these associations from an experimental point of view.

Keywords: Colorectal cancer, *GUCY2C*, mutation and metastases.

Índice

1. Introdução	15
2. Objetivos.....	16
2.1 Questão de investigação	16
2.2 Objetivo Geral.....	16
2.3 Objetivos específicos	16
3. Enquadramento teórico	16
3.1 O cancro.....	16
3.2 A epidemiologia do CCR em Portugal e no mundo.....	17
3.3 Apresentação e desenvolvimento do Cancro colorretal.....	17
3.4 Fatores de risco do CCR.....	19
3.5 Histologia e classificações	19
3.6 Diagnóstico, terapêutica e estadiamento.....	20
3.7 GUCY2C e as vias de sinalização no CCR.....	21
4. Metodologia	24
4.1 Tipo de Estudo.....	24
4.2. Seleção da base de dados	24
4.3 Critérios de inclusão e exclusão	24
4.4 Variáveis.....	25
4.5 Colheita dos dados.....	25
4.6 Tratamento estatístico.....	26
4.8. Considerações éticas e legais	27
5. Resultados	27
5.1 Estatística descritiva dos doentes com CCR.....	27
5.2 Estatística inferencial dos doentes com CCR	30
5.2.1 Estatística <i>GUCY2C</i>	30
5.2.2 Estatística <i>AKT</i>	31
5.2.3 Estatística <i>PTEN</i>	32
5.2.4 Estatística <i>PRKG2</i>	32
5.2.5 Estatística <i>KRAS</i>	33
5.2.6 Estatística <i>BRAF</i>	34
5.3 Estatística da relação mutacional da <i>GUCY2C</i> com cada gene.....	34
5.3.1 Relação com <i>AKT</i>	34
5.3.2 Relação com <i>PTEN</i>	35

5.3.3 Relação com <i>PRKG2</i>	36
5.3.4 Relação com <i>KRAS</i>	36
5.3.5 Relação com <i>BRAF</i>	37
6. Discussão.....	38
6.1 A relação entre a guanilato ciclase 2C e o estágio do CCR.....	38
6.2 A relação do estado mutacional da guanilato ciclase 2C com genes de outras vias.....	38
7. Conclusão	39
Referências Bibliográficas.....	40

Lista de tabelas

Tabela1- Resumo do estadiamento do CCR. O estadiamento é definido de acordo com a 7ª edição da classificação TNM da AJCC/UICC que aqui é resumida (Compton, C.C., Byrd, D.R., Garcia-Aguilar, J., Kurtzman, S.H., Olawaiye, A., Washington MK, ed. <i>AJCC Cancer Staging Atlas</i> . 7th ed. New York: Springer; 2012. doi:10.1007/978-1-4614-2080-4.). Esta é uma descrição simplificada do sistema de estadiamento e não exclui a consulta da classificação original. (19).....	20
Tabela 5.1 Características da amostra de estudo.....	28
Tabela 5.2 Quantidade de amostras em cada tipo de mutação	30

Lista de figuras

Figura 1.1 As características do cancro(11)	17
Figura 3.1 Pólipos adenomatosos (2)	18
Figura 3.2 Sequência para surgimento de adenocarcinomas (14).....	18
Figura 3.3 Variantes histopatológicas do cancro colorrectal.(A) Mucinoso adenocarcinoma caracterizado por abundante produção extracelular de mucina; (B) signet carcinoma de células anelares com deposição proeminente de mucina intracitoplasmática, causando deslocamento e moldagem de núcleos de células tumorais; (C) carcinoma medular caracterizado por folhas de células malignas com núcleos vesiculosos com núcleos proeminentes e abundantes citoplasma eosinofílico (notar infiltração linfocítica proeminente do tecido tumoral); (D) adenocarcinoma micropapilar com pequeno papilar e trabecular característico clusters de células tumorais dentro dos espaços do estroma, imitando os canais vasculares(18).....	19
Figura 3.5 Via de sinalização normal GUCY2C/cGMP relacionada a via PRKG2(8)....	22
Figura 5.5.1 Fluxograma da colheita de dados de amostras de pacientes.....	26
Figura 5.2 Histograma estágio em quatro fases de doentes com CCR.	29
Figura 5.3 Histograma da idade dos doentes com CCR.....	29
Figura 5.4 Relação da mutação da GUCY2C com o estágio em quatro fases.	31
Figura 5.5 Relação da mutação da AKT com o estágio em quatro fases.	31
Figura 5.6 Relação da mutação da PTEN com o estágio em quatro fases.	32
Figura 5.7 Relação da mutação da PRKG2 com o estágio em quatro fases.	33
Figura 5.8 Relação da mutação da KRAS com o estágio em quatro fases.	33
Figura 5.9 Relação da mutação da BRAF com o estágio em quatro fases.	34
Figura 5.10 Relação entre a mutação da GUCY2C e da AKT.....	35
Figura 5.11 Relação entre a mutação da GUCY2C e da PTEN.....	35
Figura 5.12 Relação entre a mutação da GUCY2C e da PRKG2.....	36
Figura 5.13 Relação entre a mutação da GUCY2C e da KRAS.....	37
Figura 5.14 Relação entre a mutação da GUCY2C e da BRAF.....	37

Lista de abreviaturas

CCR – Cancro colorretal

GUCY2C- Guanilato ciclase 2 C

PRKG2- Proteína quinase dependente de cGMP 2

AKT- Serina/treonina quinase

PTEN- homólogo de fosfatase e tensina

KRAS- Proto oncogene KRAS, GTPase

BRAF- Proto oncogene BRAF

SPSS- Nome do programa de estatística utilizado

1. Introdução

O cancro é um conjunto de doenças genéticas complexas caracterizado pelo crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos, e que são unidas por marcas comuns (1). Dentre os diversos tipos de cancro, o cancro colorretal (CCR) é aquele que se desenvolve no intestino grosso ou reto (2).

O CCR é o terceiro tipo de cancro mais comum no mundo e a segunda principal causa de morte associada ao cancro em ambos os sexos, e o terceiro tipo mais incidente em homens e mulheres (3). Em Portugal foi responsável por 10.575 novos casos e 4.809 mortes em 2024, sendo que 90% dos casos são detetados a partir dos 50 anos e 85% dos casos surgem sem qualquer relação de história familiar (3). Apesar dos grandes avanços que ocorreram nos últimos anos no tratamento do CCR, a mortalidade da doença permanece alta (4).

Devido à elevada mortalidade em CCR, a procura por novos marcadores moleculares como forma de encontrar um tratamento mais preciso se tornou extremamente relevante (4,5). A guanilato ciclase C (GUCY2C) é uma proteína transmembranar pertencente à família de recetores da ciclase de mucosa sendo seletivamente expressa nas células epiteliais intestinais, tendo sido descrita em diversos estudos como um marcador em CCR (3,4,6–10). Essa proteína transmembranar é sobre expressa em quase 95% dos tumores colorretais (3).

Sabe-se que a perda de Guanilina e Uroguanilina, os ligandos da GUCY2C, está associada ao silenciamento da via e à iniciação e progressão em CCR, incluindo em adenomas (3). A perda de GUCY2C em ratinhos (*Gucy2C^{-/-}*) está associada a um fenótipo tumorigénico, levando a iniciação tumoral, manutenção da integridade genómica e restringindo a proliferação (11). É importante ressaltar que essa proteína somente é sobre expressa no tumor primário e nas metástases de CCR, o que faz dela um potencial biomarcador preditivo e de prognóstico e que vem sendo estudado como o novo alvo para as terapias de precisão (9).

2. Objetivos

2.1 Questão de investigação

Partindo do *GUCY2C* como potencial biomarcador, indicador de prognóstico e potencial alvo terapêutico, levou a colocar a questão: De que forma a *GUCY2C* está envolvida no desenvolvimento e evolução de CCR?

2.2 Objetivo Geral

Estudar as mutações de *GUCY2C* e as vias de sinalização associadas em doentes com CCR.

2.3 Objetivos específicos

- Relacionar o estágio de CCR, a idade e os gânglios linfáticos com o estado mutacional de *GUCY2C* usando bases de dados populacionais.
- Relacionar o estado mutacional da *GUCY2C* com o estado mutacional de genes pertencentes a vias de sinalização, nomeadamente: *PRKG2*, *KRAS*, *BRAF*, *PTEN* e *AKT*, em bases de dados populacionais.

3. Enquadramento teórico

3.1 O cancro

O cancro é um conjunto de doenças genéticas complexas caracterizada pelo crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos, e que são unidas por marcas comuns (1). O cancro surge através de um processo caracterizado pelo ganho de mutações no material genético das células, através do qual as células cancerígenas adquirem um conjunto comum dessas 8 propriedades/características como se pode verificar na figura 1.1. Estas incluem: potencial ilimitado de proliferação, autossuficiência em sinais de crescimento e resistência a estímulos anti-proliferativos e apoptóticos e mais atualmente “*enabling characteristics*”, que nada mais é que o reflexo

dos mecanismos moleculares e celulares pelos quais as marcas são adquiridas, e não as próprias oito capacidades mencionadas anteriormente (11).

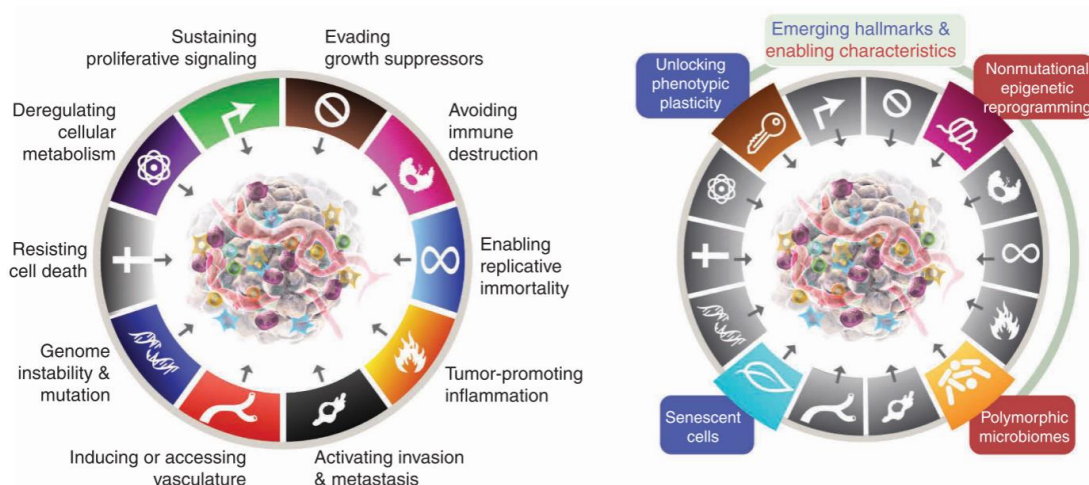


Figura 3.1 As características do cancro(11)

3.2 A epidemiologia do CCR em Portugal e no mundo

Dentre os diversos tipos de cancro, o CCR é aquele que se desenvolve no intestino grosso ou reto (2). O início da carcinogénese no CCR, é determinado pelo desenvolvimento de pólipos que inicialmente são benignos e vão-se transformando em pólipos neoplásicos na mucosa do cólon (5).

A principal causa de morte relacionada com este tipo de cancro é a presença de metástases à distância. Em 25% dos pacientes diagnosticados, os mesmos apresentam metástases à distância principalmente no fígado. Em situações de CCR localizado a probabilidade de sobrevivência a 5 anos é de 90%, em casos de serem identificadas metástases a taxa de sobrevivência a 5 anos desce para 12% (12).

3.3 Apresentação e desenvolvimento do Cancro colorretal

O início da carcinogénese no CCR, é determinado pelo desenvolvimento de pólipos que inicialmente são benignos e vão se transformando em pólipos neoplásicos na mucosa do cólon. O estudo histológico é de extrema importância para a determinação do potencial maligno dos pólipos (5). Existem dois tipos histológicos de pólipos, os hiperplásticos e os adenomatosos. Conforme diversos tipos de estudo comprovaram, a maioria dos CCR surgem de adenomas. O risco de desenvolver CCR é maior com o aumento do número de pólipos adenomatosos (Fig.3.1). Em casos de doentes com

polipose adenomatosa familiar, que desenvolvem centenas de pólipos adenomatosos no cólon, a condição progride para CCR se não realizarem colectomia (13).

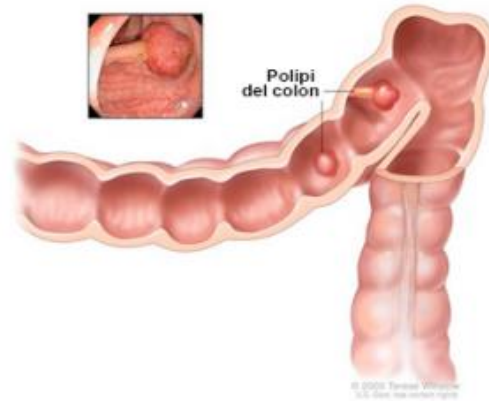


Figura 3.2 Pólipos adenomatosos (2)

O aparecimento de CCR resultante da instabilidade genética pode seguir diferentes vias moleculares, nomeadamente: instabilidade cromossômica; alta instabilidade de microssatélites (MSI); e fenótipo de metilação de ilhas dinucleótido citosina-guanina (CPG) (14). Quase 70% dos casos de CCR são adenocarcinomas, que surgem a partir da via tradicional com a mutação do gene *APC* (Fig. 3.2). A mutação no gene *APC* é a mutação mais comum presente no CCR familiar e esporádico.

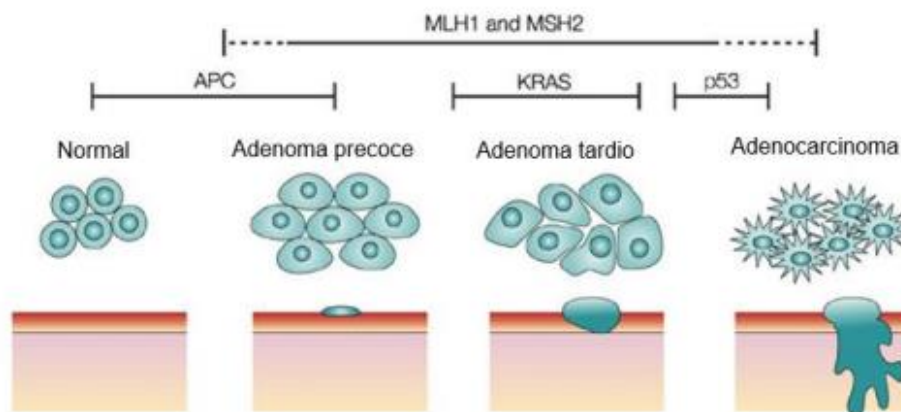


Figura 3.3 Sequência para surgimento de adenocarcinomas (14)

3.4 Fatores de risco do CCR

Até ao presente momento, o CCR não tem uma causa única e sim diversos fatores que aumentam as chances de seu aparecimento. Este tipo de cancro possui diversos fatores de risco que são divididos em: comportamentais, ambientais, genéticos e ou estilo de vida (15). Alguns dos fatores de risco são: idade, etnia, género e predisposição genética. A idade é considerada um fator relevante, uma vez que 70% dos pacientes têm mais de 65 anos e a incidência de CCR é menor em pessoas com menos de 40-45 anos (16). Outros fatores de risco considerados particularmente relevantes são o histórico pessoal ou familiar de CCR e a presença de antecedentes pessoais de pólipos adenomatosos (5).

3.5 Histologia e classificações

Dentre as diversas classificações existentes para o CCR, sendo elas clínicas, moleculares ou morfológicas as mais utilizadas são a de Dukes e o TNM (17). Sabe-se que o principal tipo de cancro colorretal, são os adenocarcinomas, que podem ser mucinoso ou carcinomas das células em anel de sinete, sendo os outros tipos o carcinoma medular e o adenocarcinoma micropapilar (Fig. 3.3)(18) .

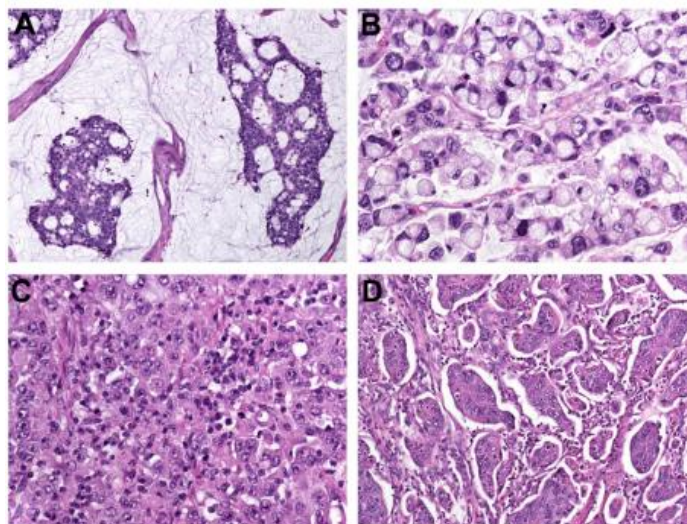


Figura 3.4 Variantes histopatológicas do cancro colorrectal.(A) Mucinoso adenocarcinoma caracterizado por abundante produção extracelular de mucina; (B) Carcinoma de células em anel de sinete com deposição proeminente de mucina intracitoplasmática, causando deslocamento e moldagem de núcleos de células tumorais; (C) Carcinoma medular caracterizado por folhas de

células malignas com núcleos vesiculosos com núcleos proeminentes e abundantes citoplasma eosinofílico (notar infiltração linfocítica proeminente do tecido tumoral); (D) Adenocarcinoma micropapilar com pequeno papilar e trabecular característico clusters de células tumorais dentro dos espaços do estroma, imitando os canais vasculares(18).

3.6 Diagnóstico, terapêutica e estadiamento

O cancro colorretal é em grande parte uma doença assintomática até atingir um estágio avançado. No entanto, os pacientes podem apresentar uma ampla gama de sinais e sintomas, como sangramento retal oculto ou evidente, alteração nos hábitos intestinais, anemia ou dor abdominal. O sangramento retal de início recente geralmente deve levar à colonoscopia em indivíduos com 45 anos ou mais. Em pacientes mais jovens, fatores adicionais são usados para identificar aqueles com maior risco de CCR (p. das fezes) (19).

O procedimento de estadiamento da doença utiliza exame clínico, exames laboratoriais (biópsias, enzimas hepáticas, etc.) e exames de imagem (raios X, tomografia computadorizada, ressonância magnética ou PET, etc.) com o objetivo de localizar com precisão a posição anatômica da lesão e detectar ou excluir doença metastática. O estadiamento no CCR descreve o quanto o cancro cresceu nas paredes do intestino, se atingiu estruturas próximas e se espalhou para os gânglios linfáticos ou órgãos distantes, indicando não apenas a localização anatômica, mas também os grupos prognósticos (tabela 1) (19).

Tabela1- Resumo do estadiamento do CCR. O estadiamento é definido de acordo com a 7ª edição da classificação TNM da AJCC/UICC que aqui é resumida. Esta é uma descrição simplificada do sistema de estadiamento e não exclui a consulta da classificação original. (19)

Stage	Main characteristic
0	Carcinoma in situ. No invasion of the submucosa, lymph nodes or other organs.
I	Tumour invades submucosa or muscularis propria. No invasion of pericolorectal tissue lymph nodes or other organs.
II	Tumour invades pericolorectal tissue or directly invades other organs or structures. No invasion of the lymph nodes or distant organs.
III	Independent of local invasion, lymph node metastasis is detected. No invasion of distant organs.
IV	Independent of local or lymph node invasion, distant organ metastasis is detected.

O estadiamento do CCR continua a afetar profundamente tanto as opções terapêuticas quanto às chances de sobrevivência. Desta forma, para casos localizados e em estágios

iniciais a cirurgia é a terapia de primeira linha, e a ressecção do tumor é frequentemente bem-sucedida. Assim, o prognóstico é altamente positivo, com uma sobrevivência de 5 anos de 90%, quando os tumores permanecem restritos à parede intestinal. Para diminuir as chances de recidivas em casos localizados, a ressecção cirúrgica é associada a quimio e radioterapia neoadjuvante (3).

Entretanto à medida que a doença progride para os gânglios regionais e para órgãos distantes a chance de a sobrevivência aos 5 anos é menos favorável - reduzida para 70% e 14%, respectivamente (20). A relevância das metástases ocultas no estadiamento e no prognóstico é sublinhada pela melhoria da sobrevivência, quando a quimioterapia adjuvante é utilizada em doentes com CCR em estágio III e num subconjunto de doença em estágio II, tal como estabelecido pelos ensaios MOSAIC e NSABP C-07(3).

Quando os pacientes apresentam doença metastática, a quimioterapia e a radioterapia são as principais estratégias para controlar o crescimento e a disseminação do CCR. No entanto, apesar dos avanços nos tratamentos médicos, o prognóstico para os doentes com CCR avançado continua a ser mau (20,21).

3.7 GUCY2C e as vias de sinalização no CCR.

Diversos estudos evidenciaram que a GUCY2C é sobre expressa em quase 95% dos tumores colorretais, e atualmente está sendo investigado como um novo alvo em terapia de precisão do CCR (3).

A GUCY2C é uma proteína transmembranar expressa na superfície das células epiteliais intestinais. Na fisiologia normal, desempenha um papel supressor de tumor, restringindo a transformação epitelial através de uma variedade de vias reguladas por seu segundo mensageiro, guanosina de monofosfato cíclico (cGMP) (22).

Sabe-se que a perda de Guanilina e Uroguanilina, os ligandos da GUCY2C, está associada ao silenciamento da via e à iniciação e progressão em CCR, incluindo em adenomas (3). A perda de *GUCY2C* em ratinhos (*Gucy2C^{-/-}*) está associada a um fenótipo tumorigénico, sendo que levando a iniciação tumoral, manutenção da integridade genómica e restringindo a proliferação (11). É importante ressaltar que essa proteína somente é sobre expressa no tumor primário e nas metástases de CCR, o que faz dela um potencial biomarcador preditivo e prognóstico e que vem sendo estudado como o novo alvo para as terapias de precisão (9).

Uma das principais vias envolvidas com a angiogénese tumoral é a via do VEGF-D que possui um papel crucial na escolha da quimioterapia que será utilizada, uma vez que pacientes com CCR metastático, que apresentem níveis baixos de VEGF-D são tratados com quimioterapia em conjunto com o bevacizumab, o que aumenta as chances de sobrevivência e resposta a quimioterapia (6).

Um estudo conduzido por Jimenez-Luna et al demonstrou que vários genes envolvidos na ação angiogénica foram identificados como sobre expressos na progressão e metastatização do CRC, sendo um deles a GUCY2C (6).

Um estudo conduzido por Rampuria et al, demonstrou o potencial da GUCY2C como alvo para a imunoterapia baseada em células T para este tipo de cancro (7).

Diversos estudos têm demonstrado como o eixo GUCY2C/cGMP é capaz de modificar ou de ser modificado por outras vias muito importantes no cancro colorretal nomeadamente, a APC/ β -CATENINA/TCF, no qual uma mutação nessa via leva a não produção de guanilina, um dos ligantes que a ativam a via da GUCY2C, silenciando assim essa via (8).

O oposto tem sido demonstrado com a via do AKT, na qual a estimulação agonista (Guanilina e a uroguanilina) do domínio de ligação do ligante extracelular GUCY2C ativa seu domínio catalítico intracelular, levando a produção de cGMP que tem como alvo várias proteínas efetoras nomeadamente PRKG2 e as proteínas quinases dependentes (Fig. 2.4) (22).

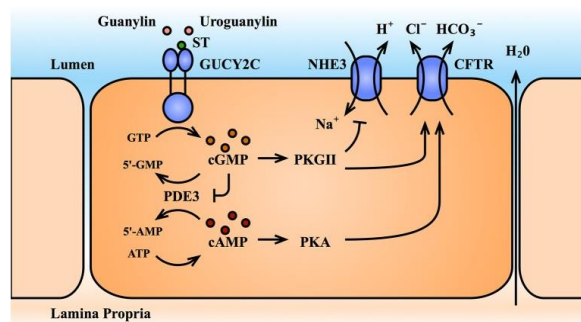


Figura 3.5 Via de sinalização normal GUCY2C/cGMP relacionada a via PRKG2(8).

Além disso, a GUCY2C regula a homeostase replicativa e metabólica no epitélio intestinal normal e tumores, modulando a atividade de AKT, em parte, de maneira dependente de PTEN (8).

A sinalização via PI3K e AKT convergem para mTORC1 que, entre outras funções, controla diversos mecanismos celulares importantes no cancro. Juntamente com as mutações *KRAS* e *BRAF*, as mutações *PIK3CA* também são amplamente estudadas

como biomarcadores potenciais para a capacidade de resposta à terapia anti-EGFR no CCR metastizado. Mutações ativadoras de *PIK3CA* são identificadas em 7-32% dos pacientes com CCR e não são mutuamente exclusivas de mutações *KRAS* ou *BRAF* (25,26,27,28). Embora alguns resultados promissores indiquem que pacientes com mutação *PIK3CA* não poderiam se beneficiar de terapias anti-EGFR, apresentando pior sobrevida global e sobrevida livre de doença, outros estudos são incapazes de sustentar esse benefício e manter isso como um assunto em aberto nesse contexto (25,26,27).

O regulador negativo de PI3K *PTEN* tem relatado baixa frequência de mutação no CCR (aproximadamente 0,7%), mas são relatados mecanismos de desregulação que diminuem a expressão, sendo a avaliação imunohistoquímica do *PTEN* o método mais utilizado para avaliação (28,29,30,31).

RAS é um membro da família de genes do vírus do sarcoma de rato (*ras*) de oncogenes (incluindo *KRAS*, *HRAS* e *NRAS*), que codifica uma pequena proteína de ligação RAS de 21 kD difosfato de guanossina (GDP)/trifosfato de guanossina (GTP) que atua inativando o transdutor de sinal intracelular. Após a ativação mediada por Grb2/SOS, o RAS ligado ao GTP recruta a proteína serina BRAF, iniciando a cascata de sinalização MAPK levando à ativação de fatores de transcrição que desempenham papéis importantes no crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (32,33,34).

O gene mais comumente mutado na via MAPK é o *KRAS*, com aproximadamente 35% a 45% dos pacientes com CCR metastizado apresentando mutações nos codões 12 e 13. Evidências de vários ensaios clínicos demonstraram que mutações *KRAS* predizem resistência a anticorpos monoclonais anti-EGFR no CCR metastizado, a determinação do estado mutacional *KRAS* de um paciente é obrigatória para a administração de anticorpos monoclonais anti-EGFR, sendo esse tratamento limitado ao cenário de tumor *KRAS* tipo selvagem (35,34).

Outra mutação comum na via de sinalização MAPK é no gene *BRAF*, responsável por 2-6% de todas as mutações no CCR. A mutação *BRAF* mais comum é V600E (90% de todas as mutações *BRAF* no CCR) no exão 15, e geralmente é mutuamente exclusiva de mutações *KRAS*, portanto, a ativação de qualquer uma das proteínas pode desencadear a sinalização MAPK (36,35). As mutações *BRAF* são fator prognóstico negativo no CCR metastizado, mas os dados sobre o valor preditivo da mutação *BRAF* para os anticorpos anti-EGFR permanecem controversos. Nenhum estudo mostrou um benefício estatisticamente significativo da adição de um anticorpo EGFR à quimioterapia em pacientes com CCR com mutação *BRAF* V600, e um estudo recente demonstrou

que a adição de panitumumab tem um efeito potencialmente deletério em pacientes com mutação *BRAF* (35,37,38).

4. Metodologia

4.1 Tipo de Estudo

De modo a alcançar os objetivos propostos, foi realizado um estudo retrospectivo do tipo descritivo de análise quantitativa a partir de bases de dados públicas de acesso livre sendo selecionada informação curada de doentes com CCR, visando relacionar o estado mutacional da *GUCY2C*, *AKT*, *PTEN*, *PRKG2*, *KRAS*, *BRAF* com características clínicas do mesmo tumor.

4.2. Seleção da base de dados

Foi realizada uma pesquisa de bases de dados que possuíam informações genómicas associadas a cancro. Foram encontradas várias de bases de dados, nomeadamente: TCGA, cBioPortal, GEO, CanPro Var 2.0, ICGC, TCPA, GDC e Fire Browse (24,25)

Para alcançar o objetivo foi selecionada a base de dados que tinha mais dados das variáveis em estudo e mais bem caracterizados, bem como a que incluía estudos referentes ao CCR. Após comparação das diferentes bases, selecionou-se a cBioPortal por ser a mais completa e aquela que tinha mais dados com menor sobreposição de estudos.

A cBioPortal (www.cbioportal.org) é um recurso de acesso aberto para a exploração interativa de conjuntos de dados genómicos multidimensionais de cancro, providenciando informação de mais de 300.000 pacientes recolhida em mais de 900 estudos diferentes. Esta plataforma permite a visualização, exploração, análise e transferência dos dados para vários todos os tipos de análise.

4.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram utilizados os critérios de inclusão/exclusão abaixo para definir as amostras elegíveis para este estudo.

1. Amostras que fazem parte unicamente de um estudo (sem duplicações).
2. Amostras que possuíam o perfil genómico de todos os genes que estavam a ser analisados.

O primeiro critério foi utilizado porque muitas amostras são usadas em estudos diferentes que muitas vezes estão na mesma base de dados, o que pode fazer que a mesma amostra possa ser selecionada em estudos diferentes e entrar a duplicar na análise. O segundo critério foi usado para garantir a comparabilidade genómica, mesmo se a informação clínica pudesse não ter sido recolhida.

4.4 Variáveis

Para se atingir os objetivos foram definidas 10 variáveis: Estádio, Idade, Gânglios positivos, gânglios examinados, *GUCY2C*, *AKT*, *PTEN*, *PRKG2*, *KRAS* e *BRAF*. Sendo classificadas do seguinte modo:

- Variáveis quantitativas nominais:
 - Mutações dos genes *GUCY2C*, *AKT*, *PTEN*, *PRKG2*, *KRAS* e *BRAF* - Usando as seguintes categorias de acordo com o tipo de mutação indicada pela base de dados: Sem mutação, *missense*, *nonsense*, *splice*, *Deep Del*, amplificação, homodeleção e truncada.
- Variável quantitativa ordinal: Estádio – Usando as seguintes categorias de acordo com a AJCC/UICC (Referência): I,II,III e IV
- Variável quantitativa discreta:
 - Idade- Medida em anos completos
 - Gânglios examinados – em números inteiros
 - Gânglios positivos – em números inteiros

4.5 Colheita dos dados

A colheita de dados foi realizada em www.cbioportal.org entre os dias 10 e 13 de abril de 2023, tendo sido precedida peça seleção de estudos e casos a colher de acordo com a descrição seguinte.

4.5.1 Seleção de estudos

No cBioPortal, foram selecionados os estudos que correspondessem a *Bowel* existindo 18 estudos referentes a CCR. Foram excluídos 6 estudos os quais eram referentes a

outros tipos de cancro (cancro de colon, cancro de reto e adenocarcinoma de apêndice). Dos 12 estudos restantes foram excluídos 2 por possuírem pacientes/amostra em duplicadas com um terceiro (TCGA, Nature 2012 e TCGA, PanCancer Atlas) e 1 estudo foi excluído por se tratar apenas de comparações entre pacientes com CCR da África e das Américas.

4.5.2 Seleção de amostras

Foram selecionadas 3324 amostras a partir dos 12 estudos que faziam parte dos critérios de inclusão. Foi então efetuada uma *Query* pela GUCY2C, tendo aí sido excluídas 832 amostras porque não possuíam o perfil dos genes deste estudo. Das 2492 amostras de doentes com CCR selecionou-se um total de 209 amostras que possuíam informação genómica de todos os genes em análise, como se observa na Fig. 5.5.1.

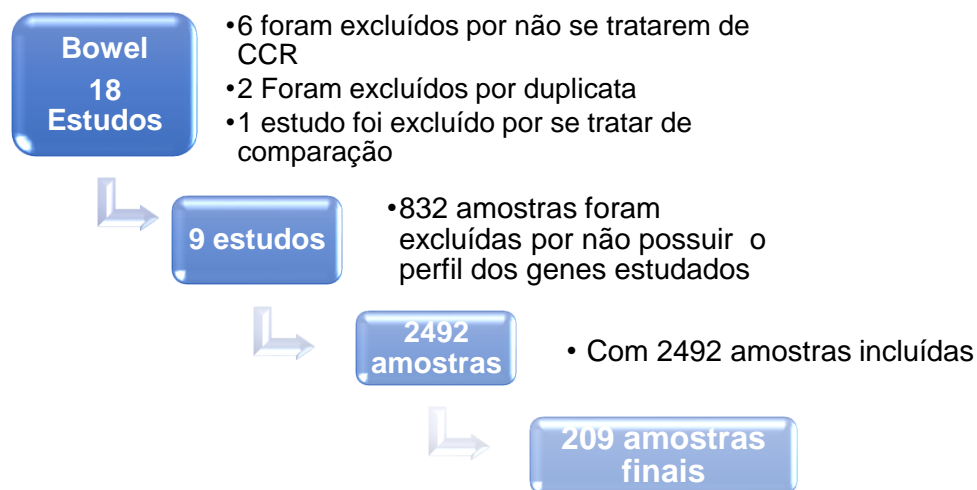


Figura 5.4.1 Fluxograma da colheita de dados de amostras de pacientes

As variáveis foram todas analisadas e os dados colhidos e organizados numa tabela de Microsoft Office Excel para Office 365, no qual os dados foram agrupados de acordo com as variáveis previamente descritas.

4.6 Tratamento estatístico

Para o tratamento estatístico dos dados e para caracterizar a amostra do estudo, os dados foram analisados estatisticamente usando o software estatístico SPSS v27, foi

realizada estatística descritiva (frequência e frequências relativas apresentadas em tabelas e histogramas) para analisar e agrupar as variáveis do estudo. Com o intuito de comparar as relações entre os diferentes perfis genômicos e as variáveis clínicas, foi realizada estatística inferencial através de testes de Qui-quadrado de Pearson, pois foram comparados dados categoriais em mais de dois grupos.

4.8. Considerações éticas e legais

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde com a referência **CE-ESTeSL-Nº. 23-2023**. Sendo um projeto em que não foram utilizadas amostras biológicas de indivíduos, mas sim dados de pessoas anônimas em base de dados públicas, estando garantido o direito à confidencialidade e anonimato dos participantes garantindo os princípios de ética de acordo com a Declaração de Helsínquia e Convenção de Oviedo.

5. Resultados

5.1 Estatística descritiva dos doentes com CCR

Na tabela 5.1, segue a estatística descritiva da amostra do estudo em percentagem, em que foram observados um maior número de casos em idades entre 60 e 80 anos. Para além disso, o estágio mais frequente foi o IV e houve mais casos onde não houve gânglios examinados.

Tabela 5.1 Características da amostra de estudo

		Casos	Porcentagem
Idade	20-40	19	9%
	40-60	78	37%
	60-80	95	45%
	Maiores de 80	12	6%
	Sem informação	5	2%
	Total	209	100%
Estádio	I	13	6%
	II	57	27%
	III	38	18%
	IV	94	45%
	Sem informação	7	4%
	Total	209	100%
Gânglios examinados	0 a 20	18	9%
	20 a 40	29	14%
	40 a 60	6	3%
	Sem informação	156	75%
	Total	209	100%
Gânglios positivos	0 a 5	204	98%
	6 a 10	3	1%
	11 a 15	2	1%
	Sem informação	0	0%
	Total	209	100%

Com o histograma, é possível ver que o maior número de casos se encontra no estágio IV, como podemos ver na Figura 5.2.

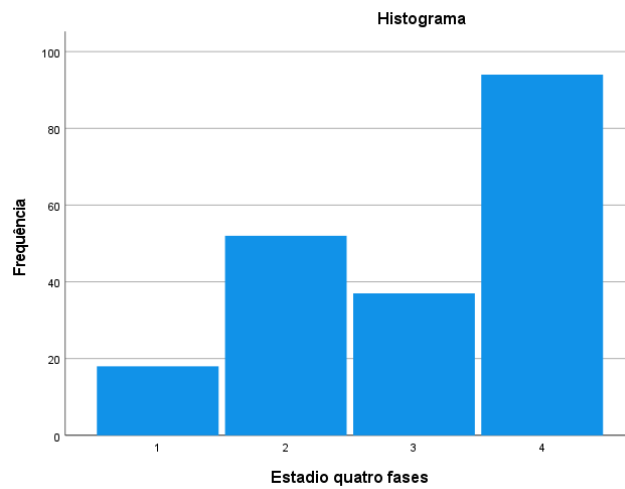


Figura 5.1 Histograma estágio em quatro fases de doentes com CCR.

Com o histograma, é possível ver que a frequência de idade é maior entre 40 e os 70 anos, como podemos ver na Figura 5.3.

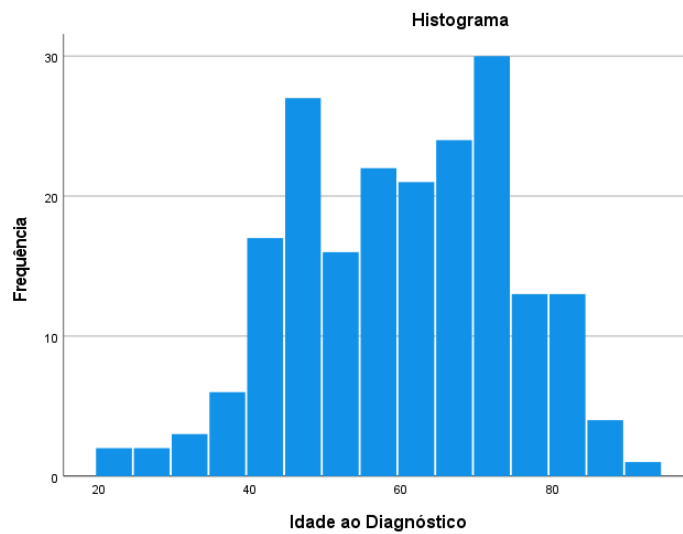


Figura 5.2 Histograma da idade dos doentes com CCR.

Na tabela 5.2 pode-se observar a quantidade de casos em cada tipo de mutação em cada gene, onde a mutação mais frequente em todos os genes foi a *missense* e a menos frequente foi a homodeleção em todos os genes. Em relação aos genes, o gene menos mutado foi o *PRKG2* e o mais mutado o *KRAS*.

Tabela 5.2 Quantidade de amostras em cada tipo de mutação

	GUCY2C	AKT	PTEN	PRKG2	KRAS	BRAF*
Sem mutação	165	193	188	206	138	182
Missense	28	12	8	1	69	25
Nonsense	0	0	3	0	1	0
Amplificação	0	2	0	0	1	0
Deep Del	0	1	5	0	0	0
Truncada	13	0	0	0	0	0
Splice	1	0	2	2	0	0
Homodeleção	2	0	0	0	0	0
Mais de uma mutação	0	1	3	0	0	1
Total de mutação	44	16	21	3	71	26

* possui uma amostra mutada com um FS DEL.

5.2 Estatística inferencial dos doentes com CCR

Para a estatística inferencial foi realizada para cada gene um gráfico de barras entre o estágio do CCR com a presença/ausência de mutação. Com um teste de qui-quadrado, como forma de verificar se a presença de mutação de cada gene estava associada com o momento do estadiamento do CCR.

5.2.1 Estatística *GUCY2C*

No caso da *GUCY2C* foi verificado através do gráfico de barras que o maior número de casos de mutação estava presente em estádios iniciais (Fig.5.4).

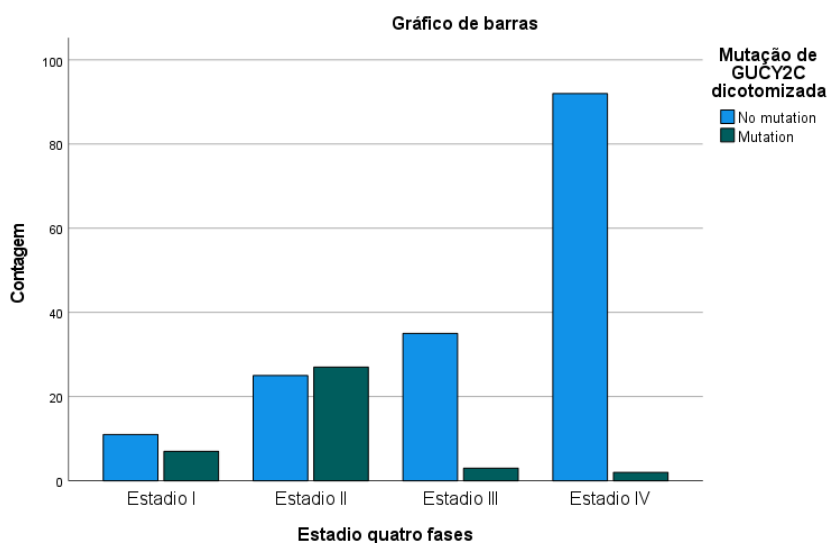


Figura 5.3 Relação da mutação da *GUCY2C* com o estágio em quatro fases.

Em seguida o teste de qui-quadrado de Pearson verificou um valor de p igual a $3,7359 \times 10^{-13}$ que demonstra que existe uma associação estatisticamente significativa entre a presença de mutação e os estágios iniciais do CCR.

5.2.2 Estatística *AKT*

No caso da *AKT* foi verificado através do gráfico de barras que o maior número de casos de mutação estava presente em estágios iniciais (Fig. 5.5).

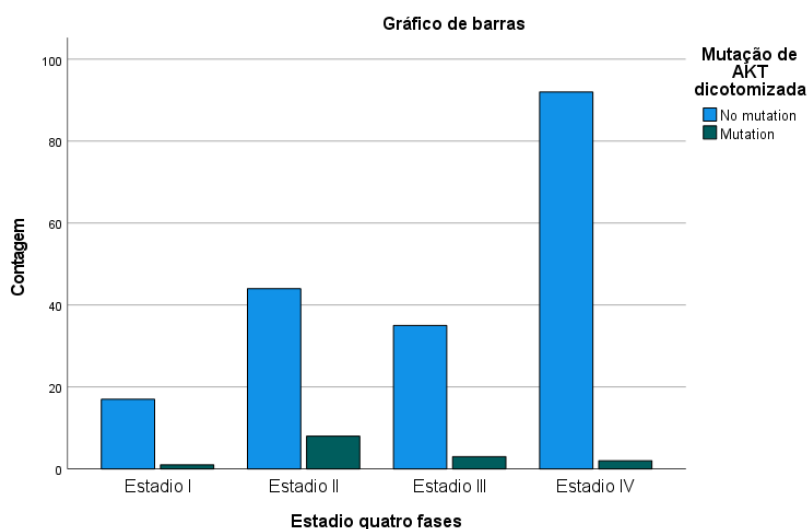


Figura 5.4 Relação da mutação da *AKT* com o estágio em quatro fases.

Em seguida o teste de qui-quadrado de Pearson verificou um valor de p igual a 0,026374, que demonstra que existe uma associação estatisticamente significativa entre a presença de mutação e os estádios iniciais do CCR.

5.2.3 Estatística *PTEN*

No caso da *PTEN* foi verificado através do gráfico de barras que o maior número de casos de mutação estava presente em estádios avançados (Fig. 5.6).

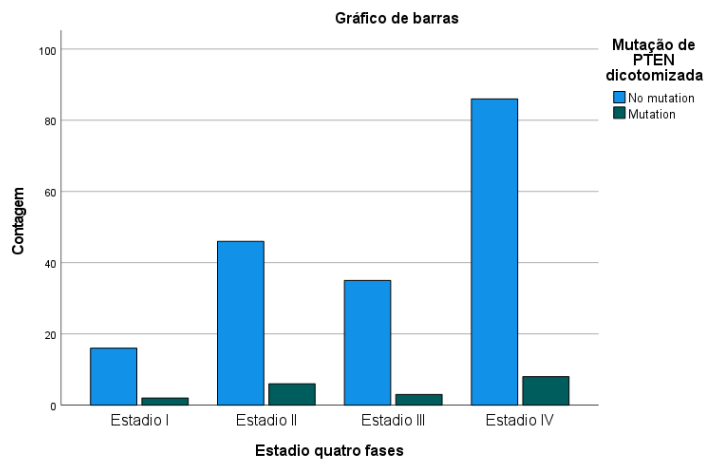


Figura 5.5 Relação da mutação da *PTEN* com o estágio em quatro fases.

Em seguida fizemos o teste de qui-quadrado de Pearson no qual verificamos um valor de p igual a 0,912431 o que demonstra que não possui relação estatisticamente significativa entre a presença de mutação e os estádios iniciais do CCR.

5.2.4 Estatística *PRKG2*

No caso da *PRKG2* foi verificado através do gráfico de barras que os únicos casos de mutações estavam presentes em estágio II (Fig. 5.7).

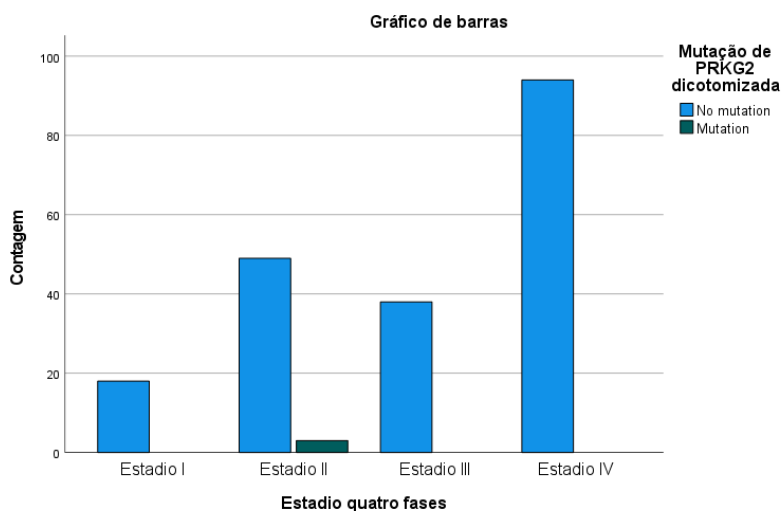


Figura 5.6 Relação da mutação da *PRKG2* com o estágio em quatro fases.

Em seguida fizemos o teste de qui-quadrado de Pearson no qual verificamos um valor de p igual a 0,032300 o que demonstra que existe relação estatisticamente significativa entre a presença de mutação e os estágios iniciais do CCR.

5.2.5 Estatística KRAS

No caso da *KRAS* foi verificado através do gráfico de barras que o maior número de casos de mutação estava presente em estágios avançados (Fig. 5.8).

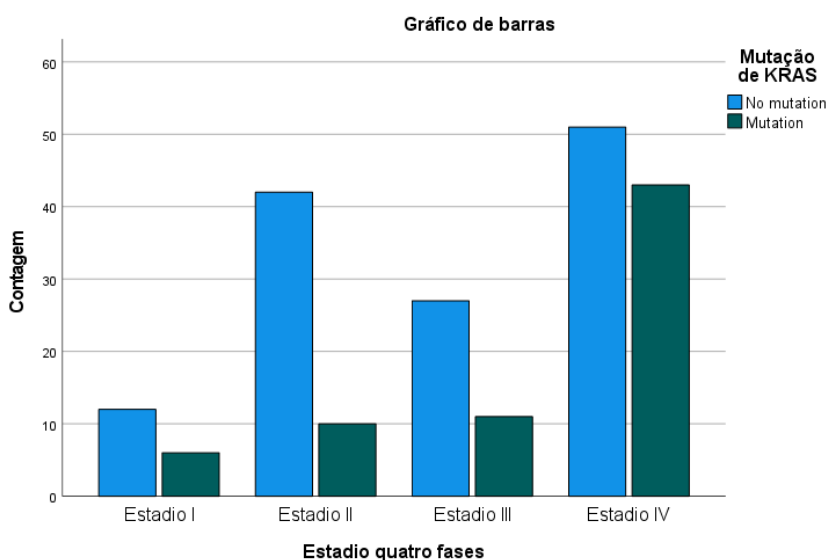


Figura 5.7 Relação da mutação da *KRAS* com o estágio em quatro fases.

Em seguida fizemos o teste de qui-quadrado de Pearson no qual verificamos um valor de p igual a 0,011050 o que demonstra que existe relação estatisticamente significativa entre a presença de mutação e os estádios iniciais do CCR.

5.2.6 Estatística BRAF

No caso da *BRAF* foi verificado através do gráfico de barras que o maior número de casos de mutação estava presente em estádios avançados (Tabela 5.9).

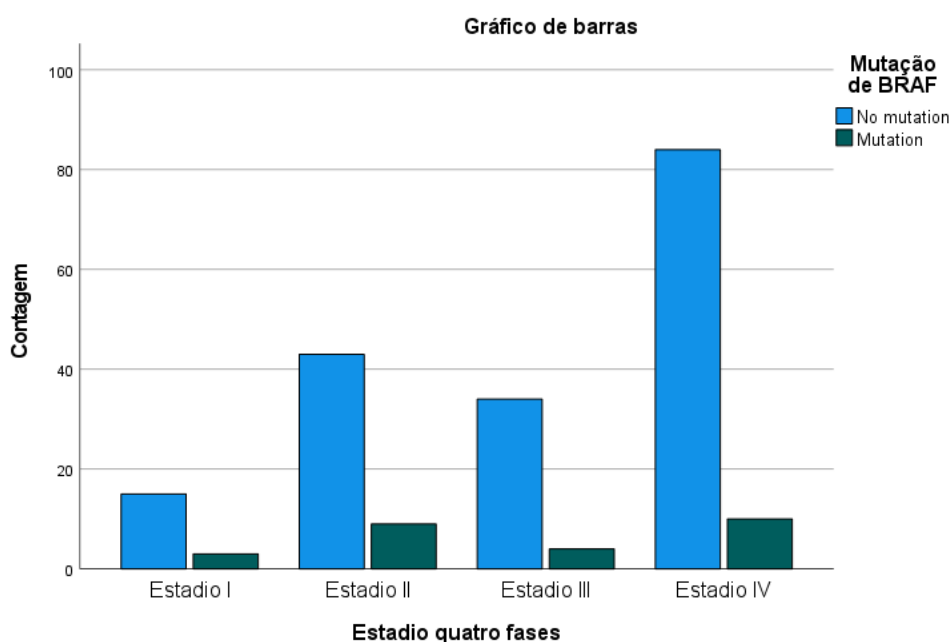


Figura 5.8 Relação da mutação da *BRAF* com o estágio em quatro fases.

Em seguida fizemos o teste de qui-quadrado de Pearson no qual verificamos um valor de p igual a 0,626298 o que demonstra que não existe relação estatisticamente significativa entre a presença de mutação e os estádios iniciais do CCR.

5.3 Estatística da relação mutacional da *GUCY2C* com cada gene

5.3.1 Relação com *AKT*

O gráfico abaixo demonstra que a mutação da *AKT* acontece de forma indiferente a mutação de *GUCY2C*, sendo que o número de casos de *AKT* não mutado é maior quando a *GUCY2C* também não está mutada (Fig. 5.10). Entretanto o teste de qui-

quadrado de Pearson teve um valor de p igual a 0,106914 o que demonstra que não existe relação estatisticamente significativa entre as mutações de *AKT* e *GUCY2C*.

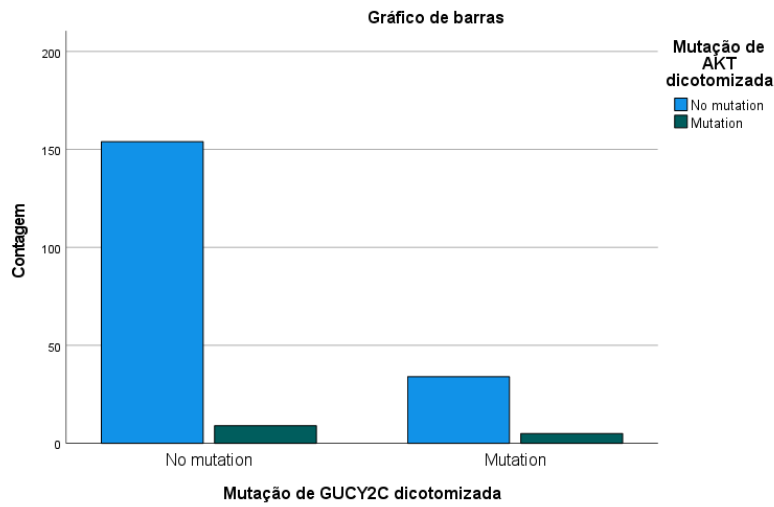


Figura 5.9 Relação entre a mutação da *GUCY2C* e da *AKT*

5.3.2 Relação com *PTEN*

O gráfico abaixo demonstra que a mutação da *PTEN* acontece de forma indiferente a mutação de *GUCY2C*, sendo que o número de casos de *PTEN* não mutado e mutado é maior quando a *GUCY2C* não está mutada (Fig. 5.11). Entretanto o teste de qui-quadrado de Pearson teve um valor de p igual a 0,416101 o que demonstra que não existe relação estatisticamente significativa entre as mutações de *PTEN* e *GUCY2C*.

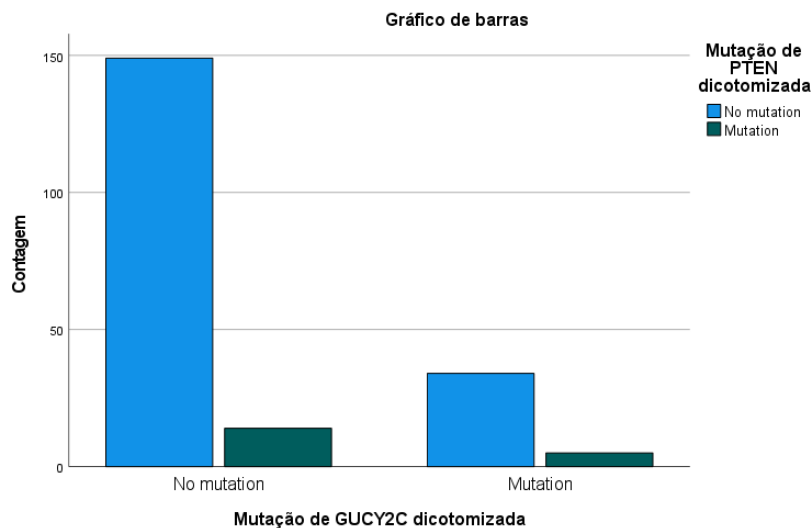


Figura 5.10 Relação entre a mutação da *GUCY2C* e da *PTEN*

5.3.3 Relação com *PRKG2*

O gráfico abaixo demonstra que a mutação da *PRKG2* acontece de forma dependente da mutação de *GUCY2C*, sendo que os casos de *PRKG2* mutado acontecem quando a *GUCY2C* esta mutada (Fig. 5.12). Devido a isso, o teste de qui-quadrado de Pearson teve um valor de p igual a 0,000360 o que demonstra que existe relação estatisticamente significativa entre as mutações de *PRKG2* e *GUCY2C*, quase impossível não haver relação.

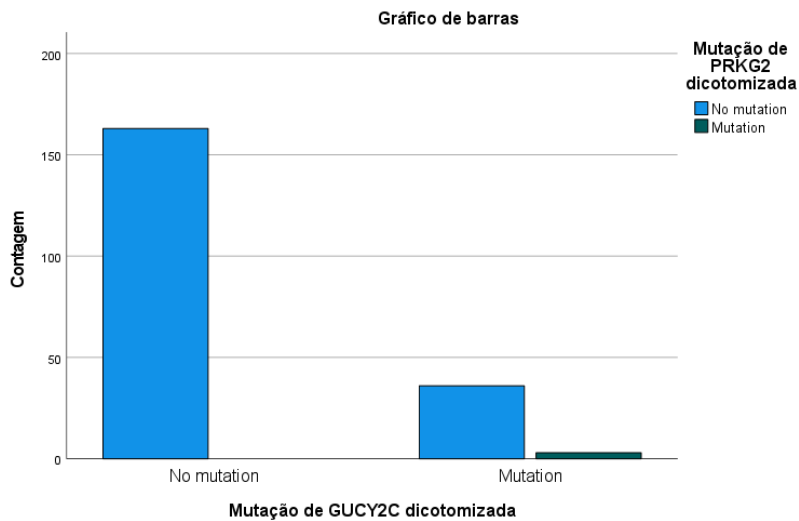


Figura 5.11 Relação entre a mutação da *GUCY2C* e da *PRKG2*

5.3.4 Relação com *KRAS*

O gráfico abaixo demonstra que a mutação da *KRAS* acontece de forma indiferente a mutação de *GUCY2C*, sendo que o número de casos de *KRAS* mutado acontece com a *GUCY2C* mutada ou não, além disso o *KRAS* mutado e não mutado e maior quando a *GUCY2C* não esta mutada (Fig. 5.13). Entretanto o teste de qui-quadrado de Pearson teve um valor de p igual a 0,570402 o que demonstra que não existe relação estatisticamente significativa entre as mutações de *KRAS* e *GUCY2C*.

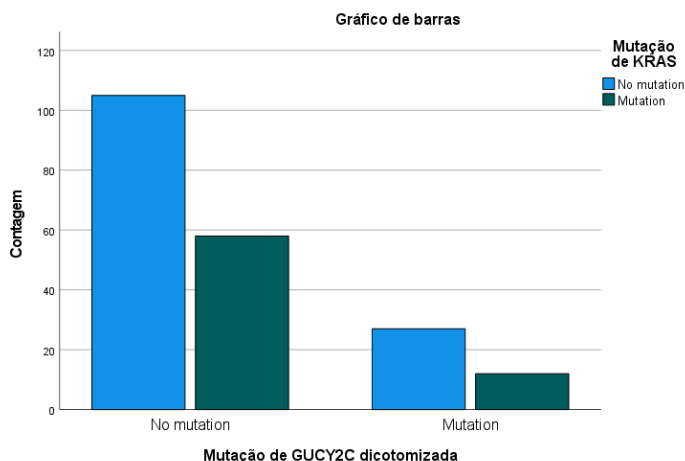


Figura 5.12 Relação entre a mutação da *GUCY2C* e da *KRAS*

5.3.5 Relação com *BRAF*

O gráfico abaixo demonstra que a mutação da *BRAF* acontece de forma indiferente a mutação de *GUCY2C*, sendo que o número de casos de *BRAF* mutado acontece com a *GUCY2C* mutada ou não, além disso o *BRAF* mutado e não mutado é maior quando a *GUCY2C* não está mutada (Fig. 5.14). Entretanto o teste de qui-quadrado de Pearson teve um valor de p igual a 0,034119 o que demonstra que não existe relação estatisticamente significativa entre as mutações de *BRAF* e *GUCY2C*, sendo a *BRAF* um gene relacionado mais independente.

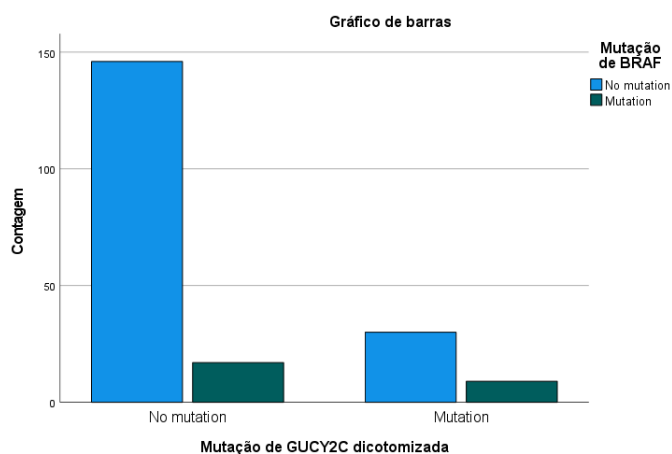


Figura 5.13 Relação entre a mutação da *GUCY2C* e da *BRAF*

6. Discussão

6.1 A relação entre a guanilato ciclase 2C e o estágio do CCR

A estatística descritiva revelou que o tipo de mutação mais comum foi a *missense* embora o maior número de casos tenha associação com a *GUCY2C* não mutada.

Através da análise estatística, foi observado que a presença de mutação da *GUCY2C* está mais relacionada aos estádios mais iniciais do cancro colorretal (ou estágio loco-regional), o que pode indicar que a mutação de *GUCY2C* parece abrandar a progressão do cancro colorretal, ou seja, os pacientes com esse gene mutado levam mais tempo para metastizar. Achado este que corrobora com a literatura do CCR, uma vez que, diversos estudos de diferentes autores verificaram que a *GUCY2C* perde seus ligantes nas fases iniciais da tumorigénese (3,8,9,22). Este facto indica que mais estudos de bancada devem ser feitos com linhas celulares onde a mutação da *GUCY2C* pode ajudar a aumentar o tempo até a metástase ou com murganhos com tumores com ou sem *GUCY2C* e observar se influencia a taxa de metastização(8).

Para além disso, os resultados sugerem que as mutações da *GUCY2C* como biomarcador prognóstico, por se tratar de um gene cuja mutação está relacionada com aumento do tempo até metástase. Embora apenas o estudo de Jimenez-Luna et al pode comprovar a *GUCY2C* como um biomarcador prognóstico, os estudos recentes o apontam como biomarcador preditivo(9,10,22)

6.2 A relação do estado mutacional da guanilato ciclase 2C com genes de outras vias.

Segundo as estatísticas a *AKT*, *PTEN*, *KRAS* e *BRAF* não possuem qualquer relação com o estado mutacional da *GUCY2C*, conforme visto nas figuras 5.10,5.11 ,5.13 e 5.14, o que nos sugere que não há relação entre as mutações, o que não quer dizer que não haja uma relação entre as vias. Embora as mutações segundo este estudo não possuam relação, a literatura do CCR aponta para uma relação entre essas vias como podemos identificar em diversos estudos, o que abre a possibilidade para a realização de mais estudos que visam encontrar relação ou não entre essas vias (23)

Também foi verificado que o estado mutacional do *PRKG2* tem relação com o estado mutacional da *GUCY2C*, mas como existem apenas 3 casos com mutação em *PRKG2* pode ser que esta relação não seja muito relevante, pois as 3 mutações de *PRKG2* eram

coincidentes com tumores com mutação da *GUCY2C*. No entanto é um tumor com muito poucas as mutações nesta série, podendo relevar a sua importância para a tumorigénese. Este último achado ainda pode ser um excelente tópico para um estudo futuro com uma população maior e mais específica.

Com isso foi possível estabelecer algumas relações entre a *GUCY2C* e suas vias e genes mais diretamente relacionados, embora seja preciso ainda mais estudos para fazer relações mais fortes.

6.3 Limitações

Apesar da grande quantidade de informação qualificada na base de dados da cBioportal, ainda é recorrente o problema de falta de alguns tipos de dados, o que muitas vezes prejudica no achado de conclusões mais concretas a respeito do CCR e outros tipos de cancros.

A falta de informação curada a respeito dos gânglios, tanto examinados como positivos, nas bases de dados foi o principal fator que limitou as análises estatísticas e possíveis relações que poderiam surgir deste estudo. Outra limitação deste trabalho foi o baixo número de casos mutados de *PRKG2* que impediu a confirmação das possíveis relações.

7. Conclusão

Como é sabido, o CCR é hoje uma doença muito frequente e com altas taxas de mortalidade em todo mundo (3). Por este facto a procura por novos marcadores moleculares como forma de encontrar um tratamento mais preciso se tornou extremamente relevante (4,5) .

Conclui-se também que *GUCY2C* proteger da progressão do CRC, além de estar relacionada com os estágios iniciais do CCR, e embora seja necessária mais investigação, esta conclusão pode apontar no sentido de desenvolver um biomarcador que poderia levar a uma terapêutica que ajudasse a aumentar ainda mais a sobrevida da doença.

Referências Bibliográficas

1. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. Cell. Elsevier B.V. Vol. 136; 2009. p. 823–37.
2. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Vol. 12, Cancer Discovery. American Association for Cancer Research Inc.; 2022. p. 31–46.
3. ACF, ESMO. Cancro Colorretal: um Guia para o Doente. Diretrizes para a Prática Clínica, v.1, 2016, p. 1-53.
4. Serrano DAC, Leite CP. Avanços recentes das abordagens nanotecnológicas para diagnóstico e tratamento do cancro colorretal. Universidade Lusófona de humanidades. 2021 Oct.
5. Lisby AN, Flickinger JC, Bashir B, Weindorfer M, Shelukar S, Crutcher M, et al. GUCY2C as a biomarker to target precision therapies for patients with colorectal cancer. Expert Review of Precision Medicine and Drug Development. Taylor and Francis Ltd.; Vol. 6, 2021. p. 117–29.
6. De Melo A, Silva RMP, Andrade WP, Braga LC, Marcadores preditivos e prognósticos para a medicina personalizada do cancro colorretal. Acta biologica brasiliensia. Vol 2.n 1, 2019 Jun, p. 54-79.
7. Entezari AA, Snook AE, Waldman SA. Guanylyl cyclase 2C (GUCY2C) in gastrointestinal cancers: recent innovations and therapeutic potential. Expert Opinion on Therapeutic Targets. Taylor and Francis Ltd.; Vol. 25, 2021. p. 335–46.
8. Blomain ES, Rappaport JA, Pattison AM, Bashir B, Caparosa E, Stem J, et al. APC- β -catenin-TCF signaling silences the intestinal guanylin-GUCY2C tumor suppressor axis. Cancer Biol Ther. 2020 May 3;21(5):441–51.
9. Lin JE, Li P, Snook AE, Schulz S, Dasgupta A, Hyslop TM, et al. The Hormone Receptor GUCY2C Suppresses Intestinal Tumor Formation by Inhibiting AKT Signaling. Gastroenterology. 2010;138(1):241–54.
10. Mejia A, Schulz S, Hyslop T, Weinberg DS, Waldman SA. GUCY2C reverse transcriptase PCR to stage pN0 colorectal cancer patients. Expert Review of Molecular Diagnostics Vol. 9, 2009. p. 777–85.
- 11.
12. Cappell MS. From colonic polyps to colon cancer: Pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis. Clinics in Laboratory Medicine. W.B. Saunders; Vol. 25, 2005. p. 135–77.
13. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. Gastrointest Cancer Res. Vol. 5, 2012 Jan, p. 19-27. Available from: www.myGCRonline.org
14. Granados-Romero JJ, Valderrama-Treviño AI, Contreras-Flores EH, Barrera-Mera B, Herrera Enríquez M, Uriarte-Ruíz K, et al. Colorectal cancer: a review. Int J Res Med Sci. 2017 Oct 27;5(11):4667.

15. Argilés G, Tabernero J, Labianca R, Hochhauser D, Salazar R, Iveson T, et al. Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2020 Oct 1;31(10):1291–305.
16. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features., *Histopathology*. Vol. 50, 2007. p. 113–30.
17. Schneider NI, Langner C. Prognostic stratification of colorectal cancer patients: Current perspectives. *Cancer Management and Research*. Dove Medical Press Ltd. Vol. 6, 2014. p. 291–300.
18. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *The Lancet*.v. 394, 2019; p.80-1467.Available from: www.thelancet.com
19. Van Der Stok EP, Spaander MCW, Grünhagen DJ, Verhoef C, Kuipers EJ. Surveillance after curative treatment for colorectal cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; Vol. 14, 2017. p. 297–315.
20. Riihimaki M, Hemminki A, Sundquist J, Hemminki K. Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Sci Rep*. 2016 Jul 15;6.
21. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020 May;70(3):145–64.
22. Rappaport JA, Waldman SA. An update on guanylyl cyclase C in the diagnosis, chemoprevention, and treatment of colorectal cancer. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. Taylor and Francis Ltd.; Vol. 13, 2020. p. 1125–37.
23. Das T, Andrieux G, Ahmed M, Chakraborty S. Integration of Online Omics-Data Resources for Cancer Research. *Frontiers in Genetics*. Frontiers Media S.A.; Vol. 11, 2020.
24. Kwon YW, Jo HS, Bae S, Seo Y, Song P, Song M, et al. Application of Proteomics in Cancer: Recent Trends and Approaches for Biomarkers Discovery., *Frontiers in Medicine*. Frontiers Media S.A.; Vol. 8, 2021.
25. Pentheroudakis G, Kotoula V, De Roock W, et al. Biomarkers of benefit from cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer: interaction of EGFR ligand expression with RAS/RAF, PIK3CA genotypes. *BMC Cancer*. 2013;13(1):49. doi:10.1186/1471-2407-13-49.
26. Bando H, Yoshino T, Shinozaki E, et al. Simultaneous identification of 36 mutations in KRAS codons 61 and 146, BRAF, NRAS, and PIK3CA in a single reaction by multiplex assay kit. *BMC Cancer*. 2013;13(1):405. doi:10.1186/1471-2407-13-405.
27. Lan Y-T, Jen-Kou L, Lin C-H, et al. Mutations in the RAS and PI3K pathways are associated with metastatic location in colorectal cancers. *J Surg Oncol*. 2015;111(7):905-910. doi:10.1002/jso.23895.
28. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol*. 2010;11(8):753-762. doi:10.1016/S1470-2045(10)70130-3.

29. Bermúdez Brito M. Focus on PTEN regulation. *Front Oncol.* 2015;5(July):1-15. doi:10.3389/fonc.2015.00166.
30. Lin P-C, Lin J-K, Lin H-H, et al. A comprehensive analysis of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) loss in colorectal cancer. *World J Surg Oncol.* 2015;13(1):186. doi:10.1186/s12957-015-0601-y.
31. Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR Status in Determining Benefit From Cetuximab Therapy in Wild-Type KRAS Metastatic Colon Cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(35):5924-5930. doi:10.1200/JCO.2008.21.6796
32. Custodio A, Feliu J. Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer: Beyond KRAS mutations. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013;85(1):45-81. doi:10.1016/j.critrevonc.2012.05.001.
33. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):459-465. doi:10.1038/nrc1193.
34. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(11):761-774. doi:10.1038/nrc3106
35. Clarke SJ, Karapetis CS, Gibbs P, et al. Overview of biomarkers in metastatic colorectal cancer: tumour, blood and patient-related factors. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013;85(2):121-135. doi:10.1016/j.critrevonc.2012.06.001.
36. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014;25(suppl 3):iii1-iii9. doi:10.1093/annonc/mdu260.
37. Atreya CE, Corcoran RB, Kopetz S. Expanded RAS: Refining the Patient Population. *J Clin Oncol.* 2015;33(7):682-685. doi:10.1200/JCO.2014.58.9325.
38. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009;4(1):127-150. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092311.

