



**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA**  
**CURSO DE MEDICINA**

**JOÃO CLÁUDIO SILVA FONTES CORREIA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PACIENTES COM CANCER DE COLON  
METASTÁTICO E PERFIL DE RESISTÊNCIA TERAPÊUTICA A TRATAMENTO  
INICIAL: UM ESTUDO RETROSPECTIVO**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**SALVADOR - BA**

**2024**

**JOÃO CLÁUDIO SILVA FONTES CORREIA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PACIENTES COM CANCER DE COLON  
METASTÁTICO E PERFIL DE RESISTÊNCIA TERAPÊUTICA A TRATAMENTO  
INICIAL: UM ESTUDO RETROSPECTIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à matéria Metodologia  
da Pesquisa no Curso de Graduação  
em Medicina da Escola Bahiana de  
Medicina e Saúde Pública.

Orientador(a):

Dra Priscila Galvão Doria Antunes

**SALVADOR**

**2024**

## SUMÁRIO

1	RESUMO.....	4
2	ABSTRACT.....	5
3	INTRODUÇÃO.....	6
2	OBJETIVO.....	7
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	8
4	MÉTODOS.....	17
5	RESULTADOS.....	21
6	DISCUSSÃO.....	31
7	CONCLUSÃO.....	33
8	REFERÊNCIAS.....	34

## 1. RESUMO

Introdução: o câncer colorretal (CCR) representa uma das principais causas de morte associada ao câncer em todo o mundo.<sup>1</sup> Mesmo se tratando de doença heterogênea, o tratamento do CCR metastático é semelhante para maior parte dos pacientes, com poucas linhas de sequenciamento terapêutico disponíveis.<sup>2</sup> Portanto, a resistência terapêutica está associada a impactos negativos nos desfechos oncológicos. Objetivo: o objetivo deste estudo é comparar o perfil clínico e molecular de pacientes portadores de câncer colorretal metastático respondedores ou não respondedores a tratamento quimioterápico inicial. Métodos: este é um estudo retrospectivo, no qual foram coletados dados de pacientes atendidos em uma clínica privada em Salvador, Bahia. Resultados: este estudo incluiu 70 pacientes com adenocarcinoma colorretal metastático. A maioria eram portadores de doença metastática ao diagnóstico, sendo o fígado o sítio mais comum de metástase entre os pacientes estudados. Nos pacientes portadores de CCR metastático com mutação no gene RAS, BRAF ou instabilidade microssatélite, houve uma tendência a progressão precoce a tratamento quimioterápico inicial, embora sem significância estatística. O grupo de pacientes que apresentou progressão a primeira linha de tratamento em menos de 9 meses, apresentou menor sobrevida global (19,6 meses x 30,1 meses em relação ao grupo que progrediu após 9 meses de tratamento ( $p=0,0089$ )). Conclusão: Não foi possível identificar um biomarcador já utilizado na prática clínica que possa prever resistência a tratamento quimioterápico inicial. No entanto, este trabalho reforça o impacto negativo da resistência terapêutica na sobrevida global de pacientes com CCR metastático.

Palavras-chave: Câncer colorretal, Oncologia, Metástase.

## 2. ABSTRACT

Introduction: Colorectal cancer (CRC) represents one of the leading causes of cancer-related death worldwide.<sup>1</sup> Despite being a heterogeneous disease, the treatment of metastatic CRC is similar for the majority of patients, with few therapeutic sequencing options available.<sup>2</sup> Therefore, therapeutic resistance is associated with negative impacts on oncological outcomes. Objective: The aim of this study is to compare the clinical and molecular profile of patients with metastatic colorectal cancer who respond or do not respond to initial chemotherapy treatment. Methods: This is a retrospective study in which data were collected from patients treated at a private clinic in Salvador, Bahia. Results: This study included 70 patients with metastatic colorectal adenocarcinoma. The majority had metastatic disease at diagnosis, with the liver being the most common site of metastasis among the patients studied. In patients with metastatic CRC with mutations in the RAS, BRAF genes, or microsatellite instability, there was a trend towards early progression to initial chemotherapy treatment, although without statistical significance. The group of patients who progressed to the first line of treatment in less than 9 months had lower overall survival (19.6 months vs. 30.1 months compared to the group that progressed after 9 months of treatment ( $p=0.0089$ )). Conclusion: It was not possible to identify in our sample a biomarker already used in clinical practice that could predict resistance to initial chemotherapy treatment. However, this study shows the negative impact of therapeutic resistance on the overall survival of patients with metastatic CRC.

Keywords: Colorectal cancer, Oncology, Metastasis.

### 3. INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia maligna que afeta o cólon e o reto, sendo o adenocarcinoma o tipo histológico mais comum.<sup>1</sup> É a neoplasia maligna mais prevalente do trato gastrointestinal, ocupando o terceiro lugar como câncer mais diagnosticado no mundo e se configura como a segunda principal causa de morte associada a câncer, sendo responsável por mais de 880 mil óbitos em 2018 globalmente.<sup>2,3</sup>

O tratamento do câncer de cólon metastático é baseado em quimioterapia (FOLFOX ou FOLFIRI) associado ou não a uma droga alvo anti-EGFR ou anti-VEGF, a depender do status de mutação RAS, como primeira e segunda linhas de tratamento. Após progressão a segunda linha, pode-se considerar tratamento com Regorafenibe ou Trifluridina/Tipiracil (FTD/TPI) associado ou não a bevacizumabe, em terceira linha; e mais recentemente, Fruquintinibe como opção de tratamento de quarta linha para pacientes refratários (no entanto, ainda não disponível no Brasil).<sup>4,5</sup> Ainda assim, benefícios discretos em desfechos oncológicos após progressão a segunda linha são observados, sendo o 5-FU o principal fármaco envolvido no tratamento do CCR metastático.<sup>6</sup>

Sabe-se que o câncer de cólon metastático é uma doença heterogênea, no entanto, o sequenciamento de tratamento é semelhante para a maior parte dos pacientes; e atualmente, poucos biomarcadores com predição de resistência ou resposta terapêutica estão disponíveis para utilização na prática clínica.<sup>7</sup>

Aprofundar a compreensão do perfil clínico e molecular relacionando-os com padrão de resposta ou resistência ao tratamento do câncer colorretal metastático pode trazer informações prognósticas e que impactem em decisões terapêuticas futuras. Portanto, o objetivo deste trabalho é caracterizar pacientes respondedores e não respondedores a primeira linha de tratamento de câncer de cólon e reto metastático.

## **4. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Comparar o perfil clínico e molecular de pacientes portadores de câncer colorretal respondedores e não respondedores ao tratamento quimioterápico inicial.

### **2.2 Objetivos específicos**

Descrever as características clínicas de pacientes portadores de adenocarcinoma metastático numa clínica privada de atendimento ao paciente oncológico em Salvador-Bahia.

Comparar o perfil molecular entre os pacientes respondedores e não respondedores a quimioterapia inicial (FOLFOX, FOLFIRI ou FOLFOXIRI).

## **5. REVISÃO DE LITERATURA**

### **5.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER COLORRETAL**

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais frequente no Brasil. O número estimado de casos novos de câncer de cólon e reto no país para cada ano do triênio de 2023 a 2025 é de 45.630 casos, correspondendo a um risco estimado de 21,10 casos por 100 mil habitantes, sendo 21.970 casos entre os homens e 23.660 casos entre as mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 20,78 casos novos a cada 100 mil homens e de 21,41 a cada 100 mil mulheres.<sup>3</sup> Além disso, é também estimado, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), que para cada ano entre 2023 e 2025, haja 21.970 novos casos de neoplasia maligna colorretal em homens e 23.660 casos em mulheres, estabelecendo-se como a segunda neoplasia maligna mais incidente na população.

O CCR ocorre com maior frequência em países de renda média a alta, com ocorrência até 8 vezes mais que no restante do mundo.<sup>1</sup> Aproximadamente 15%-30% dos pacientes tem o diagnóstico inicial já com a presença de lesões metastáticas e 20%-50% dos pacientes com doença inicialmente localizada irão desenvolver doença metastática ao longo do seguimento oncológico, com um tempo de sobrevida global mediano de 37 meses.<sup>2</sup> O sítio mais comum de metástase é o fígado, seguido do pulmão, peritônio e linfonodos retroperitoneais.<sup>4</sup>

Apesar desses números, historicamente, a mortalidade vem diminuindo nas últimas décadas. Isso pode ser explicado pela maior prevenção e detecção precoce, além dos novos tratamentos disponíveis.<sup>5,6</sup>

### **5.2 CARACTERÍSTICA HISTOPATOLÓGICA**

O adenocarcinoma, que representa o tipo histológico mais comum, têm origem no epitélio glandular colunar da mucosa, sendo o processo de carcinogênese mais frequente ocorrendo na sequência adenoma-carcinoma, com a transformação de um adenoma geralmente por mais de 10 anos.<sup>7</sup>

O processo de carcinogênese começa frequentemente com a transformação de uma lesão benigna, como um pólip adenomatoso, em uma lesão pré-maligna.<sup>8</sup> O acúmulo de mutações genéticas somáticas e alterações epigenéticas progressivas desempenham um papel crucial nessa evolução.<sup>8</sup> A via clássica de carcinogênese colorretal, conhecida como a via adenoma-carcinoma, envolve mutações sequenciais em genes como APC, KRAS, TP53 e SMAD4.<sup>9</sup>

A inativação do gene APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) parece ser um evento central na formação de adenomas e no desenvolvimento subsequente do adenocarcinoma colorretal.<sup>8</sup> A perda da função do gene APC leva à ativação da via de sinalização *Wnt/β-catenina*, resultando em proliferação celular descontrolada e acúmulo de mutações adicionais. Mutações subsequentes em genes como KRAS, que participa da via de sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), e TP53, um supressor tumoral crucial, conferem vantagem seletiva às células tumorais, promovendo a progressão para um estado maligno.<sup>8</sup> Além disso, alterações no status de metilação do DNA e a instabilidade cromossômica contribuem para a heterogeneidade genética do adenocarcinoma colorretal, influenciando seu comportamento biológico e resposta ao tratamento.<sup>10</sup>

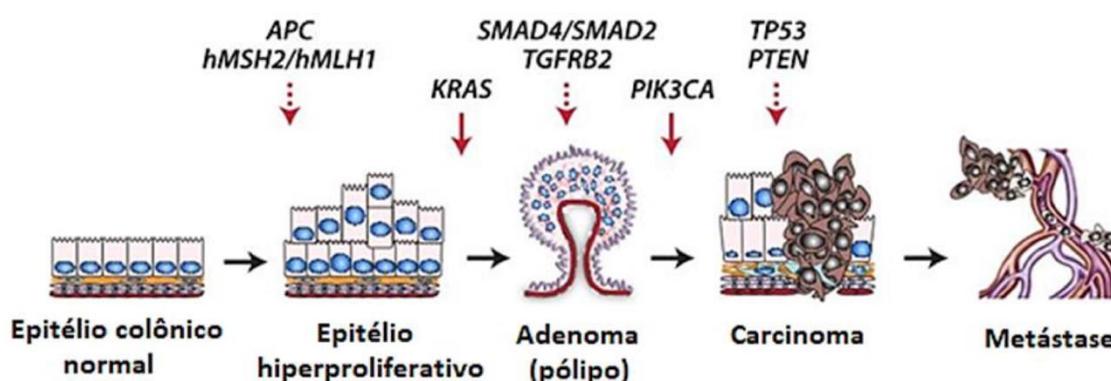


Imagem 1: sequência adenoma-carcinoma para a formação do câncer colorretal.<sup>22</sup>

As características histopatológicas do adenocarcinoma colorretal refletem sua complexidade molecular e sua evolução biológica.<sup>11</sup> Esses tumores exibem uma variedade de padrões histológicos, incluindo o tipo tubular, tipo cribriforme, tipo

mucinoso e tipo de células em anel de sinete, cada um com implicações prognósticas distintas.<sup>7</sup> Geralmente, os adenocarcinomas tubulares têm um prognóstico relativamente melhor quando comparados a outros subtipos mais agressivos.<sup>7</sup> Isso se deve à sua maior tendência à diferenciação e menor potencial de invasão e metástase.<sup>10</sup> Além disso, a presença de características histopatológicas específicas, como grau de diferenciação tumoral, invasão linfovascular e margens cirúrgicas comprometidas, fornece informações sobre o potencial agressivo do tumor e pode orientar as decisões terapêuticas.<sup>10</sup>

### 5.3 ESTADIAMENTO

O CCR é caracterizado principalmente com base nos achados histopatológicos. O estadiamento do tumor, atualmente é um dos principais fatores prognósticos considerados na escolha do tratamento de pacientes não metastáticos.<sup>6</sup>

O método de classificação Tumor, Nódulo, Metástase (TNM) desenvolvido pelo Comitê Conjunto Americano de Câncer (AJCC) / União Internacional de Controle do Câncer (UICC) é amplamente utilizado como o sistema preferencial de estadiamento para a maior parte dos tumores sólidos e para o câncer colorretal.<sup>12</sup>

No caso do câncer colorretal, o sistema TNM descreve três aspectos principais do câncer:

- **Tumor (T):** Esta categoria descreve o tamanho e a extensão do tumor primário. Ela é subdividida em vários estágios, geralmente de T0 a T4, com base no tamanho do tumor e na sua invasão em tecidos adjacentes. Por exemplo:

T1: O tumor invadiu a submucosa (camada de tecido abaixo da mucosa) do cólon ou do reto.

T2: O tumor invadiu a muscular própria do cólon ou do reto.

T3: O tumor invadiu através da muscular própria e se estendeu até a serosa (camada externa) do cólon ou do reto.

T4: O tumor invadiu estruturas adjacentes, como órgãos ou tecidos próximos.

- **Linfonodos (N):** Esta categoria descreve se o câncer se espalhou para os linfonodos próximos e em que medida. Ela é categorizada geralmente de N0 a N2, com base no número de linfonodos envolvidos e sua localização. Por exemplo:

N0: Não há evidência de disseminação para os linfonodos regionais.

N1: O câncer se espalhou para 1-3 linfonodos regionais.

N2: O câncer se espalhou para 4 ou mais linfonodos regionais.

- **Metástases (M):** Esta categoria descreve se o câncer se espalhou para outras partes do corpo além do local primário. Ela é categorizada geralmente de M0 a M1, com base na presença ou ausência de metástases. Por exemplo:

M0: Não há evidência de metástases à distância.

M1: O câncer se espalhou para órgãos distantes, como fígado, pulmões ou ossos.

Combinando essas três categorias, pode-se determinar o estágio clínico ou patológico do câncer colorretal, o que impacta no prognóstico e decisão terapêutica.

Primary tumor (T)	
T category	T criteria
TX	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> , intramucosal carcinoma (involvement of lamina propria with no extension through muscularis mucosae)
T1	Tumor invades the submucosa (through the muscularis mucosa but not into the muscularis propria)
T2	Tumor invades the muscularis propria
T3	Tumor invades through the muscularis propria into pericolorectal tissues
T4	Tumor invades* the visceral peritoneum or invades or adheres <sup>¶</sup> to adjacent organ or structure
T4a	Tumor invades* through the visceral peritoneum (including gross perforation of the bowel through tumor and continuous invasion of tumor through areas of inflammation to the surface of the visceral peritoneum)
T4b	Tumor directly invades* or adheres <sup>¶</sup> to adjacent organs or structures
<p>* Direct invasion in T4 includes invasion of other organs or other segments of the colorectum as a result of direct extension through the serosa, as confirmed on microscopic examination (for example, invasion of the sigmoid colon by a carcinoma of the cecum) or, for cancers in a retroperitoneal or subperitoneal location, direct invasion of other organs or structures by virtue of extension beyond the muscularis propria (ie, respectively, a tumor on the posterior wall of the descending colon invading the left kidney or lateral abdominal wall; or a mid or distal rectal cancer with invasion of prostate, seminal vesicles, cervix, or vagina).</p> <p><sup>¶</sup> Tumor that is adherent to other organs or structures, grossly, is classified cT4b. However, if no tumor is present in the adhesion, microscopically, the classification should be pT1-4a depending on the anatomical depth of wall invasion. The V and L classification should be used to identify the presence or absence of vascular or lymphatic invasion whereas the PN prognostic factor should be used for perineural invasion.</p>	

Imagem 2: Classificação TNM (T).<sup>13</sup>

Regional lymph nodes (N)	
N category	N criteria
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	One to three regional lymph nodes are positive (tumor in lymph nodes measuring $\geq 0.2$ mm), or any number of tumor deposits are present and all identifiable lymph nodes are negative
N1a	One regional lymph node is positive
N1b	Two or three regional lymph nodes are positive
N1c	No regional lymph nodes are positive, but there are tumor deposits in the: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Subserosa</li> <li>▪ Mesentery</li> <li>▪ Nonperitonealized pericolic, or perirectal/mesorectal tissues</li> </ul>
N2	Four or more regional nodes are positive
N2a	Four to six regional lymph nodes are positive
N2b	Seven or more regional lymph nodes are positive

Imagem 3: Classificação TNM (N).<sup>13</sup>

Distant metastasis (M)	
M category	M criteria
M0	No distant metastasis by imaging, etc; no evidence of tumor in distant sites or organs. (This category is not assigned by pathologists.)
M1	Metastasis to one or more distant sites or organs or peritoneal metastasis is identified
M1a	Metastasis to one site or organ is identified without peritoneal metastasis
M1b	Metastasis to two or more sites or organs is identified without peritoneal metastasis
M1c	Metastasis to the peritoneal surface is identified alone or with other site or organ metastases

Imagem 4: Classificação TNM (M).<sup>13</sup>

O estadiamento pode ser clínico, baseado em resultados de exames de imagem e/ou exames endoscópicos, ou patológico, baseado nos dados da peça cirúrgica quando o paciente é submetido a cirurgia do tumor primário.<sup>13</sup>

Prognostic stage groups			
When T is...	And N is...	And M is...	Then the stage group is...
Tis	N0	M0	0
T1, T2	N0	M0	I
T3	N0	M0	IIA
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
T1-T2	N1/N1c	M0	IIIA
T1	N2a	M0	IIIA
T3-T4a	N1/N1c	M0	IIIB
T2-T3	N2a	M0	IIIB
T1-T2	N2b	M0	IIIB
T4a	N2a	M0	IIIC
T3-T4a	N2b	M0	IIIC
T4b	N1-N2	M0	IIIC
Any T	Any N	M1a	IVA
Any T	Any N	M1b	IVB
Any T	Any N	M1c	IVC

TNM: Tumor, Node, Metastasis; AJCC: American Joint Committee on Cancer; UICC: Union for International Cancer Control.

Imagem 5: Estadiamento clínico segundo classificação TNM.<sup>13</sup>

#### 5.4 TRATAMENTO CCR metastático

O plano terapêutico dos pacientes com CCRm envolve uma abordagem multidisciplinar, que pode combinar cirurgia, tratamento sistêmico (quimioterapia, terapia alvo, imunoterapia) e eventualmente tratamentos locais (como radioablação ou IMRT).<sup>5</sup> Além disso, a escolha do tratamento precisa considerar fatores como a localização e a extensão das metástases, o *performance status* do paciente e a análise biomolecular do tumor.<sup>2</sup>

O 5-FU é o principal fármaco utilizado no tratamento do CCRm. É classificado como um antimetabólito e, portanto, interfere na síntese e no funcionamento do ácido nucléico, que é crucial para o crescimento e a divisão celular.<sup>6</sup> Ele inibe a enzima crucial no processo de replicação do DNA e RNA, impedindo assim a divisão celular e o crescimento do tumor. Nos casos de CCRm, é geralmente utilizado em combinação com outros quimioterápicos, como oxaliplatina e irinotecano, melhorando

a eficácia do tratamento.<sup>11,14</sup> Os principais efeitos colaterais incluem fadiga, náusea, vômito, diarreia e toxicidade medular.<sup>11</sup>

A terapia de primeira linha para o câncer de cólon metastático frequentemente envolve esquema duplo de quimioterapia, como FOLFOX (5-fluorouracil, leucovorin e oxaliplatina) ou FOLFIRI (5-fluorouracil, leucovorin e irinotecano).<sup>7</sup>

## **5.5 RESISTENCIA AO TRATAMENTO**

A resistência ao tratamento ocorre em parte devido à heterogeneidade tumoral e à capacidade das células cancerígenas desenvolverem diversos mecanismos de escape, como a super expressão de bombas de efluxo de medicamentos ou a mutação no gene RAS, que ativa vias de sinalização alternativas e torna as células insensíveis a alguns tratamentos, por exemplo.<sup>11,15</sup>

Com o objetivo de aumentar eficácia do tratamento, terapias direcionadas a alvos moleculares específicos foram adicionadas mais recentemente ao arsenal terapêutico disponível, com base nas características moleculares do tumor.<sup>16</sup> Os biomarcadores utilizados atualmente na prática clínica são: mutação no gene RAS e BRAF; perda de expressão de proteínas de reparo do DNA (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2), também conhecida como instabilidade microssatélite e geralmente associada a síndrome de Lynch; e amplificação HER2.<sup>7,17</sup>

### **5.5.1 EGFR-KRAS-BRAF no CCR**

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é importante na regulação do crescimento, manutenção e transporte celular.<sup>5</sup> Quando ativado, ele ativa as proteínas RAS e BRAF, que desempenham papéis na proliferação celular, diferenciação, senescência e apoptose por meio de proteínas quinases.<sup>5</sup> A ativação do RAS provoca proliferação celular, auxiliando na sobrevivência celular, invasão tumoral e metástase. A mutação de RAS e BRAF está associada a um pior prognóstico, sendo a mutação

do BRAF em especial relacionado a uma menor sobrevida global e sobrevida livre de progressão.<sup>6</sup>

#### **5.5.2 Estado do gene MSI (Instabilidade de Microssatélites):**

- O estado do gene MSI (Instabilidade de Microssatélites) é uma condição caracterizada pela alta frequência de erros de inserção ou deleção em sequências repetitivas curtas de DNA, conhecidas como microssatélites, durante a replicação do DNA.<sup>18</sup> Essa instabilidade ocorre devido a defeitos no sistema de reparo de pareamento de bases (*MMR - Mismatch Repair*), um conjunto de proteínas responsável pela correção de erros que acontecem durante a duplicação do DNA.<sup>19</sup>
- A instabilidade de microssatélites é particularmente significativa no contexto do câncer, onde pode ser um indicador de tumores com deficiências no sistema MMR.<sup>18</sup> Esses tumores são frequentemente mais heterogêneos e podem ter um comportamento clínico distinto em comparação com tumores que não apresentam MSI.<sup>18</sup>
- Esta condição é observada em cerca de 5% dos cânceres colorretais metastáticos e está associada a uma melhor resposta a certos tratamentos, como imunoterapia (inibidores de checkpoint imunológico), como pembrolizumabe ou nivolumabe + ipilimumabe.<sup>19</sup>

#### **5.5.3 Amplificação do gene HER2:**

A amplificação do gene HER2 é uma alteração genética onde há um aumento anormal no número de cópias do gene HER2 (ERBB2) em células cancerígenas.<sup>20</sup> Este gene codifica uma proteína chamada receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), que é um membro da família dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR).<sup>20</sup> A proteína HER2 é um receptor tirosina quinase que, quando ativado, desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que promove o crescimento, a proliferação e a sobrevivência celular.<sup>20</sup> Em condições normais, esses processos são essenciais para o desenvolvimento e a manutenção dos tecidos. No entanto, quando o gene HER2 é amplificado, a super expressão da proteína resultante pode levar a um crescimento celular descontrolado e ao desenvolvimento de câncer.<sup>21</sup> Estudos têm demonstrado benefício em utilizar terapias anti-HER2 em terceira linha para pacientes portadores de CCR metastático HER2 positivo RAS selvagem.<sup>21</sup>

## **6 MÉTODOS**

### **6.1 Desenho de estudo:**

Este é um estudo retrospectivo, de caso-controle, para investigar a relação entre as características clínicas e biomoleculares e a progressão de doença precoce a primeira linha de tratamento quimioterápico.

### **6.2 Local e Período:**

O estudo foi desenvolvido na Clínica AMO (Salvador-Ba), através da coleta de dados de prontuários de pacientes atendidos entre janeiro de 2015 a dezembro de 2022.

### **6.3 População:**

Pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de cólon ou reto metastáticos irresssecáveis que foram submetidos a tratamento quimioterápico por mais de 9 meses.

### **6.4 Critérios de Inclusão e Exclusão:**

Pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de cólon ou reto metastáticos irresssecáveis que foram submetidos a tratamento quimioterápico por mais de 9 meses. Fora excluídos pacientes que descontinuaram o tratamento e que iniciaram tratamento em outras clínicas.

### **6.5 Instrumentos e procedimentos de coleta dados:**

A coleta de dados foi feita no prontuário online dos pacientes atendidos na Clínica AMO em Salvador-Bahia, acessados na rede interna, *SmartHealth*, ou na clínica. Em uma planilha de Excel foram preenchidos os dados dos pacientes, número do prontuário, gênero, idade ao diagnóstico, estadió clínico ao diagnóstico, locais de metástase e de tumor primário; histologia do tumor, se há invasão angiolinfática, perineural ou vascular sanguínea, qual o grau histológico e qual a classificação TNM, quantos linfonodos foram acometidos e ressecados, se as margens estavam livres na

biópsia, se há tumor *budding*, perfuração, se o tumor primário foi ressecado, se havia perda de expressão de proteínas de reparo do DNA, status HER2, NTRK, status RAS e BRAF, quantas linhas de tratamento foram feitas.

## 6.6 Variáveis:

As variáveis do estudo foram organizadas em diferentes categorias de acordo com sua natureza e escala. As variáveis nominais incluíram informações como gênero, local de metástase, local de tumor primário, histologia, classificação TNM, tratamento adjuvante e classificação HER2. Enquanto isso, as variáveis ordinais compreenderam dados como idade ao diagnóstico, componente mucinoso, estágio clínico ao diagnóstico, linfonodos acometidos e linhas de tratamento. Já as variáveis dicotômicas foram classificadas em duas opções, como gênero (masculino ou feminino), invasão angiolinfática (sim ou não), invasão perineural (sim ou não), entre outras. Por fim, as variáveis politômicas abarcaram diferentes categorias ou valores, tais como quantidade de linhas de tratamento (1, 2, 3), componente mucinoso em percentual, classificação TNM e tumor *budding* (baixo, intermediário ou alto). Essas variáveis foram consideradas preditoras em relação a determinadas características dos pacientes, como faixa etária, linhas de tratamento, status metastático ao diagnóstico, intervenção cirúrgica e tratamento adjuvante.

## 6.7 Plano de análise dos dados:

A coleta dos dados permitiu uma caracterização molecular de pacientes com câncer de colón metastático que foram submetidos a uma reexposição a primeira linha de tratamento com 5-FU. Esta análise foi feita através de pacotes do programa *R Statistics*. Os resultados das variáveis contínuas foram apresentados sob a forma de média, desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartilico (IIQ) quando a variável não apresentou distribuição normal. As variáveis categóricas foram expressas por frequência simples, absoluta e relativa. Para considerar uma variável como tendo distribuição normal, foram utilizados os seguintes parâmetros: média, mediana, moda,

desvio padrão, simetria e achatamento da curva, histograma, Q-Q plots e teste de Kolmogorov-Smirnov para normalidade. Para comparação das variáveis quantitativas entre dois grupos, foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes, ou o *Mann-Whitney*, conforme a distribuição da variável em questão. Para a análise de 3 ou mais grupos, foi utilizada análise de variância de uma via – ANOVA, ou *Kruskal-Wallis*, conforme apropriado, sendo aplicado análise *Post-Hoc* com teste de *Tukey*. Para comparação das variáveis categóricas foram utilizados Qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher. A correlação linear entre as variáveis foi testada utilizando-se os testes de correlação de *Pearson* ou *Spearman* de acordo com a distribuição das variáveis. Para análise de sobrevivência foram utilizadas a curva de *Kaplan-Meier* e o teste de *Log-Rank*, modelo de Cox e modelo de Cox tempo dependente, conforme apropriado. Todos os testes foram bicaudais e só aplicados após verificação das premissas para sua utilização. Foram considerados como estatisticamente significantes valores de  $p < 0,05$ .

#### **6.8 Riscos:**

Vazamentos de dados pessoais do paciente ou a quebra do sigilo ético são os riscos envolvidos no desenvolvimento deste trabalho. Tais riscos foram minimizados dado o fato que o acesso a plataforma com seus dados é feito somente mediante login e senha de acesso dos pesquisadores envolvidos.

#### **6.9 Benefícios:**

A compreensão das características moleculares específicas do câncer de cólon metastático facilita a personalização das terapias, permitindo que os tratamentos sejam melhor ajustados às características únicas de cada tumor, o que pode aumentar substancialmente a eficácia deste tratamento. Importante também é a capacidade deste estudo de identificar marcadores de resistência terapêutica, o que é essencial para desenvolver estratégias que superem a resistência a medicamentos, possibilitando abordagens terapêuticas mais efetivas e duradouras.

#### **6.10 Aspectos éticos:**

O projeto foi submetido ao comitê de ética e pesquisa para a aprovação (número de protocolo: 73891923.5.0000.5027) e segue os preceitos da resolução nº466/2012, mantendo os critérios de ética em pesquisa. Não foram aplicados termos de consentimento e durante a análise dos dados pacientes no prontuário e posterior escrita da pesquisa não será exposto o nome de nenhum paciente e nem os seus dados pessoais.

## **7 RESULTADOS**

Foram analisados 184 prontuários de pacientes atendidos entre janeiro de 2015 a dezembro de 2022 na Clínica AMO (Salvador - BA) com diagnóstico de

adenocarcinoma de cólon metastático. Destes, 114 prontuários foram excluídos por perda de seguimento com profissional da clínica, por não terem realizado tratamento quimioterápico por mais de 9 meses ou por se tratar de tumor de outro tipo histológico (ex: tumor neuroendócrino). Desse modo, a amostra (n) do presente estudo foi de 70 pacientes, sendo 43 (61,42%) do sexo feminino e 27 (38,57%) do sexo masculino, com faixa etária média de 64 anos ao diagnóstico (Tabela 1).

**Tabela 1: Perfil dos pacientes**

Preditor	Valor	Porcentagem (%)	Contagem (n)
Sexo	Masculino	38.5	27
Sexo	Feminino	61.4	43
EC ao Diagnóstico	I	0	0
EC ao Diagnóstico	II	4.2	3
EC ao Diagnóstico	III	21.4	15
EC ao Diagnóstico	IV	72.8	51
EC ao Diagnóstico	NE	1.4	1
Status RAS	Mutado	61.4	43
Status RAS	Selvagem	35.7	25
Status RAS	Inconclusivo	2.8	2
Status BRAF	Mutado	4.2	3
Status BRAF	Selvagem	51.4	36
Status BRAF	NE	44.2	31
MSI High	Sim	7.1	5
MSI High	Não	77.1	54
MSI High	NE	15.7	11
HER2	Positivo	2.8	2
HER2	Negativo	47.1	33
HER2	NE	50	35

**Fonte:** Autoria própria.

Se forem separados os pacientes que tiveram uma progressão dentro dos primeiros 9 meses de tratamento dos demais que não progrediram ou chegaram a progredir depois de 9 meses, tem-se que:

**Tabela 2: Perfil dos pacientes que progrediram em <9m com relação ao total**

Preditor	Valor	Porcentagem (%)	Contagem (n)
----------	-------	-----------------	--------------

Sexo	Masculino	15,7	11
Sexo	Feminino	38,5	27
Média de idade ao diagnóstico	Homens		61
Média de idade ao diagnóstico	Mulheres		64
EC ao Diagnóstico	I	0	0
EC ao Diagnóstico	II	1,4	1
EC ao Diagnóstico	III	11,4	8
EC ao Diagnóstico	IV	41,4	29
EC ao Diagnóstico	NE	0	0

**Fonte:** Autoria própria.

**Tabela 3: Perfil dos pacientes que não progrediram em <9m**

Preditor	Valor	Porcentagem (%)	Contagem (n)
Sexo	Masculino	22,8	16
Sexo	Feminino	25,7	18
Média de idade ao diagnóstico	Homens		65
Média de idade ao diagnóstico	Mulheres		67
EC ao Diagnóstico	I	0	0
EC ao Diagnóstico	II	2,8	2
EC ao Diagnóstico	III	10	7
EC ao Diagnóstico	IV	31,4	22
EC ao Diagnóstico	NE	1,4	1

**Fonte:** Autoria própria.

No estudo, 72,86% dos pacientes foram diagnosticados com estadiamento clínico IV, ou seja, metastáticos ao diagnóstico, enquanto aqueles com diagnóstico em estágios mais iniciais (II e III), sem metástase sincrônica, foram menos comuns, representados por 4,2% e 21,4% respectivamente. Não houve nenhum paciente diagnosticado no estágio I e em 1 paciente não havia especificação de estadiamento ao diagnóstico (NE) (tabela 1). A maioria dos pacientes exibia metástases hepáticas (60%), seguidas

por metástases pulmonares (41,43%) e peritoneais (34,29%) (tabela 4). Outros locais menos frequentes, como o ovário (10%) e outras áreas afetadas (35,71%), também foram observadas. Na maioria dos casos, as metástases estavam concentradas em 1 ou 2 sítios, com 28 pacientes em ambos os grupos, enquanto uma parcela menor, composta por 14 pacientes, apresentavam metástases em 3 ou mais sítios (Tabela 4).

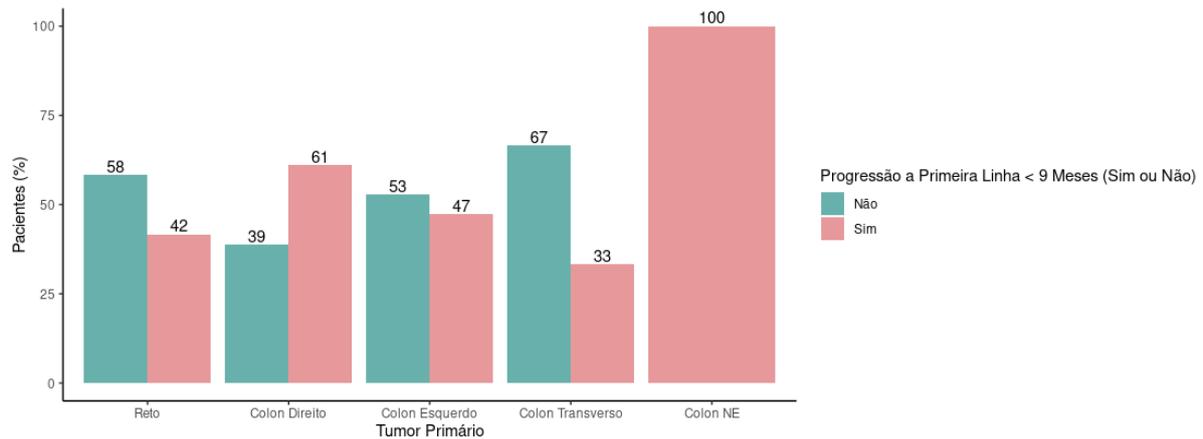
**Tabela 4: Locais de metástase**

Preditor	Valor	Porcentagem (%)	Contagem (n)
Contagem de Local de Metástase	1 Local	40	28
Contagem de Local de Metástase	2 Locais	40	28
Contagem de Local de Metástase	3 ou mais	20	14
Local de Metástase	Fígado	60	42
Local de Metástase	Pulmão	41.42	29
Local de Metástase	Peritônio	34.28	24
Local de Metástase	Ovário	10	7
Local de Metástase	Outros	35.71	25

**Fonte:** Autoria própria.

Quanto à localização do tumor primário, 32 pacientes apresentaram tumor primário no cólon esquerdo, 18 apresentaram tumor primário no cólon direito, 12 no reto e 3 no cólon transversal com apenas um paciente sem especificação (NE). Pacientes com tumor do lado direito prevaleceram com relação a progressão da doença com 9 meses ou (61%) (OR:1,83; IC95% 0,61-5,47; p=0,41 – Imagem 6), conforme evidenciado no Gráfico 1.

**Gráfico 1:** Relação entre localização do tumor primário e progressão de doença



**Fonte:** Autoria própria.

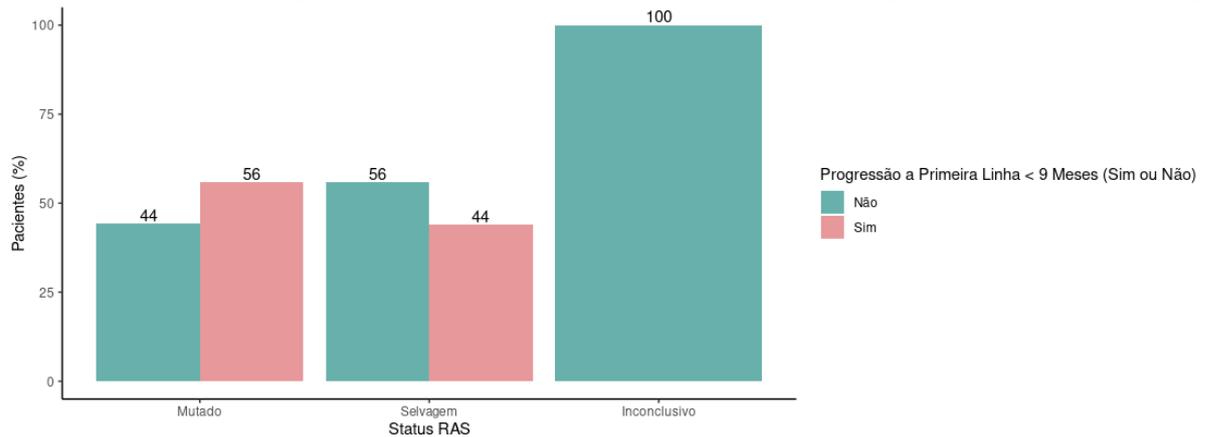
**OR para Resistência Terapêutica**

Variável	OR	OR (95% IC)	Valor-P
<b>Localização do Tumor Primário</b>			
Cólon Direito	1.833	(0.614; 5.470)	0.412
Cólon Esquerdo	0.795	(0.310; 2.033)	0.752
Reto	0.667	(0.189; 2.345)	0.811
<b>Biomarcadores</b>			
dMMR	1.200	(0.185; 7.770)	1
Status BRAF (Mutado)	1.272	(0.105; 15.384)	1
Status RAS (Mutado)	1.607	(0.595; 4.339)	0.451
HER2 (Positivo)	0.736	(0.042; 12.821)	1

Imagem 6: Dados estatísticos por variável analisada

Na análise das características moleculares nesta amostra, foi observado que a mutação do gene RAS estava presente em 61,43% dos casos, enquanto 35,71% dos pacientes não apresentavam mutação no gene RAS (RAS selvagem) (Tabela 1). Ao comparar os grupos, percebe-se que a mutação do gene RAS tende a aumentar o risco de progressão em menos de 9 meses de tratamento, embora sem significância estatística atingida em nossa amostra (OR:1,60; IC95% 0,59-4,33; p=0,45) (Gráfico 2).

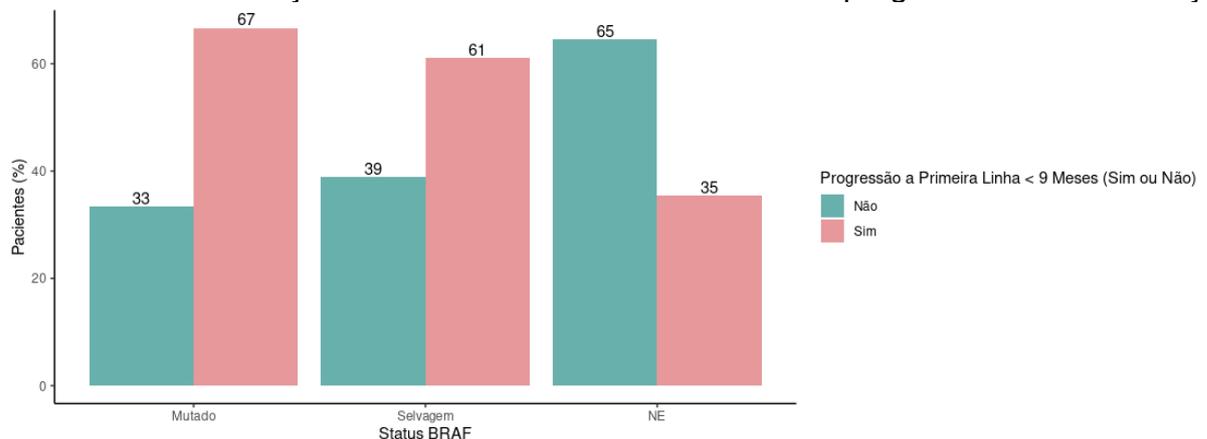
**Gráfico 2:** Relação entre o status RAS e progressão de doença



**Fonte:** Autoria própria.

Foi encontrada mutação do gene BRAF em 4.29% dos pacientes (Tabela 1). Dentre estes, percebe-se que o status BRAF mutado também mostra uma tendência a aumentar o risco de progressão precoce da doença, mas sem significância estatística em nossa amostra (OR:1,27; IC95% 0,10-15,38;  $p=1$ ) (Gráfico 3).

**Gráfico 3:** Relação entre o status BRAF e progressão de doença

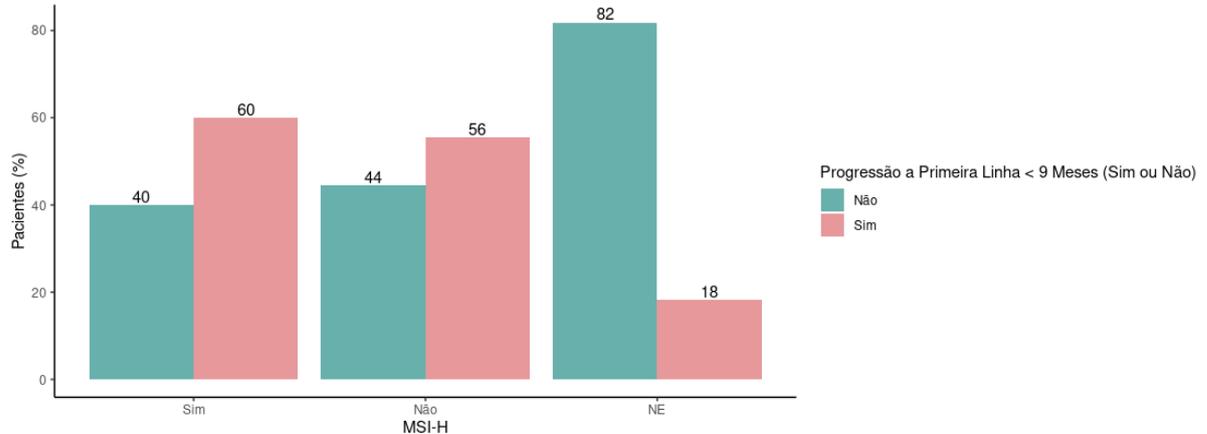


**Fonte:** Autoria própria.

A instabilidade de microssatélites (MSI High) foi detectada em 7.14% dos casos, com a maioria dos pacientes (77.14%), demonstrando ausência dessa instabilidade e variável não avaliada em 15,72% dos pacientes. (Tabela 1). Apesar de observarmos

uma tendência a progressão precoce no grupo de pacientes portadores de instabilidade microssatélite, também não houve significância estatística (OR:1,2/ IC:95% 0,18-7,77/ p=1) (Gráfico 4).

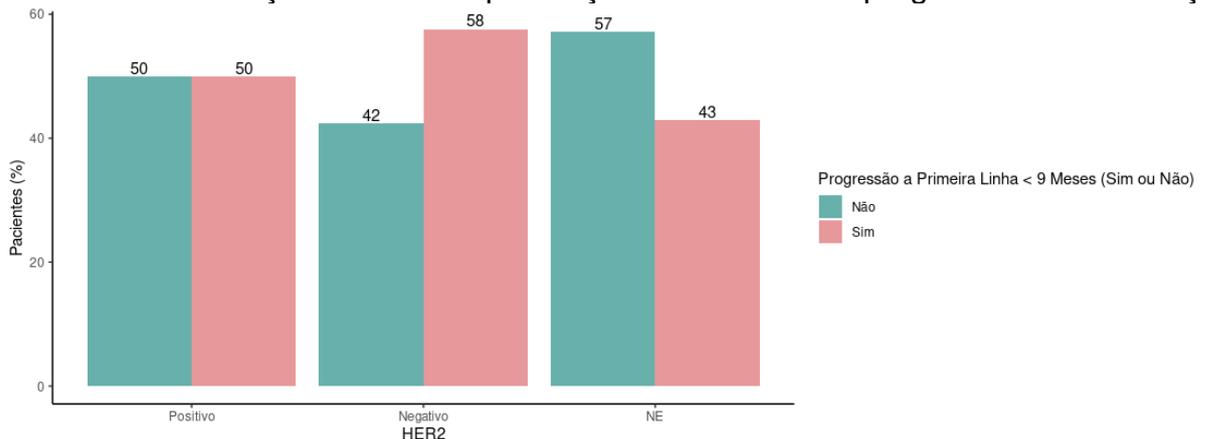
**Gráfico 4:** Relação entre células MSI-H e progressão de doença



**Fonte:** Autoria própria.

No que se refere ao receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), 47.14% dos pacientes apresentaram resultado negativo, enquanto apenas 2.86% foram positivos e metade da amostra não teve esse dado avaliado (Tabela 1). Não há uma relação clara nesta amostra entre a presença de amplificação HER2 e progressão precoce.

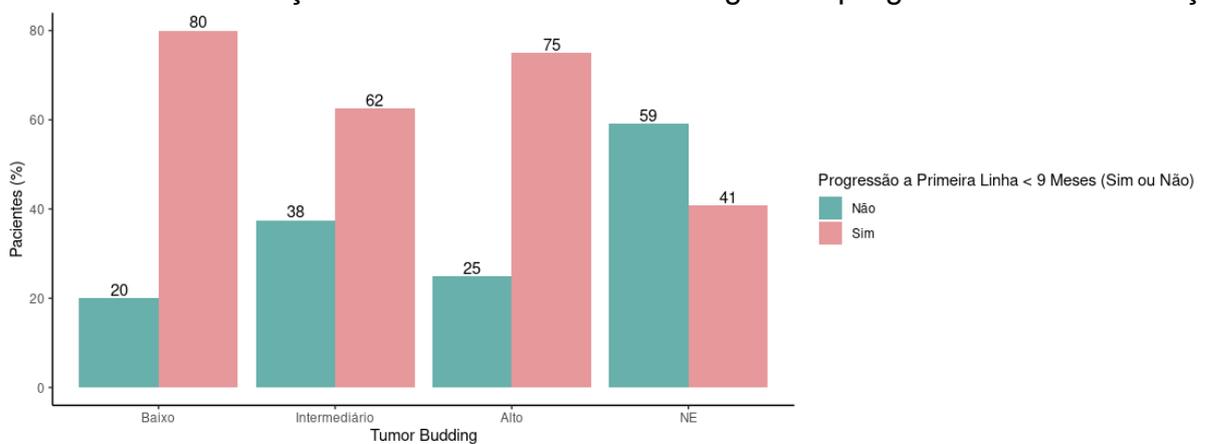
**Gráfico 5:** Relação entre a presença de HER2 e progressão de doença



**Fonte:** Autoria própria.

A avaliação do tumor *budding* revelou uma predominância de casos em que essa característica não estava especificada (70%), com uma porcentagem menor apresentando tumor *budding* alto (11.43%) ou intermediário (11.43%) (Tabela 1). Não foi possível estabelecer um padrão relevante entre o grau de tumor *budding* e a probabilidade de progressão precoce da doença à primeira linha de tratamento, visto que a maioria progrediu independente do grau identificado (OR:1,33; IC95% 0,18-9,72;  $p=1$ ) (Gráfico 6).

**Gráfico 6:** Relação entre Tumor Budding e progressão de doença



**Fonte:** Autoria própria.

Naqueles pacientes submetidos a cirurgia do tumor primário, 34.29% eram moderadamente diferenciados e 34,29% bem diferenciado, sendo 7,14% pouco diferenciado e 34,28% não especificado (Tabela 5). Já quanto às linhas de tratamento, 17,14% (12 pacientes) passaram por apenas uma linha de tratamento independente da evolução até a data analisada, 35.71% (25 pacientes) passaram por duas linhas e 27.14% (19 pacientes) por três. Uma parcela significativa de pacientes (20%) foi submetida a quatro ou mais linhas de tratamento, demonstrando a complexidade e resistência desse tipo de câncer a abordagens terapêuticas (Tabela 6).

**Tabela 5: Grau histológico dos Tumores Primários**

Preditor	Valor	Porcentagem (%)	Contagem (n)
Grau Histológico	Bem Diferenciado	22.85	16
Grau Histológico	Moderadamente Diferenciado	34.28	24
Grau Histológico	Pouco Diferenciado	7.14	5
Grau Histológico	NE	34.28	24

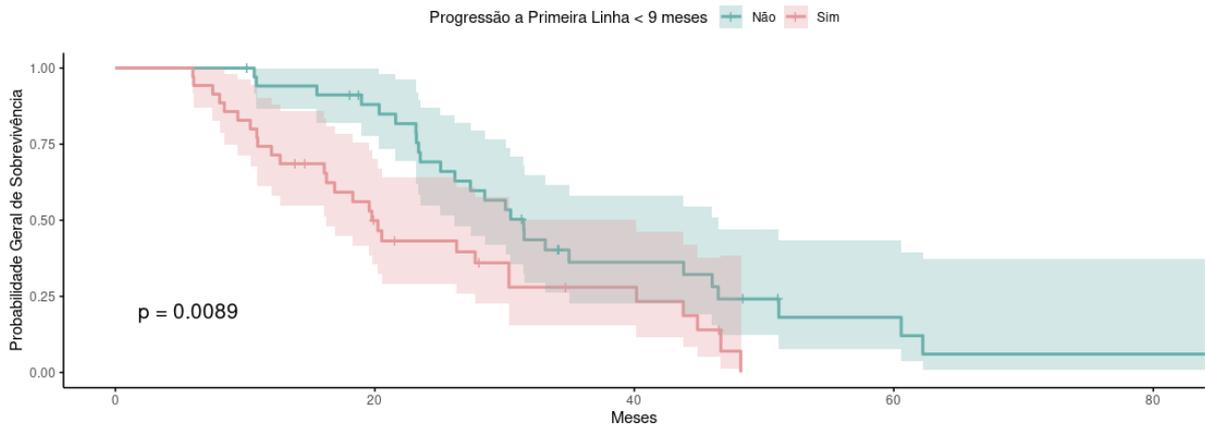
**Fonte:** Autoria própria.

**Tabela 6: Número de Linhas de Tratamento por Paciente**

Quantidade de Linhas de Tratamento	(%)	(n)
1 Linhas de Tratamento	17,14%	12
2 Linhas de Tratamento	35,71%	25
3 Linhas de Tratamento	27,14%	19
4 ou mais Linhas de Tratamento	20	14

**Fonte:** Autoria própria.

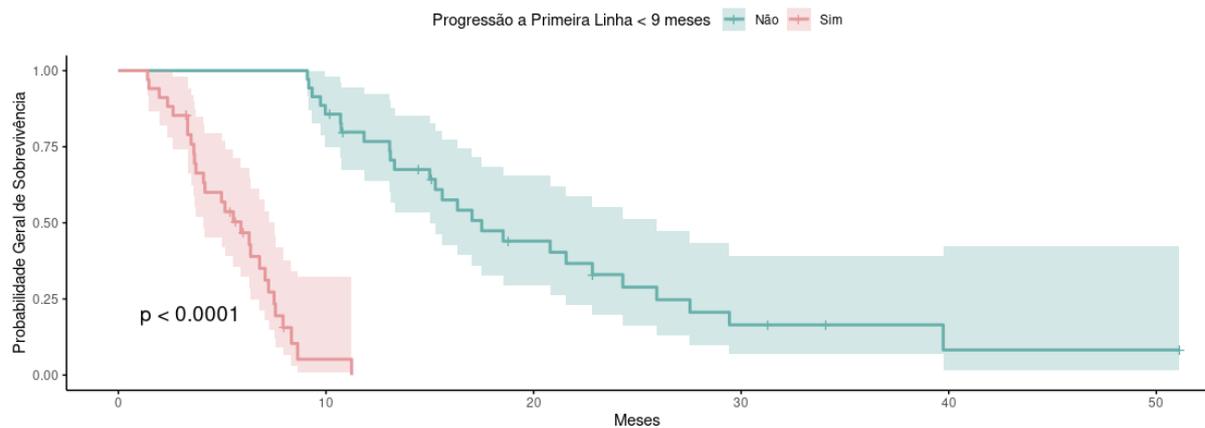
**Gráfico 7:** Curva de Kaplan-Meier da sobrevida dos pacientes a partir do diagnóstico da doença metastática.



**Fonte:** Autoria própria.

Os pacientes que progrediram precocemente (<9 meses) a partir da primeira linha de tratamento apresentaram sobrevida global mediana de 19,6 meses a partir do diagnóstico de doença metastática, comparado a 30,1 meses do grupo que não progrediu com < 9 meses ( $p=0,0089$ ) (Gráfico 7).

**Gráfico 8 :** Curva de Kaplan-Meier do tempo livre de progressão dos pacientes a partir do diagnóstico de doença metastática.



**Fonte:** Autoria própria.

Além disso, os pacientes que progrediram nos 9 meses iniciais de tratamento, apresentaram uma sobrevida livre de progressão mediana de 5,37 meses comparado a 15,6 meses do outro grupo ( $p=0,0001$ ) (Gráfico 8).

## 8 DISCUSSÃO

A presença de mutações nos genes RAS e BRAF é um fator importante na resistência terapêutica e na progressão do CCRm.<sup>18</sup> Neste estudo, observamos que 61,43% dos pacientes apresentavam mutação somática no RAS, e um menor percentual de pacientes com mutação somática no gene BRAF (4,29%). Esses resultados se alinham com a literatura, que mostram que mutações no gene BRAF é menos frequente que as mutações dos genes RAS, com uma diferença de aproximadamente 35%.<sup>6,15</sup>

Poucos pacientes na nossa amostra foram testados para amplificação HER2, já que o estudo incluiu paciente a partir de 2015, quando esse biomarcador não era testado rotineiramente nos pacientes. Embora a amplificação do HER2 seja um potencial alvo terapêutico, atualmente para tratamento de terceira linha em pacientes com tumor de cólon metastático HER2 positivo, sua baixa prevalência na nossa amostra limitou a análise de sua associação com possível resistência terapêutica. Alguns estudos sugerem que a amplificação do HER2 pode estar associada à resistência terapêutica, especialmente em relação a algumas terapias direcionadas.<sup>16,18,22</sup>

Com relação às características clínicas, é observado que a predominância de tumores primários no cólon esquerdo e a maior suscetibilidade à progressão da doença em pacientes com tumor do lado direito são achados consistentes com estudos prévios. Estudos anteriores têm associado a localização do tumor primário no cólon direito a um perfil molecular mais agressivo e com pior sobrevida global.<sup>2,18</sup>

O grupo de pacientes que progrediram precocemente (<9 meses) a primeira linha de tratamento apresentaram uma sobrevida global significativamente menor em comparação com o grupo que progrediu após 9 meses de tratamento, mostrando o impacto negativo da resistência terapêutica nos desfechos oncológicos.

É importante reconhecer as limitações deste estudo, incluindo seu desenho retrospectivo, o tamanho da amostra pequena e a natureza unicêntrica do local de coleta de dados. Estudos prospectivos maiores e multicêntricos com dados de vida real poderiam trazer mais informações sobre perfil de resistência terapêutica e biomarcadores, fornecendo insights adicionais para o sequenciamento terapêutico em pacientes com CCR metastático.

## **9 CONCLUSÃO**

### **9.1 Geral**

O grupo de pacientes que progrediram precocemente (<9 meses) (não respondedores) a primeira linha de tratamento apresentou uma sobrevida global significativamente menor em comparação com o grupo que progrediu após 9 meses de tratamento (respondedores), mostrando o impacto negativo da resistência terapêutica nos desfechos oncológicos.

### **9.2 Específicos**

#### **9.2.1 Quanto às características clínicas**

- a) Na nossa amostra houve prevalência de tumores primários no cólon esquerdo
- b) A maioria dos pacientes neste estudo foi diagnosticada em estágio IV
- c) O principal sítio de metástase na maioria dos pacientes analisados foi no fígado (60%).

#### **9.2.2 Quanto ao perfil molecular**

- a) Neste estudo, observou-se uma maior incidência de mutações no gene RAS (61,43%) e uma menor frequência de mutações no gene BRAF (4,29%)

## 10 REFERÊNCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424.
2. Cervantes A, Adam R, Roselló S, Arnold D, Normanno N, Taïeb J, et al. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up ☆. *Ann Oncol [Internet].* 2023;34(1):10–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.003>
3. Pucci MD, Dasenbrock A, Tanzawa CK, Santos MB dos. Perfil Clínico-Epidemiológico do Câncer Colorretal na Região Oeste do Paraná, Brasil, 2016-2018. *Rev Bras Cancerol.* 2023;69(1):2016–8.
4. Taberero J, Taieb J, Prager GW, Ciardiello F, Fakih M, Leger C, et al. Trifluridine/tipiracil plus bevacizumab for third-line management of metastatic colorectal cancer: SUNLIGHT study design. *Futur Oncol.* 2021;17(16):1977–85.
5. Dasari NA, Lonardi S, Garcia-Carbonero R, Fernandez MEE, Yoshino T, Sobrero AF, et al. LBA25 FRESCO-2: A global phase III multiregional clinical trial (MRCT) evaluating the efficacy and safety of fruquintinib in patients with refractory metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol [Internet].* 2022;33(June):S1391–2. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.08.021>
6. Nagourney RA, Evans S, Tran PH, Nagourney AJ, Sugarbaker PH. Colorectal cancer cells from patients treated with FOLFOX or CAPOX are resistant to oxaliplatin. *Eur J Surg Oncol [Internet].* 2021;47(4):738–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2020.09.017>
7. Schlicker A, Beran G, Chresta CM, McWalter G, Pritchard A, Weston S, et al. Subtypes of primary colorectal tumors correlate with response to targeted treatment in colorectal cell lines. *BMC Med Genomics.* 2012;5:1–15.
8. Vasconcelos RIVO. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer Coordenação de Pós-graduação Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer Coordenação de Pós-graduação. 2022;
9. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: Results of the

- translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol.* 2010;28(3):466–74.
10. Ryan D, Rodríguez M. Overview of the management of rectal adenocarcinoma - UpToDate. UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA [Internet]. 2020;(algorithm 1):1–29. Available from: [https://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-management-of-rectal-adenocarcinoma%0Ahttps://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-management-of-rectal-adenocarcinoma?search=Overview of the management of rectal adenocarcinoma&source=search\\_result&searchTerm=Overview of the management of rectal adenocarcinoma](https://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-management-of-rectal-adenocarcinoma%0Ahttps://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-management-of-rectal-adenocarcinoma?search=Overview%20of%20the%20management%20of%20rectal%20adenocarcinoma&source=search_result&searchTerm=Overview%20of%20the%20management%20of%20rectal%20adenocarcinoma)
  11. Gowrikumar S, Primeaux M, Pravoverov K, Wu C, Szeglin BC, Sauvé CEG, et al. A claudin-based molecular signature identifies high-risk, chemoresistant colorectal cancer patients. *Cells.* 2021;10(9):1–23.
  12. Ahnen DJ, Macrae FA, Bendell J. Clinical manifestations, diagnosis, and staging of colorectal cancer. UpToDate [Internet]. 2012;1–12. Available from: [http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-diagnosis-and-staging-of-colorectal-cancer?topicKey=ONC/2496&elapsedTimeMs=0&source=search\\_result&searchTerm=colorectal+cancer&selectedTitle=1~150&view=print&displayedView=full](http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-diagnosis-and-staging-of-colorectal-cancer?topicKey=ONC/2496&elapsedTimeMs=0&source=search_result&searchTerm=colorectal+cancer&selectedTitle=1~150&view=print&displayedView=full)
  13. Primary T. Colorectal cancer TNM staging AJCC UICC 8th edition. 2020;7–9.
  14. Clark JW, Sanoff HK. Adjuvant therapy for resected stage III ( node-positive ) colon cancer Authors. 2012;1–34.
  15. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab–FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer . *N Engl J Med.* 2013;369(11):1023–34.
  16. Cremolini C, Rossini D, Dell’Aquila E, Lonardi S, Conca E, Del Re M, et al. Rechallenge for Patients with RAS and BRAF Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer with Acquired Resistance to First-line Cetuximab and Irinotecan: A Phase 2 Single-Arm Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2019;5(3):343–50.
  17. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2509–20.
  18. Kwon Y, Park M, Jang M, Yun S, Kim WK, Kim S, et al. Prognosis of stage III colorectal carcinomas with FOLFOX adjuvant chemotherapy can be predicted by

- molecular subtype. *Oncotarget*. 2017;8(24):39367–81.
19. Auvray M, Auclin E, Barthelemy P, Bono P, Kellokumpu-Lehtinen P, Gross-Goupil M, et al. Second-line targeted therapies after nivolumab-ipilimumab failure in metastatic renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2019;108:33–40.
  20. Sanoff HK, Goldberg RM. Therapy for metastatic colorectal cancer in elderly patients and those with a poor performance status. *UpToDate*. 2011;1–38.
  21. André S, Tomás AR, Fonseca R. Determinação da amplificação do HER2 por hibridação in situ de fluorescência (FISH). *Acta Med Port*. 2005;18(6):417–22.
  22. Hoadley KA, Yau C, Wolf DM, Cherniack AD, Tamborero D, Ng S, et al. Multiplatform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues of origin. *Cell [Internet]*. 2014;158(4):929–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.049>