

**A.C.CAMARGO CANCER CENTER
FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE**

**KRAS-G12C: UM BIOMARCADOR NEGLIGENCIADO PARA DETECTAR
INDIVÍDUOS COM POLIPOSE ASSOCIADA AO MUTYH**

ANA BEATRIZ DELEAME MEDEIROS

Dissertação de Mestrado Acadêmico apresentada à
Fundação Antônio Prudente como requisito para obtenção
do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia.

Orientador (a): Dr^a Giovana Tardin Torrezan

**São Paulo
2025**

FICHA CATALOGRÁFICA

Medeiros, Ana Beatriz Deleame.

KRAS-G12C: um biomarcador negligenciado para detectar indivíduos com Polipose Associada ao MUTYH. / Ana Beatriz Deleame Medeiros. São Paulo, 2025.

104f.

**Dissertação de Mestrado - Fundação Antônio Prudente.
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.**

Orientador: Giovana Tardin Torrezan.

1. Polipose Associada ao MUTYH, 2. KRAS-G12C, 3. PIK3CA-Q546K

CDU 616

Nome: Ana Beatriz Deleame Medeiros

Título: KRAS-G12C: um biomarcador negligenciado para detectar indivíduos com Polipose Associada ao MUTYH

Aprovado em: 20/03/2025

Banca Examinadora

Orientador: Giovana Tardin Torrezan

Instituição: Fundação Antônio Prudente (A.C.Camargo Cancer Center)

Membro da banca: Virgílio Souza e Silva

Instituição: A.C.Camargo Cancer Center

Membro da banca: Renata Lazari Sandoval

Instituição: Hospital Sírio Libanês

Membro da banca: Clarissa Gondim Picanço de Albuquerque

Instituição: Instituto do Câncer do Ceará (Hospital Haroldo Juaçaba)

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio do INCT 2014 de Oncogenômica e Inovação Terapêutica (Processo nº 201450943-1), do Grant CGA-IGC Award fostering clinical innovations in Latin America 2022 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por meio da concessão de Bolsa de Mestrado (Processo nº 2022/03407-3).

“O que podemos experimentar de mais belo é o mistério. É a fonte de toda arte e ciência verdadeiras. Aquele que for alheio a esta emoção, aquele que não se detenha a admirar as coisas, é como se estivesse morto: seus olhos estão fechados.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, gostaria de agradecer imensamente a todos os pacientes que aceitaram fazer parte do estudo. São vocês que permitem que os avanços em oncologia aconteçam. Espero que os resultados obtidos aqui facilitem o manejo clínico de vocês e de muitas outras pessoas.

À minha orientadora, Dr^a. Giovana Torrezan, que consegue conciliar perfeitamente profissionalismo, competência, empatia e respeito, características comuns, porém difíceis de serem vistas em conjunto em muitos profissionais. Tenho muita admiração por você e espero um dia conseguir ter pelo menos metade do seu conhecimento. É impossível não gostar de pesquisa sendo sua aluna. Muito obrigada por todo o apoio com o projeto de mestrado e por todos os conselhos profissionais e pessoais.

Aos amigos que fiz no CIPE e que quero levar para a vida, Larissa, Mariana, Anthony, Isabela, Lucas, Victor e em especial à Sophia, por ter me apresentado à pesquisa no A.C.Camargo. Alguns de vocês me ajudaram diretamente no meu projeto e outros me ajudaram emocionalmente, mas todos fizeram o processo ser mais fácil. Obrigada por todos os nossos momentos juntos.

A todos os pesquisadores, funcionários e outros alunos do Grupo de Genômica Clínica e Funcional, os quais sempre foram muito solícitos em ajudar em tudo o que precisamos.

Às meninas do Biobanco e à equipe da Anatomia Patológica, que sempre fizeram o possível para atender às minhas demandas de extração de DNA (que não foram poucas).

Aos colaboradores de Barretos, em especial ao Dr. Rui Reis e ao Dr. Gustavo Berardinelli, por terem me recebido no meio da correria da rotina de diagnóstico do Hospital de Amor e dado todo o suporte necessário para a coleta de dados dos pacientes.

Aos demais colaboradores do estudo, como à Dr^a. Vanessa Kozak e à Dr^a. Clarissa Picanço-Albuquerque, por terem colaborado conosco fornecendo as amostras dos pacientes com variantes de significado incerto no gene *MUTYH*.

Aos meus pais, Salete e Roberto, por terem apoiado os meus estudos desde criança, e ao meu irmão, Henrique. Nunca me faltou nada, principalmente amor, e sou muito grata por tudo o que sempre fizeram por mim. Mãe, você é minha inspiração e uma das mulheres mais fortes que conheço, juntamente à minha avó, de quem sinto tanta falta e que espero que esteja olhando por mim, de onde quer que esteja.

Ao meu amor e melhor amigo, Gustavo, por dividir a vida comigo e torná-la muito mais bonita e agradável. Obrigada por todo o apoio, incentivo e companheirismo de sempre.

Aos meus amigos de profissão e da vida, Gabriela, Rodrigo e Benjamin, por terem acompanhado e incentivado minha trajetória na pesquisa desde a iniciação científica e por sempre terem me dado força em tudo o que quis fazer.

Por fim, agradeço às agências de fomento CNPq, CAPES e principalmente FAPESP, da qual recebi a bolsa de pesquisa grande parte da minha iniciação científica e mestrado, além dos outros incentivos à pesquisa recebidos por este projeto e auxílios financeiros da pós-graduação.

RESUMO

Medeiros, ABD. KRAS-G12C: um biomarcador negligenciado para detectar indivíduos com Polipose Associada ao MUTYH. [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2025.

INTRODUÇÃO: A Polipose Associada ao *MUTYH* (MAP) é uma síndrome recessiva de predisposição ao câncer responsável por 0,7% de todos os cânceres colorretais (CCR). A perda de função do gene *MUTYH* gera transversões G:C → T:A em diversos genes, incluindo *KRAS* e *PIK3CA*. A mutação KRAS-G12C ocorre em <3% dos pacientes com CCR esporádico e em >80% dos pacientes MAP; *PIK3CA*-Q546K, por sua vez, ocorre em 0,7% e 37%, respectivamente. Estudos demonstraram que 3% a 25% dos pacientes com CCR e KRAS-G12C apresentaram variantes germinativas patogênicas (VGPs) em *MUTYH*.

OBJETIVOS: Avaliar a taxa de detecção de VGPs em *MUTYH* em pacientes com CCR e KRAS-G12C e correlacionar aspectos clínicos com os genótipos dos pacientes; avaliar a utilidade de investigar KRAS-G12C e *PIK3CA*-Q546K em adenomas e CCR para classificar variantes de significado incerto (VUS) em *MUTYH*. **MATERIAL E MÉTODOS:** Para isso,

foram extraídos DNA de tumor fresco, parafina e leucócito. Para o primeiro objetivo, foram avaliadas as VGPs mais comuns de *MUTYH* no Brasil (p.Tyr179Cys, p.Gly396Asp, p.Arg241Trp, p.Ala385fs e deleção éxons 4-16) por PCR multiplex seguida de sequenciamento de nova geração (NGS) de amplicons. Pacientes com apenas uma variante em heterozigose foram avaliados por sequenciamento completo do *MUTYH*. Para o segundo objetivo, avaliamos a frequência de detecção das mutações KRAS-G12C e *PIK3CA*-Q546K em adenomas e CCR de indivíduos diagnosticados com MAP (bialélicos) e suspeitos (com presença de VUS em *MUTYH*). **RESULTADOS:** Foram identificados 220 pacientes com

CCR e KRAS-G12C, dos quais 25 (11,4%) tinham pelo menos uma VGP em *MUTYH*. Destes, 13 foram submetidos ao sequenciamento completo, 9 se apresentaram como bialélicos no

sequenciamento inicial e 3 não possuíam material para o painel genético. Dentre os 25 pacientes detectados, 15 (6,8%) são bialélicos, sendo classificados como MAP, enquanto 10 (4,5%) são monoalélicos, dos quais 40% apresentaram perda de heterozigose. Pacientes MAP apresentam uma média de idade de aparecimento do câncer menor do que pacientes com *MUTYH* selvagem, além de maior presença de pólipos e histórico familiar para outros cânceres e menor prevalência de tumores em estágio IV (p-valores de 0,008, 0,036, 0,014 e 0,029, respectivamente). Em relação ao segundo objetivo, de 16 pacientes MAP, 12 (75%) são mutados para *KRAS*-G12C e 5 (31,2%) para *PIK3CA*-Q546K. De 17 adenomas analisados, 8 (47%) foram mutados para *KRAS*-G12C e nenhum para *PIK3CA*-Q546K; de 13 adenocarcinomas analisados, os resultados foram de 12 (92,3%) e 5 (38,4%), respectivamente. A identificação de qualquer uma das duas mutações em adenocarcinomas detectou pacientes MAP com uma sensibilidade de 100%. Adenomas/CCR de três pacientes suspeitos para MAP com VUS em *MUTYH* revelaram a presença de *KRAS*-G12C e/ou *PIK3CA*-Q546K nos portadores de p.Pro301Arg e p.Trp113Arg, suportando a reclassificação das duas variantes para provavelmente patogênicas. **CONCLUSÃO:** Podemos concluir que a alta taxa de detecção de VGPs em *MUTYH* em pacientes com CCR e *KRAS*-G12C indica seu uso como biomarcador para detectar pacientes MAP, e que a alta taxa de detecção de *KRAS*-G12C e *PIK3CA*-Q546K em adenocarcinomas de pacientes MAP suporta sua utilização na reclassificação de VUS. **PALAVRAS-CHAVE:** Polipose Associada ao *MUTYH*, *KRAS*-G12C, *PIK3CA*-Q546K, Câncer Colorretal.

ABSTRACT

Medeiros, ABD. KRAS-G12C: a neglected biomarker to detect patients with MUTYH-associated polyposis. [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2025.

INTRODUCTION: MUTYH-associated polyposis (MAP) is a recessive hereditary predisposition syndrome responsible for 0.7% of all colorectal cancers (CRC). The loss of function of the MUTYH gene generates G:C → T:A transversions in several genes, including KRAS and PIK3CA. The KRAS-G12C mutation occurs in <3% of patients with sporadic CRC and in >80% of MAP patients; PIK3CA-Q546K, in turn, occurs in 0.7% and 37%, respectively. Studies have shown that 3% to 25% of CRC patients with KRAS-G12C harbor germline pathogenic variants (GPVs) in MUTYH. **PURPOSE:** to evaluate the detection rate of GPVs in MUTYH in patients with CRC and KRAS-G12C and to correlate their clinical aspects with the genotypes; to evaluate the utility of investigate KRAS-G12C and PIK3CA-Q546K in adenomas and CRC to classify variants of uncertain significance (VUS) in MUTYH. **MATERIAL AND METHODS:** For this purpose, DNA from fresh tumor, paraffin-embedded and leukocyte samples were extracted. For the first objective, the most common GPVs of MUTYH in Brazil (p.Tyr179Cys, p.Gly396Asp, p.Arg241Trp, p.Ala385fs and exon deletion 4-16) were evaluated by multiplex PCR followed by next-generation sequencing (NGS) of amplicons. Patients with one variant in heterozygosity were evaluated by complete sequencing of MUTYH. For the second objective, we evaluated the frequency of detection of KRAS-G12C and PIK3CA-Q546K mutations in adenomas and CRC of individuals diagnosed with MAP (biallelic) and suspected (with presence of VUS in MUTYH). **RESULTS:** A total of 220 patients with CRC and KRAS-G12C were identified, of which 25 (11.4%) had at least one GPV in MUTYH. Of these, 13 underwent complete sequencing, 9 were biallelic in the initial sequencing and 3 did not have material for the

genetic panel. Among the 25 patients, 15 (6.8%) are biallelic, being classified as MAP, while 10 (4.5%) are monoallelic, of which 40% had loss of heterozygosity. MAP patients have a lower mean age at cancer onset than patients with wild-type MUTYH, in addition to a higher presence of polyps and family history for other cancers and a lower prevalence of stage IV tumors (p-values of 0.008, 0.036, 0.014, and 0.029, respectively). Regarding the second objective, of 16 MAP patients, 12 (75%) were mutated for KRAS-G12C and 5 (31.12%) for PIK3CA-Q546K. Of 17 adenomas assessed, 8 (47%) were mutated for KRAS-G12C and none for PIK3CA-Q546K; of 13 adenocarcinomas assessed, the results were 12 (92.3%) and 5 (38.4%), respectively. The identification of either of the two mutations in adenocarcinomas identified MAP patients with 100% sensitivity. Adenomas/CRC from three patients suspected of MAP with VUS in MUTYH revealed the presence of KRAS-G12C and/or PIK3CA-Q546K in carriers of p.Pro301Arg and p.Trp113Arg, supporting reclassification as likely pathogenic in both cases. **CONCLUSION:** We can conclude that the high detection rate of GPVs in MUTYH in patients with CRC and KRAS-G12C indicates its use as a biomarker to detect MAP patients, and that the high detection rate of KRAS-G12C and PIK3CA-Q546K in adenocarcinomas of MAP patients supports its use in VUS reclassification. **KEYWORDS:** MUTYH-associated polyposis, KRAS-G12C, PIK3CA-Q546K, Colorectal Cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Vias de desenvolvimento do câncer colorretal.	2
Figura 2. Esquema do Sistema de Reparo por Excisão de Bases (BER).	4
Figura 3. Assinaturas mutacionais SBS18 e SBS36 características de tumores de pacientes MAP.	9
Figura 4. Fluxograma da seleção da coorte e das análises referentes aos objetivos geral e secundários 1 a 3.	15
Figura 5. Fluxograma da seleção da coorte e das análises referentes ao objetivo secundário 4.	16
Figura 6. Regiões e éxons abrangidos pelos iniciadores utilizados no sequenciamento multiplex e na PCR ampliada do gene <i>MUTYH</i>	21
Figura 7. Principais neoplasias observadas no histórico familiar para outros cânceres, metástases e outros tumores primários e distribuição dos estádios clínicos dos tumores.	27
Figura 8. Exemplo de resultado de gel de agarose e de visualização de variantes por meio do software IGV.	29
Figura 9. Exemplo de visualização das variantes avaliadas por PCR alelo-específica para confirmação de heterozigose composta no software IGV.	33
Figura 10. Relação do histórico familiar para outros cânceres de pacientes MAP.	34
Figura 11. Comparação entre os grupos bialélico, monoalélico e sem variantes em <i>MUTYH</i> nos dois centros em relação à idade de aparecimento do CCR e à presença de pólipos.	42
Figura 12. Heredograma da probanda portadora da VUS p.Lys450Met.	49
Figura 13. Heredograma da probanda portadora da VUS p.Pro301Arg.	50
Figura 14. Heredograma da probanda portadora da VUS p.Trp113Arg.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variantes, iniciadores e tamanho dos amplicons utilizados na técnica de PCR multiplex do <i>MUTYH</i>	19
Tabela 2. Iniciadores e tamanho dos amplicons utilizados na PCR multiplex ampliada do <i>MUTYH</i>	21
Tabela 3. Variantes, iniciadores e tamanho dos amplicons utilizados na técnica de PCR alelo-específica.	23
Tabela 4. Mutações, iniciadores e tamanho dos amplicons utilizados na técnica de PCR multiplex do <i>KRAS</i> e <i>PIK3CA</i>	24
Tabela 5. VGPs detectadas em <i>MUTYH</i> em pacientes com CCR e <i>KRAS</i> -G12C.	32
Tabela 6. Variantes encontradas no sequenciamento multiplex ou completo do gene <i>MUTYH</i> e análise de perda de heterozigose (LOH) em pacientes monoalélicos.	35
Tabela 7. Análises estatísticas das características clínicas e anatomopatológicas da coorte, comparando pacientes com VGPs e sem VGPs em <i>MUTYH</i>	37
Tabela 8. Análises estatísticas das características clínicas e anatomopatológicas da coorte, comparando pacientes bialélicos e sem VGPs em <i>MUTYH</i>	39
Tabela 9. Dados de idade, variantes e materiais analisados dos 16 pacientes MAP que compuseram o grupo controle positivo.	44
Tabela 10. Frequências de detecção observadas para <i>KRAS</i> -G12C e <i>PIK3CA</i> -Q546K em adenomas e CCR de pacientes MAP da nossa coorte e de pacientes esporádicos da literatura.	46
Tabela 11. Valores de sensibilidade, especificidade e acurácia das mutações <i>KRAS</i> -G12C e <i>PIK3CA</i> -Q546K para detectar pacientes MAP.	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AFAP – Polipose Adenomatosa Familiar Atenuada (do inglês *Attenuated Familial Adenomatous Polyposis*)

ARMS – Sistema de Mutação Refratária à Amplificação (do inglês *Amplification-Refractory Mutation System*)

ASP 1 – Iniciador alelo-específico 1 – alelo selvagem específica (do inglês *Allele-Specific Primer*)

ASP 2 – Iniciador alelo-específico 2 – alelo mutado (do inglês *Allele-Specific Primer*)

AS-PCR – PCR alelo-específica (do inglês *Allele-Specific PCR*)

B – Benigna

BER – Reparo por Excisão de Bases (do inglês *Base Excision Repair*)

CCR – Câncer Colorretal

CIN – Via de Instabilidade Cromossômica (do inglês *Chromosomal Instability*)

CIMP – Fenótipo de Metilação de Ilhas CpG (do inglês *CpG Island Methylator Phenotype*)

CON – Iniciador conservado

EGFR - Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*)

FAP – Polipose Adenomatosa Familiar (do inglês *Familial Adenomatous Polyposis*)

FFPE – Fixado em Formalina e Emblocado em Parafina (do inglês *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*)

GST – Gene Supressor Tumoral

IC – Intervalo de Confiança

IHQ – Imunohistoquímica

LOH – Perda de Heterozigose (do inglês *Loss of Heterozygosity*)

MAP – Polipose Associada ao *MUTYH* (do inglês *MUTYH-associated polyposis*)

Mb – Megabase

MMR – Reparo de Malpareamento (do inglês *Mismatch Repair*)

MSI – Instabilidade de Microssatélites (do inglês *Microsatellite Instability*)

MSI-H – Alta Instabilidade de Microssatélites (do inglês *Microsatellite Instability High*)

MSS – Estabilidade de Microssatélites (do inglês *Microsatellite Stability*)

NGS – Sequenciamento de Nova Geração (do inglês *Next-Generation Sequencing*)

NSCLC – Câncer de Pulmão Não Pequenas Células

OR – Razão de Chances (do inglês *Odds Ratio*)

nº – Número

P – Patogênica

PB – Provavelmente Benigna

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

PD-L1 – Ligante de Morte Programada 1 (do inglês *Programmed Death Ligand 1*)

PP – Provavelmente Patogênica

SBS – Substituição de Base Única (do inglês *Single Base Substitution*)

SL – Síndrome de Lynch

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TMB – Carga Mutacional Tumoral (do inglês *High Mutational Burden*)

VAF – Frequência Alélica da Variante (do inglês *Variant Allele Frequency*)

VCF – Formato de Chamada de Variantes (do inglês *Variant Call Format*)

VGP – Variante Germinativa Patogênica

VUS – Variantes de Significado Incerto (do inglês *Variants of Uncertain Significance*)

LISTA DE SIGLAS

ACCCC – A.C.Camargo Cancer Center

ACMG – *American College of Medical Genetics and Genomics*

ASMO - *American Society of Clinical Oncology*

ClinGen – *Clinical Genome Resource*

CEP – Conselho de Ética em Pesquisa

CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

ESMO - *European Society for Medical Oncology*

FDA – *Food and Drug Administration*

gnomAD – *Genome Aggregation Database*

IGV – *Integrative Genomics Viewer*

LDG – Laboratório de Diagnóstico Genômico

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NCCN – *National Comprehensive Cancer Network*

TCGA – *The Cancer Genome Atlas Program*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer Colorretal e Síndromes de Predisposição Hereditária relacionadas	1
1.2 Polipose Associada ao <i>MUTYH</i> (MAP)	3
1.3 Portadores Monoalélicos	6
1.4 Fenótipos tumorais	8
1.4.1 Assinaturas mutacionais SBS18 e SBS36	8
1.4.2 Associação com <i>KRAS</i> -G12C e <i>PIK3CA</i> -Q546K	10
1.4.3 Reclassificação de variantes de significado incerto (VUS) em <i>MUTYH</i>	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos Secundários	13
3 CASUÍSTICA E DESENHO DO ESTUDO	14
4 METODOLOGIA	18
4.1 Extração de DNA	18
4.2 Detecção de alterações pontuais em <i>MUTYH</i> por NGS-amplicon	18
4.3 Sequenciamento Completo do <i>MUTYH</i>	20
4.4 PCR multiplex ampliada do <i>MUTYH</i>	21
4.5 PCR Alelo-Específica.....	22
4.6 Análise de Perda de Heterozigose (LOH)	23
4.7 Detecção de alterações pontuais em <i>KRAS</i> e <i>PIK3CA</i> por NGS-amplicon	23
4.8 Reclassificação de VUS.....	24
4.9 Coleta de dados e análises estatísticas.....	25
5 RESULTADOS.....	26

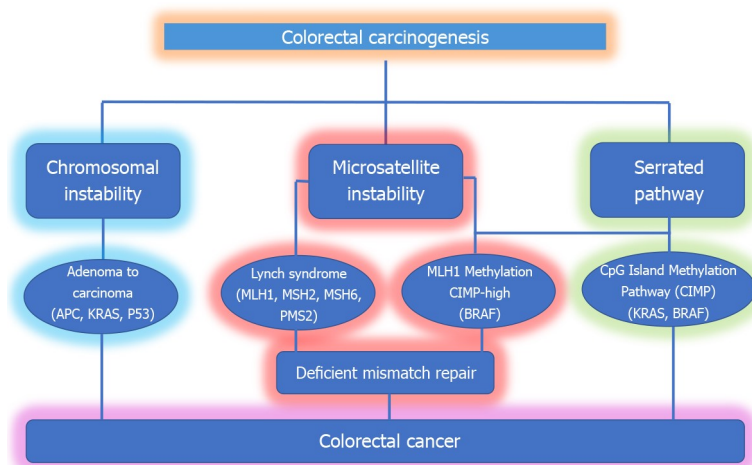
5.1	Características clínicas e anatomopatológicas da coorte geral.....	26
5.2	Detecção de variantes patogênicas em <i>MUTYH</i> em pacientes com CCR e <i>KRAS</i> -G12C	28
5.3	Comparação das características clínicas observadas entre pacientes com VGPs e sem VGPs em <i>MUTYH</i>	35
5.4	Avaliação de <i>KRAS</i> -G12C e <i>PIK3CA</i> -Q546K em adenomas e adenocarcinomas de pacientes MAP	43
5.5	Análise de variantes de significado incerto (VUS) em <i>MUTYH</i>	47
6	DISCUSSÃO	52
6.1	Taxa de detecção de VGPs em <i>MUTYH</i> em pacientes com CCR e <i>KRAS</i> -G12C	52
6.2	Dados clínicos e anatomopatológicos de pacientes com e sem VGPs em <i>MUTYH</i>	55
6.3	Inibidores de <i>KRAS</i> -G12C e Imunoterapia em pacientes MAP	58
6.4	Pacientes monoalélicos	60
6.5	Frequência de <i>KRAS</i> -G12C e <i>PIK3CA</i> -Q546K e reclassificação de VUS.....	61
7	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXOS	75
	APÊNDICES	81

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Colorretal e Síndromes de Predisposição Hereditária relacionadas

O câncer colorretal (CRC) é responsável por aproximadamente 11% de todos os cânceres diagnosticados e que levam à morte em todo o mundo. No Brasil, especificamente, a estimativa é de 704 mil novos casos para o triênio de 2023 a 2025, e desconsiderando o câncer de pele não melanoma, o CCR é o terceiro mais frequente no país. (Santos et al. 2023; Murphy, Zaki, 2024). Seu desenvolvimento normalmente se inicia a partir de uma lesão precursora neoplásica denominada pólipos, o qual, por sua vez, se origina a partir do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em oncogenes e genes supressores de tumor (GST) em células-tronco da base das criptas colônicas. Os pólipos podem progredir para um carcinoma devido ao processo de acúmulo de novas alterações genéticas, o qual leva cerca de 10 a 15 anos para ocorrer. Ademais, os pólipos podem ser de vários tipos, incluindo adenomatosos, serrilhados, entre outros (Dekker et al. 2019).

A via mais comum (cerca de 70% dos casos) de desenvolvimento do CCR, denominada via adenoma-carcinoma ou via de instabilidade cromossômica (CIN), é caracterizada pela presença de pólipos adenomatosos principalmente no lado esquerdo do cólon, os quais são de formato peduncular. Eles surgem como resultado de anomalias cromossômicas estruturais e numéricas, geralmente ocasionadas por mutações de perda de função no GST *APC* seguidas por mutações secundárias nos oncogenes *KRAS*, *PIK3CA* e *SMAD4* ou no GST *TP53*. A segunda via mais comum (10-20%) é a via serrilhada, também chamada de via do fenótipo de metilação de ilhas CpG (CIMP), caracterizada pela presença de pólipos serrilhados/*flats* principalmente no lado direito do cólon. Essa via é geralmente definida por instabilidade epigenética e mutações ativadoras nos oncogenes *BRAF* ou *KRAS*. Por fim, a via mais incomum (2-15%) de carcinogênese colorretal é a via da instabilidade de microssatélites (MSI). Em casos esporádicos, a via geralmente se inicia com uma mutação somática no gene *BRAF* ou com o silenciamento epigenético no promotor do gene *MLH1*, pertencente à via de reparo de malpareamento (*mismatch repair* – MMR) e levando à MSI; em casos germinativos, variantes germinativas patogênicas (VGP) nos genes MMR são as responsáveis pelo fenótipo de MSI (**Figura 1**) (Dekker et al. 2019; Aiderus, Barker, Tergaonkar, 2024; Pierantoni, Cosentino, Ricciardiello, 2024).



Fonte: Leowattana W, Leowattana P, Leowattana T., 2023.

Figura 1. Vias de desenvolvimento do câncer colorretal.

Legenda: A figura mostra as três vias responsáveis pelo desenvolvimento do câncer colorretal: a via de instabilidade cromossômica, também conhecida como via adenoma-carcinoma; a via de instabilidade de microsatélites; e a via serrilhada.

Por ser um câncer de desenvolvimento lento, o rastreamento preventivo em busca de lesões precursoras ou a detecção em estágios iniciais para os casos em que o câncer já se estabeleceu garantem altas chances de cura. Sinais e sintomas clínicos como o relato de sangue nas fezes, mudanças no hábito intestinal, anemia e dor abdominal chamam a atenção dos clínicos para realizar exames específicos. Atualmente, as abordagens mais utilizadas e recomendadas incluem o teste de sangue oculto nas fezes realizado por imunoquímica fecal e o rastreamento por colonoscopia, o qual possibilita a remoção dos pólipos em muitos casos. Este último, infelizmente, por ser um teste invasivo, com necessidade de preparo e com risco de sangramento e perfuração intestinal, é realizado abaixo do recomendado. Caso a colonoscopia seja realizada de forma incompleta ou inadequada, a tomografia computadorizada pode ser uma alternativa. Após o diagnóstico, o tratamento pode ser feito de forma cirúrgica, por quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e outros (Dekker et al. 2019; Brenner et al. 2024).

Há vários fatores de risco associados ao seu desenvolvimento, incluindo gênero, idade avançada, dieta e hereditariedade, sendo a última responsável por 20 a 30% dos casos e podendo estar associada a genes de predisposição ao câncer bem definidos ou não (Dekker et al. 2019). Estima-se que 5 a 10% dos casos tenham relação com genes de predisposição ao câncer e síndromes genéticas, tais como a Síndrome de Lynch (SL), Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e sua forma atenuada (AFAP), Polipose Associada ao *MUTYH* (MAP),

Síndrome de Peutz-Jeghers, Polipose Juvenil e Síndrome de Cowden. As síndromes hereditárias não associadas a poliposes, como a SL, são as mais comuns relacionadas ao câncer colorretal hereditário, e possuem, em grande parte, um padrão de herança autossômico dominante. Já as síndromes hereditárias que cursam com fenótipo de polipose (com 10 pólipos ou mais) variam em relação ao seu padrão de herança. O exemplo mais conhecido é a FAP, síndrome autossômica dominante causada por VGPs no gene *APC* e caracterizada pela presença de mais de 100 pólipos adenomatosos; a AFAP, por sua vez, é considerada uma forma atenuada da FAP pela presença relativamente menor de pólipos, variando de 10 a 100, e sendo clinicamente confundida com a MAP, síndrome autossômica recessiva a ser detalhada na próxima seção (Wells, Wise, 2017; Ma et al. 2018).

1.2 Polipose Associada ao *MUTYH* (MAP)

1.2.1 Definição e descoberta

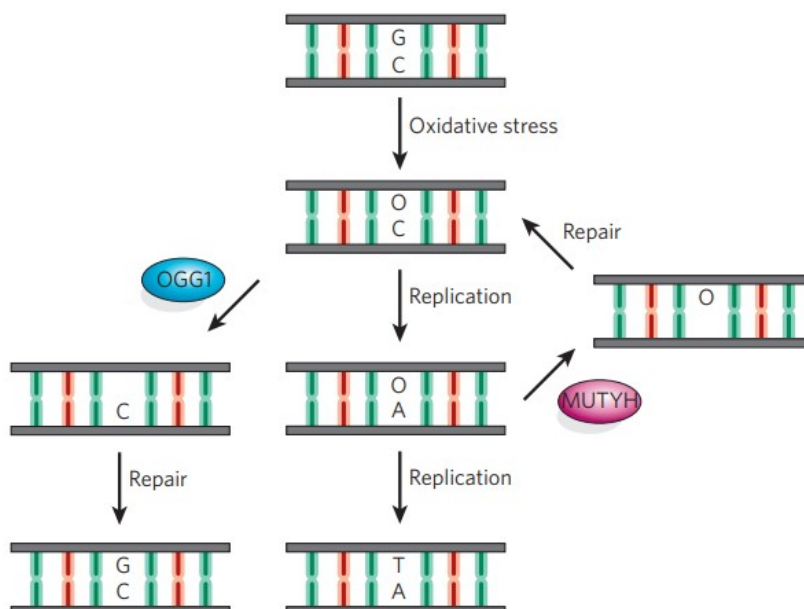
A Polipose Associada ao *MUTYH* ou MAP é uma síndrome de predisposição ao CCR responsável por 0,7% de todos os CCR e 13% de todas as poliposes colorretais, possuindo uma herança autossômica recessiva e sendo causada pela inativação bialélica do gene *MUTYH*, o qual codifica uma DNA-glicosilase atuante no sistema de reparo por excisão de bases (BER) do DNA (Aimé et al. 2015). Não há estimativas definidas em relação à frequência de bialélicos na população geral, apenas na caucasiana (0,01-0,04%); porém, propõe-se que essa frequência esteja entre 1:20.000 e 1:60.000, considerando a frequência conhecida de 1-2% de heterozigotos para *MUTYH* (Win et al. 2016; Barreiro et al. 2022). A síndrome foi definida em 2002, quando Al Tassan e colaboradores (2002) avaliaram uma família britânica em que três irmãos apresentavam múltiplos pólipos e um havia falecido de CCR, porém, sem VGPs no gene *APC*. O sequenciamento germinativo dos irmãos evidenciou duas VGPs em heterozigose (NM_001128425.2:c.1187G>A; p.Gly396Asp e NM_001128425.2:c.536A>G; p.Tyr179Cys) no gene *MUTYH*, enquanto os familiares não afetados eram heterozigotos para apenas uma das duas variantes, sugerindo a herança autossômica recessiva.

1.2.2 Gene *MUTYH* e Sistema de Reparo por Excisão de Bases (BER)

Ao sequenciamento somático dos adenomas e adenocarcinomas da família estudada por Al Tassan et al. (2002), evidenciaram-se 15 de 18 mutações somáticas com transversão

G:C → T:A, incomuns em CCR esporádico e na FAP. Essas transversões características da MAP ocorrem pelo papel que o *MUTYH* desempenha no sistema BER. Esta via é responsável por reparar danos oxidativos, de desaminação, alquilação e outros principalmente durante a fase G1 do ciclo celular. O reparo é feito por glicosilases de DNA, enzimas que excisam bases modificadas específicas ao hidrolisarem ligações N-glicosídicas entre a base danificada e o açúcar, deixando um sítio apurínico/apirimidínico ou uma quebra de DNA fita simples (Talhaoui et al. 2017; Chatterjee, Walker, 2017).

No caso do erro reparado pelo *MUTYH*, o estresse oxidativo, causado por espécies reativas de oxigênio geradas por exposição ambiental ou durante processos do metabolismo celular, pode ocasionar danos no material genético levando à formação de bases estáveis 8-oxo-guanina (8-oxoG), as quais se pareiam às citosinas. Posteriormente, durante a replicação, as citosinas são substituídas por adeninas. A glicosilase de *MUTYH* atua no reparo removendo a adenina, em conjunto com outras glicosilases (como *OGG1* e *MTH1*), que fazem o reparo por meio da excisão e hidrólise de 8-oxoG. Porém, quando o *MUTYH* está mutado, a timina permanece no local da guanina e, assim, geram-se as transversões G:C → T:A (**Figura 2**), as quais afetam todo o genoma, inclusive genes *driver* importantes para a carcinogênese colorretal (David, O'Shea, Kundu, 2007; Talhaoui et al. 2017).



Fonte: David, O'Shea, Kundu, 2007.

Figura 2. Esquema do Sistema de Reparo por Excisão de Bases (BER).

Legenda: Esquema demonstrando o reparo realizado por alguns genes envolvidos no sistema BER. O *MUTYH*, particularmente, remove as adeninas erroneamente pareadas às 8-oxo-guaninas para que outras proteínas as retirem, reparando o dano.

Grande parte das variantes patogênicas encontradas no gene *MUTYH* é do tipo *missense*, sendo uma minoria as variantes que afetam *splicing* ou as do tipo truncadoras. Em 2011, o estudo de Torrezan et al. identificou a primeira grande deleção genômica NM_001128425.2:c.[348 + 33_*64 + 146del4285insTA] envolvendo os éxons 4 a 16 do gene *MUTYH*, a qual também foi detectada, no mesmo ano, em uma paciente de um estudo francês (Rouleau et al. 2011). Duas variantes consideradas fundadoras, p.Gly396Asp e p.Tyr179Cys, são de origem caucasiana e já foram encontradas em pacientes MAP em estudos de diversos países, incluindo o Brasil. O estudo de Esperon et al. (2024), o primeiro a caracterizar o espectro de VGPs em *MUTYH* em oito centros da América Latina (incluindo dois localizados em São Paulo), mostrou que essas variantes foram encontradas em 55% e 23%, respectivamente, sendo as mais representadas, seguidas pela variante NM_001128425.2:c.1147del; p.Ala385fs, com quase 5%. As outras variantes geralmente apresentam frequências distintas a depender da população estudada (Al Tassan et al. 2002; Torrezan et al. 2013; Yamaguchi et al. 2014).

1.2.3 Apresentação clínica

A MAP é considerada uma polipose atenuada por apresentar, na maioria dos casos, de 10 a 100 pólipos, sendo adenomas tubulares (mais frequentes), túbulo-vilosos, pólipos hiperplásicos, mistos e sésil-serrilhados, com tumores acometendo mais frequentemente o cólon direito (52%) ou o reto (26%) (Kantor et al. 2017; Aelvoet et al. 2022; Zaffaroni et al. 2024). No Brasil, pacientes com fenótipo de polipose ou que sejam irmãos de pacientes com VGP sabidamente conhecida em *MUTYH* possuem direito de realização do teste genético de linhagem germinativa (ANS, 2021); porém, alguns pacientes MAP desenvolvem CCR na ausência de polipose e/ou história familiar de polipose ou CCR, o que torna o fenótipo dessa síndrome extremamente variável e muitas vezes apresentando-se como um caso esporádico, dificultando o seu diagnóstico. A falta de diagnóstico precoce é alarmante, principalmente porque os pacientes MAP são caracterizados por um risco muito aumentado de CCR ao longo da vida (em torno de 50% aos 60 anos de idade, sendo a idade média de aparecimento do câncer 50 anos), o qual aumenta para 80%-90% quando não há rastreamento preventivo (Curia, Catalano, Aceto, 2020; Nielsen, Infante, Brand, 2021; Aelvoet et al. 2022).

O manejo clínico pode se basear apenas na polipectomia, principalmente para os pacientes com fenótipo mais brando. Essa técnica é comumente associada à colonoscopia e geralmente o rastreio é iniciado em pacientes MAP entre 25 e 30 anos, com intervalos de 2

em 2 anos; o *guideline* britânico, em contrapartida, indica o início do rastreio entre 18 e 20 anos, sendo repetido anualmente, mas ressalta que a polipectomia pode não ser eficaz por conta da carcinogênese acelerada da MAP e risco de desenvolvimento de CCR mesmo sob vigilância. Quando há presença de múltiplos pólipos maiores que 10mm e/ou displásicos de alto grau e/ou um rápido aumento no número de pólipos, normalmente, a recomendação médica é a colectomia, com extensões variadas a depender do quadro clínico do paciente. Ademais, mesmo após a cirurgia, lesões metacrônicas no cólon, reto e duodeno não são incomuns, fazendo-se necessário a vigilância contínua (Nielsen, Infante, Brand, 2021; Aelvoet et al. 2022; Zaffaroni et al. 2024).

Apesar de a síndrome estar altamente relacionada com CCR, a retirada de pólipos no duodeno pela endoscopia também deve ser feita, já que cerca de 20-35% de indivíduos MAP apresentam pólipos nessa região e existe um risco estimado de 1,5% de desenvolvimento de câncer no duodeno. Indica-se que o rastreio deva iniciar entre 30 e 35 anos, com intervalos entre 3 meses a 4 anos a depender da classificação de Spigelman; todavia, a eficácia preventiva ainda é incerta (Nielsen, Infante, Brand, 2021; Zaffaroni et al. 2024; NCCN, 2024). Em relação a outros cânceres, apesar de estudos anteriores terem identificado aumento de risco ou incidência principalmente para câncer de bexiga e ovário, os dados são insuficientes para justificar um rastreamento personalizado (Vogt et al. 2009; Win et al. 2016). O *guideline* mais recente da *National Comprehensive Cancer Network (NCCN): Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal guidelines 2024.3*, por exemplo, não indica nenhum tipo de vigilância adicional além da colonoscopia e endoscopia discutidas anteriormente. Irmãos de indivíduos afetados possuem 50% de chance de serem monoalélicos e 25% de chance de possuírem ou não a síndrome; caso não sejam testados, é recomendado seguir o acompanhamento multidisciplinar indicado para pacientes MAP (Nielsen, Infante, Brand, 2021). Os casos de pacientes com apenas uma VGP em *MUTYH* (monoalélicos) serão discutidos na seção a seguir.

1.3 Portadores Monoalélicos

Indivíduos monoalélicos para *MUTYH* representam cerca de 1-2% dentro de populações caucasianas, possuindo principalmente as variantes p.Tyr179Cys e p.Gly396Asp (Aelvoet et al. 2022). Apesar de não apresentarem MAP, os estudos divergem em relação ao risco de desenvolvimento de CCR e outros cânceres. O primeiro estudo a avaliar uma grande coorte para estimar o risco de cânceres extracolônicos em pacientes monoalélicos para

MUTYH foi o de Win et. al (2016). Neste estudo, foram analisados casos diagnosticados com CCR de registros populacionais de câncer e indivíduos de famílias com múltiplos casos de câncer do *Colon Cancer Family Registry* (CCFR). Foram identificados 2.237 pacientes monoalélicos, dentre os quais 363 foram confirmados e 1.874 foram estimados. Houve aumento do risco até os 70 anos para os cânceres de estômago (HR = 9,3%; IC 95% 6,7-13) e fígado (HR = 4,5%; IC 95% 2,7-7,5), além de um discreto aumento para endométrio (HR = 2,1%; IC 95% 1,1-3,9) e mama (HR = 1,4%; IC 95% 1-2). Em contrapartida, o estudo de Fulk et al. (2019), por exemplo, ao comparar 541 pacientes monoalélicos para *MUTYH* em 30.456 casos de câncer de mama com controles sem histórico familiar e pessoal de câncer, não identificou associação. De maneira semelhante, Thompson et al. (2022), ao coletarem retrospectivamente dados de painel genético e compararem 500 monoalélicos com CCR, mama e/ou endométrio com controles sem câncer do *Genome Aggregation Database* (gnomAD), não identificaram associação com nenhum dos três cânceres.

Uma das maiores coortes pan-câncer estudadas até o momento analisou dados germinativos de 224 pacientes monoalélicos para *MUTYH* em uma coorte de 10.389 pacientes com câncer do *The Cancer Genome Atlas Program* (TCGA), comparando-os com 1.695 indivíduos monoalélicos da coorte de 118.479 indivíduos do gnomAD. Eles demonstraram que pacientes monoalélicos possuem um risco relativo maior, ainda que baixo, principalmente para adenocarcinoma adrenal (RR = 4,55%; IC 95% 1,74-11,9; p valor = 0,012), o qual foi correlacionado com eventos de LOH tumoral e a presença das assinaturas mutacionais SBS18 e SBS36 (detalhadas na seção a seguir). Outros cânceres com aumento de risco relativo identificado incluem carcinoma esofágico (RR = 3,4%; IC 95% 1,54-0,48; p valor = 0,009), sarcoma (RR = 2,4%; IC 95% 1,09-5,32; p valor = 0,04), adenocarcinoma de próstata (RR = 2,1%; IC 95% 1,14-3,89; p valor = 0,032) e carcinoma renal de células claras (RR = 1,96; IC 95% 1,06-3,62; p valor = 0,047) (Barreiro et al. 2022). Outro grande estudo pan-câncer realizado por Paller et al. (2024) utilizou um algoritmo validado para inferir o status germinativo do *MUTYH* (monoalélico ou bialélico) em uma coorte de 354.366 tumores do Foundation Medicine que haviam sido previamente submetidos a um perfil genômico abrangente. Foram identificadas 5.982 amostras monoalélicas, das quais 5.244 sem LOH e 738 com LOH do alelo selvagem. Quando comparado à frequência de variantes germinativas monoalélicas em *MUTYH* em CCR e na coorte geral (em torno de 2%), os tumores a seguir apresentaram uma porcentagem maior de alterações monoalélicas no gene: tumores de células das ilhotas pancreáticas (3,3%), glândula adrenal (3,0%), medular de tireoide (2,4%), timo (2,3%), células germinativas (3,0%), carcinoides (2,9%), intestino delgado (2,6%) e sarcomas

ósseos (2,2%). Os tumores de células das ilhotas pancreáticas e glândula adrenal, particularmente, foram os que apresentaram maior prevalência de LOH e score da SBS18.

Apesar das evidências até o momento, os dados variam consideravelmente e os *guidelines* da NCCN 2024.3 não apontam risco aumentado para CCR e outros, indicando rastreamento equivalente ao realizado para a população geral, exceto para pacientes com histórico familiar pessoal ou de primeiro grau de CCR ou pólipos (os quais devem iniciar o rastreamento por colonoscopia com 40 anos ou 10 anos antes do diagnóstico do(s) parente(s) de primeiro grau).

1.4 Fenótipos tumorais

1.4.1 Assinaturas mutacionais SBS18 e SBS36

As transversões G:C → T:A em diversos genes ocasionadas pela inativação bialélica do gene *MUTYH* acaba gerando o que chamamos de assinaturas mutacionais. As assinaturas mutacionais são definidas como um padrão específico de mutações no genoma gerado por diversos processos endógenos e exógenos, incluindo processos de dano, modificação, replicação e reparo de DNA, os quais ocorrem durante toda a vida de um indivíduo. Sua relevância tem aumentado nos últimos anos, em particular na área oncológica, já que as mutações presentes no tumor podem ser utilizadas a fim de fornecer informações sobre a etiologia tumoral e identificar processos mutagênicos, atuando como biomarcadores e preditores de terapia. Além disso, a diminuição contínua dos custos das tecnologias de sequenciamento e a ampliação do desenvolvimento de algoritmos e *pipelines* de bioinformática que facilitam a análise de dados propiciam uma aplicação ainda maior das assinaturas mutacionais (Van Hoeck et al. 2019; Alexandrov et al. 2020).

Os tipos de mutações que geram as assinaturas incluem substituições de base única (SBS) e dupla (DBS), pequenas inserções e deleções (ID), variações estruturais (SV), alterações no número de cópias (CN) e substituições de base única no RNA (RNA-SBS), sendo que múltiplas assinaturas mutacionais podem estar sobrepostas no genoma de um único câncer (Alexandrov et al. 2020). Para MAP, as assinaturas mutacionais específicas dominantes são a SBS18 e a SBS36, as quais aparecem em alta frequência em tumores de portadores bialélicos e em uma menor frequência em monoalélicos, enquanto são raras em pacientes com *MUTYH* selvagem (Disel et al. 2024). A SBS18 foi identificada pela primeira vez no estudo de Alexandrov et al. (2013) e relacionada experimentalmente a danos por espécies reativas de oxigênio no estudo de Kucab et al (2019). A SBS36, por sua vez, foi

MAP, inclusive sendo relatados três estudos de caso em que três pacientes demonstraram respostas completas ou sem progressão de doença após submissão às imunoterapias com nivolumab e pembrolizumab. Estes dados ainda são pouco explorados e muito recentes, necessitando de maior investigação (Volkov et al. 2020; Mathias-Machado et al. 2023; Disel et al. 2024).

1.4.2 Associação com *KRAS*-G12C e *PIK3CA*-Q546K

Embora as transversões G:C → T:A ocorram em todo o genoma em decorrência da deficiência de *MUTYH*, na mucosa intestinal elas levam ao enriquecimento de clones de células contendo principalmente mutações específicas no oncogene *KRAS* e em outros GSTs importantes para a carcinogênese do CCR, como o *APC* (Aelvoet et al. 2022). O *KRAS* pertence a uma família de proteínas da classe GTPase chamada Ras, responsável por transmitir sinais dentro das células que controlam a proliferação e sobrevivência celular. O gene é um dos primeiros a sofrerem mutação na via adenoma-carcinoma, além de ser um dos principais mutados em CCR metastático (cerca de 40% dos casos), sendo que a maioria das mutações é ativadora e ocorre nos códons 12, 13 e 61 (Walther et al. 2009; Chong et al. 2022). Mutações nesses três códons comprometem a capacidade de hidrólise do GTP ligado a Ras, fazendo com que a via fique constitutivamente ativa. Em tumores de pacientes MAP, a mutação encontrada com maior frequência (>80%) é a NM_004985.5:c.34G>T; p.G12C, a qual confere ganho de função ao gene e é rara (2-3%) em pacientes com CCR sem o *MUTYH* mutado (van Puijenbroek et al. 2008; Georgeson et al. 2022).

Esse contraste levantou a hipótese de que a mutação *KRAS*-G12C poderia atuar como um biomarcador barato e acessível para direcionar a realização do teste germinativo do *MUTYH*, e, assim, aumentar a taxa de detecção de pacientes MAP, já que diversos painéis para CCR incluem o *KRAS* e são utilizados na rotina clínica para predizer a resposta do paciente à terapia de antagonistas do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR). Até o momento, os estudos que avaliaram a taxa de detecção da MAP dentro de coortes *KRAS*-G12C obtiveram valores entre 3-25%, resultados expressivos quando comparados à representação de 0,7% da MAP dentre todos os casos de CCR (van Puijenbroek et al. 2008; Aimé et al. 2015; Yanus et al. 2018; Volkov et al. 2020; Georgeson et al. 2022; Imyanitov et al. 2022).

Porém, apesar de que se tenha sugerido o uso do *KRAS*-G12C como biomarcador para identificação de pacientes com MAP, ainda não ocorreu uma ampla adoção dessa abordagem.

Por exemplo, nenhuma das diretrizes atuais da *European Society for Medical Oncology* (ESMO), da *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) e NCCN para triagem de risco de câncer colorretal hereditário recomenda testar o gene *MUTYH* em pacientes com essa mutação somática. Além disso, mesmo que as diretrizes da NCCN recomendem considerar a solicitação de testes genéticos para todos os casos diagnosticados de CCR, a realidade da maioria dos países de baixa e média renda não sustentaria essa abordagem. Dessa forma, a presença da variante *KRAS-G12C* poderia ser útil para direcionar a realização do sequenciamento de *MUTYH* e proporcionar o diagnóstico de MAP, levando a tratamentos adequados e ao aconselhamento multidisciplinar de familiares (Aimé et al. 2015; Terlouw et al, 2020; Gomes et al. 2021).

O gene *PIK3CA* codifica a subunidade catalítica alfa de PI3K e está relacionado com a proliferação celular, atuando em conjunto com *KRAS* na regulação da via de sinalização a jusante do EGFR. O gene está mutado em cerca de 10-20% dos casos em uma variedade de cânceres, sendo os principais o de mama, endométrio e colorretal, sendo que as mutações geralmente estão presentes nas cinco regiões *hotspots* R88, E542, E545, Q546 e H1074 (Lech et al. 2016; Voutsadakis, 2021). Em CCR metastático, particularmente, as mutações observadas com maior frequência são a H1047R (9,8%), E545K (9,2%) e E542K (9,0%) (Yasin et al. 2024). Recentemente, Georgeson et al. (2022) estudaram uma coorte de mais de 5.600 CCRs e demonstraram que, além da alta frequência de *KRAS-G12C* em MAP, a mutação NM_006218.4:c.1636C>A; p.Q546K também aparece em alta frequência, estando presente em 37% dos CCRs MAP em comparação à 0,7% dos CCRs controles. Este foi o primeiro estudo a destacar *PIK3CA-Q546K* como biomarcador da MAP. Ademais, o estudo de Georgeson et al. (2022) também demonstrou que a presença de *KRAS-G12C* e/ou *PIK3CA-Q546K* resulta em uma sensibilidade de 89,5% (área sob a curva = 0,932) para detectar pacientes MAP, com ambas relacionadas à presença das assinaturas mutacionais SBS18 e SBS36 nos seus adenocarcinomas. Por conta disso, o estudo sugeriu a utilização dessas duas mutações em abordagens de classificação de variantes de significado incerto (VUS) em *MUTYH* no cenário clínico.

1.4.3 Reclassificação de variantes de significado incerto (VUS) em *MUTYH*

A classificação de variantes germinativas em genes de doenças mendelianas é feita com base em uma variedade de critérios definida por um grupo de especialistas da *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG), da *Association for Molecular*

Pathology (AMP) e do *College of American Pathologists* (CAP), além de recomendações de *experts* do *Clinical Genome Resource* (ClinGen) (Richards et al. 2015). Os chamados critérios ACMG/AMP envolvem a análise de dados funcionais, computacionais, frequência populacional, segregação familiar e outros sobre a variante em questão para chegar a uma classificação final das variantes em uma de cinco classes: benignas (B), provavelmente benignas (PB), variantes de significado incerto (VUS), provavelmente patogênicas (PP) ou patogênicas (P). As VUS são variantes que não preenchem critérios específicos que permitam classificá-las em uma das demais classes, ou que apresentam informações conflitantes. Com a introdução de painéis multigênicos, sequenciamento de exoma e sequenciamento de genoma completo, o número de variantes identificadas por pessoa aumentou progressivamente; em paralelo, mais VUS passaram a ser identificadas. Essas variantes são comunicadas aos pacientes, porém, não possuem valor clínico para direcionar a tomada de decisões médicas ou indicar a necessidade de se realizar testes preditivos em membros da família (Richards et al. 2015; Morales, Hershberger, 2018; Fatkin, Johnson, 2020).

Estudos que reportam VUS em homozigose ou em heterozigose composta com uma variante patogênica em casos suspeitos de MAP buscam maneiras de reclassificar essas variantes e garantir o diagnóstico correto dos pacientes (Ricci et al. 2017; Kidambi et al. 2018; Picanço-Albuquerque et al. 2022). A reclassificação proposta por Georgeson et al. (2022) utilizando a presença de *KRAS*-G12C e/ou *PIK3CA*-Q546K no tecido tumoral poderia ser feita por meio da aplicação do critério específico PP4, o qual é aplicado quando o fenótipo ou história familiar do paciente são altamente específicos para uma doença com uma etiologia genética única (Richards et al. 2015). Ainda, novas recomendações em andamento do *ClinGen InSiGHT Hereditary Colorectal Cancer/Polyposis Variant Curation Expert Panel* reforçam essa ideia, uma vez que sugerem que características fenotípicas tumorais, incluindo *KRAS*-G12C, sejam consideradas como evidência de patogenicidade; dessa forma, a depender de outros critérios que também possam ser aplicados, variantes VUS em *MUTYH* poderiam ser, portanto, reclassificadas (Walsh et al. 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a taxa de detecção de variantes germinativas patogênicas/provavelmente patogênicas (VGPs) no gene *MUTYH* em pacientes com câncer colorretal e mutação somática *KRAS*-G12C.

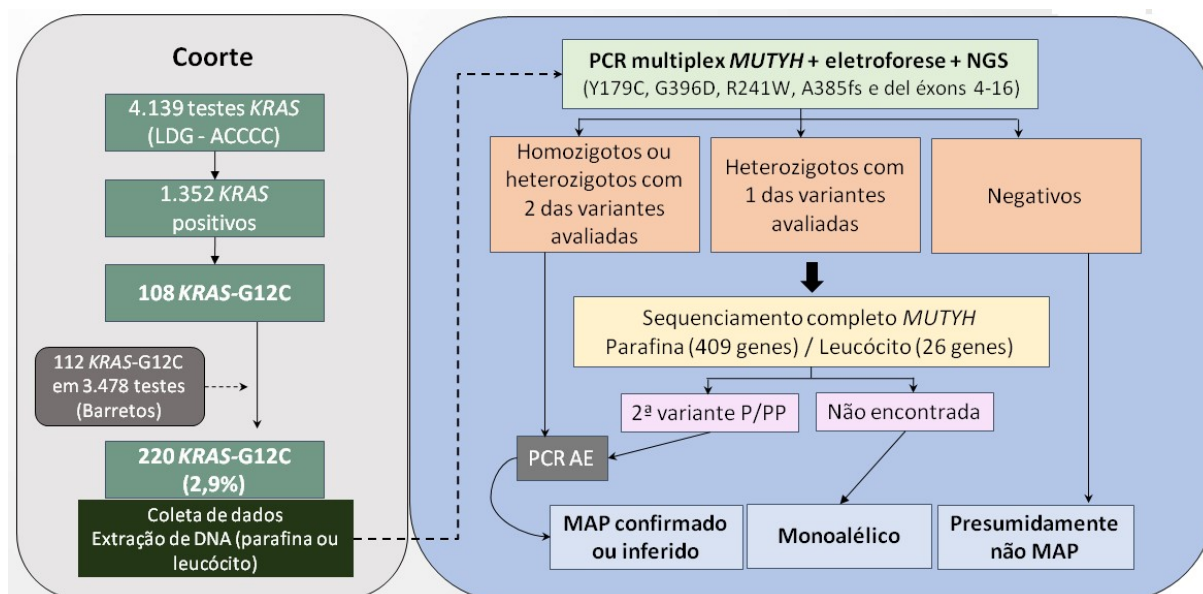
2.2 Objetivos Secundários

- 1) Avaliar a frequência das variantes germinativas p.Tyr179Cys, p.Gly396Asp, p.Arg241Trp, p.Ala385fs e deleção dos éxons 4 a 16 do gene *MUTYH* em pacientes com câncer colorretal e mutação somática *KRAS* G12C;
- 2) Realizar o sequenciamento completo do gene *MUTYH* em portadores monoalélicos das variantes avaliadas;
- 3) Comparar aspectos clínicos e anatomopatológicos entre pacientes bialélicos, monoalélicos e sem VGPs em *MUTYH*;
- 4) Avaliar a utilidade de investigar *KRAS*-G12C e *PIK3CA*-Q546K em tecidos de adenomas e câncer colorretal para classificar variantes de linhagem germinativa de significado incerto em *MUTYH*.

3 CASUÍSTICA E DESENHO DO ESTUDO

Para os objetivos 1 a 3, pacientes acima de 18 anos, portadores de câncer colorretal e mutação somática *KRAS*-G12C foram selecionados através de busca no banco de dados interno do Laboratório de Diagnóstico Genômico (LDG) do A.C. Camargo Cancer Center (ACCCC) e através de parceria com o Hospital de Amor (Barretos - SP), em colaboração com o Dr. Rui Reis. De 4.139 testes *KRAS* realizados no ACCCC, 1.352 eram positivos, dos quais 108 eram *KRAS*-G12C. Em Barretos, de 3.478 testes *KRAS* realizados, 112 foram identificados como *KRAS*-G12C, totalizando, portanto, 220 pacientes elegíveis (2,9%). Foram excluídos indivíduos sem material biológico disponível para análise. A **Figura 4** sintetiza as coortes avaliadas e o desenho experimental do estudo.

Resumidamente, coletamos os dados clínicos e anatomopatológicos dos 220 pacientes *KRAS*-G12C e solicitamos a extração de DNA dos seus materiais de leucócito e/ou parafina. Posteriormente, esses materiais foram submetidos à PCR multiplex das cinco variantes mais comuns no Brasil (p.Tyr179Cys, p.Gly396Asp, p.Arg241Trp, p.Ala385fs e deleção dos éxons 4-16), além de eletroforese para verificação das bandas e sequenciamento de nova geração (NGS) dos amplicons. Por fim, os pacientes seguiram um dos três fluxos possíveis: 1. Quando os pacientes eram homozigotos ou heterozigotos com duas das variantes avaliadas, avaliamos a disponibilidade de material para a realização de PCR alelo-específica (PCR-AE) a fim de confirmar a MAP, e quando não foi possível realizá-la, inferimos a MAP. 2. Para pacientes heterozigotos com uma das variantes avaliadas, realizamos o sequenciamento completo do *MUTYH*: quando uma segunda VGP foi detectada, seguimos como no fluxo 1; quando outra VGP não foi detectada, classificamos o paciente como monoalélico. 3. Para pacientes negativos para as cinco variantes analisadas, presumimos que não possuem MAP. Mais detalhes sobre a metodologia utilizada estão disponíveis no capítulo 4.



Fonte: Autoria própria.

Figura 4. Fluxograma da seleção da coorte e das análises referentes aos objetivos geral e secundários 1 a 3.

Legenda: LDG = Laboratório de Diagnóstico Genômico; ACCCC = A.C.Camargo Cancer Center; PCR = Reação em cadeia da polimerase; NGS = Sequenciamento de Nova Geração; PCR AE = PCR alelo-específica; P = Patogênica; PP = Provavelmente patogênica; MAP = Polipose Associada ao *MUTYH*. Transcrito utilizado para as variantes em *MUTYH*: NM_001128425.2.

Para o objetivo 4 do estudo, buscamos VUS em *MUTYH* em uma coorte de mais de 3.200 testes genéticos realizados em pacientes do ACCCC em risco de síndromes de câncer hereditário. A seleção dos pacientes foi feita revisando os bancos de dados de testes germinativos do Laboratório de Diagnóstico Genômico, de projetos anteriores do grupo, do Departamento de Oncogenética do ACCCC e por colaboração com os hospitais Haroldo Juaçaba – Instituto do Câncer do Ceará (CE) e Erasto Gaertner (PR). A **Figura 5** sintetiza o fluxo do estudo para esse objetivo específico. Resumidamente, selecionamos indivíduos com CCR e VUS em *MUTYH* em homozigose ou em heterozigose composta com uma variante patogênica heterozigota. Identificamos três pacientes com VUS candidatas e analisamos a presença de *KRAS*-G12C e *PIK3CA*-Q546K em pelo menos duas amostras por paciente (incluindo amostras de câncer colorretal e adenomas). Ainda, para confirmar a alta frequência das mutações *KRAS*-G12C e *PIK3CA*-Q546K em tumores de pacientes com MAP, avaliamos como grupo controle positivo a presença dessas mutações em tecidos de 16 pacientes já diagnosticados com MAP no ACCCC, comparando-os com um grupo controle negativo obtido da literatura recente (Georgeson et al. 2022; Walker et al. 2024). Após a detecção de

Os dados clínicos dos pacientes e histopatológicos dos tumores foram obtidos por consulta em prontuário eletrônico e armazenados de maneira anonimizada em banco de dados estruturado na plataforma REDCap. Os pacientes nos quais detectamos VGPs receberam o retorno dos resultados através de relatórios de pesquisa e em consulta de aconselhamento genético no Departamento de Oncogenética das duas instituições participantes. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) do A.C.Camargo Cancer Center / Fundação Antônio Prudente (nº 3153/21) e do Hospital de Amor de Barretos / Fundação Pio XII (CAAE 53067621.3.3001.5437).

4 METODOLOGIA

4.1 Extração de DNA

As extrações de DNA de tumor fresco, FFPE e leucócito foram realizadas no Biobanco dessa instituição, de acordo com os protocolos operacionais padrão estabelecidos. A integridade do DNA foi avaliada pelo equipamento TapeStation (Agilent) e a concentração pelo equipamento Qubit® com o uso do reagente QUANT-IT DNA HS assay kit (Life Technologies). As amostras foram identificadas por códigos padrão do Biobanco, garantindo sua anonimização. Além da extração realizada pelo Biobanco, quando disponível, foi utilizado DNA residual dos testes somáticos de *KRAS* feitos pelos Laboratórios de Diagnóstico Genômico do A.C.Camargo Cancer Center e do Hospital de Amor de Barretos.

A extração de DNA de saliva coletado para fins de confirmação de heterozigose composta por PCR alelo-específica foi feita na instituição com o uso do reagente prepIT-L2P (DNA Genotek), seguindo instruções do fabricante. A integridade do DNA foi avaliada pelo equipamento NanoDrop (ThermoFisher) e a concentração pelo equipamento Qubit® com o uso do reagente QUANT-IT DNA HS assay kit (Life Technologies). As amostras foram identificadas por códigos derivados do código padrão do Biobanco, garantindo sua anonimização.

4.2 Detecção de alterações pontuais em *MUTYH* por NGS-amplicon

Para a detecção das alterações germinativas em *MUTYH* p.Tyr179Cys, p.Gly396Asp, p.Arg241Trp, p.Ala385fs e deleção dos éxons 4 a 16 foi utilizada a metodologia de NGS de amplicons. Essas variantes foram selecionadas por serem as variantes mais frequentes na população brasileira e em pacientes MAP do Brasil (dados de testes genéticos internos; Torrezan et al. 2014; Esperon et al. 2024). Para isto, primers específicos para as regiões dessas alterações foram desenhados utilizando a ferramenta online Primer 3 (**Tabela 1**). Resumidamente, 20ng de DNA de leucócito ou tumor foram submetidos a reações de PCR multiplex com o kit Qiagen Multiplex PCR para gerar amplicons das regiões de interesse. As condições de ciclagem envolveram uma pré-incubação a 95°C por 5 minutos seguida por 40 ciclos de: desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 90 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Por fim, uma etapa de extensão final a 68°C por 10 minutos foi realizada.

Tabela 1. Variantes, iniciadores e tamanho dos amplicons utilizados na técnica de PCR multiplex do *MUTYH*.

Variante	Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>	Tamanho do amplicon (pb)
c.1187G>A; p.Gly396Asp (éxon 13)	5'GGCAGTGGCATGAGTAACAA3'	5'GACGGGAACCTCCACAGTC3'	112
c.536A>G; p.Tyr179Cys (éxon 7)	5'ACCCACAGGAGGTGAATCAA3'	5'CCAAGACTCCTGGGTTCCTA3'	120
c.721C>T; p.Arg241Trp (éxon 9)	5'GGTGTGGTGGATGGCAAC3'	5'CCCAACATCCTACCAGAGCT3'	105
c.1147del; p.Ala385fs (éxon 12)	5'AGCTCTGCCACCTGTGTTCT3'	5'GCCGATTCCCTCCATTCTCT3'	140
Deleção éxons 4-16	5'CAGAACCAAGCAGAACGTCA3'	5'GCCTGCTAAGCTGGTACGAC3'	188

Fonte: Autoria própria.

Legenda: pb = Pares de base. Transcrito utilizado: NM_001128425.2.

Após a confirmação de amplificação por análise em gel de agarose, 10 a 100ng do produto amplificado por PCR foi utilizado para a construção das bibliotecas de amplicon com o kit Ion Plus Fragment Library (ThermoFisher), de acordo com as instruções do fabricante. Para o sequenciamento, as etapas de PCR em emulsão, enriquecimento e deposição no chip de sequenciamento foram realizadas no equipamento Ion Chef (ThermoFisher). Por fim, o sequenciamento foi realizado na plataforma Ion S5 (ThermoFisher). Os resultados do sequenciamento foram analisados no TorrentSuite software e VariantCaller (ThermoFisher) e comparados com a versão do genoma GRCh37/Hg19. As variantes identificadas foram inspecionadas visualmente no software Integrative Genomics Viewer (IGV). Foram consideradas positivas amostras com variantes detectadas com pelo menos 30% do total de leituras.

4.3 Sequenciamento Completo do *MUTYH*

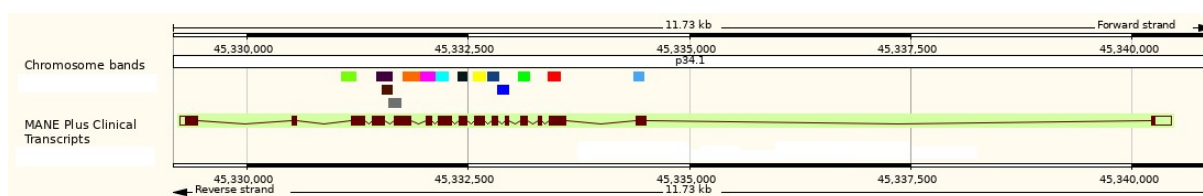
Pacientes nos quais detectamos apenas uma variante em heterozigose (alteração monoalélica) foram submetidos ao sequenciamento completo do gene *MUTYH* por sequenciamento de painel multigenes por NGS. Resumidamente, para o sequenciamento NGS, puderam ser utilizados dois painéis multigenes que contêm o gene *MUTYH*. Para as amostras com DNA extraído de leucócito, foi utilizado um painel de captura contendo 26 genes. Para as amostras com DNA apenas de parafina disponível, foi utilizado um painel de amplicons contendo 409 genes, já padronizado para avaliar esse tipo de DNA, que apresenta alto grau de degradação.

Para o painel de 26 genes, o DNA genômico foi fragmentado por digestão enzimática e ligado a adaptadores e barcodes. A captura das regiões alvo foi realizada através de hibridização com sondas biotiniladas para os 26 genes do painel (Painel HCS – Sophia Genetics), seguindo as recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado na plataforma NextSeq 500 ou MiniSeq (Illumina) e as análises no programa Sophia DDM (Sophia Genetics).

Para o painel de 409 genes, foi utilizado o painel comercial Comprehensive Cancer Panel (ThermoFisher), de 1.300kb, o qual abrange 409 oncogenes e genes supressores de tumor relacionados ao câncer, com 16.000 pares de primers distribuídos em quatro pools. A abordagem se baseia na amplificação da região codificadora dos genes alvo seguida de sequenciamento na plataforma Ion S5. Os resultados do sequenciamento foram analisados no TorrentSuite software e VariantCaller (ThermoFisher) e comparados com a versão do genoma GRCh37/Hg19. Por fim, os arquivos VCFs foram importados para o software VarSeq (Golden Helix) para anotações adicionais e filtragem de variantes. A classificação ACMG descrita das variantes encontradas foi obtida da anotação do banco ClinVar do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) no próprio VarSeq; quando a informação não estava disponível, a classificação final das variantes foi realizada considerando as recomendações iniciais da ACMG/AMP (Richards et al 2015) e publicações mais recentes do consórcio ClinGen.

4.4 PCR multiplex ampliada do *MUTYH*

Para os pacientes detectados com uma variante em heterogizose no sequenciamento multiplex e que não possuíam quantidade suficiente de material para a realização de painel genético (mínimo 40ng de DNA), bem como apresentavam impossibilidade de nova coleta, realizamos uma PCR multiplex ampliada contendo dez pares de primers previamente disponíveis em nosso laboratório que cobrem aproximadamente 57,8% da região codificadora do gene *MUTYH* (**Figura 6**). O protocolo e as condições de ciclagem foram os mesmos descritos para a seção 4.2. As regiões cromossômicas e éxons abrangidos, os primers utilizados e o tamanho dos amplicons gerados estão descritos na **Tabela 2**.



Fonte: Produzido no software Ensembl Genome Browser (<https://www.ensembl.org/index.html>)

Figura 6. Regiões e éxons abrangidos pelos iniciadores utilizados no sequenciamento multiplex e na PCR ampliada do gene *MUTYH*.

Legenda: A imagem demonstra as regiões que os primers (representados por retângulos coloridos) utilizados no sequenciamento multiplex inicial e na PCR ampliada abrangem em comparação às regiões dos 16 éxons do transcrito MANE Plus Clinical (NM_001128425.2) do gene *MUTYH*, representados por retângulos marrons. O gene é transcrito na fita reversa, e, portanto, o éxon 1 está localizado à direita da imagem.

Tabela 2. Iniciadores e tamanho dos amplicons utilizados na PCR multiplex ampliada do *MUTYH*.

Região cromossômica e éxon	Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>	Tamanho do amplicon (pb)
chr1:45334369-45334483 (éxon 2)	5'TGGGAAGTGGTCACAGGAAG3'	5'GGGCCACAACCTAGTTCCTT3'	115
chr1:45333407-45333543 (éxon 3)	5'AAGAGGTGGTATTGCAGGCC3'	5'GCCTACCCGTCTTCTCCATG3'	137
chr1:45333066-45333196 (éxon 5)	5'CATGACCCTTCCCTTCCTCC3'	5'TCCTCATGCCAACCCCTTTC3'	131

Con/Tabela 2. Iniciadores e tamanho dos amplicons utilizados na PCR multiplex ampliada do *MUTYH*.

chr1:45332825-45332960 (éxon 6)	5'GAAGTGGCCTACACTGCAG3'	5'GATTCACCTCCTGTGGGTAG3'	136
chr1:45332554-45332688 (éxon 8)	5'GGTGGTAGAGGAGCTAGGGG3'	5'GGGGTGGGCTGTGAGATC3'	135
chr1:45332132-45332277 (éxon 10)	5'GCCAGGAGATTTCAACCAAG3'	5'GGACTTCTCACTGCCCCCTTC3'	146
chr1:45331959-45332117 (éxon 11)	5'GCCCTATGACACTCAACCCT3'	5'AACTGGAATGGGGCTTCTGA3'	159
chr1:45331765-45331948 (éxon 12)	5'CCTGAGTAAGATTCTGCAGAAC3'	5'TTTCTGGGGAAGTTGACCAC3'	184
chr1:45331459-45331637 (éxon 13)	5'GGCAGTGGCATGAGTAACAA3'	5'AGCCCAACGCTGTAGTTCCT3'	179
chr1:45331062-45331229 (éxon 14)	5'ACGCAGGAGGAATTCACAC3'	5'GCAACAGAGCGATTCTCCG3'	168

Fonte: Autoria própria.

Legenda: pb = Pares de base. Transcrito utilizado: NM_001128425.2.

4.5 PCR Alelo-Específica

A metodologia de PCR alelo-específica (PCR-AE ou AS-PCR – *Allele-specific PCR*) ou ARMS (*Amplification refractory mutation system*) foi utilizada para confirmar a fase (*cis* ou *trans*) das variantes presentes em indivíduos bialélicos heterozigotos, ou seja, confirmar se as variantes estão em cromossomos distintos. Essa técnica se baseia na dependência da PCR do correto pareamento da extremidade 3' do oligo iniciador para que ocorra a síntese da fita complementar. Para isso, utilizam-se dois iniciadores diferentes, um deles apresentando a última base da extremidade 3' complementar a um dos nucleotídeos da alteração e o outro iniciador sendo complementar ao outro nucleotídeo possível.

Em uma amostra de um indivíduo heterozigoto, cada um dos alelos é amplificado apenas na reação contendo o iniciador que apresente o nucleotídeo complementar a este alelo. A amplificação preferencial de apenas um dos alelos em cada reação permite a comprovação de variantes bialélicas, também chamadas heterozigotas compostas, em síndromes recessivas. As condições da PCR-AE e do sequenciamento de seus amplicons foram as mesmas que as descritas acima para a PCR multiplex. As variantes para as quais foi realizada PCR alelo-

específica, bem como os primers utilizados e o tamanho dos amplicons gerados estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3. Variantes, iniciadores e tamanho dos amplicons utilizados na técnica de PCR alelo-específica.

Variante 1	Variante 2	ASP 1	ASP 2	CON	Tamanho do amplicon (pb)
c.325C>G; p.Arg109Gly (éxon 7)	c.536A>G; p.Tyr179Cys (éxon 7)	5'CTGGGCTGG CCTGGGCTA3' (reverse)	5'CTGGGCTGG CCTGGGCTG3' (reverse)	5'GCCTGCTAA GCTGGTACGAC3' (forward)	663
c.721C>T; p.Arg241Trp (éxon 9)	c.536A>G; p.Tyr179Cys (éxon 7)	5'CTGGGCTGG CCTGGGCTA3' (reverse)	5'CTGGGCTGG CCTGGGCTG3' (reverse)	5'CACCCTTGT TACCCCAACAT3' (forward)	455
c.1187G>A; p.Gly396Asp (éxon 13)	c.933+3A>C; p. spl? (ínton 10)	5'CACAGTCCT GCCAGCAGAC3' (reverse)	5'CACAGTCCT GCCAGCAGAT3' (reverse)	5'CACAGTGTG TACCCACAGC3' (forward)	701

Fonte: Autoria própria.

Legenda: ASP 1 = Iniciador alelo-específico 1 – alelo selvagem; ASP 2 = Iniciador alelo-específico 2 – alelo mutado; CON = Iniciador conservado; pb = Pares de base. Transcrito utilizado: NM_001128425.2.

4.6 Análise de Perda de Heterozigose (LOH)

A avaliação da perda de heterozigose (LOH) foi realizada em tecido tumoral, a partir de DNA tumoral fresco, congelado ou embebido em parafina (FFPE). Todo o material FFPE foi revisado por um patologista especialista e apenas tecidos tumorais que contêm mais de 40% de células tumorais foram considerados. Para esse objetivo, a amplificação por PCR, a construção da biblioteca de amplicons e a realização e análise do sequenciamento foram realizadas conforme previamente descrito na seção 4.2. As frequências das variantes foram avaliadas visualmente no software IGV, sendo que apenas variantes com frequência alélica acima de 65% foram consideradas portadoras de LOH.

4.7 Detecção de alterações pontuais em *KRAS* e *PIK3CA* por NGS-amplicon

Para a detecção das mutações somáticas *KRAS*-G12C e *PIK3CA*-Q546K em tecidos de adenomas e câncer colorretal do grupo controle positivo e dos pacientes VUS, foi utilizada a mesma metodologia de NGS de amplicons e de análise descritas no item 5.2. Primers

específicos para as regiões dessas alterações foram desenhados utilizando a ferramenta online Primer 3 (Tabela 4). Foram consideradas positivas amostras com variantes detectadas com pelo menos 3% do total de leituras. Para o grupo controle negativo, foram utilizados os dados dos estudos de Georgeson et al. (2022) para CCR e Walker et al. (2024) para adenomas, os quais analisaram a presença das duas mutações em 5.364 CCR e 27 adenomas de pacientes sem variantes germinativas ou somáticas patogênicas em *MUTYH*.

Tabela 4. Mutações, iniciadores e tamanho dos amplicons utilizados na técnica de PCR multiplex do *KRAS* e *PIK3CA*.

Mutação	Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>	Tamanho do amplicon (pb)
c.34G>T; p.Gly12Cys (éxon 2)	5'AGGCCTGCTGAAAATGACTG3'	5'AGCTGTATCGTCAAGGCACTC3'	81
c.1636C>A; p.Gln546Lys (éxon 10)	5'CTCAAAGCAATTTCTACACGA GA3'	5'TGAGATCAGCCAAATTCAGTT3'	148

Fonte: Autoria própria.

Legenda: pb = Pares de base. Transcritos utilizados: NM_004985.5 (*KRAS*) e NM_006218.4 (*PIK3CA*).

4.8 Reclassificação de VUS

As VUS identificadas no gene *MUTYH* foram reclassificadas seguindo os critérios definidos pela ACMG e suas atualizações, as quais consideram dados populacionais, funcionais, computacionais, de segregação, alélicos e de outras fontes e bases de dados a fim de classificar variantes encontradas em testes genômicos. A variante em questão pode ser reclassificada como patogênica, provavelmente patogênica, benigna ou provavelmente benigna a partir de uma somatória de pontos que podem ser aplicados a depender dos critérios que são atendidos. Ainda, a variante pode ser mantida como VUS, caso não exista critérios suficientes que apoiem sua reclassificação. O critério específico pontuado levando em consideração a presença das mutações *KRAS*-G12C e/ou *PIK3CA*-Q546K foi o critério PP4 (Richards et al. 2015).

4.9 Coleta de dados e análises estatísticas

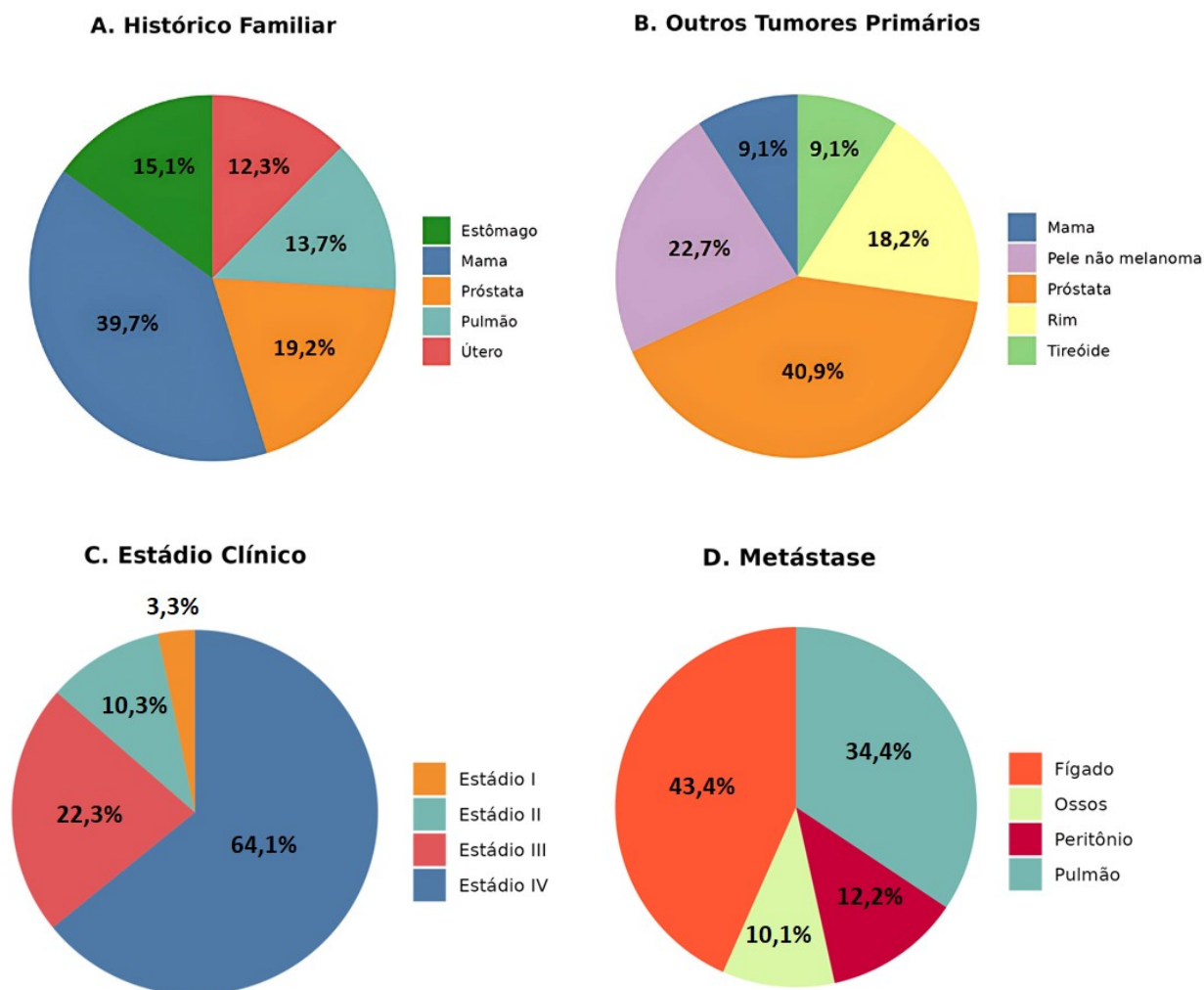
Dados clínicos dos pacientes (idade de acometimento, número de pólipos, história familiar de câncer, entre outros) e histopatológicos dos tumores (localização, tipo histológico, grau, entre outros) foram obtidos por consulta em prontuário eletrônico. O número de pólipos descrito representou a carga total de pólipos que o paciente apresentou durante todas as colonoscopias realizadas nas instituições participantes e/ou realizadas em outras instituições, sendo que quando a carga era de pelo menos 10 pólipos, o paciente foi considerado como portador de polipose. Pacientes nos quais não foram reportados pólipos nas colonoscopias foram considerados sem pólipos. Pacientes apenas com dado de testagem de *KRAS* no prontuário eletrônico foram considerados como sem informação para pólipos e para os outros dados coletados.

Os dados obtidos foram descritos com estatística descritiva, incluindo a utilização de medianas, médias e desvios padrões para dados contínuos. Para variáveis contínuas comparadas entre dois grupos, utilizamos o teste T; para comparações entre mais de dois grupos, utilizamos o ANOVA. Para dados categóricos dispostos em tabelas de contingência 2x2, a associação foi verificada por meio do Teste Exato de Fisher; quando as tabelas não seguiam esse padrão, foi utilizado o Teste Qui-Quadrado de Pearson. Um valor de p bicaudal $<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A realização das análises estatísticas contou com o apoio do serviço de apoio estatístico do CIPE - A.C.Camargo Cancer Center, para definição dos testes adequados aos resultados obtidos.

5 RESULTADOS

5.1 Características clínicas e anatomopatológicas da coorte geral

De um total de 7.617 testes *KRAS* realizados no A.C.Camargo Cancer Center (4.139 testes) e no Hospital de Amor de Barretos (3.478 testes), identificamos 220 pacientes (2,9%) com CCR e *KRAS* c.34G>T p.G12C, sendo 108 pacientes advindos do A.C.Camargo e 112 do Hospital de Amor. A coorte apresentou média de idade de 58 anos (24 a 92), com 96/163 (58,9%) apresentando pelo menos um pólipó e 40/157 (25,4%) apresentando histórico familiar para CCR. Cerca de metade dos pacientes (81/156 – 52%) apresentaram histórico familiar para outros tipos de câncer e 29/174 (16,6%) possuíam histórico de outros tumores primários. Dos 184 pacientes com informações sobre estadiamento tumoral, a maior parte (64,1%) apresentou estágio IV, seguido por 41 (22,3%) com estágio III, 19 (10,3%) com estágio II e 6 (3,3%) com estágio I. Em relação ao desenvolvimento de metástase, 123/187 (65,7%) pacientes apresentaram a condição. A relação das principais neoplasias observadas no histórico familiar, outros tumores primários, bem como a distribuição dos estágios tumorais e locais de metástase podem ser observados na **Figura 7**.



Fonte: Autoria própria.

Figura 7. Distribuição de características clínicas na coorte total.

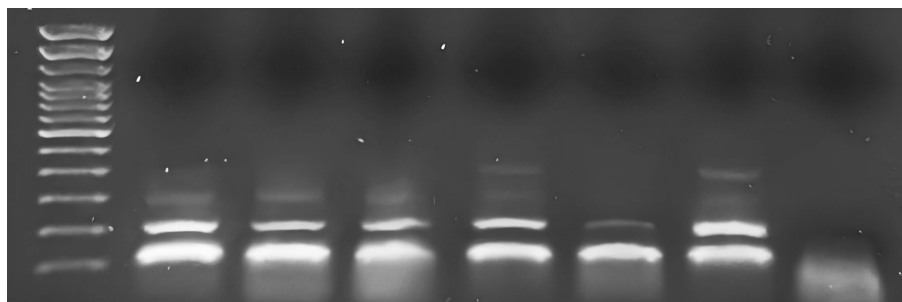
Legenda: A – Principais neoplasias observadas nos casos com histórico familiar positivo (81 pacientes). B – Outros tumores primários apresentados por 29 pacientes. C – Distribuição dos estádios clínicos dos tumores colorretais (184 pacientes). D – Localização dos sítios metastáticos em 123 pacientes. OBS: Alguns pacientes da coorte contribuíram com mais de uma categoria.

Grande parte dos pacientes se autodeclarou branco (135/181 – 74,5%), seguido por pardo (40/181 – 22%), amarelo (4/181 – 2,2%) e preto (2/181 – 1,1%). A localização tumoral predominante foi o lado esquerdo (128/190 – 67,3%), o qual abrange os cólons descendente e sigmoide e o reto. A maior parcela dos pacientes não realizou imunohistoquímica (IHQ) para avaliar a perda da expressão das proteínas MMR, mas dos 85 que a realizaram, 83 (97,6%) não apresentaram perda de expressão. De forma semelhante, a maior parte dos pacientes também não teve avaliação de MSI. Dos 81 pacientes que realizaram a avaliação, 78 (96,2%) não apresentaram instabilidade.

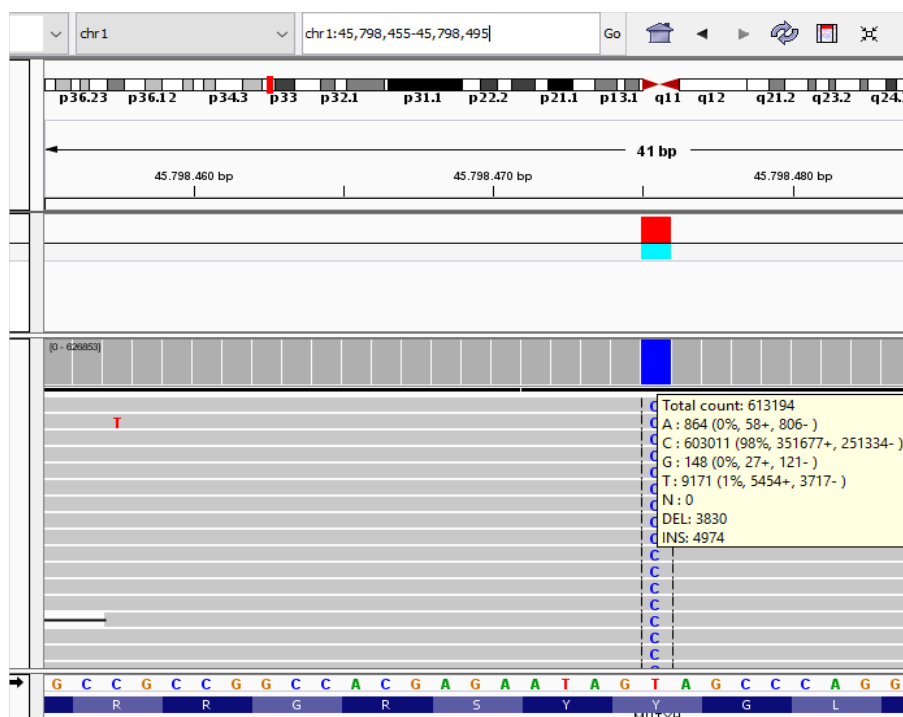
5.2 Detecção de variantes patogênicas em *MUTYH* em pacientes com CCR e *KRAS*-G12C

Todos os 220 pacientes foram submetidos ao sequenciamento multiplex inicial, sendo que 25 (11,4%) apresentavam pelo menos uma VGP em *MUTYH* e 1 apresentava uma VUS em heterozigose (NM_001128425.2:c.710G>A; p.Gly237Asp). A **Figura 8** apresenta um exemplo de como foram analisados os resultados da multiplex. Na **Figura 8A**, podemos observar a disposição de bandas na eletroforese após a realização da PCR; na **Figura 8B**, observamos a análise do resultado posterior ao sequenciamento, feito no software IGV; por fim, na **Figura 8C**, vemos como é feita a análise para pacientes que possuem a deleção dos éxons 4 a 16.

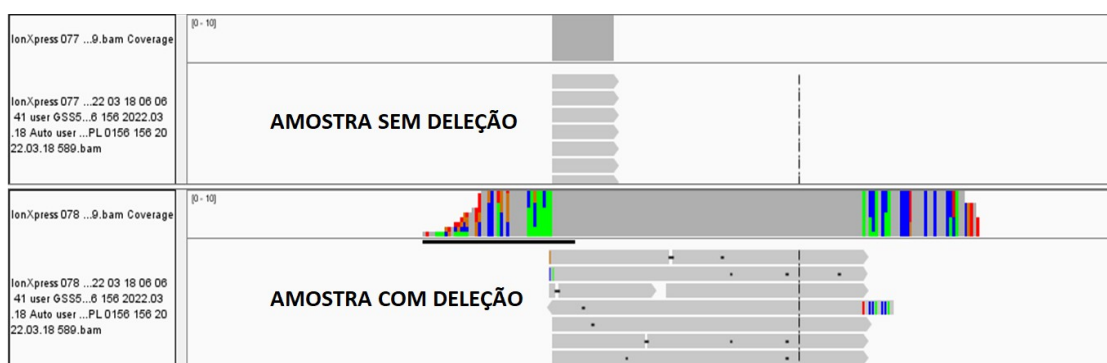
a.



b.



c.



Fonte: Autoria própria e obtida do software Integrative Genomics Viewer (IGV).

Figura 8. Exemplo de resultado de gel de agarose e de visualização de variantes por meio do software IGV.

Legenda: A figura A trata-se de um resultado de gel de agarose após a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex. No primeiro poço, à esquerda, tem-se o padrão de peso molecular; nos dois últimos, à direita, o controle positivo e negativo, respectivamente. Os demais poços, por fim, contêm as amostras. As figuras B e C demonstram como é feita a visualização de variantes no software IGV: na B, tem-se um exemplo de um paciente homozigoto para a variante *missense* p.Tyr179Cys; na C, compara-se a visualização da região onde ocorre a deleção dos éxons 4 a 16 entre um paciente sem a deleção, onde podemos observar que as leituras mostram somente o alinhamento do primer, e um com a deleção, onde podemos observar o trecho inicial do amplicon de 188 pares de base (pb) formado.

Dos 25 pacientes com VGPs em *MUTYH*, 9 se apresentaram como bialélicos homozigotos ou heterozigotos no sequenciamento inicial, 13 foram submetidos ao sequenciamento completo do gene e 3 não possuíam material suficiente para a realização de painel genético. A média de cobertura vertical em 100x dos painéis realizados foi de 96,14% (93,92%-100%). Dentre os 25 pacientes detectados, 15 (6,8% da coorte total) foram identificados com VGPs bialélicas, sendo classificados como MAP, enquanto 10 (4,5%) possuíam apenas uma VGP, sendo classificados como monoalélicos. Quando estratificado por idade, para pacientes com menos de 60 anos, 19/110 (17,2%) possuíam pelo menos uma VGP em *MUTYH*, sendo que 12 (10,9%) foram classificados como MAP e 7 como monoalélicos (6,3%). Já estratificando por pólipos, 19/96 (19,7%) possuíam pelo menos uma VGP em *MUTYH*, 11 (11,4%) foram classificados como MAP e 8 (8,3%) como monoalélicos (**Tabela 5**).

Todas as cinco variantes selecionadas para rastreamento por sequenciamento multiplex foram identificadas pelo menos uma vez. A variante mais frequentemente encontrada foi a p.Tyr179Cys (40%), seguida por p.Gly396Asp (28%), p.Ala385fs (20%) e deleção dos éxons 4 a 16 e p.Arg241Trp, cada uma com 12%. Analisando apenas pacientes bialélicos, as frequências encontradas foram de 40%, 26,6%, 20%, 20% e 13,3%, respectivamente. As demais variantes detectadas no sequenciamento completo do gene *MUTYH* apareceram uma única vez dentre os pacientes analisados (**Tabela 5**).

Dos 15 pacientes MAP identificados, 3 (ID1, ID3 e ID8) que continuam em acompanhamento com a equipe médica do ACCCC e que possuíam amostra de leucócito e/ou saliva disponíveis foram submetidos à análise por PCR Alelo-Específica (PCR-AE) para confirmação da heterozigose composta (**Figura 9**). Todos os três foram confirmados como MAP. Os pacientes ID23, ID24 e ID25, inicialmente identificados com uma frequência alélica da variante (VAF) de 99% para as suas respectivas variantes no tecido tumoral, foram posteriormente confirmados como MAP através de PCR seguida por NGS em tecido normal adjacente, confirmando a homozigose. Em contrapartida, o paciente ID17, inicialmente identificado com uma VAF de 100% para a variante p.Ala385fs, ao ser testado seu tecido normal adjacente, foi classificado como monoalélico (VAF 81,5% no tecido normal).

Os pacientes com deleção dos éxons 4 a 16 homozigotas (ID2 e ID5) ou heterozigotos com outra VGP dentro desses éxons (ID14) foram confirmados como MAP, enquanto pacientes com duas VGPs heterozigotas em *MUTYH* com insuficiência de amostra disponível para a realização de PCR-AE e impossibilidade de uma nova coleta (ID4, ID7, ID10, ID15, ID21, ID22) foram inferidos como MAP. Por fim, os pacientes ID13, ID16 e ID20, por não

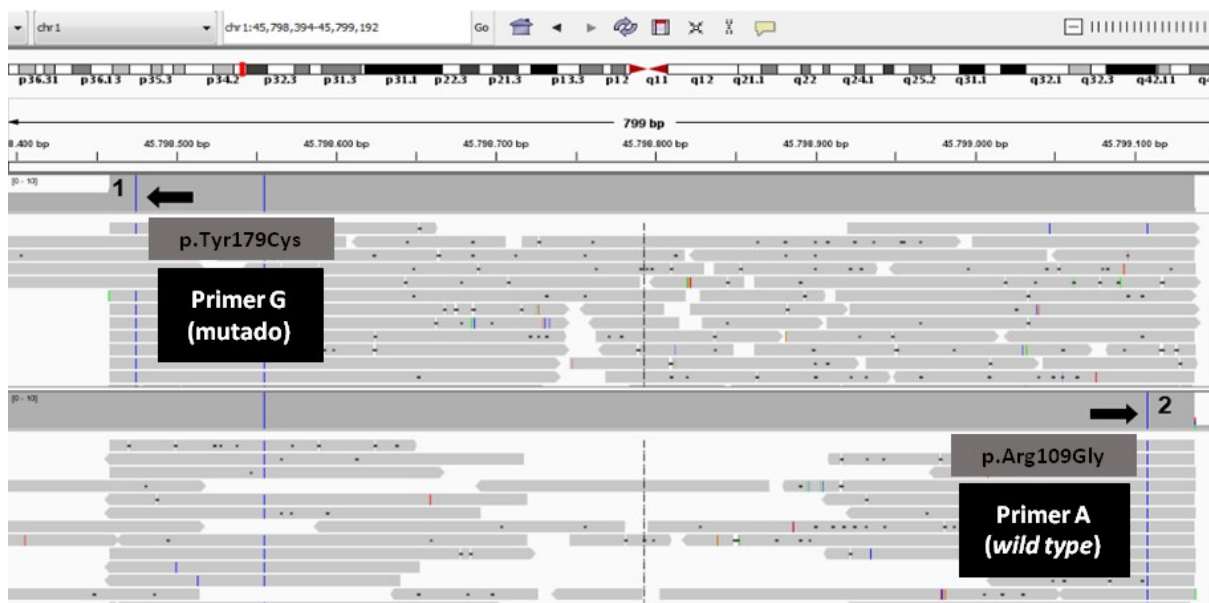
possuírem amostra suficiente para a realização do sequenciamento completo do *MUTYH*, foram submetidos à PCR ampliada do gene para o rastreamento de possíveis VGPs. Todos os três não apresentaram variantes nas regiões abrangidas pelos iniciadores utilizados e foram classificados como monoalélicos inferidos (**Tabela 5**).

Tabela 5. VGP's detectadas em *MUTYH* em pacientes com CCR e *KRAS*-G12C.

ID	Idade	Pólipos	História Familiar CCR	VGP's multiplex	VGP's Sequenciamento <i>MUTYH</i>	Classificação
ID1	58	Múltiplos	Ausente	c.536A>G; p.Tyr179Cys ^{HT}	c.325C>G; p.Arg109Gly ^{HT}	Bialélico confirmado (MAP)
ID2	27	1	Pai (61a), 2 tios paternos	c.348+33_*64+146del4285; p.? (Del E4-E16 ^{HM})	-	Bialélico confirmado (MAP)
ID3	56	Múltiplos	Ausente	c.536A>G; p.Tyr179Cys ^{HT} / c.721C>T; p.Arg241Trp ^{HT}	-	Bialélico confirmado (MAP)
ID5	44	2	Irmão	c.348+33_*64+146del4285; p.? (Del E4-E16 ^{HM})	-	Bialélico confirmado (MAP)
ID8	50	33	Ausente	c.1187G>A; p.Gly396Asp ^{HT}	c.933+3A>C; p.spl? ^{HT}	Bialélico confirmado (MAP)
ID14	44	Múltiplos	Ausente	c.348+33_*64+146del4285; p.? (Del E4-E16 ^{HT})	c.688C>T; p.Gln230Ter ^{HT}	Bialélico confirmado (MAP)
ID23	50	Ausente	2 irmãos (44a e 49a)	c.1147del; p.Ala385fs ^{HM}	Ausente	Bialélico confirmado (MAP)
ID24	68	Múltiplos	Ausente	c.536A>G; p.Tyr179Cys ^{HM}	Ausente	Bialélico confirmado (MAP)
ID25	49	1	Ausente	c.1187G>A; p.Gly396Asp ^{HM}	-	Bialélico confirmado (MAP)
ID4	63	NI	NI	c.1187G>A; p.Gly396Asp ^{HT} / c.721C>T; p.Arg241Trp ^{HT}	-	Bialélico inferido (MAP)
ID7	59	Ausente	Tia	c.536A>G; p.Tyr179Cys ^{HT} / c.1187G>A; p.Gly396Asp ^{HT}	-	Bialélico inferido (MAP)
ID10	32	>1	Bisavô paterno (>60a)	c.536A>G; p.Tyr179Cys ^{HT}	c.818C>G; p.Pro301Arg ^{HT?*}	Bialélico inferido (MAP)
ID15	NI	NI	NI	c.536A>G; p.Tyr179Cys ^{HT} / c.1147del; p.Ala385fs ^{HT}	-	Bialélico inferido (MAP)
ID21	43	>50	Ausente	c.1147del; p.Ala385fs ^{HT}	c.389-1G>C; p.spl? ^{HT}	Bialélico inferido (MAP)
ID22	43	Múltiplos	2 primas maternas (45a e 50a)	Ausente	c.1227_1228dup; p.Glu410fs ^{HT} / c.1012C>T; p.Gln338Ter ^{HT}	Bialélico inferido (MAP)
ID6	51	11	Ausente	c.536A>G; p.Tyr179Cys ^{HT}	Ausente	Monoalélico confirmado
ID9	53	Múltiplos	Ausente	c.536A>G; p.Tyr179Cys ^{HT}	Ausente	Monoalélico confirmado
ID11	64	2	Ausente	c.1147del; p.Ala385fs ^{HT}	Ausente	Monoalélico confirmado
ID12	54	4	Ausente	c.721C>T; p.Arg241Trp ^{HT}	Ausente	Monoalélico confirmado
ID17	44	NI	NI	c.1147del; p.Ala385fs ^{HT}	Ausente	Monoalélico confirmado
ID18	NI	1	NI	c.1187G>A; p.Gly396Asp ^{HT}	Ausente	Monoalélico confirmado
ID19	55	7	Ausente	c.536A>G; p.Tyr179Cys ^{HT}	Ausente	Monoalélico confirmado
ID13	56	2	Ausente	c.1187G>A; p.Gly396Asp ^{HT}	-	Monoalélico inferido
ID16	31	Ausente	Ausente	c.1187G>A; p.Gly396Asp ^{HT}	-	Monoalélico inferido
ID20	75	4	Ausente	c.536A>G; p.Tyr179Cys ^{HT}	-	Monoalélico inferido

Fonte: Autoria própria.

Legenda: NI = Não informado; HM = Homozigoto; HT = Heterozigoto; a = Anos; MAP = Polipose Associada ao *MUTYH*. Transcrito utilizado: NM_001128425.2. *Variante reclassificada como provavelmente patogênica, conforme descrito no item 5.5

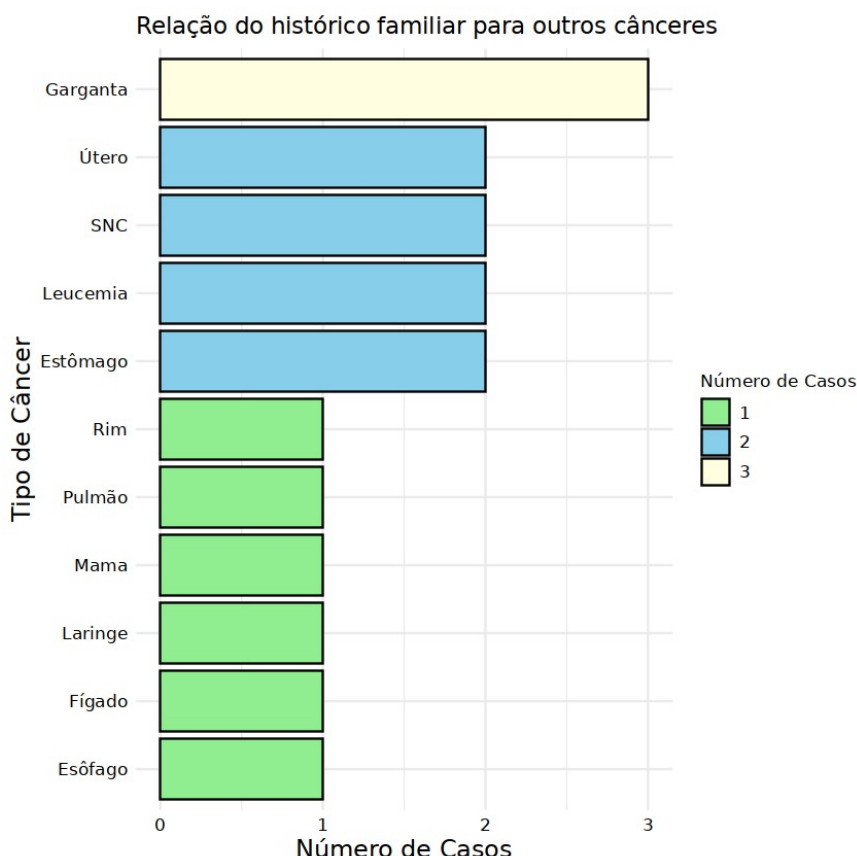


Fonte: Obtida do software Integrative Genomics Viewer (IGV).

Figura 9. Exemplo de visualização das variantes avaliadas por PCR alelo-específica para confirmação de heterozigose composta no software IGV.

Legenda: A figura demonstra o resultado de duas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) distintas: na primeira, observa-se a amostra em que foi utilizado o primer *reverse* que anela preferencialmente no alelo mutado para a variante p.Tyr179Cys, a qual está presente na imagem; na segunda, observa-se a amostra em que foi utilizado o primer *reverse* que anela preferencialmente no alelo *wild type*, onde podemos observar a presença da segunda variante p.Arg109Gly, confirmando a heterozigose composta.

Em relação às características clínicas dos 15 pacientes MAP, a idade de diagnóstico do CCR variou de 27 a 68 anos. Dos 11 pacientes MAP que continham dados disponíveis sobre pólipos, 7 (63,6%) possuíam um fenótipo clássico de polipose. Apenas 4/13 (30,7%) pacientes evoluíram para um quadro metastático e 2/13 apresentaram outros tumores primários, sendo um caso de câncer de pulmão e um de angiomiolipoma renal. Seis pacientes (6/13 – 46,1%) apresentaram tumores com estágio III, localizados principalmente no lado esquerdo do cólon (8/14 – 57,1%) e moderadamente diferenciados (10/12 – 83,3%). Por fim, sobre a presença/ausência de história familiar para CCR, nenhuma prevalência foi observada; em contrapartida, 11/13 (84,6%) pacientes MAP apresentaram histórico familiar para outros cânceres. A **Figura 10** demonstra um gráfico de barras com a quantidade de casos dos tipos de câncer ocorrentes na nossa coorte.



Fonte: Autoria própria.

Figura 10. Relação do histórico familiar para outros cânceres de pacientes MAP.

Legenda: A figura demonstra um gráfico de barras horizontais, sendo o eixo y referente ao tipo de câncer (conforme descrito no laudo, informado pelo próprio paciente), e o eixo x referente à quantidade de casos com aquele tipo tumoral. Cânceres com mesmo número de casos estão marcados com a mesma cor. OBS: O câncer referido pelos pacientes como “garganta” é subjetivo, uma vez que essa região engloba vários órgãos; dessa forma, apesar de possuir maior número de casos, existe a probabilidade de que os casos de dentro desta classe tenham ocorrido em diferentes órgãos para cada familiar do paciente em questão, assim como podem se enquadrar em órgãos previamente relatados por outros pacientes, tais como “laringe” ou “esôfago”, modificando as prevalências observadas.

Dez pacientes (ID6, ID9, ID11, ID12, ID13, ID16, ID17, ID18, ID19 e ID20) que foram confirmados ou inferidos como monoalélicos seguiram para a análise de LOH no DNA do tumor. Quatro pacientes (ID6, ID11, ID17 e ID20) apresentaram VAF >65%, confirmando a LOH do alelo selvagem, e um paciente (ID19) apresentou uma VAF próxima ao limiar (64%) (**Tabela 6**). Um único paciente apresentou uma variante somática em *MUTYH*, classificada no momento como VUS (ID9, variante NM_001128425.2:c.710G>A; p.Gly237Asp).

Tabela 6. Variantes encontradas no sequenciamento multiplex ou completo do gene *MUTYH* e análise de perda de heterozigose (LOH) em pacientes monoalélicos.

ID	VGP (HGVS)	<i>Variant Allele Frequency</i> (VAF)	% de células tumorais (CT) ou VAF <i>KRAS-G12C</i>
ID6	c.536A>G; p.Tyr179Cys	88% (LOH)	70% CT
ID9	c.536A>G; p.Tyr179Cys	42%	90% CT
ID11	c.1147del; p.Ala385fs	67% (LOH)	-
ID12	c.721C>T; p.Arg241Trp	45%	90% CT
ID13	c.1187G>A; p.Gly396Asp	48%	-
ID16	c.1187G>A; p.Gly396Asp	54%	29% VAF
ID17	c.1147del; p.Ala385fs	81% (LOH)	28% VAF
ID18	c.1187G>A; p.Gly396Asp	51%	25% VAF
ID19	c.536A>G; p.Tyr179Cys	64%	45% VAF
ID20	c.536A>G; p.Tyr179Cys	67% (LOH)	24% VAF

Fonte: Autoria própria.

Legenda: ID – Identificação. VGP – Variante germinativa patogênica. HGVS – Critérios para nomenclatura de variantes do Human Genome Variation Society. VAF – Frequência alélica da variante. CT – Células tumorais. LOH – Perda de heterozigose. Transcrito utilizado – NM_001128425.2.

Em relação aos dados clínicos e anatomopatológicos destes pacientes, a idade variou de 31 a 75 anos, com a maioria dos pacientes (8/9 – 88,8%) apresentando pólipos e evoluindo para quadros metastáticos (7/10 – 70%) e metade apresentando histórico familiar para outros cânceres (4/8 – 50%), sendo que todos foram regularmente distribuídos, sem nenhuma prevalência observada. Um paciente (1/9 – 11,1%) apresentou um segundo tumor primário (carcinoma basocelular nodular ulcerado) e nenhum apresentou histórico familiar para CCR. De características anatomopatológicas, a maioria (7/10 – 70%) apresentou um estágio clínico IV e tumores no lado direito do cólon, moderadamente diferenciados (5/7 – 71,4%).

5.3 Comparação das características clínicas observadas entre pacientes com VGPs e sem VGPs em *MUTYH*

Dados clínicos (média de idade, sexo, história familiar para CCR e outros cânceres, pólipos, metástases e outros tumores primários) e anatomopatológicos (estadiamento do câncer, localização do tumor e grau de diferenciação) foram comparados entre pacientes com e sem VGPs em *MUTYH* (**Tabela 7**). Essa comparação foi feita em três cenários distintos: 1. Analisando a coorte geral; 2. Analisando apenas a coorte do A.C.Camargo; 3. Analisando apenas a coorte de Barretos, de modo a observar possíveis diferenças entre os centros. A

média de idade (p-valor = 0,002) e a presença de pólipos (p-valor = 0,005) mostraram uma associação estatisticamente significativa entre os grupos na coorte geral, indicando que pacientes com VGPs em *MUTYH* apresentam uma média de idade menor de aparecimento do CCR (51 X 59; p-valor = 0,002) e maior presença de pólipos em comparação com aqueles sem VGPs (OR = 5,26; IC 95% 1,49-18,59; p-valor = 0,005). Essas mesmas variáveis, juntamente com histórico familiar para outros cânceres, metástase e estadiamento, também apresentaram valores estatisticamente significativos quando comparado apenas pacientes bialélicos e pacientes sem VGPs em *MUTYH*, excluindo monoalélicos (**Tabela 8**).

Tabela 7. Análises estatísticas das características clínicas e anatomopatológicas da coorte, comparando pacientes com VGPs e sem VGPs em *MUTYH*.

GERAL					A.C.CAMARGO			BARRETOS		
CARACTERÍSTICAS		Com VGPs N (%)	Sem VGPs N (%)	p-valor	Com VGPs N (%)	Sem VGPs N (%)	p-valor	Com VGPs N (%)	Sem VGPs N (%)	p-valor
Média de idade (intervalo)		50,8 (27-75)	59 (24-92)	0,002	50,9 (27-64)	60,7 (26-92)	0,015	50,7 (31-75)	57,2 (24-84)	0,065
Sexo	F	11 (44%)	97 (50,5%)	0,671	6 (50%)	54 (56,3%)	0,763	5 (38,5%)	43 (44,8%)	0,771
	M	14 (56%)	95 (49,5%)		6 (50%)	42 (43,8%)		8 (61,5%)	53 (55,2%)	
História Familiar para CCR	Presente	6 (28,6%)	34 (25%)	0,789	4 (36,4%)	18 (28,1%)	0,721	2 (20%)	16 (22,2%)	1,000
	Ausente	15 (71,4%)	102 (75%)		7 (63,6%)	46 (71,9%)		8 (80%)	56 (77,8%)	
História familiar para outros cânceres	Presente	15 (71,4%)	66 (48,9%)	0,063	9 (81,8%)	36 (56,3%)	0,182	6 (60%)	30 (42,3%)	0,327
	Ausente	6 (28,6%)	69 (51,1%)		2 (18,2%)	28 (43,8%)		4 (40%)	41 (57,7%)	
Pólipos	Presente	19 (86,4%)	77 (54,6%)	0,005	10 (90,9%)	46 (63%)	0,090	9 (81,8%)	31 (45,6%)	0,048
	Ausente	3 (13,6%)	64 (45,4%)		1 (9,1%)	27 (37%)		2 (18,2%)	37 (54,4%)	
Metástase	Presente	11 (47,8%)	112 (68,3%)	0,062	4 (36,4%)	47 (60,3%)	0,194	7 (58,3%)	65 (75,6%)	0,293
	Ausente	12 (52,2%)	52 (31,7%)		7 (63,6%)	31 (39,7%)		5 (41,7%)	21 (24,4%)	
Outros tumores primários	Presente	3 (13,6%)	26 (17,1%)	1,000	2 (18,2%)	18 (25,7%)	0,723	1 (9,1%)	8 (9,8%)	1,000
	Ausente	19 (86,4%)	126 (82,9%)		9 (81,8%)	52 (74,3%)		10 (90,9%)	74 (90,2%)	
Estadiamento	I	0	4 (2,5%)	0,154	0	4 (5,1%)	0,088	0	0	0,134
	II	4 (17,4%)	14 (8,7%)		4 (36,4%)	8 (10,3%)		0	6 (7,2%)	
	III	8 (34,8%)	33 (20,5%)		3 (27,3%)	18 (23,1%)		5 (41,7%)	15 (18,1%)	
	IV	11 (47,8%)	110 (68,3%)		4 (36,4%)	48 (61,5%)		7 (58,3%)	62 (74,7%)	

Con/Tabela 7. Análises estatísticas das características clínicas e anatomopatológicas da coorte, comparando pacientes com VGPs e sem VGPs em *MUTYH*.

Localização do tumor	Direito (ascendente e transverso)	9 (37,5%)	50 (30,1%)	0,638	5 (41,7%)	29 (35,4%)	0,752	4 (33,3%)	21 (25%)	0,690
	Esquerdo (descendente, sigmoide e reto)	15 (62,5%)	113 (68,1%)		7 (58,3%)	53 (64,6%)		8 (66,7%)	60 (71,4%)	
	Outros (apêndice)	0	3 (1,8%)		0	0		0	3 (3,6%)	
Grau de diferenciação	Bem diferenciado	2 (10,5%)	16 (11,1%)	0,784	0	8 (11,6%)	0,468	2 (25%)	8 (10,7%)	0,380
	Moderadamente diferenciado	15 (78,9%)	119 (82,6%)		10 (90,9%)	57 (82,6%)		5 (62,5%)	62 (82,7%)	
	Pouco diferenciado	2 (10,5%)	9 (6,3%)		1 (9,1%)	4 (5,8%)		1 (12,5%)	5 (6,7%)	

Fonte: Autoria própria.

Legenda: VGP = Variante germinativa patogênica; CCR = Câncer colorretal; N = Número total analisado; F = Feminino; M = Masculino.

Tabela 8. Análises estatísticas das características clínicas e anatomopatológicas da coorte, comparando pacientes bialélicos e sem VGPs em *MUTYH*.

GERAL				A.C.CAMARGO			BARRETOS			
CARACTERÍSTICAS		Bialélicos N (%)	Sem VGPs N (%)	p-valor	Bialélicos N (%)	Sem VGPs N (%)	p-valor	Bialélicos N (%)	Sem VGPs N (%)	p-valor
Média de idade (intervalo)		49 (27-68)	59 (24-92)	0,008	48 (27-63)	60,7 (26-92)	0,034	49,5 (43-68)	57,2 (24-84)	0,220
Sexo	F	8 (53,3%)	97 (50,5%)	0,834	5 (62,5%)	54 (56,3%)	1,000	3 (42,9%)	43 (44,8%)	1,000
	M	7 (46,7%)	95 (49,5%)		3 (37,5%)	42 (43,8%)		4 (57,1%)	53 (55,2%)	
História Familiar para CCR	Presente	7 (53,8%)	102 (75%)	0,100	4 (57,1%)	18 (28,1%)	0,192	2 (33,3%)	16 (22,2%)	0,617
	Ausente	6 (46,2%)	34 (25%)		3 (42,9%)	46 (71,9%)		4 (66,7%)	56 (77,8%)	
História familiar para outros cânceres	Presente	2 (15,4%)	69 (51,1%)	0,014	6 (85,7%)	36 (56,3%)	0,228	5 (83,3%)	30 (42,3%)	0,086
	Ausente	11 (84,6%)	66 (48,9%)		1 (14,3%)	28 (43,8%)		1 (16,7%)	41 (57,7%)	
Pólipos	Presente	2 (15,4%)	64 (45,4%)	0,036	6 (85,7%)	46 (63%)	0,412	5 (83,3%)	31 (45,6%)	0,103
	Ausente	11 (84,6%)	77 (54,6%)		1 (14,3%)	27 (37%)		1 (16,7%)	37 (54,4%)	
Metástase	Presente	9 (69,2%)	52 (31,7%)	0,006	2 (28,6%)	47 (60,3%)	0,128	2 (33,3%)	65 (75,6%)	0,044
	Ausente	4 (30,8%)	112 (68,3%)		5 (71,4%)	31 (39,7%)		4 (66,7%)	21 (24,4%)	
Outros tumores primários	Presente	11 (84,6%)	126 (82,9%)	0,874	2 (28,6%)	18 (25,7%)	0,869	0	8 (9,8%)	0,422
	Ausente	2 (15,4%)	26 (17,1%)		5 (71,4%)	52 (74,3%)		6 (100%)	74 (90,2%)	
Estadiamento	I	0	4 (2,5%)	0,029	0	4 (5,1%)	0,075	0	0	0,019
	II	3 (23,1%)	14 (8,7%)		3 (42,9%)	8 (10,3%)		0	6 (7,2%)	
	III	6 (46,2%)	33 (20,5%)		2 (28,6%)	18 (23,1%)		4 (66,7%)	15 (18,1%)	
	IV	4 (30,8%)	110 (68,3%)		2 (28,6%)	48 (61,5%)		2 (33,3%)	62 (74,7%)	

Con/Tabela 8. Análises estatísticas das características clínicas e anatomopatológicas da coorte, comparando pacientes bialélicos e sem VGPs em *MUTYH*.

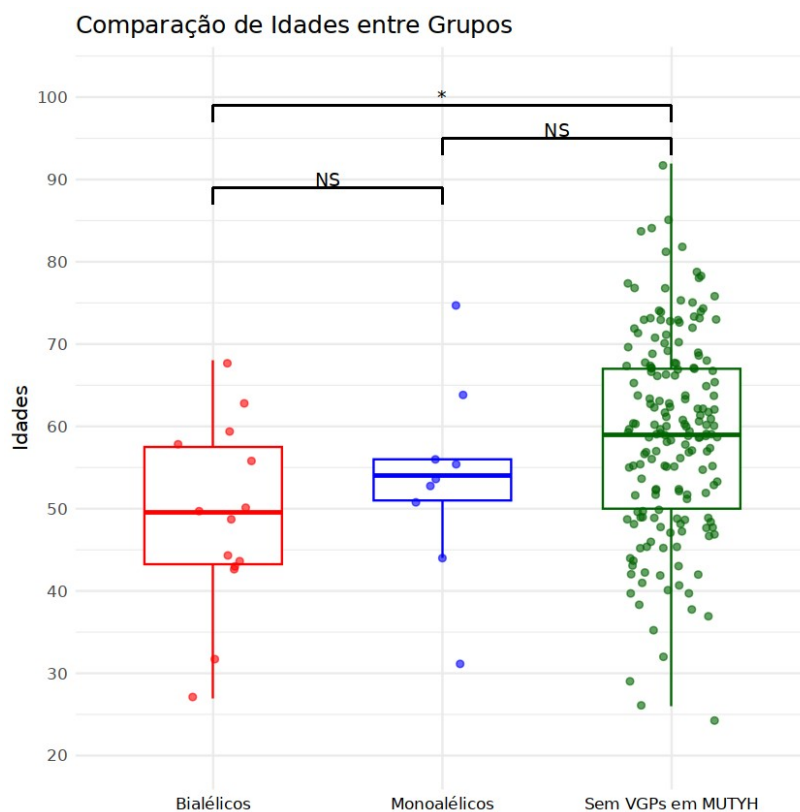
Localização do tumor	Direito (ascendente e transverso)	6 (42,8%)	50 (30,1%)	0,569	4 (50%)	29 (35,3%)	0,347	2 (66,6%)	21 (25%)	0,942
	Esquerdo (descendente, sigmoide e reto)	8 (57,2%)	113 (68%)		4 (50%)	53 (64,7%)		4 (33,4%)	60 (71,4%)	
	Outros (apêndice)	0	3 (1,9%)		0	0		0	3 (3,6%)	
Grau de diferenciação	Bem diferenciado	0	16 (11,1%)	0,317	0	8 (11,6%)	0,440	0	8 (10,6%)	0,652
	Moderadamente diferenciado	10 (83,3%)	119 (82,6%)		6 (85,7%)	57 (82,6%)		4 (80%)	62 (82,6%)	
	Pouco diferenciado	2 (16,7%)	9 (6,3%)		1 (14,3%)	4 (5,8%)		1 (20%)	5 (6,8%)	

Fonte: Autoria própria.

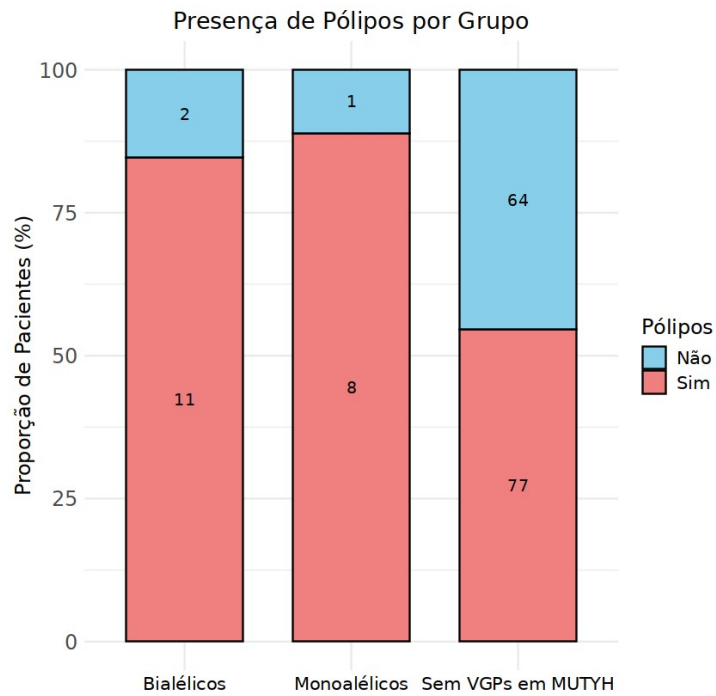
Legenda: VGP = Variante germinativa patogênica; CCR = Câncer colorretal; N = Número total analisado; F = Feminino; M = Masculino.

Por fim, o grupo de pacientes com VGPs foi dividido entre pacientes bialélicos e monoalélicos para compará-los com os pacientes sem variantes a fim de verificar se existia diferença entre os três grupos, e, caso existisse, se o grupo monoalélico era mais semelhante ao grupo bialélico ou ao grupo não mutado. De forma geral, não encontramos valores estatisticamente significativos, apenas para pólipos e idade, como demonstrado na **Figura 11**. Pacientes monoalélicos se assemelharam aos bialélicos em relação à presença de pólipos (p-valor = 0,019); já em relação à idade, foi identificada uma diferença estatisticamente significativa entre os três grupos (p-valor = 0,007), observada entre o grupo bialélico x grupo sem variantes (p-valor = 0,008).

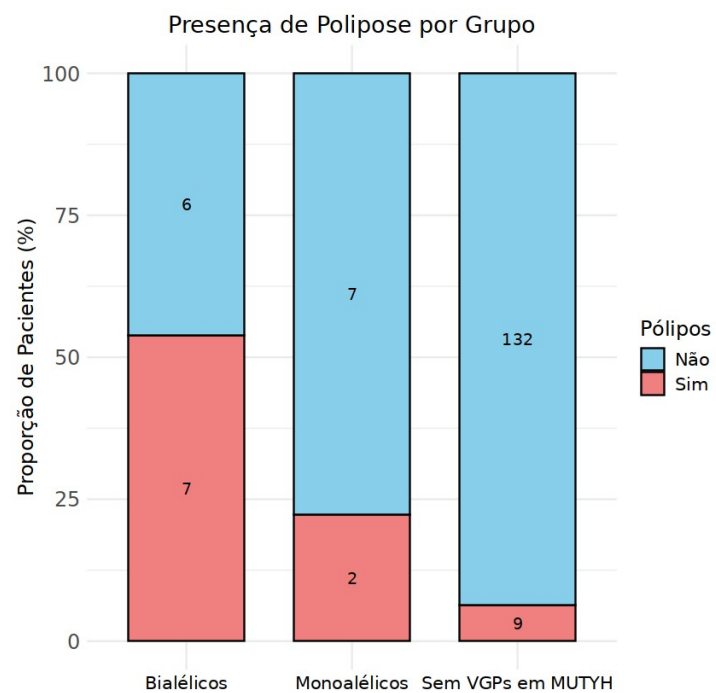
a.



b.



c.



Fonte: Autoria própria.

Figura 11. Comparação entre os grupos bialélico, monoalélico e sem variantes em *MUTYH* nos dois centros em relação à idade de aparecimento do CCR e à presença de pólipos.

Legenda: A figura A é um gráfico de *boxplots* comparando a distribuição das idades de aparecimento do CCR nos grupos bialélico (vermelho), monoalélico (verde) e sem variantes (azul). O eixo X contém os diferentes grupos, enquanto o eixo Y se refere à idade. As figuras B e C são gráficos de barras empilhadas mostrando a proporção de pacientes com pólipos/polipose (vermelho) e sem pólipos (azul) para cada um dos 3 grupos anteriormente referidos. O eixo X se refere aos diferentes grupos, enquanto o eixo Y contém a proporção de pacientes com e sem pólipos. CCR = Câncer colorretal.

5.4 Avaliação de *KRAS*-G12C e *PIK3CA*-Q546K em adenomas e adenocarcinomas de pacientes MAP

Para a avaliação de *KRAS*-G12C e *PIK3CA*-Q546K em adenomas e CCRs de pacientes MAP e suspeitos para MAP utilizados como controle positivo, foi solicitada ao biobanco a extração de DNA de blocos de adenoma e adenocarcinoma, quando disponíveis. Para todos os 16 pacientes dessa coorte obtivemos amostras, totalizando 17 adenomas (1 de alto grau e 16 de baixo grau) e 13 adenocarcinomas (**Tabela 9**).

Tabela 9. Dados de idade, variantes e materiais analisados dos 16 pacientes MAP que compuseram o grupo controle positivo.

Paciente	Idade	Variante	Adenomas			Adenocarcinomas	
			Grau	%CT	Análise (VAF)	%CT	Análise (VAF)
MAP_1	39	c.1187G>A; p.Gly396Asp / c.536A>G; p.Tyr179Cys	Baixo	100%	KRAS-G12C (10%)	Não analisado	
			Baixo	50%	KRAS-G12C (10%)		
MAP_2	46	c.536A>G; p.Tyr179Cys / c.721C>T; p.Arg241Trp	Baixo	80%	Negativo	Não analisado	
			Baixo	10%	Negativo		
			Baixo	10%	Negativo		
MAP_3	34	c.389-1G>C; p. spl? / c.1147del; p.Ala385fs	Baixo	50%	Negativo	80%	PIK3CA-Q546K (18%)
			Baixo	40%	Negativo		
MAP_4	52	c.536A>G; p.Tyr179Cys / c.389-1G>C; p. spl?	Não analisado			80%	KRAS-G12C (20%); PIK3CA-Q546H (11%)
MAP_5	31	c.721C>T; p.Arg241Trp ^{HM}	Baixo	20%	Negativo	Não analisado	
			Baixo	80%	Negativo		
MAP_6	31	c.536A>G; p.Tyr179Cys / c.1227-1228dup; p.Glu410Glyfs*43	Baixo	15%	Negativo	Não analisado	
MAP_7	52	c.536A>G; p.Tyr179Cys / c.1147del; p.Ala385fs	Alto	80%	KRAS-G12C (26%)	Não analisado	
MAP_8	44	c.348+33_*64+146del4285; p.spl? ^{HM}	Baixo	50%	KRAS-G12C (25%)	80%	KRAS-G12C (30%)
MAP_9	58	c.536A>G; p.Tyr179Cys / c.325C>G; p.Arg109Gly	Baixo	50%	KRAS-G12C (29%)	NI	KRAS-G12C (ND)
MAP_10	27	c.348+33_*64+146del4285; p.spl? ^{HM}	Não analisado			NI	KRAS-G12C (ND); PIK3CA-Q546K (33%)

Con/Tabela 9. Dados de idade, variantes e materiais analisados dos 16 pacientes MAP que compuseram o grupo controle positivo.

MAP_11	56	c.536A>G; p.Tyr179Cys / c.721C>T; p.Arg241Trp	Baixo	60%	<i>KRAS</i> -G12C (6%)	50%	<i>KRAS</i> -G12C (ND)
MAP_12	63	c.1187G>A; p.Gly396Asp / c.721C>T; p.Arg241Trp	Não analisado			60%	<i>KRAS</i> -G12C (ND); <i>PIK3CA</i> -Q546K (4%)
MAP_13	44	c.348+33_*64+146del4285; p.spl? ^{HM}	Baixo	90%	<i>KRAS</i> -G12C (35%)	60%	<i>KRAS</i> -G12C (11%)
			Baixo	40%	<i>KRAS</i> -G12C (15%)	50%	<i>KRAS</i> -G12C (6%); <i>PIK3CA</i> -Q546K (8%)
MAP_14	59	c.1187G>A; p.Gly396Asp / c.536A>G; p.Tyr179Cys	Não analisado			70%	<i>KRAS</i> -G12C (49%)
MAP_15	50	c.1187G>A; p.Gly396Asp / c.933+3A>C; p.spl?	Baixo	40%	Negativo	80%	<i>KRAS</i> -G12C (43%)
MAP_16	32	c.536A>G; p.Tyr179Cys / c.902C>G; p.Pro301Arg	Não analisado			40%	<i>KRAS</i> -G12C (9%); <i>PIK3CA</i> -Q546K (8%)

Fonte: Autoria própria.

Legenda: HM = Homozigoto; NI = Não informado; %CT = Porcentagem de células tumorais; VAF = Frequência alélica da variante. ND = Não disponível. A idade informada se refere à idade de aparecimento do CCR; porém, quando o paciente não apresentou adenocarcinoma, foi informada a idade de detecção do(s) primeiro(s) pólo(s). Transcrito utilizado *MUTYH* – NM_001128425.2

Doze pacientes foram positivos para *KRAS*-G12C (75%) e cinco (31,2%) para *PIK3CA*-Q546K. Um paciente positivou para outra variante patogênica em *PIK3CA* (c.1638G>T; p.Q546H) nos dois blocos do adenocarcinoma analisado. Em relação à frequência das variantes a depender do material, de 17 adenomas analisados, 8 (47%) positivaram para *KRAS*-G12C e nenhum para *PIK3CA*-Q546K. Já para os 13 adenocarcinomas analisados, 12 (92,3%) positivaram para *KRAS*-G12C e 5 (38,4%), para *PIK3CA*-Q546K. Os dados de frequência da detecção das duas *hotspots* em CCR e adenomas esporádicos (controle negativo) foram obtidos da literatura, sendo os valores de 2,4% (CCR) e 7,4% (adenomas) para *KRAS*-G12C, e 0,7% (CCR) e não detectado (adenomas) para *PIK3CA*-Q546K (Georgeson et al. 2022; Walker et al. 2024) (Tabela 10).

Tabela 10. Frequências de detecção observadas para *KRAS*-G12C e *PIK3CA*-Q546K em adenomas e CCR de pacientes MAP da nossa coorte e de pacientes esporádicos da literatura.

Variante	Dados MAP (este estudo)		Dados esporádicos	
			Walker et al. (2024)	Georgeson et al. (2022)
	Adenomas (n = 17)	Adenocarcinomas (n = 13)	Adenomas (n = 27)	Adenocarcinomas (n = 5364)
<i>KRAS</i> -G12C	8 (47%)	12 (92,3%)	2 (7,4%)	127 (2,4%)
<i>PIK3CA</i> - Q546K	Não detectada	5 (38,4%)	Não detectada	36 (0,7%)

Fonte: Autoria própria.

Legenda: MAP = Polipose associada ao *MUTYH*. n = número.

Adenocarcinomas demonstraram ser um material mais preciso na identificação de pacientes MAP ao se detectar *KRAS*-G12C, e especialmente ao considerar a presença de qualquer uma das duas mutações. A detecção de *KRAS*-G12C em CCR apresentou alta sensibilidade (92,3%), especificidade (97,6%) e acurácia (97,6%), de maneira semelhante à detecção de *KRAS*-G12C e/ou *PIK3CA*-Q546K (100%, 96,9% e 97%, respectivamente). A testagem apenas de *PIK3CA*-Q546K em CCR e a testagem de *KRAS*-G12C em adenomas não detecta boa parte dos pacientes MAP (38,4% e 47%, nessa ordem), apesar de serem altamente específicos (99,3% e 92,6%) e acurados (98,9% e 92,2%). Os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia não foram testados para *PIK3CA*-Q546K em adenomas, uma vez que o biomarcador não foi detectado nesse material (Tabela 11).

Tabela 11. Valores de sensibilidade, especificidade e acurácia das mutações *KRAS*-G12C e *PIK3CA*-Q546K para detectar pacientes MAP.

	MAP	NÃO MAP*	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia
ADENOCARCINOMAS					
<i>KRAS</i> -G12C positivo	12	127	92,3%	97,6%	97,6%
<i>KRAS</i> -G12C negativo	1	5237			
<i>PIK3CA</i> -Q546K positivo	5	36	38,4%	99,3%	98,9%
<i>PIK3CA</i> -Q546K negativo	8	5328			
<i>KRAS</i> -G12C e/ou <i>PIK3CA</i> -Q546K positivos	13	162	100%	96,9%	97%
<i>KRAS</i> -G12C e <i>PIK3CA</i> -Q546K negativos	0	5202			
ADENOMAS					
<i>KRAS</i> -G12C positivo	8	2	47%	92,6%	92,2%
<i>KRAS</i> -G12C negativo	9	25			

Fonte: Autoria própria.

Legenda: MAP = Polipose associada ao *MUTYH*. *Valores obtidos do estudo de Georgeson et al. (2022) para adenocarcinomas e de Walker et al. (2024) para adenomas.

5.5 Análise de variantes de significado incerto (VUS) em *MUTYH*

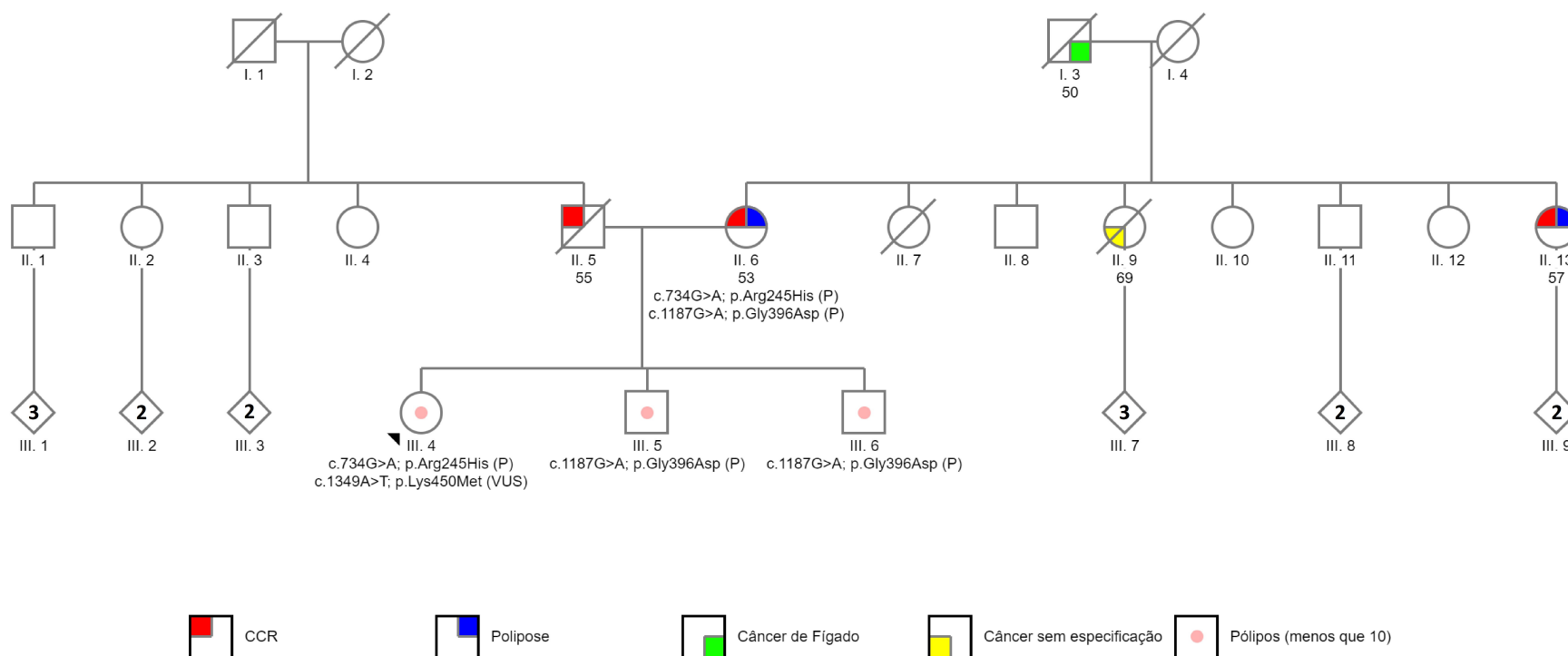
Três pacientes com variantes de significado clínico incerto (VUS) em *MUTYH* foram identificados e avaliados quanto à presença de *KRAS*-G12C e *PIK3CA*-Q546K em tecidos tumorais. Dois pacientes apresentavam uma variante patogênica em heterozigose no *MUTYH* e uma segunda variante em heterozigose, de significado clínico incerto. Um terceiro paciente apresentava uma VUS em homozigose.

A primeira probanda apresentou a variante patogênica NM_001128425.2:c.734G>A; p.Arg245His e a VUS NM_001128425.2:c.1349A>T; p.Lys450Met, com histórico familiar de CCR de ambos os pais (sendo a mãe portadora de MAP) e de uma tia materna e dois irmãos heterozigotos para a variante p.Arg245His. Tanto ela como os irmãos apresentaram pólipos, apesar de não possuírem polipose (a probanda apresentou 5 pólipos, o irmão do meio 7 e o irmão mais novo 3) ou CCR (**Figura 12**). Dois adenomas da probanda foram analisados, sendo um negativo e um possuindo a mutação *KRAS*-G12V. Para essa paciente não houve suporte para reclassificação da VUS, uma vez que só foi possível pontuar as evidências *PM2_supp* (ausente ou em frequência extremamente baixa em controles do banco de dados gnomAD) e *PP3_moderate* (múltiplas linhas de evidência computacional suportam um efeito

deletério no gene ou seu produto), sendo a última pontuada de acordo com os *thresholds* do REVEL, o qual aponta um efeito deletério moderado.

A segunda probanda, por sua vez, apresentou as variantes p.Tyr179Cys (patogênica) e NM_001128425.2:c.902C>G; p.Pro301Arg (VUS), além de CCR aos 32 anos, histórico de pólipos (reportado no laudo clínico como “mais de um”) e histórico familiar de um bisavô materno com CCR acima de 60 anos (**Figura 13**). No adenocarcinoma analisado, foi encontrada a mutação *KRAS*-G12C. A variante foi inicialmente pontuada com as regras *PP3_strong*, *PM2_supp* e *PM3_supp* (para doenças recessivas, detectada em *trans* com uma variante patogênica), e com a identificação da mutação *KRAS*-G12C, foi possível acrescentar a pontuação da regra *PP4_moderate*, a qual se refere a um fenótipo altamente específico para uma doença com etiologia genética única. Assim, apoiou-se a reclassificação da variante p.Pro301Arg para provavelmente patogênica.

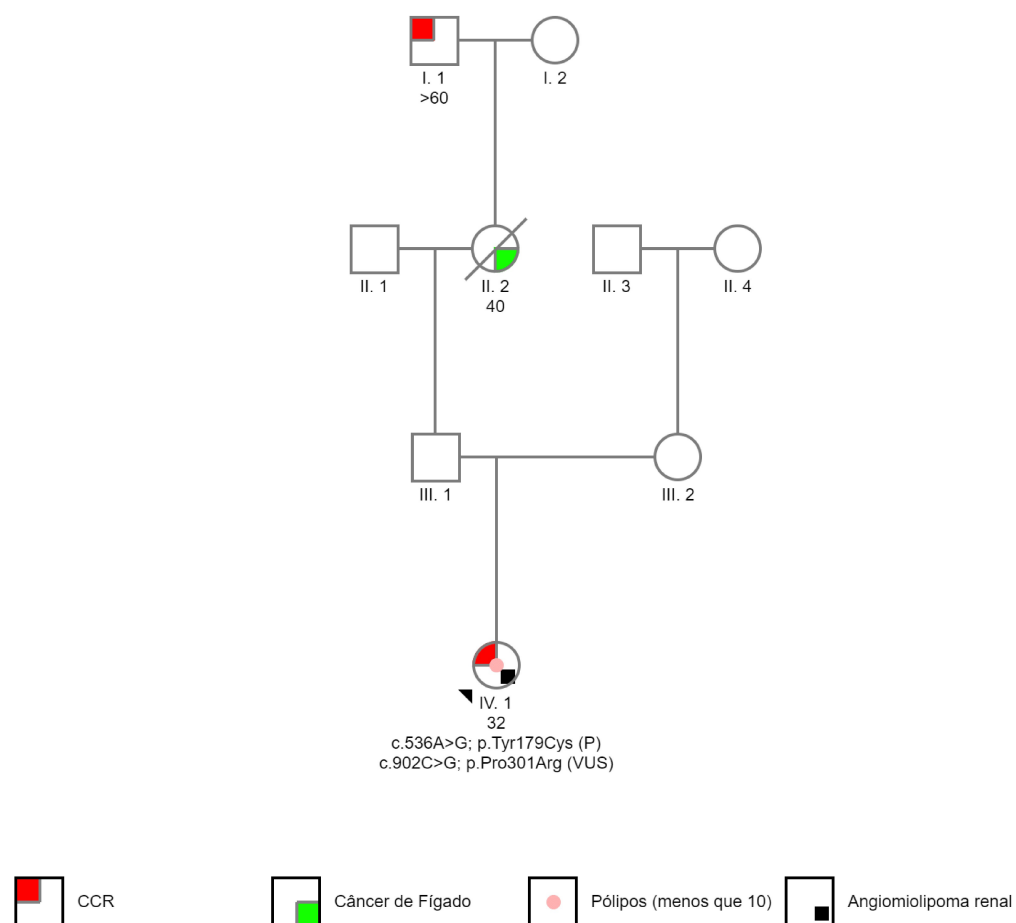
Por fim, a terceira probanda, descendente de um casal consanguíneo, apresentou a VUS NM_001128425.2:c.337T>C; p.Trp113Arg, juntamente com dois CCR metacrônicos, um aos 56 e outro aos 64 anos, além de histórico de polipose e histórico familiar de dois irmãos e uma tia materna com CCR (**Figura 14**). Foram analisados materiais de adenoma e adenocarcinoma da paciente, com *KRAS*-G12C presente no adenoma e *KRAS*-G12C e *PIK3CA*-Q546K presentes no adenocarcinoma. Depois de aplicadas as evidências *PM2_supp*, *PP3_moderate*, *PM3_supp* e *PP4_moderate*, foi possível reclassificar a variante para provavelmente patogênica.



Fonte: Autoria própria.

Figura 122. Heredograma da probanda portadora da VUS p.Lys450Met.

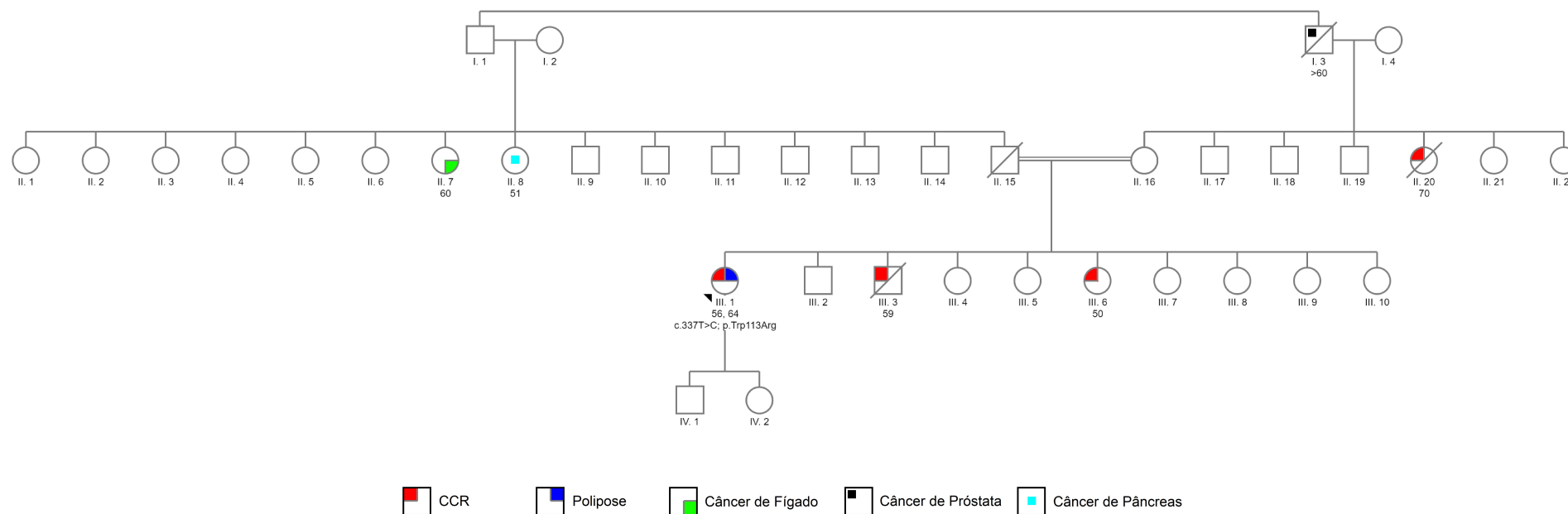
Legenda: CCR = Câncer colorretal; P = patogênica; VUS = variante de significado incerto. As idades destacadas para alguns familiares são as idades de diagnóstico dos respectivos cânceres. Todas as variantes descritas estão em heterozigose.



Fonte: Autoria própria.

Figura 133. Heredograma da probanda portadora da VUS p.Pro301Arg.

Legenda: CCR = Câncer colorretal; P = patogênica; VUS = variante de significado incerto. As idades destacadas para alguns familiares são as idades de diagnóstico dos respectivos cânceres. As variantes descritas estão em heterozigose.



Fonte: Autoria própria.

Figura 144. Heredograma da probanda portadora da VUS p.Trp113Arg.

Legenda: CCR = Câncer colorretal. As idades destacadas para alguns familiares são as idades de diagnóstico dos respectivos cânceres. A variante descrita está em homozigose.

6 DISCUSSÃO

6.1 Taxa de detecção de VGPs em *MUTYH* em pacientes com CCR e *KRAS-G12C*

Neste estudo, até o momento, avaliamos a segunda maior coorte de CCR com mutação somática *KRAS-G12C* e a primeira coorte estudada no Brasil com essas características para avaliar o potencial uso de *KRAS-G12C* em aprimorar o diagnóstico da MAP. O encaminhamento desses pacientes para a testagem germinativa do *MUTYH* demonstrou um aumento significativo na taxa de detecção de VGPs no gene (11,4%) e uma maior detecção de pacientes MAP (6,8%), especialmente entre pacientes com menos de 60 anos (10,9%). A taxa de detecção de MAP em pacientes com CCR e *KRAS-G12C* se mostrou elevada, principalmente quando comparada com as baixas taxas de detecção observadas em coortes de CCR (0,7%) e na população em geral (0,01%) (Aimé et al. 2015; Win et al. 2017).

Nossos achados estão alinhados com estudos anteriores que avaliaram a detecção de MAP dentro de coortes *KRAS-G12C*/CCR. O estudo de van Puijenbroek et al. (2008), o primeiro a estudar uma coorte com essas características, analisou 10 pacientes com *KRAS-G12C*, identificando uma (10%) mulher de 61 anos com MAP que tinha CCR e 3 adenomas; seu irmão tinha 10-15 adenomas e as mesmas variantes patogênicas de *MUTYH* identificadas por meio de testagem germinativa. Posteriormente, Yanus et al. (2018) avaliaram 90 pacientes com *KRAS-G12C* testados para a identificação de pacientes elegíveis para terapia direcionada ao EGFR. Os dados sobre a idade de início do CCR e histórico familiar não foram fornecidos; no entanto, eles relataram que aproximadamente 44 de 90 pacientes (49%) tinham menos de 50 anos. Entre esses pacientes, 6/90 (6,7%) foram identificados como MAP, com 5 (83,3%) com menos de 60 anos e 3 (50%) apresentando pólipos (os dados sobre pólipos não estavam disponíveis para os três pacientes restantes). Georgeson et al. (2022) analisaram o cenário de mutações somáticas em casos de CCR e encontraram que 143 de 5364 casos possuíam a mutação *KRAS-G12C*, com 16 (11%) identificados como MAP. Os dados clínicos para este estudo não foram especificados. Em contraste, Aimé et al. (2015) identificaram 25% (7/28) de pacientes *MUTYH* bialélicos em uma coorte *KRAS-G12C*/CCR de 2008 a 2012, sendo uma porcentagem maior em comparação a de nossas descobertas e as de outros estudos. No entanto, esse resultado pode ser tendencioso devido ao menor tamanho de sua coorte e à indisponibilidade de dados clínicos para todos os pacientes incluídos, o que seria de particular interesse, especialmente considerando a idade de início do CCR e a presença de pólipos. Como demonstrado neste estudo e em outros anteriores (Esperon et al. 2024, Thet et al. 2024),

pacientes MAP possuem uma média de idade de aparecimento do CCR menor e maior prevalência de pólipos; se a coorte estudada por Aimé et al. (2015) for preferencialmente mais jovem e/ou com pólipos, a tendência é que a detecção de MAP realmente seja maior.

Dois estudos que reportaram menor frequência de MAP em pacientes com CCR e *KRAS*-G12C são, curiosamente, provenientes da Rússia, realizados em colaboração entre centros localizados na mesma região (São Petersburgo). Volkov et al. (2020) e Imyanitov et al. (2022), ao realizarem o *screening* inicial do *MUTYH* em pacientes russos com CCR, utilizaram como base três variantes previamente identificadas como *hotspots* russas no estudo de Yanus et al. (2018), também de São Petersburgo: p.Gly396Asp, p.Tyr179Cys e p.Arg245His. As taxas de detecção encontradas foram de 4,73% (9/190) e 3% (7/223), respectivamente, valores inferiores aos observados em nosso estudo. Essa menor taxa de detecção nos estudos russos pode estar relacionada à maior frequência de mutações *KRAS*-G12C dentre todas as mutações *KRAS* em CCR na população avaliada, em comparação a outras regiões. Por exemplo, nos estudos conduzidos por Aimé et al. (2015) e Georgeson et al. (2022), na França e Austrália, a frequência de mutações *KRAS*-G12C entre todas as mutações *KRAS* foi de 2,1% e 2,4%, respectivamente, enquanto em nosso estudo foi de 2,9%. Em contraste, nos três estudos russos, as frequências foram razoavelmente maiores: 3,4%, 3,8% e 6,4%, superiores aos usualmente descritos na literatura. Esses achados podem sugerir a existência de mecanismos adicionais que contribuam para o aparecimento da mutação *KRAS*-G12C em CCR e a existência de outras VGP's comuns na população russa que não tenham sido detectadas e incluídas no *screening* inicial. Ainda, por serem estudos envolvendo o mesmo centro de pesquisa, não necessariamente se referem a evidências independentes, podendo haver uma sobreposição das coortes.

Como não existem muitos estudos que caracterizem VGP's em *MUTYH* encontradas em maior frequência na América Latina, é limitante fazer comparativos amplos. No entanto, as variantes mais frequentemente encontradas p.Tyr179Cys e p.Gly396Asp, observadas em nosso estudo nesta ordem de frequência, corroboram os achados do estudo brasileiro, em São Paulo, de Torrezan et al. (2013). Por outro lado, estudos como o de Rodriguez-Rojas et al. (2023), realizado na Colômbia, identificaram 11 pacientes com VGP's em *MUTYH*; destes, sete (63,6%) apresentavam a variante p.Gly396Asp e dois (18,1%) a variante p.Tyr179Cys. O estudo de Pitroski et al. (2011), que analisou a frequência dessas variantes em 5 pacientes com diagnóstico de CCR no sul do Brasil, também relatou maior frequência da p.Gly396Asp (60%) em comparação com a p.Tyr179Cys (40%), enquanto a p.Ala385fs foi identificada em um paciente (20%). O estudo de Esperon et al. (2024), citado na introdução como o maior

envolvendo centros de diferentes países da América Latina, também encontrou a p.Gly396Asp como a mais frequente, seguida pela p.Tyr179Cys, destacando uma diferença em relação aos nossos resultados. A maior frequência da variante p.Gly396Asp, também observada por outros grandes estudos fora da América Latina (Georgeson et al. 2022; Thompson et al. 2022; Paller et al. 2024), demonstra que essas diferenças podem refletir tanto uma questão de coorte quanto uma real diferença no espectro de VGPs em *MUTYH* da população brasileira, ou, pelo menos, do sudeste do país.

Ainda que os nossos achados de detecção de VGPs em *MUTYH* tenham se mostrado semelhantes aos poucos estudos existentes em literatura, é importante ressaltar que existem algumas limitações. Em 16 dos 25 pacientes com VGPs no gene, as variantes detectadas foram confirmadas como sendo de origem germinativa. Para o restante, embora variantes somáticas em *MUTYH* sejam raras (Paller et al. 2024), existe uma pequena possibilidade de que as variantes encontradas não sejam germinativas. Além disso, apenas três pacientes foram submetidos à PCR-AE por indisponibilidade de amostra de leucócito e/ou saliva, resultando na classificação de alguns pacientes como MAPs inferidos em vez de confirmados. Apesar da triagem das cinco variantes mais comuns no Brasil, é possível que alguns pacientes MAP e monoalélicos tenham sido perdidos devido a variantes patogênicas em outras regiões. Um exemplo é o ID22 (c.1227_1228dup; p.Glu410fs^{HT} / c.1012C>T; p.Gln338Ter^{HT}), o qual só foi identificado por um painel germinativo realizado anteriormente por solicitação da Oncogenética. Apesar disso, as 5 variantes selecionadas neste estudo exibiram alta sensibilidade, identificando a maioria dos pacientes MAP diagnosticados no ACCCC (12/14 pacientes – 85,7%). Isso pode se refletir para todo o país ou não, principalmente considerando que boa parte da nossa coorte é branca (74,5%) e que talvez essas variantes sejam menos frequentes em populações não majoritariamente brancas. Por fim, as coortes dos dois centros avaliadas em nosso estudo são enviesadas para pacientes em estágios mais avançados, uma vez que o encaminhamento médico no Brasil comumente ocorre meses após os sintomas iniciais, além de que painéis direcionados para genes com papel preditivo em CCR, incluindo *KRAS*, são geralmente realizados apenas para casos metastáticos (Yanus et al. 2018; Guimarães et al. 2021; Koulouridi et al. 2022). Assim, a verdadeira frequência de MAP dentro de uma coorte *KRAS*-G12C não selecionada pode ser distinta.

É importante destacar que apenas quatro dos 15 pacientes MAP haviam sido previamente submetidos a testes genéticos: ID10, ID21 e ID22 apresentaram um início precoce de câncer colorretal (32, 43 e 43 anos, respectivamente), juntamente com um fenótipo de polipose e/ou histórico familiar de CCR e/ou outros tumores primários; o paciente ID24,

por sua vez, foi diagnosticado em uma idade mais avançada (68 anos), mas exibiu um fenótipo de polipose e relatou consanguinidade. Em contraste, outros pacientes, como ID2, ID5 e ID25, apesar de apresentarem início precoce do CCR (27, 44 e 49 anos, respectivamente) e histórico familiar de CCR (ID2 e ID25), não foram atendidos pelo serviço de Oncogenética. Nossos dados demonstram como a MAP ainda é uma condição subdiagnosticada seguindo os critérios atuais para a realização de testes germinativos, reforçando a importância da identificação de biomarcadores que possam facilitar o diagnóstico.

A utilização de *KRAS*-G12C como biomarcador para identificar pacientes com suspeita de MAP facilitaria o seu diagnóstico, visto que a MAP possui grande variação de fenótipos, sendo em alguns casos semelhante a outras síndromes como FAP e AFAP e em outros podendo ser confundida com casos de CCR esporádico, quando não há histórico familiar de câncer ou pólipos intestinais. Além disso, o valor prognóstico e preditivo do teste somático para identificação de mutações no gene *KRAS* faz com que ele seja realizado rotineiramente nos pacientes com CCR metastático e em outros cenários específicos, por meio da realização de pequenos painéis direcionados de NGS de baixo custo ou perfis genômicos abrangentes. Por outro lado, o exame de detecção da MAP se dá pelo sequenciamento completo do gene *MUTYH*, teste que, por ser custoso, somente é realizado quando há uma suspeita clínica de MAP (Aimé et al. 2015; Koulouridi et al. 2022).

6.2 Dados clínicos e anatomopatológicos de pacientes com e sem VGPs em *MUTYH*

Nossos achados demonstraram que pacientes com VGPs em *MUTYH* apresentam menor idade de aparecimento do CCR (p-valor = 0,002) e maior prevalência de pólipos (p-valor = 0,005) em comparação com pacientes sem VGPs no gene, dados similares aos de outros estudos (Nielsen, Infante, Brand, 2021; Esperon et al. 2024). Porém, apesar da diferença estatisticamente significativa encontrada em relação a pólipos e da MAP ser considerada uma polipose atenuada, em literatura, cerca de 1/3 dos pacientes podem apresentar CCR isoladamente, sem pólipos concomitantes ou com menos de 10 ao exame clínico (Nielsen, Infante, Brand, 2021; Thet et al. 2024). Em nossa coorte, também encontramos que aproximadamente 1/3 dos pacientes (5/13 - 38,4%) não apresentaram um fenótipo clássico de polipose. Visto que o rol da ANS (2021) e os *guidelines* mais recentes da NCCN delimitam a polipose para recomendar a testagem germinativa do *MUTYH* nos

serviços de saúde, nossos dados mostram que considerar esse requisito para a realização de testes genéticos gera uma falha em detectar uma parcela dos pacientes com fenótipo mais brando.

A diferença de fenótipos em portadores de variantes patogênicas em *MUTYH* pode ser atribuída à penetrância, expressividade e ao impacto funcional dessas alterações. Al Tassan et al. (2002), quando caracterizaram a MAP pela primeira vez, demonstraram que a variante p.Tyr179Cys reduz a atividade gênica em 98%, comprometendo o domínio pseudo-HhH (essencial na remoção da adenina) e resultando em uma proteína instável, enquanto a p.Gly396Asp reduz a atividade em 86%, gerando uma proteína parcialmente funcional. Posteriormente, estudos funcionais avaliaram que a p.Tyr179Cys está relacionada a um fenótipo mais agressivo, a um início mais precoce do CCR e a uma maior frequência da assinatura mutacional SBS18 (Barreiro et al. 2022; Thet et al. 2024). De fato, dos cinco pacientes MAP que não apresentavam polipose, somente um apresentou a variante p.Tyr179Cys em heterozigose composta, enquanto os outros apresentavam outras variantes em homozigose ou heterozigose composta. Variantes que tendem a prejudicar consideravelmente a funcionalidade da proteína, como as *frameshifts* e a deleção dos éxons 4 a 16, estavam presentes em pacientes com fenótipo de polipose severa (ID14, ID21 e ID22); em contraste, os pacientes ID2 e ID5, mesmo possuindo a deleção em homozigose, apresentaram apenas um e dois pólipos, respectivamente. Pelo fato de diferentes pacientes com a mesma VGP apresentarem características clínicas distintas, supõe-se que a heterogeneidade fenotípica esteja relacionada não somente com fatores genéticos, mas também com epigenéticos e ambientais (Thet et al. 2024).

Como nossa coorte MAP é limitada, não foi possível avaliar de maneira significativa o espectro de tumores extracolônicos que ocorrem em MAP. Em literatura, foi demonstrado que esses pacientes podem possuir um aumento de risco de desenvolver alguns cânceres extracolônicos em relação à população saudável, principalmente o de ovário e bexiga. Os outros tumores primários que os dois pacientes de nossa coorte apresentaram, sendo um caso de pulmão e um angiomíolipoma renal, não são frequentemente relatados em estudos que avaliam cânceres não colorretais associados à MAP, e, quando são, não apresentam associação estatisticamente significativa (Vogt et al. 2009; Win et al. 2016). Ainda, angiomíolipomas renais são frequentemente benignos e de causa esporádica (Skelton, Leslie, 2024). Outros estudos já reportaram tumores fora do espectro conhecido para a MAP, como Villy et al. (2023), que reportaram o primeiro caso de um paciente MAP com meduloblastoma, e Guarrera, Prezzano, Mannava (2024), que descreveram um caso de um

paciente MAP com múltiplos sebaceomas, em um fenótipo semelhante ao de Muir-Torre. Porém, os cânceres ocorridos aqui podem se tratar tanto de casos esporádicos como terem relação com VGPs em outros genes, sem necessariamente ter uma relação com *MUTYH*.

Existem alguns pontos na nossa coorte que devem ser ressaltados. A alta incidência de histórico familiar para outros cânceres (84,6%; p-valor = 0,014) observado na coorte MAP, por exemplo, é um dado complicado de se explorar neste estudo. Grande parte da literatura aborda o histórico familiar de pacientes MAP apenas em relação à ocorrência do próprio CCR ou de adenomas em familiares, não trazendo informações relevantes sobre a ocorrência de outros cânceres. Isso pode ser tanto pela ausência de casos como por não abordar a informação, já que o CCR é o mais relevante para essa síndrome. Ademais, nenhum dos familiares dos pacientes do nosso estudo foi submetido a um teste germinativo, podendo se tratar de casos esporádicos ou não. Outro ponto é a localização tumoral: em literatura, enquanto tumores colorretais em pacientes esporádicos são mais frequentemente encontrados no lado esquerdo ou distal, em MAP, os tumores acometem com maior frequência o lado direito ou proximal, o qual engloba o ceco e os cólons ascendente e transversos. Em nossa coorte MAP, encontramos que um pouco mais da metade (57,1%) dos pacientes apresentaram tumores do lado esquerdo; porém, além dessa frequência mais prevalente no lado direito poder variar entre 29% a 69% (Curia, Catalano, Aceto, 2020), nossa coorte de pacientes com CCR e *KRAS-G12C* é composta primariamente por pacientes com tumores do lado esquerdo, o que pode gerar um viés.

A maior prevalência de CCR metastático (p-valor = 0,006) e estágio IV (p-valor = 0,029) em pacientes sem VGPs pode ser explicada por algumas razões. Tumores com *MUTYH* inativo tendem a apresentar um bom prognóstico por conta da alta infiltração linfocitária, o que reflete em uma resposta imune mais acentuada contra as células tumorais e, consequentemente, em uma menor chance de evoluir para metástase (Yanus et al. 2018; Disel et al. 2024). Ainda, cerca de metade dos pacientes MAP possuem polipose, o que pode levar a um rastreamento preventivo mais frequente e, por conseguinte, a um diagnóstico mais precoce, em comparação a pacientes sem histórico de adenomas. Por fim, nenhum paciente MAP com teste de IHQ para as proteínas MMR e/ou teste de MSI apresentou perda nas proteínas ou instabilidade, característica que, segundo a literatura, é esperada para a maioria desses pacientes (Nielsen, Infante, Brand, 2021).

6.3 Inibidores de *KRAS*-G12C e Imunoterapia em pacientes MAP

O primeiro medicamento anti-*KRAS* G12C aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) foi o Sotorasibe, o qual não apresentou resultados tão eficazes em monoterapia para CCR quando comparados aos observados no câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC) com *KRAS*-G12C mutado. O Adagrasibe, segundo medicamento a entrar no cenário clínico, seguiu na mesma linha, não apresentando resultados tão satisfatórios em monoterapia para o tratamento de CCR. Por esse motivo, novos ensaios clínicos testando a eficácia da combinação de inibidores de *KRAS*-G12C com outras terapias, como anti-EGFR e imunoterapias, têm sido desenvolvidos de forma a atingir respostas maiores nesses pacientes. Alguns exemplos são as combinações de Sotorasibe + Panitumumabe (NCT04185883 CodeBreak 101 Phase I), Adagrasibe + Cetuximabe (NCT03785249 KRYSTAL-1 Phase I) e Adagrasibe + Pembrolizumabe (NCT04613596 KRYSTAL-7), os quais apresentaram taxas de resposta objetiva de 30%, 46% e 49%, respectivamente (Piazza et al. 2024). Não é de nosso conhecimento estudos que tenham avaliado a eficácia dos inibidores de *KRAS*-G12C particularmente em CCR de pacientes MAP. Todavia, caso essas combinações futuramente sejam aplicadas na clínica, estes pacientes poderiam ser beneficiados, principalmente quando pensamos na combinação de Adagrasibe + imunoterápico (Pembrolizumabe), já que conforme apresentado na seção 1.4.1, pacientes MAP aparentam ter uma maior infiltração linfocitária tumoral.

Neste contexto, a imunoterapia tem recentemente emergido como uma possibilidade de tratamento para pacientes MAP. Volkov et al. (2020) já havia descrito anteriormente que CCR de pacientes MAP apresentam uma infiltração linfocitária de células CD8+ comparável à observada em tumores MSI-H, ainda que com poucos pacientes avaliados. Posteriormente, Georgeson et al. (2021) identificaram um valor de TMB mais alto (>10 mutações/Mb) em *MUTYH* bialélicos em comparação a *MUTYH* wild-type com CCR MMR proficientes, o que estimulou investigações posteriores. Disel et al. (2024) demonstraram que amostras de CCR de pacientes com alterações germinativas em *MUTYH* foram correlacionadas com um valor de TMB médio (10-20 mutações/Mb). Especificamente, de 563 amostras, 135 foram classificadas como TMB-High (>=10 mutações/Mb), das quais 85 (63%) apresentaram >20 mutações/Mb. Em consonância, Paller et al. (2024) identificaram 27% (aproximadamente 32/119) das amostras bialélicas germinativas com pelo menos 10 mutações/Mb, apesar de nem todas serem de CCR. Em relação à expressão do ligante de morte programada 1 (PD-L1), outro biomarcador de predição de resposta à imunoterapia, Disel et al (2024) não

identificaram associação. No entanto, Permata et al. (2019) demonstraram que a deficiência da via BER está associada a uma maior regulação positiva de PD-L1; ainda, relataram que dados do TCGA indicam que sua expressão em tumores é negativamente correlacionada com a expressão de mRNAs de genes da via, e que tumores mutados para qualquer um dos genes BER apresentam alta expressão de neoantígenos em comparação com amostras não mutadas para esses genes. Apesar dos valores de TMB e expressão de PD-L1 variarem entre os estudos, é interessante que pesquisas clínicas futuras avaliem a eficácia da imunoterapia para beneficiar pelo menos parte dos pacientes MAP.

Até o momento, três estudos de caso de pacientes MAP submetidos à imunoterapia foram publicados. O primeiro, de Volkov et al. (2020), relatou o caso de uma paciente russa de 66 anos heterozigota composta para as variantes p.Tyr179Cys e p.Gly396Asp, sem pólipos e com dois CCR metacrônicos, sendo o segundo positivo para a mutação *KRAS*-G12C. Após a avaliação de um alto nível de infiltração de linfócitos nos seus tecidos tumorais, a paciente foi submetida ao tratamento experimental com Nivolumabe. As varreduras de tomografia computadorizada feitas posteriormente demonstraram uma redução contínua do tumor, e, até o momento descrito no artigo, a paciente permaneceu com o tratamento por um período de sete meses sem evidência de progressão da doença.

O segundo caso, de Mathias-Machado et al. (2023), avaliou uma paciente brasileira de 21 anos homozigota para a variante p.Tyr179Cys sem histórico familiar de câncer e com antecedente pessoal de CCR e adenocarcinomas primários de pulmão e estômago. A IHQ não revelou perda das proteínas de reparo no adenocarcinoma gástrico e a coloração PD-L1 demonstrou alta expressão do biomarcador. Após a recusa da paciente pela quimioterapia e a infiltração linfocitária com alta expressão de PD-L1, a equipe médica iniciou o tratamento com Pembrolizumabe em janeiro de 2021. A paciente obteve resposta clínica completa em 2023 e permaneceu em remissão até o momento em que foi descrito no estudo. A caracterização tumoral feita posteriormente demonstrou mutações somáticas em diversos genes, incluindo *KRAS*-G12C e *PIK3CA*-Q546K, além de MSS e TMB de 26,5 mutações/Mb.

Por fim, o terceiro caso, de Disel et al. (2024), apresentou uma paciente de 38 anos com CCR metastático para o fígado e histórico familiar de CCR em dois parentes de primeiro grau. A paciente possuía uma VGP em *MUTYH* e a assinatura mutacional SBS18; porém, os autores não relataram qual variante ou se apresentava LOH. Após biópsia do tumor, houve a identificação de um *score* de proporção tumoral PD-L1 de 80% e um valor de TMB de 16 mutações/Mb, além da mutação somática *KRAS*-G12C. Ao esquema FOLFOX-6 que já estava em andamento, foi acrescentado Nivolumabe; posteriormente, foi administrada radioterapia

no reto em conjunto com o Nivolumabe e infusão contínua de 5-fluorouracil. Por fim, foram realizadas radioterapia, cirurgia retal curativa e ressecção da metástase no fígado, além da administração de Nivolumabe de manutenção. Não houve evidência de doença em 24 meses após o diagnóstico. Esses relatos demonstram que o diagnóstico de MAP pode potencialmente apresentar um papel preditivo, reforçando a relevância de estratégias para a detecção desses pacientes.

6.4 Pacientes monoalélicos

Variantes patogênicas monoalélicas em *MUTYH* encontradas em pacientes oncológicos permanecem controversas em relação à sua associação com risco de câncer, implicações clínicas e tratamento do paciente. Conforme abordado anteriormente, as diretrizes atuais da NCCN não recomendam triagem específica para indivíduos com variantes monoalélicas, a menos que tenham histórico familiar ou de primeiro grau para CCR ou pólipos (NCCN, 2024). Estudos recentes não identificaram um aumento de risco para CCR, endométrio e mama, por exemplo, apoiando essas diretrizes (Fulk et al. 2019; Thompson et al. 2022), no entanto, outros sugerem um aumento de risco baixo a moderado para vários tipos de câncer, como o adrenal, sarcoma, mama, esofágico e outros (Win et al. 2017; Barreiro et al. 2022; Paller et al. 2024). Em nossa coorte, apenas um paciente dos casos monoalélicos apresentou um segundo tumor primário (um carcinoma basocelular nodular ulcerado aos 75 anos).

É importante lembrar que todos os pacientes da coorte geral eram pacientes com CCR e mutação somática *KRAS*-G12C; uma vez que esta ocorre em frequência extremamente baixa em casos esporádicos, está altamente relacionada com as transversões geradas pela falha do *MUTYH* na via BER e que muitos estudos demonstraram que variantes monoalélicas no gene não podem, por si só, levar ao desenvolvimento do CCR, conclui-se que o alelo selvagem deva ser, de alguma maneira, inativado. Dentre os mecanismos sugeridos, como segundos *hits* somáticos, variantes patogênicas em regiões não cobertas por painéis germinativos comuns, VUS concomitante em *MUTYH* que pode, na realidade, ser patogênica, efeitos sinérgicos com VGPs em outros genes relacionados ao CCR, como *NTHL1*, *MSH3*, *MSH6* e *POLE*, a LOH do alelo selvagem no tumor é o mais amplamente aceito e demonstrado por outros estudos (Schubert et al. 2020; Dell'Elice et al. 2021; Barreiro et al. 2022; Georgeson et al. 2022; Paller et al. 2024). Em nossa análise de LOH, quatro pacientes (ID6, ID11, ID17 e ID20), os quais representam 40% da coorte monoalélica, exibiram LOH, o

que demonstra que esse processo é comum como mecanismo de perda do alelo selvagem. O valor encontrado é bem maior do que os reportados por estudos como o de Georgeson et al. (2022) (4%) e Paller et al. (2024) (12%) e em coortes como a *Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes* (0/60) e o TCGA (69/583 – 12%), porém, como dito anteriormente, a coorte selecionada em nosso estudo apresenta *KRAS*-G12C, o que já é um indício da existência de mecanismos inativadores do alelo selvagem do *MUTYH*. Para os pacientes sem LOH com resultado de painel, não foram identificadas VGPs em outros genes que poderiam explicar o desenvolvimento neoplásico; assim, com base na discussão de literatura, casos não explicados por LOH podem ter relação com outros mecanismos que não foram explorados neste estudo.

Em relação à idade, pacientes monoalélicos não diferiram estatisticamente nem do grupo bialélico (p-valor = 0,637) e nem do grupo sem VGPs em *MUTYH* (p-valor = 0,394). Já em relação à prevalência de pólipos, os pacientes monoalélicos parecem ser mais semelhantes aos bialélicos, com maior prevalência de pólipos em relação à população sem VGPs (p-valor = 0,019). Nossos achados contrastam com os de Patel et al. (2021). Neste estudo retrospectivo, os autores analisaram dados de 125 pacientes monoalélicos confirmados por teste genético entre 1994 e 2019. Destes, apenas 28 (22,4%) desenvolveram pólipos, o que os autores concluíram ser um valor similar ao encontrado em coortes da população geral (20-30%). Porém, além de ter se tratado de um estudo unicêntrico (observando apenas o ACCCC, por exemplo, também não foi vista diferença estatisticamente significativa entre os grupos), os pacientes monoalélicos analisados eram relativamente mais jovens do que os selecionados nas coortes da população geral citadas. Ademais, 66% da coorte eram descendentes de indianos Gujerati, carreadores da variante NM_001128425.2:c.1438G>T; p.Glu480Ter; assim, há a probabilidade de ser observado um fenótipo distinto dos encontrados em outras populações.

6.5 Frequência de *KRAS*-G12C e *PIK3CA*-Q546K e reclassificação de VUS

A alta frequência de *KRAS*-G12C em tumores de pacientes MAP não é uma associação recente. O estudo de Lipton et al. (2003), um dos primeiros a investigar a carcinogênese mediada pelo *MUTYH*, identificou a mutação em 9 de 14 (64%) CCR e 13 de 30 (43%) adenomas de pacientes MAP. Alguns anos depois, outros estudos relataram a presença da mutação em frequências variáveis, entre 18-62% nos adenomas e 16-80% nos adenocarcinomas (Jones et al., 2004; Venesio et al., 2013; Castillejo et al., 2014; Guarinos et al., 2014; Aimé et al. 2015). Esses estudos mais antigos apresentavam uma variação

considerável na frequência de *KRAS*-G12C, em especial em adenocarcinomas, possivelmente devido à utilização de técnicas de detecção mais antigas, como o pirosequenciamento e métodos baseados em eletroforese capilar, os quais necessitam de frequências alélicas maiores para detectar a mutação apropriadamente (Zhu et al. 2021). De qualquer forma, os valores obtidos já eram considerados relevantes quando comparados aos 2-3% descritos na literatura para CCR com *MUTYH* selvagem (van Puijenbroek et al. 2008; Georgeson et al. 2022).

Posteriormente, estudos mais amplos e/ou que utilizaram tecnologias mais robustas, como o de Viel et al. (2017), Furlan et al. (2017) e Georgeson et al. (2022), identificaram taxas maiores de detecção de *KRAS*-G12C em adenocarcinomas MAP, sendo os valores encontrados de 70,5%, 89% e 84%, respectivamente; em adenomas, o estudo mais recente identificou a mutação em 66,7% (Walker et al. 2025). Nossos achados mostraram que 47% dos adenomas e 92,3% dos CCR de MAP são mutados para *KRAS*-G12C. Esses resultados corroboram os achados da literatura e são esperados, uma vez que mutações em *KRAS* comumente ocorrem na passagem do adenoma em estágio inicial para um estágio mais intermediário/avançado (Walther et al. 2009). Assim, a depender do grau do adenoma analisado (em nosso estudo, por exemplo, apenas um era de alto grau), a mutação pode estar presente ou não; já em adenocarcinomas, é esperado que ela esteja presente na maior parte dos casos, apresentando alta sensibilidade (92,3%), especificidade (97,6%) e acurácia (97,6%) na detecção de pacientes MAP.

No que se refere à *PIK3CA*-Q546K e MAP, a primeira relação foi feita no estudo de Georgeson et al. (2022), citado na introdução, o qual demonstrou pela primeira vez o enriquecimento dessa mutação (37%) em MAP em comparação a pacientes sem VGPs (0,7%) no *MUTYH*. Estudos anteriores já haviam detectado essa mutação em uma frequência maior, porém, apesar de ela ser rara (0,4-3,5%) em coortes de CCR de artigos e do TCGA, o dado não foi explorado (Fu et al. 2021). Viel et al. (2017), por exemplo, analisaram o espectro mutacional de oncogenes e GSTs envolvidos na carcinogênese colorretal e associados ao *MUTYH* inativo. Nesse estudo, *PIK3CA*-Q546K foi encontrada em 4/17 (23,5%) dos adenocarcinomas e 2/26 (7,7%) dos adenomas. O estudo de Furlan et al. (2017), por sua vez, ao analisar 10 adenocarcinomas de pacientes MAP para avaliar as características genéticas e epigenéticas iniciais em lesões colorretais, identificou a mutação em 2/10 (20%) adenocarcinomas. Nossos resultados estão de acordo com o encontrado em literatura, com 5/13 (38,4%) dos adenocarcinomas MAP mutados para *PIK3CA*-Q546K, um achado mais próximo ao de Georgeson et al. (2022). Nenhum dos 17 adenomas analisados apresentou a mutação, assim como encontrado no estudo de Walker et al. (2025) – 0 adenomas de 27

analisados; entretanto, este achado é esperado, uma vez que mutações em *PIK3CA* tendem a ocorrer mais tardiamente na carcinogênese colorretal, quando o adenoma já está progredindo para adenocarcinoma (Ottaiano et al. 2021). Dessa forma, praticamente nenhum paciente MAP seria identificado tentando detectar apenas *PIK3CA*-Q546K no adenoma, assim como muitos não seriam identificados no tumor (sensibilidade = 38,4%).

O gene *PIK3CA* pode apresentar mutações simultâneas com *KRAS* em MAP, como evidenciado por Furlan et al. (2017), que apontaram essa co-ocorrência como suporte para a carcinogênese acelerada em pacientes MAP. Embora a condição tenha sido inicialmente comparada à AFAP, o risco de desenvolvimento de CCR não está necessariamente relacionado à presença de adenomas, visto que muitos pacientes desenvolvem o câncer mesmo na ausência de pólipos. Outros fatores também reforçam a ideia de progressão tumoral acelerada: uma proporção considerável de pacientes MAP desenvolve CCR na primeira década após o diagnóstico inicial da polipose; mais de 1/3 dos pacientes submetidos à ressecção parcial necessitam de cirurgia secundária em curto prazo; o risco de CCR metacrônico em 5 anos é de 9-11%; e os adenomas MAP apresentam de duas a quatro vezes mais mutações somáticas na região codificadora do que os adenomas FAP. Esses dados sugerem que a inativação bialélica do *MUTYH* leva a um *mutator phenotype*, caracterizado por uma alta taxa de mutações no DNA, promovendo a carcinogênese acelerada (Nieuwenhuis et al. 2012; Rashid et al. 2016). Furlan et al. (2017) observaram a co-ocorrência de mutações em *KRAS* e *PIK3CA* em mais de um terço dos pacientes, com *KRAS*-G12C e *PIK3CA*-Q546K encontrados em 25% (2/8). De forma semelhante, identificamos a co-ocorrência de *KRAS*-G12C e *PIK3CA*-Q546K em 25% (4/16) dos pacientes, valor que aumenta para 31,2% ao incluir um caso com *KRAS*-G12C e *PIK3CA*-Q546H. A detecção de qualquer uma das duas mutações em adenocarcinomas identifica todos os pacientes MAP (sensibilidade = 100%), uma vez que todos os 13 CCR testados apresentavam pelo menos uma das duas *hotspots*.

Conforme demonstrado por Georgeson et al. (2022), apesar de a detecção das assinaturas mutacionais SBS18 e SBS36 apresentarem maior especificidade (100%) e acurácia (100%) em comparação com os valores obtidos neste estudo detectando as mutações *KRAS*-G12C e *PIK3CA*-Q546K em adenocarcinomas (96,9% e 97%, respectivamente), a detecção das *hotspots* é bem mais viável financeiramente quando comparada à análise de assinaturas, a qual necessita da realização de exoma ou genoma completo. Esses dados, portanto, apoiam a utilização de adenocarcinomas como um bom material para a análise de *KRAS*-G12C/*PIK3CA*-Q546K e reclassificação de VUS em *MUTYH*. No que se refere aos

adenomas, *KRAS*-G12C está presente de maneira variável, enquanto *PIK3CA*-Q546K praticamente inexistente, o que faria este material não ser o ideal no contexto de reclassificação de variantes. Porém, recentemente, Walker et al. (2025) detectaram as assinaturas SBS18 e SBS36 em adenomas MAP em proporções equivalentes às aquelas encontradas nos adenocarcinomas MAP, além de serem proporções significativamente maiores às observadas em casos de adenomas/CCR não hereditários. Assim, apesar de ser uma alternativa mais cara, a detecção de assinaturas mutacionais em adenomas é interessante para a reclassificação de VUS em *MUTYH* e para a detecção precoce da MAP, fazendo com que pacientes que ainda não desenvolveram um tumor possam ter um acompanhamento personalizado. Ainda, mesmo a detecção de *KRAS*-G12C de maneira isolada em adenomas pode ser mais eficiente quando mais de um adenoma (de alto e baixo grau) puder ser avaliado e for positivo para essa mutação.

Considerando o exposto, a detecção das *hotspots* especificamente nos adenocarcinomas de pacientes com VUS + VGP em *MUTYH* foi considerada para a pontuação da evidência PP4, conforme explicado na seção 1.4.3. Das três pacientes avaliadas, duas tiveram suas VUS reclassificadas; a probanda com a VUS p.Lys450Met não apresentava adenocarcinoma disponível para a análise e as evidências pontuadas (*PM2_supp* + *PP3_moderate*) não suportam a reclassificação. Essa variante foi reportada apenas uma vez no ClinVar pelo mesmo laboratório particular que realizou o teste de nosso caso, o qual a classificou como VUS. A segunda probanda com a variante p.Pro301Arg apresentou *KRAS*-G12C em seu adenocarcinoma e pôde ser reclassificada para provavelmente patogênica (*PP3_strong* + *PM2_supp* + *PM3_supp* + *PP4_moderate*). Não há submissões dessa variante no ClinVar e não a encontramos em artigos da literatura. Por fim, a terceira probanda com a variante p.Trp113Arg apresentou tanto *KRAS*-G12C como *PIK3CA*-Q546K em seu adenocarcinoma e também pôde ser reclassificada para provavelmente patogênica (*PM2_supp* + *PP3_moderate* + *PM3_supp* + *PP4_moderate*). A variante foi reportada pela primeira vez no estudo de McVeigh et al. (2017), o qual a detectou em dois pacientes em heterozigose composta com a variante patogênica p.Tyr179Cys: um deles com polipose e CCR diagnosticado aos 36 anos e o outro também com polipose. Posteriormente, foi reportada por dois laboratórios no ClinVar, os quais a classificaram como VUS.

7 CONCLUSÕES

Nós demonstramos que pacientes com CCR e *KRAS*-G12C apresentam uma maior taxa de detecção (11,4%) de VGPs no gene *MUTYH* e que a presença dessa mutação deve ser considerada como biomarcador para a realização do sequenciamento completo do gene e possível diagnóstico da MAP, uma vez que aumenta sua identificação (6,8%), especialmente entre pacientes abaixo de 60 anos (10,9%). Os pacientes monoalélicos para *MUTYH* representaram 4,5% de toda a coorte, com quase a metade (40%) apresentando LOH como mecanismo de inativação do alelo selvagem. Todas as cinco variantes mais presentes na população brasileira foram encontradas em nossos pacientes, com as frequências de 40% (p.Tyr179Cys), 28% (p.Gly396Asp), 20% (p.Ala385fs) e 12% (deleção dos éxons 4 a 16 e p.Arg241Trp).

Em relação às características clínicas e anatomopatológicas, pacientes MAP tendem a apresentar uma idade de diagnóstico do CCR menor e maior prevalência de pólipos em comparação a pacientes sem VGPs em *MUTYH*, dados concordantes com outros estudos, ainda que alguns pacientes da nossa coorte não tenham seguido esse padrão. Outro achado também foi um maior histórico familiar para outros cânceres não colorretais em pacientes MAP, apesar de ter sido pouco explorado neste estudo principalmente pela falta de dados mais detalhados dos familiares, incluindo dados germinativos. Estadiamento e metástase também apareceram com valores estatisticamente significativos, apresentando maior prevalência do estágio IV e metástase em pacientes sem VGPs. Pacientes monoalélicos se assemelharam aos bialélicos em relação à presença de pólipos, diferindo do grupo *MUTYH* selvagem (p-valor = 0,019); porém, os outros dados clínicos e anatomopatológicos analisados dos pacientes monoalélicos não demonstraram diferenças estatisticamente significativas nem quando comparados ao grupo bialélico e nem ao grupo sem VGPs em *MUTYH*.

Por fim, a alta frequência de *KRAS*-G12C (92,3%) e *PIK3CA*-Q546K (38,4%) em adenocarcinomas de pacientes MAP, em comparação à frequência identificada em pacientes esporádicos da literatura (2,4% e 0,7%, respectivamente), demonstrou sua aplicação na reclassificação de VUS em *MUTYH*, identificando todos os pacientes MAP do grupo controle positivo (sensibilidade = 100%). Dos três pacientes suspeitos para MAP avaliados neste estudo com VUS no gene, as VUS de dois pacientes (p.Pro301Arg e p.Trp113Arg) puderam ser reclassificadas para provavelmente patogênicas considerando a identificação de *KRAS*-G12C e/ou *PIK3CA*-Q546K em seus adenocarcinomas.

REFERÊNCIAS

- Aelvoet AS, Buttitta F, Ricciardiello L, Dekker E. Management of familial adenomatous polyposis and MUTYH-associated polyposis; new insights. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2022 Jun-Aug;58-59:101793.
- Agência Nacional de Saúde Suplementar: Rol de Procedimentos e Eventos em Saúde: Anexo II - Diretrizes de Utilização para Cobertura de Procedimentos na Saúde Suplementar (RN 465/2021 e suas alterações). 2021.
- Aiderus A, Barker N, Tergaonkar V. Serrated colorectal cancer: preclinical models and molecular pathways. *Trends Cancer*. 2024 Jan;10(1):76-91.
- Alexandrov LB, Kim J, Haradhvala NJ, Huang MN, Tian Ng AW, Wu Y et al. Mutational Signatures Working Group; Getz G, Rozen SG, Stratton MR; PCAWG Consortium. The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature*. 2020 Feb;578(7793):94-101.
- Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013 Aug 22;500(7463):415-21.
- Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT et al. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet*. 2002 Feb;30(2):227-32.
- Barreiro RAS, Sabbaga J, Rossi BM, Achatz MIW, Bettoni F, Camargo AA. et al. Monoallelic deleterious MUTYH germline variants as a driver for tumorigenesis. *J Pathol*. 2022 Feb;256(2):214-222.
- Brenner H, Heisser T, Cardoso R, Hoffmeister M. Reduction in colorectal cancer incidence by screening endoscopy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2024 Feb;21(2):125-133.
- Castillejo A, Vargas G, Castillejo MI, Navarro M, Barberá VM, González S et al. Prevalence of germline MUTYH mutations among Lynch-like syndrome patients. *Eur J Cancer*. 2014 Sep;50(13):2241-50.
- Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*. 2017 Jun;58(5):235-263.

Chong W, Zhu X, Ren H, Ye C, Xu K, Wang Z et al. Integrated multi-omics characterization of KRAS mutant colorectal cancer. *Theranostics*. 2022 Jul 4;12(11):5138-5154.

Curia MC, Catalano T, Aceto GM. *MUTYH*: Not just polyposis. *World J Clin Oncol*. 2020 Jul 24;11(7):428-449.

David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*. 2007 Jun 21;447(7147):941-50.

Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet*. 2019 Oct 19;394(10207):1467-1480.

Dell'Elice A, Cini G, Fornasarig M, Armelao F, Barana D, Bianchi F. et al. Filling the gap: A thorough investigation for the genetic diagnosis of unsolved polyposis patients with monoallelic *MUTYH* pathogenic variants. *Mol Genet Genomic Med*. 2021 Dec;9(12):e1831.

Disel U, Sivakumar S, Pham T, Fleischmann Z, Anu RI, Sokol ES et al. Increased KRAS G12C Prevalence, High Tumor Mutational Burden, and Specific Mutational Signatures Are Associated With *MUTYH* Mutations: A Pan-Cancer Analysis. *Oncologist*. 2024 Feb 2;29(2):e213-e223.

Esperon P, Neffa F, Pavicic W, Spirandelli F, Alvarez K, Mullins MJ. et al. A comprehensive characterization of the spectrum of *MUTYH* germline pathogenic variants in Latin America. *Fam Cancer*. 2024 Apr 30.

Fatkin D, Johnson R. Variants of Uncertain Significance and "Missing Pathogenicity". *J Am Heart Assoc*. 2020 Feb 4;9(3):e015588.

Fu X, Lin H, Fan X, Zhu Y, Wang C, Chen Z et al. The Spectrum, Tendency and Predictive Value of *PIK3CA* Mutation in Chinese Colorectal Cancer Patients. *Front Oncol*. 2021 Mar 26;11:595675.

Fulk K, LaDuca H, Black MH, Qian D, Tian Y, Yussuf A et al. Monoallelic *MUTYH* carrier status is not associated with increased breast cancer risk in a multigene panel cohort. *Fam Cancer*. 2019 Apr;18(2):197-201.

Furlan D, Trapani D, Berrino E, Debernardi C, Panero M, Libera L et al. Oxidative DNA damage induces hypomethylation in a compromised base excision repair colorectal tumourigenesis. *Br J Cancer*. 2017 Mar 14;116(6):793-801.

Guarrera J, Prezzano JC, Mannava KA. Sebaceomas in a Muir-Torre-like Phenotype in a Patient with MUTYH-Associated Polyposis. *Dermatopathology (Basel)*. 2024 Mar 4;11(1):124-128.

Georgeson P, Harrison TA, Pope BJ, Zaidi SH, Qu C, Steinfeld RS. et al. Identifying colorectal cancer caused by biallelic *MUTYH* pathogenic variants using tumor mutational signatures. *Nat Commun*. 2022 Dec;13(1):3254.

Georgeson P, Pope BJ, Rosty C, Clendenning M, Mahmood K, Joo JE et al. Evaluating the utility of tumour mutational signatures for identifying hereditary colorectal cancer and polyposis syndrome carriers. *Gut*. 2021 Nov;70(11):2138-2149.

Gomes AAD, Macedo MP, Torrezan GT, Zenun GR, Aguiar S, Begnami MD. et al. DNA Mismatch Repair–Deficient Colorectal Carcinoma: Referral Rate for Genetic Cancer Risk Assessment in a Brazilian Cancer Center. *J Gastrointest Cancer*. 2021 Sep;52(3):997–1002.

Guarinos C, Juárez M, Egoavil C, Rodríguez-Soler M, Pérez-Carbonell L, Salas R et al. Prevalence and characteristics of MUTYH-associated polyposis in patients with multiple adenomatous and serrated polyps. *Clin Cancer Res*. 2014 Mar 1;20(5):1158-68.

Guimarães DP, Mantuan LA, de Oliveira MA, Junior RL, Costa AMD, Rossi S. et al. The Performance of Colorectal Cancer Screening in Brazil: The First Two Years of the Implementation Program in Barretos Cancer Hospital. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2021 Feb;14(2):241-252.

Imyanitov E, Martianov A, Chuinyshena S, Gorgul Y, Kuligina ES, Laidus T et al. 356P Biallelic MUTYH germline inactivation in patients with colon polyposis and subjects with sporadic colorectal cancer. *Annals of Oncology*. 2022 Sep;33(7):S698-S699.

Jones S, Lambert S, Williams GT, Best JM, Sampson JR, Cheadle JP. Increased frequency of the k-ras G12C mutation in MYH polyposis colorectal adenomas. *Br J Cancer*. 2004 Apr 19;90(8):1591-3.

Kidambi TD, Goldberg D, Nussbaum R, Blanco A, Umetsu SE, Terdiman JP. et al. Novel variant of unknown significance in *MUTYH* in a patient with *MUTYH*-associated polyposis: a case to reclassify. Clin J Gastroenterol. 2018 Dec;11(6):457-460.

Koulouridi A, Karagianni M, Messaritakis I, Sfakianaki M, Voutsina A, Trypaki M. et al. Prognostic Value of *KRAS* Mutations in Colorectal Cancer Patients. Cancers. 2022 Jul 7;14(14):3320.

Kucab JE, Zou X, Morganello S, Joel M, Nanda AS, Nagy E et al. A Compendium of Mutational Signatures of Environmental Agents. Cell. 2019 May 2;177(4):821-836.e16.

Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M, Krasnodębski IW. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. World J Gastroenterol. 2016 Feb 7;22(5):1745-55.

Leowattana W, Leowattana P, Leowattana T. Systemic treatment for metastatic colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2023 Mar 14;29(10):1569-1588.

Lipton L, Halford SE, Johnson V, Novelli MR, Jones A, Cummings C et al. Carcinogenesis in MYH-associated polyposis follows a distinct genetic pathway. Cancer Res. 2003 Nov 15;63(22):7595-9.

Ma H, Brosens LAA, Offerhaus GJA, Giardiello FM, de Leng WWJ, Montgomery EA. Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer. Pathology. 2018 Jan;50(1):49-59.

Mathias-Machado MC, Peixoto RD, Ashton-Prolla P, Da Silva LM, Dienstmann R. Complete Response to Immunotherapy in a Patient with *MUTYH*-Associated Polyposis and Gastric Cancer: A Case Report. Case Rep Oncol. 2023 Jul 10;16(1):504-510.

McVeigh TP, Duff M, Carroll C, O'Shea R, Bradley L, Farrell M, Gallagher DJ, Clabby C, Green AJ. *MUTYH*-Associated Polyposis: The Irish Experience>. Ir Med J. 2016 Dec 12;109(10):485.

Morales A, Hershberger RE. Variants of Uncertain Significance: Should We Revisit How They Are Evaluated and Disclosed? Circ Genom Precis Med. 2018 Jun;11(6):e002169.

Murphy CC, Zaki TA. Changing epidemiology of colorectal cancer - birth cohort effects and emerging risk factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2024 Jan;21(1):25-34.

National Comprehensive Cancer Network: NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal, Endometrial, and Gastric. 2024 Aug(1):105.

Nielsen M, Infante E, Brand R. MUTYH Polyposis. 2012 Oct 4 [updated 2021 May 27]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Amemiya A, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2024.

Nieuwenhuis MH, Vogt S, Jones N, Nielsen M, Hes FJ, Sampson JR et al. Evidence for accelerated colorectal adenoma--carcinoma progression in MUTYH-associated polyposis? *Gut*. 2012 May;61(5):734-8.

Ottiano A, Santorsola M, Caraglia M, Circelli L, Gigantino V, Botti G et al. Genetic regressive trajectories in colorectal cancer: A new hallmark of oligo-metastatic disease? *Transl Oncol*. 2021 Aug;14(8):101131.

Paller CJ, Tukachinsky H, Maertens A, Decker B, Sampson JR, Cheadle JP. et al. Pan-Cancer Interrogation of MUTYH Variants Reveals Biallelic Inactivation and Defective Base Excision Repair Across a Spectrum of Solid Tumors. *JCO Precis Oncol*. 2024 Feb;8:e2300251.

Patel R, McGinty P, Cuthill V, Hawkins M, Clark SK, Latchford A. Risk of colorectal adenomas and cancer in monoallelic carriers of MUTYH pathogenic variants: a single-centre experience. *Int J Colorectal Dis*. 2021 Oct;36(10):2199-2204.

Permata TBM, Hagiwara Y, Sato H, Yasuhara T, Oike T, Gondhowiardjo S, Held KD, Nakano T, Shibata A. Base excision repair regulates PD-L1 expression in cancer cells. *Oncogene*. 2019 Jun;38(23):4452-4466.

Piazza GA, Chandrasekaran P, Maxuitenko YY, Budhwani KI. Assessment of KRAS^{G12C} inhibitors for colorectal cancer. *Front Oncol*. 2024 Jun 24;14:1412435.

Picanço-Albuquerque CG, Sant'Ana RO, Luciano MCS, Bezerra MJB, Bitencourt FS, Oliveira FFB. *MUTYH*-related polyposis syndrome associated with a variant of uncertain

significance mutation: a new pathogenic mutation? *Journal of Clinical Oncology*. 2022 Jun;40(16):e22528-e22528.

Pierantoni C, Cosentino L, Ricciardiello L. Molecular Pathways of Colorectal Cancer Development: Mechanisms of Action and Evolution of Main Systemic Therapy Compounds. *Dig Dis*. 2024;42(4):319-324.

Pilati C, Shinde J, Alexandrov LB, Assié G, André T, Hélias-Rodzewicz Z et al. Mutational signature analysis identifies *MUTYH* deficiency in colorectal cancers and adrenocortical carcinomas. *J Pathol*. 2017 May;242(1):10-15.

Pitroski CE, Cossio SL, Koehler-Santos P, Graudenz M, Prolla JC, Ashton-Prolla P. Frequency of the common germline *MUTYH* mutations p.G396D and p.Y179C in patients diagnosed with colorectal cancer in Southern Brazil. *Int J Colorectal Dis*. 2011 Jul;26(7):841-6.

Rashid M, Fischer A, Wilson CH, Tiffen J, Rust AG, Stevens P et al. Adenoma development in familial adenomatous polyposis and *MUTYH*-associated polyposis: somatic landscape and driver genes. *J Pathol*. 2016 Jan;238(1):98-108.

Ricci MT, Miccoli S, Turchetti D, Bondavalli D, Viel A, Quaia M. et al. Type and frequency of *MUTYH* variants in Italian patients with suspected MAP: a retrospective multicenter study. *J Hum Genet*. 2017 Feb;62(2):309-315.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24.

Rodriguez-Rojas LX, Candelo E, Pachajoa H, Garcia-Robledo JE, Nastasi-Catanese JA, Olave-Rodriguez JA et al. The Unique Spectrum of *MUTYH* Germline Mutations in Colombian Patients with Extracolonic Carcinomas. *Appl Clin Genet*. 2023 Apr 18;16:53-62.

Rouleau E, Zattara H, Lefol C, Noguchi T, Briaux A, Buecher B et al. First large rearrangement in the *MUTYH* gene and attenuated familial adenomatous polyposis syndrome. *Clin Genet*. 2011 Sep;80(3):301-3.

Santos MO, de Lima FCS, Martins LFF, Oliveira JFP, de Almeida LM, Cancela MC. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2023 Feb;69(1)e-213700

Schubert SA, Ruano D, Tiersma Y, Drost M, de Wind N, Nielsen M. et al. Digenic inheritance of MSH6 and MUTYH variants in familial colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2020 Jul 2;59(12):697–701

Skelton WP, Leslie SW. Renal Angiomyolipoma. 2024 May 2. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan–.

Talhaoui I, Matkarimov BT, Tchenio T, Zharkov DO, Saparbaev MK. Aberrant base excision repair pathway of oxidatively damaged DNA: Implications for degenerative diseases. *Free Radic Biol Med*. 2017 Jun;107:266-277.

Terlouw D, Suerink M, Singh SS, Gille HJJP, Hes FJ, Langers AMJ. et al. Declining detection rates for APC and biallelic *MUTYH* variants in polyposis patients, implications for DNA testing policy. *Eur J Hum Genet*. 2020 Feb;28(2):222–30.

Thet M, Plazzer JP, Capella G, Latchford A, Nadeau EA, Greenblatt MS et al. Phenotype correlations with pathogenic DNA variants in the *MUTYH* gene. *Human Mutation*. 2024 Sep;24(1).

Thompson AB, Sutcliffe EG, Arvai K, Roberts ME, Susswein LR, Marshall ML. et al. Monoallelic *MUTYH* pathogenic variants ascertained via multi-gene hereditary cancer panels are not associated with colorectal, endometrial, or breast cancer. *Fam Cancer*. 2022 Oct;21(4):415-422.

Torrezan GT, da Silva FC, Krepischi AC, Santos ÉM, Ferreira Fde O, Rossi BM et al. Breakpoint characterization of a novel large intragenic deletion of *MUTYH* detected in a MAP patient: case report. *BMC Med Genet*. 2011 Sep 30;12:128.

Torrezan GT, da Silva FC, Santos EM, Krepischi AC, Achatz MI, Aguiar S Jr. et al. Mutational spectrum of the APC and *MUTYH* genes and genotype-phenotype correlations in Brazilian FAP, AFAP, and MAP patients. *Orphanet J Rare Dis*. 2013 Apr 5;8:54.

Van Hoeck A, Tjoonk NH, van Boxtel R, Cuppen E. Portrait of a cancer: mutational signature analyses for cancer diagnostics. *BMC Cancer*. 2019 May 15;19(1):457.

van Puijenbroek M, Nielsen M, Tops CM, Halfwerk H, Vasen HF, Weiss MM. et al. Identification of patients with (atypical) *MUTYH*-associated polyposis by *KRAS2* c.34G > T prescreening followed by *MUTYH* hotspot analysis in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Clin Cancer Res*. 2008 Jan 1;14(1):139-42.

Venesio T, Balsamo A, Errichiello E, Ranzani GN, Risio M. Oxidative DNA damage drives carcinogenesis in *MUTYH*-associated-polyposis by specific mutations of mitochondrial and MAPK genes. *Mod Pathol*. 2013 Oct;26(10):1371-81.

Viel A, Bruselles A, Meccia E, Fornasarig M, Quaia M, Canzonieri V. et al. A Specific Mutational Signature Associated with DNA 8-Oxoguanine Persistence in *MUTYH*-defective Colorectal Cancer. *EBioMedicine*. 2017 Jun;20:39–49.

Villy MC, Warcoin M, Filser M, Buecher B, Golmard L, Suybeng V et al. First report of medulloblastoma in a patient with *MUTYH*-associated polyposis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2023 Aug;49(4):e12929.

Vogt S, Jones N, Christian D, Engel C, Nielsen M, Kaufmann A, Steinke V, Vasen HF, Propping P, Sampson JR, Hes FJ, Aretz S. Expanded extracolonic tumor spectrum in *MUTYH*-associated polyposis. *Gastroenterology*. 2009 Dec;137(6):1976-85.e1-10.

Volkov NM, Yanus GA, Ivantsov AO, Moiseenko FV, Matorina OG, Bizin IV et al. Efficacy of immune checkpoint blockade in *MUTYH*-associated hereditary colorectal cancer. *Invest New Drugs*. 2020 Jun;38(3):894-898.

Voutsadakis IA. The Landscape of PIK3CA Mutations in Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2021 Sep;20(3):201-215.

Walker R, Mahmood K, Como J, Clendenning M, Joo JE, Georgeson P. et al. DNA Mismatch Repair Gene Variant Classification: Evaluating the Utility of Somatic Mutations and Mismatch Repair Deficient Colonic Crypts and Endometrial Glands. *Cancers (Basel)*. 2023 Oct 10;15(20):4925.

Walsh MF, Ritter DI, Kesserwan C, Sonkin D, Chakravarty D, Chao E et al. Integrating somatic variant data and biomarkers for germline variant classification in cancer predisposition genes. *Hum Mutat.* 2018 Nov;39(11):1542-1552.

Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009 Jul;9(7):489-99.

Wells K, Wise PE. Hereditary Colorectal Cancer Syndromes. *Surg Clin North Am.* 2017 Jun;97(3):605-625.

Win AK, Jenkins MA, Dowty JG, Antoniou AC, Lee A, Giles GG. et al. Prevalence and Penetrance of Major Genes and Polygenes for Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017 Mar;26(3):404-412.

Win AK, Reece JC, Dowty JG, Buchanan DD, Clendenning M, Rosty C et al. Risk of extracolonic cancers for people with biallelic and monoallelic mutations in MUTYH. *Int J Cancer.* 2016 Oct 1;139(7):1557-63.

Yanus GA, Akhapkina TA, Ivantsov AO, Preobrazhenskaya EV, Aleksakhina SN, Bizin IV. et al. Spectrum of APC and MUTYH germ-line mutations in Russian patients with colorectal malignancies. *Clin Genet.* 2018 May;93(5):1015-1021.

Yasin F, Sokol E, Vasan N, Pavlick DC, Huang RSP, Pelletier M et al. Molecular characteristics of advanced colorectal cancer and multi-hit PIK3CA mutations. *Oncologist.* 2024 Dec 6;29(12):1059-1067.

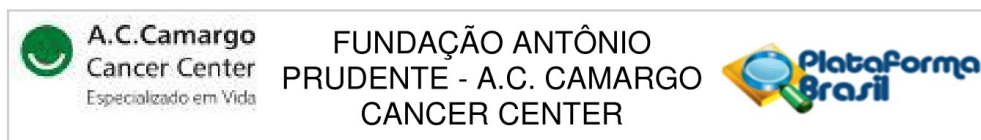
Zaffaroni G, Mannucci A, Koskenvuo L, de Lacy B, Maffioli A, Bisseling T et al. Updated European guidelines for clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP), MUTYH-associated polyposis (MAP), gastric adenocarcinoma, proximal polyposis of the stomach (GAPPS) and other rare adenomatous polyposis syndromes: a joint EHTG-ESCP revision. *Br J Surg.* 2024 May 3;111(5):znae070.

Zhu G, Pei L, Xia H, Tang Q, Bi F. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Mol Cancer.* 2021 Nov 6;20(1):143.

ANEXOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do A.C.Camargo Cancer Center / Fundação Antônio Prudente, sob o nº 3153/21. (**Anexo 1**)

Anexo 1 – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: KRAS-G12C: um biomarcador negligenciado para detectar pacientes com polipose associada ao MUTYH

Pesquisador: GIOVANA TARDIN TORREZAN

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 53067621.3.0000.5432

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.264.601

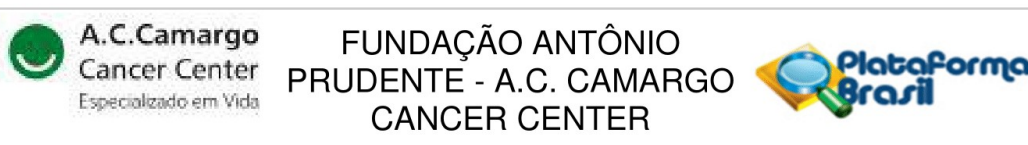
Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos itens "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa", "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do documento "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2181788_E2.pdf", gerado pela Plataforma Brasil em 11/08/2023.

Resumo:

A Polipose Associada à MUTYH (MAP) é responsável por 0,7% de todos os cânceres colorretais (CCR) e 13% de todas as poliposes colorretais. O gene MUTYH faz parte do sistema de reparo de excisão de bases do DNA e, quando mutado, leva a transições G:C T:A em diversos genes, incluindo o KRAS. Em câncer colorretal (CCR), mutações em KRAS são observadas em cerca de 50% dos casos, e são, em sua grande maioria, mutações do tipo missense nos códons 12 e 13. A mutação somática c.34G>T; G12C é uma mutação mais rara, ocorrendo em menos de 10% dos pacientes com mutação KRAS. Estudos anteriores demonstraram uma elevada frequência da mutação somática KRAS-G12C em pacientes com MAP, sendo que em torno de 25% dos pacientes com CCR mutação G12C apresentaram variantes patogênicas bialélicas em MUTYH. Os objetivos do estudo são: avaliar a taxa de detecção de variantes germinativas patogênicas/provavelmente patogênicas (P/PP) no gene MUTYH em pacientes com câncer colorretal e mutação somática KRAS G12C; avaliar a utilidade de investigar KRAS-G12C e PIK3CA-Q546K em tecidos de adenomas e câncer colorretal para classificar variantes germinativas de significado incerto em MUTYH. Para

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 6.264.601

isso, serão extraídos DNA de tumor fresco, tumor fixado em formalina e emblocado em parafina (FFPE) e leucócito. Para o primeiro objetivo, serão avaliadas 4 variantes de MUTYH (p.Tyr179Cys, p.Gly396Asp, p.Arg241Trp e deleção dos éxons 4 a 16) através de PCR multiplex seguida por sequenciamento de nova geração (NGS) de amplicons. Pacientes com apenas 1 variante em heterozigose serão avaliados por sequenciamento completo do gene MUTYH, e os resultados encontrados serão descritos com estatística descritiva. Para o segundo objetivo, iremos avaliar a frequência de detecção das mutações somáticas KRAS -G12C e PIK3CA-Q546K em tecidos de adenomas e câncer colorretal de indivíduos diagnosticados com MAP (bialélicos) e de indivíduos suspeitos para MAP (com presença de VUS em MUTYH). Esperamos que nosso estudo possibilite uma melhoria nas estratégias de diagnóstico de pacientes com MAP e seus familiares, permitindo acompanhamento, vigilância e medidas preventivas adequadas para esses indivíduos.

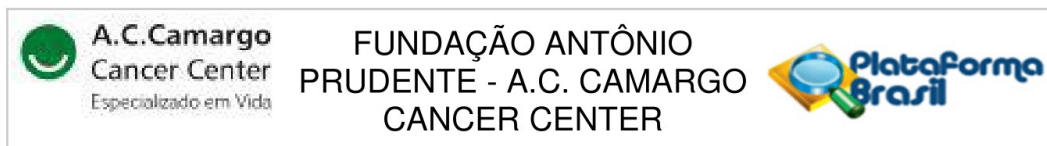
Hipótese:

Pacientes com câncer colorretal e mutação somática KRAS-G12C apresentam maior risco de detecção de variantes germinativas patogênicas no gene MUTYH. Além disso, este biomarcador pode ser usado para auxiliar na reclassificação de VUS em MUTYH.

Metodologia Proposta:

As extrações de DNA de tumor fresco, tumor fixado em formalina e emblocado em parafina (FFPE) e leucócito serão realizadas no Biobanco dessa instituição, de acordo com os protocolos operacionais padrão estabelecidos. A integridade do DNA será avaliada pelo equipamento TapeStation (Agilent) e a concentração pelo equipamento Qubit® com o uso do reagente QUANT-IT DNA HS assay kit (Life Technologies). As amostras serão identificadas por códigos padrão do Biobanco, garantindo sua anonimização. Para a detecção das alterações germinativas MUTYH p.Tyr179Cys, p.Gly396Asp, p.Arg241Trp e deleção dos éxons 4 a 16 será utilizada a metodologia de sequenciamento de nova geração (NGS) de amplicons. Para isto, primers específicos para as regiões dessas alterações serão desenhados utilizando a ferramenta online Primer 3. Resumidamente, 20ng de DNA de leucócito, saliva ou tumoral serão submetidos a reações de PCR multiplex com o kit Qiagen Multiplex PCR para gerar amplicons das regiões de interesse. Após a confirmação de amplificação por análise em gel de agarose, 10 a 100ng do produto amplificado por PCR será utilizado para construção das bibliotecas de amplicon com o kit Ion Plus Fragment Library (Thermo Fisher), de acordo com as instruções do fabricante. Para o sequenciamento, as etapas de PCR em emulsão, enriquecimento e deposição no chip de sequenciamento serão

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 6.264.601

realizadas no equipamento Ion Chef (Thermo Fisher). Por fim, o sequenciamento será realizado na plataforma Ion S5 (Thermo Fisher). Os resultados do sequenciamento serão analisados no Torrent Suite software e Variant Caller (Thermo Fisher) e serão comparados com a versão do genoma GRCh37/Hg19. Os arquivos contendo as variantes chamadas (VCFs) serão avaliados no software VarSeq para anotação e filtragem das variantes. Serão consideradas positivas amostras com variantes detectadas com pelo menos 30% do total de leituras. As variantes identificadas serão inspecionadas visualmente no software Integrative Genomics Viewer (IGV). Pacientes nos quais for detectada apenas 1 variante em heterozigose (alteração monoalélica) serão avaliados por sequenciamento completo do gene MUTYH por sequenciamento de painel multigenes por NGS. Para a detecção das mutações somáticas KRAS-G12C e PIK3CA-Q546K em tecidos de adenomas e câncer colorretal será utilizada a mesma metodologia de NGS de amplicons e de análise descritas no item 5.2. Serão consideradas positivas amostras com variantes detectadas com pelo menos 5% do total de leituras.

Critério de Inclusão:

Pacientes com mais de 18 anos de idade, diagnosticados com câncer colorretal e mutação somática KRAS-G12C diagnosticada em teste molecular prévio. Pacientes com mais de 18 anos de idade, diagnosticados com MAP ou com variante de significado incerto em MUTYH em teste genético prévio.

Critério de Exclusão: Indivíduos que recusarem participar do estudo.

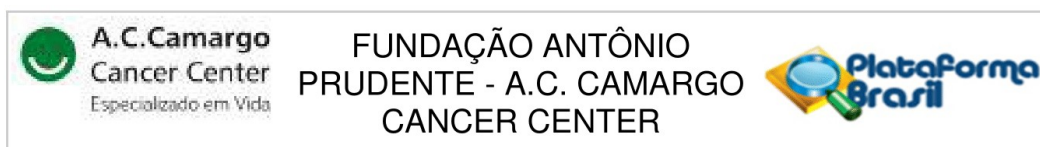
Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a taxa de detecção de variantes germinativas patogênicas/provavelmente patogênicas (P/PP) no gene MUTYH em pacientes com câncer colorretal e mutação somática KRAS G12C e a utilidade deste biomarcador para auxiliar na reclassificação de VUS em MUTYH.

Objetivo Secundário: 1) Avaliar a frequência das variantes germinativas p.Tyr179Cys, p.Gly396Asp, p.Arg241Trp e deleção dos éxons 4 a 16 do gene MUTYH em pacientes com câncer colorretal e mutação somática KRAS G12C; 2) Realizar o sequenciamento completo do gene MUTYH em portadores monoalélicos das variantes avaliadas; 3) Avaliar a utilidade de investigar KRAS-G12C e PIK3CA-Q546K em tecidos de adenomas e câncer colorretal para classificar variantes de linhagem germinativa de significado desconhecido em MUTYH. 4) Correlacionar as variantes germinativas

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 6.264.601

P/PP bialélicas e monoalélicas detectadas em MUTYH com aspectos clínicos das pacientes e histopatológicos dos tumores.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Existe a possibilidade de identificarmos nos pacientes alterações genéticas que podem influenciar o risco de desenvolver câncer. A detecção destas alterações pode resultar em mudanças na forma como o paciente deve ser acompanhado, ao indicar a necessidade de realizar novos exames laboratoriais e ao indicar quais familiares deveriam iniciar acompanhamento médico específico. O resultado do exame genético pode causar angústias e ansiedade, e para minimizar estes riscos ele será realizado em consulta de aconselhamento genético. Existe também o risco relacionado a perda do sigilo e confidencialidade durante a coleta e o uso dos dados clínicos das amostras. Os pesquisadores desse estudo se comprometem a seguir procedimentos de anonimização e de controle de acesso aos resultados para minimizar esse risco.

Benefícios: A maioria dos participantes não se beneficiará diretamente com a participação nesse estudo. Contudo, em alguns casos o estudo poderá identificar alterações genéticas com relevância clínica. Esses resultados serão retornados aos participantes, que poderão se beneficiar de condutas clínicas mais adequadas a eles e seus familiares. O estudo ainda tem o benefício de ampliar o conhecimento sobre a síndrome de polipose associada ao MUTYH em nossa população.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de submissão de EMENDA 2

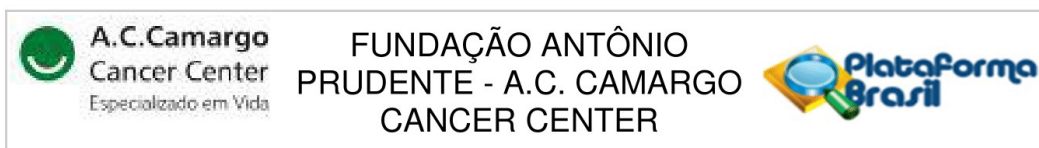
De acordo com o documento "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2181788_E2.pdf" criado em 11/08/2023 a emenda proposta trata-se de inclusão de centro co-participante:

"Justificativa da Emenda: Encaminho para análise deste Comitê a solicitação de emenda 2 ao projeto com o objetivo de solicitação de inclusão de centro co-participante (Hospital do Câncer de Barretos/Hospital de Amor) e novos pesquisadores colaboradores. O centro co-participante irá contribuir com o envio de amostras biológicas (DNA de tumor) para um dos objetivos do estudo."

FUNDACAO PIO XII

Pesquisador responsável: Rui Manuel Reis

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 6.264.601

A instituição co-participante envia carta de concordância e colaboração com o presente estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

Recomendações:

Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

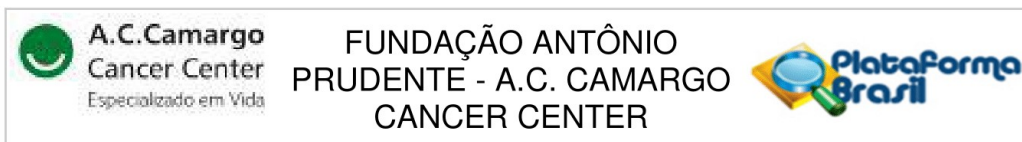
Após apreciação da presente emenda este Comitê de Ética em Pesquisa não observa óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2181788_E2.pdf	11/08/2023 09:09:56		Aceito
Outros	5_Identificacao_dos_CVs_V2cor.docx	11/08/2023 09:09:36	GIOVANA TARDIN TORREZAN	Aceito
Declaração de concordância	Carta_Concordancia_Barretos.pdf	27/07/2023 17:49:55	GIOVANA TARDIN TORREZAN	Aceito
Outros	MDTA_ACC_Barretos.pdf	27/07/2023 17:49:45	GIOVANA TARDIN TORREZAN	Aceito
Outros	2023_07_27_Carta_Emenda2.doc	27/07/2023 17:49:31	GIOVANA TARDIN TORREZAN	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	16_Projeto_MUTYH_KRAS_G12C_V3.docx	27/07/2023 17:49:14	GIOVANA TARDIN TORREZAN	Aceito
Folha de Rosto	ProjetoFolhaDeRostoGiovana_assinado.pdf	19/12/2022 15:12:58	GIOVANA TARDIN TORREZAN	Aceito
Outros	1_Formulario_CEP_V2.pdf	12/12/2022 15:40:12	GIOVANA TARDIN TORREZAN	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	11_2022_12_12_TCLE_pacientes_V2_tracking.docx	12/12/2022 15:38:44	GIOVANA TARDIN TORREZAN	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	11_2022_12_12_TCLE_pacientes_V2.docx	12/12/2022 15:38:32	GIOVANA TARDIN TORREZAN	Aceito

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 6.264.601

Ausência	11_2022_12_12_TCLE_pacientes_V2.docx	12/12/2022 15:38:32	GIOVANA TARDIN TORREZAN	Aceito
Outros	Declaracoes_CEP.pdf	05/11/2021 10:29:53	GIOVANA TARDIN TORREZAN	Aceito
Outros	15_DECLARACAO_DE_CIENCIA_Onco genetica.pdf	04/11/2021 10:05:07	GIOVANA TARDIN TORREZAN	Aceito
Outros	14_DECLARACAO_DE_CIENCIA_ANATOMIA PATOLOGICA.pdf	04/11/2021 10:04:47	GIOVANA TARDIN TORREZAN	Aceito
Outros	13_DECLARACAO_DE_CIENCIA_CR_c oloretal.pdf	04/11/2021 10:04:31	GIOVANA TARDIN TORREZAN	Aceito
Outros	12_TERMOS_DE_DISPENSA_TCLE.pdf	04/11/2021 10:03:57	GIOVANA TARDIN TORREZAN	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	10_DECLARACAO_INFRA_CIPe.pdf	04/11/2021 10:03:19	GIOVANA TARDIN TORREZAN	Aceito
Outros	9_USO_E_DESTINO_DO_MATERIAL_BIOLOGICO.pdf	04/11/2021 10:02:49	GIOVANA TARDIN TORREZAN	Aceito
Outros	8_DECLARACAO_DE_CIENCIA_Biobanco.pdf	04/11/2021 10:02:00	GIOVANA TARDIN TORREZAN	Aceito
Outros	7_DECLARACAO_PUBLICACAO_DOS DADOS.pdf	04/11/2021 10:00:08	GIOVANA TARDIN TORREZAN	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 28 de Agosto de 2023

Assinado por:
LUCIANA DE MOURA LEITE
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, Liberdade, Atrium - Subsolo
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br

APÊNDICES

Apêndice 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) RESOLUÇÃO 466/12 CNS/MS

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PARTICIPANTE:
RGH:..... SEXO: M F TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):
TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO: KRAS-G12C: um biomarcador negligenciado para detectar pacientes com polipose associada ao MUTYH
2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dra Giovana Tardin Torrezan – CIPE - A.C. Camargo Cancer Center
3. PESQUISADORES ENVOLVIDOS:
 - Dra. Dirce Maria Carraro, CIPE - A.C. Camargo Cancer Center
 - Dr. José Claudio Casali da Rocha, Dept. de Oncogenética - A.C. Camargo Cancer Center
 - Dr Samuel Aguiar Junior, Centro de Referência de Tumores Colorretais - A.C. Camargo Cancer Center
 - Dr. Warley Abreu Nunes, Dept. de Anatomia Patológica - A.C. Camargo Cancer Center
 - Outros membros do corpo clínico do Dept. de Oncogenética - A.C. Camargo Cancer Center
4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

INFORMAÇÕES AO PARTICIPANTE

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “**KRAS-G12C: um biomarcador negligenciado para detectar pacientes com polipose associada ao MUTYH**”, que será realizada no A.C. Camargo Cancer Center.

O convite para você participar do estudo será feito em uma de suas visitas na instituição ou por contato telefônico do seu médico, de um enfermeiro(a) de pesquisa ou de um aluno(a) envolvido no projeto. Este documento fornece as informações sobre esse estudo e você deve ler com atenção e tirar todas as suas dúvidas. Se você aceitar participar desse estudo, você deverá preencher/assinar esse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Você está sendo convidado (a) para participar desse projeto de pesquisa por um dos seguintes motivos:

Rubrica do
participante:

Rubrica do responsável
pelo consentimento:



1. Você foi diagnosticado com câncer colorretal e com mutação somática no gene *KRAS* do tipo G12C em um teste molecular realizado previamente quando você realizou seus exames no hospital A.C. Camargo Cancer Center ou;
2. Você foi diagnosticado a Síndrome de Polipose Associada à *MUTYH* (MAP) ou;
3. Você foi diagnosticado com uma variante de significado clínico incerto (VUS) em um teste genético prévio;

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA

Este projeto irá avaliar a relação entre variantes genéticas germinativas patogênicas no gene *MUTYH* em indivíduos com câncer colorretal e a mutação somática do tipo G12C no gene *KRAS*. Uma variante genética germinativa ou uma mutação somática são alterações em nosso DNA, ou seja, em nosso material genético, que é responsável pela determinação das características das células. O DNA é organizado em várias partes que são chamadas de “genes”, e dois desses genes, mais especificamente o *MUTYH* e o *KRAS*, podem sofrer alterações que estão relacionadas ao desenvolvimento de câncer colorretal.

O gene *MUTYH*, quando apresenta variantes patogênicas, ou seja nocivas, e germinativas (que estão presentes em todas as células do corpo), está associado a uma doença chamada Síndrome de Polipose Associada ao *MUTYH* (MAP), caracterizada pelo aparecimento de pólipos na região do cólon e do reto e com o aumento de risco para desenvolvimento de câncer colorretal. A mutação somática (ou seja, que acontece apenas nas células do tumor) no gene *KRAS* ocorre frequentemente em tumores colorretais. Um tipo específico de mutação no gene *KRAS* chamada G12C é mais frequente em indivíduos com MAP e por isso, pode ajudar a identificar pacientes com risco de serem portadores da MAP.

DESENHO DA PESQUISA

Cerca de 150 indivíduos serão incluídos no estudo. Dados clínicos dos participantes de pesquisa (idade de acometimento, histórico de outros tumores e história familiar de câncer) e dados histopatológicos dos tumores (tipo histológico, grau, marcadores moleculares, entre outros) serão obtidos por consulta em prontuário eletrônico e armazenados de maneira anonimizada. Iremos utilizar DNA de saliva, de sangue ou de tumor para analisar variantes no gene *MUTYH*, no gene *KRAS* e no gene *PIK3CA* através da técnica de sequenciamento de DNA. Sequenciamento é um tipo de teste genético realizado quando se quer observar determinada região do material genético de uma pessoa.

Além disso, vamos comparar as variantes detectadas em *MUTYH* com aspectos clínicos dos participantes, ou, em outras palavras, dos sinais e sintomas apresentados por eles; bem como relacionar com aspectos histopatológicos (características do tecido) dos tumores. Com os resultados, poderemos avaliar se a detecção da mutação G12C em *KRAS*

Rubrica do
participante:

Rubrica do responsável
pelo consentimento:



pode indicar quais pacientes devem ser investigados para Síndrome de Polipose Associada ao *MUTYH*.

DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Se você concordar em participar deste estudo, os pesquisadores envolvidos irão acessar suas informações de saúde pessoal, incluindo as informações de tumores desenvolvidos, através da revisão do prontuário hospitalar e/ou de comunicação pessoal em consulta de aconselhamento genético (consulta no Departamento de Oncogenética).

Se disponível, utilizaremos suas amostras de leucócito e tumor congelado que já estejam no Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center para realizarmos o sequenciamento. Caso não tenhamos esse material em biobanco, pode ser necessário coletar uma amostra de saliva ou raspado bucal, ou solicitar seu material de tumor em outro serviço, para realizarmos o sequenciamento. Para a coleta de saliva, você não poderá ter comido, bebido, fumado ou mastigado chiclete nos 30 minutos que antecede a coleta.

As amostras de saliva, raspado bucal ou tumor serão processadas e o DNA extraído será armazenado pelo Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center. O DNA será utilizado para realização do sequenciamento no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do A.C. Camargo Cancer Center. Toda identificação do seu material será feita por códigos para preservar sua identidade.

Você poderá ter acesso ao resultado do seu exame em qualquer momento que solicitar. Caso com a análise de DNA seja identificada alguma variante patogênica, você receberá o resultado desta análise posteriormente, em uma consulta de aconselhamento genético com um médico geneticista colaborador deste projeto, que irá explicar detalhadamente as implicações dos resultados encontrados.

Caso você concorde em participar do estudo, esta será uma colaboração voluntária, não havendo nenhuma forma de remuneração por isto. Do mesmo modo, esta decisão não afeta de nenhum modo o que será cobrado de você ou de sua seguradora de saúde. Informamos que não são esperados custos relacionados a sua participação neste estudo. A coleta de saliva ou raspado bucal será realizada quando você estiver no A.C. Camargo Cancer Center para a realização de consultas, exames ou qualquer procedimento médico. No entanto, caso seja necessário algum custo inesperado para você ou seu acompanhante devido à participação neste estudo, você será ressarcido por todos os gastos.

DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO

As coletas de saliva e raspado bucal são coletas não invasivas, não apresentando qualquer risco de complicações. O seu tratamento será exatamente o mesmo, caso você participe ou não deste estudo. Nenhum dano imediato ou tardio, que comprometa a sua saúde, deverá ser decorrente deste estudo, uma vez que você não será submetido a nenhum procedimento adicional aqueles realizados durante o seu tratamento neste hospital. No

Rubrica do
participante:

Rubrica do responsável
pelo consentimento:



entanto, em caso de danos decorrentes da pesquisa, garantimos seu direito à assistência gratuita e integral, pelo tempo que for necessário.

Existe a possibilidade de identificarmos alterações genéticas no seu DNA que podem influenciar o seu risco de desenvolver câncer. A detecção destas alterações pode resultar em mudanças na forma como o seu médico te acompanha ao indicar a necessidade de realizar novos exames laboratoriais e ao indicar quais dos seus parentes deveriam iniciar acompanhamento médico específico. O resultado do exame genético pode causar angústias e ansiedade, e para minimizar estes riscos ele é realizado em consulta de aconselhamento genético.

Existe, também, o risco relacionado à perda de sigilo e confidencialidade durante a coleta e uso dos dados clínicos das amostras. Os pesquisadores deste estudo se comprometem a seguir procedimentos de anonimização e de controle de acesso aos resultados para minimizar esse risco.

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda de benefícios aos quais tem direito. A recusa em participar não acarretará nenhum prejuízo na qualidade do tratamento.

BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

A maioria dos participantes não se beneficiará diretamente com a participação nesse estudo. Contudo, em alguns casos o estudo poderá identificar alterações genéticas com importância clínica. Esses resultados serão retornados aos participantes, que poderão se beneficiar de condutas clínicas mais adequadas a eles e seus familiares. O estudo ainda tem o benefício de ampliar o conhecimento sobre a Síndrome de Polipose Associada ao MUTYH (MAP) em nossa população.

CONFIDENCIALIDADE

A confidencialidade de suas informações será mantida e sua identidade será preservada, sendo que somente os membros da equipe médica e do Comitê de Ética em Pesquisa terão acesso aos registros. Você terá acesso aos seus dados de exames e atendimentos médicos, quando solicitados.

Para se fazer pesquisas mais relevantes, é importante que os pesquisadores compartilhem informações obtidas de estudos. Eles fazem isso depositando os resultados em um ou mais bancos de dados científicos, onde são armazenados junto com informações de outros estudos. Os pesquisadores podem então estudar as informações combinadas para aprender ainda mais sobre saúde e doenças. Se você concordar em participar do estudo, algumas de suas informações genéticas e de saúde podem ser publicadas em revistas científicas e também serem colocadas em um ou mais bancos de dados científicos mantidos por instituições nacionais ou internacionais. A deposição dos dados sempre é feita de forma

Rubrica do
participante:

Rubrica do responsável
pelo consentimento:



anonimizada e seu nome e outras informações que poderiam identificá-lo diretamente nunca serão colocados em um banco de dados científicos. No entanto, uma vez que a sua composição genética é única, há um risco muito pequeno de você poder ser identificado. Por isso, o acesso de pesquisadores para estudarem as informações presentes nos bancos de dados é realizado de forma controlada, garantindo o compromisso de proteger sua privacidade e manter suas informações confidenciais.

DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Qualquer dano resultante da sua participação no estudo será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e cuidados a que você tem direito. Ao assinar este formulário de consentimento você não está abrindo mão de qualquer um dos seus direitos legais, incluindo buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes da sua participação nesse estudo.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Os pesquisadores, médicos e a equipe envolvida na pesquisa se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo. **TELEFONES PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS OU QUALQUER DÚVIDA SOBRE O ESTUDO:** (011) 2189-5000 – ramal 2953, entrar em contato com Dra Giovana Tardin Torrezan (pesquisadora).

OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

As amostras coletadas serão processadas pelo Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center. O excedente, não utilizado por este projeto de pesquisa, poderá ser descartado ou, se autorizado pelo participante (mediante assinatura de TCLE específico do Biobanco), ser armazenado e utilizado em outros projetos, após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição, e quando necessário, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

Em qualquer ocasião e a qualquer tempo, você terá o direito de acesso às informações e resultados obtidos com a utilização de seu material biológico armazenado, recebendo orientações quanto às consequências desse resultado, incluindo aconselhamento genético quando necessário.

A retirada do consentimento de armazenamento da sua amostra biológica excedente no Biobanco poderá ocorrer a qualquer momento e esta solicitação deve ser registrada em um documento e assinada por você. A validade desta solicitação se dará a partir da data de comunicação de sua decisão. A recusa ou desistência do armazenamento de sua amostra não irá prejudicar seu acompanhamento médico e tratamento.

Rubrica do
participante:

Rubrica do responsável
pelo consentimento:



Esta pesquisa poderá ser interrompida durante a sua realização e após o aval do CEP da instituição, em casos onde: a) O pesquisador responsável decida que algum motivo ou situação possa pôr em risco a segurança do participante ou; b) O CEP julgue que o estudo esteja sendo conduzido de maneira eticamente inaceitável.

QUEM DEVO CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:

Pesquisador Responsável: Dra. Giovana Tardin Torrezan

Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do A.C. Camargo Cancer Center - São Paulo.

Telefones: (11) 2189-5000 ramal 2953. Endereço: Rua Taguá, 440 – Liberdade – São Paulo.

Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center: telefone (11) 2189-5000, ramal 5020 de segunda-feira à quinta-feira das 8 horas às 18 horas e sexta-feira das 8 horas às 17 horas, endereço: Rua Prof Antônio Prudente, 211, São Paulo, email: cep_accamargo@accamargo.org.br.

Este documento é elaborado em duas vias, ambas deverão ser rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela pessoa por ele delegada. Você receberá uma das vias originais assinada e a outra será arquivada pelo pesquisador em seu arquivo de pesquisa.

Eu, _____
declaro ter lido, compreendido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e **concordo em participar desse estudo de forma livre e esclarecida** autorizando os procedimentos acima relacionados:

Assinatura do participante ou responsável legal

_____/_____/_____
Data

Assinatura do responsável pelo consentimento

_____/_____/_____
Data

Rubrica do
participante:

Rubrica do responsável
pelo consentimento: