



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

YASMIM VIEIRA SILVA

EXPRESSÃO DO CANAL $K_v10.1$ EM PACIENTES COM CÂNCER
COLORRETAL: IMPLICAÇÕES DIAGNÓSTICAS E
TERAPÊUTICAS

JOÃO PESSOA

2024

YASMIM VIEIRA SILVA

**EXPRESSÃO DO CANAL $K_v10.1$ EM PACIENTES COM CÂNCER
COLORRETAL: IMPLICAÇÕES DIAGNÓSTICAS E TERAPÊUTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba com o objetivo de obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Área de Concentração: Biologia e Fisiologia Celular

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Gláucia Faheina Veríssimo Martins

JOÃO PESSOA

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586e Silva, Yasmim Vieira.

Expressão do canal Kv10.1 em pacientes com câncer colorretal : implicações diagnósticas e terapêuticas / Yasmim Vieira Silva. - João Pessoa, 2024.

94 f. : il.

Orientação: Glaucia Faheina Veríssimo Martins.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Câncer colorretal - Gene Kv10.1. 2. Câncer colorretal - Dados clinico-patológico. 3. Linhagens celulares - Dados clinico-patológico. 4. Viabilidade celular. I. Martins, Glaucia Faheina Veríssimo. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616-006.6(043)



Ata da Sessão Pública da Defesa de Dissertação de Mestrado da discente **Yasmim Vieira Silva**, candidata ao Título de Mestre em Biologia Celular e Molecular - Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular.

1 Aos vinte e seis dias do mês de abril de dois mil e vinte e quatro, às dez horas, reuniram-se,
2 no Auditório do Departamento de Biologia Molecular - CCEN/UFPB, os membros da Banca
3 Examinadora, composta pelos Professores Doutores: Glaucia Verissimo Faheina Martins
4 (Orientador / Presidente), Davi Felipe Farias (Examinador interno) e Demetrius Antônio
5 Machado de Araújo (Examinador externo) constituída para examinar a candidata **Yasmim**
6 **Vieira Silva** ao grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em
7 Biologia Celular e Molecular. Iniciando a sessão, na qualidade de Presidente, a Professora
8 Glaucia Verissimo Faheina Martins comunicou aos presentes a finalidade da reunião. A
9 seguir, concedeu a palavra para que a candidata fizesse, oralmente, a exposição do trabalho
10 intitulado "*EXPRESSÃO DO CANAL KV10.1 EM PACIENTES COM CÂNCER*
11 *COLORRETAL: IMPLICAÇÕES DIAGNÓSTICAS E TERAPÊUTICAS*". Concluída a
12 exposição, a candidata foi arguida pela Banca Examinadora, que avaliou, julgou e proferiu o
13 seguinte parecer: "**aprovada**". Ao final da sessão, a orientadora preencheu a Ficha de
14 Avaliação e emitiu o Relatório Final, para serem encaminhados ao Colegiado deste Programa
15 para homologação. E, para constar, eu, Maria do Socorro de Oliveira Souza, Assistente em
16 Administração, responsável pela Secretaria do Programa, lavrei a presente ata, que assino
17 junto com os membros da Banca Examinadora.

Glaucia Verissimo Faheina Martins
Orientador / Presidente

Coorientador

Davi Felipe Farias
Examinador Interno

Demetrius Antônio Machado de Araújo
Examinador Externo

Yasmim Vieira Silva
Discente

Maria do Socorro de Oliveira Souza
Assistente em Administração

Dedico o princípio deste trabalho aos pacientes que estiveram presentes no estudo e às suas famílias, que possamos contribuir a partir de hoje com o futuro de tantas outras.

Dedico, também, a conclusão deste trabalho aos meus pais, Alba Valéria e Luiz Carlos, que com seu infinito amor me ajudaram chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, Alba Valéria e Luiz Carlos, minha irmã Bruna e minha sobrinha Bianca. Vocês são o meu ponto de partida, a minha bússola e o meu porto seguro.

À minha prima Nicole, que me inspira com sua competência, determinação e coragem, desde que dividíamos as brincadeiras no areial do sítio, cercadas de arbustos venenosos, até as conquistas pessoais e de trabalho. Amo você.

Agradeço às minhas amigas Monalisa e Maria Eduarda por dividirem comigo as risadas, as dores, as conquistas, as dificuldades, os desafios que as etapas das nossas vidas vão nos trazendo desde a graduação, e principalmente, a leveza de conviver e ter a amizade de vocês.

À Rafael, meu companheiro de vida, de luta e amor, que esteve comigo nos momentos mais sinuosos desta caminhada e foi também um porto de segurança, que me ajudou a encontrar a luz e o conforto que em diversas situações mostraram-se desafiadoras.

A todo o grupo do TOXGEN, o laboratório que me acolheu para realizar este estudo. À minha orientadora prof^a Glaucia Faheina, que me acolheu no laboratório e fez com que esta pesquisa fosse possível, Alécia e Inaldo, que iniciaram comigo nesta caminhada, e os que estão arduamente trabalhando por um bem maior, meus colegas e amigos Jeremias e Victória.

À FAPESQ, que permitiu desde o financiamento do projeto à bolsa de mestrado fosse fornecida com muita responsabilidade e cuidado. Ao Hospital Napoleão Laureano, em especial ao Dr. Péricles Oliveira, médico cirurgião que realizou e orientou a equipe com a coleta das amostras, que permitiu que esta pesquisa fosse realizada; ao Programa de Pesquisa para o SUS (PPSUS), e à UFPB, que desde 2017 é a minha casa e o lugar onde construí minha melhor identidade e minhas melhores memórias jovens.

E por fim, agradeço à Ana Cecília, a psicóloga que me acompanhou todo o ano de 2023 e acompanha até hoje, que se tornou uma pessoa marcante na minha história e que me apresentou as ferramentas para que eu mesma me conhecesse. Serei eternamente grata.

“O conhecimento é uma questão de ciência, não admite a menor desonestidade ou presunção. O que se requer é precisamente o contrário - honestidade e modéstia. ”

(Mao Zedong, 1937)

Resumo

O câncer colorretal é um dos tipos mais comuns de câncer globalmente, com 45.630 novos casos e 20.245 mortes no Brasil em 2023, atribuídos a fatores como exposição a agentes cancerígenos e envelhecimento populacional. Apesar de sua alta incidência, pode ser tratado eficazmente se detectado precocemente, embora os métodos de diagnóstico atuais tenham limitações. Os canais de potássio dependentes de voltagem (K_v) desempenham um papel crucial na regulação do ciclo celular e na progressão tumoral. O K_v10.1, por sua vez, é um canal de potássio restrito a alguns tipos de tecido em condições saudáveis, como o neuronal, mas foi documentado a presença deste canal em tecidos periféricos em pacientes diagnosticados com câncer colorretal, câncer de mama, cervical e outros. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de expressão do gene para o K_v10 em amostras tumorais e saudáveis de pacientes com câncer colorretal, e em linhagens celulares, correlacionando estes resultados aos dados clínico-patológicos, além de avaliar *in silico* e *in vitro* a susceptibilidade do canal como alvo para tratamento. Foram obtidas 27 amostras frescas de tecido tumoral e saudável de pacientes diagnosticados com CCR (> 18 anos) no Hospital Napoleão Laureano (HNL). O projeto foi aprovado no CEP sob CAEE: 5.017.299. As linhagens tumorais utilizadas foram HT-29, LoVo, HCT-116, K562 e HEK-293. A análise da expressão gênica (RNAm) do K_v10.1 foi realizada pela técnica da PCR em tempo real, usando o gene normalizador GAPDH e o corante SYBR Green. Nossos dados demonstraram que houve maior expressão do K_v10.1 nas amostras tumorais, quando comparado ao tecido saudável adjacente do mesmo paciente (p=0.0282) pelo Teste de Mann-Whitney. A expressão do gene do K_v10.1 mostrou estar correlacionada com a idade, sendo mais expresso em pacientes abaixo dos 60 anos (p=0.0112), com a localização, sendo mais expresso em tumores localizados no lado esquerdo (p=0.0173), com o tamanho do tumor, sendo mais expresso em tumores menores que 5cm (p=0.0343), e o com o estágio inicial (I/II) (p=0.0078). O canal K_v10.1 foi submetido ao estudo de *docking* molecular, utilizando os compostos A398 e 5-Fluororacil, como ligantes. Os compostos demonstraram valores de energia de ligação negativos, para o A398 (-9,59 Kcal/mol), demonstrando melhor interação com o K_v10.1, quando comparado ao 5-FU (-4,05 Kcal/mol), fármaco utilizado na clínica para o tratamento do CCR. No ensaio de MTT, o composto A398 inibiu significativamente a viabilidade de células HCT-116, com CI₅₀ de 18,24µM em 24h e 9,87µM em 72h. Já o 5-FU mostrou inibição significativa somente após 72h, com CI₅₀ de 14,85µM, evidenciando a dependência de tempo e concentração para sua eficácia. Diante disso, é possível observar bom potencial de uso do K_v10.1 como biomarcador para diagnóstico de CCR, enquanto a abordagem para seu uso como alvo terapêutico deve ser melhor investigado.

Palavras-chave: Câncer colorretal; K_v10.1; Eag1; clínico-patológico; viabilidade celular.

Abstract

Colorectal cancer is one of the most common types of cancer globally, with 45,630 new cases and 20,245 deaths in Brazil in 2023, attributed to factors such as exposure to carcinogens and population aging. Despite its high incidence, it can be effectively treated if detected early, although current diagnostic methods have limitations. Voltage-gated potassium channels (Kv) play a crucial role in cell cycle regulation and tumor progression. Kv10.1, in turn, is a potassium channel restricted to some types of tissue under healthy conditions, such as neuronal tissue, but its presence has been documented in peripheral tissues in patients diagnosed with colorectal cancer, breast cancer, cervical cancer, and others. Thus, the aim of this study was to evaluate the gene expression profile for Kv10.1 in tumor and healthy samples from patients with colorectal cancer, as well as in cell lines, correlating these results with clinicopathological data, and evaluating *in silico* and *in vitro* cell viability the susceptibility of the channel as a treatment target. Twenty-seven fresh tissue samples were obtained from tumor and healthy tissue of patients diagnosed with CRC (> 18 years old) at Napoleão Laureano Hospital (HNL). The project was approved by the Research Ethics Committee under the registration CAAE: 5.017.299. The tumor cell lines used were HT-29, LoVo, HCT-116, K562, and HEK-293. Gene expression analysis (mRNA) of Kv10.1 was performed using real-time PCR technique, using the GAPDH normalization gene and SYBR Green dye. Our data showed that there was higher expression of Kv10.1 in tumor samples compared to adjacent healthy tissue from the same patient ($p=0.0282$) by Mann-Whitney Test. Kv10.1 gene expression was found to be correlated with age, being more expressed in patients under 60 years old ($p=0.0112$), with location, being more expressed in tumors located on the left side ($p=0.0173$), with tumor size, being more expressed in tumors smaller than 5cm ($p=0.0343$), and with early stage (I/II) ($p=0.0078$). The Kv10.1 channel underwent molecular docking study using compounds A398 and 5-Fluorouracil (5-FU) as ligands. The compounds demonstrated negative binding energy values, with A398 (-9.59 Kcal/mol) showing better interaction with Kv10.1 compared to 5-FU (-4.05 Kcal/mol), a drug used clinically for CRC treatment. In the MTT assay, compound A398 significantly inhibited the viability of HCT-116 cells, with IC₅₀ of 18.24 μ M at 24h and 9.87 μ M at 72h. On the other hand, 5-FU showed significant inhibition only after 72h, with IC₅₀ of 14.85 μ M, indicating time and concentration dependence for its efficacy. Therefore, it is possible to observe good potential for using Kv10.1 as a biomarker for CRC diagnosis, while the approach for its use as a therapeutic target should be better investigated.

Keywords: Colorectal cancer; Kv10.1; Eag1; clinic pathological; cell viability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estimativas em 2023 da incidência por 100 mil habitantes.	p. 6
Figura 2 –	Desenvolvimento de um tumor de câncer colorretal	p. 8
Figura 3 -	Vias de ativação da carcinogênese colorretal	p. 9
Figura 4 -	Perfil de expressão de mutações em genes encontrados diferencialmente no lado direito e esquerdo do CCR	p. 10
Figura 5 -	Canal de potássio dependente de voltagem (K_v)	p. 17
Figura 6 -	Mecanismos que alteram a expressão de $K_v10.1$ e possíveis consequências	p. 23
Figura 7 -	Manutenção da cultura de células	p. 28
Figura 8 -	Corte dos fragmentos de tecido tumoral e não-tumoral feito com tesoura cirúrgica	p. 31
Figura 9 -	Microtubos após adição de clorofórmio ao TRIzol® seguido de agitação das amostras	p. 32
Figura 10 -	Obtenção da fase aquosa contendo RNA	p. 33
Figura 11 -	Quantificação das amostras obtidas (RNA e cDNA)	p. 33
Figura 12 -	Método de corrida da qPCR no Software QuantStudio™ 3 System	p. 37
Figura 13 -	Redução do MTT (amarelo) para os cristais de formazan (roxo)	p. 39
Figura 14 -	Expressão do $K_v10.1$ em linhagens celulares	p. 45
Figura 15 -	Expressão diferenciada em tecido saudável e tecido doente	p. 46
Figura 16 -	Expressão do $K_v10.1$ de acordo com o sexo	p. 48
Figura 17 -	Expressão do $K_v10.1$ de acordo com a idade	p. 48
Figura 18 –	Expressão do $K_v10.1$ de acordo com a localização do tumor	p. 50
Figura 19 -	Expressão do $K_v10.1$ de acordo com o tamanho do tumor	p. 51
Figura 20 -	Expressão do $K_v10.1$ de acordo com a diferenciação do tumor	p. 52
Figura 21 -	Expressão do $K_v10.1$ de acordo com o CEA	p. 53
Figura 22 -	Expressão do $K_v10.1$ de acordo com o Grau TNM	p. 54
Figura 23 -	Expressão do $K_v10.1$ de acordo com a presença de metástases	p. 54
Figura 24 -	Expressão do $K_v10.1$ de acordo com a presença de metástases em órgãos linfáticos	p. 55
Figura 25 -	Diagrama de Ramachandran para $K_v10.1$ (modelo 1)	p. 58
Figura 26 -	Diagrama de Ramachandran para $K_v10.1$ (modelo 2)	p. 58
Figura 27 -	Diagrama 2D das interações entre a $K_v10.1$ e o A398	p. 60
Figura 28 -	Diagrama 2D das interações entre a $K_v10.1$ e o 5-FU	p. 61
Figura 29 -	Gráficos de tratamento do A398 e 5-FU em HCT-116	p. 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estadiamento do câncer colorretal pela classificação TNM	p. 12
Tabela 2 -	Linhagens celulares utilizadas e suas especificações na ATCC	p. 26
Tabela 3 -	Desenho dos primers	p. 36
Tabela 4 -	Ligantes, códigos de acesso e estrutura 2D	p. 38
Tabela 5 -	Resultados dos dados clínico-patológicos	p. 42
Tabela 6 -	Correlação entre a expressão relativa do Kv10.1 e os dados clínico-patológicos de pacientes com CCR	p. 55
Tabela 7 -	Resultado do <i>docking</i> molecular com o A398	p. 59
Tabela 8 -	Resultado do <i>docking</i> molecular com o 5-FU	p. 61
Tabela 9 -	Comparação das CI_{50} em HCT-116 nos dois tratamentos	p. 64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	p. 1
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	p. 4
2.1	CÂNCER	p. 4
2.2	CÂNCER COLORRETAL	p. 5
2.2.1	EPIDEMIOLOGIA	p. 5
2.2.2	CARACTERIZAÇÃO E FISIOPATOLOGIA	p. 6
2.2.3	DIAGNÓSTICO, CLASSIFICAÇÃO E TRATAMENTO	p. 10
2.2.4	BIOMARCADORES PARA CCR	p. 14
2.3	CANAIS DE POTÁSSIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM	p. 16
2.3.1	FAMÍLIA EAG (<i>ether-à-go-go</i>)	p. 19
2.4	K _v 10.1	p. 21
3	OBJETIVOS	p. 25
3.1	OBJETIVO GERAL	p. 25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	p. 25
4	METODOLOGIA	p. 26
4.1	CULTURA DE CÉLULAS	p. 26
4.2	COLETA DE DADOS CLÍNICOS E AMOSTRAS DE PACIENTES	p. 28
4.3	EXTRAÇÃO DE RNA	p. 29
4.3.1	EXTRAÇÃO DE RNA NA CULTURA CELULAR	p. 30
4.3.2	EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS FRESCAS E DAS LINHAGENS CELULARES	p. 30
4.4	SÍNTESE DE cDNA	p. 34
4.5	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL	p. 35
4.6	DOCKING MOLECULAR	p. 37
4.7	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	p. 39
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	p. 40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	p. 42
5.1	DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS	p. 42
5.2	EXPRESSÃO DO K _v 10.1 EM CULTURA DE CÉLULAS	p. 44
5.3	EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE K _v 10.1 EM AMOSTRAS DE TECIDO SAUDÁVEL E TECIDO TUMORAL DE PACIENTES COM CCR	p. 45
5.4	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> POR <i>DOCKING</i> MOLECULAR PARA O CANAL K _v 10.1	p. 57
5.5	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO A398	p. 62
6	CONCLUSÃO	p. 67
	REFERÊNCIAS	p. 68
	APÊNDICE A	p. 75
	APÊNDICE B	p. 77
	APÊNDICE C	p. 78
	APÊNDICE D	p. 79
	APÊNDICE E	p. 81
	ANEXO I	p. 83

1 INTRODUÇÃO

O câncer é a nomenclatura para um conjunto de mais de 100 doenças que compartilham a característica de crescimento desordenado de células com capacidade de disseminar-se para outros tecidos e órgãos (INCA, 2022). O câncer colorretal, objeto de estudo desta pesquisa, apresenta tumores que iniciam na porção terminal do intestino grosso, de 15 a 12cm antes do ânus, tendo a segunda maior incidência a nível mundial para homens e mulheres. No Brasil, contou com 45.630 novos casos em 2023, e 20.245 mortes relacionadas. O aumento da incidência de neoplasias na população pode estar relacionado ao aumento da exposição a fatores cancerígenos, envelhecimento populacional, o aprimoramento de tecnologias para diagnóstico e pode estar associado ao maior uso de antibióticos e alteração da microbiota intestinal (Batista; Mattos; Silva, 2015; INCA, 2022).

Apesar de o câncer colorretal ter uma alta incidência, principalmente em pessoas entre 50 e 70 anos, inicialmente apresenta um crescimento lento e é facilmente tratado se diagnosticado precocemente, porém, os métodos de diagnóstico atuais possuem algumas limitações: são pouco sensíveis, como é o caso do teste de sangue oculto nas fezes, podem ser operador-dependentes e alguns são invasivos, a exemplo da sigmoidoscopia flexível e a colonoscopia total, respectivamente (Medeiros *et al.*, 2018).

O trato gastrointestinal realiza diversas funções importantes no nosso organismo, pois serve de barreira física contra agentes tóxicos, separando-os, excretando-os e realizando a absorção de nutrientes. Estas funções cruciais para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência dos organismos requer grandes quantidade de água, íons e nutrientes que ultrapassam as camadas epiteliais do intestino e atingem outros órgãos e tecidos. Dessa forma, para que estas funções aconteçam, é necessário que as células envolvidas nestes processos sejam capazes de transportar essas moléculas através dos canais iônicos, transportadores e bombas iônicas (Anderson; Cormier; Scott, 2019). Os canais de potássio têm um papel-chave durante estes processos pois permite o fluxo de íons K^+ , alterando o potencial de membrana, podendo também alterar o volume da célula e modulação fisiológica nas concentrações internas de K^+ , o que repercute na progressão do ciclo celular e nos processos de proliferação e apoptose (Bachmann *et al.*, 2020). Diante disso, pela sua variedade de propriedades funcionais, os canais de potássio dependentes de voltagem podem ser distribuídos em quatro grandes grupos, e dentre estes, os “canais retificadores retardados” possuem um certo atraso

para abertura após a despolarização, e é o grupo onde o canal Kv10.1 faz parte (Serrano-Novillo *et al.*, 2019).

A tumorigênese é um processo composto por múltiplos passos, os quais refletem alterações genéticas que surgem tanto da ativação de proto-oncogenes (os quais controlam os processos de crescimento, divisão e sobrevivência celular) em oncogenes (formas alteradas dos proto-oncogenes) quanto de mutações que levam a perda da função e/ou inativação dos genes supressores tumorais, relacionados com o controle do crescimento celular desregulado e a ativação de vias de reparo do DNA (ácido desoxirribonucléico). Mecanismos epigenéticos também estão associados para a alteração da expressão destes genes (Lee; Muller, 2010; Santarius *et al.*, 2010).

Anderson, Cormier e Scott (2019) apresentaram a relação de alguns canais de potássio dependentes de voltagem (Kv) no desenvolvimento de alguns tipos de câncer no trato gastrointestinal, bem como o papel desenvolvido quando a expressão do canal se encontra alterada. O gene KCNA5 (Kv1.5) está associado ao câncer de estômago e colorretal, atuando como oncogene superexpresso em ambos os casos e alterando a resistência a drogas. O KCNH2 (Kv11.1) está associado ao câncer colorretal, pancreático, de esôfago e estômago, atuando como oncogene superexpresso e tendo atividade de angiogênese, migração, invasão e um prognóstico não favorável. No caso do KCNA3 (Kv1.3), o canal está associado ao câncer pancreático, onde encontra-se infrarregulado, pois possui papel de supressão de tumor, e também é associado ao câncer colorretal, sem papel definido, mas geralmente encontra-se superexpresso e hipermetilado (Gould; Paul, 2022). Dessa forma, o câncer tem sido descrito como uma canalopatia (Gould; Paul, 2022), o que indica que disfunções nos canais iônicos nas células se sobressaem aos *hallmarks* do câncer descritos por Hanahan e Weinberg (2011).

O Kv10.1 por sua vez, faz parte de um grupo de canais de potássio dependentes de voltagem conhecido como os canais “*ether à go-go*” (hEAG), e é um retificador interno. É normalmente expresso em tecidos neuronais saudáveis, mas é amplamente documentada uma participação significativa no desenvolvimento de alguns tipos de câncer de diferentes origens, incluindo câncer de mama, cólon, osteosarcomas, glioblastomas e outros. Além disso, a alta expressão de Kv10.1 é relacionada a um melhor desenvolvimento do tumor por estimular vascularização e impedir condições de hipóxia. A superexpressão desse canal está presente em aproximadamente 70% das biópsias tumorais humanas (Serrano-Novillo *et al.*, 2019; Bachmann *et al.*, 2020).

Diante da importância que o canal iônico tem na regulação de sobrevivência e proliferação das células tumorais e não tumorais, este estudo objetiva melhorar a compreensão da agressividade do tumor na presença do gene KCNH1 (Kv10.1) e relacionar aos dados clínico-patológicos mediante a seleção de pacientes, buscando contribuir com o diagnóstico e tratamento dos indivíduos diagnosticados com o adenocarcinoma colorretal.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CÂNCER

O desenvolvimento dos diversos tipos de câncer é um processo multifatorial com diversas etapas que acontecem paulatinamente (Botelho; Teixeira; Oliveira, 2014). O risco de desenvolvimento da doença é influenciado por fatores genéticos e intrínsecos como idade, sistema imune, dieta e desbalanços hormonais, e também influenciado por fatores extrínsecos ou ambientais como poluição, o hábito de fazer exercícios, fumar, beber álcool, a presença de infecções sexualmente transmissíveis (IST), síndrome ou doença pré-existente e estresse. No entanto, não é possível afirmar qual a magnitude da importância de um desses fatores no desenvolvimento da doença em um determinado indivíduo, ou seja, afirmar qual a causa específica (Botelho; Teixeira; Oliveira, 2014; Loomans-Kropp; Umar, 2018).

Algumas características moleculares que são intrínsecas ao câncer foram estabelecidas e apresentadas por Hanahan e Weinberg (2011), como a sinalização contínua de proliferação, evasão de supressores tumorais, ativação de invasão tecidual e metástase, potencial de replicação ilimitado, angiogênese e driblagem de mecanismos de apoptose. Também foi observado, além do que foi apresentado por Hanahan e Weinberg, uma intensa e presente instabilidade genômica, alterações epigenéticas, construção de microambiente tumoral (MAT) e alteração na expressão gênica de canais iônicos, inclusive caracterizando o câncer como uma canalopatia (Macheret; Halazonetis, 2015; Figueiredo, 2019; Gould; Paul, 2022).

Geneticamente, o processo de tumorigênese se dá pela ativação de proto-oncogenes e inativação de genes supressores tumorais, além de alterações epigenéticas que podem alterar a expressão de proteínas, seja por infra ou superexpressão, e mecanismos genéticos de morte celular, como falha no reparo do DNA (Botelho; Teixeira; Oliveira, 2014). Os oncogenes são uma classe de genes que sofreram algum tipo de mutação que promove o desenvolvimento do câncer, e podem ser ativados por diversos mecanismos diferentes, enquanto os supressores tumorais são genes antagonistas aos oncogenes que impedem a progressão do câncer (Macheret; Halazonetis, 2015). A proteína p53, por exemplo, é um agente supressor tumoral que atua no ciclo celular inibindo o processo de oncogênese, e a mutação no gene da proteína (TP53) é grande determinante para o início da sequência adenoma-carcinoma (Lu *et al.*, 2017). Neste contexto, uma das primeiras famílias de proto-oncogenes a serem identificadas foi a família RAS, a qual contém as proteínas KRAS, NRAS e HRAS associadas à proteína G, responsáveis pela ativação das vias extrínsecas das cinases 1/2 (ERK1/2) e a cascata de

ativação do fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), promovendo o crescimento celular, entrada no ciclo celular e sobrevivência da célula em condições normais. No câncer, essas proteínas estão superexpressas, configurando às células as características clássicas de uma célula tumoral, isto é, capacidade de crescimento e proliferação ilimitados e evasão dos mecanismos de apoptose (Nyga *et. al*, 2023).

Outra via de sinalização amplamente discutida e estudada é a via *Hedgehog* (Hh), muito conservada evolutivamente na transmissão de sinais da membrana celular até o núcleo, e normalmente está associada ao desenvolvimento embrionário de invertebrados e vertebrados, além do processo de cicatrização de feridas. No câncer, por sua vez, esta via pode estar ativada tanto em estágios iniciais como em estágios mais avançados de metástase, e em alguns tipos, estar associado a invasão tecidual (Skoda *et. al*, 2018).

Segundo o grupo de Souza *et. al* (2014), as vias de sinalização mais ativas na regulação da progressão do câncer colorretal são: Wnt/ β -catenina, a qual apresenta interações exacerbadas pela superexpressão da proteína β -catenina com fatores de crescimento, promovendo a transformação de células do epitélio intestinal em células com proliferação exacerbada; a via KRAS, que também aumenta a proliferação celular pela constante fosforilação da via ERK1/2 e causando a intensa expressão da ciclina D1, necessária para o andamento do ciclo celular e sobrevivência pela ativação da via PI3K; e a via Rho GTPase, também ativada pela superexpressão de KRAS e associada a reorganização do esqueleto de actina, culminando no processo de migração celular.

2.2 CÂNCER COLORRETAL

2.2.1 Epidemiologia

Segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer), a incidência estimada só em 2023 de câncer colorretal, conforme a localização primária do tumor, para homens foi de 21.970 novos casos (9,2% ao total) e de 23.660 (9,7%) para mulheres no Brasil, ambos ocupando o segundo lugar de maior incidência para ambos os sexos, estando atrás de câncer de próstata (30%) e câncer de mama (30,1%), para homens e mulheres, respectivamente. A estimativa total em 2023 do câncer colorretal em João Pessoa na Paraíba (PB - Brasil) para homens e mulheres foi em média de 130 novos casos a cada 100 mil habitantes, sendo 60 para homens e 70 para mulheres conforme mostra a Figura 1. Para o triênio 2023-2025, a estimativa do câncer colorretal é 45.630 casos para cada ano, 21,10 casos por 100 mil habitantes.

Figura 1. Estimativas em 2023 da incidência por 100 mil habitantes

Localização Primária Neoplasia Maligna	Homens			Mulheres			Total		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Mama Feminina	-	-	-	210	50,50	44,55	210	50,50	44,55
Próstata	290	79,43	99,40	-	-	-	290	79,43	99,40
Cólon e Reto	60	16,90	15,86	70	17,86	11,96	130	17,41	13,50
Traqueia, Brônquio e Pulmão	60	16,72	14,64	60	13,71	10,69	120	15,12	11,69
Estômago	40	11,12	10,58	30	8,11	5,77	70	9,52	7,70
Colo do Útero	-	-	-	60	14,03	10,55	60	14,03	10,55
Glândula Tireoide	**	2,57	2,47	100	24,56	17,17	110	14,29	10,43

Fonte: INCA (2023). Estimativas em 2023 da incidência por 100 mil habitantes e o número de novos casos de câncer colorretal por sexo e localização primária em João Pessoa, Paraíba

Esse dado é interessante pois, ainda segundo o INCA, para cada ano do triênio de 2020-2022, a estimativa no Brasil era de 20.520 casos para homens e 20.470 para mulheres, o que representa um aumento deste tipo de câncer de 7.06% para homens e 15,58% para mulheres somente em 2023.

No que tange à mortalidade, em 2021 o câncer colorretal foi responsável por 10.662 óbitos de homens e (8,8% dentre todas as neoplasias), e 10.598 óbitos de mulheres (9,6%), conforme a localização primária (INCA, 2023).

2.2.2 Caracterização e Fisiopatologia

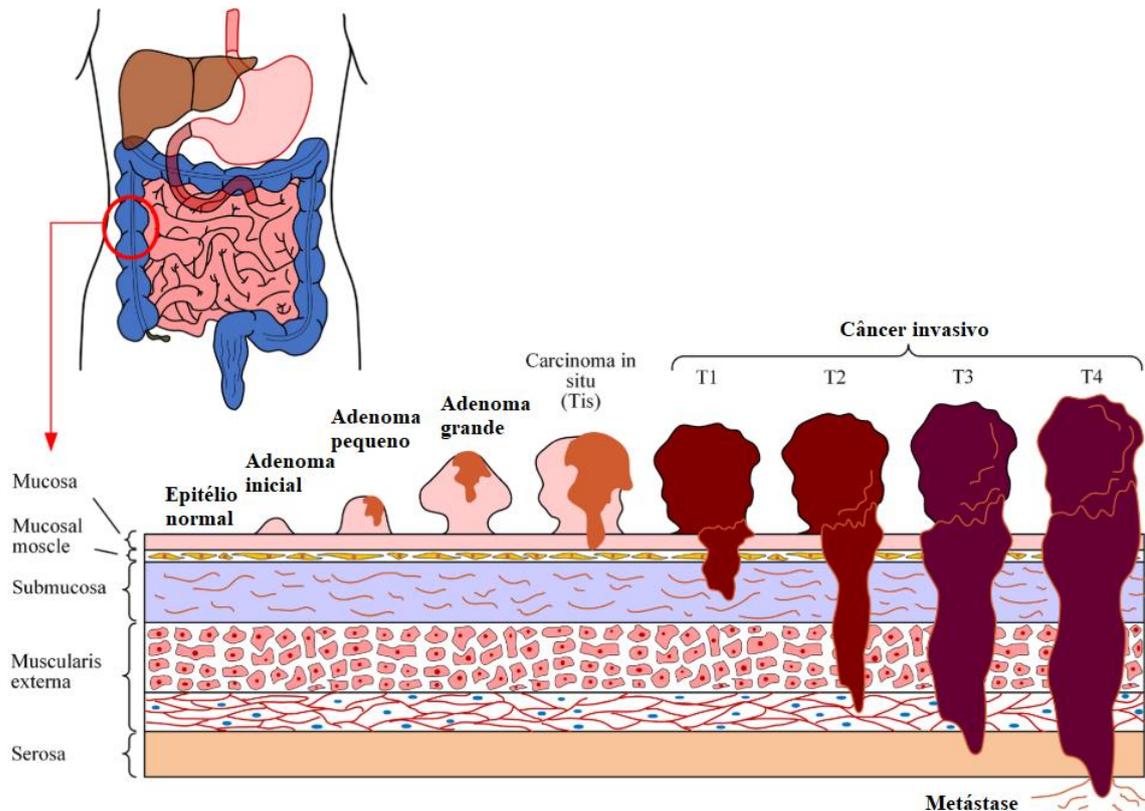
O câncer colorretal pode ser dividido, epidemiologicamente, em três tipos: esporádico, familiar e hereditário. Um estudo feito por Tian *et. al* (2023) relatou que a maioria dos casos (entre 60-80%) é do tipo esporádico, isto é, sem qualquer relação com família ou predisposição hereditária. Isso nos leva a crer que o processo de carcinogênese neste órgão é principalmente devido ao processo de envelhecimento, a exposição a agentes cancerígenos e fatores ambientais, que promovem o desenvolvimento da doença. Todos os tipos de câncer podem desenvolver-se pelas diversas vias diferentes de carcinogênese descrita para o câncer colorretal, por isto é uma doença considerada heterogênea (Tian *et al.*, 2023).

Dessa forma, é preciso compreender brevemente a anatomia do intestino para que possamos entender as funções exercidas por cada região, entendendo como e onde se dá a formação do câncer colorretal. O intestino é um grande órgão que exerce funções distintas, dividido em duas grandes partes: o intestino delgado e o intestino grosso. O intestino delgado é subdividido no duodeno (subdividido em quatro partes), jejuno e íleo, juntos sendo responsáveis pela absorção de nutrientes, água, vitaminas e eletrólitos (Volk; Lacy, 2017). Já o intestino grosso é mais curto e é subdividido em ceco, apêndice, cólon ascendente, cólon transversal, cólon descendente, cólon sigmoide, reto e ânus. Esta porção intestinal tem por função a absorção de água e eletrólitos e a formação e eliminação das fezes, e é a localização onde o câncer colorretal é caracterizado (Wozniak *et al.*, 2019).

O câncer colorretal inicia-se com lesões que a princípio não são malignas. Os tumores colorretais são característicos por serem heterogêneos (terem um perfil de expressão diferenciado), mas algumas sequências de eventos devem acontecer para que o câncer em si se desenvolva. As lesões precursoras (geralmente formações de pólipos), que podem ser caracterizados como “adenomas tubulares tradicionais” ou “adenomas serrados” seguem a sequência adenoma-carcinoma (Nguyen; Goel; Chung, 2020). A princípio, os adenomas são formados quando mecanismos de reparo de DNA e proliferação estão alterados em algumas células, e assim, em uma situação de renovação celular no epitélio intestinal vão se acumulando diversas células mutantes, onde o processo de diferenciação terminal e apoptose são interrompidos e alguns pólipos são formados, podendo crescer de tamanho ao longo do tempo (Nguyen; Goel; Chung, 2020). Existem diversos mecanismos e vias de desenvolvimento do câncer, mas é importante salientar que não são todos os adenomas que irão tornar-se malignos, pois, para isso, é preciso que alguns eventos moleculares específicos ocorram.

A progressão do tumor é observada de acordo com o estágio em que este se encontra. Na Figura 2 podemos observar superficialmente como é estabelecido: o estágio Tis (tumor *in situ*) indica que o câncer está desenvolvendo-se apenas na mucosa intestinal apenas; dos estágios T1-T3 há um avanço de células cancerosas nas outras camadas teciduais (submucosa, muscularis e subserosa); o estágio T4 reflete um estágio de metástase com invasão a outros tecidos e órgãos (Tian *et al.*, 2023).

Figura 2. Desenvolvimento de um tumor de câncer colorretal

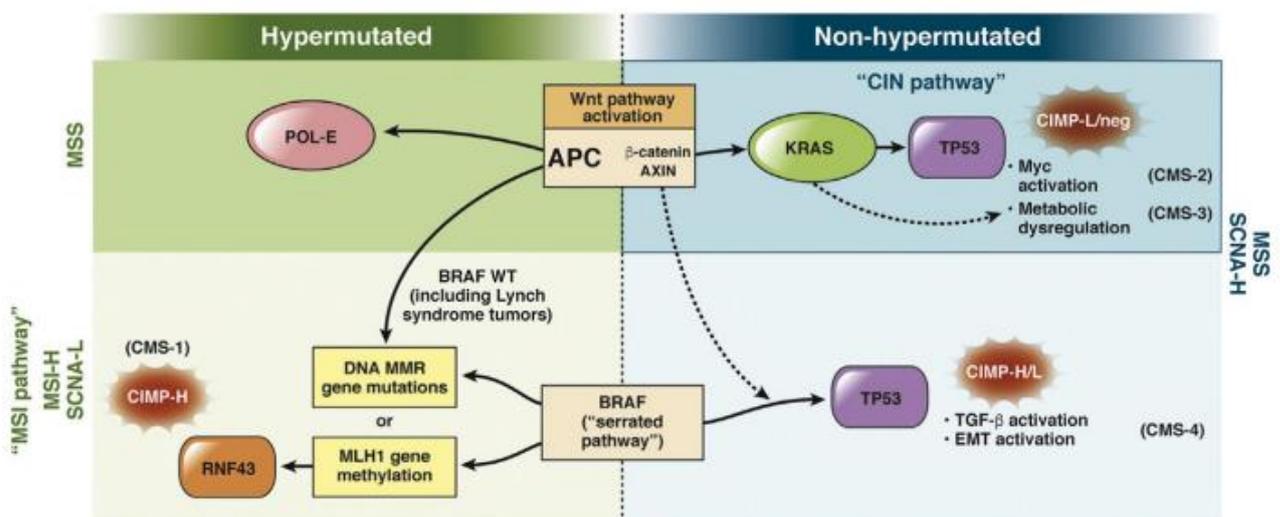


Fonte: Tian *et al.* (2023); adaptação e tradução pelo autor (2024). O grau TNM é considerado a partir do *Tis* até o nível T4, onde há metástase.

A resposta do paciente ao tratamento e o prognóstico no câncer colorretal depende de algumas características moleculares e da localização primária do tumor. A localização inicial pode ser dividida em: Tumores do Lado Direito (originados no ceco, apêndice, cólon ascendente ou cólon transverso) e Tumores do Lado Esquerdo (cólon descendente, cólon sigmoide, reto e ânus), os quais têm definição embriológica (Gallois *et al.*, 2018). É documentado que pacientes com tumores originados no Lado Direito são mais velhos, com prevalência em pacientes do sexo feminino, os quais apresentam um pior prognóstico além de apresentarem sangramento gastrointestinal e anemia. Por sua vez, os pacientes que possuem tumores no Lado Esquerdo são mais jovens, manifestam cólicas abdominais, obstrução intestinal e mudanças nos hábitos intestinais (Waldstein *et al.*, 2023). Além disso, o CCR direito tem mais probabilidade de ser exófitico (externo), diplóide e com histologia mucinosa, enquanto o CCR esquerdo tem mais probabilidade de apresentar lesões infiltrativas e serem aneuploides (Bustamante-Lopez *et al.*, 2019).

As diferenças moleculares entre os tumores com localização primária diferenciada nos ajudam a compreender o por que esta divisão de conceitos e aspectos é importante durante o estudo do caso do paciente para escolha da melhor abordagem de tratamento. As primeiras mutações a ocorrerem geralmente são no gene APC (“*Adenomatous Polyposis Coli*”), que é um supressor tumoral, e nos oncogenes BRAF e KRAS os quais dão progressão a vias de desenvolvimento do câncer e levam a mutações em diversos outros genes, como TP53 (Nguyen; Goel; Chung, 2020; Sullivan; Noujaim; Roper, 2022). Além disso, algumas características presentes no câncer podem levar a essas mutações ou são desenvolvidas após a mutação, como neoplasia serrada, instabilidade cromossomal e instabilidade de microssatélites (Nguyen; Goel; Chung, 2020). A Figura 3 mostra a ativação da via Wnt pela mutação no gene APC, ou mutação no gene BRAF, a qual pode levar a instabilidade de microssatélite (MSI), sendo estável (MSS) ou hipermutado (MSI-H) (Sullivan; Noujaim; Roper, 2022).

Figura 3. Vias de ativação da carcinogênese colorretal

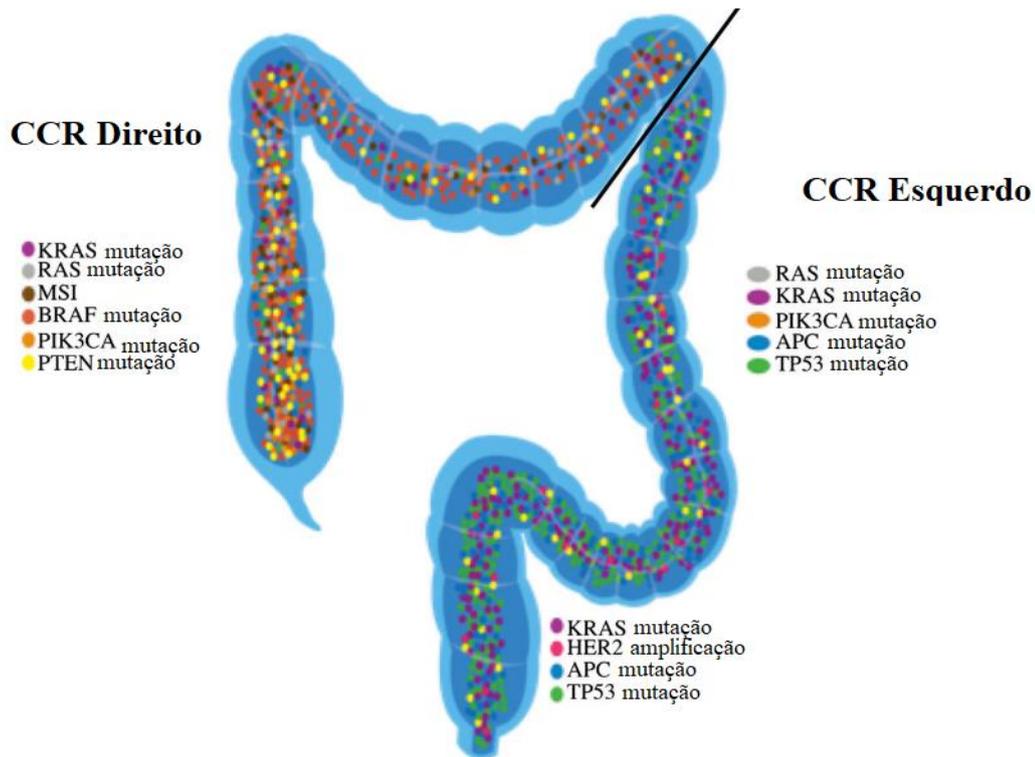


Fonte: Sullivan; Noujaim; Roper (2022). Vias ativadas após a mutação no gene APC, levando aos fenótipos hipermutados ou não-hipermutados e diferentes resultados.

Alguns estudos mostraram que tumores originados no Lado Esquerdo têm uma prevalência de mutações nos genes TP53 e APC, mediante alta instabilidade cromossômica, além de mutações nos genes EGFR e amplificação de HER2. O CCR do Lado Direito apresenta alta instabilidade de microssatélites, fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP) e mais

mutações deletérias de RAS, BRAF e PIK3CA (Gallois *et al.*, 2018; Tian *et al.*, 2023). A Figura 4 mostra os principais genes que estão mutados e em qual região estão com mais frequência localizados.

Figura 4. Perfil de expressão de mutações em genes encontrados diferencialmente no lado direito e esquerdo do CCR.



Fonte: Gallois *et al.* (2018). No CCR Direito (ceco, apêndice, cólon ascendente ou cólon transverso) há mais mutações diferenciadas em PTEN, perfil MSI e BRAF. No CCR Esquerdo (cólon descendente, cólon sigmoide, reto e ânus), há mais mutações em APC, TP53 e HER2.

Dessa forma, podemos afirmar que existem duas vias majoritárias para o desenvolvimento do CCR: a via adenoma-carcinoma e a via ligada ao adenoma serrilhado-sésil, como foi apresentado na Figura 3 (Augusto *et al.*, 2022).

2.2.3 Diagnóstico, classificação e tratamento

De modo geral, o rastreamento do CCR é feito por três exames: Pesquisa de Sangue Oculto nas Fezes (PSOF), exames radiológicos e exames endoscópicos; e estão associados à prática clínica e dosagem sérica do antígeno carcinoembrionário (CEA) (Augusto *et al.*, 2022). Clinicamente, pacientes com CCR podem apresentar sangramento retal, anemia, dor

abdominal e mudanças no hábito intestinal, e a partir da anamnese do paciente é possível fazer as indicações clínicas de exames e investigação.

O diagnóstico primário do câncer geralmente é dado pela biópsia realizada na colonoscopia, podendo ser solicitado um exame de biópsia no pulmão, linfonodos ou fígado para identificação de metástase, exceto se o paciente já tiver sido diagnosticado em estágios T1-T3 do CCR, apresentar lesões no fígado ou estiver fragilizado. Também são realizados exames radiológicos como tomografias computadorizadas com alto contraste do tórax, abdômen e pélvis para identificar lesões benignas ou malignas metastáticas, estadiamento pré-operatório e acompanhamento pós-operatório (Biller; Schrag, 2021; Augusto *et al.*, 2022).

O estadiamento clínico é um processo preditor baseado no sistema TNM do “*American Joint Committee on Cancer*” (AJCC) realizado para determinar a extensão local e regional das lesões, para a avaliação terapêutica e margens cirúrgicas, sendo fundamental nos períodos pré, intra e pós-operatório (Souza *et al.*, 2018). O INCA (2004) trouxe um documento descrevendo o sistema TNM, que tem papel internacional de classificação da progressão de todos os tipos de câncer, com os objetivos de ajudar no planejamento do tratamento e dar alguma indicação de prognóstico. Nesta classificação o T (T0, T1, T2, T3, T4) representa a extensão do tumor primário, o N (N0, N1, N2, N3) representa a ausência ou presença de metástase em linfonodos regionais, e o M (M0, M1) representa a presença de metástase à distância, o que ajuda a classificar clinicamente (cTNM) para o pré-operatório ou patologicamente (pTNM) pós-operatório seguindo algumas regras. A Tabela 1 mostra como essas classificações podem ser aplicadas. Ainda, segundo o INCA (2004), para o câncer colorretal, a avaliação das categorias deve ser feita mediante exame físico, diagnóstico por imagem, endoscopia ou exploração cirúrgica.

Tabela 1. Estadiamento do câncer colorretal pela classificação TNM

Estágio	Tumor (penetração máxima)	Metástase linfonodal regional	Metástase à distância
0	Tis	N0	M0
I	T1 ou T2	N0	M0
II	T3	N0	M0
III	Qualquer T ou	Qualquer N	M0
	T4	N0	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Manual MSD – Versão para profissionais da saúde (2024). Tis = carcinoma *in situ*, T1 = tela submucosa, T2 = túnica muscular; T3 = penetra todas as camadas (no câncer retal, inclui o tecido perirretal) e T4 = órgãos adjacentes ou peritônio; N0 = nenhum, N1 = 1–3 linfonodos regionais, N2 = ≥ 4 linfonodos regionais, N3 = linfonodos apicais ou vasculares do tronco; M0 = nenhum; M1 = presente.

Como já foi explicitado, existem diferenças entre os sintomas apresentados no câncer colorretal direito e esquerdo. É importante recapitular que no CCR direito apresenta hemorragia digestiva baixa, ocorrendo em fases mais avançadas o comprometimento dos vasos sanguíneos da parede colônica e ulceração tumoral com hematoquezia; o CCR esquerdo apresenta um quadro obstrutivo (Augusto *et al.*, 2022). Em nível mundial, além da colonoscopia total (CT), é realizado também a pesquisa de sangue oculto nas fezes para rastreamento do CCR, o qual trata-se de um método não invasivo e econômico, baseado na reação de heme peroxidase, partindo do pressuposto que podem ocorrer sangramentos em adenomas e carcinomas. Contudo, a PSOF possui limitações na sensibilidade, valor preditivo, adesão do paciente por anos e especificidade (Medeiros *et al.*, 2018; Augusto *et al.*, 2022). A colonoscopia, por sua vez, é realizada pelo Sistema Único de Saúde (SUS) desde novembro de 2013, e é feita por indicação clínica de doenças inflamatórias intestinais, hemorragia digestiva baixa, pólipos no cólon, diarreia crônica, tumor maligno ou benigno no cólon entre outros. Augusto *et al.* (2022) fez um estudo observacional retrospectivo e analítico do impacto do exame de CT antes e depois de ser introduzido no SUS e demonstrou que o número de internações por CCR de 2008 a 2019 foi ascendente, crescendo 139,8%, e apresentou queda estatisticamente significativa nas taxas de mortalidade, justamente pelo rastreamento precoce na população.

Geralmente, a sequência adenoma-carcinoma leva por volta de 10 anos para que um pólio adenomatoso se desenvolva em um tumor maligno. Por isso, o estágio tumoral no diagnóstico é fator determinante para um bom prognóstico (Tian *et al.*, 2023). Como foi

demonstrado na Figura 2, e segundo o sistema TNM de classificação, o estágio T1 ao T3 não apresenta metástase, no entanto, à medida que os estágios vão avançando, o estágio T4 metastático torna-se mais provável, isto é, no estágio T1, a probabilidade de desenvolver metástase é menor que 10%, enquanto nos estágios T2 e T3 é de 10-20% e 25-50%, respectivamente (Biller; Schrag, 2021). O grupo de Riihimäki et al. (2016) fez um estudo mostrando que o nível T4 de metástase por si só não indica a gravidade do prognóstico, mas também deve ser considerado o local onde a metástase está localizada, bem como os estágios TNM, e ainda afirma que os locais de maior incidência de metástase são nos linfonodos, fígado, pulmão e peritônio.

Do ponto de vista do tratamento para o câncer colorretal, é preciso que haja um perfilamento molecular para identificar o subtipo do tumor que está sendo avaliado, pois, novamente, o CCR traz consigo características muito heterogêneas. Esse processo geralmente é feito por identificação imunohistoquímica para encontrar o fenótipo MMR-D (deficiência em proteínas MMR de reparo do DNA), instabilidade de microssatélites, ou ainda a busca por síndrome de Lynch por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), pois pacientes com esta síndrome têm mais chances de desenvolver o CCR (Biller; Schrag, 2021). Além das testagens moleculares com amostras frescas do tecido tumoral, pode ser realizado uma busca por DNA tumoral circulante (ctDNA) ou células tumorais circulantes (CTC) em amostras de sangue periférico, mas esses métodos trazem consigo algumas limitações como insuficiência de tecido, a aquisição das amostras e renovação celular muito rápida (Malla *et al.*, 2022). Esses processos são necessários para escolher o melhor método de tratamento, o prognóstico e ainda o risco de doença na família (Lemes *et al.*, 2020).

A ressecção cirúrgica do tumor ainda é a abordagem mais comum como método terapêutico, principalmente nos primeiros estágios (T1 a T3), por meio de cirurgia aberta (com remoção de parte do intestino), colectomia laparoscópica ou cirurgia colonoscópica. Estes métodos podem, ainda, ser associados a quimioterapia ou radioterapia a partir do estágio T3 do câncer colorretal (Kater, 2022). No entanto, é importante salientar que aproximadamente 20% dos pacientes já apresentam metástase quando são diagnosticados com CCR e, assim, o tratamento inicial se dá pela quimioterapia sistêmica, mas mesmo assim apresentam uma taxa de sobrevivência de 5 anos (Martinelli *et al.*, 2022; Biller; Schrag, 2021). A ressecção de tumores metastáticos é possível somente em tumores que apresentam capacidade de serem removidos cirurgicamente por completo, mas a cura a longo prazo não

atinge mais do que 20% dos pacientes, provavelmente por micrometástases já disseminadas (Biller; Schrag, 2021).

A primeira linha de tratamento geralmente se dá por quimioterápicos combinados, como o regime terapêutico da combinação FOLFOX (fluorouracil, leucovorina e oxaliplatina) ou CAPOX (capecitabina e oxaliplatina), que são comumente utilizados nos tratamentos de CCR na América do Norte (Biller; Schrag, 2021). O SUS, atualmente, também apresenta a estratégia FOLFOX (ou FOLFIRI, com combinação de irinotecano) como tratamento padrão de primeira linha (CONITEC, 2018). Outra estratégia abordada em outros países é o uso como alvo terapêutico do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) por meio do tratamento com bevacizumabe quando o paciente apresenta uma mutação no gene BRAF^{V600E}, que acomete 8-12% dos pacientes com CCR metastático (Martinelli *et al.*, 2022). Aproximadamente 50% dos tumores apresentam mutação nos genes da família RAS, os quais recebem o tratamento com anticorpos monoclonais cetuximabe e panitumumab, os quais têm como alvo o Receptor de Crescimento Epitelial (EGFR), impedindo a sinalização. Embora esse tratamento seja eficaz e muito disseminado, ele não é oferecido pelo SUS (Carvalho; Leal; Sasse, 2017).

Pacientes diagnosticados com o CCR esquerdo podem se beneficiar mais de terapias baseadas nos inibidores de EGFR do que pacientes que apresentam CCR direito, que para estes o tratamento deve ser direcionado de outra maneira (Modest; Pant; Sartore-Bianchi, 2019). Estas observações reforçam a necessidade de haver uma boa análise de localização primária e perfil molecular para fazer a melhor abordagem de tratamento.

2.2.4 Biomarcadores para CCR

A ocorrência do câncer colorretal em pessoas jovens aumenta a cada ano, e o tempo de desenvolvimento ou estabelecimento dessa doença, leva aproximadamente 10 anos. A sobrevivência e o bom prognóstico estão relacionados intimamente com a rapidez com que o diagnóstico é realizado, isto quer dizer que urge a necessidade de exames rotineiros que possam identificar em estágios precoces o desenvolvimento tumoral, não só os que são recomendados para os indivíduos acima de 50 anos (Zhang *et al.*, 2023).

Os biomarcadores são moléculas bioquímicas que indicam a normalidade de processos biológicos e processos patogênicos, que podem ser medidas e avaliadas (Shah *et al.*, 2014).

Existem diversos tipos de biomarcadores com diversas funções diferentes, podendo ser biomarcadores de: diagnóstico, monitoramento, farmacodinâmica, preditivos (de efeitos a exposição de algum medicamento), prognóstico, segurança e susceptibilidade (a desenvolver algum tipo de doença ou condição médica no futuro) (Califf, 2018). É importante esclarecer que os biomarcadores podem exercer mais de uma função dentre as citadas, mas é também importante determinar qual é o papel do biomarcador. Nem sempre a avaliação quantitativa daquela biomolécula garante um resultado clínico direto. Isto é, nem sempre um sintoma ou resposta a medicamento está relacionado com o biomarcador previamente medido, pois para afirmar a correlação é preciso que haja um esclarecimento estatístico (Califf, 2018).

O uso de biomarcadores na investigação rotineira pode ser desaconselhável para alguns casos devido ao custo elevado e a baixa especificidade do órgão afetado ou região onde aquele marcador está sendo originado, mas pode ser muito útil no prognóstico e tratamento em doenças como o câncer (Simonetti *et al.*, 2018). A dosagem do antígeno carcinoembrionário (CEA) tem importância relevante no prognóstico (Souza *et al.*, 2018). O CEA é um antígeno glicoproteico presente no epitélio gastrointestinal, descoberto em 1965 e é associado a carcinomas digestórios, mamários e pulmonares. A dosagem sérica é feita por meio de efusões pleurais, onde geralmente ocorrem metástases, para auxiliar na identificação benigna ou maligna do tumor e principalmente no prognóstico do paciente (Simonetti *et al.*, 2018). É sabido que em neoplasias malignas o CEA é identificado em níveis elevados, chegando a 90-95% de especificidade quando se trata de câncer colorretal, e os níveis pré-operatórios são os que indicam um possível resultado prognóstico, sendo necessário refazer a dosagem com certa frequência após a cirurgia para que seja possível identificar recidivas ou tecido tumoral residual (Almeida *et al.*, 2007).

Além do CEA, podemos identificar alguns outros marcadores genéticos muito conhecidos e estudados, como: KRAS, TP53, APC, PIK3CA, BRAF, MSH; e como já foi discutido, a alteração genética nestes genes geralmente indica qual a via de mutações genéticas acumuladas pode ter desencadeado o processo tumoral, isto é, instabilidade cromossômica ou erro no reparo do DNA, por deleções ou rearranjos. Ainda há, além destes marcadores, alguns marcadores de RNA e marcadores epigenéticos (Zhang *et al.*, 2023).

No que tange aos canais iônicos, este grupo de proteínas ainda não foi incluído no grupo de biomarcadores para tumores na clínica, pois, para que isso seja possível é preciso identificar a correlação da expressão dos canais com dados clínico-patológicos. No entanto, há uma vasta literatura abrangendo o papel determinante de diferentes canais iônicos e

transportadores no desenvolvimento, manutenção e regulação do comportamento de células tumorais (Lastraioli; Iorio; Arcangeli, 2015). Isto é refletido quando podemos observar nos registros literários que os canais iônicos são utilizados em diversas estratégias de tratamento, seja pela direta inibição de determinados canais de Ca^{2+} ou canais de K^+ dependentes de voltagem para ressensibilizar as células tumorais ao processo de apoptose, ou seja pela alteração de proteínas que interagem com canais iônicos, como Bax, atuando na cascata de forforilação oxidativa de forma a também estimular a apoptose de células tumorais sem atingir células normais (Gould; Paul, 2022; Zúñiga *et al.*, 2022; Luis *et al.*, 2022).

2.3 CANAIS DE POTÁSSIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM

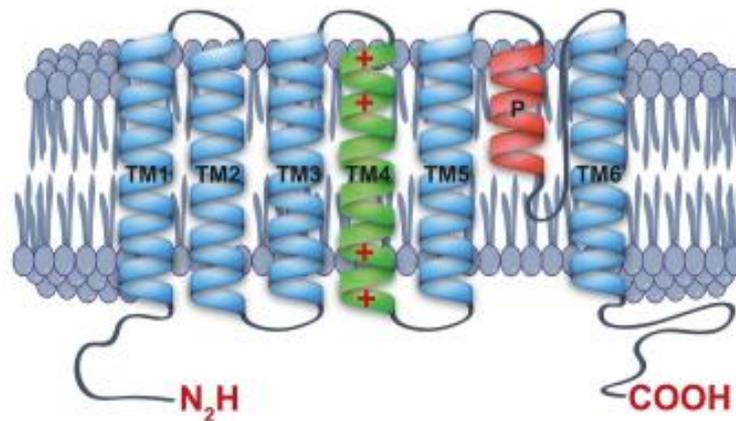
A sinalização celular é um processo sofisticado e coordenado de comunicação entre as células de um organismo dado pela complexidade e diversidade de funções que um ser vivo deve realizar para sobreviver. A sinalização pode ser mais forte ou mais fraca ou com uma “combinação” diferente de moléculas que podem influenciar na resposta que a célula que recebeu o sinal, terá (Holzmann; Sutterluty, 2023). Para que a sinalização seja realizada é preciso que sinais moleculares sejam encaminhados de uma célula emissora para uma célula receptora, onde estão presentes proteínas receptoras, que captam estes sinais na membrana, como os canais iônicos. Estes, por sua vez, são uma classe de proteínas transmembranares, que formam poros, ou canais, ao longo da membrana plasmática ou mitocondrial, e regulam o fluxo de íons, colaborando para manter a homeostase das células por meio da resposta a estímulos intra ou extracelulares, essenciais para a sinalização celular (Kim; Nimigeon, 2016; Serrano-Novillo *et al.*, 2019).

Os canais iônicos são fundamentais para o funcionamento de células excitáveis, pois sua abertura e fechamento coordenados auxiliam na manutenção do potencial de membrana. O fluxo de íons pelos canais permite que funções como proliferação, migração, controle do volume celular e processos específicos como contração muscular, sinapses em células nervosas e absorção de nutrientes no trato gastrointestinal sejam realizados (Serrano-Novillo *et al.*, 2019; Kim; Nimigeon, 2016). Há quatro subdivisões de grupos aos quais os canais iônicos estão separados: canais iônicos dependentes de voltagem; canais iônicos dependentes de ligantes; canais iônicos dependentes de estímulos físicos/mecânicos e; canais iônicos abertos (como é o caso de aquaporinas) (Serrano-Novillo *et al.*, 2019).

Dentro destes grupos encontram-se os canais de potássio (K^+), que é o maior grupo de canais iônicos e é altamente seletivo para íons K^+ . Estes são expressos tanto em células excitáveis quanto não excitáveis, e são responsáveis principalmente pelo efluxo de potássio das células para a restauração do potencial de repouso, ou repolarização, após a ativação do potencial de ação. A seletividade dos canais para íons potássio é o que permite que o interior da célula tenha mais K^+ e o exterior mais íons sódio (Na^+), pois assim é mantido o potencial de repouso de uma célula (Kim; Nimigean, 2016). Além da seletividade, os canais de K^+ permitem o fluxo rápido devido a sua estrutura, que é dividida em duas grandes partes compartilhadas por todas as classes de canais de K^+ : domínio formador do poro e o domínio regulatório; o primeiro é responsável pela passagem dos íons propriamente dita, e o domínio regulatório funciona como um sensor de estímulos intra e extracelulares para abertura ou fechamento do canal, onde as diferenças entre as classes dos canais de K^+ variam principalmente neste segundo domínio (Kuang; Purhonen; Hebert, 2015).

A estrutura do canal de K^+ dependente de voltagem (K_v) é basicamente um tetrâmero, onde cada monômero contém um domínio para condução elétrica do poro. Isso significa que quatro domínios (S1-S4) formam uma estrutura transmembrana, e funcionam como um sensor de voltagem (que é a estrutura básica dos canais de K^+), e outros dois segmentos transmembranares (S5-S6) que envolvem a subunidade formadora de poro em si onde passam os íons de potássio com alta seletividade (Figura 5). Os canais de potássio são classificados e subdivididos em famílias K_v1 a K_v12 , de acordo com a biofísica do canal, as propriedades farmacológicas, o número de domínios formadores de poro e reguladores de abertura e fechamento do canal (Xia *et. al.*, 2023). Os canais são expressos em diferentes tecidos e participam de 6 subfamílias: K_v1 (Shaker), K_v2 (Shab), K_v3 (Shaw), K_v4 (Shal), K_v7 (K_vLQT), e a família *ether-à-go-go* com os K_v10 , K_v11 , K_v12 (Bachmann *et al.*, 2020).

Figura 5. Canal de potássio dependente de voltagem (K_v)



Fonte: Zúñiga *et al.* (2022). TM1 a TM6 conduzem elétrons que se concentram no segmento TM4, funcionando como um sensor de voltagem, e a subunidade P formadora do poro com passagem seletiva de íons K^+ .

A regulação do comportamento celular, que é mediado pelos canais de K^+ , nos permite inferir que estes canais tem um papel chave no desenvolvimento celular, o que de fato acontece pela participação em mecanismos celulares de proliferação, migração, invasão e apoptose, além da manutenção e regulação da homeostase na célula e do potencial de membrana como foi apresentado. Quando estudamos o processo de tumorigênese é possível perceber diversas mudanças fenotípicas e genotípicas na expressão de diversos grupos de proteínas (Serrano-Novillo *et al.*, 2019). É possível associar a presença dos canais de potássio em situações normais nas células à presença abundante destes em diversos tipos de tumores, tendo sua expressão aberrantemente diferenciada e prestando papéis igualmente importantes para o desenvolvimento do tumor.

Mutações em canais iônicos presentes no epitélio gastrointestinal são muito prováveis de acontecer devido à rápida proliferação celular nesta região em razão da exposição do tecido a diversos estímulos físicos, químicos e biológicos, assim, o tecido como um todo acumula diversos tipos de mutações que podem ser oncogênicas (Anderson; Cormier; Scott, 2019). Foi documentado a presença de alguns canais de potássio dependentes de voltagem (K_v) que estão presentes no tecido epitelial gastrointestinal, como $K_v1.1$ (KCNA1), $K_v1.3$ (KCNA3), $KCa3.1$ (KCNN4) e $K_v 7.1$ (KCNQ1), que estão envolvidos na secreção de íons, regulação da migração celular e outras funções como absorção de glicose (Lu *et al.*, 2023). Estes mesmo canais também estão superexpressos, como é o caso do $K_v1.3$, nos tumores de câncer colorretal participando na proliferação rápida destas células e dessensibilização aos mecanismos de apoptose (Teisseyre *et al.*, 2019).

A relação entre o real início da tumorigênese com os K_v ainda não é bem elucidado, mas é sabido que células com altas taxas de proliferação, como células de câncer, estão mais despolarizadas que células diferenciadas ou quiescentes, e a progressão no ciclo celular destas células, bem como migração, invasão e proliferação, requer que haja mudanças no potencial de membrana por meio de canais iônicos, incluindo os K_v (Serrano-Novillo *et al.*, 2019). A questão chave, como traz Gould e Paul (2022), é quando um canal envolvido em proliferação, por exemplo, está superexpresso em células tumorais, provoca uma redundância de possibilidades de interações iônicas compensatórias quando há alguma tentativa de mecanismos de destruição celular, garantindo àquele tumor um dos “*hallmarks*” do câncer. Isto provoca a evasão aos mecanismos de apoptose. Devido a isto, o câncer pode ser descrito como uma canalopatia, como foi sugerido pelos autores Prevarskaya, Sryma e Shuba (2018). As evidências da participação de K_v no processo de tumorigênese são inúmeras, além das correlações que podem ser feitas entre a superexpressão desses canais com a proliferação, migração, invasão e outros fatores moleculares que auxiliam na progressão dos tumores. A colaboração do $K_v11.1$ na regulação do pH do microambiente tumoral de câncer colorretal promove a adesão do tumor na matriz extracelular através da interação com outras duas proteínas (integrina $\beta 1$ e trocador de sódio-hidrogênio) que estão associadas com este processo (Xia *et. al*, 2023).

As estratégias de tratamento usando como alvo os K_v são inúmeras, como o uso de toxinas de animais que apresentam grande afinidade pelos canais, porém dependem da abundância do canal e ainda carecem de soluções que minimizem os efeitos adversos (Serrano-Novillo *et al.*, 2019), e outros tipos de inibidores específicos como E4031 (Figueiredo; Nascimento; Martins, 2019). Com o avanço de estratégias de software e *screening*, é possível fazer predições de moléculas inibidoras que interagem com os canais, sendo preferíveis os canais que estão superexpressos em tumores e pouco presentes em tecidos saudáveis, para que o desenvolvimento de terapias baseadas em anticorpos seja facilitado pelo acesso aos canais na superfície celular (Zúñiga *et al.*, 2022), como é o caso do $K_v10.1$, que será discutido nas sessões posteriores.

2.3.1 Família EAG (*ether-à-go-go*)

A família EAG, codificada pelos genes KCNH, é constituída de três subtipos: EAG ($K_v10.1$ e $K_v10.2$), ERG ($K_v11.1$, $K_v11.2$ e $K_v11.3$) e ELK ($K_v12.1$, $K_v12.2$ e $K_v12.3$). O

K_v10.1, que é o alvo desta pesquisa, e K_v10.2, são codificados pelos genes KCNH1 e KCNH5, respectivamente. A descoberta dos canais EAG deve-se ao estudo de Kaplan e Trout (1969), quando foi primeiramente descrita a partir de mutantes desse gene em moscas *Drosophila melanogaster* que apresentavam atividade motora frenética sob a anestesia de éter, daí a nomenclatura “*ether-à-go-go*”. Após essa contribuição, foi descoberto os genes KCNH2, referentes ao hERG (“*human ether-à-go-go related gene*”), onde mutações neste gene provocam doenças cardiovasculares congênitas, arritmias, infarto e outras enfermidades. O hERG recebe atenção intesa após a sua descoberta principalmente pela sua extensa lista de moléculas inibidoras que podem alterar a expressão deste gene (Toplak *et al.*, 2021).

Todos os membros da família EAG compartilham homologia com as outras subfamílias de K_v, e apresentam a mesma estrutura tetramérica constituída de seis segmentos transmembranares como foi apresentado na Figura 5, contendo os domínios sensores de voltagem (S1-S4). O segmento S4 contém diversos resíduos de aminoácidos carregados positivamente — transformando-o no segmento mais importante dentre os quatro — e os domínios S5 e S6 que se associam para formar o canal de passagem dos íons K⁺ (Barros *et al.*, 2020). O mecanismo de ação do canal é uma das suas principais propriedades, sendo baseado na abertura e fechamento do canal, ou *gating*, que controla a passagem dos íons como um filtro de seletividade, onde supostamente a ativação do canal (para abrir ou fechar) resulta de uma conformação de aminoácidos que formam uma “dobradiça” na região, torcendo-a e permitindo que o canal rotacione ou dobre (Kim; Nimigeon, 2016).

Ainda que o mecanismo e a organização do canal seja similar para os membros da família EAG, que são extremamente expressos em tecido neuronal, existem muitas diferenças nas propriedades biofísicas e nas condições de ativação e inativação do canal, mesmo entre os membros das subfamílias. Por exemplo, os canais ERG são ativados vagarosamente e são seguidos de uma inativação dependente de voltagem muito rápida, auxiliando no processo de excitabilidade celular, enquanto os canais EAG são inibidos pela interação com o complexo Ca²⁺-Calmodulina (Ca²⁺-CaM) (Barros *et al.*, 2020).

Tratando-se do câncer, os canais EAG e hERG são os que recebem maior destaque, com mais relatos na literatura falando dos canais K_v10.1 e K_v11.1 como fatores chave no desenvolvimento de alguns tipos de tumor, como os do câncer colorretal. O K_v10.1 ganha destaque pela sua distribuição restrita no organismo em condições saudáveis e fisiológicas, podendo servir como um possível marcador tumoral, e uma associação consideravelmente significativa para o bom ou mau prognóstico por estudos feitos há mais de 10 anos

(Rodríguez-Rasgado; Acuña-Macías; Camacho, 2012). Por sua vez, a relevância do K_v11.1 está relacionada a um fenótipo invasivo com associação a um prognóstico desfavorável em estágios I e II do CCR e baixa sensibilidade a drogas como doxorubicina (Lastraioli; Iorio; Arcangeli, 2015). O K_v11.1 aparece também em lesões pré-cancerosas e parece participar da progressão ao adenocarcinoma, enquanto o K_v10.1 aparece com maior frequência em carcinomas de células escamosas (Lastraioli; Iorio; Arcangeli, 2015).

Apesar disso, o K_v10.1 desperta a curiosidade pela sua expressão “surpresa” em tecidos que não sejam os neuronais em condições patológicas, e estando superexpresso em diversos tumores neuronais, hepáticos, mamários, ovarianos, na próstata e colorretais, com fortes indicações que a sua inibição altera o comportamento de proliferação, sensibilidade a tratamentos químicos e apoptose destas células que o superexpressam (Zúñiga *et al.*, 2022). Na sessão seguinte discutiremos mais sobre este canal.

2.4 K_v10.1

O K_v10.1 é codificado pelo gene localizado no cromossomo 1, KCNH1 (“*Potassium Voltage-Gated Potassium Channel Subfamily H Member 1*”), como foi discutido anteriormente. Ao que indica a literatura, o gene foi descrito primeiramente em moscas *Drosophila melanogaster*, mas também é expresso em humanos, galinhas, vacas, peixes, camundongos e ratos, o que sugere uma conservação ancestral e evolutiva desse gene (Luis *et al.*, 2022; Cázares-Ordoñez; Pardo, 2017). Os primeiros estudos com o canal K_v10.1 mostraram uma de suas mais importantes características: a presença do mRNA somente no cérebro e na placenta; indicando que em tecidos periféricos o canal é ausente, e, além disso, parece ser regulado pelo ciclo celular, extremamente relevante na fusão de mioblastos (Hemmerlein *et al.*, 2006).

Atualmente, sabe-se que o canal realmente tem a expressão majoritária nestes tecidos, onde é difundido nas áreas do hipotálamo, hipocampo, córtex cerebral, cerebelo e nervo olfatório (Martínez *et al.*, 2015), e além da placenta também é expresso em testículos, glândula adrenal, temporariamente em mioblastos (Chávez-López *et al.*, 2020) e em glândulas endometriais (Toplak *et al.*, 2021). No cérebro, o canal é expresso em células dopaminérgicas com função eletrofisiológica, onde foi documentada a presença de quatro variantes de *splicing* do canal, K_v10.1a (mais comum) e K_v10.1b, onde o primeiro é menor por 81 pares de base (no éxon 6) mas não parecem ter propriedades eletrofisiológicas muito distintas; e as variantes

exclusivas a humanos E65 e E70, as quais são incapazes de formar o canal pela falta de segmentos transmembranares. No entanto, se estas variantes forem co-expressas com K_v10.1 podem trazer consequências para o tamanho do canal, além de ativação de ciclinas dependentes de cinases (CDKs) e aumento na glicosilação do canal, diminuindo sua atividade (Càzares-Ordoñez; Pardo, 2017).

Nas células não neuronais que foram descritas, é importante salientar que o K_v10.1 é expresso com um “tempo de vida” limitado, ou seja, temporariamente, e em células com um ciclo curto, demonstrando que sua expressão é controlada pelo tempo do ciclo celular, especificamente na fase G2/M (Toplak *et al.*, 2021). Isto é melhor apresentado no estudo de Urrego *et al.* (2016), onde a subexpressão do K_v10.1 induziu o acúmulo de células na fase G2/M, sugerindo a relação entre a baixa expressão do canal e a longa permanência das células nessa fase, implicando na participação deste canal na regulação do ciclo celular. Além disso, Movsisyan e Pardo (2020) deram continuidade nessa linha de estudo e demonstraram que a subexpressão do K_v10.1 também está relacionada com a ativação do complexo SAC (“*Spindle Assembly Checkpoint*”, ou “ponto de checagem de fuso”) na fase G2/M, impedindo a não separação de cromossomos. Este é um processo comum em células de câncer, ou seja, em células com alta taxa de proliferação e alta expressão do K_v10.1, esse ponto de checagem no ciclo passa despercebido e os cromossomos defeituosos não são corrigidos. Diante disso, é possível observar que o canal apresenta funções não só relacionadas a excitabilidade de células neuronais, mas vai além, participando de processos de proliferação e divisão celular em células saudáveis e ainda participante na angiogênese, invasão e migração de células cancerosas (Gao *et al.*, 2022). Além do câncer, ainda está associado às síndromes de “Zimmermann-Laband” (ZLS) e de “Temple Baraitser” (Han *et al.*, 2017), não pela perda de função do canal, mas pelo ganho de funções após mutações no gene que provocam uma alteração na ativação do potencial de ação e hiperpolarização mais intensa (Toplak *et al.*, 2021).

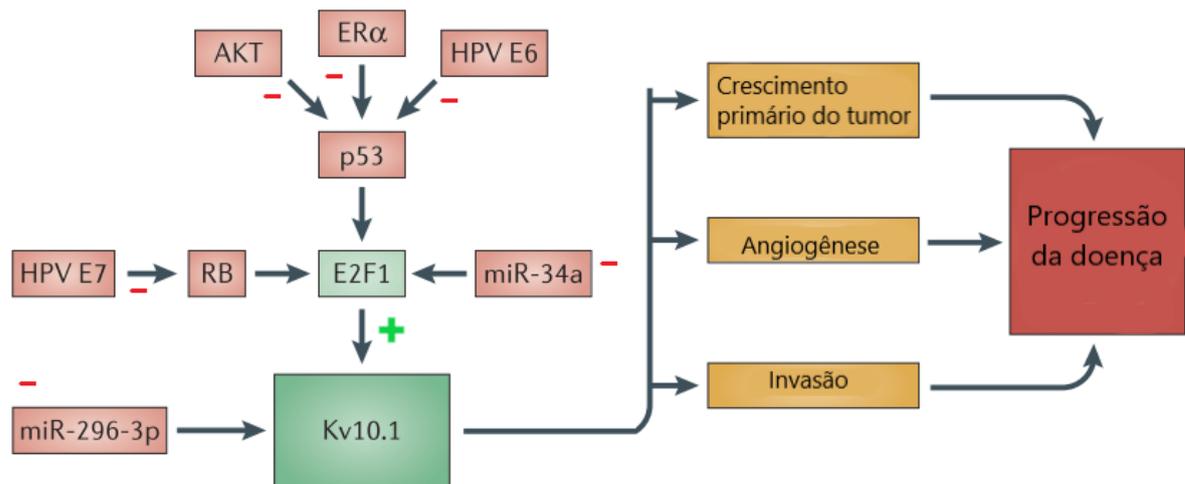
É importante lembrar que a biofísica do canal está muito relacionada ao tecido neuronal, onde o canal exerce o seu “papel principal”. O K_v10.1 possui uma ativação voltagem-dependente lenta, o que implica em uma necessidade de uma membrana com diversos estímulos despolarizantes por um tempo considerável para que o canal seja ativado, sendo assim, um regulador para hiperexcitabilidade dos neurônios em transmissões pré-sinápticas de frequência alta, mas permanece desativado em frequências mais baixas (Toplak *et al.*, 2021).

A participação do K_v10.1 no câncer é relevante devido a sua expressão periférica em outros tecidos que não os mencionados anteriormente, isto é, em tecidos que normalmente, em situações saudáveis, ele não seria expresso. Por causa disso, o K_v10.1 representa uma possibilidade estratégica no tratamento oncológico, no diagnóstico e como fator prognóstico (Càzares-Ordoñez; Pardo, 2017). No entanto, apesar da expressão diferenciada em tumores e papel significativo no desenvolvimento das células tumorais, a dificuldade de tratá-lo como um alvo terapêutico se dá pela semelhança estrutural (e não funcional) com outros canais da mesma família KCNH como o hERG, compartilhando uma ampla quantidade de moléculas com afinidade para os dois canais, e assim, o tratamento sem efeitos cardíacos adversos ainda é uma barreira (Luis *et al.*, 2022). O caminho para tentar solucionar estes “contratempos” é estudar as vias de sinalização que são exclusivas ao K_v10.1.

Uma das vias de regulação do K_v10.1 é pela interação cálcio-calmodulina (Ca²⁺-CaM). Com a entrada de Ca²⁺ na célula, o íon atua como segundo mensageiro na célula em diversas vias de sinalização, até chegar a níveis citoplasmáticos altos e ligar-se à calmodulina (uma proteína citoplasmática), formando o complexo Ca²⁺-CaM e inibindo o próprio K_v10.1 em um sistema de *feedback* negativo pela ligação do complexo dentro do poro do canal, obstruindo a passagem de íons. No câncer, o K_v10.1 regula a entrada de Ca²⁺ pelo canal ORAI1 (Toplak *et al.*, 2021).

Ainda, Urrego *et al.* (2016) relatou, além da participação do K_v10.1 no ciclo celular na fase G2/M, que a sua regulação em cultura de células HeLa foi feita a nível genético pelo fator de transcrição E2F1 — ativo nessa fase do ciclo celular — em ligação diretamente ao promotor do gene do canal. Além disso, foi observado que em células HeLa contendo superexpressão do oncogene HPV-E7, com inibição da proteína supressora tumoral pRb (proteína do retinoblastoma) que atua como inibidora do E2F1, a expressão do K_v10.1 é aumentada. O estudo de Chávez-López *et al.* (2020) ratificou e reiterou a regulação do K_v10.1 pela pRb em amostras *in vitro* de tecidos tumorais de retinoblastoma. Em suma, a expressão aberrante do canal está oposta à expressão que é suprimida de p53, pRb, E2FF1 e, também, de microRNAs como miR-34a (Figura 6) (Pardo; Stühmer, 2014). Estes estudos dão um direcionamento da regulação endógena do canal, que pode nos auxiliar no desenvolvimento de estratégias diagnósticas e farmacológicas de tratamento.

Figura 6. Mecanismos que alteram a expressão de K_v10.1 e possíveis consequências



Fonte: Pardo e Stühmer (2014; adaptado e traduzido). Vias que podem inibir as proteínas p53, RB ou alguns tipos de microRNAs (em vermelho), podem acabar ativando ou deixando de inibir o fator de transcrição E2F1, que ativa *Eag1* e consequentemente o *K_v10.1* (em verde), atuando na progressão do câncer por diversos mecanismos diferentes.

Segundo a apuração de Pardo e Stühmer (2014), o *K_v10.1* tem influência e participação na migração de leucemia mielóide aguda e câncer de mama, proliferação no câncer cervical, neuroblastoma e mama, e uma correlação com a expressão e um mau prognóstico para sarcomas, câncer de ovário e câncer colorretal. No câncer colorretal, o estudo feito pelo grupo de Ding *et al.* (2007) avaliou a relação do *K_v10.1* em 76 amostras parafinadas por imunohistoquímica e demonstrou a significância entre os dados clínico-patológicos e a expressão do canal, demonstrando uma dependência entre o tamanho do tumor, metástases e o estágio de Duke. Já o grupo de Hemmerlein *et al.* (2006), um ano antes, tinha demonstrado a expressão diferenciada do *K_v10.1* em diferentes tecidos tumorais e seus adjacentes saudáveis, incluindo o tecido de câncer colorretal. Mais recentemente, foi documentado pelo grupo de Gao *et al.* (2022), em cultura de células de câncer de estômago, a relação entre a diminuição da proliferação e da quantidade de células que entravam no estágio G2/M em células transfectadas com shRNA (*short hairpin RNA*) que inibiam a atividade de *K_v10.1*, além da indicação de um pior prognóstico para os pacientes que apresentavam a expressão aberrante do canal no estudo de bioinformática do mesmo grupo.

Diante disso, este trabalho tem o intuito de ampliar o conhecimento sobre o canal *K_v10.1* em pacientes diagnosticados com o câncer colorretal no período de 2021-2023 em um hospital referência para o câncer na cidade de João Pessoa (PB), Brasil, bem como avaliar este canal como alvo farmacológico por ferramentas computacionais e teste *in vitro*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a expressão diferencial do gene para o canal K_v10.1 (KCNH1) em amostras de pacientes com adenocarcinoma colorretal e avaliar o seu potencial como biomarcador.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Apresentar um perfil clínico-patológico dos pacientes;
- Verificar se o gene K_v10.1 está diferencialmente expresso em amostras de tumores em relação ao tecido da margem do tumor, obtidos de pacientes com câncer colorretal;
- Comparar se a expressão do gene KCNH1 está associado ao quadro clínico do paciente e a agressividade dos tumores;
- Analisar a expressão do gene K_v10.1 em cultura de células tumorais;
- Avaliar a citotoxicidade do composto A398 em linhagem de câncer colorretal humana HCT-116;
- Realizar *docking* molecular do composto A398 com o canal K_v10.1.

4 METODOLOGIA

4.1 CULTURA DE CÉLULAS

As linhagens de células tumorais utilizadas neste estudo foram em sua maioria de tecidos epiteliais de câncer colorretal derivados de humanos, diferenciando-se pelo perfil de expressão de determinadas proteínas ou mutações em cromossomos específicos, e foram obtidas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As linhagens escolhidas foram estas: HCT-116, HT-29, LoVo (Tabela 2). A linhagem K562 de leucemia mielóide crônica foi utilizada, embora não seja referente ao CCR, para avaliar a distribuição do K_v10.1. A linhagem não tumoral utilizada como controle negativo foi a HEK-293, derivada de tecido de rim embrionário humano. As características, expressão de proteínas específicas, mutações e outras informações de cultura celular foram obtidas mediante análise no guia de cultura de células “Animal Cell Culture Guide” (ATCC).

Tabela 2. Linhagens celulares utilizadas e suas especificações na ATCC

CÓDIGO ATCC	LINHAGEM CELULAR	MEIO DE CULTURA	TECIDO	DOENÇA ASSOCIADA
CCL-247	HCT-116	DMEM + 10% SBF + 1% PEN-STREP	INTESTINO GROSSO/COLON	CARCINOMA COLORRETAL
HTB-38	HT-29	DMEM + 10% SBF + 1% PEN-STREP	CÓLON	ADENOCARCINOMA COLORRETAL
CCL-229	LOVO	DMEM + 10% SBF + 1% PEN-STREP	INTESTINO GROSSO/COLON	ADENOCARCINOMA COLORRETAL GRAU IV
CRL-1573	HEK-293	DMEM + 10% SBF + 1% PEN-STREP	RIM EMBRIONÁRIO	-
CRL-3344	K562	DMEM + 10% SBF + 1% PEN-STREP	MEDULA ÓSSEA	LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Fonte: Autor (2023). Dados retirados do guia ATCC, mostrando o código, a linhagem, o meio de cultura que foi utilizado no estudo, o tecido de qual a cultura primária foi realizada e a doença associada, exceto HEK-293, que não é uma linhagem tumoral.

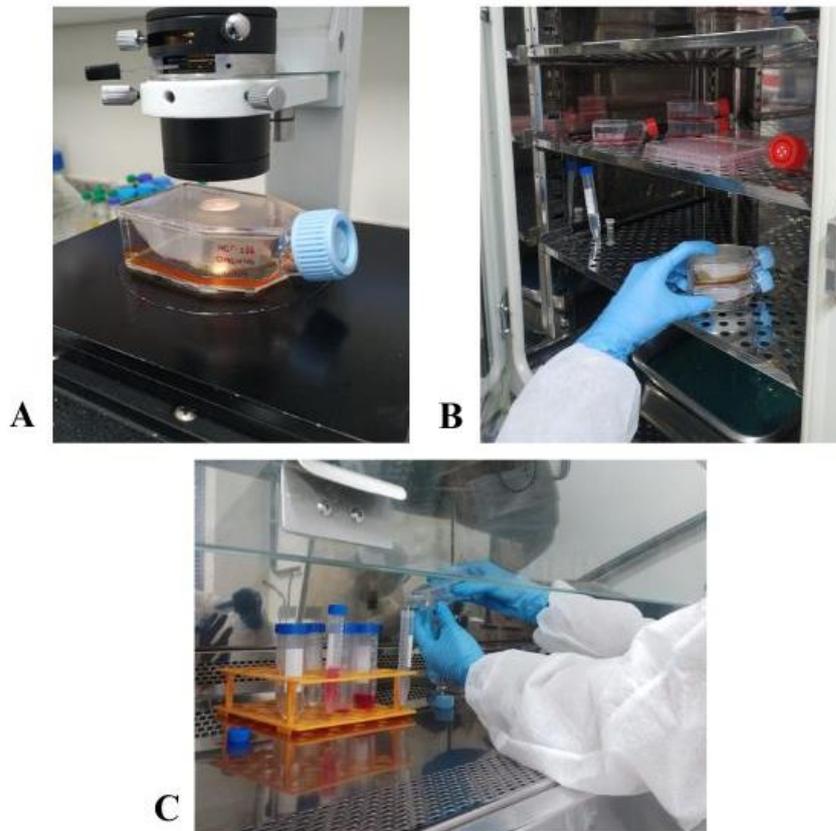
Como afirma Gonçalves e Sobral (2020), é essencial conhecer as linhagens e observar em microscópio óptico invertido tanto o aspecto geral das células, como também o ciclo celular de crescimento, já que as células se comportam de maneiras diferentes com relação à

proliferação, atividade enzimática, expressão de determinadas proteínas, etc. Todas as linhagens estudadas são aderentes, exceto a K562 que é uma linhagem de cultura suspensa, e precisaram passar pelo processo de digestão por tripsina/EDTA quando a confluência chegava a aproximadamente 80-95%, aproximadamente a cada dois dias, e quando não era necessário soltar as células para passagem, foi realizada apenas a troca de meio de cultura.

A cultura de células deu-se no Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular (LBCM) lotado no Centro de Biotecnologia (CBIOTEC) na Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As células foram cultivadas em garrafas de 25cm² e 75cm², e o meio de cultura utilizado para todas as linhagens foi o meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; SIGMA-ALDRICH, Reino Unido), suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF; SIGMA-ALDRICH, Reino Unido) para estimular crescimento e 1% de penicilina-streptomina (SIGMA-ALDRICH, Reino Unido). As culturas celulares foram mantidas em condições de 37 °C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ (Figura 7.A e 7.B). A composição do meio de cultura DMEM contém 4mM de L-glutamina, 4,5g/L de glicose, 1mM de piruvato de sódio e 1,5g/L de bicarbonato de sódio.

O processo, manuseio e manutenção das culturas seguiu protocolo pré-estabelecido pelo laboratório e seguiu as recomendações principais de biossegurança, a fim de evitar contaminações na cultura, bem como promover algum risco ocupacional ao operador de acordo com as recomendações das Boas Práticas de Laboratório (BPL; Figura 7.C.). O uso de Equipamentos de Proteção Individual e Coletiva (EPI's e EPC's), limpezas e descontaminações periódicas dos ambientes de trabalho e descarte dos materiais contaminados foram algumas medidas tomadas para adequar às normas de BPL.

Figura 7. Manutenção da cultura de células



Fonte: Autor (2023). A.: Garrafinha 25cm² de cultura celular de HCT-116 no meio DMEM sob microscópio óptico. B.: Estufa da cultura celular, a 37°C a 5% CO₂. C.: Processo de tripsinização da cultura para manutenção.

4.2 COLETA DE DADOS CLÍNICOS E AMOSTRAS DE PACIENTES

A partir da participação do Setor de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Hospital Napoleão Laureano (João Pessoa, PB), as amostras frescas foram adquiridas de pacientes selecionados e que consentiram, voluntariamente, com a utilização e participação no estudo, mediante a assinatura em nosso “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (apêndice A), com uma cópia permanecendo com o grupo de pesquisa e uma com o paciente voluntário. O presente estudo foi encaminhado para aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em humanos, e foi aprovado sob o parecer de nº 5.017.299.

Foram avaliados ao todo 27 pacientes com câncer colorretal que foram atendidos no Hospital Napoleão Laureano, submetidos a cirurgia eletiva ou cirurgias de urgência entre os anos de 2022 e 2023. Foram excluídos do estudo pacientes com histórico de polineuropatia amiloidótica familiar (PAF), câncer colorretal hereditário não polipose (CCHNP), doença inflamatória intestinal – retocolite ulcerativa ou doença de Crohn, história de CCR sincrônico

ou prévio, submetido a radio e/ou quimioterapia neoadjuvantes, com indisponibilidade de dados completos em prontuário médico.

Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos através de seus prontuários clínicos. Foram coletados dados referentes ao gênero biológico, idade, cor, escolaridade, localização do tumor (direito, esquerdo e reto), tamanho do tumor (maior ou menor que 5 cm), grau histológico (pouco, moderadamente e bem diferenciado), tipo histológico (tubular e misto), metástase em órgãos linfáticos e em outros órgãos, estadiamento patológico (grau 0 – IV) e níveis de expressão do CEA (abaixo ou acima de 4,0 ng/mL).

Nesse contexto, uma pequena porção do fragmento obtido no processo da biópsia foi separado e imerso em 1 mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen) em microtubos estéreis de 1,5 mL livres de RNase. Dessa forma, foram armazenados dois microtubos para cada paciente no freezer a -80°C: um tubo contendo o tecido doente e um tubo do tecido não tumoral adjacente, e assim permaneceram até o momento de extração de RNA. A caracterização dos tumores de cada paciente foi feita pelo médico responsável pela cirurgia, como consta no “Instrumento de Coleta de Dados” (apêndice B) fornecido pelo grupo de pesquisa. O Instrumento de Coleta de Dados forneceu-nos informações a respeito da localização do tumor, diferenciação, tamanho, metástases e algumas informações pessoais dos pacientes, como idade e sexo.

4.3 EXTRAÇÃO DE RNA

O TRIzol® é um reagente de fase única de fenol e tiocianato de guanidina que tem por objetivo o isolamento de RNA (ou simultaneamente RNA, DNA e proteínas), facilitando, assim, o armazenamento e a realização do protocolo posterior à extração de RNA. O RNA é uma molécula instável que pode fornecer informações importantes sobre expressão gênica, e, assim, é importante que a sua extração seja feita de forma eficiente, mantendo a integridade e qualidade do ácido nucleico. O processo de extração baseia-se na lise e desnaturação das células na presença de inibidores de RNase, pois a presença destas ribonucleases é a maior dificuldade durante este processo (BITTENCOURT et al., 2011).

Para cada tipo de amostra (linhagem celular ou tecidos frescos dos pacientes), o cuidado e manuseio foi realizado de forma diferente inicialmente, como é descrito nas seções a seguir. O protocolo seguido foi obtido a partir da literatura e padronizado para a realidade do nosso grupo de pesquisa, e está descrito na seção 4.3.2, pois o protocolo em si de extração

foi o mesmo tanto para as linhagens quanto para as amostras frescas de tumores e tecidos saudáveis.

Após o final das extrações de RNA, foi realizada as quantificações com 1µL da amostra final obtida, no equipamento e programa NanoDropTM2000 (ThermoFisher Scientific; ND2000), para determinar a concentração média de RNA obtida de cada amostra ou linhagem antes de prosseguir para a síntese de cDNA.

4.3.1 Extração de RNA na cultura celular

Para a cultura celular foi preciso fazer etapas prévias a extração para que continuássemos com a cultura celular após o experimento, bem como para obtermos uma quantidade de células razoável para o experimento.

Dessa forma, as células foram cultivadas em garrafas de 75cm² a uma confluência de aproximadamente 90% e então foram removidas com solução de tripsina/EDTA (25%), submetidas a centrifugação (1400rpm), ressuspensas em 2 mL de meio DMEM e a densidade celular ajustada para 1×10^6 células/mL em 3 mL. Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços, com fundo tratado para aderência, 24h antes do experimento de extração de RNA. A concentração das células foi determinada pelo método de contagem em câmara de Neubauer, com coloração do Azul de Tripán (LGC Biotecnologia; código BR30084-01). Para cada linhagem foram utilizados dois poços com essas concentrações.

4.3.2 Extração das amostras frescas e das linhagens celulares

Como foi explicitado na seção 4.3, as amostras frescas de tumores e tecidos saudáveis eram armazenadas já em microtubos contendo 1 mL TRIzol a -80 °C após a cirurgia de ressecção. A partir do descongelamento rápido das amostras nos tubos, o procedimento de extração seguiu o protocolo. Cada fragmento tecidual obtido possuía entre 0.5 mm a 3 cm aproximadamente. Consequentemente, os fragmentos precisaram ser picotados e macerados antes de serem adicionados os reagentes e inicializada a extração do RNA propriamente dita. Dessa forma, os fragmentos foram picotados em pedaços menores com tesoura cirúrgica (Figura 8), e adicionados a novos microtubos de 1,5 mL, contendo 1mL de TRIzol®.

Figura 8. Corte dos fragmentos de tecido tumoral e não-tumoral feito com tesoura cirúrgica



Fonte: Autor (2023). Os fragmentos foram picotados e macerados dentro do tubo tipo Eppendorf.

Após o corte das amostras para obter fragmentos menores, foi adicionado 200 μ L de clorofórmio ao 1 mL de TRIzol® já presente, e agitado à mão por 15 segundos. Em seguida, após obter uma amostra de coloração rosada (Figura 9), os microtubos foram incubados em gelo por 3 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas à 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C.

Figura 9. Microtubos após adição de clorofórmio ao TRIzol® seguido de agitação das amostras

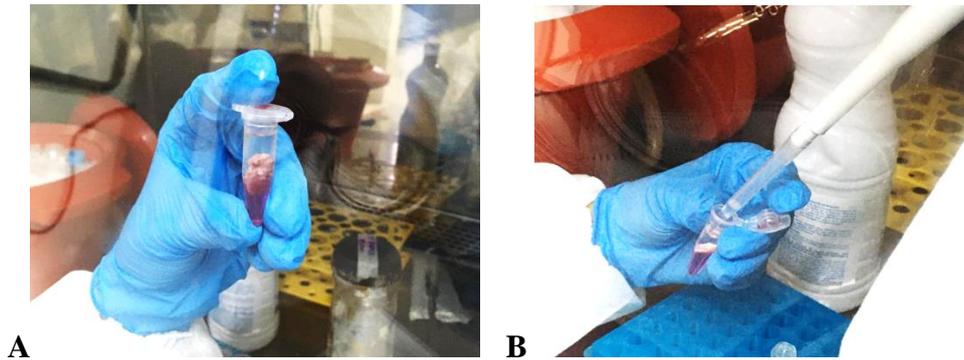


Fonte: Autor (2023). Tubos contendo a amostra, TRIzol e clorofórmio antes da primeira centrifugação. No caso da figura, o experimento foi realizado com duas marcas diferentes de TRIzol para a extração da linhagem HEK-293, para avaliar a capacidade de cada um, por isso as colorações diferentes, mas o experimento seguiu como descrito.

Após esse processo, os tubos apresentaram três fases visíveis: a fase aquosa (incolor, contendo o RNA de interesse), anel interfásico (esbranquiçado, contendo DNA) e a fase fenólica (fase orgânica; contendo lipídeos e proteínas) (Figura 10.A). Assim, a fase aquosa foi retirada contendo o RNA de interesse e passada para um novo microtubo estéril de 1,5 mL livre de RNase (Figura 10.B). Foi adicionado 500 μ L de álcool isopropílico P.A. e os microtubos agitados por inversão, seguido de incubação por 15 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C.

O clorofórmio adicionado durante o protocolo tem a função de solubilizar os lipídeos presentes na solução com a amostra e permitir a sua retirada em fase posterior. O RNA é precipitado na presença do álcool isopropílico e o álcool etílico 75% é utilizado em prol de retirar sais que tenham aderido ao RNA precipitado, por isso às vezes é necessário realizar essa etapa mais de uma vez para obter um RNA de qualidade elevada (IBELLI et al., 2007).

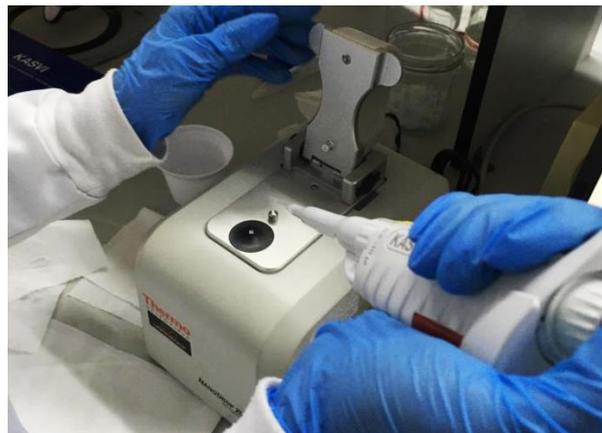
Figura 10. Obtenção da fase aquosa contendo RNA



Fonte: Autor (2023). A.: Separação das três fases após a primeira centrifugação. B.: Retirada da fase aquosa contendo o RNA de interesse para colocar em novo tubo Eppendorf.

Após a segunda centrifugação, foram obtidos os precipitados contendo o RNA de interesse. O sobrenadante foi descartado e adicionado álcool etílico 75% (preparado em água livre de RNase). Foi realizada nova centrifugação a $7500 \times g$ à 4°C por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e repetiu-se a centrifugação a $7500 \times g$ à 4°C por 3 minutos. Após descartar o sobrenadante contendo o álcool, os tubos foram deixados abertos no fluxo laminar para secar, por aproximadamente 45 minutos a 1 hora. Os precipitados contendo RNA foram ressuspensos em $50 \mu\text{L}$ de água DEPC livre de RNase e $1 \mu\text{L}$ foi utilizado para realizar a quantificação do RNA (Figura 11).

Figura 11. Quantificação das amostras obtidas (RNA e cDNA)



Fonte: Autor (2023). De cada ressuspensão (seja de RNA ou cDNA), $1 \mu\text{L}$ foi depositado no sensor do equipamento para quantificação da amostra (NanoDrop™2000, ThermoFisher Scientific; ND2000, Wilmington, Estados Unidos).

4.4 SÍNTESE DE cDNA

Esta é uma técnica de biologia molecular que busca sintetizar a primeira cadeia de cDNA pela atividade da enzima transcriptase reversa, capaz de polimerizar a fita a partir de um molde de RNA total ou mRNA. Para uma síntese de cDNA bem sucedida, é preciso que o RNA a ser utilizado como molde esteja íntegro e contenha a menor quantidade possível de contaminantes como resíduos proteicos, sais, íons metálicos, etanol e fenol provenientes da extração do RNA, para evitar a inibição da reação de síntese, bem como livre de DNA para que não interfira no resultado da posterior RT-PCR.

O kit utilizado para esta pesquisa foi o “Platus Transcriber RNase H- cDNA First Strand Kit” da Sinapse Ino (#S1402; Lot: 00873371), o qual contém a enzima transcriptase reversa Platus H-, a qual possui uma mutação capaz de eliminar completamente a atividade da RNase H, evitando assim, a degradação do RNA durante a síntese de cDNA.

A enzima transcriptase reversa foi isolada primariamente de um vírus, e a sua versão com a mutação permite que haja um maior rendimento de cDNA de comprimento longo e também pela capacidade de funcionar em um amplo espectro de temperatura (42°C a 55°C) (GREEN; SAMBROOK, 2019). Este processo é interessante pois obtém-se ao final, uma fita de DNA que não contém íntrons, apenas éxons, isto é, os fragmentos genéticos que de fato são responsáveis por codificar uma determinada proteína (LITWACK, 2018).

O protocolo da síntese de cDNA foi seguido estritamente como indica o fabricante do kit para fabricação a partir do RNA total e síntese de hexâmetro aleatório, como segue o passo a passo:

- Adicionar ao tubo o RNA total (0,5 ng – 5 µg), o *random hexamer primer* (1 µL) e água *nuclease-free* (12 µL), com volume total final de 12µL.
- Adicionar os componentes na ordem: 5x *Reaction Buffer* (4 µL), *RNase Inhibitor* (1µL), 10 mM dNTP Mix (2 µL) e H Minus *Reverse Transcriptase* (1 µL).
- Misturar delicadamente e centrifugar
- Colocar no equipamento termociclador (Applied Biosystems; GeneAmp PCR System 9700) por um ciclo na sequência:
 - 5 minutos a 25°C
 - 60 minutos a 42°C
 - 5 minutos a 70°C

4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL

A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*; PCR) é uma técnica de amplificação de sequências específicas de DNA. No caso da presente pesquisa, o nosso alvo em estudo para amplificação de DNA seriam as sequências genômicas do canal Kv10.1 (gene KCNH1) e GAPDH, como gene de referência. Para cada gene estudado, um par de oligonucleotídeos (primers) é utilizado para hibridizar em cada uma da dupla fita de cDNA obtida previamente. Após o anelamento dos primers, é possível que uma enzima polimerase possa fazer a extensão da cadeia de DNA pela polimerização com nucleotídeos presentes no tubo de reação nas duas direções da fita. Todo o processo é repetido durante vários ciclos, e em todos os ciclos as sequências passam pelo mesmo processo de desnaturação da cadeia (abertura da dupla fita), anelamento dos primers e amplificação da cadeia, permitindo que ao final da PCR, tenhamos uma amplificação com milhares de cópias de DNA (LITWACK, 2018).

No presente estudo, utilizamos uma variação da técnica de PCR, chamada *Real-Time PCR*, a qual utiliza marcadores fluorescentes que permitem a captação e observação da amplificação das fitas de DNA em tempo real de forma quantitativa e qualitativa (CAO et al., 2020).

A qPCR foi realizada com o kit “Power Up SYBR Green Master Mix” da ThermoFisher, e o protocolo foi seguido de acordo com as instruções do fabricante. O desenho dos primers (Tabela 3) foi realizado em colaboração com o biólogo Diogo Leonardo Santos Silva, também estudante do grupo de pesquisa, da seguinte forma: as sequências para a região codificante (CDS) completa do gene Kv10.1 (KCNH1) foram coletadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Em seguida, as sequências foram alinhadas na plataforma CLUSTAL W (<http://www.clustal.org/clustal2/>). Com isto, foram determinadas regiões homólogas entre as sequências coletadas, dentre as quais uma delas foi utilizada para o desenho dos *primers* na plataforma online Primer 3 (<https://primer3.org/>). Por fim, a especificidade dos *primers* desenhados para o Kv10.1 de humanos foi analisada por meio do alinhamento na plataforma online BLAST N do NCBI (<https://tinyurl.com/geo-blast>).

Tabela 3. Desenho dos primers

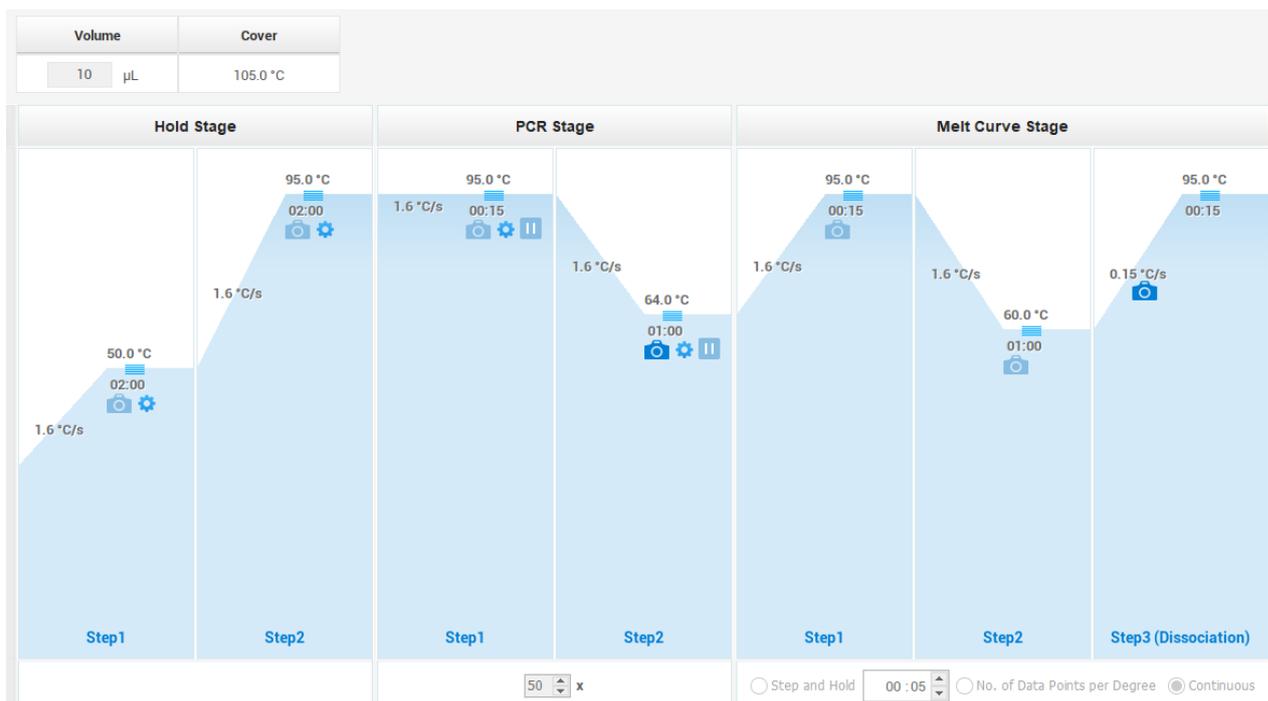
GENE	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS	TAMANHO
KCNH1	F-5'TGGTACAGCATTGGGGACTA3' R - 5'TAAGGGGTGCCAATGTCCAT3'	120 pb
GAPDH	F - 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3' R - 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'	249 pb

Fonte: Autor (2023). As sequências no portal NCBI na biblioteca de “Nucleotide”, o alinhamento foi feito na ferramenta CLUSTALW, o desenho dos primers no “Primer3web” e por fim, a especificidade verificada na ferramenta BLASTn.

A qPCR foi realizada por meio do equipamento e Software “QuantStudio™ 3 System”, utilizando do método de Ct Comparativo ($\Delta\Delta Ct$) com a sonda SYBR® Green, no método de corrida “Standard”. O volume final do tubo de reação foi de 10 μ L, seguindo os três estágios de desnaturação da dupla fita de cDNA, anelamento dos primers e extensão, conforme mostra a Figura 12. O procedimento foi repetido por 50 ciclos, pois o gene em estudo apresenta baixa expressão. A desnaturação é um passo importante onde a dupla fita de DNA é submetida a altas temperaturas, provocando a perda da estrutura secundária da molécula; o anelamento, por sua vez, as sequências complementares dos *primers* hibridizam na fita única em uma temperatura menor e perfeitamente adequada à construção das novas interações moleculares, baseado na temperatura de *melting* (T_m); por fim, a extensão acontece em uma temperatura ótima para a atuação da enzima polimerase, que vai fazer a extensão da fita e amplificação das sequências alvo (Life Technologies).

No equipamento, a primeira etapa “*Hold Stage*” (Figura 12), refere-se à ativação da enzima que acontece aos 50 °C por 2 minutos, seguido de um período de 2 minutos a 95 °C. A fase de desnaturação acontece logo em seguida, aos 95 °C por 15 segundos. Neste protocolo, de acordo com o fabricante, as fases de anelamento dos *primers* e extensão acontecem à mesma temperatura, aos 64 °C por 1 minuto. Corridos os 50 ciclos da PCR, é gerada a curva de *melting* iniciando aos 95 °C por 15 segundos, seguido de 60 °C por 1 minuto, e, por fim, 95 °C por 15 segundos.

Figura 12. Método de corrida da qPCR no Software QuantStudio™ 3 System



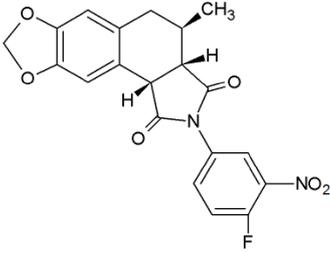
Fonte: Autor (2023). As três etapas da PCR: “Hold Stage; PCR Stage; Melt Curve Stage”, contendo as temperaturas e o tempo de duração da subetapa. Essas três etapas repetiram-se aos 50 ciclos, com volume final da reação de 10 μ L.

4.6 DOCKING MOLECULAR

Foi realizado um estudo de *docking* molecular, com o objetivo de avaliar o potencial de interação teórico sobre este canal de potássio dependente de voltagem. Primeiramente, foram calculadas as energias livres de ligação de alguns compostos, tendo como foco para esta pesquisa o composto A398, que já existe estudos *in vitro* prévios do nosso grupo de pesquisa em linhagens celulares de diversos tipos de leucemia e algumas linhagens aderentes, e o 5-fluorouracil (5-FU), que é a droga utilizada na clínica que utilizamos como referência para comparação neste estudo.

É importante salientar que quanto menor os valores de energia de ligação dos compostos, mais favoráveis e estáveis energeticamente será a interação entre o composto e o canal avaliados (esta é a interação ligante-proteína). Os ligantes utilizados, isto é, as moléculas-alvo para interação com o canal de potássio estão expostas na Tabela 4.

Tabela 4. Ligantes, códigos de acesso e estrutura 2D

NOME COMERCIAL	COMPOSTO	CÓDIGO DE ACESSO	ESTRUTURA 2D
A398	(2s,6s,7r)-4-(4-fluoro-3-nitrofenil)-7-metil-12,14-dioxa-4-azatetraciclo[7.7.0.0.2,6.0.11,15]hexadecal(16),9,11(15)-trieno-2,5-diona	Desenhado no <i>ChemSketch</i>	
5-Fluorouracil	5-Fluoro-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione, 2,4-Dihydroxy-5-fluoropyrimidine	3385/ <i>PubChem</i>	

Fonte: Autor (2024). Os compostos utilizados, com seus nomes comerciais, compostos químicos, o código de acesso no PubChem e a estrutura 2D obtida ou desenhada.

Dessa forma, foi selecionada uma sequência do membro 1 do canal dependente de voltagem de potássio isoforma 2, subfamília H de *Homo sapiens* na base de dados do NCBI (Acesso: NP_002229.1). A sequência foi modelada pelo servidor SWISS-MODEL através da técnica de modelagem comparativa (modelagem por homologia). Esta técnica tem como função a modelagem de uma proteína desconhecida e tentar fazer a predição de sua estrutura com base em várias outras estruturas moldes que estão disponíveis em bancos de dados, assumindo que a conformação estrutural de uma proteína é mais conservada do que a sequência de aminoácidos durante o processo evolutivo, e as mudanças inerentes àquela proteína só interfere em pequenas alterações na estrutura tridimensional, assim, os moldes terão similaridades de função, estrutura, e mesmo grupo de genes (Comparativa, 2018). Assim, foi selecionado como estrutura-molde o canal dependente de voltagem de potássio membro 1 da subfamília H (PDB-ID 5K7L), que apresentou uma similaridade de 96,93%.

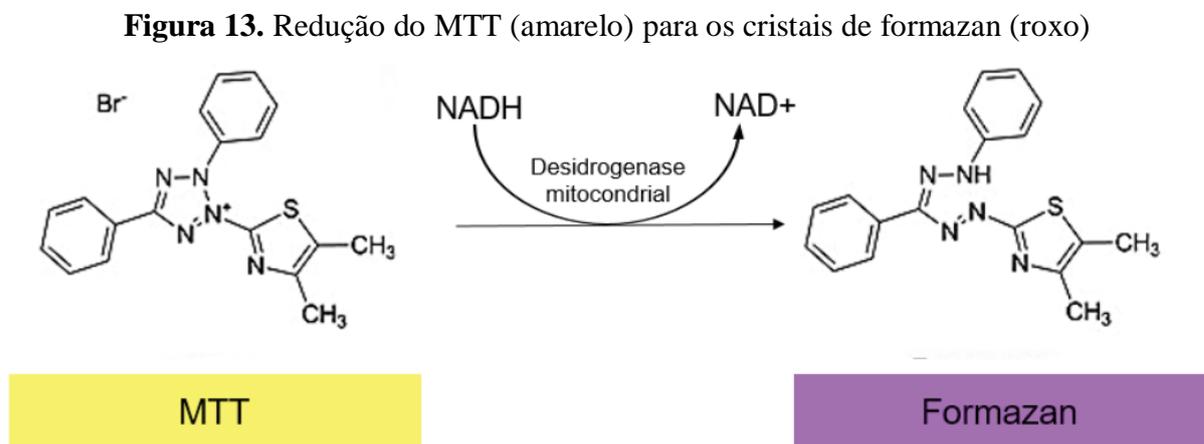
As simulações de ancoragem foram realizadas no programa *AutoDock tool* (MGLTools 1.5.6). As estruturas das proteínas foram tratadas como macromoléculas receptoras e os compostos foram tratados como ligantes. As moléculas de água foram removidas e parâmetros de carga *Gasteiger* foram adicionados.

Para cada sistema proteína-ligante foi estabelecida uma grade cúbica (*grid*) de dimensões 126 x 126 x 126 Å centrada nos receptores pela ferramenta *Autogrid*, isto serve para determinar o local que haverá o *docking*. O *docking* foi calculado através do Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) com 10.000 réplicas com populações de 150 indivíduos a um máximo de 27.000 gerações e taxas de mutação crossover de 0,02 e 0,08 respectivamente.

4.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Realizamos, em sequência à bioinformática, o ensaio de MTT para avaliar a viabilidade celular após o tratamento com o composto A398 e ao 5-fluorouracil (5-FU), isto é, uma molécula testada pela primeira vez *in silico* no Kv10.1 e uma molécula que já é utilizada na clínica para o tratamento do CCR. O A398 foi adquirido em colaboração com o Prof^o Dr^o Petrônio Filgueiras de Athayde Filho, lotado no Departamento de Química (DQUI) do Centro de Ciência Exatas e da Natureza (CCEN) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

O ensaio de MTT (Mosmann, 1983) é uma técnica que se baseia na atividade de enzimas oxidorreduzases mitocondriais dependentes de NAD(P)H, que quando estão metabolicamente ativas (isto é, as células estão viáveis), tem a capacidade de reduzir o sal de tetrazólio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), uma molécula de tonalidade amarelada e solúvel em água, em cristais de formazan roxos e insolúveis em água (Kumar; Nagarajan; Uchil, 2018) (Figura 13). Sendo assim, quanto maior a coloração roxa, mais viáveis estão as células.



Fonte: Magalhães, Thá e Leme (2018). A molécula de MTT (amarela) passando pela redução a cristais de formazan (roxo).

Para este ensaio, utilizamos a linhagem celular HCT-116 que foi cultivada em DMEM nas mesmas condições indicadas na seção 4.1. As células foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de 3×10^5 células/mL com volume final nos poços de 100 μ L e deixadas *overnight* para aderir. Após este período, os compostos testados foram diluídos, por diluição seriada, e foram aplicados na faixa de concentrações de 1,56 a 100 μ M (1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 μ M), deixando os poços com 200 μ L no volume final para cada concentração, inclusive no controle negativo (apenas com meio de cultura). Ao final do tratamento (24 ou 72 horas), retirou-se 110 μ L de meio, e adicionou-se 10 μ L da solução de MTT (5 mg/mL). As células foram incubadas na estufa por um período de 3 horas e 30 minutos e depois as células foram centrifugadas (1400 rpm x 4 minutos), e todo o MTT e meio de cultura foi retirado para solubilização dos cristais de formazan com 100 μ L de DMSO por aproximadamente 10 minutos. Os ensaios foram realizados nos períodos de 24 horas e 72 horas em triplicata. A leitura da placa, após a solubilização dos cristais de formazan, foi feita a 570 nm em leitora de placas do tipo ELISA (BioTek; EL800).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os dados clínico-patológicos, os dados brutos foram tratados e organizados em Excel (Washington, Estados Unidos) e realizamos uma análise de frequência de dados utilizando o software IBM® SPSS® Statistics 22 (Estados Unidos).

Os dados de quantificação das amostras de RNA e cDNA foram registrados em Excel (Apêndice C). O método da PCR foi por meio da quantificação relativa, onde utilizamos a expressão de um gene de referência (no caso deste estudo, o gene GAPDH) e o nosso gene de interesse (K_v10.1). Os dados foram coletados no software QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.5.2, onde ajustamos o ciclo *threshold* (CT), referindo-se ao ciclo da PCR que o nível de fluorescência obtido atinge um determinado nível de interesse, e, em seguida, foram tratados em planilha no programa Excel (Washington, Estados Unidos) (Apêndice D e E). Realizamos o método estatístico de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para calcular a quantificação relativa (*fold-change*) das amostras. Para fazer a análise estatística, utilizamos o software GraphPad Prism 8.0.2, onde fizemos os testes *t* de Mann-Whitney (para amostras não pareadas e que não assumem distribuição gaussiana; Mann; Whitney, 1947) para todas as comparações de significância estatística entre as expressões. Consideramos o valor de $p < 0.05$.

Com relação aos dados de bioinformática, além dos *softwares* utilizados para a realização dos próprios experimentos, a qualidade estereoquímica dos modelos gerados foi garantida por meio dos gráficos de Ramachandran, na ferramenta online PROCHECK. A otimização dos ligantes submetidos (A398 e 5-FU) foi feita realizada no programa Openbabel. E por fim, o *docking* molecular foi feito no *software Autodock Tool*, e os seus resultados foram visualizados e analisados pelos *software VMD-Visual Molecule Dynamics* (Humphrey et al., 1996) e *DS-Discovery Studio Visualizer* (BIOVIA).

Por fim, os resultados da citotoxicidade nas linhagens celulares foram obtidos por leitura em espectrofotômetro (BioTek; EL800) e foram exportados no programa Excel (Washington, Estados Unidos). Os experimentos realizados em triplicata foram analisados no GraphPad Prism 8.0.2, onde realizamos os testes de variância *one-way* ANOVA, para testar estatisticamente a igualdade entre as médias e a variância, sendo assim expressos no gráfico como média \pm erro padrão da média. As análises estatísticas dos dados foram realizadas mediante o teste estatístico de correção de Bonferroni, considerando $P < 0,05$ para a significância dos dados. Para determinar a atividade de inibição dose-dependente, utilizamos o cálculo da concentração inibitória média. A concentração inibitória média (CI₅₀) é um resultado que indica a concentração para inibir ou inviabilizar a atividade bioquímica ou biológica de uma população celular pela metade, podendo indicar em testes *in vitro* a concentração necessária de um determinado composto para inibir 50% da viabilidade celular de uma população.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES

Os resultados obtidos a partir da coleta de dados feita com o recolhimento do “Instrumento de Coleta de Dados” (Apêndice B) demonstraram que dos 27 pacientes estudados, as idades variaram de 36 a 88 anos ($62,25 \pm 13,88$), onde 10 (37%) tinham idade menor que 60 anos até o momento da coleta, e 17 (36%) tinha mais de 60 anos. A maioria era do sexo masculino, sendo estes 15 (55,6%) pacientes, enquanto 12 (44,4%) eram do sexo feminino. Além disso, observou-se que a maioria dos pacientes estudados foram diagnosticados com CCR Esquerdo, em grau inicial (I-II), com diferenciação baixa-moderada, sem metástases (no momento do diagnóstico) para órgãos linfáticos ou outros órgãos, com valores de CEA menores que 5 ng/ml, mas que possuíam na maioria destes casos tumores com tamanhos acima de 5cm. Todas estas informações estão sumarizadas e contabilizadas na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados dos dados clínico-patológicos

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	N (%)
Pacientes	27 (100%)
Idade	
<60 anos	10 (37%)
>60 anos	17 (36%)
Sexo	
F	12 (44,4%)
M	15 (55,6%)
Localização do Tumor	
CCR Direito	8 (29,6%)
CCR Esquerdo	19 (70,4%)
Tamanho do Tumor	
<5cm	9 (33,3%)
>5cm	18 (66,7%)
Diferenciação	

Baixa-Moderada	23 (85,2%)
Alta	3 (11,1%)
Dados Ausentes	1 (3,7%)
Metástase	
Sim	6 (22,2%)
Não	21 (77,8%)
Metástase para Órgãos Linfáticos	
Sim	5 (18,5%)
Não	22 (81,5%)
Grau TNM	
I-II	13 (48,1%)
III-IV	7 (25,9%)
Dados Ausentes	7 (25,9%)
Valor CEA	
<5ng/mL	12 (44,4%)
>5ng/mL	3 (11,1%)
Dados Ausentes	12 (44,4%)

Os dados foram coletados pelo instrumento de coleta e calculados no Software SPSS Statistics, utilizando do cálculo de análise de frequência.

Estes resultados entram em congruência com o estudo de Pucci *et al.* (2022), que analisou o perfil clínico-epidemiológico de 509 pacientes diagnosticados com CCR no Paraná (Brasil) de 2016 a 2018, e identificou que a maioria dos pacientes eram do sexo masculino, acima de 60 anos e com CCR de Lado Esquerdo. Os nossos dados, embora com uma quantidade menor de pacientes para avaliação quando em comparação com o de Pucci *et al.* (2022), demonstram uma predominância de características que colaboram na criação de um padrão clínico. Isso pode auxiliar no rastreio precoce na parcela da população que se encaixa nesse padrão. É importante salientar que o presente estudo avaliou pacientes na Paraíba (na região Nordeste do Brasil), com outros hábitos alimentares, culturais, estilo de vida, condições financeiras, e diferentes estímulos ambientais (temperatura, exposição solar).

O presente estudo também está alinhado aos resultados de Lobo, Giglio e Aguiar (2020), que mostrou a análise do perfil clínico-epidemiológico de 60 pacientes na região de São Bernardo (SP) demonstrando a prevalência do CCR no mesmo grupo que Pucci *et al.*

(2022). Lobo, Giglio e Aguiar (2020) avaliaram, porém, apenas pacientes com estadiamento IV, indicando que metástases eram mais frequentes no fígado. Destes, apenas 21,7% (13/60) estavam presentes em órgãos linfáticos. O estudo de Sardinha, Nunes e Almeida (2021) ainda demonstrou 455 pacientes estudados em São Luis (MA) onde a prevalência do diagnóstico de CCR foi nos estádios II (30,55%), III (29,23%) e IV (31,21%), que é similar com os resultados que foram obtidos no nosso estudo, exceto pelo estágio IV. Isto indica que a maioria dos pacientes não é diagnosticado precocemente ou no estágio I de menor infiltração do câncer nos tecidos, necessitando assim, métodos de diagnóstico mais eficazes. Ainda neste estudo, porém, houve uma singela prevalência de casos em indivíduos do sexo feminino (50,11%).

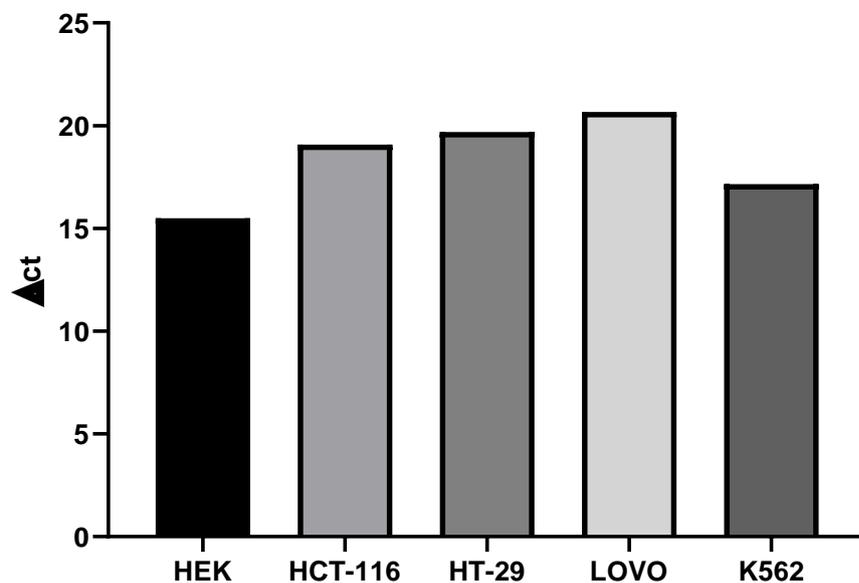
5.2 EXPRESSÃO DO K_v10.1 EM CULTURA DE CÉLULAS

A análise das linhagens foi feita por meio da qPCR para avaliar amplificação das sequências de DNA na presença do K_v10.1 e do GAPDH. O valor de Ct é o número do ciclo de amplificação que é atingido quando o gene é amplificado a um determinado número de cópias. O valor de Δ Ct (Figura 14) é a diferença entre os valores de Ct entre o gene de interesse (K_v10.1) e o gene endógeno de referência (GAPDH). Os Ct's são inversamente proporcionais à presença dos genes, isto é, um gene que tem um valor de Ct muito alto está pouco expresso pois são necessários mais ciclos de PCR para que a fluorescência das cópias amplificadas seja detectada (Shoib *et al.*, 2022). A fórmula de $\Delta\Delta$ Ct não pôde ser utilizada neste experimento pois esta é aplicada para avaliar a expressão de um gene frente um grupo com um determinado tratamento e outro grupo controle, logo a estratégia de Ct Comparativo não se aplica neste ensaio.

O uso da análise do Ct ou Δ Ct tem papel qualitativo, visto que estudos como de Shoib *et al.* (2022) mostram a importância na avaliação padronizada destes valores para a detecção da presença do vírus Sars-Cov-2 em amostras de pacientes, podendo auxiliar no diagnóstico. Aqui, trazemos os valores de Δ Ct comparados entre as linhagens celulares para ratificar a presença do mRNA de K_v10.1. É importante salientar, porém, que também foi identificada na linhagem de HEK-293 a presença do

K_v10.1, o que torna debatível o resultado. As células HEK-293 foram discutidas no trabalho de Stepanenko e Dmitrenko (2015), onde mostraram que esta linhagem tem perfil tumorigênico, cariótipo instável e expressão de marcadores renais, neuronais e células da glândula adrenal, o que pode explicar a presença do K_v10.1 e um resultado de Δ Ct menor do que das outras linhagens estudadas.

Figura 14. Expressão do K_v10.1 em linhagens celulares



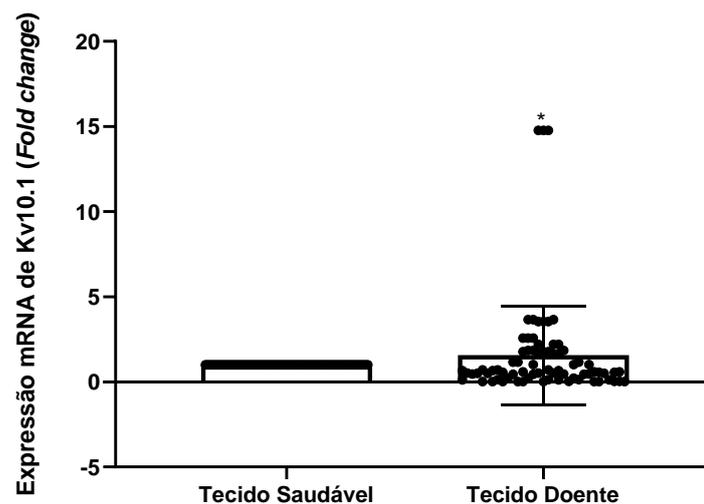
O gráfico mostra os Δ Ct entre uma linhagem não tumoral (HEK-293) e as linhagens tumorais de câncer colorretal (HT-29, HCT-116 e LoVo) e a linhagem de leucemia mielóide crônica (K562). O gráfico foi gerado no GraphPad Prism.

5.3 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE K_v10.1 EM AMOSTRAS DE TECIDO SAUDÁVEL E TUMORAL DE PACIENTES COM CCR

A análise dos tecidos tumorais e dos tecidos saudáveis adjacentes foi feita por meio de qPCR. Para fazer a comparação das expressões, admitimos o valor da expressão do tecido saudável próximo a 1, para normalizar a expressão do canal. Fizemos os testes de “normalidade e lognormalidade” para avaliar a distribuição das amostras, que demonstrou ser “não-gaussiana” e, então, a análise feita foi não-pareada e não-paramétrica, utilizando então o teste estatístico de Mann-Whitney (Mann; Whitney, 1947).

Na análise da expressão gênica de Kv10.1, por PCR em tempo real, realizadas em amostras frescas, verificou-se um aumento da expressão do canal, no tecido tumoral, quando comparado ao tecido saudável da margem do tumor do mesmo paciente (* $p = 0.0282$), como demonstrado na Figura 15. A expressão do mRNA do canal foi heterogênea entre as amostras, variando de 0,015442 a 288,6145055. Estes resultados entram em concordância com o estudo de Chávez-López *et al.* (2020), que estudou a expressão do Kv10.1 em amostras de pacientes com tumores de retinoblastoma, onde a presença do canal foi similarmente heterogênea, mas diferencialmente expressa em comparação com tecido saudável. Dentre as 27 amostras do nosso estudo, foram consideradas duas análises como “*outliers*”, as quais não foram incluídas por estarem muito discrepantes do restante.

Figura 15. Expressão do Kv10.1 em tecido saudável e tecido tumoral de pacientes com CCR



O gráfico demonstra a expressão relativa do canal Kv10.1 em amostras de tecido tumoral (doente) comparada com o tecido saudável. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão (Média \pm SD), (N = 25; * $p = 0.0282$) de acordo com o teste de Mann-Whitney.

A expressão do mRNA de Eag1 (K_v10.1) é diferenciada na maioria dos estudos que estão presentes na literatura. Já no início do século, Ding *et al.* (2007) demonstrou por imunohistoquímica a presença aberrante do canal em 76.3% (58/76) dos casos estudados, além da expressão positiva, obtida por RT-PCR, em 10 dos 13 casos estudados de câncer colorretal no mesmo estudo. O K_v10.1 é considerado importante pela sua expressão diferenciada em tumores de tecidos periféricos onde ele não é encontrado em condições saudáveis, podendo tornar-se um bom biomarcador para câncer cervical e carcinoma de cabeça e pescoço, além de estar amplamente discutido na literatura como um fator que pode

correlacionar com maus prognósticos em sarcomas, câncer colorretal, câncer de ovário, leucemia mielóide aguda, glioblastomas e metástases no cérebro (Cázares-Ordoñez; Pardo, 2017).

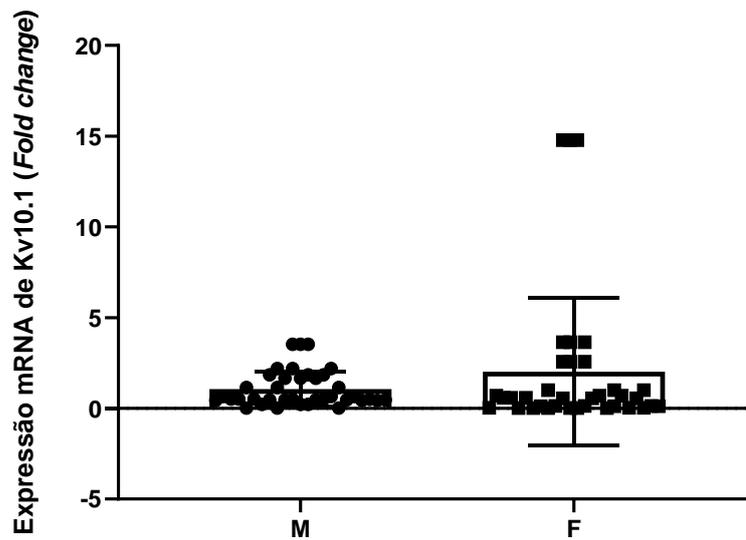
A relevância possivelmente diagnóstica da presença do Kv10.1 é trazida desde os estudos com câncer cervical, onde exames de rotina “Teste de Papanicolau” demonstraram a presença do mRNA de E6/E7 mesmo em pacientes que não demonstravam lesões intraepiteliais profundas, e hoje é sabido que o HPV é um fator que pode regular a expressão do Kv10.1 (Rodríguez-Rasgado; Acuña-Macías; Camacho, 2012), assim, a presença do Kv10.1 mesmo em lesões pré-malignas é possível, e pode ser um sinal de que seja necessário fazer exames de acompanhamento. A questão é justamente que a presença do Kv10.1 não é mera consequência da malignidade fenotípica do tecido, mas o canal exerce ativamente um papel fundamental na proliferação das células, angiogênese, aumento das condições de hipóxia no microambiente tumoral, migração e progressão do ciclo celular (Cázares-Ordoñez; Pardo, 2017; Rodríguez-Rasgado; Acuña-Macías; Camacho, 2012), como foi discutido nas seções anteriores.

Além da comparação entre os tecidos tumorais e seus adjacentes saudáveis, foi avaliado se a expressão do canal Kv10.1 poderia estar relacionada com fatores clínico-patológicos, avaliando assim, se os fatores de idade, sexo, localização do tumor e outros, interferem em uma maior ou menor expressão do canal. Os gráficos referentes a associação dos fatores clínico-patológicos com a expressão gênica estão apresentados das figuras 16 à 24.

Na Figura 16, observa-se a distribuição da expressão do Kv10.1 de acordo com o sexo. É possível observar que, mesmo os pacientes do sexo masculino sendo a maioria, a diferença entre um grupo e outro não demonstrou ser estatisticamente significativa ($p = 0.5430$). Embora a literatura afirme que a prevalência do CCR em homens seja maior que em mulheres, isso não demonstrou fazer diferença com relação à expressão do Kv10.1 nas amostras estudadas.

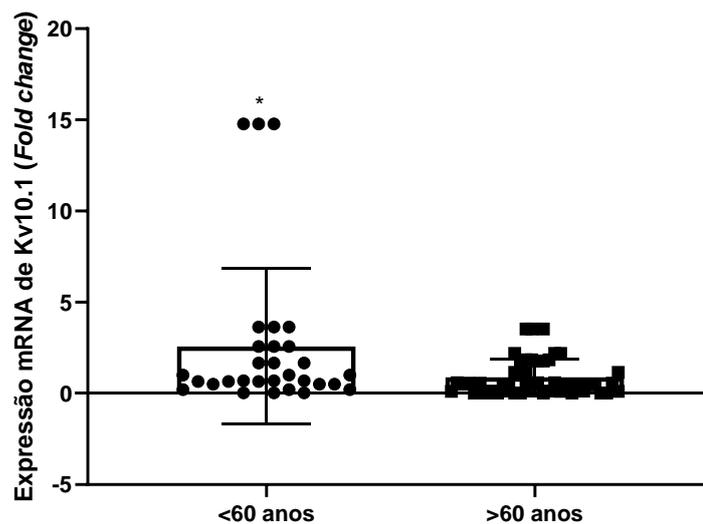
Os nossos achados entram em contraposição ao estudo de Martínez *et al.* (2015) onde pacientes do sexo masculino diagnosticados com glioblastoma apresentaram uma maior expressão do Kv10.1 em comparação a pacientes do sexo feminino, e a sobrevivência a longo prazo destes pacientes foi influenciada pela presença do canal, indicando que este fator pode estar relacionado com o prognóstico dos pacientes. No entanto, as próprias características do câncer, tecido, pacientes e outros fatores podem influenciar nesses resultados.

Figura 16. Expressão do Kv10.1 de acordo com o sexo



O gráfico mostra a distribuição da expressão do Kv10.1 nas amostras de pacientes do sexo masculino (M) e sexo feminino (F) segundo o Teste de Mann-Whitney. (N = 25; $p = 0.5430$).

Figura 17. Avaliação da expressão do Kv10.1 em pacientes com CCR de acordo com a idade



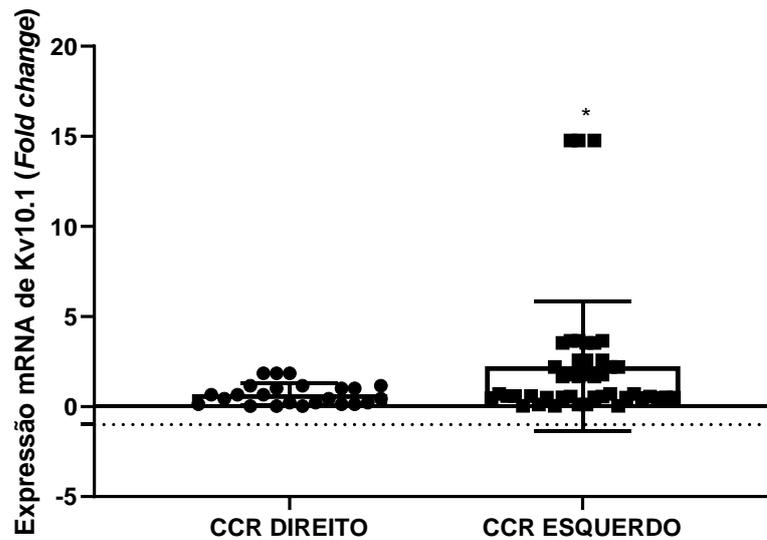
A distribuição da expressão relativa das amostras dos pacientes com menos de 60 anos (à esquerda) e com mais de 60 anos (à direita). Os dados são expressos como média \pm SD pelo Teste de Mann-Whitney. (N = 25; $*p = 0.0112$).

Com relação à idade, por outro lado, os pacientes com idade menores de 60 anos, que representaram 37% dos pacientes estudados, apresentaram expressar mais o K_v10.1 do que os pacientes mais velhos que 60 anos, que eram a maioria (Figura 17; *p = 0.0112). Este dado estatisticamente significativo no nosso estudo, reforça a possibilidade do K_v10.1 como um possível marcador biológico que pode ser identificado em indivíduos mais jovens. O estudo de Liu *et al.* (2015) mostrou a prevalência do K_v10.1 em pacientes acima dos quarenta anos em amostras de pacientes do sexo feminino com câncer de mama, enquanto no estudo de Ding *et al.* (2007), os pacientes com a maior prevalência do canal em estudos de imunohistoquímica eram os que tinham idade menor que 60 anos, mesmo sendo a minoria dos casos com CCR no estudo, tal qual os resultados apresentados na Figura 17.

Em relação a localização do tumor, foi possível identificar que a expressão do canal K_v10.1 estava mais expressa em amostras de tumores do lado esquerdo do cólon, quando comparado a expressão em tumores localizados no lado direito (p = 0.0173; Figura 18), que também foram a maioria dos casos estudados (19/27; 70,4%), como mostrou a Tabela 5. A localização interfere no prognóstico do paciente, pois o CCR Direito está relacionado com mais mutações BRAF, mais instabilidade de microssatélites e maior chance de recidivas, mas que com um diagnóstico em estágios menos avançados (I-II), o prognóstico é melhor (Waldstein *et al.*, 2023). No entanto, o estudo de Bustamante-Lopez *et al.* (2019), mostrou que dentre 187 pacientes com CCR Direito e 173 pacientes com CCR Esquerdo, os pacientes com CCR Direito eram mais velhos, com estadiamento mais avançado e maior risco de morte quando a comparação foi feita com relação a localização do tumor primário.

No nosso estudo, a expressão do K_v10.1 foi maior nos pacientes com CCR Esquerdo, que geralmente tem as características morfológicas polipoides, de pólipos tubulares, com mutações nos genes APC, TP53, EGFR e apresentam instabilidade cromossômica, além dos pacientes possivelmente apresentarem dor abdominal, mudanças nos hábitos estomacais, obstrução intestinal e tem maior chances de apresentar metástases para o fígado e pulmão (Waldstein *et al.*, 2023). Embora a gravidade entre a localização do tumor primário do CCR seja debatível, a maioria dos casos na população em geral é de pacientes que apresentam a localização primária do lado esquerdo do cólon, principalmente em pacientes abaixo dos 55 anos (Kasi *et al.*, 2018).

Figura 18. Expressão do Kv10.1 de acordo com a localização do tumor

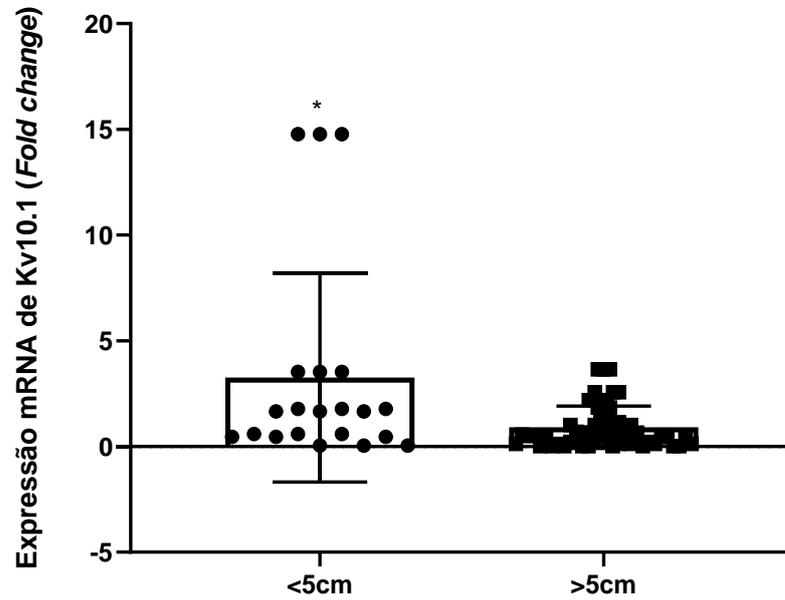


Os dados no gráfico estão expressos como média \pm desvio padrão pelo Teste de Mann-Whitney. (N = 25; *p = 0.0173).

Em relação ao tamanho do tumor (Figura 19), também foi observado que houve influência na expressão do canal, sendo mais significativos em tumores pequenos, menores que 5 cm ($p = 0.0343$). No estudo de Yirgin *et al.* (2023) foi mostrado que pacientes com tumores maiores ou iguais a 5 cm teriam um pior prognóstico, podendo correlacionar este fator com o tamanho.

O nosso estudo mostra que a presença do Kv10.1 está mais expressiva em tumores menores, que geralmente são relacionados com estágios mais iniciais do câncer, reforçando um possível papel diagnóstico no canal. No entanto, a expressão não se perpetua ou progride tanto em estágios mais avançados, ao contrário, sua expressão parece diminuir em tumores maiores que 5 cm. De toda forma, outros fatores possam ser levados em consideração para isto acontecer, o que está aberto ao debate. Liu *et al.* (2015) estudou a expressão do Eag1 em tumores de mama e identificou a correlação entre a expressão do canal e os fatores clínico-patológicos de tamanho do tumor e o grau TNM, e o tamanho dos tumores que apresentavam a maior expressão positiva nos ensaios imunohistoquímicos foram os de tamanho variável entre 2 a 5 cm, portanto em conformidade com os nossos achados.

Figura 19. Expressão do Kv10.1 em amostras de pacientes com CCR de acordo com o tamanho do tumor



Os dados são expressos como média \pm desvio padrão, analisado pelo teste de Mann-Whitney (N = 25; *p=0.0343)

A diferenciação do tumor (Figura 20), por sua vez, não demonstrou no nosso estudo ser um fator de muita relevância para a expressão do Kv10.1 ($p = 0.8407$), embora a maioria dos pacientes tenha apresentado uma diferenciação “Baixa-Moderada”. A diferenciação do tumor refere-se ao crescimento e agressividade que aquele tumor pode ter, havendo três graus (normalmente) de diferenciação: grau 1 (bem diferenciado), grau 2 (moderadamente diferenciado) e 3 (pouco diferenciado); sendo o mais grave o grau 3, pois as células estão com o crescimento rápido e já tem uma morfologia diferenciada das células “originais” daquele tecido (Teixeira; Vasconcelos, 2019).

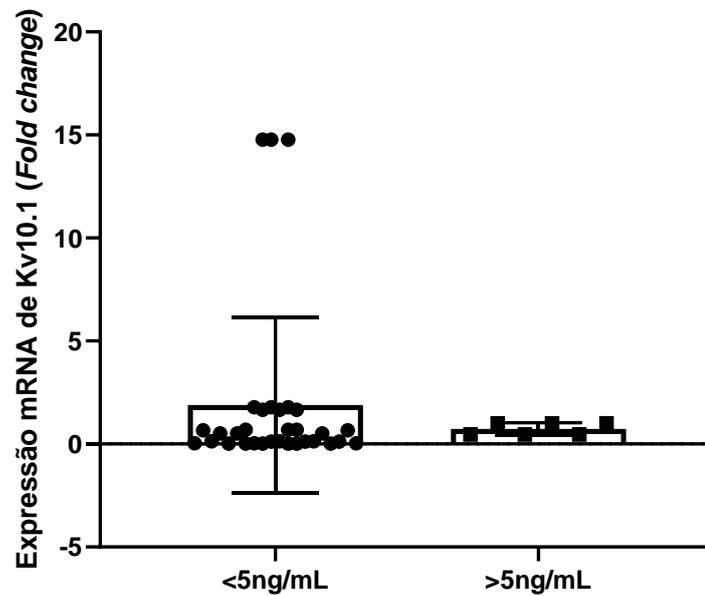
Figura 20. Expressão do Kv10.1 de acordo com a diferenciação do tumor



Os dados são expressos como média \pm SD pelo Teste de Mann-Whitney. (N = 25; p = 0.8407)

Com relação ao valor do antígeno carcinoembrionário (CEA), os dados não mostraram alguma relação entre ele e a expressão do canal (Figura 21). É importante salientar que de todos os dados que coletamos, o valor do CEA foi o que mais apresentou dados ausentes (44,4%), o que pode ter interferido no resultado final, pois a amostragem foi bem reduzida quando em comparação com o restante dos dados. Além disso, a coleta do valor do CEA pode ter ocorrido após a ressecção cirúrgica de alguns pacientes, o que é esperado a influenciar na dosagem do antígeno. O CEA é um biomarcador utilizado na clínica para auxiliar ou direcionar no acompanhamento de pacientes diagnosticados com CCR, e está relacionado a progressão do câncer e a um maior potencial de risco para metástases, sendo estudado como um possível alvo para um sistema de liberação de drogas e outras estratégias (Campos-da-Paz *et al.*, 2018).

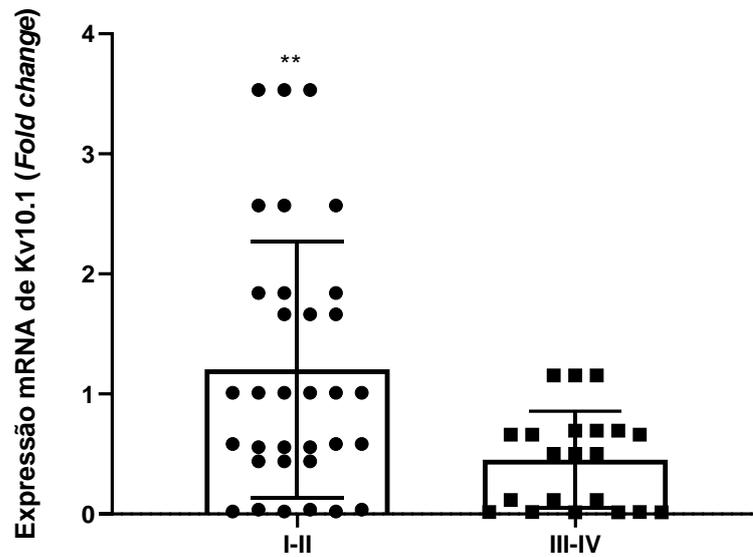
Figura 21. Expressão do Kv10.1 de acordo com o CEA



A maioria dos pacientes apresentou um valor CEA <5ng/mL. (N = 25; p = 0.4846)

Por outro lado, quando comparadas as expressões de Kv10.1 em amostras de CCR nos estádios I-II e III-IV, de acordo com o grau TNM (Figura 22), a expressão em nos estádios mais iniciais foi maior do que em estádios mais avançados (**p = 0.0078), indicando que o canal está mais presente quando o paciente ainda apresenta lesões não tão graves, onde ainda não há metástase linfonodal regional nem metástase em tecidos distantes. Liu *et al.* (2015) identificou que nos grupos com tumores de câncer de mama, o grau TNM foi um fator correlacionado com a expressão do Eag1. Destarte, no estágio II a presença do canal foi mais abundante, seguido do estágio III. Este resultado se assemelha com o nosso estudo, embora tenhamos feito a divisão dos entádios entre I-II e III-IV, que pode ter interferido nesta correlação. No entanto, ratificam a presença do Kv10.1 em estágios mais iniciais, e não quando há metástases distantes no estágio IV.

Figura 22. Expressão do Kv10.1 de acordo com o Grau TNM

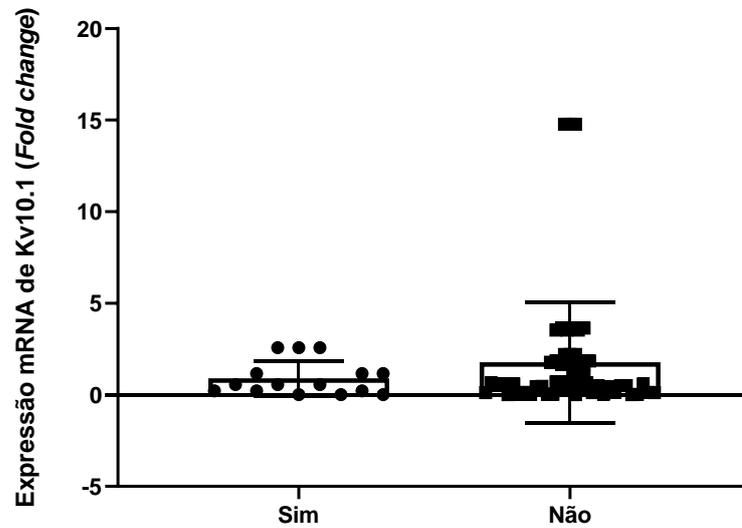


Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da expressão relativa do canal Kv10.1 de acordo com o Teste de Mann-Whitney. (N = 25; **p = 0.0078).

Em relação a presença de metástases, observou-se que esta não se apresentou como um fator significante para a expressão diferenciada do Kv10.1, pois tanto no caso de metástases a distância para outros órgãos (Figura 23; $p = 0.5529$) como em metástases para órgãos linfáticos (Figura 24; $p = 0.5921$) não foi observado diferença significativa.

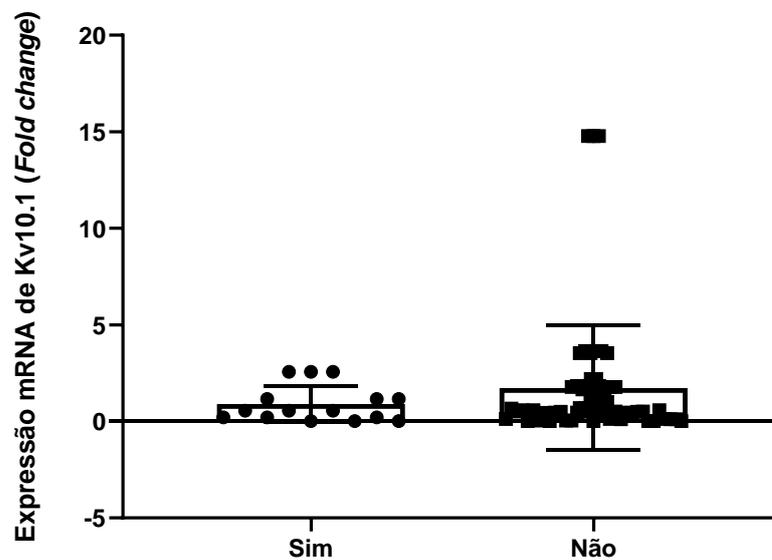
Diferentemente do que foi observado por Martinez *et al.* (2015), cuja expressão de Kv10.1 em metástases cerebrais foi significativamente superior em 60% dos casos, quando comparada com a expressão nos carcinomas primários correspondentes, o que implicou em um pior prognóstico dos pacientes.

Figura 23. Expressão do Kv10.1 em amostras de pacientes com CCR de acordo com a presença de metástases em outros órgãos



Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da expressão relativa do canal Kv10.1 em amostras de tumor (N=25; $p = 0.5529$).

Figura 24. Expressão do Kv10.1 de acordo com a presença de metástases em órgãos linfáticos



Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da expressão relativa do canal Kv10.1 em amostras de tumor (N=25; $p = 0.5921$).

A associação da expressão do Kv10.1 pode ser melhor observada e comparada com os dados clínico-patológicos na Tabela 6.

Tabela 6. Associação entre a expressão relativa do K_v10.1 e os dados clínico-patológicos de pacientes com CCR

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	N (%)	EXPRESSÃO RELATIVA (MÉDIA ± SD)	P
Pacientes	27 (100%)	-	-
Idade			
<60 anos	10 (37%)	2.578 ± 4.276	*0.0112
>60 anos	17 (36%)	0.8894 ± 1	
Sexo			
F	12 (44,4%)	2.013 ± 4.054	0.5430
M	15 (55,6%)	1.065 ± 0.9848	
Localização do Tumor			
CCR Direito	8 (29,6%)	0.6834 ± 0.5930	*0.0173
CCR Esquerdo	19 (70,4%)	2.241 ± 3.580	
Tamanho do Tumor			
<5cm	9 (33,3%)	3.261 ± 4.942	*0.0343
>5cm	18 (66,7%)	0.9052 ± 1.002	
Diferenciação			
Baixa-Moderada	23 (85,2%)	1.126 ± 1.086	0.8470
Alta	3 (11,1%)	5.150 ± 7.223	
Dados Ausentes	1 (3,7%)		
Metástase			
Sim	6 (22,2%)	0.9027 ± 0.9514	0.5529
Não	21 (77,8%)	1.772 ± 3.278	
Metástase para Órgãos Linfáticos			
Sim	5 (18,5%)	0.9027 ± 0.9514	0.5921
Não	22 (81,5%)	1.722 ± 3.228	
Grau TNM			
I-II	13 (48,1%)	1.206 ± 1.067	**0.0078
III-IV	7 (25,9%)	0.4513 ± 0.4045	
Dados Ausentes	7 (25,9%)		
Valor CEA			
<5ng/mL	12 (44,4%)	1.892 ± 4.255	0.4846

>5ng/mL	3 (11,1%)	0.7353 ± 0.3014
Dados Ausentes	12 (44,4%)	

Os dados clínico-patológicos dos pacientes com CCR (n=27) são expressos de forma bruta e em porcentagem (%). A expressão gênica relativa do Kv10.1 e os dados são expressos como média ± desvio padrão. Os valores de p estão disponíveis, sendo os valores com significância marcados. Consideramos significativo quando p<0.05.

Resultados foram obtidos no *software* GraphPad Prism 8.0.2.

Os dados da tabela apresentam os resultados obtidos, mostrando que a expressão do canal pode ser correlacionada com dados demográficos e clínico-patológicos, como a idade, localização do tumor, o tamanho do tumor e o grau TNM, o qual é determinado no diagnóstico. Não foi realizado as diferenças no tempo de sobrevida dos pacientes nos grupos de acordo com os níveis de expressão do Kv10.1 para associar com os fatores clínico patológicos.

Diante dos nossos dados é possível ratificar a expressão do Kv10.1 em tecidos periféricos em condições não saudáveis, e ainda observar que o canal tem potencial no diagnóstico de câncer colorretal.

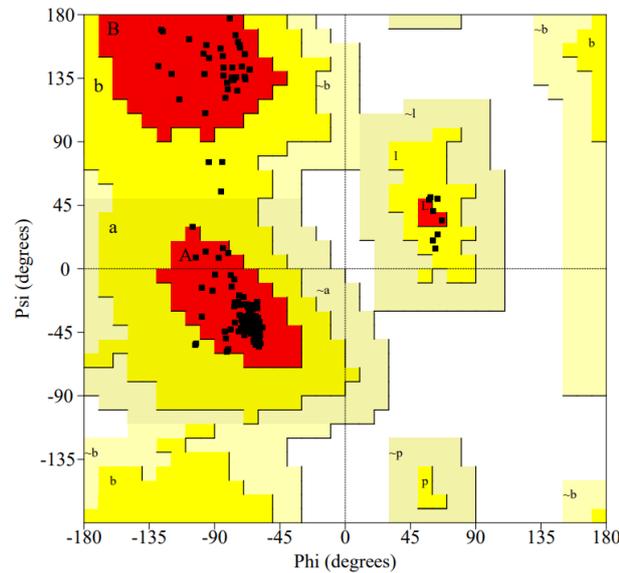
5.4 ANÁLISE *IN SILICO* POR *DOCKING* MOLECULAR PARA O CANAL Kv10.1

Após observar a importância do canal Kv10.1 e sua expressão diferencial em tumores de câncer colorretal e sua relação com fatores clínico-patológicos, buscou-se utilizar essa proteína como alvo molecular para compostos já utilizados na clínica para o CCR, bem como testar um novo composto já estudados pelo nosso grupo de pesquisa com ação anticâncer.

Para isso, foi preciso fazer inicialmente a predição por homologia da estrutura proteica do canal Kv10.1. A modelagem da proteína envolve cinco etapas: pesquisa de estruturas homólogas em base de dados; alinhamento da sequência alvo com as sequências de estrutura conhecida (moldes); construção do modelo tridimensional; a otimização estrutural, e; a validação do modelo (Costa; Galúcio; Silva, 2022). Os gráficos de Ramachandran foram gerados para cada um dos modelos estruturais refinados (Figuras 25 e 26), e é o gráfico de validação da predição que descreve as proteínas pelos seus ângulos de torção, conhecidos por ϕ (phi; ângulo entre o carbono- α e o nitrogênio do grupamento amino) e ψ (psi; ângulo formado entre o carbono- α e o carbono do grupamento carboxi) (Soares *et al.*, 2023). Dessa

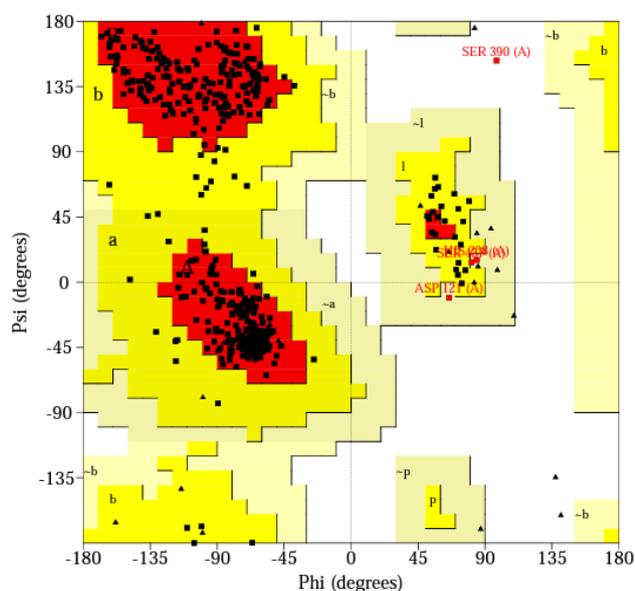
forma, representa todas as combinações possíveis de ângulos diédricos Ψ (psi) versus os ϕ (phi) nos aminoácidos das proteínas.

Figura 25. Diagrama de Ramachandran para Kv10.1 (modelo 1)



O gráfico mostra os resíduos de aminoácidos no eixo y, que representa os ângulos psi formador e no eixo x, com os ângulos phi. O gráfico de Ramachandran tem regiões coloridas fixas que indicam onde os aminoácidos devem se situar para indicar a melhor qualidade estereoquímica. Na modelagem, 95,7 % (222) dos resíduos situaram-se nas regiões mais favoráveis (vermelho), 4,3% (10) situaram-se nas regiões permitidas, nenhum em regiões desfavoráveis ou na região proibida.

Figura 26. Diagrama de Ramachandran para Kv10.1 (modelo 2)



O gráfico mostra os resíduos de aminoácidos no eixo y, que representa os ângulos psi formador e no eixo x, com os ângulos phi. O gráfico de Ramachandran tem regiões coloridas fixas que indicam onde os

aminoácidos devem se situar para indicar a melhor qualidade estereoquímica. Para este modelo, 92,2 % (599) dos resíduos situaram-se nas regiões mais favoráveis (vermelho), 7,2% (47) situaram-se nas regiões permitidas, 0,5% (3) em regiões desfavoráveis e 0,2% (1) em região proibida.

Os resultados apresentados pelos gráficos de Ramachandran apontam que os dois modelos apresentam uma ótima qualidade estereoquímica, uma vez que todos apresentaram mais de 90% de seus resíduos de aminoácidos situados em regiões favoráveis (pontos pretos nas áreas vermelhas) e permitidas (pontos nas áreas amarelas e beges). Nenhum resíduo situou-se em regiões proibidas, o que indica a inexistência de choques estéricos entre os átomos das cadeias laterais.

Com os modelos disponíveis, foi possível realizar o *docking* molecular, onde os valores de energia de ligação foram negativos para os 10 complexos e variaram de -9,59 kcal/mol a -6,72 kcal/mol, indicando uma afinidade ente estas duas moléculas, resultando em complexos proteína-ligante fortes. Os valores para as constantes de inibição (K_i) variaram de 0,9307 μm a 11,93 μm . Os valores de cada complexo podem ser visualizados na Tabela 7.

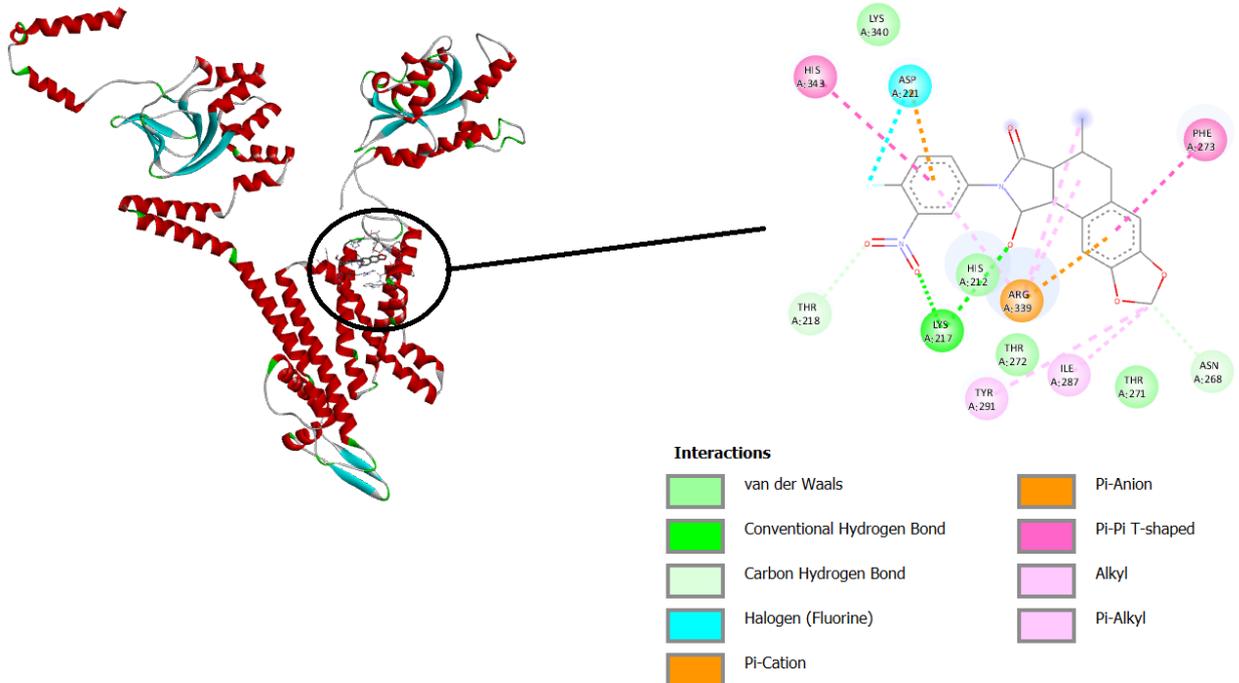
Tabela 7. Resultado do *docking* molecular para o canal Kv10.1 com o composto A398.

COMPLEXO	ENERGIA DE LIGAÇÃO (Kcal/mol)	CONSTANTE DE INIBIÇÃO- K_i (μm)
1	-6,72	11,93
2	-7,54	2,97
3	-8,41	0,68589
4	-8,30	0,82722
5	-9,57	0,09647
6	-9,59	0,09307
7	-8,69	0,43004
8	-9,40	0,12922
9	-9,56	0,09884
10	-8,73	0,39679

Fonte: Autor (2024). Ensaio de *docking*, ou ancoragem, realizada no software *AutoDock tool*.

O complexo 6, que apresentou menor energia de ligação (-9,59 Kcal/mol) foi selecionado para análise visual das interações intermoleculares (Figura 27).

Figura 27. Diagrama 2D das interações entre a Kv10.1 e o A398



Fonte: Autor (2024). Interações moleculares geradas no *Discovery Studio* entre o Kv10.1 e o A398.

No total 13 aminoácidos interagem com o ligante, formando as seguintes interações: ligação convencional de hidrogênio (LYS217), interações de Van der Waals (HIS212, THR271, THR272, LYS340), interação pi-cation/pi-ânion (ASP221, ARG339) interações alquila/pi-alquila (TYR291, ILE287, ARG339), ligação carbono-hidrogênio (THR218) e interações pi-pi T-shaped (PHE273, HIS343). Os resíduos de aminoácidos que interagem com o A398 estão localizados principalmente na região do sensor de voltagem nos segmentos S1-S3, indicando que o A398 pode agir como um ligante que impeça a abertura do canal (Toplak *et al.*, 2021; Whicher; MacKinnon, 2016).

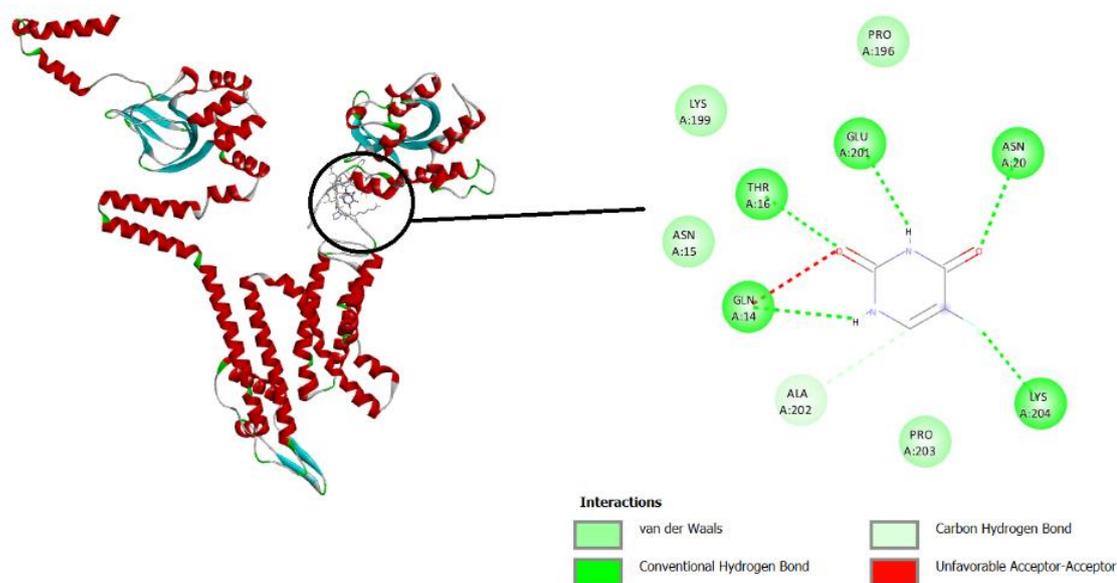
Para o 5-FU, os valores de energia de ligação foram negativos para os 10 complexos e variaram de -4,05 kcal/mol a -3,68 kcal/mol, indicando uma afinidade ente estas duas moléculas, resultando em complexos proteína-ligante estáveis. Os valores para as constantes de inibição (K_i) variaram de 1.070,00 μm a 1.990,00 μm . Os valores de cada complexo podem ser visualizados na tabela 8.

Tabela 8. Resultado do *docking* molecular para o canal Kv10.1 com o composto 5-FU.

COMPLEXO	ENERGIA DE LIGAÇÃO (Kcal/mol)	CONSTANTE DE INIBIÇÃO- Ki (µm)
1	-3,69	1.980,00
2	-3,68	1.990,00
3	-3,69	1.980,00
4	-3,80	1.650,00
5	-3,88	1.430,00
6	-4,00	1.160,00
7	-4,05	1.070,00
8	-3,77	1.720,00
9	-4,00	1.170,00
10	-3,82	1.590,00

Ensaio de *docking*, ou ancoragem, realizada no *software* *AutoDock tool*.

O complexo que apresentou menor energia de ligação (-4,05 Kcal/mol) com o composto 5-FU foi selecionado para análise visual das interações intermoleculares, sendo neste caso o complexo 7 (Figura 28).

Figura 28. Diagrama 2D das interações entre a Kv_v10.1 e o 5-FU

Interações moleculares geradas no *Discovery Studio* entre o Kv_v10.1 e o 5-FU.

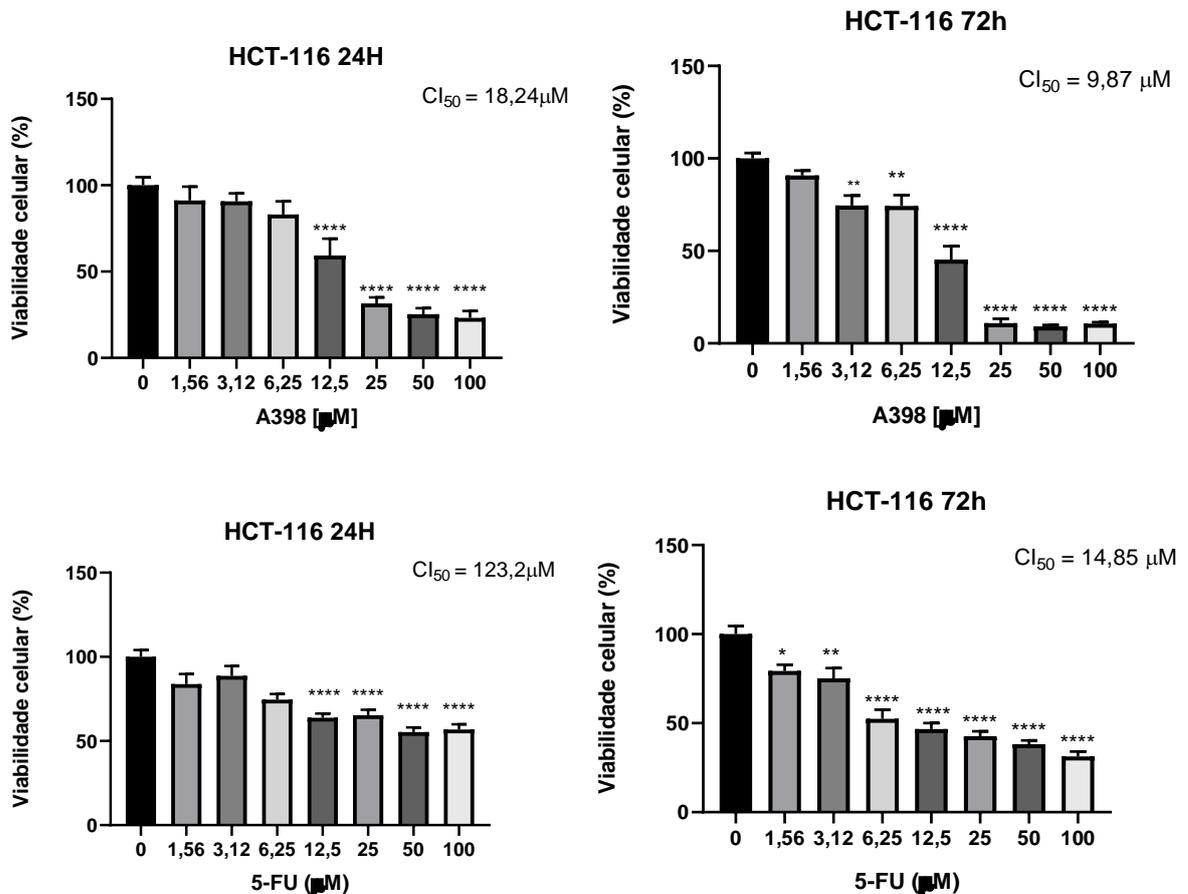
No total 1 aminoácidos interagiu com o ligante, formando as seguintes interações: ligação convencional de hidrogênio (GLN14, THR16, ASN20, GLU201, LYS204), interações de van der Waals (ASN15, PRO196, LYS199, PRO203), ligação carbono-hidrogênio (ALA202) e interação desfavorável. Diante disso, não houve nenhuma interação comum às duas moléculas estudadas. A partir dos resultados do *docking*, é possível concluir que para utilizar o K_v10.1 como alvo molecular, o 5-FU que já é utilizado na clínica não seria a melhor abordagem, pois há uma interação bem inferior quando comparada com a interação provocada pelo A398.

5.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO A398

A partir dos resultados da bioinformática, foi também objetivo do nosso trabalho avaliar se *in vitro* o A398 teria um desempenho melhor que o 5-FU. A análise da viabilidade celular pelo ensaio de MTT avaliou a citotoxicidade dos compostos na linhagem celular HCT-116, referente ao câncer colorretal. O tratamento das células foi realizado nos períodos de 24h e 72h com o A398 (molécula estudada pelo nosso grupo), e uma droga utilizada na clínica, o 5-Fluouracil (5-FU). Em 24h de tratamento com o A398, a inibição da viabilidade celular na concentração de 25 μ M foi de 68,39% e na concentração de 12,5 μ M a inibição foi 40,71%. A CI_{50} é de 18,24 μ M no menor tempo de tratamento. Já em 72h de tratamento, a inibição da viabilidade de 54,64% das células ocorreu na concentração de 12,5 μ M, demonstrando uma CI_{50} equivalente a 9,87 μ M. Esses resultados demonstram que para esta linhagem, a ação do A398 depende tanto da concentração, como do tempo de tratamento.

Já o 5-FU, por sua vez, não conseguiu inibir 50% da viabilidade das células em nenhuma concentração testada no tempo de 24h. Por outro lado, quando esse composto foi exposto por 72h, demonstrou uma inibição de 53,29% já na concentração de 12,5 μ M, e obteve uma CI_{50} de 14,85 μ M, indicando que a atividade do 5-FU é dependente do tempo e da concentração, mas é necessário sempre um maior tempo de tratamento. Os resultados estão sumarizados na Figura 29 e na Tabela 9.

Figura 29. Viabilidade celular de HCT-116 exposta a A398 e 5-FU em 24 e 72 horas



Fonte: Autor (2024). Os gráficos apresentam a porcentagem da viabilidade celular (eixo y) pela concentração das drogas que foram testadas (eixo x), que parte do controle (0 μM) até a concentração máxima do ensaio (100 μM).

Os resultados foram obtidos no *software* GraphPad Prism 8 na tabela de coluna, e os dados estatísticos com a tabela XY submetidos ao teste “Ordinary one-way ANOVA” corrigido pelo teste de Bonferroni. **** $p < 0.0001$.

O composto A398 é uma molécula derivada da podofilotoxina, um produto natural cicloglicano isolada de diversas espécies da família *Podophyllum*. A podofilotoxina tem propriedades micotóxicas, neurotóxicas, inseticida, antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidativas, analgésicas e outras, mas sua alta citotoxicidade e baixa seletividade impediu que tratamentos anticâncer fossem continuados por sua alta taxa de efeitos adversos gastrointestinais e neurotoxicidade (Shah *et al.*, 2021). No estudo de Silveira *et al.* (2014) com as linhagens tumorais HL-60, MOLT-4, HT-29, HepG2 e não tumorais FGH, IEC-6 e PBMC, o A398 demonstrou alta citotoxicidade dentre as linhagens celulares tumorais e baixa citotoxicidade com as linhagens não tumorais. Da mesma maneira, Silva (2020) obteve resultados similares com o ensaio de MTT nas linhagens 4T1, HeLa (ambas tumorais) e L929

(não tumoral), onde a citotoxicidade em L929 foi significativamente inferior quando em comparação às linhagens tumorais. Aqui, somamos a estes dados demonstrando que para os testes *in vitro* com o A398 esta pode ser uma molécula promissora no tratamento de CCR principalmente em comparação com o 5-FU que já é utilizado na clínica e normalmente tem que ser associado a outras drogas, como mostrou o estudo de Biller e Schrag (2021).

Tabela 9. Comparação das CI_{50} em HCT-116 nos dois tratamentos

COMPOSTO	CI_{50} 24h	CI_{50} 72h
A398	18,24 μ M	9,87 μ M
5-FU	123,2 μ M	14,85 μ M

Os valores da CI_{50} foram representados pela média e desvio padrão (SD) de três experimentos independentes.

O uso de anticorpos TRAIL (“*Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis-Inducing Ligand*”; “Ligante Indutor de Apoptose Relacionado ao Fator de Necrose Tumoral”) para atingir o $K_v10.1$ como alvo farmacológico e induzir a apoptose as células em cultivo foi abordado no estudo de Hartung e Pardo (2016), ligando-se na porção extracelular do poro do canal. Nesta estratégia, o aumento de células em apoptose foi maior quando em associação aos tratamentos com outras drogas, como doxorubicina e roscovitina em concentrações abaixo de 20 μ M. A doxorubicina também demonstrou aumentar os receptores TRAIL e diminuir a expressão do $K_v10.1$ nos períodos de 24h e 48h, o que indica que o canal tem potencial farmacológico. Hernández-Reséndiz *et al.* (2020) sugeriram que o $K_v10.1$ está relacionado com a atividade mitocondrial, visto que a inibição do canal resultou em fragmentação da mitocôndria, aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e aumento de autofagia, e as células com superexpressão do canal estavam mais sensíveis a inibidores mitocondriais.

O estudo pioneiro de Silveira *et al.* (2014), por sua vez, mostrou que o A398 despolariza a membrana mitocondrial de maneira dependente de concentração e tempo de exposição. Além disso, o A398 inibiu a atuação da proteína anti-apoptótica Bcl-2, promoveu a ativação das caspases 8, 9 e 3, e ainda aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio (embora o aumento de ROS não tenha sido significativo para a indução de apoptose no estudo) em células de leucemia HL-60. Os resultados de Silveira *et al.* (2014) mostram que o A398 está relacionado aos mecanismos de apoptose intrínsecos e extrínsecos.

Não é possível afirmar somente por este ensaio, no entanto, que o melhor desempenho do A398 está relacionado com o K_v10.1, pois para isto teria de haver mais ensaios avaliando o mecanismo celular do composto nestas células, mas é possível ratificar a potencialidade que o composto demonstra, bem como a susceptibilidade do canal como alvo molecular para tratamento no CCR. Com isso, é interessante aprofundar nos mecanismos de interação do A398 com o K_v10.1, como ensaios de *patch-clamp*, a fim de avaliar o efeito do composto diretamente no canal para ratificar a possível interação entre a ativação dos mecanismos de morte celular com a presença do canal, visto que os ensaios *in silico* mostraram uma interação potencial entre a porção do sensor de voltagem da proteína e o A398.

6 CONCLUSÃO

Diante do exposto, é possível concluir que a expressão do canal Kv10.1 está correlacionada a fatores clínico-patológicos como idade, localização do tumor, tamanho do tumor e grau TNM na amostra dos pacientes do Hospital Napoleão Laureano na Paraíba, . Além disso, foi possível apresentar as interações entre os compostos A398 e 5-FU *in silico* com o canal Kv10.1 e *in vitro* em linhagens de câncer colorretal.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, José Ricardo Chamhum de. Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [s. l.], v. 53, p. 305-316, 2018. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/download/1798/1080/13332>. Acesso em: 25 dez. 2023.
- ANDERSON, K.; CORMIER, R.; SCOTT, P. Role of ion channels in gastrointestinal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], 2019. Disponível em: 10.3748/wjg.v25.i38.5732. Acesso em: 10 jan. 2024.
- AUGUSTO, Lucas Barros Xavier. Impacto da introdução da colonoscopia no SUS sobre a mortalidade por cânceres colorretais. **Brazilian Journal of Health Review**, [s. l.], v. 5, p. 3365-3381, 2022. DOI 10.34119/bjhrv5n1-297. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/44337/pdf>. Acesso em: 20 dez. 2023.
- BACHMANN, Magdalena *et al.* Voltage-Gated Potassium Channels as Regulators of Cell Death. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], p. 1-17, 2020. Disponível em: 10.3389/fcell.2020.611853. Acesso em: 30 jan. 2024.
- BARROS, Francisco *et al.* The EAG Voltage-Dependent K⁺ Channel Subfamily : Similarities and Differences in Structural Organization and Gating. **Front. Pharmacol.**, [s. l.], p. 1-19, 2020. Disponível em: 10.3389/fphar.2020.00411 EAG. Acesso em: 14 nov. 2023.
- BATISTA, Delma Riane Rebouças; MATTOS, Magda de; SILVA, Samara Frizzeira da. CONVIVENDO COM O CÂNCER: DO DIAGNÓSTICO AO TRATAMENTO. **Revista de Enfermagem da UFSM**, [s. l.], 2015. DOI 10.5902/2179769215709. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/reufsm/article/view/15709/pdf>. Acesso em: 28 jul. 2023.
- BILLER, Leah H.; SCHRAG, Deborah. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: A review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 325, n. 7, p. 669-685, 2021. Disponível em: 10.1001/jama.2021.0106. Acesso em: 30 dez. 2023.
- BITENCOURT, Gislayne de Araujo *et al.* **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 29**: Avaliação de diferentes métodos para extração de RNA total de folhas e raízes de braquiária. 1. ed. Embrapa Gado de Corte Campo Grande, MS: [s. n.], 2011. 22 p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/920024/1/BP29.pdf>. Acesso em: 26 jun. 2023.
- BOTELHO, M. C.; TEIXEIRA, J. P.; OLIVEIRA, P. A. Carcinogenesis. **Encyclopedia of Toxicology**, [s. l.], v. 1, p. 713-729, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00371-7>. Acesso em: 5 dez. 2023.
- BUSTAMANTE-LOPEZ, L. A. *et al.* 2019. Existe diferença entre o câncer do cólon direito versus o esquerdo? A localização faz alguma diferença no seguimento em longo prazo? **ABCD Arq Bras Cir Dig**, 32(4), e1479. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abcd/a/zvtKYcN89fLYpSmbxLqVXkN/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 11 dez. 2023.
- CALIFF, Robert M. Biomarker definitions and their applications. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], p. 213–221, 2018. Disponível em: 10.1177/1535370217750088. Acesso em: 29 dez. 2023.
- CAO, Yiqi *et al.* Digital PCR as an Emerging Tool for Monitoring of Microbial Biodegradation. **Molecules**, [s. l.], 2020. DOI :10.3390/molecules25030706. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/3/706>. Acesso em: 28 jul. 2023.
- Campos-da-Paz, M., Dórea, J. G., Galdino, A. S., Lacava, Z. G. M., & de Fatima Menezes Almeida Santos, M. (2018). Carcinoembryonic Antigen (CEA) and Hepatic Metastasis in Colorectal Cancer:

Update on Biomarker for Clinical and Biotechnological Approaches. **Recent Patents on Biotechnology**, 12(4), 269–279. DOI: 10.2174/1872208312666180731104244

CARVALHO, Adriana C.; LEAL, Frederico; SASSE, Andre Deeke. Cost-effectiveness of cetuximab and panitumumab for chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 1-11, 2017. Disponível em: 10.1371/journal.pone.0175409. Acesso em: 30 dez. 2023.

CHÁVEZ-LÓPEZ , María de Guadalupe *et al.* Eag1 Gene and Protein Expression in Human Retinoblastoma Tumors and Its Regulation by pRb in HeLa Cells. **Genes**, [s. l.], 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/genes11020119>. Acesso em: 23 fev. 2024.

CÁZARES-ORDOÑEZ, V.; PARDO, L. A. Kv10.1 potassium channel: From the brain to the tumors. **Biochemistry and Cell Biology**, [s. l.], v. 95, p. 531-536, 2017. Disponível em: 10.1139/bcb-2017-0062. Acesso em: 23 fev. 2024.

COMPARATIVA, Tutorial – Modelagem. UFMG, Minas Gerais, 2018. Disponível em: http://www.biodados.icb.ufmg.br/pinguim/stuff/Tutorial_Modelagem.pdf. Acesso em: 19 mar. 2024.

COSTA, Kauê Santana da; GALÚCIO, João Marcos Pereira; SILVA, José Rogério de Araújo. MÉTODOS DE PREDIÇÃO POR HOMOLOGIA. In: SANTANA, Kauê; NAHUM, Cláudio. **Métodos de modelagem da estrutura tridimensional de proteínas: um guia teórico e prático**. [S. l.: s. n.], 2022. p. 7-15. Disponível em: <https://doi.org/10.22533/at.ed.825222810>. Acesso em: 4 abr. 2024.

DING, Xiang-Wu *et al.* Aberrant expression of Eag1 potassium channels in gastric cancer patients and cell lines. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 24, p. 345-350, 2007. Disponível em: 10.1007/s12032-007-0015-y. Acesso em: 26 fev. 2024.

FIGUEIREDO, Carmem Gabriela; RODRIGUES, Claudenice; MARTINS, Gláucia Veríssimo Faheina. (2019). CANAIS IÔNICOS COMO ALVO FARMACOLÓGICO PARA TERAPIA DO CÂNCER COLORRETAL, capítulo 7, p. 135-153. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/332119077>.

FIGUEIREDO, Cláudia Roberta L. V. O intrigante paradoxo da inflamação associada ao câncer: uma atualização. **J Bras Patol Med Lab**, [s. l.], p. 321-332, 2019. DOI 10.5935/1676-2444.20190029. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpml/a/VMYQKJvBcZtVNBGXMRmMs/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 5 dez. 2023.

GALLOIS, Claire *et al.* Colorectal Cancer : Why Does Side Matter ?. **Drugs**, [s. l.], v. 78, p. 789-798, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0921-7>. Acesso em: 12 dez. 2023.

GAO, Shan *et al.* The mechanism study of Eag1 potassium channel in gastric cancer. **Translational Cancer Research**, [s. l.], 2022. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.21037/tcr-22-2276>. Acesso em: 23 fev. 2024.

GONÇALVES, Juan Carlos Ramos; SOBRAL, Marianna Vieira. **Cultivo de Células: da teoria à bancada**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <http://www.editora.ufpb.br/sistema/press5/index.php/UFPB/catalog/download/669/839/7054-1?inline=1>. Acesso em: 14 jun. 2023.

GOULD, Harry J; PAUL, Dennis. Cancer as a Channelopathy—Appreciation of Complimentary Pathways Provides a Different Perspective for Developing Treatments. **Cancers**, [s. l.], 2022. DOI 10.3390/cancers14194627. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/19/4627>. Acesso em: 30 jan. 2024.

GREEN, Michael R.; SAMBROOK, Joseph. Synthesis of cDNA Probes from mRNA Using Random Oligonucleotide Primers. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, [s. l.], p. 577-581, 2019. Disponível em: <http://cshprotocols.cshlp.org/>. Acesso em: 17 jul. 2023.

HAN, Bo *et al.* Eag1 K⁺ Channel: Endogenous Regulation and Functions in Nervous System. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2017/7371010>. Acesso em: 23 fev. 2024.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, p. 646-674, 2011. DOI 10.1016/j.cell.2011.02.013. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S00928674\(11\)001279?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867411001279%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S00928674(11)001279?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867411001279%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 5 dez. 2023.

HARTUNG, Franziska; PARDO, Luis A. Guiding TRAIL to cancer cells through Kv10.1 potassium channel overcomes resistance to doxorubicin. **European Biophysics Journal**, [s. l.], 2016. Disponível em: 10.1007/s00249-016-1149-7. Acesso em: 10 abr. 2024.

HEMMERLEIN, Bernhard *et al.* Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. **Mol. Cancer**, [s. l.], p. 310-327, 2006. DOI 10.1186/1476-4598-5-41. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17022810/>. Acesso em: 23 fev. 2024.

HERNÁNDEZ-RESÉNDIZ, Ileana; PACHEU-GRAU, David; SÁNCHEZ, Araceli; PARDO, Luis A. Inhibition of Kv10.1 Channels Sensitizes Mitochondria of Cancer Cells to Antimetabolic Agents. **Cancers**, [s. l.], 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/4/920>. Acesso em: 10 abr. 2024.

HOLZMANN, Klaus; SUTTERLÜTY, Hedwig. Signal Transduction as an Assimilation of Signals with Different Origins and Different Intracellular States. **Int. J. Mol. Sci**, [s. l.], p. 1-3, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10299158/pdf/ijms-24-10085.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2024.

IBELLI, Adriana Mércia Guaratini *et al.* Extração de RNA. In: GOUVEIA, J. J. de S.; REGITANO, L. C. de A. **Protocolos em biologia molecular aplicada à produção animal**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste: [s. n.], 2007. cap. 3, p. 9-11. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPPSE/17537/1/PROCILCAR2007.00416.pdf>. Acesso em: 26 jun. 2023.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). (2023). Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA.

KAPLAN, W. D.; TROUT, W.E. The behavior of four neurological mutants of *Drosophila*. **Genetics**. Fev;61(2):399-409, 1969. doi: 10.1093/genetics/61.2.399. PMID: 5807804; PMCID: PMC1212165.

KATER, Fabio. Tratamento do câncer de cólon e de reto alto. **Instituto Vencer o Câncer**, [s. l.], 2022. Disponível em: <https://vencerocancer.org.br/tipos-de-cancer/cancer-colorretal-o-que-e/cancer-colorretal-tratamento/>. Acesso em: 29 dez. 2023.

KASI, Pashtoon Murtaza *et al.* Rising Proportion of Young Individuals With Rectal and Colon Cancer. **Clinical Colorectal Cancer and Other Gastrointestinal Malignancies**, [s. l.], v. 18, ed. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2018.10.002>. Acesso em: 21 mar. 2024.

KIM, Dorothy M.; NIMIGEAN, Crina M. Voltage-Gated Potassium Channels: A Structural Examination of Selectivity and Gating. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, [s. l.], 2016. DOI 10.1101/cshperspect.a029231. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4852806/pdf/cshperspect-ION-a029231.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2024.

KUANG, Qie; PURHONEN, Pasi; HEBERT, Hans. Structure of potassium channels. **Cell. Mol. Life Sci**, [s. l.], 2015. DOI 10.1007/s00018-015-1948-5. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4565861/pdf/18_2015_Article_1948.pdf. Acesso em: 30 jan. 2024.

KUMAR, Priti; NAGARAJAN, Arvindhan; UCHIL, Pradeep D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harb Protoc**, [s. l.], 2018. Disponível em: 10.1101/pdb.prot095505. Acesso em: 10 mar. 2024.

LASTRAIOLI, Elenas; IORIO, Jessica; ARCANGELI, Annarosa. Ion channel expression as promising cancer biomarker. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [s. l.], p. 2685–2702 Contents, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.12.016>. Acesso em: 25 dez. 2023.

LEE, Eva Y H P; MULLER, William J. Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cold Spring Harb Perspect Biol** ., [s. l.], 2010. DOI 10.1101/cshperspect.a003236. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20719876/>. Acesso em: 20 dez. 2023.

LEMES, Dayane Karajá *et al.* CÂNCER COLORRETAL: DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO, UMA REVISÃO. **Revista de Patologia do Tocantins**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 59-64, 2020. DOI 10.20873/uft.2446-6492.2020v7n3p59. Disponível em: <https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/patologia/article/view/6825/17630>. Acesso em: 30 dez. 2023.

LITWACK, Gerald. Nucleic Acids and Molecular Genetics. *In: HUMAN Biochemistry*. [S. l.: s. n.], 2018. cap. 10, p. 257-317. ISBN 978-0-12-383864-3. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780123838643/human-biochemistry#book-description>. Acesso em: 17 jul. 2023.

LIU, G. X.; YU, Y. C.; HE, X. P.; REN, S. N.; FANG, X. D.; LIU, F.; HE, Y. Expression of eag1 channel associated with the aggressive clinicopathological features and subtype of breast câncer. **Int J Clin Exp Pathol**. [s. l.], v. 8, n. 11, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4713635/pdf/ijcep0008-15093.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2024.

LOBO, Fernanda Laraia da Rocha; GIGLIO, Auro del; AGUIAR, Pedro da Costa. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DO CÂNCER COLORRETAL. **Clin Onc Let.**, [s. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4322/col.2019.005>. Acesso em: 4 abr. 2024.

LOOMANS-KROPP, Holli A.; UMAR, Asad. Cancer prevention and screening: the next step in the era of precision medicine. **Precision Oncology**, [s. l.], p. 60-69, 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41698-018-0075-9>. Acesso em: 5 dez. 2023.

LU, Xianmin *et al.* Ion channels and transporters regulate nutrient absorption in health and disease. **J Cell Mol Med**, [s. l.], p. 2631-2642, 2023. DOI 10.1111/jcmm.17853. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10494301/pdf/JCMM-27-2631.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2024.

LUIS, Enoch *et al.* The Kv10.1 Channel: A Promising Target in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, p. 1-20, 2022. Disponível em: 10.3390/ijms23158458. Acesso em: 23 fev. 2024.

MACHERET, Morgane; HALAZONETIS, Thanos D. DNA Replication Stress as a Hallmark of Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, [s. l.], v. 10, p. 425-448, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012414-040424>. Acesso em: 5 dez. 2023.

MAGALHÃES, Washington Luiz Esteves; THÁ, Emanoela Lundgren; LEME, Daniela Morais. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. *In: Embrapa: Comunicato técnico 427*. [S. l.], 2018. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/191253/1/CT-427-1572-final2.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2024.

MAIOR, Alex Souto *et al.* Canais Iônicos de Potássio Associados à Síndrome do QT Longo Adquirido. **Rev Bras Cardio**, [s. l.], 2011. Disponível em:

http://sociedades.cardiol.br/socerj/revista/2011_01/a_2011_v24_n01_05alex.pdf. Acesso em: 30 jan. 2024.

MALLA, Midhun *et al.* Using Circulating Tumor DNA in Colorectal Cancer : Current and Evolving Practices review articles abstract. **J Clin Oncol**, [s. l.], v. 40, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02615>. Acesso em: 27 dez. 2023.

MANN, HB; WHITNEY, DR. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. **Ann. Math. Statist.**, [s. l.], 1947. Disponível em: 10.1214/aoms/1177730491.

MARTINELLI, E. *et al.* Real-world first-line treatment of patients with BRAFV600E-mutant metastatic colorectal cancer: the CAPSTAN CRC study. **ESMO Open**, [s. l.], v. 7, n. 6, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2022.100603>. Acesso em: 30 dez. 2023.

MARTÍNEZ, Ramón *et al.* Analysis of the expression of Kv10.1 potassium channel in patients with brain metastases and glioblastoma multiforme: impact on survival. **BMC Cancer**, [s. l.], 2015. DOI 10.1186/s12885-015-1848-y. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4632660/pdf/12885_2015_Article_1848.pdf. Acesso em: 23 fev. 2024.

MEDEIROS, Mateus Marinho *et al.* Rastreamento E Diagnóstico Precoce De Cancer Colorretal: Revisão Integrativa Tracking and Early Diagnosis of Cancer Colorretal: Integrative Review. **Revista Interdisciplinar em Saúde**, [s. l.], p. 310-327, 2018. Disponível em: 2358-7490. Acesso em: 29 dez. 2023.

MODEST, D. P.; PANT, S.; SARTORE-BIANCHI, A.; . Treatment sequencing in metastatic colorectal cancer. **European Journal of Cancer**, [s. l.], p. 70-83, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.12.019>. Acesso em: 30 jan. 2024.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.

MOVSISYAN, Naira; PARDO, L. A. Kv10.1 Regulates Microtubule Dynamics during Mitosis Naira. **Cancers**, [s. l.], v. 12, p. 1-26, 2020. Disponível em: 10.3390/cancers12092409. Acesso em: 23 fev. 2024.

NGUYEN, Long H.; GOEL, Ajay; CHUNG, Daniel C. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 158, p. 291-302, 2020. Disponível em: doi:10.1053/j.gastro.2019.08.059. Acesso em: 12 dez. 2023.

NYGA, Agata *et al.* The role of RAS oncogenes in controlling epithelial mechanics. **Trends in Cell Biology**, [s. l.], p. 60-69, 2023. DOI 10.1016/j.tcb.2022.09.002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9850021/>. Acesso em: 5 dez. 2023.

PARDO, L. A.; STÜHMER, Walter. The roles of K + channels in cancer. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 14, p. 39-48, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3635>. Acesso em: 26 fev. 2024.

PREVARSKAYA, Natalia; SKRYMA, Roman; SHUBA, Yaroslav. Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies?. **Physiol Rev**, [s. l.], 2018. DOI 10.1152/physrev.00044.2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29412049/>. Acesso em: 30 jan. 2024.

RIIHIMÄKI, Matias *et al.* Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep29765>. Acesso em: 27 dez. 2023.

RODRÍGUEZ-RASGADO, Jesús Adrián; ACUÑA-MACÍAS, Isabel; CAMACHO, Javier. Eag1 Channels as Potential Cancer Biomarkers. **Sensors**, [s. l.], 2012. Disponível em: 10.3390/s120505986. Acesso em: 23 fev. 2024.

SANTARIUS, Thomas *et al.* A census of amplified and overexpressed human cancer genes. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], 2010. DOI 10.1038/nrc2771. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20029424/>. Acesso em: 20 dez. 2023.

SARDINHA, Ana Hélia de Lima; NUNES, Priscila Praseres; ALMEIDA, Joelson dos Santos. Perfil epidemiológico de casos do câncer colorretal em hospital de referência no Maranhão, Brasil. **Mundo da Saúde**, [s. l.], 2021. Disponível em: 10.15343/0104-7809.202145606614. Acesso em: 4 abr. 2024.

SERRANO-NOVILLO, Clara *et al.* Implication of voltage-gated potassium channels in neoplastic cell proliferation. **Cancers**, [s. l.], 2019. Disponível em: 10.3390/cancers11030287. Acesso em: 30 jan. 2024.

SHAH, Reena *et al.* Biomarkers for Early Detection of Colorectal Cancer and Polyps: Systematic Review. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, [s. l.], v. 23(9), 2014. Disponível em: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0412. Acesso em: 14 nov. 2023.

SHAH, Zinnia *et al.* Podophyllotoxin: History, Recent Advances and Future Prospects. **Biomolecules**, [s. l.], v. 11, p. 1-27, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom11040603>. Acesso em: 12 mar. 2024.

SHOAI, Naila *et al.* Factors associated with cycle threshold values (Ct-values) of SARS-CoV2-rRT-PCR. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07360-x>. Acesso em: 5 abr. 2024.

SILVEIRA AL, FAHEINA-MARTINS GV, MAIA RC, ARAÚJO DAM (2014) Compound A398, a Novel Podophyllotoxin Analogue: Cytotoxicity and Induction of Apoptosis in Human Leukemia Cells. **PLoS ONE** 9(9): e107404. doi:10.1371/journal.pone.0107404. Acesso em: 12 mar. 2024.

SIMONETTI, Ana Catarina. Variações dos valores séricos do CEA, bilirrubinas e aminotransferases em indivíduos oncológicos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [s. l.], 2018. DOI 10.21877/2448-3877.201800623. Disponível em: <https://www.rbac.org.br/artigos/variacoes-dos-valores-sericos-do-cea-bilirrubinas-e-aminotransferases-em-individuos-oncologicos/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

SKODA, Ana Marija *et al.* The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. **Bosn J Basic Med Sci.**, [s. l.], p. 8-20, 20 fev. 2018. Disponível em: 10.17305/bjbm.2018.2756. Acesso em: 6 dez. 2023.

SOARES, Neidelênio Baltazar *et al.* ESTUDO DE PROTEÍNAS E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PELO GRÁFICO RAMANCHANDRAN. **Uma breve introdução à simulação computacional aplicada à química**, [s. l.], p. 60-72, 2023. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/374025791_ESTUDO_DE_PROTEINAS_E_AVALIACAO_DA_QUALIDADE_PELO_GRAFICO_RAMANCHANDRAN. Acesso em: 4 abr. 2024.

SOUZA, Gleim Dias de. MÉTODOS DE IMAGEM NO ESTADIAMENTO PRÉ E PÓS OPERATÓRIOS DO CÂNCER COLORRETAL. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, [s. l.], v. 31, 2018. Disponível em: 10.1590/0102-672020180001e1371 Artigo. Acesso em: 25 dez. 2023.

SOUZA, Waldemir Fernandes de *et al.* Sinalização celular em câncer. **Ciência e Cultura**, [s. l.], v. 66, n. 1, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252014000100013>. Acesso em: 6 dez. 2023.

STEPANENKO, A.A.; DMITRENKO, V.V. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. **Gene**, [s. l.], 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.05.065>. Acesso em: 5 abr. 2024.

SULLIVAN, Brian A.; NOUJAIM, Michael; ROPER, Jatin. Cause, Epidemiology, and Histology of Polyps and Pathways to Colorectal Cancer. **Gastrointest Endosc Clin N Am.**, [s. l.], v. 32, p. 177-194, 2022. DOI 10.1016/j.giec.2021.12.001. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9924026/pdf/nihms-1864616.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2023.

TEISSEYRE, Andrzej *et al.* Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.3 as a Target in Therapy of Cancer. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], p. 1-16, 2019. Disponível em: doi: 10.3389/fonc.2019.00933 Voltage-Gated. Acesso em: 13 nov. 2023.

TEIXEIRA , Ana Kátia S.; VASCONCELOS, Juliana Lúcia A. Perfil histopatológico de pacientes com diagnóstico de tumores malignos assistidos em um hospital de referência do Agreste Pernambucano. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, [s. l.], v. 55, ed. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20190002>. Acesso em: 21 mar. 2024.

TIAN, JIYUAN *et al.* Fundamentals of Bowel Cancer for Biomedical Engineers. **Annals of Biomedical Engineering**, [s. l.], v. 51, p. 679–701, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10439-023-03155-8>. Acesso em: 27 dez. 2023.

TOPLAK, Zan. Overcoming challenges of HERG potassium channel liability through rational design : Eag1 inhibitors for cancer treatment. **Medicinal Research Reviews** , [s. l.], p. 183-226, 2021. Disponível em: 10.1002/med.21808. Acesso em: 26 fev. 2024.

URREGO, Diana *et al.* Periodic expression of Kv10.1 driven by pRb/E2F1 contributes to G2/M progression of cancer and non-transformed cells. **CELL CYCLE**, [s. l.], p. 799–811, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2016.1138187>. Acesso em: 23 fev. 2024.

VOLK, Neil; LACY, Brian. Anatomy and Physiology of the Small Bowel. **Gastrointest Endoscopy Clin N Am**, [s. l.], p. 1-13, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.giec.2016.08.001>. Acesso em: 11 dez. 2023.

WALDSTEIN, Sasha *et al.* Impact of Colorectal Cancer Sidedness and Location on Therapy and Clinical Outcomes : Role of Blood-Based Biopsy for Personalized Treatment. **J. Pers. Med**, [s. l.], v. 13, ed. 1114, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jpm13071114>. Acesso em: 27 dez. 2023.

WHICHER, Jonathan R.; MACKINNON, Roderick. Structure of the voltage-gated K⁺ channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism. **Science**, [s. l.], v. 12, n. 353, 2016. Disponível em: doi:10.1126/science.aaf8070. Acesso em: 4 abr. 2024.

WOZNIAK, Slawomir *et al.* The large intestine from fetal period to adulthood and its impact on the course of colonoscopy. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, [s. l.], v. 224, p. 17-22, 23 mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2019.02.004>. Acesso em: 11 dez. 2023.

XIA, Cong *et al.* Potassium channels, tumorigenesis and targeted drugs. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332223004614?via%3Dihub>. Acesso em: 30 jan. 2024.

Yirgin, H.; Sibiç, O.; Tatlıdil, Y. E.; Bozdağ, E.; Bozkurt, M. A.; Devecioğlu, E. G.; Aziret, M.,; Ercan, M. Effect of tumor size on prognosis in colorectal cancer. **Annali italiani di chirurgia**, 94, 63–72, 2023.

ZHANG, Yue *et al.* Methods and biomarkers for early detection, prediction, and diagnosis of colorectal cancer. **Biomed Pharmacother** ., [s. l.], 2023. DOI 10.1016/j.biopha.2023.114786. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37119736/>. Acesso em: 10 jan. 2024.

ZUÑIGA, Leandro. Potassium Channels as a Target for Cancer Therapy: Current Perspectives. **Oncotargets and Therapy** , [s. l.], p. 783–797, 20 jul. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9309325/pdf/ott-15-783.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2024.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar como voluntário (a) no estudo “**PROSPECÇÃO DE NOVOS MARCADORES DIAGNÓSTICOS PARA O CÂNCER COLORRETAL E CONTRIBUIÇÃO NA PREVENÇÃO DA MORTALIDADE POR ESTA DOENÇA NO SUS**”, coordenado pela professora Dra. Glauca Veríssimo Faheina Martins e vinculado a UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE do CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE da UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE.

Sua participação é voluntária e você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade. Este estudo tem por objetivo coletar um pequeno fragmento de tecido que será retirado durante a cirurgia para identificação de marcadores moleculares tumorais que auxiliarão em diagnósticos mais rápidos e precisos, bem como a descoberta de novos tratamentos para câncer colorretal. Seu material ficará armazenado provisoriamente por tempo determinado apenas para realização dos ensaios propostos por esta pesquisa no Laboratório de Ensaios Toxicológicos e Genética do Câncer-TOXGEN da Universidade Federal de Campina Grande e se faz necessário porque o câncer colorretal tem grande incidência no Brasil e no mundo e apesar de existirem quimioterápicos efetivos, eles são muito tóxicos e não tem ação em alguns tumores, pois as células dos tumores se tornaram resistentes. Além disso, o diagnóstico inicial desta patologia está diretamente relacionado a grandes taxas de sobrevivência ao tratamento. A descoberta de novos alvos farmacológicos para esta patologia, como os canais iônicos Kv, que já são alvos farmacológicos para outras doenças, pode proporcionar a descoberta de novas terapias, bem como, diagnósticos moleculares diferenciais.

Caso decida aceitar o convite, você será submetido (a) ao(s) seguinte(s) procedimentos: Após a remoção de seu tecido durante a cirurgia, conforme já estava previsto pelo seu médico, vamos precisar de sua autorização para armazenar o tecido e possivelmente coletar uma amostra de qualquer outro material biológico conforme seu médico achar necessário. Os riscos envolvidos com sua participação são os mesmos já previstos no procedimento cirúrgico que já estava prescrito pelo seu médico, pois o mesmo ocorreria independente deste projeto, estamos apenas solicitando sua permissão para armazenar e utilizar parte deste material. Esse estudo tem o intuito de descobrir novos diagnósticos e tratamentos, com a sua participação sendo totalmente voluntária, podendo desistir a qualquer momento, sem penalidades, danos e prejuízos. Quanto aos riscos adicionais referentes ao constrangimento na abordagem, coleta de material ou vazamentos de informações de dados coletados, estes são possíveis, mas pretendemos minimizá-los, pois o projeto não visa constranger, inibir, desrespeitar, afrontar, mas sim contribuir com os novos diagnósticos e tratamento do câncer colorretal. Os pesquisadores se propõem a realizar identificação numérica das amostras evitando exposição de dados dos pacientes no manuseio das amostras em laboratório. Os benefícios da pesquisa serão: Os pacientes que cederão as amostras para o presente estudo receberão orientações sobre o que é o câncer colorretal, métodos de rastreamento e fatores de risco. Os participantes da pesquisa poderão contribuir para o desenvolvimento de testes diagnósticos mais eficientes e desenvolvimento de novos tratamentos. Os participantes não terão benefício pessoal direto através deste projeto, sendo sua participação voluntária e não-remunerada.

Todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de maneira que não permita a identificação de nenhum voluntário.

Se você tiver algum gasto decorrente de sua participação na pesquisa, você será ressarcido, caso solicite. Em qualquer momento, se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você poderá buscar o direito de ser indenizado.

Esta pesquisa atende às exigências das resoluções 466/2012 e 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), as quais estabelecem diretrizes e normas regulamentadoras para pesquisas envolvendo seres humanos.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Formação de Professores (CFP) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) é um colegiado interdisciplinar e independente de caráter consultivo, deliberativo e educativo, que tem como foco central defender os interesses e a integridade dos participantes voluntários de pesquisas envolvendo seres humanos e, conseqüentemente, contribuir para o desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Você ficará com uma via rubricada e assinada deste termo e qualquer dúvida a respeito desta pesquisa, poderá ser requisitada a Profa. Dra. Glaucia Veríssimo Faheina Martins, ou ao Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos - CEP/CFP/UFCG, cujos dados para contato estão especificados abaixo.

Dados para contato com o responsável pela pesquisa

Nome: Glaucia Veríssimo Faheina Martins

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

Endereço Pessoal: Rua: Elvira Cecília dos Santos, 190, Planalto das mansões, Cuité-PB.

Endereço Profissional: Sítio Olho D'água da Bica, bloco dos Professores, sala F19, térreo – Centro de Educação e Saúde (CES), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus Cuité.

Horário disponível: 8:00-12:00 E DE 14:00-18:00

Telefone: 3372-1900

Email: glaucia.verissimo@professor.ufcg.edu.br

Dados do CEP

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Formação de Professores da Universidade Federal de Campina Grande- CEP/CFP/UFCG, situado a rua Sergio Moreira de Figueiredo, s/n, Bairro: Casas Populares, Cajazeiras - PB; CEP: 58.900-000.

Email: cepcfufcgcz@gmail.com

Tel: (83) 3532-2075

Declaro que estou ciente dos objetivos e da importância desta pesquisa, bem como a forma como esta será conduzida, incluindo os riscos e benefícios relacionados com a minha participação, e concordo em participar voluntariamente deste estudo.

LOCAL E DATA

Assinatura ou impressão datiloscópica do voluntário ou responsável legal

Nome e assinatura do responsável pelo estudo

APÊNDICE B – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

PROJETO: “PROSPECÇÃO DE NOVOS MARCADORES DIAGNÓSTICOS PARA O CÂNCER COLORRETAL E CONTRIBUIÇÃO NA PREVENÇÃO DA MORTALIDADE POR ESTA DOENÇA NO SUS”

Pesquisadora responsável: Prof.^a Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins

1. Data da cirurgia: ____ / ____ / _____
2. Nome do paciente: _____
3. CAD: _____
4. Numeração da amostra (PAC): _____
5. Sexo do paciente: F () M ()
6. Idade do paciente: _____
7. Localização do tumor:
 - Reto () - cólon esquerdo () - cólon transverso () - cólon direito ()
8. Diferenciação do tumor:
 - Alta () - moderada () - baixa () - não-diferenciado ()
9. Tamanho do tumor (cm)
 - maior que 5 cm () – menor que 5 cm ()
10. Metástase para órgãos linfáticos
 - Sim () - Não ()
11. Metástase para outros órgãos:
 - Sim () - Não ()

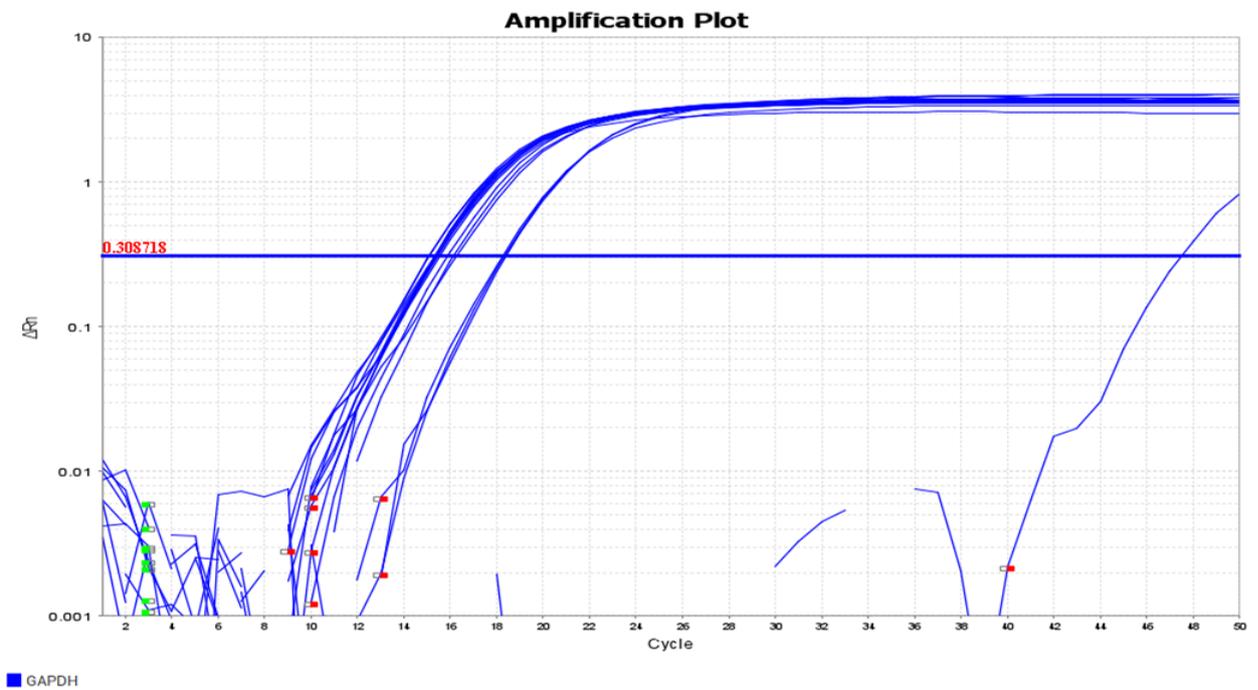
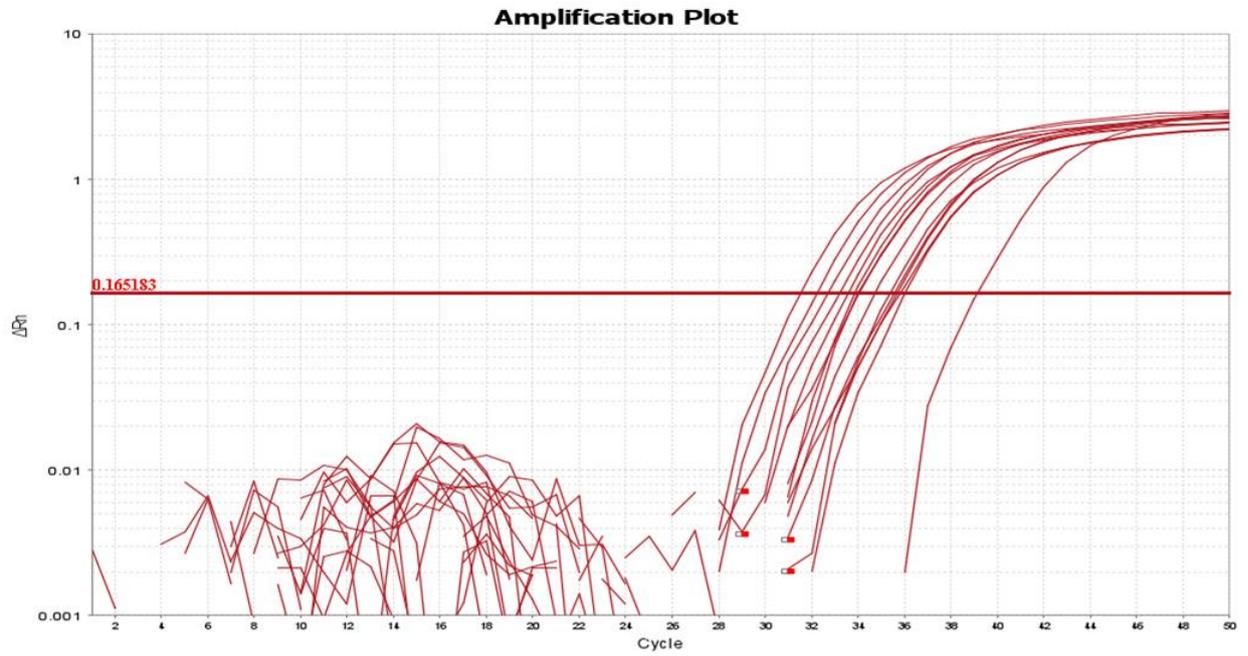
Médico responsável pela coleta de dados

APÊNDICE C – QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE RNA E cDNA

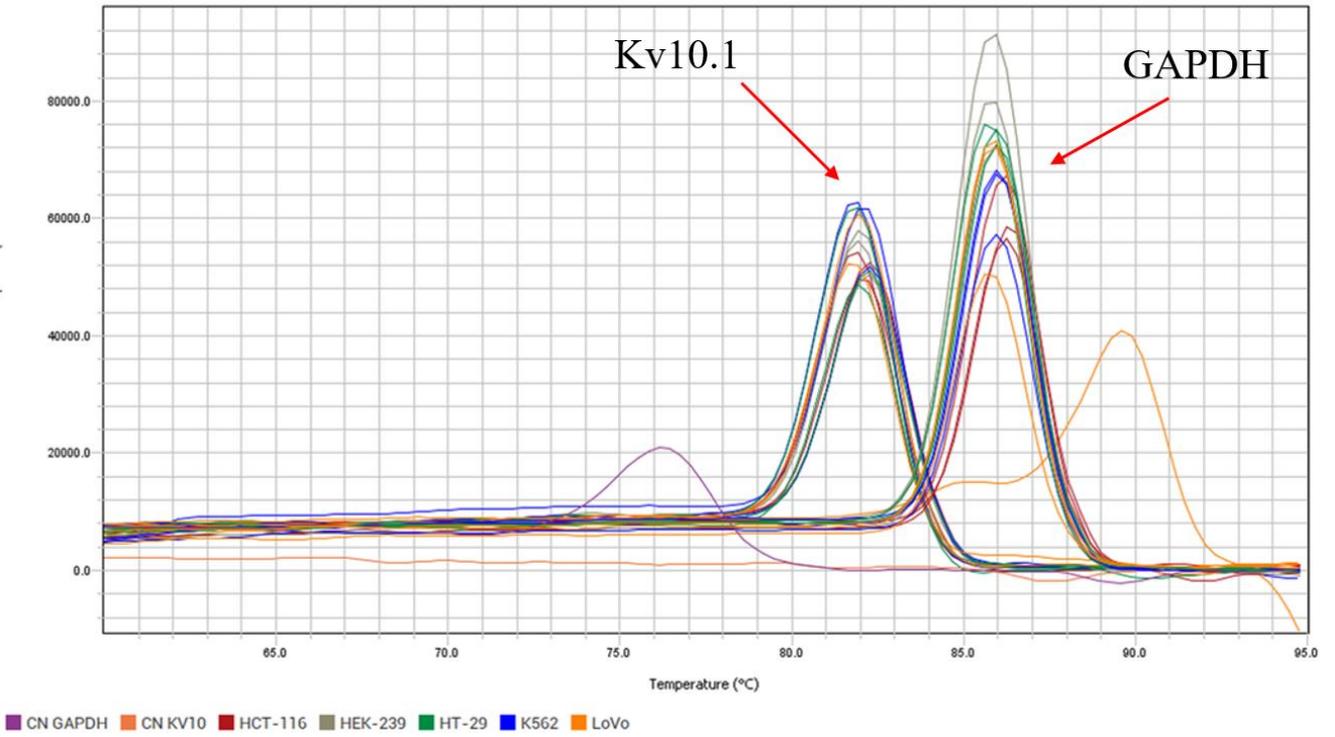
RNA										RNA										
Data da extração	Tipo de Amostra	Ac. Nucleico	Linhagem Celular/PAC	Quantificação (ug/ul.)	260/280	260/230	Data da extração	Tipo de Amostra	Ac. Nucleico	Linhagem Celular/PAC	Quantificação (ug/ul.)	260/280	260/230	Data da extração	Tipo de Amostra	Ac. Nucleico	Linhagem Celular/PAC	Quantificação (ug/ul.)	260/280	260/230
12.05.2022	célula	RNA	K562	3,7749	2,0	1,78	19.04.2023	tumor	RNA	PAC17TD	1,4795	2,03	2,24	19.04.2023	tumor	RNA	PAC17TD	1,4795	2,03	2,24
12.05.2022	célula	RNA	HCT-116	1,863	2,0	1,76	19.04.2023	tumor	RNA	PAC18TS	0,1414	1,87	2,47	19.04.2023	tumor	RNA	PAC18TS	0,1414	1,87	2,47
13.12.2022	célula	RNA	HT-29	3,9329	1,98	1,64	19.04.2023	tumor	RNA	PAC18TD	0,3897	1,97	2,31	19.04.2023	tumor	RNA	PAC18TD	0,3897	1,97	2,31
29.12.2022	célula	RNA	LOVO	0,2494	1,93	1,15	20.04.2023	tumor	RNA	PAC19TS	0,3990	1,97	2,32	20.04.2023	tumor	RNA	PAC19TS	0,3990	1,97	2,32
23.03.2023	célula	RNA	HEK-293 (1)	1,0811	1,99	2,08	20.04.2023	tumor	RNA	PAC19TD	1,8991	2,05	2,30	20.04.2023	tumor	RNA	PAC19TD	1,8991	2,05	2,30
23.03.2023	célula	RNA	HEK-293 (2)	1,03	1,99	2,21	20.04.2023	tumor	RNA	PAC20TS	0,4033	1,97	2,32	20.04.2023	tumor	RNA	PAC20TS	0,4033	1,97	2,32
06.06.2022	tumor	RNA	PAC1TS	2,300	2,02	1,89	20.04.2023	tumor	RNA	PAC20TD	1,1585	2,02	2,27	20.04.2023	tumor	RNA	PAC20TD	1,1585	2,02	2,27
06.06.2022	tumor	RNA	PAC1TD	3,779	1,98	1,68	24.04.2023	tumor	RNA	PAC21TS	0,2687	1,91	2,24	24.04.2023	tumor	RNA	PAC21TS	0,2687	1,91	2,24
06.06.2022	tumor	RNA	PAC2TS	5,957	2,01	1,78	24.04.2023	tumor	RNA	PAC21TD	1,5030	2,03	2,23	24.04.2023	tumor	RNA	PAC21TD	1,5030	2,03	2,23
06.06.2022	tumor	RNA	PAC2TD	2,1673	2,00	1,46	24.04.2023	tumor	RNA	PAC22TS	0,2372	1,92	2,26	24.04.2023	tumor	RNA	PAC22TS	0,2372	1,92	2,26
06.06.2022	tumor	RNA	PAC3TS	0,8706	1,92	1,26	24.04.2023	tumor	RNA	PAC22TD	0,1995	1,94	2,26	24.04.2023	tumor	RNA	PAC22TD	0,1995	1,94	2,26
06.06.2022	tumor	RNA	PAC3TD	0,9728	1,92	1,64	24.04.2023	tumor	RNA	PAC23TS	0,0266	1,85	1,63	24.04.2023	tumor	RNA	PAC23TS	0,0266	1,85	1,63
06.06.2022	tumor	RNA	PAC4TS	2,8394	2,03	1,91	24.04.2023	tumor	RNA	PAC23TD	0,7176	1,99	2,30	24.04.2023	tumor	RNA	PAC23TD	0,7176	1,99	2,30
06.06.2022	tumor	RNA	PAC4TD	15,5346	1,70	1,45	24.04.2023	tumor	RNA	PAC24TS	0,9747	2,00	2,30	24.04.2023	tumor	RNA	PAC24TS	0,9747	2,00	2,30
06.06.2022	tumor	RNA	PAC5TS	1,6027	1,98	1,53	24.04.2023	tumor	RNA	PAC24TD	1,0627	2,03	0,91	24.04.2023	tumor	RNA	PAC24TD	1,0627	2,03	0,91
06.06.2022	tumor	RNA	PAC5TD	14,9229	2,02	1,91	24.04.2023	tumor	RNA	PAC25TS	0,2380	1,94	1,71	24.04.2023	tumor	RNA	PAC25TS	0,2380	1,94	1,71
06.06.2022	tumor	RNA	PAC6TS	1,5832	2,00	1,98	24.04.2023	tumor	RNA	PAC25TD	0,7769	1,99	2,38	24.04.2023	tumor	RNA	PAC25TD	0,7769	1,99	2,38
06.06.2022	tumor	RNA	PAC6TD	19,7525	1,82	1,70	20.04.2023	tumor	RNA	PAC26TS	0,1894	1,96	2,13	20.04.2023	tumor	RNA	PAC26TS	0,1894	1,96	2,13
06.06.2022	tumor	RNA	PAC7TS	1,4121	2,00	1,87	20.04.2023	tumor	RNA	PAC26TD	0,2854	1,94	2,27	20.04.2023	tumor	RNA	PAC26TD	0,2854	1,94	2,27
06.06.2022	tumor	RNA	PAC7TD	4,7249	1,99	1,90	20.04.2023	tumor	RNA	PAC27TS	0,0386	1,78	1,94	20.04.2023	tumor	RNA	PAC27TS	0,0386	1,78	1,94
25.07.2022	tumor	RNA	PAC8TS	0,0167	1,83	1,20	20.04.2023	tumor	RNA	PAC27TD	0,0503	1,83	2,07	20.04.2023	tumor	RNA	PAC27TD	0,0503	1,83	2,07
25.07.2022	tumor	RNA	PAC8TD	0,2389	1,93	1,05	19.04.2023	tumor	RNA	PAC28TS	0,5402	1,97	2,30	19.04.2023	tumor	RNA	PAC28TS	0,5402	1,97	2,30
25.07.2022	tumor	RNA	PAC9TS	0,0007	1,17	0,07	19.04.2023	tumor	RNA	PAC28TD	0,7735	1,99	2,29	19.04.2023	tumor	RNA	PAC28TD	0,7735	1,99	2,29
25.07.2022	tumor	RNA	PAC9TD	0,0036	1,63	0,03	19.04.2023	tumor	RNA	PAC29TS	3,1659	2,04	2,24	19.04.2023	tumor	RNA	PAC29TS	3,1659	2,04	2,24
25.07.2022	tumor	RNA	PAC10TS	0,4524	1,85	0,76	19.04.2023	tumor	RNA	PAC29TD	1,1843	2,01	2,25	19.04.2023	tumor	RNA	PAC29TD	1,1843	2,01	2,25
25.07.2022	tumor	RNA	PAC10TD	0,7728	1,98	1,34	17.04.2023	tumor	RNA	PAC30TS	1,6387	2,03	2,16	17.04.2023	tumor	RNA	PAC30TS	1,6387	2,03	2,16
03.08.2022	tumor	RNA	PAC11TS	0,5382	1,87	1,21	17.04.2023	tumor	RNA	PAC30TD	3,3318	2,05	2,25	17.04.2023	tumor	RNA	PAC30TD	3,3318	2,05	2,25
16.08.2022	tumor	RNA	PAC12TS	1,1931	1,94	1,45	14.04.2023	tumor	RNA	PAC31TS	0,0582	1,84	2,02	14.04.2023	tumor	RNA	PAC31TS	0,0582	1,84	2,02
16.08.2022	tumor	RNA	PAC12TD	1,8319	2,03	1,84	14.04.2023	tumor	RNA	PAC31TD	0,3499	1,97	2,19	14.04.2023	tumor	RNA	PAC31TD	0,3499	1,97	2,19
?	tumor	RNA	PAC13TS	?	?	?	14.04.2023	tumor	RNA	PAC32TS	0,2278	2,04	2,52	14.04.2023	tumor	RNA	PAC32TS	0,2278	2,04	2,52
?	tumor	RNA	PAC13TD	?	?	?	11.05.2023	tumor	RNA	PAC32TD	4,3278	2,05	2,19	11.05.2023	tumor	RNA	PAC32TD	4,3278	2,05	2,19
14.04.2023	tumor	RNA	PAC14TS	0,0803	1,96	2,09	11.05.2023	tumor	RNA	PAC33TS	0,9918	2,04	2,22	11.05.2023	tumor	RNA	PAC33TS	0,9918	2,04	2,22
14.04.2023	tumor	RNA	PAC14TD	0,0276	1,88	2,06	11.05.2023	tumor	RNA	PAC33TD	4,6158	2,06	2,14	11.05.2023	tumor	RNA	PAC33TD	4,6158	2,06	2,14
17.04.2023	tumor	RNA	PAC15TS	0,0206	1,81	2,34	11.05.2023	tumor	RNA	PAC34TD	6,4915	2,06	1,95	11.05.2023	tumor	RNA	PAC34TD	6,4915	2,06	1,95
17.04.2023	tumor	RNA	PAC15TD	0,1422	1,82	2,23	24.05.2023	tumor	RNA	PAC35TS	2,9562	2,09	2,18	24.05.2023	tumor	RNA	PAC35TS	2,9562	2,09	2,18
17.04.2023	tumor	RNA	PAC16TS	0,5884	2,00	2,24	24.05.2023	tumor	RNA	PAC35TD	2,8361	2,06	2,18	24.05.2023	tumor	RNA	PAC35TD	2,8361	2,06	2,18
17.04.2023	tumor	RNA	PAC16TD	0,1849	1,87	2,23	24.05.2023	tumor	RNA	PAC36TS	1,8236	2,07	2,22	24.05.2023	tumor	RNA	PAC36TS	1,8236	2,07	2,22
19.04.2023	tumor	RNA	PAC17TS	0,1596	1,89	2,33	24.05.2023	tumor	RNA	PAC36TD	2,1229	2,02	2,06	24.05.2023	tumor	RNA	PAC36TD	2,1229	2,02	2,06

cDNA													
Data da síntese	Tipo de Amostra	Ác. Nucleico	Linagem Celular/PAC	Quantificação (µg/µL)	260/280	260/230	Data da síntese	Tipo de Amostra	Ác. Nucleico	Linagem Celular/PAC	Quantificação (µg/µL)	260/280	260/230
19.05.2022	célula - RNA	cDNA	K562	1,5629	1,69	1,87	27.04.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC17TD	1,9903	1,70	1,99
19.05.2022	célula - RNA	cDNA	HCT-116	2,833	1,75	2,05	27.04.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC18TS	3,4538	1,73	2,16
26.04.2023	célula - RNA	cDNA	HT-29	1,8831	1,73	2,00	27.04.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC18TD	2,9317	1,74	2,11
26.04.2023	célula - RNA	cDNA	LOVO	1,5168	1,70	1,89	27.04.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC19TS	2,9193	1,73	2,06
26.04.2023	célula - RNA	cDNA	HEK-293 (1)	1,5660	1,76	2,11	27.04.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC19TD	2,6949	1,73	2,08
26.04.2023	célula - RNA	cDNA	HEK-293 (2)	3,7914	1,76	2,16	27.04.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC20TS	1,9192	1,69	2,02
-	tumor - RNA	cDNA	PAC1TS	2,0079	1,65	1,95	27.04.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC20TD	2,3253	1,72	2,06
-	tumor - RNA	cDNA	PAC1TD	5,5797	1,70	2,02	03.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC21TS	2,3465	1,71	2,05
-	tumor - RNA	cDNA	PAC2TS	2,4663	1,68	1,96	03.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC21TD	3,0665	1,75	2,13
-	tumor - RNA	cDNA	PAC2TD	5,4162	1,67	2,01	03.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC22TS	2,1366	1,70	2,04
-	tumor - RNA	cDNA	PAC3TS	2,3240	1,69	1,96	03.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC22TD	2,0820	1,69	2,03
-	tumor - RNA	cDNA	PAC3TD	5,1626	1,73	2,11	03.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC23TS	2,6136	1,72	2,07
-	tumor - RNA	cDNA	PAC4TS	2,4697	1,71	2,02	03.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC23TD	2,4958	1,73	2,09
-	tumor - RNA	cDNA	PAC4TD	5,1807	1,74	2,10	03.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC24TS	2,9483	1,74	2,10
-	tumor - RNA	cDNA	PAC5TS	2,4905	1,71	2,01	03.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC24TD	2,2722	1,73	2,04
-	tumor - RNA	cDNA	PAC5TD	5,1048	1,66	2,03	03.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC25TS	2,7049	1,74	2,10
-	tumor - RNA	cDNA	PAC6TS	2,3092	1,70	2,02	03.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC25TD	3,3371	1,74	2,12
-	tumor - RNA	cDNA	PAC6TD	4,5933	1,73	2,09	03.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC26TS	2,7766	1,73	2,08
-	tumor - RNA	cDNA	PAC7TS	2,4514	1,70	2,04	03.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC26TD	1,7312	1,68	1,98
-	tumor - RNA	cDNA	PAC7TD	4,6891	1,69	2,05	04.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC27TS	2,9356	1,74	2,11
-	tumor - RNA	cDNA	PAC8TS	-	-	-	04.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC27TD	3,3919	1,73	2,17
-	tumor - RNA	cDNA	PAC8TD	-	-	-	04.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC28TS	2,3369	1,69	2,04
-	tumor - RNA	cDNA	PAC9TS	-	-	-	04.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC28TD	2,6416	1,71	2,07
-	tumor - RNA	cDNA	PAC9TD	-	-	-	04.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC29TS	2,3938	1,74	2,11
-	tumor - RNA	cDNA	PAC10TS	-	-	-	04.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC29TD	2,5615	1,73	2,11
-	tumor - RNA	cDNA	PAC10TD	-	-	-	04.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC30TS	3,0079	1,76	2,13
-	tumor - RNA	cDNA	PAC11TS	5,3930	1,65	1,98	04.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC30TD	3,7201	1,78	2,21
-	tumor - RNA	cDNA	PAC11TD	4,7390	1,72	2,08	04.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC31TS	2,5133	1,72	2,10
-	tumor - RNA	cDNA	PAC12TS	4,7532	1,72	2,08	04.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC31TD	1,7924	1,68	2,00
-	tumor - RNA	cDNA	PAC12TD	4,2667	1,75	2,11	04.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC32TS	2,9281	1,72	2,08
-	tumor - RNA	cDNA	PAC13TS	2,7181	1,67	1,97	04.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC32TD	2,3152	1,74	2,08
-	tumor - RNA	cDNA	PAC13TD	4,1388	1,77	2,13	17.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC33TS	3,7001	1,67	2,06
26.04.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC14TS	2,4447	1,71	2,03	17.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC33TD	2,9851	1,68	2,04
26.04.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC14TD	1,6701	1,64	1,87	17.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC34TS	2,8616	1,69	2,05
27.04.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC15TS	5,723	1,77	2,22	17.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC34TD	2,8029	1,71	2,02
27.04.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC15TD	10,1142	1,78	2,32	25.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC35TS	2,1985	1,70	2,05
27.04.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC16TS	3,6057	1,74	2,16	25.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC35TD	2,4273	1,71	2,08
27.04.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC16TD	2,2879	1,74	2,16	25.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC36TS	2,3161	1,71	2,08
27.04.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC17TS	2,8998	1,73	2,08	25.05.2023	tumor - RNA	cDNA	PAC36TD	2,4970	1,74	2,13

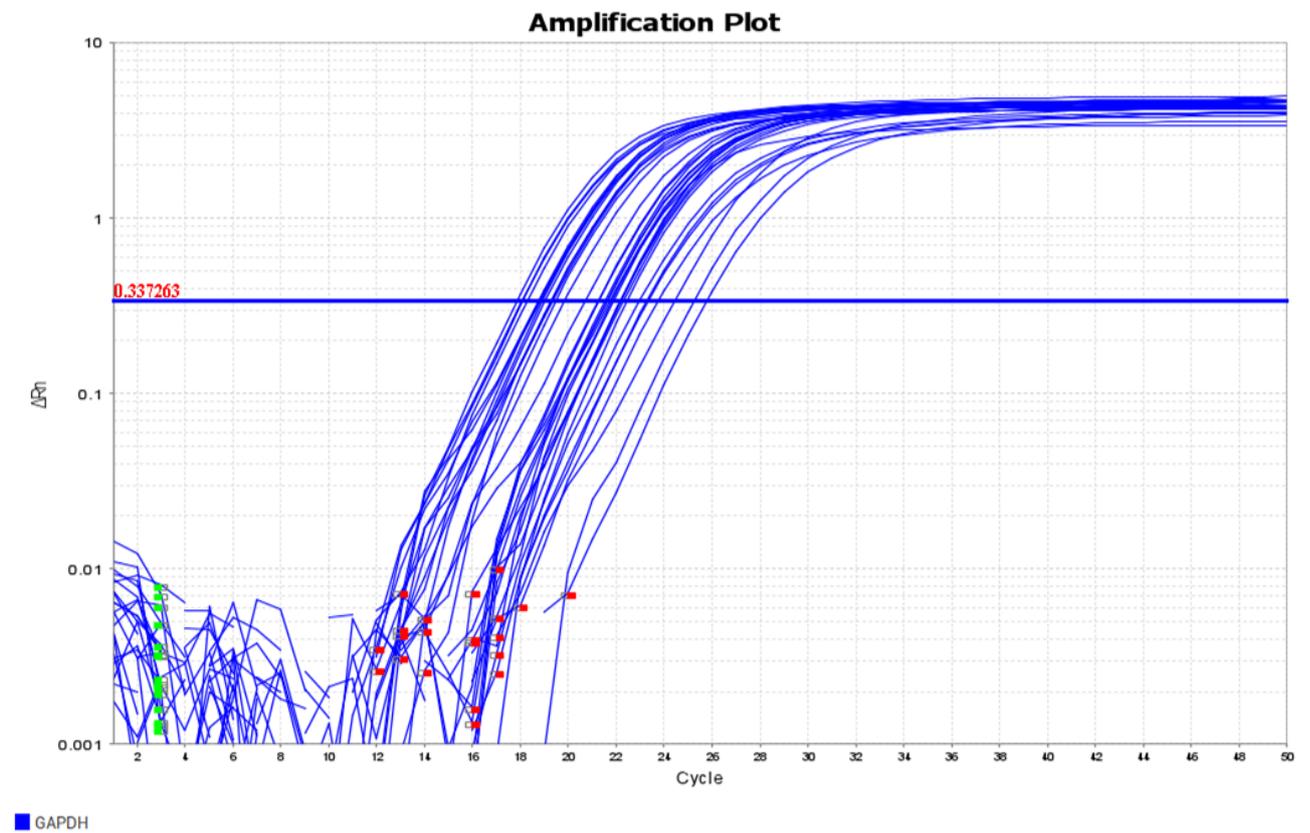
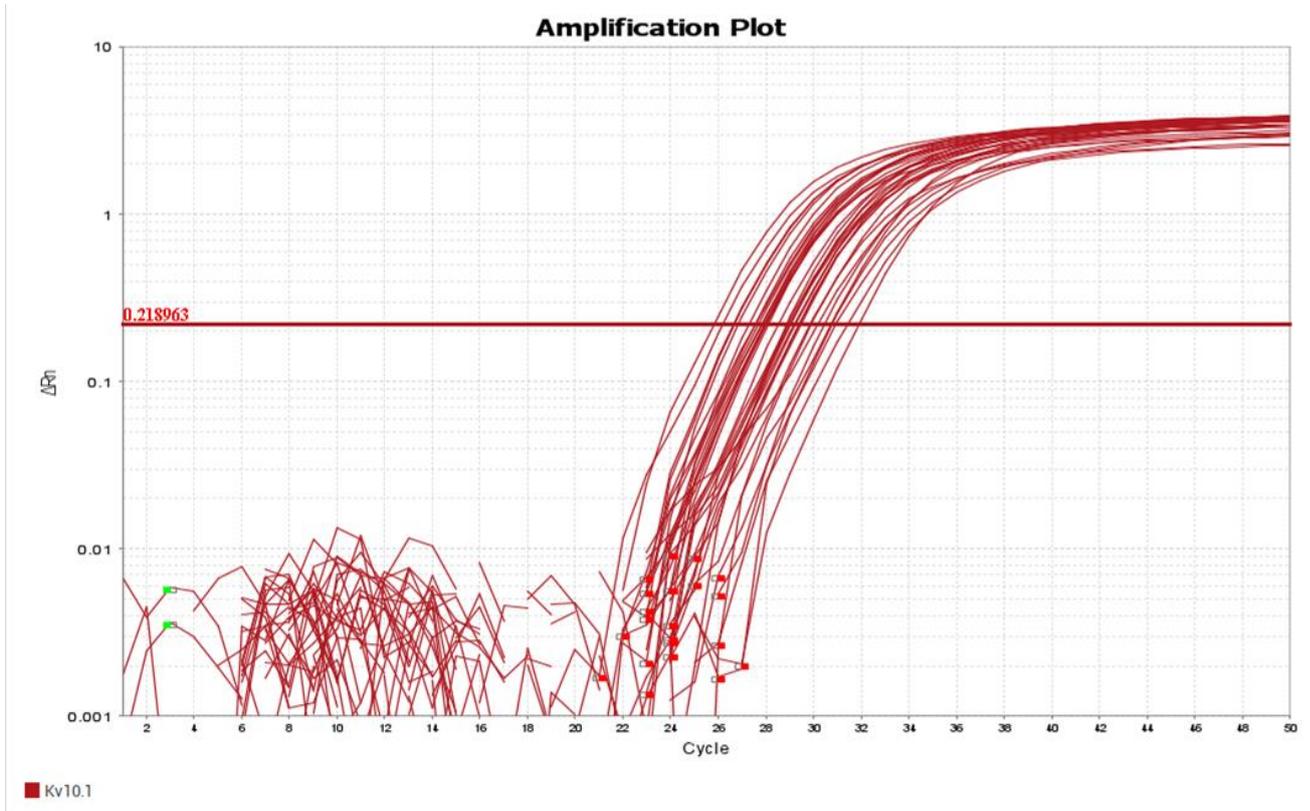
**APÊNDICE D – THRESHOLD E CURVA DE MELTING NA AMPLIFICAÇÃO DAS
LINHAGENS CELULARES QuantStudio 3 System**



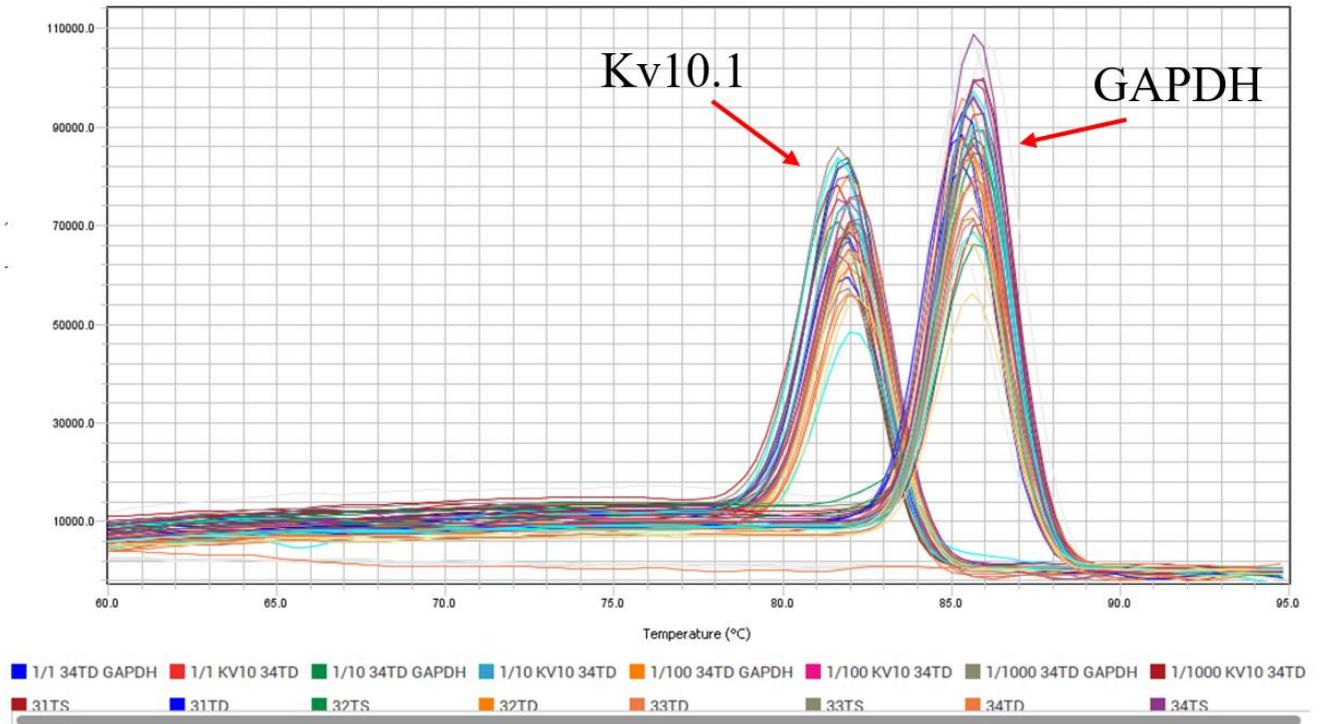
Melt Curve Plot



APÊNDICE E – *THRESHOLD* E CURVA DE *MELTING* NA AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS TUMORAIS DOS PACIENTES 36 A 31 NO SOFTWARE QuantStudio 3 System



Melt Curve Plot



ANEXO I – CERTIFICADOS DE APRESENTAÇÃO NO ENGENE 2023

ENGENE XXIV Encontro de Genética do Nordeste

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **Expressão diferencial do Kv10.1 em amostras de pacientes com Câncer Colorretal revela seu potencial como marcador diagnóstico e terapêutico** de autoria de **Yasmim Vieira Silva; Inaldo Santos Casado Cândido; Alexandre Rolim da Paz ; Péricles José C Oliveira ; Carmem Gabriela Gomes Figueiredo ; Demetrius Antônio Machado de Araújo; Glaucia Veríssimo Faheina Martins**, foi apresentado na sessão de **Pôsteres** durante o **Encontro de Genética do Nordeste**, evento realizado de 12 a 15 de novembro de 2023, na cidade de João Pessoa - PB.

Katia Castanho Scortecci
 Dra. Katia Castanho Scortecci (UFRN)
 Presidente da Regional Nordeste SBG

Carlos Henrique Salvio Gadelha Meneses
 Dr. Carlos Henrique Salvio Gadelha Meneses (UEPB)
 Presidente do XXIV ENGENE

SBC SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENÉTICA

ENGENE XXIV Encontro de Genética do Nordeste

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **Potencial anticâncer de novas moléculas por Docking molecular no canal Kv1.3** de autoria de **Yasmim Vieira Silva; Juliano Carlo Rufino Freitas; Demetrius Antônio Machado de Araújo; Glaucia Veríssimo Faheina Martins**, foi apresentado na sessão de **Pôsteres** durante o **Encontro de Genética do Nordeste**, evento realizado de 12 a 15 de novembro de 2023, na cidade de João Pessoa - PB.

Katia Castanho Scortecci
 Dra. Katia Castanho Scortecci (UFRN)
 Presidente da Regional Nordeste SBG

Carlos Henrique Salvio Gadelha Meneses
 Dr. Carlos Henrique Salvio Gadelha Meneses (UEPB)
 Presidente do XXIV ENGENE

SBC SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENÉTICA