

**ANÁLISE DA HETEROGENEIDADE DO STATUS
MUTACIONAL DO GENE *KRAS* EM CARCINOMA
COLORRETAL PRIMÁRIO E METASTÁTICO**

MARIANA PETACCIA DE MACÊDO

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Isabela Werneck da Cunha
Co-Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro**

**São Paulo
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Macedo, Mariana Petaccia de

Análise da heterogeneidade do status mutacional do gene *KRAS* em carcinoma colorretal primário e metastático / Mariana Petaccia de Macedo - São Paulo, 2014.

97p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Isabela Werneck da Cunha

Descritores: 1. NEOPLASIAS COLORRETAIS. 2. PATOLOGIA MOLECULAR. 3. HETEROGENEIDADE GENÉTICA. 4. KI-RAS GENES. 5. METÁSTASE NEOPLÁSICA. 6. MUTAÇÃO

“(...) ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, sem aprender a refazer, a retocar o sonho por causa do qual a gente se pôs a caminhar.”

“Ninguém nasce feito, é experimentando-nos no mundo que nós nos fazemos.”

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai João de Deus, minha mãe Ileana, minhas irmãs Jana e Lina e meu marido Leonardo por me encherem de uma inquietude de querer construir. Agradeço a paciência e compreensão por tantos momentos ausentes.

À minha orientadora Dra. Isabela Werneck da Cunha por todo ensinamento, tantas palavras de incentivo, paciência e confiança.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares por acreditar e me fazer acreditar, além de me incentivar em todos os momentos.

Ao Dr. Washington Luiz Conrado dos Santos, que me abriu a primeira porta, me ensinou os primeiros passos e me encheu de questionamentos e curiosidade.

Ao Dr. Clóvis e Dra. Dirlei por todo carinho, ensinamento, incentivo e conselhos.

Aos Colegas patologistas do A.C. Camargo: Dirlei, Clóvis, Cynthia, Hugo, Nascimento, Patrícia, Luis, Felipe, Stephania, Isabela, Louise e Victor por toda compreensão e incentivo durante a realização deste trabalho.

À Dra. Dirce Carraro, minha co-orientadora, por todo incentivo e cooperação com o trabalho.

À Fernanda Mello por toda a cooperação e envolvimento com este trabalho.

À Bianca Lisboa, por toda cooperação com o trabalho e ensinamentos.

À Marina Gomes, Luciane Kagahora e Júlio Cirullo, pela ajuda nos primeiros momentos do trabalho.

À Julia e Maristela, pela participação nos momentos finais deste trabalho.

À Juliano e Marina com os estudos de análise de imagens.

Ao Dr. Heber Salvador, por toda a disponibilidade e cooperação com o trabalho.

Ao Marcio Camona pela cooperação na obtenção dos dados clínicos dos pacientes.

À Eloisa, Ana Paula e Louise do banco de Macromoléculas do A.C.Camargo Cancer Center pela disponibilização das amostras congeladas.

À Severino e Carlinhos por toda a cooperação em realizar os cortes histológicos para os experimentos.

À Biblioteca do A.C.Camargo Cancer Center, e em especial à Suely pela formatação e organização deste trabalho.

À Pós Graduação da Fundação Antônio Prudente, por todo o apoio institucional, organização e profissionalismo.

Aos Funcionários de todos os setores da Anatomia Patológica do A.C.Camargo, patologistas e residentes. As amostra da patologia utilizada em cada trabalho são de boa qualidade e conferem informações seguras pois é fruto de um grande esforço de todos.

Aos colegas da Fiocruz, em especial Nathanael e Micely que tanto me ensinaram durante a iniciação científica, de ciência, de amizade, e de vida.

Aos professores e assistentes da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por todo aprendizado durante minha Residência Médica de Anatomia Patológica e aos amigos de residência médica, em especial Thales, Marcela, Fausto, Caetano, Maurício,

Marcos Vinicius, Igor, Lorena, Hugo, Rodrigo, Richard, Rachel e Felipe, por todo companheirismo e aprendizado nos anos convividos.

Aos colegas de residência do A.C. Camargo, em especial Sabrina, Carlos, Marcos, Stephania, Felipe e Patrícia e aos residentes do AC Camargo que convivi durante esses anos- Barbara, Ivan, Floriano, Amaro, Sheila, Juliana, Hugo, Camila, Marcelo, Danielle, Carol, Mariana, Lidiane, Leonardo, Fabio, Aline, Rafael, Américo, Umbelina, Antonio, Graziele, Fadia, Camila e Georgia, pelo companheirismo.

Aos amigos colegas estudantes da Pós Graduação, por dividir momentos de aprendizado e da alma.

Aos colegas do Diretório Acadêmico Pirajá da Silva. Juntos aprendemos a questionar.

Aos professores e colegas da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, por terem me ajudado a entender o que é ser médico.

Aos amigos e professores do colégio Anchieta e colégio Apoio, que são o embrião da minha formação e ao professor Hiech do Hickory High School que me ensinou os primeiros experimentos com DNA através de bolinhas magnéticas coloridas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro na realização deste projeto.

Ao A.C.Camargo Cancer Center e à Fundação Antonio Prudente, pelo apoio institucional sem o qual seria impossível realizar este projeto.

Aos demais colegas médicos do A.C. Camargo Cancer Center que muito me ensinaram através de exemplo sobre dedicação e persistência, vencendo as mais variadas dificuldades para seguir exercendo uma medicina de boa qualidade, ensinando novos médicos e construindo novos conhecimentos.

RESUMO

Macedo MP. **Análise da heterogeneidade do status mutacional do gene *KRAS* em carcinoma colorretal primários e metastáticos.** São Paulo; 2014. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: Mutações no gene *KRAS* são preditoras negativas de resposta ao tratamento com inibidores do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) em Carcinoma Colorretal (CCR) metastático. Questiona-se qual a melhor amostra tecidual para pesquisar a mutação deste gene. O objetivo desse estudo é avaliar a heterogeneidade do status mutacional do gene *KRAS* entre diferentes áreas do tumor primário e na metástase. Além disso, testar se a detecção das mutações mais frequentes de *KRAS* são reprodutíveis entre material parafinado e congelado, e ainda avaliar o impacto das porcentagens de células estromais não neoplásicas presentes na amostra tecidual selecionada para extração de DNA. **Material e Métodos:** DNA de material parafinado do tumor primário e da metástase foi obtido de 102 pacientes. Mutações nos codons 12, 13 e 61 do gene *KRAS* foram avaliadas por pirosequenciamento. Para os experimentos comparativos entre material congelado e parafinado 31 casos parafinado com 5 diferentes mutações conhecidas de *KRAS* foram selecionados baseados na disponibilidade de tecido congelado. A quantificação de células tumorais foi realizada em diferentes áreas do tumor primário em 8 casos através da análise digital de imagens. **Resultados:** A população de estudo consistiu de 102 pacientes com CCR metastático. DNA foi extraído de 2 áreas do tumor primário em 20 casos e 3 áreas em 71 casos. Apenas um paciente apresentou heterogeneidade intratumoral do tumor primário, com diferentes tipos de mutação (uma área resultou mutação c.35G>T e as outras duas áreas c.35G>A). Deste mesmo paciente, tanto a metástase linfonodal quanto hepática demonstrou a mutação c.35G>T. Testamos 97 pacientes para heterogeneidade comparativa entre o primário e a metástase, e encontramos heterogeneidade em 2 casos (2,1%). Um caso apresentou uma área do tumor primário e o linfonodo selvagens para *KRAS* e a metástase hepática mutada (c.35G>C). O segundo caso apresentou duas áreas do

tumor primário com a mutação c.35G>T enquanto a metástase hepática resultou selvagem. Em relação aos experimentos entre tumor fixado e congelado, 97% dos casos mostraram concordância do status mutacional. O caso discordante era de um caso parafinado com mutação c.38G>C e o congelado selvagem. A quantificação digital da porcentagem de células neoplásicas das áreas de extração de DNA demonstrou que não existe proporcionalidade linear entre as quantificações de células tumorais e de alelos mutados, e a quantificação de alelos mutados difere entre distintas áreas tumorais. **Conclusão:** O status de mutação do gene *KRAS* é altamente homogêneo por todas as regiões do tumor primário e na respectiva metástase. Além disso, a pesquisa de mutação do gene *KRAS* em material parafinado apresenta alta reprodutibilidade quando comparada com o congelado. Desta forma, para a precisa seleção de pacientes que se beneficiarão do tratamento com inibidores do EGFR, é possível testar a mutação do gene *KRAS* em apenas uma área do tumor primário ou no tecido metastático, assim como em tecido parafinado, contanto que seja realizada uma precisa seleção da amostra de tecido.

SUMMARY

Macedo MP. [Analysis of *KRAS* mutation heterogeneity in primary and metastatic colorectal cancer]. São Paulo; 2014. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Background: Mutations in *KRAS* are negative predictors of the response to anti-EGFR therapies in the treatment of metastatic colorectal cancer. Question raises regarding the best tissue to test for *KRAS* mutation. The aim of this study is to test the heterogeneity of *KRAS* mutational status between different areas of the primary lesion and between paired primary CRC and corresponding metastasis. Another objective is to examine whether the detection of the most frequently described types of *KRAS* mutations found in CRC are reproducible between formalin fixed-paraffin embedded tissue (FFPET) and frozen tissue (FT) using the pyrosequencing method, and additionally to test the impact of the percentage of tumor cells in the tissue sample regarding the quantification of the mutated allele. **Design:** DNA from two or three areas from the primary tumor and from one area of the metastatic tissue was obtained from FFPET from 102 metastatic CRC patients. *KRAS* codons 12, 13 and 61 mutations were analyzed by pyrosequencing. From frozen versus FFPET experiments, 31 previously sequenced FFPET cases presenting 5 different mutations *KRAS* gene were selected based on the availability of paired frozen tissue in A.C.Camargo Center Biobank. Quantification of percentage of tumor cell was performed in different areas of the primary tumor in 8 cases by digital analysis. **Results:** The study population consisted of 102 metastatic CRC patients. DNA extracted from 2 areas in 20 cases and 3 areas in 71 cases. Only one of the patients showed intratumor heterogeneity and it was regarding *KRAS* mutation type (one area showed c.35G>T and the other two areas c.35G>A). From this patient, both LN and liver metastasis presented with the c.35G>T mutation. We tested 97 of the patients for heterogeneity regarding paired primary and metastatic tissue, and we found heterogeneity in 2 cases (2,1%). One case showed one area of the primary tumor *KRAS* wild type (WT) and the liver and LN metastasis mutated (c.35G>C). The second case presented with two areas of the primary tumor with the c.35G>T

mutation and the liver metastasis WT. Regarding the frozen versus FFPE experiments, 97% of the cases showed concordance of the mutational status. The only one discordant case was from a FFPE case that showed a c.38G>C mutation and the FT a WT status. Digital quantification analysis of the DNA extracted tumor area in the slide showed that the tumor percentage is not proportional to the mutated allele quantification, but the quantification of mutated allele differs between areas of the same patient. **Conclusion:** *KRAS* status is highly homogeneous throughout primary CRC tumor areas and comparing the primary with the metastatic tissue from the same patient. Also, *KRAS* mutation detection by pyrosequencing DNA from FFPE is highly reproducible with DNA from frozen tissue. Testing *KRAS* mutation in only one area of either primary or metastatic tissue and from FFPE, as long as performing a precise tissue selection with tumor enrichment and avoiding areas of non neoplastic tissue, is suitable for correct predicting response to anti EGFR treatment and guiding clinical decisions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Figura esquemática da cascata de sinalização envolvendo o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR).....	14
Figura 2	Figura esquemática do mecanismo de ativação celular da família RAS.....	19
Figura 3	Figura esquemática das frequências e tipos de mutações do gene <i>KRAS</i> entre os diferentes códons.....	21
Figura 4	Representação esquemática da obtenção das diferentes áreas do tumor primário para extração de DNA e sequenciamento do gene <i>KRAS</i>	30
Figura 5	Representação esquemática de obtenção de amostra de células tumorais da neoplasia primária e metastática.....	31
Figura 6	Frequência de mutação do gene <i>KRAS</i> na população de estudo, considerando a neoplasia primária.....	40
Figura 7	Distribuição das mutações do gene <i>KRAS</i> entre os códons avaliados na população de estudo.....	41
Figura 8	Distribuição dos tipos de mutações encontradas no gene <i>KRAS</i> observadas no códon 12.....	42
Figura 9	Pirogramas das áreas tumorais da neoplasia primária e da metástase do caso “A”.....	45
Figura 10	Características morfológicas das áreas tumorais da neoplasia primária e da metástase do caso “A”.....	46

Figura 11	Pirogramas das áreas tumorais da neoplasia primária e da metástase do caso “B”.....	49
Figura 12	Características morfológicas das áreas tumorais do tumor primário e da metástase do caso “B”	50
Figura 13	Pirogramas das áreas tumorais do caso “C”.....	52
Figura 14	Características morfológicas das áreas tumorais da neoplasia primária e da metástase do caso “C”.....	53
Figura 15	Representação esquemática da obtenção de amostra tumoral das neoplasias de tumores sincrônicos.....	55
Figura 16	Pirogramas comparativos evidenciando mutações iguais no gene <i>KRAS</i> entre amostras congeladas e fixadas em formalina.....	60
Figura 17	Pirogramas comparativos da amostra congelada e parafinada identificada como “23”	61
Figura 18	Representação esquemática da análise digital de imagens para avaliação da porcentagem de células tumorais na área de extração de DNA.....	64

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Delineamento da população de estudo de pacientes com carcinoma colorretal em relação aos sítios de metástases.....	40
Tabela 2	Distribuição das variáveis clínico patológicas em relação à mutação do gene <i>KRAS</i> em carcinoma colorretal na população de estudo.....	43
Quadro 1	Casos que apresentaram heterogeneidade intratumoral ou primária versus metástase em relação ao gene <i>KRAS</i>	54
Quadro 2	Características Clínico-patológicas e dados de status mutacional dos genes <i>RAS</i> em Carcinoma Colorretal Sincrônico.....	57
Quadro 3	Comparação de status mutacional dos códons 12 e 13 do gene <i>KRAS</i> entre amostras de Carcinoma Colorretal fixadas em formalina e congeladas do mesmo paciente.....	59
Quadro 4	Comparação de status mutacional dos casos parafinados com mutação c.35G>C no códon 12 com amostras pareadas congeladas...	62
Quadro 5	Relação das porcentagens de representatividade tumoral e a quantidade de alelos mutados em amostras de carcinoma colorretal..	65

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>BRAF</i>	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
CCR	Carcinoma Colorretal
CCR-S	Carcinoma Colorretal Sincrônico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGFR	Receptor do fator de Crescimento Epidérmico
GTP	Guanosina trifosfato
<i>HRAS</i>	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
<i>KRAS</i>	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
<i>PIK3</i>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
NRAS	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
TGFBR	Receptor do Fator de crescimento transformador beta

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Epidemiologia do Carcinoma Colorretal	1
1.2	Vias Moleculares dos Carcinomas Colorretais	1
1.3	Classificação morfológica do Carcinoma Colorretal	4
1.4	Estadiamento Patológico e Clínico do Carcinoma Colorretal	6
1.5	Mecanismos de Metástase em Carcinoma Colorretal	8
1.6	Tratamento do Carcinoma Colorretal	9
1.7	O Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico	10
1.8	Tratamento com inibidores do EGFR	12
1.9	O gene <i>KRAS</i>	18
1.9.1	O Gene <i>KRAS</i> e a sinalização celular.....	18
1.9.2	Frequência e tipos de mutações do Gene <i>KRAS</i>	20
1.9.3	O Gene <i>KRAS</i> e Prognóstico	21
1.9.4	Tipos específicos de mutação do gene <i>KRAS</i> e Valor preditivo de resposta a tratamento com inibidores do EGFR.....	22
1.9.5	O gene <i>KRAS</i> e morfologia tumoral.....	23
1.9.6	A pesquisa de mutação do gene <i>KRAS</i> no contexto clínico	25
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	Objetivo Geral.....	28
2.2	Objetivos Específicos.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Delineamento do estudo.....	29
3.2	Desenho experimental.....	29
3.3	Seleção dos casos e Dados Clínicos Patológicos	32
3.4	Critérios de exclusão	33
3.5	Método	33
3.5.1	Seleção da área tumoral para extração de DNA	33

3.5.2	Quantificação da porcentagem de células não neoplásicas submetidas à macrodissecção.....	34
3.5.3	Extração de DNA.....	35
3.5.4	Pesquisa de mutação do gene <i>KRAS</i>	35
3.5.5	Estabelecimento de Valor de Corte de Mutação do gene <i>KRAS</i>	36
3.5.6	Interpretação dos dados e Análise estatística.....	37
3.6	Comitê de Ética.....	37
3.7	Financiamento.....	37
4	RESULTADOS	39
4.1	Delineamento da População de Estudo.....	39
4.2	Pesquisa de heterogeneidade intratumoral envolvendo os códons 12, 13 e 61...43	
4.3	Pesquisa de heterogeneidade entre tumor primário e respectiva metástase em relação à mutação do gene <i>KRAS</i>	47
4.4	Avaliação da heterogeneidade tumoral entre amostras tumorais de pacientes com tumores sincrônicos do cólon.....	54
4.5	Avaliar a influência da fixação e processamento histológico dos carcinoma colorretais na pesquisa de mutações no gene <i>KRAS</i> na prática médica.....	57
4.6	Impacto da quantidade relativa do estroma na sensibilidade de detecção das mutações do gene <i>KRAS</i>	62
5	DISCUSSÃO.....	66
6	CONCLUSÕES.....	81
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

ANEXOS

Anexo 1 Pirogramas evidenciando porcentagem de alelos mutados para as diluições sucessivas realizadas com cultura de células

Anexo 2 Artigo publicado na Int J Colorectal Dis 2011; 26:1241-8

Anexo 3 Artigo publicado na Exp Mol Pathol 2014; 96(2):257-60

- Anexo 4** Artigo publicado na J Clin Pathol 2014; 67: 647-8
- Anexo 5** Artigo aceito para publicação na revista Oncoscience
- Anexo 6** Resumos apresentados em forma de pôster em Congressos Internacionais
- Anexo 7** Tabela geral dos resultados da pesquisa de mutação dos códons 12, 13 e 61 do gene *KRAS* entre áreas do tumor primário e da metástase dos casos avaliados neste estudo
- Anexo 8** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CARCINOMA COLORRETAL

O Carcinoma Colorretal (CCR) é o terceiro tipo mais comum de câncer em homens no mundo e o segundo em mulheres. A sobrevida média global em cinco anos é de 55% em países desenvolvidos e 45% em países em desenvolvimento. A estimativa de 2012 de novos casos de CCR era de 1.361.000 novos casos da doença com 694.000 casos de óbito pela doença (BRAY et al. 2013; FERLAY et al. 2013). No Brasil também é o terceiro tipo de câncer mais comum entre homens e o segundo em mulheres, com estimativa para o ano de 2014 de 15.070 casos novos em habitantes do sexo masculino e 17.530 do sexo feminino (Ministério da Saúde 2014). Nos Estados Unidos são estimadas 50.310 mortes por Carcinoma Colorretal para o ano de 2014 (American Cancer Society - ACS 2014).

1.2 VIAS MOLECULARES DOS CARCINOMAS COLORRETAIS

O desenvolvimento dos Carcinomas Colorretais pode ser estudado subdividindo esses tumores em 3 categorias principais: tumores esporádico, tumores hereditários (sindrômicos) e tumores de caráter familiar. Aproximadamente 70% dos CCR são classificados como tumores esporádicos, ou seja, não existe uma história familiar positiva de CCR. Geralmente esses pacientes possuem idade superior a 50 anos e o desenvolvimento dos tumores está associado a fatores ambientais e

dietéticos. Já os CCR classificados como hereditários, compreendem a menor parte dos CCR, aproximadamente 5%, e são aqueles CCR que tem as bases genéticas já conhecidas, ou seja, o paciente apresenta mutações germinativas de determinados genes, que levam a predisposição ao desenvolvimento de tumores. As principais síndromes conhecidas são a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP); o Câncer Colorretal sem polipose (HNPCC ou síndrome de Lynch) e a polipose associada a MUTHY (MAP). A FAP é uma doença autossômica dominante relacionada à mutação germinativa do gene supressor de tumor *APC* (Adenomatous Polyposis Coli). O Câncer Colorretal hereditário sem polipose também é uma doença autossômica dominante relacionada a presença de mutação germinativa nos genes de reparo de DNA. A MAP está associada a mutação germinativa do gene *MUTHY*. Os tumores classificados como familiar compreendem aproximadamente 25% dos casos e neste grupo estão pacientes com história familiar de CCR mas que não se encaixam nos critérios diagnósticos das síndromes já descritas, tratando-se provavelmente de pacientes no qual a alteração genética ainda não foi identificada (FEARNHEAD et al. 2002; JASPERSON et al. 2010).

Classicamente, as principais alterações moleculares envolvidas na carcinogênese dos CCR são divididas naquelas relacionadas à instabilidade cromossômica, instabilidade de microsatélite e metilação. As alterações relacionadas à instabilidade cromossômica são as alterações descritas na via de carcinogênese proposta por VOGELSTEIN et al. (1988). Nesse modelo existe um acúmulo de alterações genéticas que se reflete em alterações morfológicas das células epiteliais que constituem a mucosa colônica. O processo se inicia morfológicamente com um foco de cripta aberrante, passando por adenomas de baixo e alto grau e culminando

com adenocarcinoma invasivo. As alterações genéticas e epigenéticas acumuladas se iniciam com mutação somática do gene *APC*, depois do gene *KRAS* e do gene *TP53*, além da perda de heterozigose do braço longo do cromossomo 18, que compreende entre outros genes, dois genes importantes de regulação de crescimento tumoral, como o *DCC* (*deleted in colorectal Cancer*) e o *Smad4*. Já a via relacionada à instabilidade de microssatélite está relacionada a mutação germinativa dos genes de reparo do DNA, conhecidos como *MSH-2*, *MSH-6*, *MLH-1*, *PMS-2* e *PMS-1*. Neste caso estas alterações estão comumente relacionadas a tumores do colon direito, com fenótipo mucinoso, pouco diferenciado e características inflamatórias. A perda da atividade de alguns desses genes também pode estar relacionada a alteração somática como fenômeno epigenético de metilação de um gene (mais frequentemente o *MLH-1*). Já a via molecular relacionada a metilação, também conhecido como fenótipo *CpG Island Methylator Phenotype* (CIMP) está relacionada a fenômenos epigenéticos de silenciamento gênico secundário a inativação de determinados genes por metilação das suas regiões promotoras, como o descrito no caso do gene *MLH-1* e também o *MGMT*. Os tumores são classificados como CIMP-H (*High*-alto), CIMP-L (*Low*-baixo) e CIMP negativo (MIYAKI e KUROKI 2003; GRADY e CARETHERS 2008; NIBBE e CHANCE 2009; FERTÉ et al. 2010; FEARON et al. 2011; CURTIN et al. 2011; ARMAGHANY et al. 2012).

Mais recentemente, o consórcio *The Cancer Genome Atlas Network-TCGA* realizou um análise molecular detalhada dos carcinomas colorretais e propôs uma nova classificação molecular. Nesta proposta os CCR são divididos em tumores hipermutados e não hipermutados. Os tumores hipermutados apresentaram eventos somáticos em genes de reparo do DNA e frequentes mutações nos genes *BRAF* e

TGFBR2. e o grupo não hipermutado em geral apresentava alterações do número de cópias do DNA e mutações no gene *TP53*. Além desses achados, em geral os tumores do grupo não hipermutados apresentam mutações mais frequentes em *KRAS*, *NRAS*, *PI3K* e *Smad4*. Ambos os tumores hipermutados e não hipermutados apresentam frequentes alterações na Via de sinalização celular WNT (Cancer Genome Atlas Network 2012).

1.3 CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DO CARCINOMA COLORRETAL

A classificação morfológica das neoplasias epiteliais malignas (carcinomas) colorretais é dada pela classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS). A última atualização é do ano de 2010 e divide os Carcinomas Colorretais em Adenocarcinomas, Carcinomas Adenoescamosos, Carcinomas Fusocelulares, Carcinomas Escamosos e Carcinoma Indiferenciado. O grupo dos Adenocarcinomas são subdivididos em Adenocarcinoma Mucinoso, Adenocarcinoma com Células em Anel de Sinete, Adenocarcinoma Medular, Adenocarcinoma Cribriforme, Adenocarcinoma Serreado e Adenocarcinoma Micropapilar.

A classificação de uma neoplasia colorretal morfológicamente como adenocarcinoma mucinoso é realizada quando a neoplasia apresenta mais de 50% de componente mucinoso. A variante de Adenocarcinoma com Células em Anel de Sinete é utilizada quando mais de 50% das células neoplásicas representadas na lesão apresentam componente de mucina intracitoplasmática. Já o Adenocarcinoma Medular é caracterizado por células neoplásicas com núcleos vesiculosos, nucléolo

proeminente e citoplasma eosinofílico abundante, além da presença de linfócitos intraepiteliais. Os adenocarcinomas serreados apresentam característica arquitetural semelhante aos pólipos sésseis serreados, com serreamento glandular e ainda podem estar acompanhados de áreas cribriformes, mucinosas e trabeculares. O adenocarcinoma cribriforme apresenta como característica morfológica a presença de glândulas cribriformes largas com necrose central. Em geral não apresentam instabilidade de microssatélite e apresentam metilação das ilhas CpG. O adenocarcinoma micropapilar apresenta pequenos agregados de células neoplásicas tumorais no estroma lembrando espaços vasculares (JASS 2007; HAMILTON et al. 2010).

A importância da classificação morfológica dos tumores se mistura com o conhecimento adquirido em relação às alterações moleculares dos subtipos morfológicos. Sabe-se que o adenocarcinoma mucinoso, a variante de adenocarcinoma com células em anel de sinete e o medular pode estar associados a alteração molecular de instabilidade de microssatélite (MIS). Tumores relacionados a MIS em geral apresentam melhor prognóstico que tumores não relacionados a essa via (UMAR et al. 2004). Já os adenocarcinomas serreados estão frequentemente relacionados a mutações no gene *BRAF* e metilação das ilhas CpG (HAMILTON et al. 2010). A mutação do gene *BRAF* em CCR está relacionada a pior prognóstico (PHIPPS et al. 2012).

1.4 ESTADIAMENTO CLÍNICO-PATOLÓGICO DO CARCINOMA COLORRETAL

O indicador prognóstico mais importante para o acompanhamento de pacientes com CCR é o estadiamento patológico do paciente no momento de apresentação da doença, que considera principalmente a invasão tumoral da parede intestinal e o envolvimento de linfonodos regionais pela neoplasia (MEYERHARDT e MAYER 2005). A sétima edição da classificação internacional dos tumores da União Internacional de Combate ao Câncer (UICC-TNM) divide as neoplasias colorretais em categoriais de acordo com a profundidade de infiltração do tumor na parede intestinal (T), acometimento de linfonodos regionais (N) e metástase à distância (M). A classificação em relação à profundidade de infiltração da neoplasia na parede intestinal é designada de “T” e divide os tumores em: **Tis** (tumores que não apresentam invasão da submucosa), **T1** (tumores que infiltram até a camada submucosa), **T2** (tumores que infiltram a muscular própria), **T3** (tumores que infiltram até o tecido adiposo subseroso), e **T4** (tumores que infiltram a serosa [T4a] e comprometem tecidos adjacentes por extensão da neoplasia [T4b]). Em relação ao comprometimento linfonodal, a classificação é designada como “N”, se baseia no número de linfonodos comprometidos, e é dividida em **N0** (sem metástase linfonodal), **N1** (metástase em 1 [N1a] ou 2-3 [N1b] linfonodos, ou nódulo satélite [N1c]), **N2** (metástase em 4-6 [N2a] ou mais de 7 [N2b] linfonodos). Em relação ao M (metástase), é dividido em **M0** (sem metástase à distância) e **M1** (metástase à distância) (EDGE et al. 2010). Posteriormente os tumores são agrupados em estádios clínicos com a seguinte classificação:

Estádio 0 - TisN0M0

Estadio I - T1-T2N0M0

Estadio 2 são subdivididos em IIa, IIb, e IIc

IIa - (T3N0M0)

IIb - (T4aN0M0)

IIc - (T4bN0M0).

Estádio 3 são subdivididos em IIIa, IIIb e IIIc

IIIa - T1-T2N1M0 ou T1N2aM0

IIIb - T3-T4aN1M0, T2-T3N2aM0 ou T1-T2N2bM0

IIIc -T4aN2aM0, T3-T4aN2bM0 ou T4bN1-N2M0.

Estádio 4 - metástase à distância.

A importância do estadiamento se reflete na avaliação prognóstica dos pacientes e definição de conduta terapêutica. A sobrevida em 5 anos para pacientes com CCR em estadio clínico I é de aproximadamente 90%. Pacientes com estágio clínico II apresentam sobrevida em 5 anos de aproximadamente 65-80%, e os pacientes com estágio III de aproximadamente 50%. Já pacientes com doença metastática no momento do diagnóstico, o que representa 25% dos casos de CCR, a sobrevida no mesmo período é de apenas 10% (KEMENY 2006; EDGE et al 2010; GAO et al. 2013).

1.5 MECANISMOS DE METÁSTASE EM CARCINOMA COLORRETAL

As metástases de CCR podem ocorrer por via hematogênica, linfática e por contiguidade. O local mais frequente de metástase linfática são os linfonodos regionais. O fígado é o sítio mais frequente de metástase hematogênica dos CCR. Aproximadamente 20% dos pacientes apresentam metástase sincrônica hepática ao diagnóstico e outros 20-30% irão desenvolver doença metastática depois da ressecção da neoplasia primária (KEMENY 2006; KAWADA et al. 2011). A ressecção das metástases hepáticas resulta em uma taxa de sobrevida em 5 anos de 36%, contudo grande parte dos pacientes (75%) recidivam após a ressecção. O pulmão é o sítio extra-abdominal mais comum de metástase de CCR e é mais comumente associado a tumores retais do que colônicos devido à drenagem das veias retais inferiores se darem para o sistema cava e não o sistema porta (MITRY et al. 2010). As metástases podem se apresentar sincrônicas ou metacrônicas, a depender se o intervalo entre o diagnóstico da neoplasia primária e metastática for menor ou maior que 6 meses, respectivamente. Para o tratamento de pacientes com metástase metacrônica, a depender da apresentação clínica, tamanho da metástase e critérios de ressecabilidade, o paciente pode ser submetido a ressecção da metástase com quimioterapia pós operatória, ou ser submetido a quimioterapia pré-operatória com ou sem ressecção posterior. Já para os pacientes com metástase sincrônica, a cirurgia do primário pode ser concomitante ou não com a cirurgia da metástase (KEMENY 2010; VAN VOORTHUIZEN et al. 2013).

Os pacientes com CCR ainda podem se apresentar com tumores sincrônicos,

quando um mesmo paciente se apresenta com mais de um CCR invasivo no momento do diagnóstico ou dentro de um intervalo pré-estabelecido de tempo que é em média de 6 meses (LAM et al. 2014). Este conceito é diferente do conceito de tumor metastático sincrônico, que refere-se ao diagnóstico da doença metastática dentro de um período pré-estabelecido de tempo do diagnóstico do tumor primário (ROSE et al. 2012). A prevalência de tumores sincrônicos é estimada em 3-4% de todos os casos de CRC (LAM et al. 2014). É mais comumente visto em homens e associado a condições de predisposição como doença inflamatória intestinal, CCR hereditário não polipóide e polipose familiar adenomatosa (LAM et al. 2014).

1.6 TRATAMENTO DO CARCINOMA COLORRETAL

A decisão de tratamento dos pacientes com Carcinoma Colorretal depende do estadiamento clínico do paciente no momento da apresentação da doença. Em geral o tratamento padrão é o tratamento cirúrgico, que muitas vezes pode ser curativo. Existe a possibilidade de quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante e ainda radioterapia a depender do estadiamento do paciente e localização da neoplasia. A recomendação de tratamento para pacientes com estágio I de carcinomas colônicos é cirúrgica apenas, assim como para os pacientes estágio II sem fatores de alto risco associado. Para os pacientes estágio II com fatores de alto risco associado (como histologia pouco diferenciada, invasão vascular angiolinfática ou perineural, obstrução intestinal, avaliação de menos de 12 linfonodos da peça cirúrgica, perfuração ou margens cirúrgicas comprometidas) pode ser considerada a possibilidade de tratamento com quimioterapia adjuvante. O tratamento dos

pacientes com estágio III em geral se baseia na ressecção cirúrgica da neoplasia primária seguida de quimioterapia adjuvante. Existem protocolos diferenciados para o tratamento de carcinoma localizados no reto, que como principal diferença, preconizam o tratamento radioterápico e quimioterápico neoadjuvante para determinados grupos de pacientes. O tratamento quimioterápico do Carcinoma colorretal se baseia principalmente no uso dos seguintes quimioterápicos: 5-Fluoruracil, leucovorin, iritotecan, oxaliplatina e capecitabina, que podem ser administrados em diversas combinações. Entre as combinações mais comumente utilizadas estão FOLFOX (Leucovorin + Fluorouracil + Oxaliplatin) e FOLFIRI (Leucovorin + Fluorouracil) (CUNNINGHAM et al. 1998; DOUILLARD et al. 2000; SALTZ et al. 2000; ANDRÉ et al. 2004; VAN DE VELDE et al. 2014). O tratamento dos pacientes com doença metastática, ou seja, estágio 4, se dá classicamente com o uso de quimioterápicos. Mais recentemente foi adicionada a possibilidade do uso para esses pacientes de quimioterápicos combinado ou não com anticorpos monoclonais contra o Fator de Crescimento Endotelial (VEGF) e os anticorpos contra o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR). O uso de inibidores do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) se tornou uma importante estratégia para o tratamento de CCR metastático (GOLDBERG et al. 2007).

1.7 O RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO

A maior parte dos carcinomas colorretais, assim como diversas outras neoplasias, apresentam hiperexpressão do Receptor do Fator de Crescimento

Epidérmico (EGFR). O EGFR (ErbB-1 ou Her-1) é um dos membros da família ErbB de receptores transmembrana com atividade Tirosina Kinase juntamente com o ErbB-2 (HER-2/neu), ErbB-3 (HER-3) e ErbB-4 (HER-4). O EGFR participa na regulação de divisão, diferenciação, migração, adesão e apoptose celular, e é superexpresso nos CCR assim como em várias outras neoplasias (SPANNO et al. 2005; CITRI e YARDEN 2006; VAN KRIEKEN et al. 2008). O gene *EGFR* é localizado no cromossomo 7p12-13. A proteína resultante, ou sejam o EGFR é constituído por uma região externa, uma porção transmembrana e uma porção intracelular (BENNASROUNE et al. 2004). A porção externa é caracterizada por um domínio glicosilado responsável pela integração com os seus ligantes, representados entre outros pelo EGF (fator de crescimento epidérmico, o TGFalfa (do inglês Fator de Crescimento Transformador Alfa), amphiregulin, betacellulin, HB-EGF (heparina binding EGF), epiregulin e epigen (HARRIS et al. 2003). A porção transmembrana é lipofílica e responsável pela fixação do receptor na posição transmembrana e ainda pela mediação do processo de sinalização celular a partir dos fatores estimuladores extracelulares. A porção citoplasmática ou intracelular possui o domínio responsável pela atividade tirosina Kinase do receptor, como o sítio de ligação com a molécula de ATP e uma região carboxi-terminal regulatória (CARPENTER e COHEN 1990; VAN KRIEKEN et al. 2008; PINES et al. 2010).

A ativação do EGFR se dá a partir da interação de um dos seus ligantes com o sítio extracelular do receptor, e resulta em ativação de uma cascata de sinalização intracelular que culmina com crescimento e progressão tumoral. As vias celulares ativadas a partir do EGFR são a via Ras/MAPK (do inglês Mitogen activated protein kinase), phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/AKT e STAT (Figura 1A) (SPANNO et

al. 2005; LIÈVRE et al. 2010; SOULIÈRES et al. 2010). A via da MAPKinase é uma das vias mais estudados em neoplasias humanas e envolve uma cascata de sinalização intracelular envolvendo as moléculas Ras-Raf-Mek-Erk1/2 (do inglês extracelular signal regulated Kinase). Essa via regula funções celulares cruciais para a célula, incluindo proliferação, crescimento e senescência (SANTARPIA et al. 2012). Experimentos in vitro evidenciaram que o EGFR está envolvido na proliferação e diferenciação do componente epitelial de pele, pulmão, pâncreas e trato gastrointestinal (YARDEN e SLIWKOWSKI 2001).

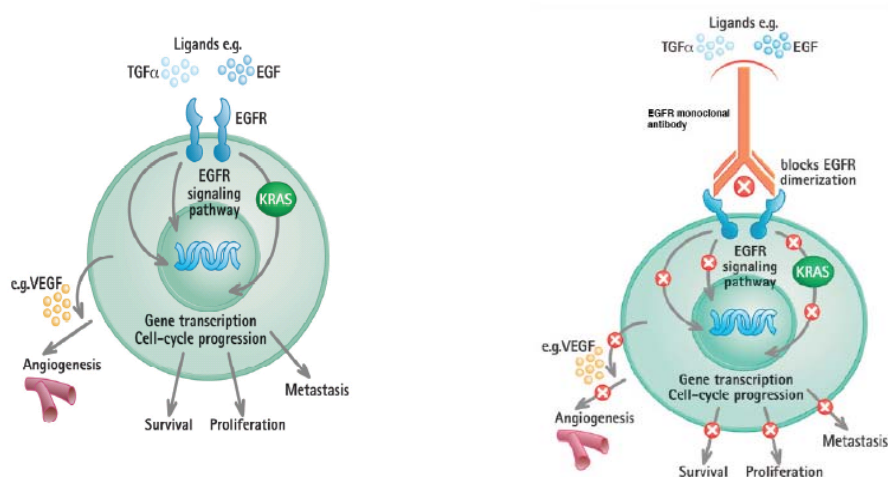
1.8 TRATAMENTO COM INIBIDORES DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR)

Existem estratégias de inibição do EGFR. A inibição pode ser feita tanto através do uso de anticorpos monoclonais direcionados contra a porção externa do receptor, como o panitumumabe ou cetuximabe, ou através do uso de pequenas moléculas mimetizadoras de ATP direcionadas contra a porção interna do receptor, que causam a inibição da atividade tirosina Kinase (gefitinibe® e erlotinibe®). Ambos bloqueiam a cascata de sinalização celular que culminam com crescimento e disseminação tumoral (Figura 1B). O Cetuximabe é um anticorpo IgG1 (imunoglobulina G subclasse 1) classificado como quimérico, pois possui a porção Variável de murino e as regiões constantes de humano. Já o Panitumumabe é um anticorpo IgG2 humano. Os anticorpos monoclonais funcionam de duas maneiras: direta e indireta. De maneira direta, entre outros mecanismos, são capazes de se ligar à porção extracelular do EGFR, bloqueando a fosforilação da atividade tirosina

kinase do receptor mediada pela interação com o ligante. Indiretamente, atuam mediante ativação de efetores do sistema immune, através de citotoxicidade mediada por complemento (CDC) ou mediada por anticorpo (ADCC) (IMAI e TAKAOKA 2006; VAN KRIEKEN et al. 2008; SOULIÈRES et al. 2010).

No início dos anos 2000, o uso de anticorpos monoclonais contra a porção externa do EGFR se tornou uma estratégia terapêutica para os pacientes com carcinoma colorretal metastático. Inúmeros estudos clínicos demonstraram o benefício do tratamento com inibidores do EGFR para pacientes com CCR metastático em primeira linha ou segunda linha de tratamento. Em 2004, SALTZ et al. conduziram um estudo fase II com 57 pacientes com diagnóstico de CCR metastático refratários ao tratamento quimioterápico inicial e demonstraram que após o uso de Cetuximabe isolado, 8.8% dos pacientes atingiram resposta parcial e 36.8% doença estável. Também em 2004, CUNNINGHAM et al. conduziram um estudo com 329 pacientes com carcinoma colorretal metastático refratários ao tratamento com irinotecan e demonstraram que o tratamento com cetuximabe apresentou atividade significativa quando administrado sozinho ou combinado para esse grupo de pacientes. Nesses dois estudos os pacientes que foram elegíveis ao tratamento com os inibidores do EGFR apresentavam comprovada expressão imunohistoquímica de EGFR nas amostras de tumor. Posteriormente CHUNG et al. em 2005 demonstraram que não é necessária a expressão imunohistoquímica de EGFR para o benefício do tratamento com cetuximabe, pois encontrou em pacientes sem a expressão imunohistoquímica de EGFR resposta de 25% ao tratamento com estes inibidores, e discute a possibilidade de existirem outros preditores de resposta terapêutica ao tratamento com EGFR (CHUNG et al. 2005). A partir deste momento diversos estudos clínicos foram

conduzidos com pacientes apresentando CCR metastático e submetidos ao tratamento com inibidores do EGFR, porém sem critérios de seleção em relação marcadores tumorais. JONKER et al. em 2007 mostraram que pacientes submetidos a tratamentos prévios para CCR avançado e tratados com cetuximabe apresentaram aumento de sobrevida global e progressão livre de doença quando comparado com o grupo de pacientes submetidos somente à suporte clínico. Um estudo fase II demonstrou ainda que a combinação de cetuximabe com FOLFOX-4 é eficaz como tratamento de primeira linha para pacientes com CCR metastático (TABERNERO et al. 2007).



Fonte: SOULIÈRES et al. (2010)

Figura 1 - Cascata de sinalização intracelular envolvendo o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR). **A)** Mutação do gene *KRAS* leva a ativação da via celular intracelular constante e independente do EGFR, criando um sistema desregulado. **B)** Inibição da cascata de sinalização do EGFR por anticorpos monoclonais direcionados contra a porção externa do receptor

Apesar de demonstrar resultados positivos no tratamento dos pacientes com CCR metastático, o tratamento com inibidores do EGFR acarretam grande impacto

monetário devido ao seu alto custo, e ainda, o seu uso está associado a diversos efeitos adversos. Os estudos que avaliam economia da saúde em geral realizam análise de custo efetividade e de custo utilidade de determinada ação de saúde, atrelada a avaliação de ganho de anos de vida e anos ajustados à qualidade de vida. Estudos mostram que não é custo efetivo o tratamento de pacientes com CCR metastático com bevacizumabe, cetuximabe e panitumumabe sem seleção criteriosa desses pacientes (LANGE et al. 2014). Os efeitos adversos relacionados ao uso dos inibidores do EGFR ocorrem comumente, e dentre as formas mais comuns estão as alterações cutâneas. O EGFR é altamente expresso na epiderme, especialmente na camada basal, nos folículos pilosos e no epitélio de glândulas sebáceas, podendo ainda ser expresso no epitélio de glândulas écrinas e nas células apresentadoras de antígenos, sendo portanto crucial para o desenvolvimento normal e fisiologia da pele. Dentre os efeitos adversos cutâneos mais comuns está a erupção pápulo-pustular ou acneiforme. As lesões costumam ser dolorosas e pruriginosas e ocorrem em aproximadamente 50% dos pacientes que recebem o tratamento. O segundo efeito adverso cutâneo mais comum é a xerose, com relatos de comprometimento de aproximadamente 35% dos pacientes. Outros efeitos descritos são paroníquia, distúrbio no crescimento dos pêlos, mucosite e hiperpigmentação pós inflamatória. As alterações cutâneas relacionadas ao uso dos inibidores do EGFR podem apresentar um amplo espectro de gravidade, sendo graduadas de acordo com o critério do Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos em 5 graus, sendo que o grau 4 reflete comprometimento cutâneo que confere risco de vida ao paciente e o grau 5 óbito secundário à essas alterações cutâneas (CHANPRAPAPH et al. 2014).

Apesar dos diversos estudos mostrando o benefício do tratamento dos pacientes com CCR metastático com inibidores do EGFR, apenas uma pequena porção de pacientes com CCR respondem à esse tratamento. Este fato está relacionado em parte a presença de alterações na via de sinalização que envolve a cascata pós receptor (SOULIÈRES et al. 2010). Sabe-se que a mutação do gene *KRAS* resulta em ativação da cascata de sinalização de forma constante e independente do EGFR, criando um sistema sem regulação (VAN KRIEKEN et al. 2008). Diversos estudos mostraram que o tratamento de pacientes com CCR metastático em primeira ou segunda linha combinados ou não com outros esquemas quimioterápicos adicionados aos inibidores do EGFR conferiam benefício quando se estabelecia seleção prévia dos pacientes, ou seja, eram selecionados pacientes com o status *KRAS* selvagem. LIÈVRE et al. em 2006 conduziram um estudo que encontrou mutação do gene *KRAS* em 43% dos 30 CRC metastático avaliados. Dos 11 pacientes que responderam ao tratamento com inibidores do EGFR, nenhum apresentava mutação neste gene, e no grupo dos 19 pacientes que não responderam ao tratamento, a frequência de mutação de *KRAS* foi de 68,4%. Desta forma associou a mutação do gene *KRAS* em CCR à menor resposta ao tratamento com cetuximabe. DI FIORE et al. em 2007 publicaram um estudo com 59 pacientes que apresentavam CCR metastático tratado com cetuximab e quimioterapia, no qual nenhum dos 12 pacientes com resposta clínica apresentava mutação de *KRAS*. AMADO et al. (2008) estudaram a presença de mutação no gene *KRAS* como fator preditivo de resposta à tratamento com inibidores do EGFR em pacientes com diagnóstico de CCR metastático submetidos à monoterapia de panitumimabe, comparado com suporte clínico. A progressão livre de doença média do grupo selvagem para *KRAS* e tratado

com panitumumabe foi de 12.3 semanas e 7.3 semanas para suporte clínico. As taxas de resposta do tratamento com panitumumabe do grupo de pacientes com *KRAS* selvagem foi de 17% e do grupo com *KRAS* mutado 0% (AMADO et al. 2008). LIÈVRE et al. em 2008 demonstraram que entre um grupo de 24 pacientes com CCR metastático e mutação do gene *KRAS*, nenhum apresentou resposta clínica. Já no grupo com 65 pacientes sem mutação do gene *KRAS*, 40% dos pacientes apresentaram resposta clínica. Sendo mais um autor a demonstrar que a presença de mutação do gene *KRAS* estava associada a resistência ao tratamento com cetuximabe (LIÈVRE et al. 2008). KARAPETIS et al. em 2008 demonstraram que no grupo de pacientes com *KRAS* selvagem, o tratamento com cetuximabe conferiu melhor sobrevida global que os pacientes submetidos a suporte clínico e melhores resultados de progressão livre de doença. Entre os pacientes com *KRAS* mutado e que receberam cetuximabe, não havia diferença entre em sobrevida global ou livre de progressão quando comparado o grupo submetido a suporte clínico (KARAPETIS et al. 2008). BOKEMEYER et al. (2009) encontraram que o tratamento em primeira linha com cetuximabe combinado com FOLFOX-4 para pacientes com CCR metastático apresentou resposta maior que o tratamento de FOLFOX-4 apenas, e que a mutação de *KRAS* foi capaz de prever resposta dos pacientes (BOKEMEYER et al. 2009). VAN CUTSEM et al. em 2009 mostraram que o tratamento em primeira linha com cetuximabe combinado com FOLFIRI quando comparado com FOLFIRI sozinho reduziu o risco de progressão do CCR metastático, porém o benefício encontrou-se limitado ao grupo de tumores evidenciando status selvagem do gene *KRAS*. DOUILLARD et al. em 2010 demonstrou que o tratamento de pacientes com CCR metastático com combinação de panitumumabe e FOLFOX4 levou a um

acréscimo de sobrevida livre de progressão em pacientes com *KRAS* selvagem (DOUILLARD et al. 2010). BOKEMEYER et al. (2011) demonstrou que a adição de cetuximabe com FOLFOX-4 levou a um aumento da sobrevida livre de progressão em pacientes com *KRAS* selvagem como primeira linha de tratamento para CCR metastático (BOKEMEYER et al. 2011). VAN CUTSEM et al. em 2011 demonstrou que a adição de cetuximab com FOLFIRI como tratamento de primeira linha melhora a sobrevida de pacientes com CCR metastático e *KRAS* Selvagem.

Mais recentemente também foi descrito que pacientes com CCR e mutação no gene *NRAS* também apresentam menor resposta ao uso de inibidores do EGFR quando comparados com os tumores *NRAS* selvagens. A mutação do gene *NRAS* está presente em aproximadamente 5% dos CCR e é encontrada principalmente nos códons 61, 12 e 13. Mutação concomitante de *NRAS* e de *KRAS* em geral não é um achado esperado nos tumores (IRAHARA et al. 2010; DOUILLARD et al. 2013).

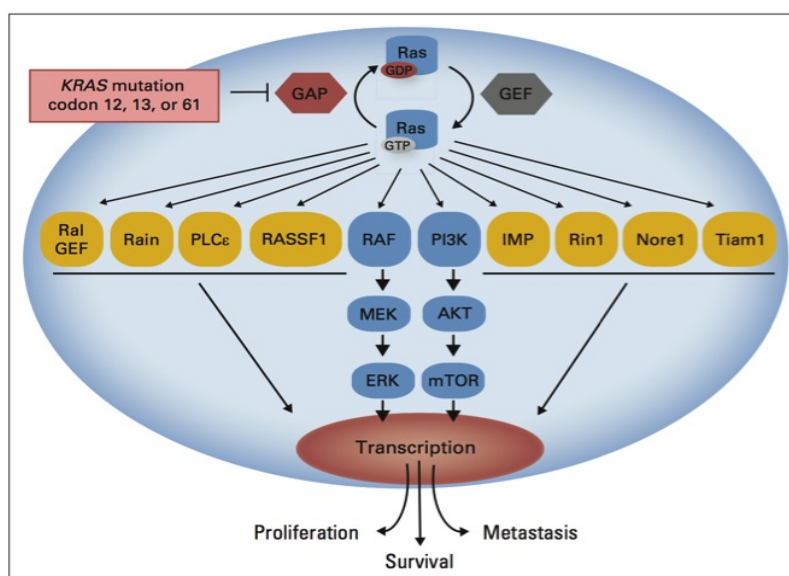
Desta forma, foi demonstrado que a presença da mutação do gene *KRAS* é um preditor negativo de resposta a terapia anti-EGFR, e indica que o tratamento com anti-EGFR não deve ser feito, evitando assim a toxicidade desnecessária causada pelo uso desses medicamentos e a perda monetária decorrente de um tratamento ainda de custo bastante elevado (PLESEC e HUNT 2009; WANG et al. 2010).

1.9 O GENE *KRAS*

1.9.1 O Gene *KRAS* e a sinalização celular

O gene *KRAS* foi primeiramente descrito como um vírus causador de câncer (Kirsten Sarcoma vírus), e na década de 80 foi identificado como oncogene

dominante em vários tipos de tumores. O gene *KRAS* faz parte da família de genes *RAS* (do acrônimo *rat sarcoma*), juntamente com o gene *HRAS* e o gene *NRAS*. Esses três genes codificam proteínas muito similares, que são conhecidas como p21, que controlam mecanismos intracelulares relacionados a proliferação e diferenciação celular. As proteínas ras possuem atividade GTPase intrínseca (BOS et al. 1988, 1989; BARBACID et al. 1990), ou seja, seu mecanismo de ativação e regulação depende de ligação e hidrólise do GTP (do inglês *guanosine triphosphate*). Quando existe uma mutação no gene *KRAS*, o GAP (do inglês GTPase activating protein) não consegue exercer sua função de auxiliar no processo de hidrólise do GTP para o GDP, desta forma o *KRAS* permanece ligado ao GTP, e portanto em seu estado de ativação. Conseqüentemente, a via de sinalização celular decorrente deste estímulo permanece ativada (Figura 2) (ROBERTS e STINCHCOMBE 2013).



Fonte: ROBERTS e STINCHCOMBE (2013)

Figura 2 - Figura esquemática do mecanismo de ativação da família RAS e cascata de sinalização intracelular. Regulação da atividade do RAS através da ligação com a GTP. Cascata de sinalização intracelular, envolvendo as vias de sinalização RAF-MEK-ERK e PI3K.

1.9.2 Frequência e Tipos de mutações do Gene *KRAS*

O gene *KRAS* é localizado na banda 12,1 no braço curto do cromossomo 12, e codifica uma proteína envolvida na proliferação celular e nas vias celulares listadas acima (WANG et al. 2010). A substituição de apenas um amino ácido é suficiente para atingir o status oncogênico (SETH et al. 2009). A mutação no gene *KRAS* é vista em 35 à 40% dos CCR (CEROTTINI et al. 1998; ANDREYEV et al. 2001). A mutação mais frequentemente observada no gene *KRAS* nos CCR é no códon 12 (80% dos casos), secundariamente no códon 13 (15%) e menos frequentemente no códon 61 (5%). Mutações ainda menos frequentes são encontradas nos códons 59, 117 e 146 (BRINK et al. 2003, AMADO et al. 2008; PLESEC e HUNT 2009, SETH et al. 2009). Mutações envolvendo mais de um códon e inserções no gene *KRAS* também já foram descritas (MACEDO et al. 2011, 2014). Os códons 12 e 13 do gene *KRAS* encontram-se no éxon 2. A sequência normal de nucleotídeos do códon 12 do gene *KRAS* é GGT (codificando uma glicina) e do códon 13 é GGC (codificando uma glicina). Vários estudos relataram as frequências dos tipos de mutação específica do gene *KRAS*. A mutação mais frequentemente encontrada no códon 12 é a c.35G>A, resultando numa mudança do aminoácido glicina nesta posição para o ácido aspártico (p.G12D) (ANDREYEV et al. 2001; BRINK et al. 2003; LIÈVRE et al. 2010). A mutação mais frequentemente encontrada no códon 13 é o c.38G>C, resultando também numa mudança do aminoácido glicina para o ácido aspártico (p.G13D) (SAMEER et al. 2009). O Códon 61 está localizado no éxon 3. A sequência de nucleotídeos do códon 61 é o CAA, que codifica uma glutamina. Vide Figura 3 com regiões e tipos de mutações mais frequentemente encontradas nos carcinomas colorretais (Figura 3).

Codon 12 (80%)	Gly12Asp (GGT>GAT)	p.G12D	c.35G>A
	Gly12Val (GGT>GTT)	p.G12V	c.35G>T
	Gly12Cys (GGT>TGT)	p.G12C	c.34G>T
	Gly12Ser (GGT>AGT)	p.G12S	c.34G>A
	Gly12Ala (GGT>GCT)	p.G12A	c.35G>C
	Gly12Arg (GGT>CGT)	p.G12R	c.34G>C
Codon 13 (15%)	Gly13Asp (GGC>GAC)	p.G13D	c.38G>A
	Gly13Arg (GGC>CGC)	p.G13R	c.37G>C
	Gly13Cys (GGC>TGC)	p.G13C	c.37G>T
	Gly13Ala (GGC>GCC)	p.G13A	c.38G>C
	Gly13Val (GGC>GTC)	p.G13V	c.38G>T
Codon 61 (<5%)	Gln61Leu (CAA>CTA)	p.Q61L	c.182A>T
	Gln61His (CAA>CAT)	p.Q61H	c.183A>T
	Gln61Arg (CAA>CGA)	p.Q61R	c.182A>G
	Gln61Lys (CAA>AAA)	p.Q61K	c.181C>A
Codon 117 (<1%)	Lys117Asn (AAA>AAC)	p.K117N	c.351A>C
Codon 146 (<1%)	Ala146Thr (GCA>ACA)	p.A146T	c.436G>A
	Ala146Pro (GCA>CCA)	p.A146P	c.436G>C
	Ala146Val (GCA>GTA)	p.A146V	c.437C>T

Figura 3 - Figura esquemática da frequência e dos tipos de mutação mais frequentes nos códons 12, 13, 61, 117 e 146 do gene *KRAS*.

1.9.3 O Gene *KRAS* e Prognóstico

Existem diversas tentativas de correlacionar a presença de mutação do gene *KRAS* com prognóstico em CCR. Enquanto alguns autores encontraram associação da presença de mutação do gene *KRAS* com pior prognóstico em pacientes com CCR (LIÈVRE et al. 2010; LEE et al. 2014), uma metanálise com mais de 4.000 pacientes (REN et al. 2012) demonstrou ausência de associação da mutação do gene *KRAS* com prognóstico dos pacientes com CCR. Em relação ao impacto prognóstico dos diferentes tipos de mutação gene *KRAS*, esta mesma metanálise (REN et al. 2012) demonstrou que a mutação no códon 12 do gene *KRAS* se correlacionava com pior

comportamento quando comparada com outras mutações. Outro estudo grande do grupo colaborativo do Kirsten Ras em Carcinoma colorretal (RASCAL) reportou associação da mutação G12V do códon 12 com pior prognóstico (ANDREYEV et al. 1998). IMAMURA et al. em 2014 demonstrou que mutações no códon 12 (em especial a mutação p.G12V) estavam relacionada a maior mortalidade que àquelas envolvendo o códon 13 em pacientes com CCR. Contrariamente, existem estudos que demonstram pior sobrevida global em pacientes com mutação no códon 13 (SAMOWITZ et al. 2000; DE ROOCK et al. 2011). Desta forma, os dados relacionados ao valor prognóstico do status mutacional do gene *KRAS* assim como dos tipos de mutação específica em pacientes com CCR são controversos, não permitindo uma generalização.

1.9.4 Tipos específicos de mutação do gene *KRAS* e Valor preditivo de resposta a tratamento com inibidores do EGFR

Existem tentativas de entender o papel dos diferentes tipos de mutação do gene *KRAS* em relação a capacidade de prever resposta ao tratamento com inibidores do EGFR. A maior parte dos trabalhos estudou o papel da mutação de diferentes códons, em especial os códon 12 e 13, em relação a resposta a tratamento. Poucos trabalhos estudaram o papel de tipos específicos de nucleotídeos substituídos nos casos de mutação do gene *KRAS* em prever resposta ao tratamento com inibidores do EGFR. Estudos experimentais *in vitro* reportaram diferenças na capacidade de ativação da via de sinalização intracelular entre os códons 12 e 13 do gene *KRAS*, demonstrando que o códon 12 possui maior capacidade de ativação que o códon 13 (GUERRERO et al. 2000). Ainda, estudos recentes de análise

computacional demonstraram que mutação no códon 13 do gene *KRAS* possuem comportamento semelhante ao *KRAS* selvagem (CHEN et al. 2013). Esses dados explicam em parte o achado de TEJPAR et al. em 2013 de que a mutação p.G13D no códon 13 do gene *KRAS* estaria associada a possibilidade de resposta ao tratamento com cetuximabe. Contudo, esses achados não são reproduzidos em todos os estudos. PEETERS et al. (2013) estudaram o papel prognóstico e preditivo das 7 mutações mais frequentes envolvendo os códon 12 e 13 do gene *KRAS* e encontrou que para o tratamento com panitumumabe, não houve diferença significativas estatísticas em relação aos tipos específicos de mutações estudadas e resposta ao tratamento. A recomendação até o presente momento é de que pacientes que apresentam mutações nos genes *KRAS*, independentemente de qual códon ou tipo de mutação esteja envolvido, não sejam submetidos a tratamento com inibidores do EGFR (MURPHY e RYAN 2010).

1.9.5 O gene *KRAS* e morfologia tumoral

Alguns autores tentaram correlacionar achados morfológicos e de localização dos CCR com a presença de mutação de *KRAS*. A maior parte dos estudos foram realizados considerando o subtipo morfológico e o grau tumoral. Vários estudos relataram ausência de associação de dados morfológicos com o status mutacional do gene *KRAS*. Um autor avaliando 258 casos de CCR não observou diferenças em relação ao status mutacional do gene *KRAS* entre subtipos histológicos de tumores mucinosos e não mucinosos e nem em relação ao grau de diferenciação tumoral (WEICHERT et al. 2010), achado reforçado por outros estudos que não encontraram associação da mutação do gene *KRAS* com a diferenciação tumoral (BRINK et al.

2003; ISHII et al. 2004). Além do status mutacional um estudo também avaliou a presença de brotamentos tumorais, padrão de infiltração e presença de infiltrado linfocítico peritumoral em CCR, e não encontrou correlação desses achados histológicos com o status mutacional do gene *KRAS* (STEINESTEL et al. 2014). Contrariamente, outros estudos relataram associação positiva de determinadas características morfológicas com a presença de mutação do gene *KRAS*. Alguns autores demonstraram que a morfologia pouco diferenciada dos CCR são capazes de prediz maior possibilidade de mutação no gene *KRAS* (YUNXIA et al. 2010; PATIL et al. 2013). Já ANDREYEV et al. (1998) avaliaram 2214 casos de CCR e encontraram mutação mais frequentemente entre tumores bem e moderadamente diferenciados do que nos pouco diferenciados. GONSALVES et al. (2014) reportaram que tumores com mutação do gene *KRAS* mais frequentemente apresentam tumores localizados no cólon direito e são inversamente associados com pouca diferenciação tumoral. ROSTY et al. em 2013 encontraram que os tumores com mutação de *KRAS* estão mais frequentemente relacionadas a histologia mucinosa e localização no colon proximal. Outros dois autores também correlacionaram a presença de mutação do gene *KRAS* com tumores do cólon direito (ELNATAN et al. 1996; SAMOWITZ et al. 2000). KONDA et al. (2014) realizaram um estudo que comparou padrões macroscópicos de apresentação das neoplasias colorretais com alterações moleculares e encontrou associação de mutação de *KRAS* com tumores apresentando característica macroscópica de lesão polipóide e tumores com padrão de crescimento de extensão lateral na luz intestinal. Ainda relacionado a dados morfológicos, um estudo encontrou relato de maior quantidade de mitose e apoptose nos tumores com mutação de *KRAS* (LIU et al. 2011). Os achados

relacionados a morfologia e mutação do gene *KRAS* são divergentes, mas em geral existe uma tendência a se considerar que a mutação do gene *KRAS* está associada a morfologia mucinosa e localização no colon direito.

1.9.6 A pesquisa de mutação do gene *KRAS* no contexto clínico

Há um aumento crescente da demanda e elevada pressão de laboratórios, empresas farmacêuticas, clínicos e pacientes para a realização do teste de mutação do gene *KRAS* nas instituições. Com isso, há um aumento no número de centros diagnósticos que realizam o teste. Não há na literatura um consenso sobre qual a metodologia ideal para a realização desse teste. São diversas as técnicas usadas pelas instituições, e entre cada técnica não há estabelecido os valores de corte para se considerar o teste mutado (ANDREYEV et al. 2001; CEROTTINI et al. 1998). Para qualquer técnica utilizada, amostra de DNA tecidual deve ser obtida. A maior parte das instituições obtém o DNA através de raspagem (macrodissecção) do tecido, e desta forma, não somente amostra tumoral, mas representação de tecido do estroma é coletado. Sabe-se que o estroma apresenta, entre outras células, fibroblastos, leucócitos e vasos sanguíneos, logo o DNA desses componentes se diluem ao DNA tumoral. Não se sabe ao certo o impacto da representatividade do estroma na sensibilidade de detecção da mutação do gene *KRAS*.

A maior parte dos testes de mutação são realizados em amostras de DNA extraídos a partir de tecido fixado em formalina e embebido em parafina, por ser o processamento padrão dos espécimes provenientes de ressecção cirúrgica e portanto o material disponível após o processamento da biópsia ou da peça cirúrgica ressecada do paciente. Poucos centros possuem armazenamento de tecido congelado a fresco,

já que esta prática depende de centros desenvolvidos com logística para rápida coleta do tumor, processamento e armazenamento, e além disso, restrito aos tumores que possuem um tamanho mínimo que permita o congelamento e o processamento convencional sem comprometer o diagnóstico final do paciente (BOISSIÈRE-MICHOT et al. 2013). Sabe-se que o formol interage com o DNA de diversas maneiras, e que tecidos fixados com formol exibem uma alta frequência de seqüências genéticas alteradas e não reprodutíveis (SRINIVASAN et al. 2012). Outros fatores que também podem interferir na integridade do material genético durante o processamento histológico do material são o tempo entre a retirada do espécime cirúrgico e a fixação, o tempo de estocagem dos blocos de parafina, o tempo do tecido submetido a fixação e a qualidade da formalina (OKAYAMA et al. 2011). Poucos estudos compararam na prática clínica o papel do processo de fixação histológica na sensibilidade e especificidade da detecção de mutações do gene *KRAS* em CCR.

Não há um consenso na literatura sobre qual é o material ideal para avaliar a presença de mutação do gene *KRAS* nos casos de pacientes com doença metastática em que haja amostra tecidual disponível tanto do tumor primário quanto da metastase (VAN KRIEKEN et al. 2008). Sabe-se que as neoplasias são celularmente complexas, e não há o conhecimento estabelecido sobre a validade, representatividade e reprodutibilidade de se obter amostra tecidual de apenas uma área tumoral para pesquisa de mutação do gene *KRAS*. Alguns estudos de revisão reportaram comparações entre o status mutacional do gene *KRAS* entre tumores primários e respectivas metástases, e as porcentagens de discordância diferem importantemente entre os estudos, assim como as técnicas de detecção da mutação e

a seleção das áreas de interesse (ITALIANO et al. 2010, RICHMAN et al. 2011, OLTEDAL et al. 2011).

A pesquisa de mutação no gene *KRAS* é mandatória antes do início de tratamento com inibidores do EGFR nos pacientes com CCR (VAN KRIEKEN et al. 2008; ALLEGRA et al. 2009). Considerando os gastos financeiro elevado e os efeitos adversos descritos em se instituir ou não erroneamente o uso de inibidores de EGFR, questionamentos existem sobre qual o melhor tecido a ser usado para pesquisa de mutação do gene *KRAS*. Estudos que comparam o status mutacional de *KRAS* de biópsias antes e após tratamento neoadjuvante não mostram diferenças em relação ao status de *KRAS*, dado importante principalmente no acompanhamento dos pacientes com Carcinoma Retal (KAWAMOTO et al. 2008; ONDREJKA et al. 2011; BOISSIÈRE-MICHOT et al. 2012), nem estudos comparando biópsias e espécimes de ressecção cirúrgica de CCR (FADHIL et al. 2012; KROL et al. 2012; YANG et al. 2012). Contudo, as revisões comparando o status de *KRAS* entre tumor primário e metástase de CCR do mesmo pacientes mostram dados conflitantes conforme citado acima. Ainda, estudos comparando a reprodutibilidade de achados de mutação do gene *KRAS* entre tumores parafinados e congelados são escassos, pouco se discutindo sobre a confiabilidade dos achados de mutação obtidos a partir de tecido parafinado e o papel que a precisa seleção da área tumoral pode ter na sensibilidade de detectar mutações. Desta forma surgem questionamentos sobre qual o melhor tecido para pesquisar a mutação de *KRAS* nos pacientes com CCR para melhor selecionar quais pacientes de beneficiarão do tratamento com inibidores do EGFR.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o status do gene *KRAS* em diversas áreas de carcinomas colorretais primários assim como em suas metástases.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Avaliar a presença de heterogeneidade intratumoral em relação à mutação do gene *KRAS* nas neoplasias colorretais primárias.
- b. Avaliar a presença de heterogeneidade do status mutacional do gene *KRAS* quando comparadas às neoplasias colorretais primárias e respectivas metástases
- c. Avaliar o impacto do processamento histológico na integridade do material genético dos carcinomas colorretais para realização de pesquisa de mutações no gene *KRAS* na prática médica.
- d. Avaliar o impacto da quantidade relativa do estroma na sensibilidade de detecção das mutações do gene *KRAS*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de estudo transversal.

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

a) Avaliar a presença de heterogeneidade intratumoral em relação à mutação do gene *KRAS* nas neoplasias colorretais primárias.

Para avaliar a presença de heterogeneidade intratumoral nos pacientes com lesão única de carcinoma colorretal em relação à mutação do gene *KRAS* analisamos o status mutacional e o tipo de mutação do gene *KRAS* de duas ou três áreas diferentes do material parafinado do tumor de um mesmo paciente. A escolha de duas ou três áreas se baseou em disponibilidade de material no arquivo da patologia. Áreas diferentes foram estabelecidas primeiramente como áreas espacialmente distintas de representação macroscópica da lesão - quando havia mais de um bloco de parafina de representação tumoral para determinado caso, áreas distintas foram obtidas através do uso de blocos diferentes (Figura 4), e quando apenas um bloco de parafina com representação tumoral estava disponível para determinado caso, áreas não consecutivas dentro daquele bloco foram utilizadas. Não foi usado como critério de áreas diferentes a profundidade de invasão do tumor ou o padrão morfológico da neoplasia.

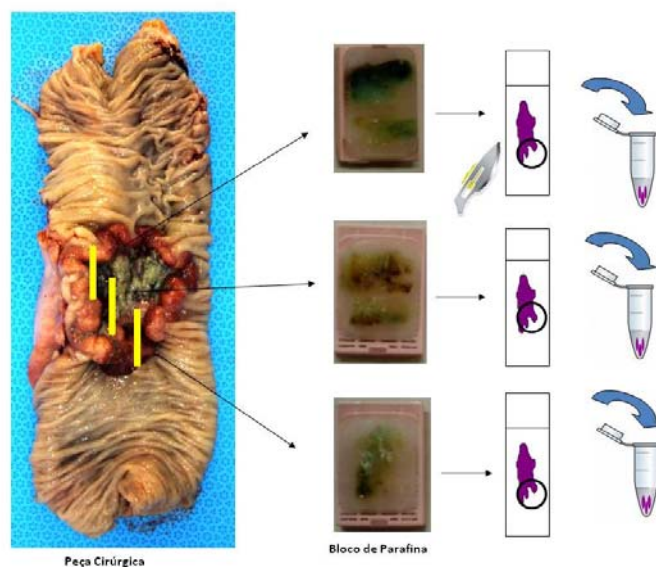


Figura 4 - Representação esquemática da obtenção das diferentes áreas do tumor primário para extração de DNA e sequenciamento do gene *KRAS*. Três áreas distintas da neoplasia foram representadas em três diferentes blocos de parafina. Para cada bloco será realizado um corte histológico, de onde será obtida amostra de células neoplásicas.

b) Avaliar a presença de heterogeneidade do status mutacional do gene *KRAS* quando comparadas às neoplasias colorretais primárias e respectivas metástases.

Para isso analisamos comparativamente o status da mutação do gene *KRAS* em carcinomas colorretais primários e suas respectivas metástases, tanto para pulmão, fígado ou linfonodos regionais. Para cada paciente que teve o tumor primário testado para presença de mutação do gene *KRAS*, as respectivas metástases hepática e/ou pulmonar e/ou para linfonodos regionais também foram testadas, quando existentes, do mesmo paciente. A avaliação da mutação do gene *KRAS* na amostra tecidual das metástases foi realizada em somente uma área tumoral representativa, utilizando-se a técnica de macrodissecção (Figura 5). A área escolhida foi aquela em que houver maior quantidade de neoplasia viável e menor quantidade de estroma, muco e infiltrado inflamatório entre as células neoplásicas.

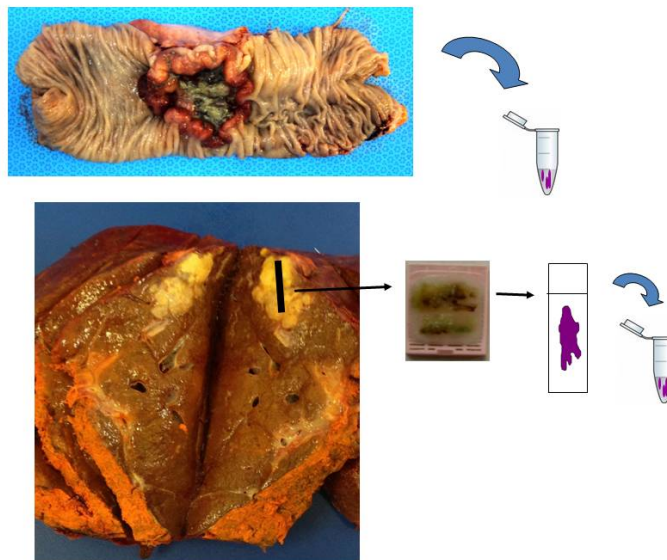


Figura 5 - Representação esquemática de obtenção de amostra de células tumorais da neoplasia primária e metastática.

c) Avaliar o impacto do processamento histológico na integridade do material genético dos carcinomas colorretais para realização de pesquisa de mutações no gene *KRAS* na prática médica.

Para isso analisamos comparativamente o status de mutação observado em tecidos que foram submetidos ao processamento histológico anátomo-patológico convencional de fixação com formol e embebimento em formalina e àqueles congelados armazenados no banco de tumor. Para pacientes que tiverem o tumor primário testado para a presença de mutação do gene *KRAS* através de obtenção de células por macrodissecção do tecido embebido em parafina avaliados nos experimentos de heterogeneidade citado acima, foi testado a presença de mutação nos tecidos congelados e armazenados no banco de tumor, através de macrodissecção de amostra tecidual.

d) Avaliar o impacto da quantidade relativa do estroma na sensibilidade de detecção das mutações do gene *KRAS*.

Para isso realizamos a quantificação da área representativa de células não neoplásicas presentes em meio à representação tumoral dos casos que foram submetidos à macrodissecção para estimar a porcentagem de células não neoplásicas que podem interferir com os resultados da pesquisa de mutação. Para um grupo de pacientes que teve o tumor primário testado para a presença de mutação do gene *KRAS* em material embebido em parafina e com obtenção de tecido através de macrodissecção, foi comparado os resultados da porcentagem de mutação detectada com a porcentagem de células neoplásicas e não neoplásicas presentes na amostra.

3.3 SELEÇÃO DOS CASOS E DADOS CLÍNICOS PATOLÓGICOS

A população de estudo consistiu de pacientes com diagnóstico anátomo-patológico comprovado de Adenocarcinoma Colorretal primário e/ou metastático, femininos e masculinos, de todas as idades, tanto operados no A.C.Camargo Cancer Center ou revisados neste serviço com posterior acompanhamento neste hospital, e que assinaram o termo de consentimento informado geral para uso de material biológico para pesquisa. Considerou-se elegível para o estudo os pacientes com neoplasia de cólon direito, esquerdo e reto, independentemente do recebimento ou não de quimioterapia, uso de anticorpos monoclonais ou radioterapia prévia. Os blocos de parafina foram retirados do arquivo do departamento de patologia do A.C. Camargo Cancer Center. Os dados clínicos e anatomopatológicos foram obtidos a partir dos prontuários eletrônicos do A.C.Camargo Cancer Center.

3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os casos de pacientes em que não havia representatividade de tumor suficiente para realizar a extração de DNA do material embebido em parafina.

3.5 MÉTODO

3.5.1 Seleção da área tumoral para extração de DNA

Foram utilizados neste trabalho amostras de DNA do tecido tumoral provenientes de material parafinado e de material congelado armazenado no banco de tumor do A.C.Camargo Cancer Center. Como rotina hospitalar, os espécimes provenientes da ressecção cirúrgica do segmento intestinal afetado pela neoplasia são submetidos ao processo de fixação com solução de formalina e posteriormente ao exame macroscópico. Na macroscopia são descritas as características da neoplasia, como tamanho, forma de crescimento e profundidade de infiltração. Posteriormente é realizada a representação macroscópica que consiste, em geral, em submeter 1 fatia de aproximadamente 2,5 cm comprimento por 3,0 mm de espessura da neoplasia a cada 1 cm de lesão. Os cortes da neoplasia são colocados em cassetes histológicos e submetidos ao processamento histológico convencional. Posteriormente é realizada a inclusão do material em parafina, e então realizados cortes de aproximadamente 5,0 mm de espessura de tecido para confecção das lâminas histológicas e emissão do laudo diagnóstico do paciente. Neste estudo, as lâminas histológicas coradas por hematoxilina e eosina referentes aos casos de carcinoma colorretal primário e/ou

metastático foram revistos por patologista (MPM) para confirmação diagnóstica e escolha das áreas representativas da neoplasia. Na lâmina corada com Hematoxilina e Eosina foi selecionada uma área circular de aproximadamente 1,0 cm com a maior quantidade de neoplasia viável e menor quantidade de estroma, muco e infiltrado inflamatório entre as células neoplásicas, com o mínimo de 30% de representatividade de células neoplásicas para realização da extração de DNA.

Para extração de DNA das amostras congeladas e armazenadas no banco de tumor foi realizada um corte histológico do material congelado em criótomo com posterior conferência por patologista da representatividade da amostra em relação à presença de no mínimo 30% de células neoplásicas na área de interesse, para posterior extração de DNA.

3.5.2 Quantificação da porcentagem de células não neoplásicas das áreas submetidas à macrodissecção

A quantificação das células não neoplásicas presentes na área de extração de DNA foi realizada através de análise digital de imagens. As Lâminas foram escaneadas através do equipamento Aperio® e as imagens analisadas através do software PanoramicViewer®. De cada área tumoral selecionada para extração de DNA foi realizada seleção manual por um patologista das células neoplásicas e da área total selecionada para estudo. Desta forma obteve-se a porcentagem de células tumorais e não tumorais presentes em cada amostra selecionada.

3.5.3 Extração de DNA

Para obtenção de amostra de DNA a partir do tecido parafinado, foram realizados 5 cortes histológicos de 5,0 um dos blocos de parafina previamente selecionados. As lâminas foram então submetidas a processo de desparafinização, através de 3 lavagens de 5 minutos cada em xilol e depois 2 lavagens de 2 minutos cada em álcool absoluto e posterior secagem. A área correspondente da neoplasia foi obtida utilizando-se a técnica de microdissecção manual (ou macrodissecção), que consiste em raspagem da área de interesse da lâmina com o auxílio de um bisturi estéril e transferência dos fragmentos de tecido para um tubo. A extração do DNA tumoral foi realizada utilizando o kit comercial de extração de macromoléculas da Qiagen (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit®) e seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram ressuspensas com água para um volume final de 40 ul. A solução de DNA foi quantificada utilizando-se um espectofotômetro (Nandrop 2000®), e a concentração mínima estabelecida da amostra de DNA necessária para posterior utilização foi de 10ng/ul. A extração de DNA do material congelado proveniente do banco de tumor foi realizada pelo banco de macromoléculas do A.C.Camargo Cancer Center.

3.5.4 Pesquisa de mutação do gene *KRAS*

O DNA extraído foi avaliado para presença de mutações nos códon 12, 13 e 61 do gene *KRAS* através da técnica de pirosequenciamento, utilizando-se o aparelho PyroMark™ Q24 (Qiagen). A técnica de pirosequenciamento consiste na realização de uma PCR (reação em cadeia da polimerase) inicial de amplificação da área de interesse com o uso de primers biotilados e obtenção de um amplicon de 250 pares

de base. Posteriormente, o amplicon é submetido a um processo de separação em fita simples do DNA (PyroMark Vacuum Workstation Q96) seguido da PCR de pirosequenciamento. Os primers usados na PCR e no sequenciamento foram do *KRAS* Pyro kit (Qiagen). O Pirosequenciamento foi realizado utilizando-se o Kit comercial PyroMark™ Gold Q24 reagent kit (Qiagen). Os resultados foram analisados para a presença de mutação usando o programa PyroMark Q24 Software 2.0. Para cada reação envolvendo os códons 12 e 13 foram incluídos controles positivos. Amostras de DNA provenientes de cultura de células comerciais foram utilizadas como controles positivos das reações. A linhagem utilizada como controle positivo de mutação no códon 12 foi LS174T (mutação c.35G>A) e o controle de mutação no códon 13 foi HCT116 (mutação c.38G>A). Para as reações envolvendo o códon 61 do gene *KRAS* foi utilizado somente amostras sem material genético como controle negativo da PCR.

3.5.5 Estabelecimento de Valor de Corte de Mutação do gene *KRAS* no Pirosequenciamento (*Pyromark* Q24)

O valor de corte a partir do qual foi considerada mutada uma amostra tumoral foi obtido através de experimentos de diluições seriadas de DNA de cultura de células com 50% de mutação de *KRAS* previamente isolada, com mutação conhecida c.38G>C no códon 13. As diluições foram realizadas utilizando-se DNA de cultura de células previamente caracterizada como não mutada. As concentrações das amostras mutada e selvagem foram ajustadas para 20ng/ul, e utilizado um total de 60ng de DNA para cada experimento (3ul de cada solução diluída). As diluições avaliadas foram de 40%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% e 1%.

O pirosequenciamento da cultura de células com 50% de mutação detectou 49% de mutação (Anexo 1A). A amostra diluída para 40% detectou mutação em 39% das células (Anexo 1B). As amostras diluídas para 20%, 15%, 10% evidenciaram mutação em 20%, 7% e 13% respectivamente (Anexo 1C, D e E). As amostras diluídas para 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, e 1% evidenciaram mutação em 9%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3% e 2% respectivamente (Anexo 1F-N). O pirosequenciamento da amostra selvagem detectou 1% de alelo alterado (Anexo 1O). Desta forma notamos que a técnica utilizada permite a detecção de níveis baixos de mutação do gene *KRAS*. Notamos diferenças entre os valores conhecidos de mutação e os valores encontrados de 8% (1 caso), 3% (1 caso), 1% (10 casos) e 0% (2 casos) (Figura 6). Para interpretação de um caso como mutado ou selvagem ainda deve-se considerar a altura dos picos das corridas, a existência de ruído experimental e a porcentagem de tumor nas áreas extraídas. Desta forma, em geral, consideramos como valor de corte seguro para o nosso experimento níveis acima de 4% de alelos mutados para considerar um caso mutado. E sempre considerando adicionalmente achados dos controles da corrida de cada caso.

3.5.6 Interpretação dos dados e Análise estatística

A interpretação dos dados obtidos foi realizado por médico patologista. Os dados obtidos foram anotados em planilhas Microsoft Excel. Os cálculos estatísticos foram realizados por meio do software Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versão 18.0. O teste do Qui-quadrado de Pearson foi utilizados para a análise da relação entre as variáveis categóricas. Os resultados considerados estatisticamente significativos foram aqueles com $p < 0,05$.

3.6 COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente - A.C.Camargo Cancer Center/SP na data 18/08/2011 sob o número 1543/11 (Anexo 8)

3.7 FINANCIAMENTO

Este projeto obteve auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Número do projeto 2011/08510-2. O projeto foi encerrado sem pendências.

4 RESULTADOS

4.1 DELINEAMENTO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Cento e dois casos de Carcinomas Colorretais com metástases foram elegíveis para o estudo, seguindo os critérios descritos anteriormente. Dos 102 casos estudados, 61 (59,8%) eram de pacientes masculinos e 41 (40,2%) de pacientes femininos. A idade média (\pm Desvio Padrão) foi de 57,13 (\pm 12,49) anos, com intervalo de 26-80 anos. A distribuição dos casos em relação à localização do tumor primário revelou 14 casos de neoplasias localizadas no cólon direito (13,7%), 55 casos cólon esquerdo (53,9%) e 33 casos de neoplasias localizadas no reto (32,4%). Em relação ao estadiamento tumoral (pTNM) (EDGE et al. 2010), 15 pacientes (14,7%) apresentaram estadio pT4 (infiltração de serosa intestinal), 79 pacientes (77,5%) apresentaram estadio pT3 (infiltração de gordura subserosa), 7 pacientes (7%) eram pT2 (infiltração de muscular própria e somente 1 paciente (1%) era pT1 (infiltração de submucosa). Metástase linfonodal estava presente em 65 (63,7%) casos. Dos casos estudados, 78 (76,5%) eram de material do tumor primário operado no A.C Camargo Cancer Center e 24 (23,5%) de material anátomo-patológico trazidos de laboratório externo para revisão pelo departamento de anatomia patológica do A.C.Camargo Cancer Center.

Em relação aos sítios de metástase, dos 102 casos estudados 86 apresentavam somente metástase hepática, 8 casos apresentam somente metástase pulmonar e 8 casos metástase pulmonar e hepática concomitante. Analisando a casuística em relação

a metástases linfonodais e metástase à distância, temos 57 pacientes que possuíam metástase hepática e linfonodo positivo, 4 casos com metástase pulmonar e linfonodo positivo e 4 casos com metástase hepática, pulmonar e linfonodal (Tabela 1).

Tabela 1 - Delineamento da população de estudo de pacientes com carcinoma colorretal em relação aos sítios de metástase

	Metástase Hepática	Metástase pulmonar	Metástase Hepática e pulmonar	Total
Linfonodo positivo	57	4	4	65
Linfonodo negativo	29	4	4	37
Total	86	8	8	102

A Delineamento da população de estudo em relação à frequência de mutação do gene *KRAS* e dos códons envolvidos

O status mutacional do gene *KRAS* foi testado em amostras do tumor primário dos 102 pacientes. Detectamos mutação do gene *KRAS* em 42 (41.2%) dos tumores primários (Figura 6).

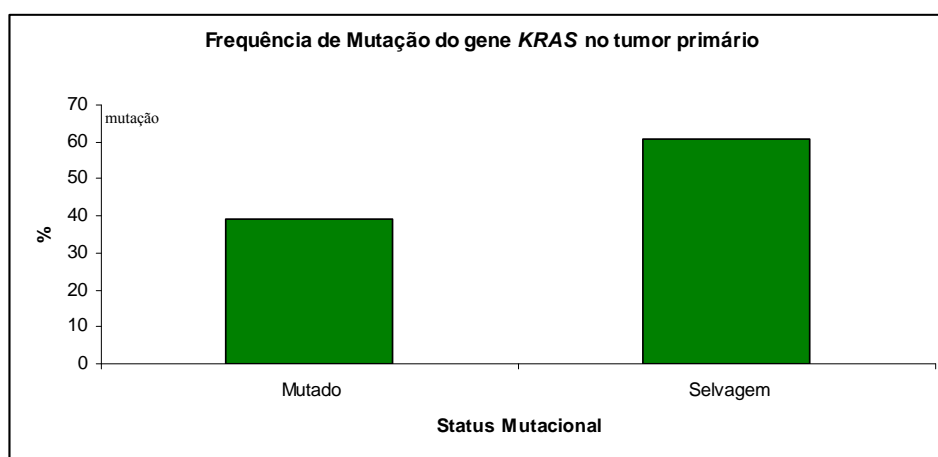


Figura 6 - Frequência de mutação do gene *KRAS* na população de estudo, considerando a neoplasia primária

A distribuição das mutações entre os códon avaliados evidenciou mutação do gene *KRAS* no códon 12 em 31 casos (74% dos casos mutados), no códon 13 em 10 casos (24%) e no códon 61 em 1 caso (2%) (Figura 7).

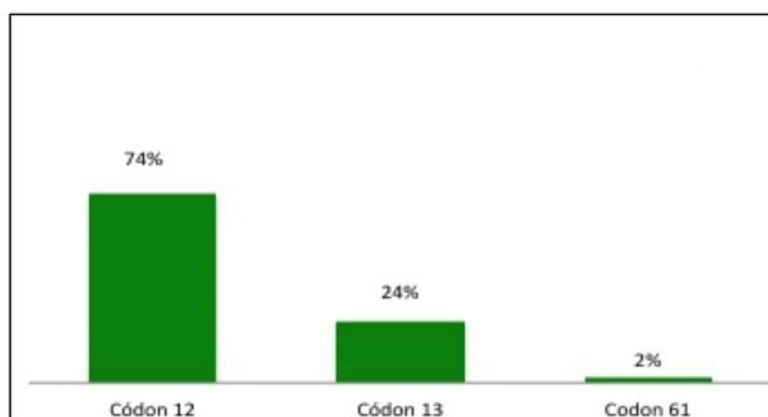


Figura 7 - Distribuição das mutações do gene *KRAS* entre os códon avaliados na população de estudo considerando a neoplasia primária.

Das 31 mutações observadas no códon 12, 15 casos (48%) evidenciaram mutação em *KRAS* c.35G>A (p.G12D), seguida por 11 casos (36%) c.35G>T (p.G12V), 2 casos (6%) c.34G>A (p.G12S), 2 (6%) c.34G>T (p.G12C) e 1 caso (4%) c.35G>C (p.G12A) (Figura 8). Das mutações observadas no códon 13, 9 (90%) foram c.38G>A (p.G13D) e 1 (10%) foi uma mutação silenciosa c.39G>T (p.G13G). A única mutação encontrada no códon 61 foi a c.183A>C (p.Q61H).

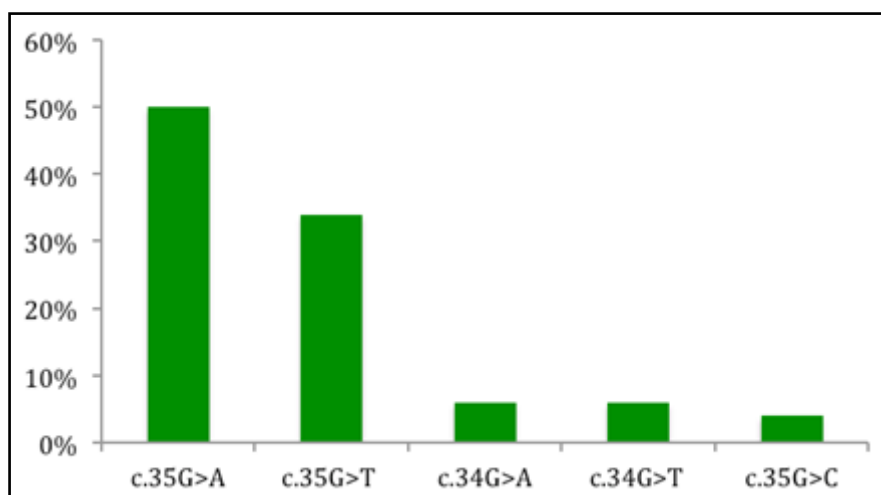


Figura 8 - Distribuição dos tipos de mutações encontradas no códon 12 do gene *KRAS* na população de estudo.

Avaliamos a associação de mutação do gene *KRAS* com dados epidemiológicos dos pacientes. Em relação ao sexo dos pacientes, encontramos que a mutação do gene *KRAS* está associada mais frequentemente ao sexo feminino ($p < 0,05$) nesta casuística. Agrupamos a localização dos tumores em tumores proximais (cólon direito) e distais (compreendendo cólon esquerdo e reto). Não foi encontrada associação de mutação do gene *KRAS* com a localização do tumor entre proximal e distal ($p = 0,076$), nem em relação à presença ou ausência de metástase linfonodal ($p = 0,834$). Em relação a profundidade de infiltração, os tumores foram agrupados em (pT1 mais pT2) e (pT3 mais pT4), e não foi identificado diferença estatística significativa em relação a mutação do gene *KRAS* entre esses grupos ($p = 0,699$). A descrição de variáveis clínico-patológicas dos pacientes do estudo em relação ao status mutacional do gene *KRAS* podem ser vistas na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição das variáveis clínico patológicas em relação à mutação do gene *KRAS* em carcinoma colorretal na população de estudo

Variável	Categoria	Status do gene <i>KRAS</i>		valor de p
		Mutado Freq (%)	Selvagem Freq. (%)	
Sexo	Feminino	22 (52%)	19 (48%)	0,042
	Masculino	20 (33%)	41 (67%)	
Localização do Tumor	Proximal	9 (64%)	5 (36%)	0,08
	Distal	33 (37%)	55 (62%)	
pT	T1/T2	3 (38%)	5 (62%)	0.699
	T3/T4	39 (41%)	56 (59%)	
Status linfonodal	Positivo	26 (40%)	38 (61%)	0,834
	Negativo	15 (42%)	21 (58%)	

Valor de p obtido pelo teste do qui-quadrado

4.2 PESQUISA DE HETEROGENEIDADE INTRATUMORAL ENVOLVENDO OS CÓDONS 12, 13 E 61

Dos 102 casos incluídos no estudo, foi possível obter amostra de DNA de mais de uma área do tumor primário em 91 casos (89%). Em 19 casos (21%) foi possível obtenção de amostra de tumor primário de duas áreas distintas e em 72 casos (79%) de 3 áreas diferentes. Em 11 casos somente uma área do tumor primário foi avaliada. Desta forma para avaliação de heterogeneidade intratumoral do status mutacional do gene *KRAS* foram avaliadas 254 amostras de tumor primário de 91 pacientes diferentes.

Foi observado heterogeneidade intratumoral na neoplasia primária em relação

à mutação do gene *KRAS* em 1 de 91 casos avaliados. Trata-se de caso designado neste estudo como "A" (número interno 130) do qual foram sequenciadas três áreas do tumor primário. Todas as áreas do tumor primário apresentavam mutação do gene *KRAS*, porém as mutações eram distintas entre as áreas. Em uma área a mutação observada foi c.35G>T com 24% de alelos mutados e nas outras duas áreas a mutação observada foi c.35G>A, com proporções de 48% e 57% de alelos mutados (Figura9). Deste mesmo paciente designado como "A" foi feita a pesquisa de mutação do gene *KRAS* na metástase linfonodal e hepática que evidenciou mutação c.35G>T em ambos os sítios de metástase. Os achados foram repetidos com novas extrações de DNA e novos sequenciamentos das áreas tumorais que confirmaram os mesmo achados reportados anteriormente, e portanto o caso foi considerado neste estudo como heterogêneo. Este caso trata-se de um paciente masculino de 59 anos operado no A.C.Camargo Cancer Center com CCR localizado no cólon direito e medindo 8,5 cm no maior diâmetro e apresentando infiltração tumoral até a subserosa. O paciente apresentava no espécime primário presença de invasão linfática e perineural, e ainda metástase em 6 de 27 linfonodos regionais avaliados. Não existe informação no prontuário eletrônico sobre a evolução deste paciente.

Os achados de heterogeneidade neste caso se correlacionam com as características morfológicas das áreas mutadas. A área com mutação c.35G>T apresentava característica glandular com formações tubulares por toda a área de extração. As duas áreas com a mutação c.35G>A apresentaram características bem semelhantes entre si, com achados remanescentes de adenoma viloso, e estruturas glandulares alongadas e papilíferas. As metástases linfonodais e hepáticas que apresentaram a mutação c.35G>T carregavam as mesmas características morfológicas encontradas

na área do tumor primário com a mutação c.35G>T, ou seja de estruturas glandulares tubulares pequenas, bem distinta das outras regiões do primário que apresentavam outro tipo de mutação (Figura 10).

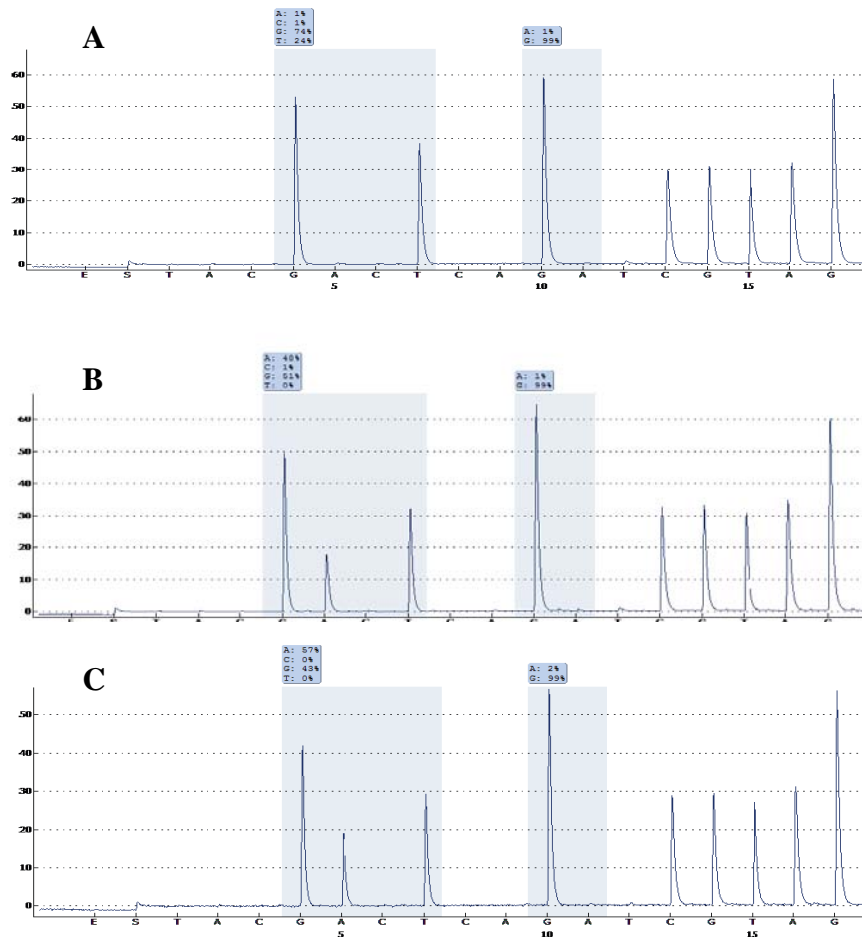


Figura 9 - Caso identificado como "A" de heterogeneidade intratumoral. Três áreas tumorais apresentando mutação do gene *KRAS* no códon 12. A) Uma área do tumor primário apresentando mutação c.35G>T. B) e C) duas áreas do tumor primário apresentando mutação c.35G>A do códon 12

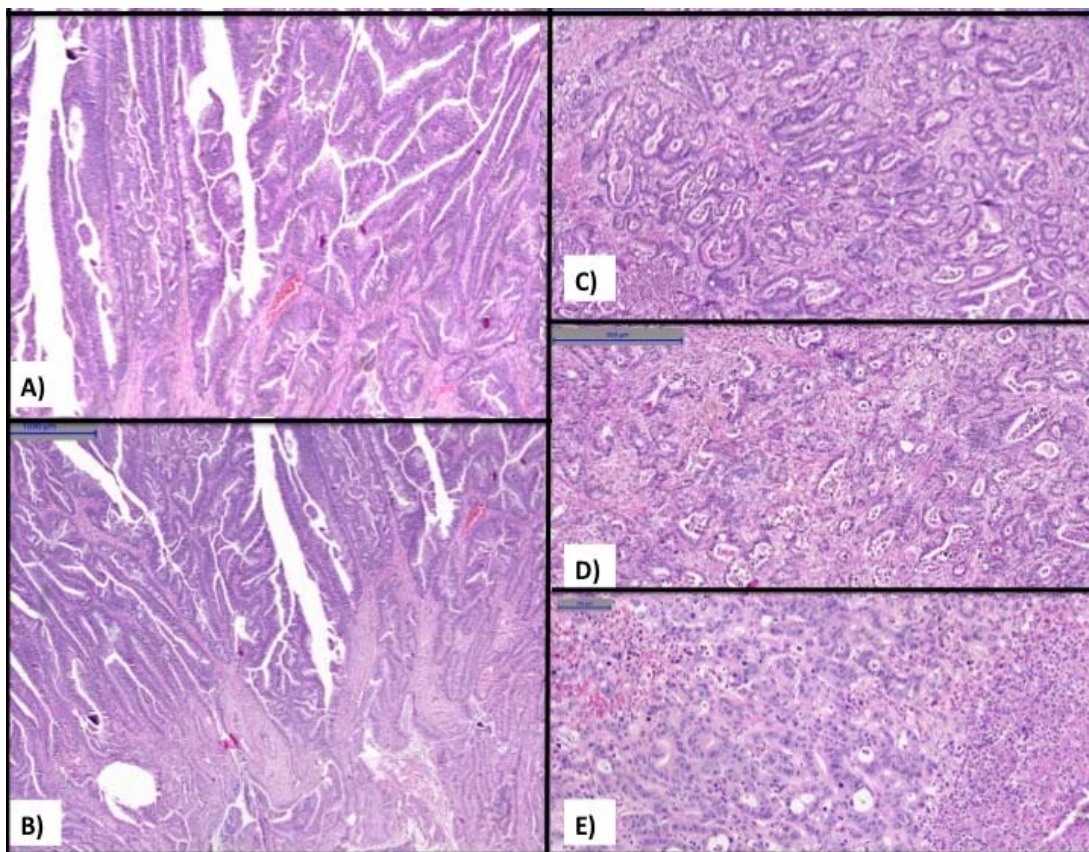


Figura 10 - Características morfológicas das áreas tumorais do tumor primário e da metástase do caso “A”. A e B) Característica morfológica túbulo-papilíferas de duas áreas do tumor primário que evidenciaram mutação c.35G>A do gene *KRAS*. C) Característica morfológica tubular da área do tumor primário que evidenciou mutação c.35G>T. D) Característica morfológica tubular da metástase linfonodal com mutação c.35G>T e E) característica morfológica tubular da metástase hepática com mutação c.35G>T.

Se considerarmos a população total do estudo de heterogeneidade intratumoral, ou seja, 91 pacientes, encontramos 1 paciente com heterogeneidade, representando uma taxa de 1.1% de heterogeneidade intratumoral neste estudo. Dos 91 pacientes avaliados nesse subgrupo, 38 apresentam mutação do gene *KRAS*. Se considerarmos que a heterogeneidade encontrada é relacionada ao tipo de mutação e não ao status mutacional, e considerarmos para determinação da taxa de heterogeneidade somente os casos com mutação do gene *KRAS* deste subgrupo avaliado, temos então 1 caso de heterogeneidade em 38 pacientes, ou seja, uma taxa

de 2,6% de heterogeneidade intratumoral em relação ao tipo de mutação encontrada no subgrupo de pacientes com *KRAS* mutado.

Sendo assim, o único caso de heterogeneidade intratumoral ao gene *KRAS* encontrada neste estudo foi relacionada ao tipo de mutação observada (Quadro 1).

4.3 PESQUISA DE HETEROGENEIDADE ENTRE TUMOR PRIMÁRIO E RESPECTIVA METÁSTASE EM RELAÇÃO À MUTAÇÃO DO GENE *KRAS*

O status mutacional do gene *KRAS* foi testado comparativamente entre o tumor primário e a metástase em 97 casos. O caso que apresentava heterogeneidade intratumoral na neoplasia primária não foi considerado neste momento para análise. Os sítios de metástase testados para mutação do gene *KRAS* dos 97 casos são assim distribuídos:

- 41 casos somente de metástase hepática
- 41 casos da metástase hepática e linfonodal
- 8 casos somente da metástase pulmonar
- 3 casos da metástase hepática, pulmonar e linfonodal
- 3 casos da metástase hepática e pulmonar
- 1 caso somente da metástase linfonodal.

Desta forma totalizaram-se 139 amostras de metástases de CCR sequenciadas neste estudo provenientes de 97 pacientes, sendo destes 90 já previamente homogêneos em relação ao status do *KRAS* na neoplasia primária conforme demonstrado anteriormente.

Dois casos apresentaram discordância do status do gene *KRAS* quando comparado o tumor primário e a metástase.

O caso identificado como “B” (número interno 46) possui apenas uma área do tumor primário avaliada, que juntamente com a metástase linfonodal resultou selvagem para o gene *KRAS*. A metástase hepática deste mesmo paciente resultou mutada, apresentando mutação c.35G>C com a porcentagem de 11% de alelos mutados (Figura 11). As amostras referentes à todas as áreas tumorais deste caso foram submetidas a nova extração de DNA e nos sequenciamentos, que confirmaram os achados. A morfologia do tumor primário evidencia áreas papilares, cribriformes, com extensas áreas de necrose, calcificações distróficas e áreas com células apresentando citoplasma eosinofílico amplo (escamóides). O padrão morfológico do componente metastático no linfonodo era predominantemente cribriforme com áreas de citoplasma eosinofílico amplo (escamóide) e apresentando ainda áreas de metaplasia óssea. A metástase hepática apresentava predominantemente aspecto cribriforme com componente “escamóide” e extensas áreas de calcificações distróficas (Figura 12). Trata-se de um paciente feminino de 34 anos com CCR do cólon esquerdo operada no A.C. Camargo Cancer Center, medindo 4,5 cm, infiltrando até a serosa e apresentando infiltração perineural. Apresenta metástase de adenocarcinoma em 4 de 27 linfonodos avaliados da gordura pericólica. A metástase hepática foi comprovada por estudo imunoistoquímico ainda na época do diagnóstico inicial de tratar-se de metástase de adenocarcinoma de trato gastrointestinal baixo, evidenciando positividade para os marcadores citoceratina 20 e CDX-2. A amostra utilizada como representativa de metástase hepática foi ressecada após 1 ano e 4 meses de evolução da doença da paciente. A paciente fez dois esquemas de

tratamento quimioterápico após ressecção da lesão primária com FOLFOX (12 ciclos) e FOLFIRI (6 ciclos) com objetivo de tratamento adjuvante e quimioterapia de conversão para ressecção da metástase. A paciente em questão não fez uso de anticorpo monoclonal inibidor do EGFR. Existia apenas representação de uma área tumoral da lesão primária por disponibilidade de material no arquivo do departamento de Anatomia Patológica. Não existe informação disponível sobre a evolução desta paciente no prontuário eletrônico do hospital.

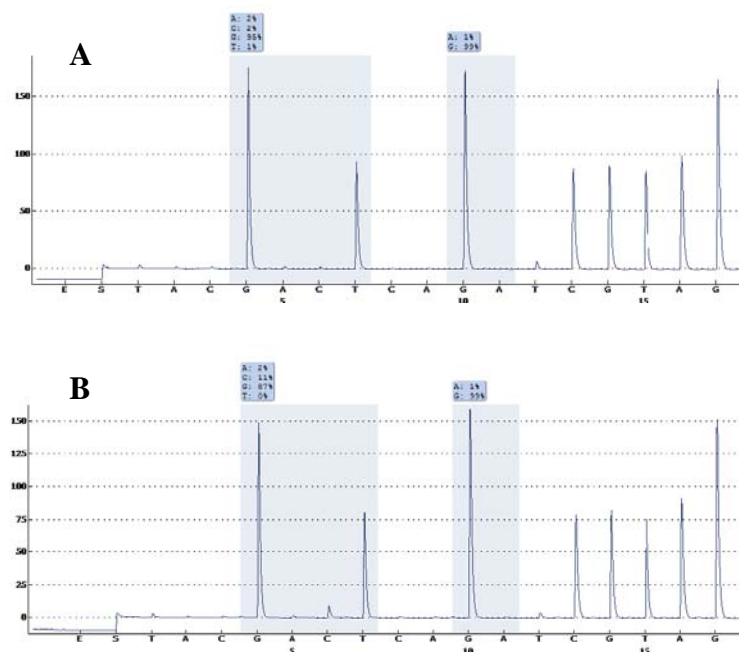


Figura 11 - Pirogramas das áreas tumorais do caso “B” de heterogeneidade primário versus metástase. A) O tumor primário apresenta-se selvagem para o gene *KRAS* e a metástase hepática B) apresenta mutação no códon 12 (c.35G>C) com 11% de alelos mutados.

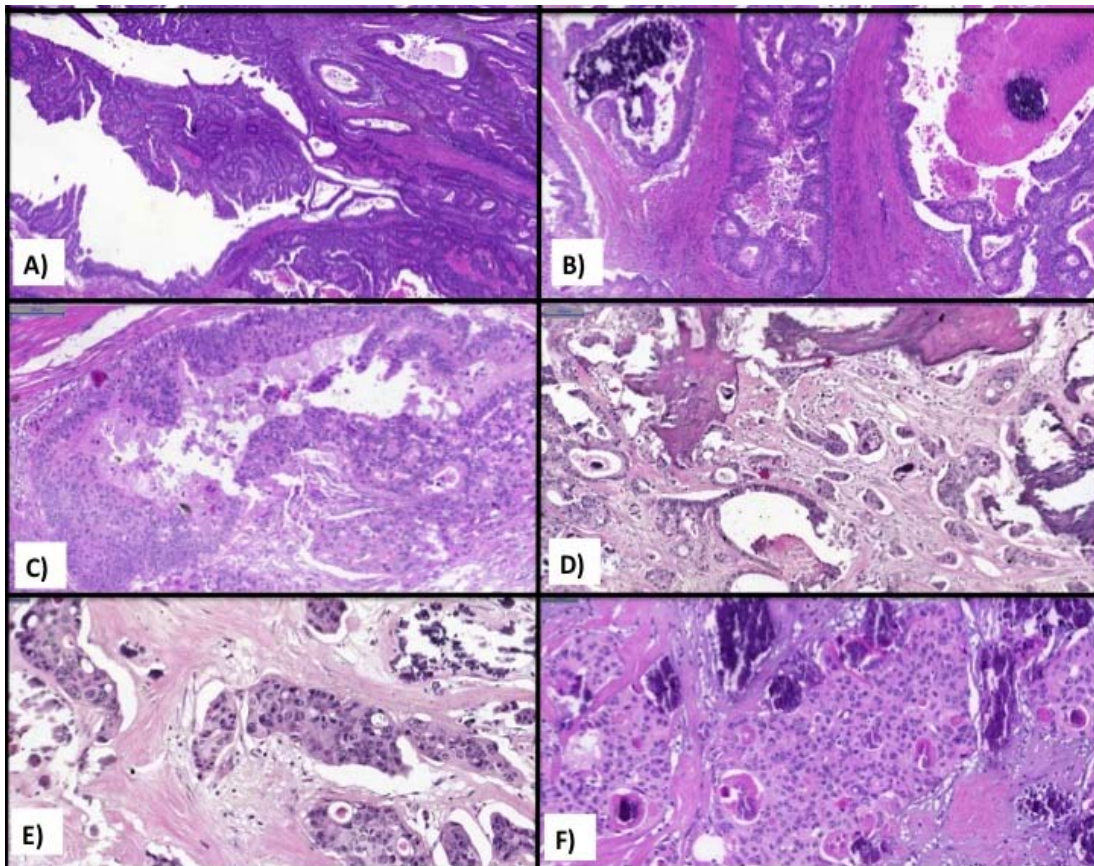


Figura 12 - Característica morfológica das áreas tumorais do caso “B”. A, B e C) Aspecto morfológico da área extraída do tumor primário evidenciando em A) morfologia papilar, B) padrão cribriforme com extensas áreas de necrose e calcificações distróficas C) componente de células escamóides. D) e E) Metástase linfonodal apresentando padrão glandular tubular com extenso componente escamóide e ossificação distrófica. F) Metástase hepática apresentando componente cribriforme e “escamóide”, além de extensas áreas de calcificações distróficas.

O caso identificado como “C” (146) apresentou duas áreas do tumor primário com mutação $c.35G>T$ e a metástase hepática selvagem. As áreas tumorais da neoplasia primária e da metástase foram submetidas a nova extração de DNA e a novas reações de sequenciamento que confirmaram os achados (Figura 13). Tratava-se de uma paciente feminina de 57 anos com diagnóstico de CCR do cólon esquerdo e metástase hepática sincrônica operada em serviço externo (ano de 2008) com

material revisado no A.C.Camargo Cancer Center. O tumor media 3,2 cm, infiltrava até o tecido adiposo subseroso, com invasão linfática e perineural presente e metástase em 2 de 14 linfonodos avaliados. A avaliação morfológica das áreas tumorais evidenciava padrão predominantemente tubular nas duas áreas sequenciadas da lesão primária e aspecto semelhante na metástase hepática (Figura 14). A amostra de metástase de tecido hepático avaliada referia-se ao mesmo momento cirúrgico da ressecção da lesão primária. Após a ressecção inicial a paciente apresentou nova metástase hepática, com história de realização de tratamento quimioterápico e metastesectomia hepática, porém neste momento a quantidade de neoplasia viável residual era muito pequena não permitindo realizar-se o teste de mutação de *KRAS* nesta amostra. Apesar da paciente apresentar metástase para linfonodo regional, a pesquisa de mutação na amostra de metástase linfonodal resultou inconclusiva mesmo após repetição do teste. A paciente evoluiu para óbito em 2012, 4 anos após diagnóstico da neoplasia.

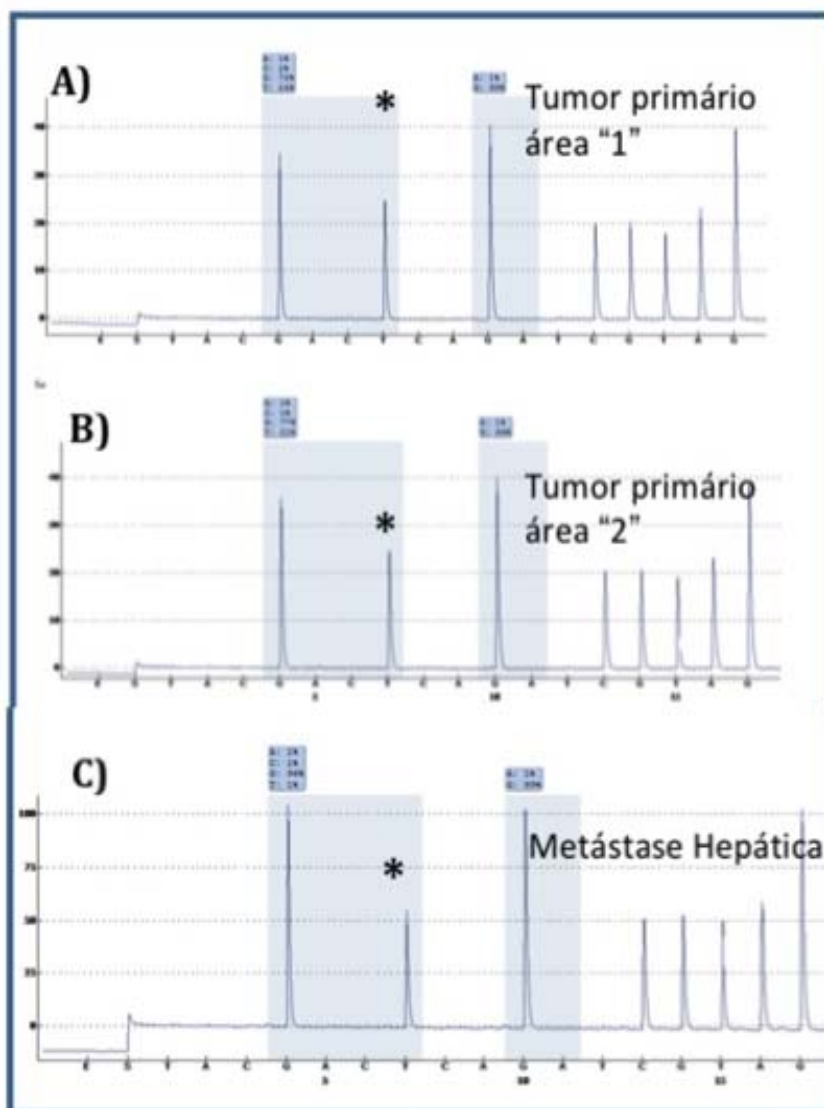


Figura 13 - Pirogramas das áreas tumorais do caso "C". A) e B) Duas áreas distintas do tumor primário apresentam mutação do gene *KRAS* no códon 12 (c.35G>T). D) Metástase hepática selvagem para o gene *KRAS*.

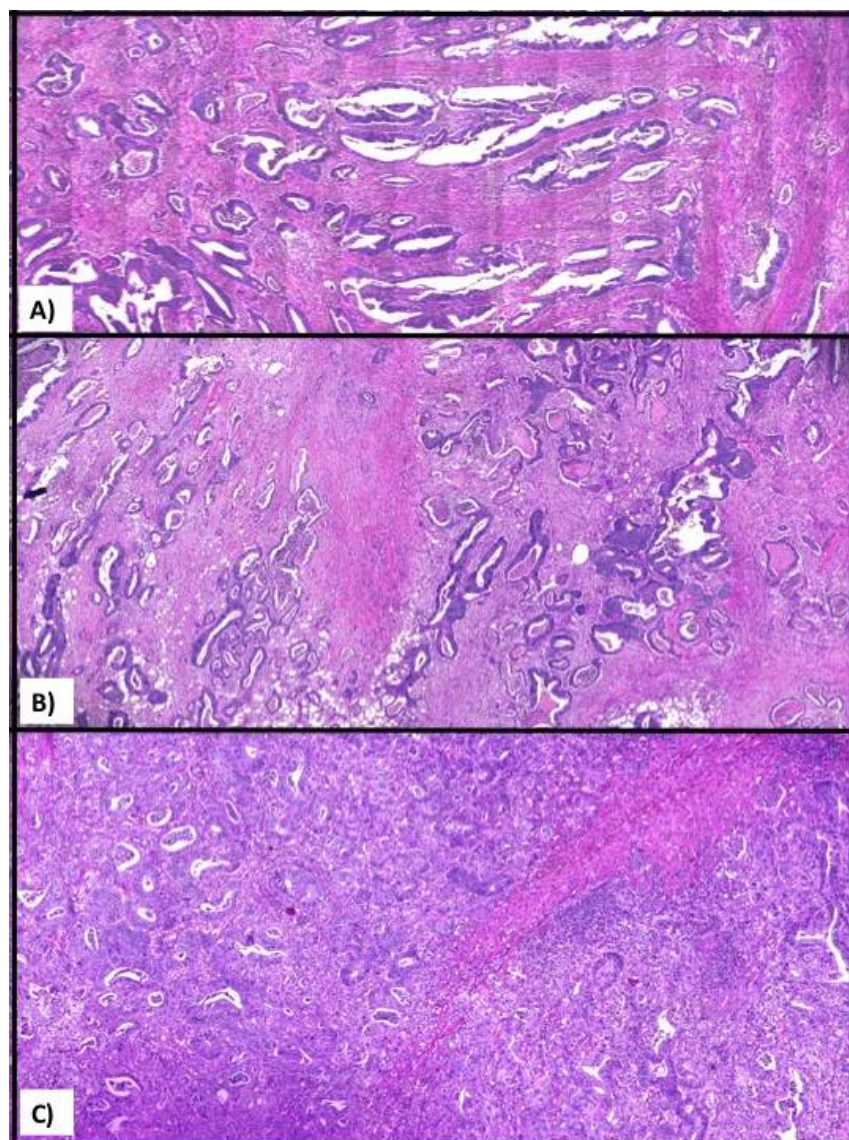


Figura 14 - Característica morfológica das áreas tumorais do caso “C”. A e B) Aspectos morfológicos predominantemente glandular tubular das duas áreas extraídas do tumor primário. C) Morfologia glandular tubular semelhante à da lesão primária na metástase hepática.

Quadro 1 - Casos que apresentaram heterogeneidade intratumoral ou primária *versus* metástase em relação ao gene *KRAS* em relação ao status mutacional nos diferentes focos da neoplasia

CASO	ÁREA 1	ÁREA 2	ÁREA 3	MET.LN	MET. HEPÁTICA	MET. PULMONAR
A	c.35G>T	c.35G>A	c.35G>A	c.35G>T	c.35G>T	NA
B	selvagem	NA	NA	selvagem	c.35G>C	NA
C	c.35G>T	c.35G>T	NA	NA	selvagem	NA

CCR= carcinoma colorretal; MET. = metástase; LN= linfonodo; NA= não se aplica

4.4 AVALIAÇÃO DA HETEROGENEIDADE TUMORAL ENTRE AMOSTRAS TUMORAIS DE PACIENTES COM TUMORES SINCRÔNICOS DO CÓLON

Durante a análise dos casos de heterogeneidade intratumoral encontramos além do caso reportado, um caso que apresentava heterogeneidade em relação ao status mutacional do gene *KRAS* entre duas áreas da neoplasia primária avaliadas. Ao refinar os dados clínicos do paciente foi identificado que tratava-se de paciente com CCR sincrônico, e que as áreas do tumor primário pesquisadas tratavam-se de duas lesões sincrônicas distintas do mesmo pacientes. Desta forma, resolvemos avaliar a heterogeneidade do status mutacional do gene *KRAS* em CCR sincrônicos. Para tanto selecionamos os casos de pacientes com tumor sincrônico operado no A.C.Camargo Câncer Center ou em serviço externo e que tiveram o espécime histopatológico revisado neste serviço. Para extração de DNA, foi realizada seleção de uma área representativa de cada lesão (Figura 15) através da técnica de macrodissecção. A pesquisa de mutação também foi realizada através de pirosequenciamento, e neste momento além da pesquisa de mutação do gene *KRAS* foi realizada pesquisa de

mutação no gene *NRAS*, já que recentemente também foi descrito como preditor negativo de resposta aos inibidores do EGFR e também pela escassez de trabalhos avaliando a heterogeneidade relacionadas aos genes *KRAS* e *NRAS* entre diferentes focos tumorais das neoplasias primárias sincrônicas.

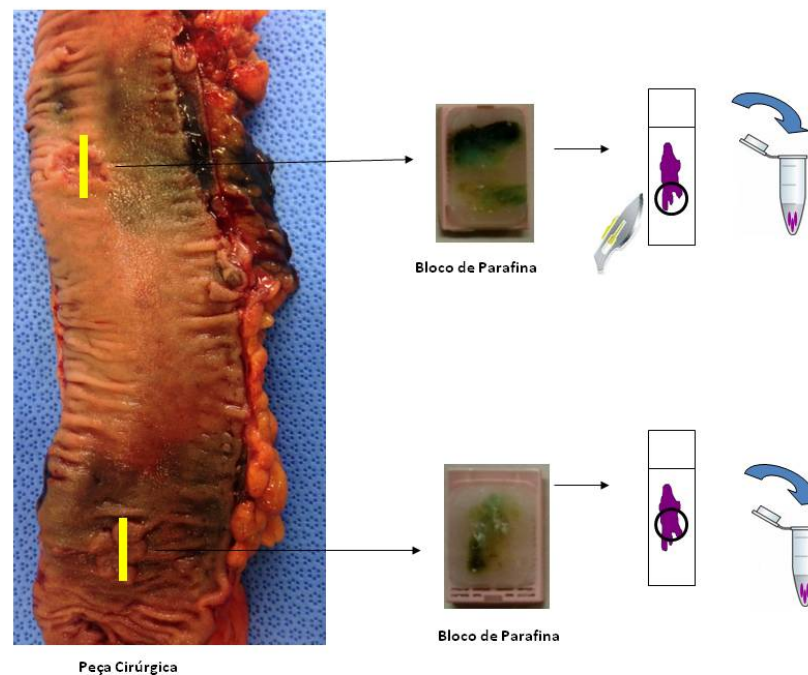


Figura 15 - Representação esquemática da obtenção de amostra de DNA de tumores sincrônicos. Uma área de cada um dos focos de neoplasia foi selecionada a partir de representação prévia macroscópica em diferentes blocos de parafina. Para cada bloco será realizado um corte histológico, de onde será obtida amostra de células neoplásicas e posterior extração de DNA.

Nossa casuística de pacientes com carcinoma colorretal sincrônico (CCR-S) consistiu de 8 pacientes, cinco do sexo masculino (62,5%) e três do sexo feminino (37,5%). A idade média foi de 71,5 anos. Todos os pacientes apresentaram duas lesões invasivas ao momento da ressecção cirúrgica (7 pacientes) ou da biópsia (1 paciente). Cinco pacientes apresentaram metástase linfonodal, tendo quatro destes

ainda metástase sistêmica (paciente 1- fígado, pleura e peritônio; paciente 2- pulmão e sistema nervoso central; paciente 5- pulmão e paciente 8 - fígado). Para descrição clinico-patológica dos casos de tumores primários sincrônicos vide Quadro 2. Encontramos heterogeneidade do status mutacional dos genes *RAS* (*KRAS* ou *NRAS*) em 6 (75%) dos 8 pacientes com CCR-S avaliados. Cinco (83%) pacientes (pacientes 2, 4, 5, 6 e 8) evidenciaram heterogeneidade relacionada ao status mutacional do gene *RAS* – uma lesão mostrou status selvagem de *RAS* e a outra mutado. Um (12,5%) paciente (paciente 1) mostrou heterogeneidade relacionada ao tipo de mutação do gene *KRAS* encontrada- as duas lesões primárias mostraram status mutado do gene *KRAS* no códon 12, contudo uma das lesões apresentou a mutação c.35G>A (p.G12D) e a outra c.34G>A (p.G12S). Apenas dois pacientes da nossa casuística de CCR-S não apresentaram heterogeneidade do status mutacional dos genes *RAS* (paciente 3 e 7). Ao avaliar o status mutacional das metástases linfonodais e sistêmicas dos pacientes com heterogeneidade do status mutacional da lesão primária, encontramos uma variedade de cenários: para casos com um tumor primário selvagem e outro mutado, temos três casos com a metástase selvagem (pacientes 4, 5 e 8) e um caso com a metástase mutada (paciente 2). Para o paciente com tipos diferentes de mutação em *KRAS* nas duas lesões primárias (paciente 1), tanto o linfonodo quanto a metástase hepática evidenciaram a mutação *KRAS* c.34G>A (Quadro 2).

Quadro 2 - Características Clínico-patológicas e dados de status mutacional do gene *KRAS* e *NRAS* em Carcinoma Colorretal Sincrônico

Paciente	Idade	Sexo	Localização	Tamanho	Estadio	<i>KRAS</i> status	Metástases
1	63	M	D (ascendente)	5,0 cm	T3	<i>KRAS</i> c.34G>A	Regional LN&fígado: <i>KRAS</i> c.34G>A
			E (descendente)	2,5 cm	T3	<i>KRAS</i> c.35G>A	
2	74	M	NI	5,8 cm	T3	<i>KRAS</i> c.35G>A	LN Paraaortico&SNC& Pulmão: <i>KRAS</i> c.35G>A
			NI	2,9 cm	T2	Selvagem	
3	83	F	D (ascendente)	2,8 cm	T2	Selvagem	Regional LN selvagem
			D (ascendente)	1,2 cm	T1	Selvagem	
4	83	M	D (ceco)	10,0 cm	T3	<i>KRAS</i> c.35G>T	Regional LN selvagem
			D (transverso)	3,7 cm	T1	Selvagem	
5	79	M	E (descendente)	3,5 cm	T3	<i>KRAS</i> c.35G>A	Pulmão selvagem
			E (descendente)	3,0 cm	T3	Selvagem	
6	64	F	D (transverso)	2,5 cm	T3	Selvagem	None
			D (transverso)	1,6 cm	T1	<i>KRAS</i> c.38G>A	
7	63	F	D (ascendente)	Biópsia	NA	<i>KRAS</i> c.35G>T	Fígado (clínica)
			D (transverso)	Biópsia	NA	<i>KRAS</i> c.35G>T	
8	69	M	E (descendente)	5,5 cm	T3	<i>NRAS</i> c.182A>T	LN e fígado selvagem
			E (descendente)	4,0 cm	T3	Selvagem	

D= cólon direito; E= cólon esquerdo; LN=linfonodo; Estadio=AJCC pT;NI= não informado M=masculino; F= feminino; D= direita; E=esquerdo; NA=não se aplica; LN= linfonodo; SNC= Sistema nervoso Central

4.5 AVALIAR A INFLUÊNCIA DA FIXAÇÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS CARCINOMA COLORRETAIS NA PESQUISA DE MUTAÇÕES NO GENE *KRAS* NA PRÁTICA MÉDICA

Para avaliar o impacto da fixação e processamento histológico dos carcinomas colorretais na pesquisa de mutações no gene *KRAS* na prática clínica, comparamos o status mutacional de 23 amostras de tumor primário processadas histologicamente e embebidas em formalina com o material congelado pareado

armazenado no banco de tumor. Os casos testados foram escolhidos baseados no status mutacional previamente pesquisado por pirosequenciamento no material parafinado nos experimentos de pesquisa de heterogeneidade de mutação entre o tumor primário e a metástase. Nenhum dos casos escolhido para os experimentos de comparação entre material parafinado e congelado apresentava heterogeneidade tumoral entre as diferentes áreas do tumor primário ou quando comparado com a metástase. Foram selecionados 23 casos que possuíam amostra de tecido congelado disponível no banco de tumor, com as seguintes características: 7 casos apresentando status selvagem do tumor primário parafinado, 16 casos mutados no tecido parafinado, destes, 10 casos apresentavam mutação no códon 12 (4 casos c.35G>A; 4 casos c.35G>T; 1 caso c.34G>A, 1 caso de c.35G>C e 6 apresentavam mutação no códon 13 (c.38G>A). A pesquisa de mutação do gene *KRAS* realizado através de pirosequenciamento mostrou concordância do status mutacional encontrado e em relação ao tipo de mutação observada entre o material congelado e o material parafinado em 96% dos casos (Quadro 3 e Figura 16). Um caso apresentou mutação no códon 12 (c.35G>C) no material parafinado de 3 regiões distintas do tumor primário, na metástase linfonodal e na metástase hepática, e resultou selvagem para os códons 12 e 13 do gene *KRAS* na pesquisa mutacional do material referente ao tumor primário congelado (Figura 17). O achado foi confirmado através da técnica de sequenciamento direto (Sanger). Adicionalmente, foi solicitado nova alíquota da amostra armazenada no banco de tumor, e o novo pirosequenciamento resultou selvagem. Adicionalmente foi feita checagem da lâmina histológica referente à área de extração de DNA da amostra, e a análise por patologista evidenciou tratar-se de amostra com mais de 90% de representatividade de células neoplásicas.

Quadro 3 - Comparação de status mutacional dos códons 12 e 13 do gene *KRAS* entre amostras de Carcinoma Colorretal fixadas em formalina e congeladas do mesmo paciente

Amostra	Tumor congelado	Códon alterado	Tipo de Mutação	TumorParafinado	Códon alterado	Tipo de Mutação
11	MUTADO	12	c.35G>A	MUTADO	12	c.35G>A
60	MUTADO	12	c.35G>A	MUTADO	12	c.35G>A
81	MUTADO	12	c.35G>A	MUTADO	12	c.35G>A
172	MUTADO	12	c.35G>A	MUTADO	12	c.35G>A
12	MUTADO	12	c.35G>T	MUTADO	12	c.35G>T
49	MUTADO	12	c.35G>T	MUTADO	12	c.35G>T
62	MUTADO	12	c.35G>T	MUTADO	12	c.35G>T
144	MUTADO	12	c.35G>T	MUTADO	12	c.35G>T
35	MUTADO	12	c.34G>A	MUTADO	12	c.34G>A
23	SELVAGEM	NA	NA	MUTADO	12	c.35G>C
3	MUTADO	13	c.38G>A	MUTADO	13	c.38G>A
8	MUTADO	13	c.38G>A	MUTADO	13	c.38G>A
17	MUTADO	13	c.38G>A	MUTADO	13	c.38G>A
61	MUTADO	13	c.38G>A	MUTADO	13	c.38G>A
75	MUTADO	13	c.38G>A	MUTADO	13	c.38G>A
80	MUTADO	13	c.38G>A	MUTADO	13	c.38G>A
64	SELVAGEM	-	-	SELVAGEM	-	-
111	SELVAGEM	-	-	SELVAGEM	-	-
113	SELVAGEM	-	-	SELVAGEM	-	-
114	SELVAGEM	-	-	SELVAGEM	-	-
122	SELVAGEM	-	-	SELVAGEM	-	-
129	SELVAGEM	-	-	SELVAGEM	-	-
131	SELVAGEM	-	-	SELVAGEM	-	-

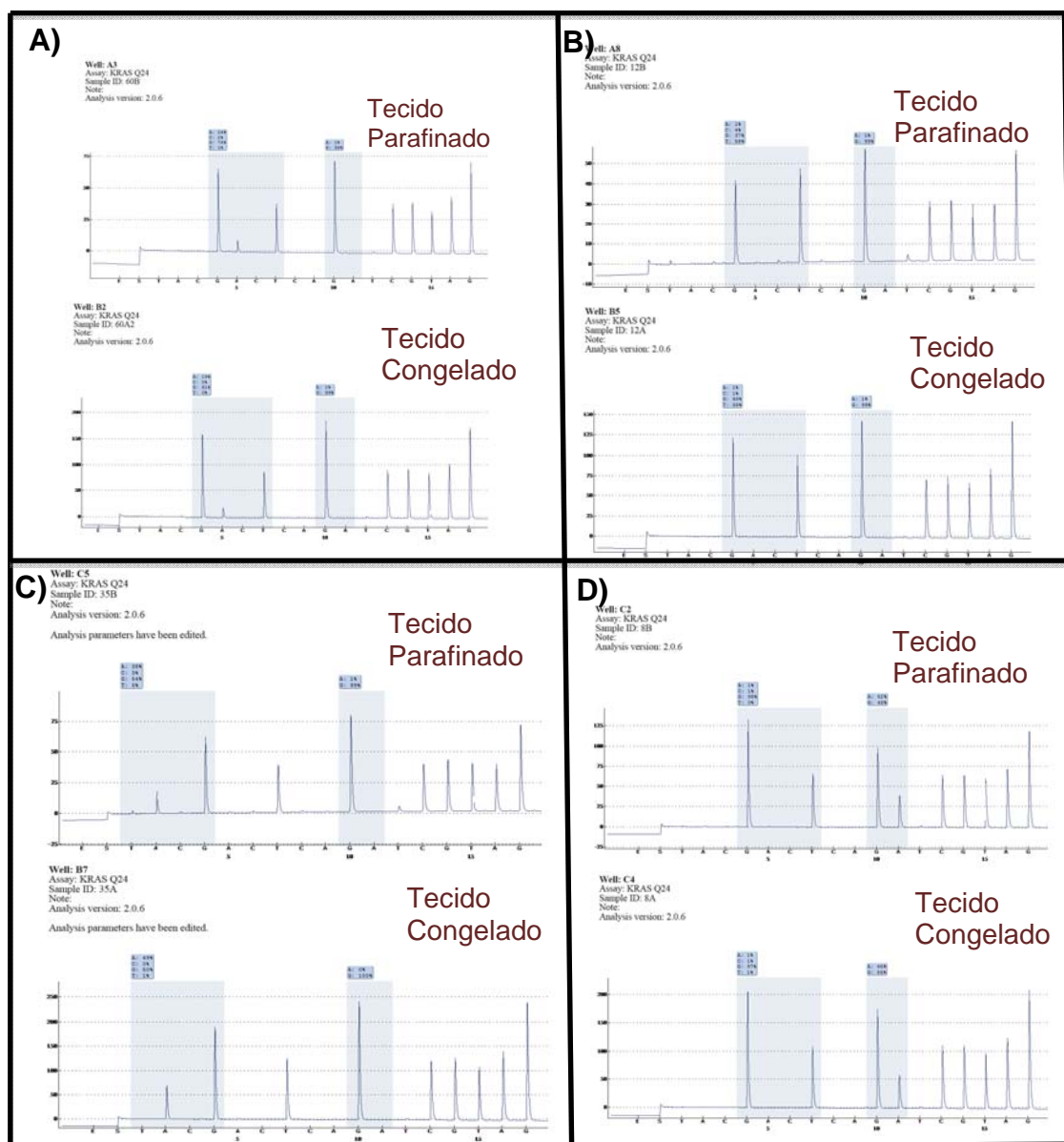


Figura 16 - Pirogramas comparativos evidenciando mutações iguais no gene *KRAS* entre amostras congeladas e fixadas em formalina. A) Mutação no códon 12 c.35G>A. B) Mutação no códon 12 c.35G>T. C) Mutação no códon 12 c.34G>A. D) Mutação no códon 13 c.38G>A.

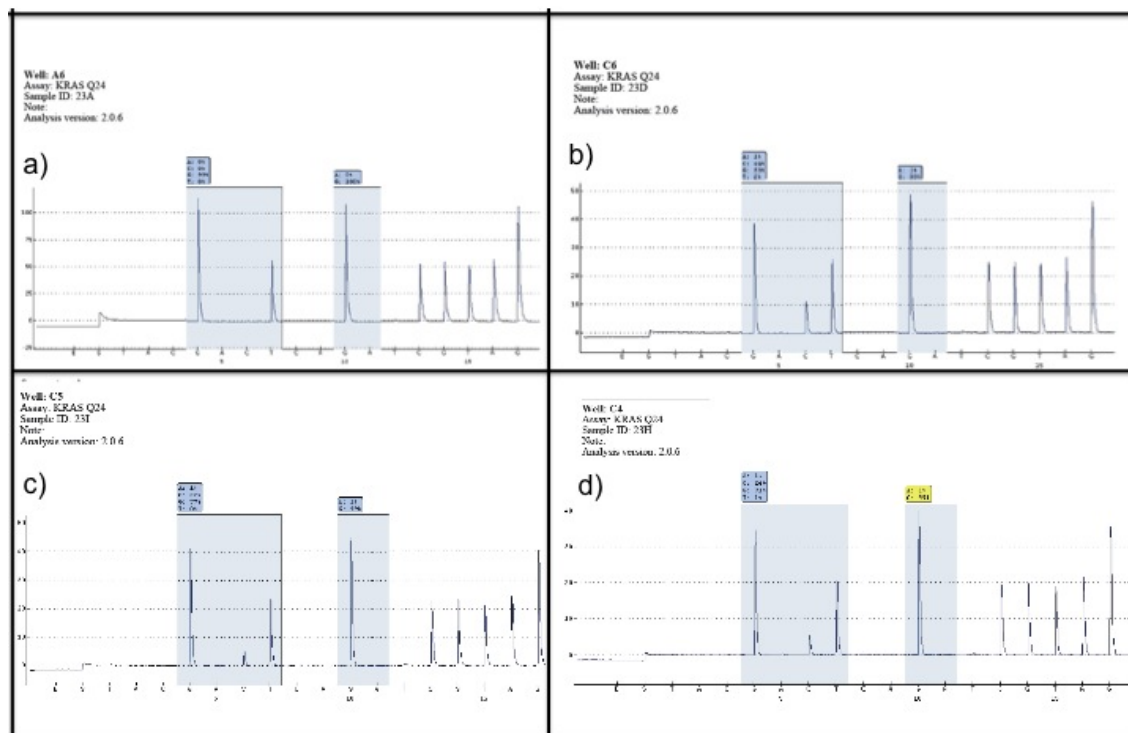


Figura 17 - Pirogramas da amostra identificada internamente como “23” evidenciando. A) status selvagem para amostra do tumor primário congelada, B) amostra de tumor primário com mutação c.35G>C, C) metástase pulmonare D) metástase hepática com mutação c.35G>C.

Considerando que a mutação c.35G>C no códon 12 é uma mutação pouco frequente, que os erros de pareamento de DNA descritos com o uso de formalina envolvem a citosina, e que nenhum dos outros tipos de mutação pesquisada resultaram em discordância quando comparado o material parafinado e congelado, investigamos a possibilidade da mutação c.35G>C encontrada no material parafinado resultar de erro de pareamento secundário ao processamento histológico. Para tal, selecionamos do banco de dados da rotina diagnóstica de pesquisa de mutação do gene *KRAS* em pacientes com CCR do AC Camargo Cancer Center os casos que apresentaram mutação c.35G>C do códon 12 do gene *KRAS* e que havia disponível amostra de tecido congelado no banco de tumor. Foram levantados 8 casos

armazenados congelados no banco de tumor que contemplavam estes critérios e foi realizada a pesquisa de mutação do gene *KRAS* nos códons 12 e 13 das amostras congeladas respectivas. Todos os 8 casos que apresentavam a mutação no códon 12 c.35G>C no material parafinado apresentaram o mesmo achado de mutação no material congelado (Quadro 4). Adicionalmente testamos como controle dois casos de mucosa não neoplásica congeladas, que evidenciaram ausência de mutação do gene *KRAS*.

Quadro 4 - Comparação de status mutacional dos casos parafinados com mutação c.35G>C no códon 12 com material congelado e armazenado em banco de tumor.

Amostra	Tumor congelado	Códon alterado	Tipo de Mutação	TumorParafinado	Códon alterado	Tipo de Mutação
C 280T	MUTADO	12	c.35G>C	MUTADO	12	c.35G>C
C 281T	MUTADO	12	c.35G>C	MUTADO	12	c.35G>C
C 282T	MUTADO	12	c.35G>C	MUTADO	12	c.35G>C
C 283T	MUTADO	12	c.35G>C	MUTADO	12	c.35G>C
C 284T	MUTADO	12	c.35G>C	MUTADO	12	c.35G>C
C 286T	MUTADO	12	c.35G>C	MUTADO	12	c.35G>C
C 287T	MUTADO	12	c.35G>C	MUTADO	12	c.35G>C
C 288T	MUTADO	12	c.35G>C	MUTADO	12	c.35G>C

4.6 IMPACTO DA QUANTIDADE RELATIVA DO ESTROMA NA SENSIBILIDADE DE DETECÇÃO DAS MUTAÇÕES DO GENE *KRAS*

Oito casos mutados foram selecionados para o estudo de avaliação do impacto da quantidade relativa do estroma na sensibilidade de detecção das mutações do gene *KRAS*. Foram selecionados os casos que possuíam análise de tecido congelado por serem os casos que apresentavam maior número de áreas sequenciadas

no estudo. As regiões previamente selecionadas para extração do DNA foram avaliadas através de sistema de digitalização de imagem. A avaliação foi feita por patologista e consistiu em selecionar em sistema digital a área correspondente à extração inicial por microdissecção manual da lâmina (Figura 19A), e posteriormente de forma manual marcar as células neoplásicas representadas nesta área (Figura 19B). Desta forma obteve-se razão de quantidade de representação de células tumorais em meio ao tecido do qual foi extraído o DNA. Os resultados foram obtidos em forma de porcentagem nas diferentes regiões testadas de um mesmo tumor (Quadro 5). Notou-se na maior parte dos casos que a proporção menor de células tumorais em determinada área do tecido confere menores porcentagens de alelos mutados em diferentes áreas tumorais de um mesmo paciente, contudo os achados não são lineares.

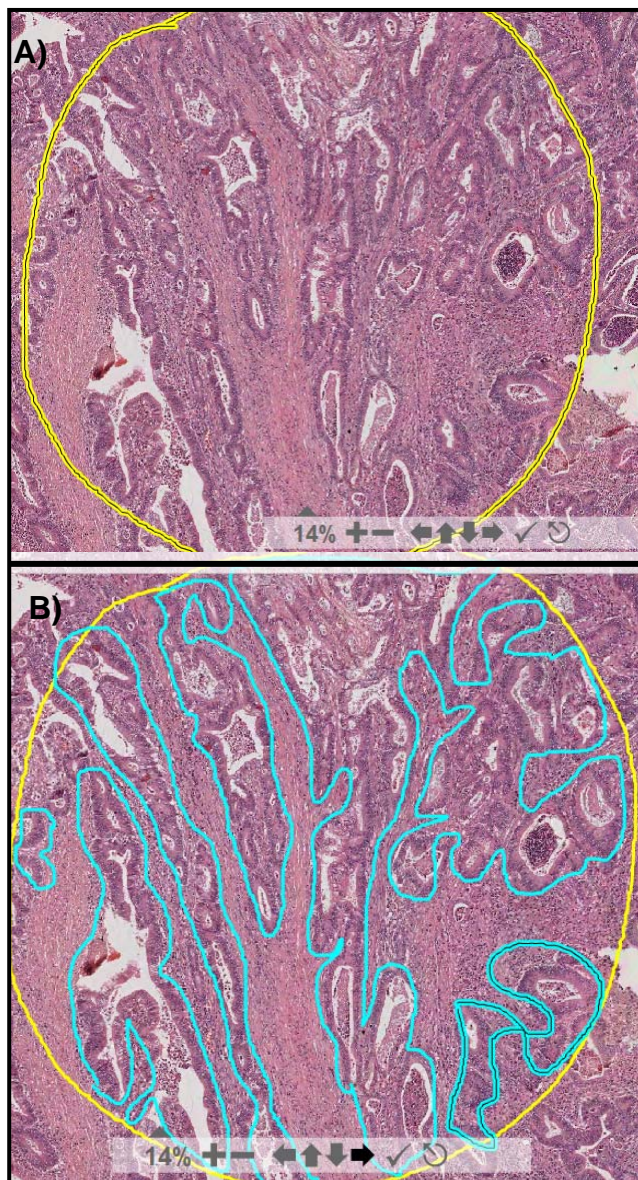


Figura 18 - Representação esquemática da análise digital de imagens para avaliação da porcentagem de células tumorais na área de extração de DNA. A) Em amarelo observa-se a área total selecionada para extração de DNA. B) Em azul observa-se a área de células neoplásicas selecionadas manualmente por patologista. A razão final é dada pela divisão das duas regiões marcadas Neste caso representativo, encontrou-se 48% de células neoplásicas nesta amostra.

Quadro 5 - Relação das porcentagens de células neoplásicas nas áreas neoplásicas submetidas à extração de DNA a porcentagem de alelos mutados do gene *KRAS*

% Tumor área "C"	% alelos mutados "C"	% Tumor área 1	% alelos mutados "1"	% Tumor área 2	% alelos mutados "2"	% Tumor área 3	% alelos mutados "3"
62,75	39	61,93	23	44,28	7	NA	NA
66	52	60,88	45	58,94	60	NA	NA
48,65	58	38,19	38	36,56	29	NA	NA
31,39	49	30	38	30	38	NA	NA
40	46,06	38	57,14	26	40	NA	NA
69,83	77	60,66	75	41	19	NA	NA
79,96	51	54,1	17	50,44	36	54,93	21
82	47	64,84	30	61,94	45	46,83	30

Área "C" refere-se à área proveniente do tecido congelado do tumor primário. Áreas 1, 2 e 3 referem-se às áreas distintas do tumor primário proveniente de material parafinado. Cada linha refere-se à um paciente com representação de várias áreas diferentes do tumor primário. NA= não se aplica.

5 DISCUSSÃO

O status mutacional do gene *KRAS* foi avaliado com sucesso em pelo menos uma área do tumor primário dos 102 casos incluídos no estudo. Em algumas áreas de determinados casos não foi possível obtenção de amostras de DNA adequadas para realização do sequenciamento. A inadequação deveu-se a quantidade insuficiente de DNA ou a qualidade inadequada do DNA. Artefatos pré-analíticos de processamento, como a não utilização de formol tamponado podem interferir com a qualidade do material genético da amostra parafinada (HEWITT et al. 2008). Em nossa casuística, alguns casos eram de pacientes que tiveram a cirurgia ou do tumor primário ou da metástase em serviço externo.

Os casos pesquisados neste estudo incluem aqueles operados desde o ano de 2000 até o ano de 2014, desta forma na nossa casuística foi possível a obtenção de DNA tumoral a partir de material parafinado com qualidade suficiente para realização de estudo de sequenciamento do gene *KRAS* em até 14 anos após inclusão do material em parafina. Os achados são compatíveis com dados já publicados anteriormente mostrando a possibilidade de se obter amostra de ácidos nucleicos para estudos moleculares de material com 20 anos de armazenamento, e até do século passado (HEWITT et al. 2008).

A população estudada apresenta frequência de mutação do gene *KRAS* semelhantes às descritas em diversas séries, ou seja, de aproximadamente 40%. A distribuição das mutações encontradas entre os códons 12, 13 e 61, assim como os tipos de substituições de nucleotídeos mais frequentemente encontradas, mostram

que a maior parte das mutações encontram-se no códon 12, e destas a mais frequente é a c.35G>A, achados também semelhantes ao descrito na literatura por diversos autores (BRINK et al. 2003, AMADO et al. 2008; PLESEC e HUNT 2009, SETH et al. 2009; WANG et al. 2010). Estes dados nos permite afirmar que a população de estudo é representativa dos achados mundiais e que a técnica de sequenciamento utilizada reproduz os achados da literatura.

Adicionalmente, caracteriza os achados de mutação do gene *KRAS* na população brasileira de pacientes com Carcinoma Colorretal. Apenas um estudo prévio caracterizou pacientes brasileiros em relação à frequência de mutação do gene *KRAS*, reportando uma frequência de 31,9% de mutação (GIL FERREIRA et al. 2014), achado um pouco inferior ao relatado na literatura. Uma das explicações para a menor frequência de mutação reportada por esse autor em comparação com a nossa casuística pode estar relacionado à utilização da técnica de sequenciamento direto no estudo deles, o que confere menor sensibilidade para detecção de mutações pontuais quando comparado ao pirosequenciamento utilizado no nosso estudo (OGINO et al. 2005).

Existem diversas técnicas moleculares disponíveis para detecção de mutações. Algumas delas exibem os resultados como mutado ou selvagem, sem discriminar o códon envolvido ou a alteração de nucleotídeos, além de não possibilitarem a quantificação dos alelos mutados. A técnica utilizada neste trabalho para identificação das mutações foi o pirosequenciamento, que é uma técnica de sequenciamento baseado no sequenciamento por síntese, em que após a incorporação de cada nucleotídeo à sequência de DNA de interesse existe a liberação de um pirofosfato que é transformado em um sinal de emissão de luz captado pelo

equipamento, e cuja intensidade é proporcional à quantidade de nucleotídeos incorporados na cadeia de DNA. O pirosequenciamento é uma técnica sensível possibilitando a identificação de mutações mesmo em pequenas proporções da população celular, permite a descrição do códon e o tipo de substituição de nucleotídeo envolvido e ainda permite a quantificação de alelos mutados, sendo portanto padrão ouro para detecção de mutação do gene *KRAS* em CCR (OGINO et al. 2005). Na nossa casuística, a técnica de pirosequenciamento mostrou ser adequada para pesquisa de mutação do gene *KRAS* já que reproduz as taxas de mutações encontradas nos grandes estudos de referências. Estabelecemos como valor de corte para considerar um caso mutado a presença de 4% de alelos mutados interpretados em conjunto com a porcentagem de células neoplásicas da amostra de tumor escolhida e os níveis de leitura de cada reação individualmente. Outros estudos demonstraram a alta sensibilidade e especificidade da técnica de pirosequenciamento para pesquisa de mutações com uso de valores de cortes semelhante (SUNDSTRÖM et al. 2010).

Não encontramos diferenças estatísticas na nossa casuística quando comparamos a presença de mutação no gene *KRAS* com a localização direita ou esquerda do tumor, a presença de metástase linfonodal ou os grupos de estadiamento (pT1+pT2 versus pT3+pT4). Encontramos diferença estatística em relação a presença de mutação do gene *KRAS* em pacientes do sexo feminino quando comparados com o sexo masculino. Este achado contradiz achados prévios da literatura de grandes casuísticas que não demonstraram associação de sexo com mutação do gene *KRAS* (ANDREYEV et al. 1998; WANGFJORD et al. 2013). Contudo estes achados poderiam refletir uma característica particular da população

brasileira, já que GIL FERREIRA et al. (2014) reportou o mesmo achado na população brasileira estudada de CCR. Alguns estudos prévios demonstraram associação da mutação do gene *KRAS* com tumores localizados no cólon direito (ELNATAN et al. 1996; SAMOWITZ et al. 2000; ROSTY et al. 2013; GONSALVES et al. 2014) enquanto que outros estudos não encontraram essa associação (ANDREYEV et al. 1998; BRINK et al. 2003). Não foi objetivo do estudo avaliar o papel prognóstico do gene *KRAS* nos carcinomas colorretais.

Apesar das neoplasias em geral possuírem altas taxas de heterogeneidade genética (BURRELL et al. 2013), e especificamente o carcinoma colorretal ser um tumor cuja carcinogênese está relacionada a diversas vias moleculares, observamos taxa muito pequena de heterogeneidade relacionada ao status mutacional do gene *KRAS* envolvendo os códons 12, 13 e 61 tanto relacionado à diferentes regiões intratumorais quanto relacionado à neoplasia primária e metastática nos carcinomas colorretais (lesão única). Nesta casuística encontramos heterogeneidade em relação ao gene *KRAS* em 3 (3%) de 102 pacientes avaliados. Heterogeneidade intratumoral na neoplasia primária foi vista em apenas 1 caso (1%), e heterogeneidade quando comparado o tumor primário e a metástase em 2 (2%) casos. Dos casos heterogêneos, 2 apresentaram heterogeneidade relacionada ao status mutacional (2%) e 1 caso (1%) ao tipo de mutação encontrada.

Em relação a heterogeneidade intratumoral, observamos apenas o tipo de heterogeneidade relacionada ao tipo de mutação, com manutenção do status de mutado, porém com diferentes nucleotídeos alterados em relação às áreas do tumor primário pesquisadas. Em relação a heterogeneidade entre o tumor primário e a metástase, observamos tanto o exemplo de presença de tumor primário selvagem e

metástase mutada, quanto o inverso. Em todos comparativos entre tumor primário e metástase os casos a heterogeneidade foram relacionados ao status mutacional, em nenhum dos casos a deveu-se a diferenças em relação ao tipo de mutação. Em nenhuma das situações a heterogeneidade se deu pelo envolvimento de diferentes códon.

O maior estudo de revisão recente sobre os trabalhos que avaliaram o status de mutação do gene *KRAS* no tumor primário e suas respectiva metástases foi publicado em 2010 e avaliou 18 estudos (KNIJN et al. 2011). Notamos neste estudo de revisão que a heterogeneidade do status mutacional do gene *KRAS* começou a ser estudado mais recentemente, com a maioria dos trabalhos datados após 2006. Segundo os dados do estudo de revisão vemos que a taxa de heterogeneidade relatada entre os 18 estudos revisados varia desde 0% a 31% de heterogeneidade, contudo a maior parte dos trabalhos apresenta números pequenos de pacientes avaliados, o que pode conferir frequência aumentada de heterogeneidade. Apenas 2 dos estudos avaliados compararam o status mutacional do gene *KRAS* entre o tumor primário e a metástase com número de pacientes semelhante ao estudado neste trabalho (mais de 90 pacientes). Um dos estudos (CEJAS et al. 2009) comparou o status mutacional do tumor primário e da metástase hepática em 93 pacientes. A técnica utilizada foi a de sequenciamento direto, e encontrou diferença em relação ao status mutacional em 5% dos casos. Outro autor SANTINI et al. (2008) comparou o status mutacional de 99 pacientes também por sequenciamento direto e encontrou taxa de heterogeneidade em 4% dos casos. Este mesmo autor (Knijin et al. 2011) comparou o status mutacional do gene *KRAS* em 305 casos de CCR primário e metastático pareados através da técnica de sequenciamento direto. Neste estudo foi testado somente uma

área do tumor primário e a metástase hepática. Dos casos identificados como heterogêneos foi testada mais de uma área do tumor primário. Foi encontrada heterogeneidade em 11 dos 305 pacientes avaliados, perfazendo uma taxa de heterogeneidade de 3.6%. Destes 11 pacientes, 7 desenvolveram metástase sincrônica e 4 metacrônica. Dos 11 pacientes, 5 tinham status mutado no tumor primário e selvagem na metástase hepática, um paciente tinha status selvagem no primário e mutado na metástase e 5 pacientes tinham o primário e a metástase mutados, porém com mutações distintas, sendo que um desses pacientes era representado por paciente com tumor sincrônico primário do colon. Desta forma dos 11 casos de heterogeneidade identificados, apenas 6 eram clinicamente relevantes. Após este estudo de revisão, outros autores reportaram dados comparativos do status mutacional do gene *KRAS* entre o tumor primário e a metástase. DÓCS et al. (2014) comparou o status mutacional do gene *KRAS* em 18 e 665 casos de tumores recidivados e metastáticos respectivamente, e encontrou discordância em apenas 6 casos. Já outro autor avaliando o status mutacional do gene *KRAS* entre diferentes áreas do tumor primário em 75 casos de CCR revelou heterogeneidade de 50% quando comparado o centro e a periferia do tumor. Apesar do autor utilizar a técnica de pirosequenciamento, trata-se de uma taxa alta de heterogeneidade que contradiz a maior parte dos achados da literatura. Sabe-se que na periferia dos tumores encontra-se em geral infiltrado inflamatório maior que no centro da lesão, desta forma pode haver um problema em relação à seleção da área de extração de DNA neste trabalho. MIGLIO et al. (2013) estudaram 45 pacientes com CCR metastático incluindo linfonodos, pulmão e fígado entre outros, e não encontrou heterogeneidade do status mutacional do gene *KRAS* em nenhum dos casos pareados. Este autor descreve uma

seleção rigorosa da área tumoral a ser selecionada, com presença de no mínimo 50% de células neoplásicas e ainda a utilização de uma técnica de sequenciamento de alta sensibilidade. VAKIANI et al. (2012) estudaram 84 amostras pareadas de CCR primário e metastático além de 31 pacientes com pares de metástase e encontraram apenas dois pacientes com diferenças no status mutacional do gene *KRAS*. Para um desses pacientes existia a possibilidade da metástase ser proveniente de um outro CCR primário ressecado previamente. O segundo caso tratava-se de ressecções sincrônicas de um CCR primário e metastático com morfologias distintas, sendo discutido a possibilidade de também tratar-se de neoplasias distintas (VAKIANI et al. 2012). Um estudo realizou a comparação do status mutacional do gene *KRAS* entre o tumor primário e a metástase com a técnica de sequenciamento em larga escala. BRANNON et al. (2014) estudaram através de sequenciamento em larga escala 69 amostras pareadas de CCR do tumor primário, metástase e tecido normal e encontrou 100% de concordância para o status de *KRAS* nestas amostras.

Em relação ao nosso estudo, dos 3 casos de heterogeneidades encontradas, apenas 2 apresentam relevância clínica estabelecida, já que um dos casos apresentou todas as áreas do tumor tanto primário quanto metastático mutadas, porém com mutações distintas, e até o presente momento, qualquer mutação encontrada no gene *KRAS* confere contra-indicação para o tratamento com inibidores de EGFR (MURPHY e RYAN 2010). Os outros 2 casos apresentaram diferenças no status mutacional e possivelmente teriam a conduta clínica alterada em caso de indicação do tratamento com inibidores de EGFR. Nosso estudo é o primeiro a ativamente estudar diferentes áreas do tumor primário em conjunto com dados do tumor metastático incluindo pulmão. Nota-se que nenhum dos casos de heterogeneidade

observada no nosso estudo envolveu casos de metástase pulmonar. Contudo a nossa casuística de metástase pulmonar não contemplou tantos casos quanto a casuística de metástase hepática.

Para o paciente que apresentou heterogeneidade intratumoral relacionada ao tipo de mutação, nota-se que trata-se de tumor de 8.5 cm localizado no cólon direito e que apresenta morfologias distintas entre as áreas com distintas mutações. Apesar de macroscopicamente tratar-se de massa única de 8.5 cm, não é possível afastar a possibilidade de tratar-se de duas neoplasias primárias colorretais sincrônicas, com colabamento das mesmas. Essa possibilidade estaria condizente com os achados de grande heterogeneidade relacionada ao status mutacional do gene *KRAS* quando comparadas as duas lesões sincrônicas de um mesmo paciente demonstrada neste estudo. Outros estudos reportaram previamente heterogeneidade relacionada ao status mutacional do gene *KRAS* em ambas as lesões dos CCR sincrônicos. Balschun et al. estudaram 20 pacientes com CCR sincrônico para presença de mutação em *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, and *BRAF*. Encontraram discordância em relação à mutação de *KRAS* entre as lesões sincrônicas em 6 pacientes: 3 pacientes apresentaram diferenças em relação ao status mutacional (selvagem *versus* mutado) e 3 pacientes em relação aos tipos de mutação encontrada entre as diferentes lesões (BALSCHUN et al. 2011). Também OGINO et al. (2006) analisaram 6 pacientes com CCR sincrônico e encontrou 3 dos 5 casos discordantes, tanto para o tipo de mutação quanto em relação ao status mutacional. Outros estudos também reportaram altas taxas de heterogeneidade relacionada ao gene *KRAS* quando comparada as distintas lesões de pacientes com CCR sincrônicos primaries (KONESS et al. 1996; KONISHI et al. 2009; VAKIANI et al. 2012). Para os casos de doença metastática, observamos na

nossa casuística que não é possível prever qual é a lesão primária correspondente da lesão metastática baseado em status mutacional do gene *KRAS* ou nos dados relacionados ao estadiamento do paciente. Neste cenário de pacientes com CCR sincrônico, testar apenas uma área do tumor primário pode levar a um perfil incompleto de mutação de *KRAS* do tumor e conseqüentemente a tomada errônea de decisões clínicas em relação ao tratamento com inibidores do EGFR. Desta forma, consideramos que nos casos de CCR sincrônico a melhor conduta seria pesquisar a doença metastática por ser a doença atual do paciente. Em casos de indisponibilidade de material representativo da metastase, em casos com múltiplas metástases no qual a realização de múltiplas biópsias seria clinicamente inviável e ainda para casos de CCR sincrônico em uma rotina diagnóstica de um laboratório de patologia molecular sem informações adicionais, a pesquisa da mutação nas duas lesões levaria a uma seleção mais precisa do paciente a se beneficiar dos inibidores do EGFR.

A frequência de heterogeneidade do status mutacional do gene *KRAS* reportado no nosso estudo é ainda discretamente inferior ao das outras séries revisadas acima. Esse achado deve-se principalmente ao fato de utilizarmos um método de detecção de mutação mais sensível que algumas outras técnicas utilizadas em estudos anteriores, como o sequenciamento direto, que pode classificar como heterogêneo um caso que possua área com baixa quantidade de alelos mutados. De fato dos nossos 2 casos de heterogeneidade em relação ao status mutacional, as porcentagens de alelos mutados são baixas, e ao contrário do exposto, conseguimos identificar estes casos como heterogêneos. Estes casos possivelmente não seriam identificados em técnicas menos sensíveis. A depender da técnica utilizada também não seria possível identificar a heterogeneidade quando esta deve-se a alteração de nucleotídeos específicos sem a

alteração do o status mutacional. Desta forma concluímos que o achado de heterogeneidade mutacional do gene *KRAS* é muito pequena, tanto relacionada a diferentes áreas do tumor primário quanto ao tecido metastático, sendo possível testar tanto o tumor primário quanto a metástase como melhor forma de selecionar os pacientes elegíveis ao tratamento com inibidores do EGFR e não sendo necessário testar múltiplas áreas do tumor primário.

O paciente identificado como caso “B apresentou heterogeneidade do status mutacional comparando o tumor primário (selvagem) e a metástase (mutado). No intervalo entre as ressecções do tumor primário e da metástase o paciente foi submetido a tratamento quimioterápico. Existem relatos de aumento da frequência de mutações somáticas após o tratamento quimioterápico (KUBOTA et al. 2000). Em relação ao tratamento com inibidores do EGFR, existem ainda relatos de aquisição de resistência ao tratamento com esses inibidores devido a aquisição de mutações do gene *KRAS* no processo metastático (MISALE et al. 2012). Contudo esses estudos são pontuais e não permitem a explicação definitiva deste mecanismo. Especificamente em relação à mutação do gene *KRAS*, autores já demonstraram anteriormente ao comparar o status mutacional de *KRAS* entre biópsias antes e após tratamento neoadjuvante que não existem diferenças nessas amostras em relação ao status de *KRAS* (KAWAMOTO et al. 2008; ONDREJKA et al. 2011; BOISSIÈRE-MICHOT et al. 2012). Uma possível explicação para a presença de uma foco metastático mutado e um tumor primário selvagem para o gene *KRAS* seria a presença de subpopulações muito pequenas em meio a neoplasia primária conferindo porcentagens muito pequenas de mutação. DIAZ et al. (2012) estudando mecanismos de resistência ao tratamento com panitumumabe demonstraram a presença de mutação do gene *KRAS*

em amostra de DNA circulante (biópsia líquida) de pacientes com status selvagem do tumor primário. O caso identificado como “C” também de heterogeneidade comparativa entre o tumor primário e a metástase, apresentou duas áreas do tumor primário mutadas e a metástase hepática selvagem. Neste caso as ressecções das lesões foram no mesmo momento cirúrgico e não temos informação sobre tratamento neoadjuvante. Existem estudos que atribuem a possibilidade discordâncias entre o status mutacional do gene *KRAS* entre o tumor primário e a metástase se dever à degradação do DNA (KANEKO et al. 2013).

Os pacientes com CCR e que não apresentam mutação do gene *KRAS* são elegíveis para tratamento com inibidores do EGFR. Entre pacientes com CCR e mutação do gene *KRAS*, são diferentes as proporções de alelos mutados em cada tumor, porém não existem estudos correlacionando o impacto de diferentes proporções de alelos mutados de cada caso com resposta a tratamento, sendo incerta portanto a importância de identificar casos com pequenas proporções de alelos mutados. Hoje a recomendação é de contra-indicação de tratamento para pacientes que apresentem mutação do gene *KRAS*, sem especificar a porcentagem de alelos mutados. Além disso existem poucos estudos correlacionando mutações específicas do gene *KRAS* com comportamento clínico e resposta a tratamento. Recentemente um trabalho mostrou que pacientes com mutação do gene *KRAS* no códon 13 apresentam resposta a tratamento com inibidores do EGFR. Sendo assim é importante a identificação de populações heterogêneas em relação a mutação do gene *KRAS* para o paciente no momento decisório de tratamento. Se a heterogeneidade dever-se a mudança de status mutacional, existe a possibilidade de se questionar a instituição do tratamento pensando em uma população selvagem celular específica. Caso a heterogeneidade seja

relaciona a tipos de mutação específica, há a possibilidade de se questionar a instituição de tratamentos pensando em subclones mutados específicos com embasamento na literatura. Vimos que dos 2 casos que apresentaram diferenças entre o status mutacional do primário e a metástase, 1 caso era mutados no tumor primario e selvagem na metástase e um caso selvagem no primário e mutado na metástase, desta forma este achado não permite concluir em qual tecido seria mais provável de se encontrar a mutação.

Considerando os estudos de porcentagem de células tumorais em relação ao estroma observamos que diferentes porcentagens de células tumorais nas áreas de extração de DNA conferiram diferentes quantificações de alelos mutados pelas diferentes áreas, contudo os achados não mostram uma linearidade em relação à quanto maior a área de células neoplásicas maior a porcentagem de alelos nutados. Este achado pode estar relacionado à composição do componente não neoplásico das amostras. Como componente não neoplásico nestas amostras podemos encontrar principalmente fibroblastos, vasos sanguíneos, células inflamatórias, necrose e mucina. A quantidade de DNA de uma área de fibrose é muito menor que a quantidade de DNA extraída de um denso infiltrado neutrofílico. Desta forma estes diferentes valores podem ser devido à diferentes composições do que foi considerado componente não neoplásico, mostrando que para selecionar as áreas para extração, tão importante quanto a escolha da área com maior representatitividade de células neoplásicas, é importante escolher a área com menor densidade de células não neoplásicas nucleadas. A mutação somática do gene *KRAS* em geral ocorre em heterozigose, ou seja, metade dos alelos encontra-se mutado. Na maior parte das áreas que foram extraídas DNA, as porcentagens de mutação não eram de 50%, ou seja,

mesmo corrigindo os achados em relação às células não neoplásicas, podemos inferir que dentro do tumor primário temos diferentes subgrupos de população de células neoplásicas na qual nem todos os clones apresentam a mutação. Em relação ao conceito de heterogeneidade, poderia ser discutido neste momento a existência de uma terceira forma de heterogeneidade, não somente relacionada ao status mutacional, ao tipo de mutação observada, mas relacionada às porcentagens de mutação entre as diferentes áreas do tumor primário.

A avaliação do impacto do processamento histológico na integridade do material genético evidenciou reprodutibilidade dos achados mutacionais quando comparado tecido fixado e submetido ao processamento histológico convencional com tecido congelado em todos os casos, exceto um. Todas as mutações envolvendo o códon 13 foram reprodutíveis entre material parafinado e congelado. As mutações c.35G>A, c.35G>T e c.34G>A pesquisadas do códon 12 evidenciaram 100% de reprodutibilidade entre material congelado e parafinado. A mutação c.35G>C no códon 12 mostra taxa de discordância de 3% se avaliarmos a quantidade total de amostras pesquisadas comparando material parafinado e congelado. Notamos que 30 de 31 amostras apresentavam diagnóstico concordante, ou seja, 97% de concordância. Os experimentos de sequenciamento confirmando que os 8 casos de mutação c.35G>C estavam presentes tanto no material congelado quanto parafinado não corroboram a hipótese deste tipo específico de mutação ser resultante de erro de pareamento de DNA. O achado de 1 caso discordante, representando 3% da casuística, pode ser interpretado como parte da mesma porcentagem descrita para os experimentos de heterogeneidade entre diferentes amostras de um mesmo paciente. Poucos estudos realizaram comparação entre amostras parafinadas e congeladas relacionadas ao status

mutacional do gene *KRAS*, e se considerarmos esta comparação em subgrupo de pacientes com CCR o número é ainda menor. Um autor estudou 131 amostras de CCR e avaliou a reprodutibilidade dos achados mutacional do gene *KRAS* usando diferentes técnicas de sequenciamento. Encontrou que a mutação foi menos frequente nos tecidos parafinados que no tecido congelado, com proporções de heterogeneidade de 6% a 18% a depender da técnica utilizada (*high resolution melting analysis* e sequenciamento direto respectivamente) (SOLASSOL et al. 2011). Esses achados podem ser atribuídos aos mesmos fatores descritos em relação aos experimentos de heterogeneidade, como seleção da área tumoral. A maior parte dos testes moleculares em oncologia são realizados em tecido fixado em formalina e embebido em parafina, por ser o material disponível após o processamento da biópsia ou da peça cirúrgica do paciente. A criação e manutenção de um banco de tumores, apesar de fornecer material genético de qualidade para pesquisa e rotina diagnóstica, possibilitando experimentos de proteômica e com RNA, é extremamente caro, inviabilizando a sua implementação na maior parte das instituições. Além disso, mesmo nas instituições que possuem banco de tumor, nem toda neoplasia operada pode ser submetida à coleta de banco de tumor, já que esta coleta não pode interferir com o resultado final do paciente. Considerando que as principais mutações de *KRAS* descritas em CCR tratam-se de mutações pontuais, envolvendo pequenas regiões do DNA, a utilização de material parafinado não parece interferir com a capacidade de detectar essas mutações. Os achados não podem ser extrapolados para outros tipos de mutação que envolvem deleções ou inserções de regiões grandes do DNA. Desta forma, concluímos que a pesquisa de mutação do gene *KRAS* para fins diagnósticos pode ser realizada em material parafinado sem prejuízo para o diagnóstico do paciente.

Pacientes com CCR que apresentam mutação do gene *KRAS* nas neoplasias primárias apresentam status de mutação do gene *KRAS* selvagem na mucosa colônica não neoplásica. Este achado mostra que a mutação do gene *KRAS* não é uma alteração germinativa presente nas células saudáveis do indivíduo, e sim uma alteração adquirida no processo de carcinogênese, conforme demonstrado por VOGELSTEIN et al. (1988).

Sendo assim, o achado neste estudo de 97% de concordância do status mutacional do gene *KRAS* entre diferentes áreas do tumor primário e comparativo entre o tumor primário e a metástase corrobora os achados de VOGELSTEIN et al. (1988) desta mutação estar presente desde as lesões precursoras dos CCR, sendo portanto considerada uma mutação *driver* (não passageira) no CCR e justificando assim a relativa homogeneidade entre as amostras. Os casos pontuais de divergência do status mutacional podem ser explicados em parte pelas pela seleção da área tumoral para pesquisa molecular, critérios diagnósticos, e pelas técnicas de sequenciamento utilizadas. Considerando os achados deste estudo e os revisados da literatura, concluímos que a pesquisa de mutação do gene *KRAS* para selecionar pacientes com CCR metastático elegíveis ao tratamento com inibidores do EGFR pode ser realizado tanto em amostra de neoplasia primário ou metastática, e que esta pesquisa pode ser realizada em somente uma área tumoral. Para pacientes com Carcinoma Colorretal sincrônico, a pesquisa de múltiplas áreas será necessária para a correta predição de resposta. Concluímos ainda que podem ser usadas amostras provenientes de tecido parafinado sem prejuízo para o diagnóstico do paciente, e que mais importante do que escolher entre o material proveniente do tumor primário ou da metástase é escolher a amostra de tumor que foi submetida ao processamento histológico mais rigoroso, a utilização de uma técnica de detecção de mutação sensível e uma precisa seleção da área tumoral que possua a maior representação de células neoplásicas viáveis.

6 CONCLUSÕES

1. A taxa de heterogeneidade intratumoral em relação à mutação do gene *KRAS* encontrada neste estudo foi de 1%.
2. A taxa de heterogeneidade em relação à mutação do gene *KRAS* quando comparada a lesão primária de CCR e suas respectivas metástases foi de 2%.
3. Nota-se alta reprodutibilidade (97%) dos achados mutacionais obtidos a partir do sequenciamento do DNA de material parafinado quando comparado com o de material congelado.
4. A porcentagem de estroma (células não neoplásicas) influencia na sensibilidade de detecção de mutação do gene *KRAS*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. **J Clin Oncol** 2009; 27:2091-6.

Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2008; 26:1626-34.

[ACS] American Cancer Society. **Cancer facts and figures 2014**. Available from: <URL:<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf>> [2014 set 12]

André T, Boni C, Navarro M, et al. Improved overall survival withoxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. **J Clin Oncol** 2009; 27:3109-16.

Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. **J Natl Cancer Inst** 1998; 90:675-84.

Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. **Br J Cancer** 2001; 85:692-6.

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

Balschun K, Haag J, Wenke AK, von Schönfels W, Schwarz NT, Röcken C. KRAS, NRAS, PIK3CA exon 20, and BRAF genotypes in synchronous and metachronous primary colorectal cancers diagnostic and therapeutic implications. **J Mol Diagn** 2011; 13:436-45.

Barbacid M. ras oncogenes: their role in neoplasia. **Eur J Clin Invest** 1990; 20:225-35.

Bennasroune A, Fickova M, Gardin A, et al. Transmembrane peptides as inhibitors of ErbB receptor signaling. **Mol Biol Cell** 2004; 15:3464-74.

Boissière-Michot F, Lopez-Crapez E, Frugier H, et al. KRAS genotyping in rectal adenocarcinoma specimens with low tumor cellularity after neoadjuvant treatment. **Mod Pathol** 2012; 25:731-9.

Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. **Ann Oncol** 2011; 22:1535-46.

Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2009; 27:663-71.

Bos JL. The ras gene family and human carcinogenesis. **Mutat Res** 1988; 195:255-71.

Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. **Cancer Res** 1989; 49:4682-9.

Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: Bosman FT, Carneiro F, Herban RH, Theise ND, editors. **WHO classification of tumors of the digestive system**. 4th ed. Lyon: IARC; 2010. p.134-46.

Brannon A, Vakiani E, Sylvester BE, et al. Comparative sequencing analysis reveals high genomic concordance between matched primary and metastatic colorectal cancer lesions. **Genome Biol** 2014; 15:454.

Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. **Int J Cancer** 2013; 132:1133-45.

Brink M, de Goeij AF, Weijenberg MP, et al. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. **Carcinogenesis** 2003; 24:703-10.

Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. **Nature** 2013; 501:338-45.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature** 2012; 487:330-7.

Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. **J Biol Chem** 1990; 265:7709-12.

Cejas P, López-Gómez M, Aguayo C, et al. KRAS mutations in primary colorectal cancer tumors and related metástases: a potential role in prediction of lung metastasis. **PLoS One** 2009; 4:e8199.

Cerottini JP, Caplin S, Saraga E, Givel JC, Benhattar J. The type of K-ras mutation determines prognosis in colorectal cancer. **Am J Surg** 1998; 175:198-202.

Chanprapaph K, Vachiramon V, Rattanakaemakorn P. Epidermal growth factor receptor inhibitors: a review of cutaneous adverse events and management. **Dermatol Res Pract** 2014; 2014:734249.

Chen CC, Er TK, Liu YY, et al. Computational analysis of KRAS mutations: implications for different effects on the KRAS p.G12D and p.G13D mutations. **PLoS One** 2013; 8:e55793.

Chung KY, Shia J, Kemeny NE, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. **J Clin Oncol** 2005; 23:1803-10.

Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2006; 7:505-16.

Cunningham D, Pyrhönen S, James RD, et al. Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. **Lancet** 1998; 352:1413-8.

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. **N Engl J Med** 2004; 351:337-45.

Curtin K, Slattery ML, Samowitz WS. CpG island methylation in colorectal cancer: past, present and future. **Patholog Res Int** 2011; 2011:902674.

De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. **Lancet Oncol** 2011; 12:594-603.

Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. **Nature** 2012; 486:537-40.

Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, et al. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. **Br J Cancer** 2007; 96:1166-9.

Dócs O, Fazakas F, Horváth NL, et al. Changes of KRAS Exon 2 Codon 12/13 Mutation Status in Recurrent Colorectal Cancer. **Pathol Oncol Res** 2014 Sep 24.

Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. **Lancet** 2000; 355:1041-7.

Douillard JY, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. **J Clin Oncol** 2010; 28:4697-705.

Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. **N Engl J Med** 2013; 369:1023-34.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7^a ed. New York: Springer-Verlag; 2010. Colon and rectum; p.143-59.

Elnatan J, Goh HS, Smith DR. C-KI-RAS activation and the biological behavior of proximal and distal colonic adenocarcinomas. **Eur J Cancer** 1996; 32A:491-7.

Fadhil W, Ibrahem S, Seth R, et al. The utility of diagnostic biopsy specimens for predictive molecular testing in colorectal cancer. **Histopathology** 2012; 61:1117-24.

Fearnhead NS, Wilding JL, Bodmer WF. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. **Br Med Bull** 2002; 64:27-43.

Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. **Annu Rev Pathol** 2011; 6:479-507.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. **GLOBOCAN 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide.** Available from: <URL:http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx> [2014 set 14

Ferté C, André F, Soria JC. Molecular circuits of solid tumors: prognostic and predictive tools for bedside use. **Nat Rev Clin Oncol** 2010; 7:367-80.

Gao P, Song YX, Wang ZN, et al. Is the prediction of prognosis not improved by the seventh edition of the TNM classification for colorectal cancer? Analysis of the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) database. **BMC Cancer** 2013; 13:123.

Gil Ferreira C, Aran V, Zalcborg-Renault I, et al. KRAS mutations: variable incidences in a Brazilian cohort of 8,234 metastatic colorectal cancer patients. **BMC Gastroenterol** 2014; 14:73.

Goldberg RM, Rothenberg ML, Van Cutsem E, et al. The continuum of care: a paradigm for the management of metastatic colorectal cancer. **Oncologist** 2007; 12:38-50.

Gonsalves WI, Mahoney MR, Sargent DJ, et al. Patient and tumor characteristics and BRAF and KRAS mutations in colon cancer, NCCTG/Alliance N0147. **J Natl Cancer Inst** 2014; 106:pii:dju106.

Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. **Gastroenterology** 2008; 135:1079-99.

Guerrero S, Casanova I, Farré L, Mazo A, Capellà G, Mangués R. K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. **Cancer Res** 2000; 60:6750-6.

Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. **Exp Cell Res** 2003; 284:2-13.

Hewitt SM, Lewis FA, Cao Y, et al. Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. **Arch Pathol Lab Med** 2008; 132:1929-35.

Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:714-27.

Imamura Y, Lochhead P, Yamauchi M, et al. Analyses of clinicopathological, molecular, and prognostic associations of KRAS codon 61 and codon 146 mutations in colorectal cancer: cohort study and literature review. **Mol Cancer** 2014; 13:135.

Irahara N, Baba Y, Nosho K, et al. NRAS mutations are rare in colorectal cancer. **Diagn Mol Pathol** 2010; 19:157-63.

Ishii M, Sugai T, Habano W, Nakamura S. Analysis of Ki-ras gene mutations within the same tumor using a single tumor crypt in colorectal carcinomas. **J Gastroenterol** 2004; 39:544-9.

Italiano A, Hostein I, Soubeyran I, et al. KRAS and BRAF mutational status in primary colorectal tumors and related metastatic sites: biological and clinical implications. **Ann Surg Oncol** 2010; 17:1429-34.

Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. **Gastroenterology** 2010; 138:2044-58.

Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. **Histopathology** 2007; 50:113-30.

Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. **N Engl J Med** 2007; 357:2040-8.

Kaneko Y, Kuramochi H, Nakajima G, Inoue Y, Yamamoto M. Degraded DNA may induce discordance of KRAS status between primary colorectal cancer and corresponding liver metastases. **Int J Clin Oncol** 2014; 19:113-20.

Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. **N Engl J Med** 2008; 359:1757-65.

Kawada K, Hasegawa S, Murakami T, et al. Molecular mechanisms of liver metastasis. **Int J Clin Oncol** 2011; 16:464-72.

Kawamoto Y, Tsuchihara K, Yoshino T, et al. KRAS mutations in primary tumours and post-FOLFOX metastatic lesions in cases of colorectal cancer. **Br J Cancer** 2012; 107:340-4.

Kemeny N. Management of liver metastases from colorectal cancer. **Oncology (Williston Park)** 2006; 20:1161-76, 1179; discussion 1179-80, 1185-6.

Kemeny N. The management of resectable and unresectable liver metastases from colorectal cancer. **Curr Opin Oncol** 2010; 22:364-73.

Knijjn N, Mekenkamp LJ, Klomp M, et al. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. **Br J Cancer** 2011; 104:1020-6.

Konda K, Konishi K, Yamochi T, et al. Distinct molecular features of different macroscopic subtypes of colorectal neoplasms. **PLoS One** 2014; 9:e103822.

Koness RJ, King TC, Schechter S, McLean SF, Lodowsky C, Wanebo HJ. Synchronous colon carcinomas: molecular-genetic evidence for multicentricity. **Ann Surg Oncol** 1996; 3:136-43.

Konishi K, Shen L, Jelinek J, et al. Concordant DNA methylation in synchronous colorectal carcinomas. **Cancer Prev Res (Phila)** 2009; 2:814-22.

Krol LC, 't Hart NA, Methorst N, Knol AJ, Prinsen C, Boers JE. Concordance in KRAS and BRAF mutations in endoscopic biopsy samples and resection specimens of colorectal adenocarcinoma. **Eur J Cancer** 2012; 48:1108-15.

Kubota M, Lin YW, Hamahata K, et al. Cancer chemotherapy and somatic cell mutation. **Mutat Res** 2000; 470:93-102.

Lam AK, Chan SS, Leung M. Synchronous colorectal cancer: clinical, pathological and molecular implications. **World J Gastroenterol** 2014; 20:6815-20.

Lange A, Prenzler A, Frank M, Kirstein M, Vogel A, von der Schulenburg JM. A systematic review of cost-effectiveness of monoclonal antibodies for metastatic colorectal cancer. **Eur J Cancer** 2014; 50:40-9.

Lee DW, Kim KJ, Han SW, et al. KRAS Mutation is Associated with Worse Prognosis in Stage III or High-risk Stage II Colon Cancer Patients Treated with Adjuvant FOLFOX. **Ann Surg Oncol** 2014 Jun 3.

Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. **Cancer Res** 2006; 66:3992-5.

Lièvre A, Bachet JB, Boige V, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. **J Clin Oncol** 2008; 26:374-9.

Lièvre A, Blons H, Laurent-Puig P. Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. **Oncogene** 2010; 29:3033-43.

Liu X, Jakubowski M, Hunt JL. KRAS gene mutation in colorectal cancer is correlated with increased proliferation and spontaneous apoptosis. **Am J Clin Pathol** 2011; 135:245-52.

Macedo MP, Andrade Lde B, Coudry R, et al. Multiple mutations in the Kras gene in colorectal cancer: review of the literature with two case reports. **Int J Colorectal Dis** 2011; 26:1241-8.

Macedo MP, de Lima LG, Begnami MD, et al. KRAS insertions in colorectal cancer: what do we know about unusual KRAS mutations? **Exp Mol Pathol** 2014; 96:257-60.

Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. **N Engl J Med** 2005; 352:476-87.

Miglio U, Mezzapelle R, Paganotti A, et al. Mutation analysis of KRAS in primary colorectal cancer and matched metastases by means of highly sensitivity molecular assay. **Pathol Res Pract** 2013; 209:233-6.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. **Nature** 2012; 486:532-6.

Mitry E, Guiu B, Cosconea S, Jooste V, Faivre J, Bouvier AM. Epidemiology, management and prognosis of colorectal cancer with lung metastases: a 30-year population-based study. **Gut** 2010; 59:1383-8.

Miyaki M, Kuroki T. Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 2003; 306:799-804.

Murphy JE, Ryan DP. American Society of Clinical Oncology 2010 colorectal update. **Expert Rev Anticancer Ther** 2010; 10:1371-3.

Nibbe RK, Chance MR. Approaches to biomarkers in human colorectal cancer: looking back, to go forward. **Biomark Med** 2009; 3:385-96.

Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, et al. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. **J Mol Diagn** 2005; 7:413-21.

Ogino S, Brahmandam M, Kawasaki T, Kirkner GJ, Loda M, Fuchs CS. Epigenetic profiling of synchronous colorectal neoplasias by quantitative DNA methylation analysis. **Mod Pathol** 2006; 19:1083-90.

Okayama N, Nishioka M, Hazama S, et al. The importance of evaluation of DNA amplifiability in KRAS mutation testing with dideoxy sequencing using formalin-fixed and paraffin-embedded colorectal cancer tissues. **Jpn J Clin Oncol** 2011; 41:165-71.

Oltedal S, Aasprong OG, Møller JH, et al. Heterogeneous distribution of K-ras mutations in primary colon carcinomas: implications for EGFR-directed therapy. **Int J Colorectal Dis** 2011; 26:1271-7.

Ondrejka SL, Schaeffer DF, Jakubowski MA, Owen DA, Bronner MP. Does neoadjuvant therapy alter KRAS and/or MSI results in rectal adenocarcinoma testing? **Am J Surg Pathol** 2011; 35:1327-30.

Patil H, Korde R, Kapat A. KRAS gene mutations in correlation with clinicopathological features of colorectal carcinomas in Indian patient cohort. **Med Oncol** 2013; 30:617.

Peeters M, Douillard JY, Van Cutsem E, et al. Mutant KRAS codon 12 and 13 alleles in patients with metastatic colorectal cancer: assessment as prognostic and predictive biomarkers of response to panitumumab. **J Clin Oncol** 2013; 31:759-65.

Phipps AI, Buchanan DD, Makar KW, et al. BRAF mutation status and survival after colorectal cancer diagnosis according to patient and tumor characteristics. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2012; 21:1792-8.

Pines G, Köstler WJ, Yarden Y. Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. **FEBS Lett** 2010; 584:2699-706.

Plesec TP, Hunt JL. KRAS mutation testing in colorectal cancer. **Adv Anat Pathol** 2009; 16:196-203.

Ren J, Li G, Ge J, Li X, Zhao Y. Is K-ras gene mutation a prognostic factor for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **Dis Colon Rectum** 2012; 55:913-23.

Richman SD, Chambers P, Seymour MT, et al. Intra-tumoral heterogeneity of KRAS and BRAF mutation status in patients with advanced colorectal cancer (aCRC) and cost-effectiveness of multiple sample testing. **Anal Cell Pathol (Amst)** 2011; 34:61-6.

Roberts PJ, Stinchcombe TE. KRAS mutation: should we test for it, and does it matter? **J Clin Oncol** 2013; 31:1112-21.

Rose JS, Serna DS, Martin LK, et al. Influence of KRAS mutation status in metachronous and synchronous metastatic colorectal adenocarcinoma. **Cancer** 2012; 118:6243-52

Rosty C, Young JP, Walsh MD, et al. Colorectal carcinomas with KRAS mutation are associated with distinctive morphological and molecular features. **Mod Pathol** 2013; 26:825-34

Saltz LB, Cox JV, Blanke C, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. **N Engl J Med** 2000; 343:905-14.

Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. **J Clin Oncol** 2004; 22:1201-8.

Sameer AS, ul Rehman S, Pandith AA, et al. Molecular gate keepers succumb to gene aberrations in colorectal cancer in Kashmiri population, revealing a high incidence area. **Saudi J Gastroenterol** 2009; 15:244-52.

Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, Robertson M, Leppert M, Slattery ML. Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2000; 9:1193-7.

Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. **Expert Opin Ther Targets** 2012; 16:103-19.

Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, et al. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. **Oncologist** 2008; 13:1270-5.

Seth R, Crook S, Ibrahim S, Fadhil W, Jackson D, Ilyas M. Concomitant mutations and splice variants in KRAS and BRAF demonstrate complex perturbation of the Ras/Raf signalling pathway in advanced colorectal cancer. **Gut** 2009; 58:1234-41.

Solassol J, Ramos J, Crapez E, et al. KRAS mutation detection in paired frozen and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) colorectal cancer tissues. **Int J Mol Sci** 2011; 12:3191-204.

Soulières D, Greer W, Magliocco AM, et al. KRAS mutation testing in the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR therapies. **Curr Oncol** 2010; 17 Suppl 1:S31-40.

Spano JP, Fagard R, Soria JC, Rixe O, Khayat D, Milano G. Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. **Ann Oncol** 2005; 16:189-94.

Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. **Am J Pathol** 2002; 161:1961-71.

Steinestel K, Lennerz JK, Eder S, Kraft K, Arndt A. Invasion pattern and histologic features of tumor aggressiveness correlate with MMR protein expression, but are independent of activating KRAS and BRAF mutations in CRC. **Virchows Arch** 2014; 465:155-63.

Sundström M, Edlund K, Lindell M, et al. KRAS analysis in colorectal carcinoma: analytical aspects of Pyrosequencing and allele-specific PCR in clinical practice. **BMC Cancer** 2010; 10:660.

Tabernero J, Van Cutsem E, Díaz-Rubio E, et al. Phase II trial of cetuximab in combination with fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2007; 25:5225-32.

Tejpar S, Celik I, Schlichting M, Sartorius U, Bokemeyer C, Van Cutsem E. Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. **J Clin Oncol** 2012; 30:3570-7.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. **J Natl Cancer Inst** 2004; 96:261-8.

Vakiani E, Janakiraman M, Shen R, et al. Comparative genomic analysis of primary versus metastatic colorectal carcinomas. **J Clin Oncol** 2012; 30:2956-62.

van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. **N Engl J Med** 2009; 360:1408-17.

van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. **J Clin Oncol** 2011; 29:2011-9.

van de Velde CJ, Boelens PG, Borrás JM, et al. EURECCA colorectal: multidisciplinary management: European consensus conference colon & rectum. **Eur J Cancer** 2014; 50:1.e1-1.e34.

van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, et al. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. **Virchows Arch** 2008; 453:417-31.

van Voorthuizen T, van Gulik TM, Punt CJA. Defining resectability of colorectal liver metastases: how and why? **Colorectal Cancer** 2013; 2:61-72.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **N Engl J Med** 1988; 319:525-32.

Wang HL, Lopategui J, Amin MB, Patterson SD. KRAS mutation testing in human cancers: The pathologist's role in the era of personalized medicine. **Adv Anat Pathol** 2010; 17:23-32.

Wangefjord S, Sundström M, Zendeirokh N, et al. Sex differences in the prognostic significance of KRAS codons 12 and 13, and BRAF mutations in colorectal cancer: a cohort study. **Biol Sex Differ** 2013; 4:17.

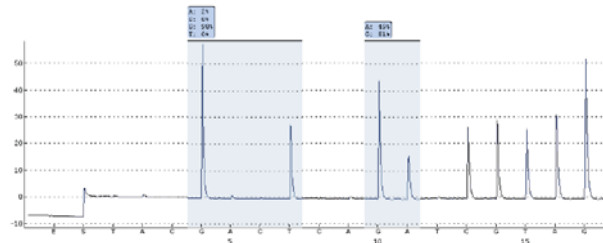
Weichert W, Schewe C, Lehmann A, et al. KRAS genotyping of paraffin-embedded colorectal cancer tissue in routine diagnostics: comparison of methods and impact of histology. **J Mol Diagn** 2010; 12:35-42.

Yang QH, Schmidt J, Soucy G, et al. KRAS mutational status of endoscopic biopsies matches resection specimens. **J Clin Pathol** 2012; 65:604-7.

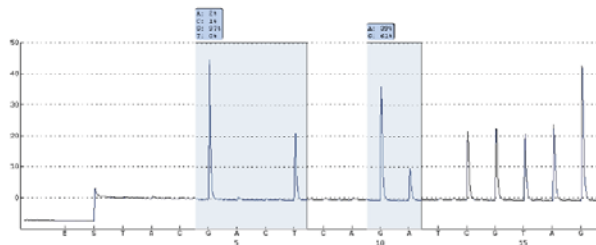
Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2001; 2:127-37.

Yunxia Z, Jun C, Guanshan Z, Yachao L, Xueke Z, Jin L. Mutations in epidermal growth factor receptor and K-ras in Chinese patients with colorectal cancer. **BMC Med Genet** 2010; 11:34.

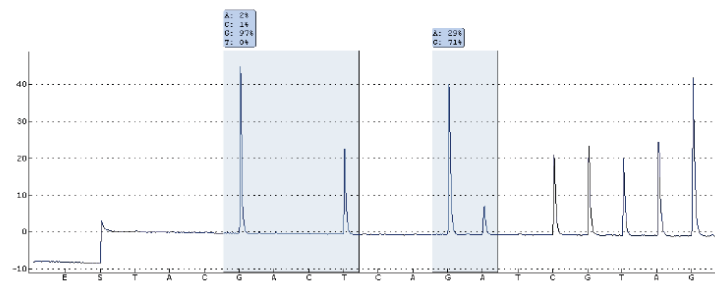
Anexo 1 -Pirogramas evidenciando porcentagem de alelos mutados para as diluições sucessivas realizadas com cultura de células



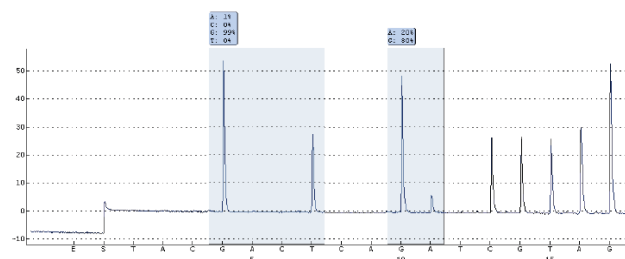
Anexo 1A) Pirosequenciamento de cultura de células com 50% de mutação no códon 13 evidenciando 49% de alelos alterados (GAC>GGC).



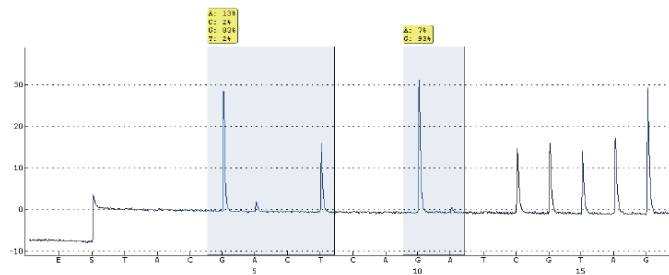
Anexo 1B) Pirosequenciamento de cultura de células com 40% de mutação no códon 13 com 30% de alelos alterados (GAC>GGC)



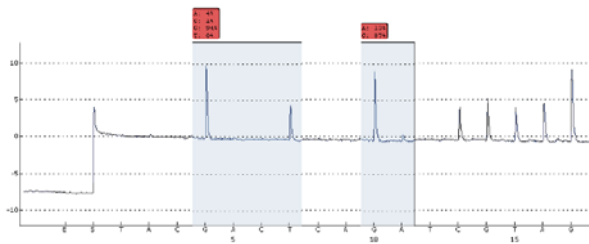
Anexo 1C) Pirosequenciamento de cultura de células com 30% de mutação no códon 13 (GAC>GGC)



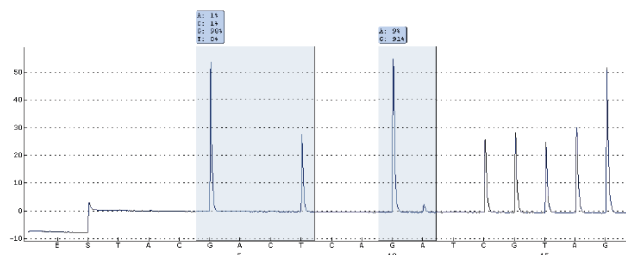
Anexo 1D) Pirosequenciamento de cultura de células com 20% de mutação no códon 13 (GAC>GGC).



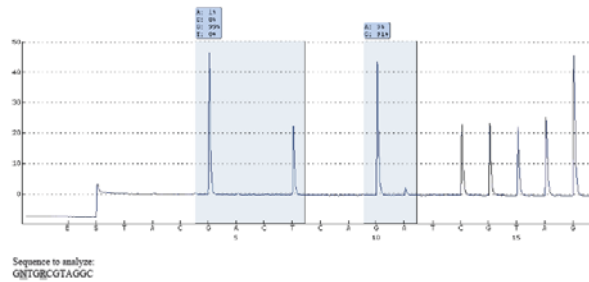
Anexo 1E) Pirosequenciamento de cultura de células com 15% de mutação no códon 13 (GAC>GGC)



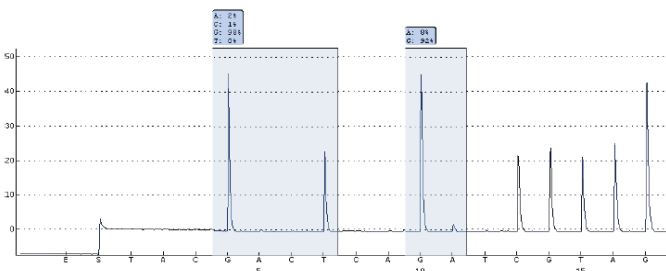
Anexo 1F) Pirosequenciamento de cultura de células com 10% de mutação no códon 13 (GAC>GGC)



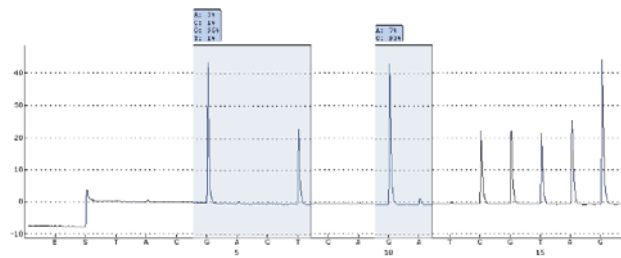
Anexo 1G) Pirosequenciamento de cultura de células com 9% de mutação no códon 13 (GAC>GGC)



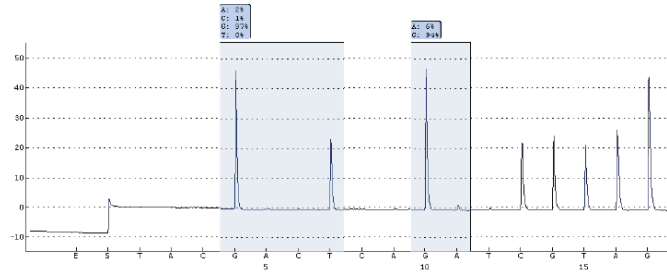
Anexo 1H) Pirosequenciamento de cultura de células com 8% de mutação no códon 13 (GAC>GGC)



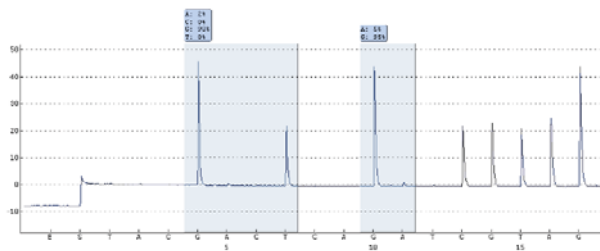
Anexo 1I) Pirosequenciamento de cultura de células com 7% de mutação no códon 13 (GAC>GGC)



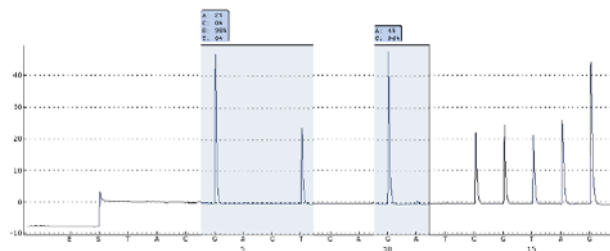
Anexo 1J) Pirosequenciamento de cultura de células com 6% de mutação no códon 13 (GAC>GGC)



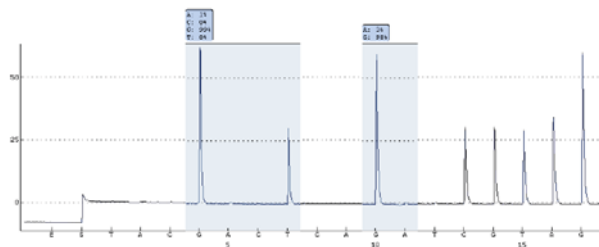
Anexo 1K) Pirosequenciamento de cultura de células com 5% de mutação no códon 13 (GAC>GGC)



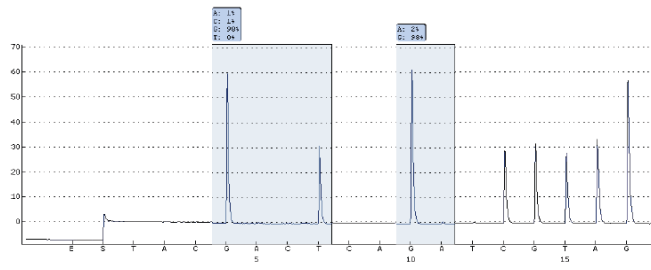
Anexo 1L) Pirosequenciamento de cultura de células com 4% de mutação no códon 13 (GAC>GGC)



Anexo 1M). Pirosequenciamento de cultura de células com 3% de mutação no códon 13 (GAC>GGC)



Anexo 1N) Pirosequenciamento de cultura de células com 2% de mutação no códon 13 (GAC>GGC)



Anexo 10) Pirosequenciamento de cultura de células com 1% de mutação no códon 13 (GAC>GGC)

Multiple mutations in the *Kras* gene in colorectal cancer: review of the literature with two case reports

Mariana Petaccia Macedo · Louise De Brot Andrade · Renata Coudry · Rodrigo Crespo · Marina Gomes · Bianca Cristina Garcia Lisboa · Samuel Aguiar Jr · Fernando Augusto Soares · Dirce Maria Carraro · Isabela Werneck Cunha

Accepted: 3 May 2011 / Published online: 21 May 2011

© Springer-Verlag 2011

Abstract

Purpose *Kras* mutations are negative predictors of anti-EGFR therapy, occurring in 40% of colorectal carcinomas (CRCs). Point substitutions in codon 12 or 13 are the most frequent mutations in *Kras*, but multiple mutations (MMs) in other codons can also develop. Few data exist on MMs with regard to their frequency and the codons and amino acids that are affected. We report two cases of *Kras* double mutations in codons 12 and 13 and review *Kras* MMs in primary CRC in PubMed databases.

Case report A 53-year-old woman and a 70-year-old man presented with deep, invasive, moderately differentiated CRC at an advanced clinical stage. The former had regional lymph node involvement and vaginal wall neoplastic implantation, and the latter had liver metastasis. Primary tumors were examined for *Kras* mutations by pyrosequencing, which were confirmed by direct sequencing. Both tumors had a mutation in codons 12 and 13, wherein codon 12 was mutated to GAT, and codon 13 became GAC.

Conclusions We identified 69 reported cases of *Kras* MMs and reported two other cases, representing 2.1% of all

mutated tumors; the incidence of such mutations is 1.0% in CRC patients. In most cases (59%), MMs develop in a single codon, usually codon 12. Codons 12 and 13 are affected simultaneously in only 27% of cases. These findings add information about the impact of specific amino acid changes in the *Kras* gene.

Keywords *Kras* · Colorectal cancer · Multiple mutations · Concurrent mutation

Introduction

Personalized medicine for colorectal cancer (CRC) has been made possible in part through the development of molecular therapies against epidermal growth factor receptor (EGFR). EGFR is a member of the ErbB family of transmembrane receptor tyrosine kinases, which regulate cell division, differentiation, migration, adhesion, and apoptosis; EGFR is overexpressed in CRC and other tumors [27, 30].

Epidermal growth factor (EGF) and other ligands, such as transforming growth factor α , amphiregulin, epiregulin, and heparin-binding EGF, are known ligands of EGFR. Activation of EGFR activates several downstream signaling pathways, resulting in tumor growth, progression, and increased risk for metastasis. These mechanisms involve the Ras/MAPK, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT, and STAT pathways, and any alteration in these pathways or in the production of ligands and receptors can promote the growth and spread of tumors [19, 27].

EGFR inhibitors are used to treat metastatic CRC that is refractory to conventional chemotherapy. Inhibition can be performed using monoclonal antibodies against the external portion of the receptor, such as the commercially available

M. P. Macedo (✉) · L. D. Andrade · R. Coudry · R. Crespo · M. Gomes · B. C. Lisboa · F. A. Soares · D. M. Carraro · I. W. Cunha
Department of Pathology, Hospital A.C. Camargo,
São Paulo, Brazil
e-mail: maripetaccia@hotmail.com

S. Aguiar Jr
Department of Surgery, Hospital A.C. Camargo,
Rua Antonio Prudente, 211, Liberdade,
São Paulo 01509-010, Brazil

R. Coudry
Department of Pathology, Fleury Laboratory,
Av. General Valdomiro Lima, 508, Jabaquara,
São Paulo 04344-903, Brazil

panitumumab and cetuximab, or small molecule tyrosine kinase inhibitors that are directed against the internal portion. Both strategies block the signaling cascade that culminates in tumor growth and spread [30]. Few CRC patients (approximately 10% to 20%), however, respond to EGFR-blocking therapies.

Considering that EGFR somatic mutations are rare in CRC, the low response rate is due to disturbances in downstream signaling [4], as seen when *Kras* is altered. *Kras* mutations result in persistent, EGFR-independent (i.e., unregulated) activation of EGFR signaling; thus, they are a negative predictor of response to anti-EGFR therapy [30]. The presence of *Kras* mutations suggests that treatment with EGFR blockers should not be initiated, to avoid the unnecessary toxicities that are caused by their intake and the economic losses that are incurred due to this expensive treatment [23, 31].

Kras lies in band 12.1 on the short arm of chromosome 12 and encodes a protein that regulates cell proliferation and differentiation [12]. A single amino acid substitution in *Kras* can be oncogenic [9]. *Kras* mutations are observed in 35% to 40% of CRC cases, and they are associated with poor prognosis, although this conclusion is under debate [7, 31]. *Kras* mutations in CRC occur most frequently in codons 12 (82%) and 13 (17%). Mutations in codon 61 (5%), codon 146, and other codons have been reported [7, 23, 26].

The wild-type amino acid sequence for codon 12 of *Kras* is GGT (glycine) and GGC for codon 13 (also glycine). The most frequent mutation is GGT>GAT in codon 12 (glycine to aspartate), which is typically associated with indolent disease [2, 7, 9]. The most common mutation in codon 13 is GGC>GAC [8]. A specific mutation (GTT, glycine to valine) in codon 12 has been reported to be associated with reduced survival [2, 31].

Few reports have observed the coexistence of more than one mutation in *Kras* in the same colorectal tumor, correlating this type of alteration with clinical and morphological features [10, 14, 21, 24]. Multiple mutations can occur in the same codon or different codons. Some groups have estimated that 3% of CRCs have coexisting *Kras* mutations, most of which develop in codon 12; few cases involve mutations in disparate codons (e.g., codons 12 and 13) [14].

The actual frequency of multiple mutation tumors and the most common resulting amino acid mutations has not been reported. The clinical implications of such phenomena have been proposed, but there are no definitive data on this topic.

We report two cases of double mutations in codons 12 and 13 of *Kras* and correlate them with tumor histopathology and patients' clinical aspects. We review the literature on multiple *Kras* mutations in primary CRC.

Materials and methods

Tissue samples, DNA isolation, and pyrosequencing

Tissue samples from primary tumors were obtained from the archives of Hospital A.C. Camargo. In our histopathological examination, we cut sections from paraffin-embedded tumor tissue blocks (5 μ m) and stained them with hematoxylin and eosin. Deparaffinization was performed, and tumor samples were obtained by laser microdissection using a PixCell Iie (Arcturus) or by scraping off the neoplastic tissue from the glass slide (macrodissection).

Genomic DNA was isolated using the QIAamp Kit (Qiagen). PCR was performed in a tube containing 100 ng of genomic DNA, 0.4 pmol of forward and reverse primers, and 1 \times Hot Start Taq Master Mix (Qiagen) in a total volume of 50 μ l. The amplicons were electrophoresed on a 2% agarose gel to confirm the correct product. Thirty microliters of biotinylated PCR product was attached to streptavidin–sepharose beads (GE Healthcare) per a standard protocol. The pyrosequencing reaction was performed according to the manufacturer's instructions. The primers for PCR and sequencing were supplied with the KRAS PyroMark™ IDQ96 V2.0 kit (Qiagen). Pyrosequencing™ was performed using the PyroMark™ Gold Q96 reagent kit (Qiagen).

Direct sequencing

The PCR reaction comprised 0.4 μ M forward (5' gatagtgtat-taaccttatgtgtg 3') and reverse (5' gatacaagaatggctctgcac 3') primers, 1.5 mM MgSO₄, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 U Platinum Taq DNA High-Fidelity Polymerase (Invitrogen), and 100 ng DNA in a final volume of 20 μ l. Amplicons were purified using 3 U exonuclease I and 1 U shrimp alkaline phosphatase (USB/GE) prior to sequencing. Purified DNA was cycle sequenced using the ABI BigDye Terminator kit v. 3.1 (ABI, Foster City, CA) per manufacturer's instructions. Sequencing reactions were electrophoresed on an ABI3130xl genetic analyzer. Electropherograms were analyzed in the sense and antisense directions using CLC Main Workbench software.

Identification and eligibility of relevant studies

We performed a systematic and extensive search of PubMed databases to locate articles on *Kras* mutational status that were written in English and selected those that examined multiple *Kras* mutations in primary CRC tissue. Mutations in tissues from metastatic disease were not included in this review. Studies that evaluated tissue samples from metastatic and primary diseases were included when the separation of primary and metastatic

samples was possible. Patients could be of any age or gender and have the disease at any clinical stage. There were no inclusion criteria regarding the methods by which the mutations were detected.

The search terms were: *Kras* status, *Kras* multiple mutations, concurrent *Kras*, concomitant *Kras*, codons 12 and 13, and colorectal cancer mutation. The specific mutations in Table 2 are expressed as the ultimate mutant amino acid sequence for the codon that is considered. When more than one codon was mutated, the affected codon was displayed in parentheses after the amino acid sequence.

Case report

Case 1

A 53-year-old woman with familial history of colonic adenocarcinoma presented in 2007 with moderately differentiated adenocarcinoma of the rectum sigmoid (Fig. 1a), measuring 4.0 cm that infiltrated the intestinal wall upon the pericolic fat tissue, with lymphatic invasion and metastasis in seven of 17 regional lymph nodes. She was submitted to surgery and chemotherapy. In 2009, the tumor had extended to the peritoneum and vaginal wall.

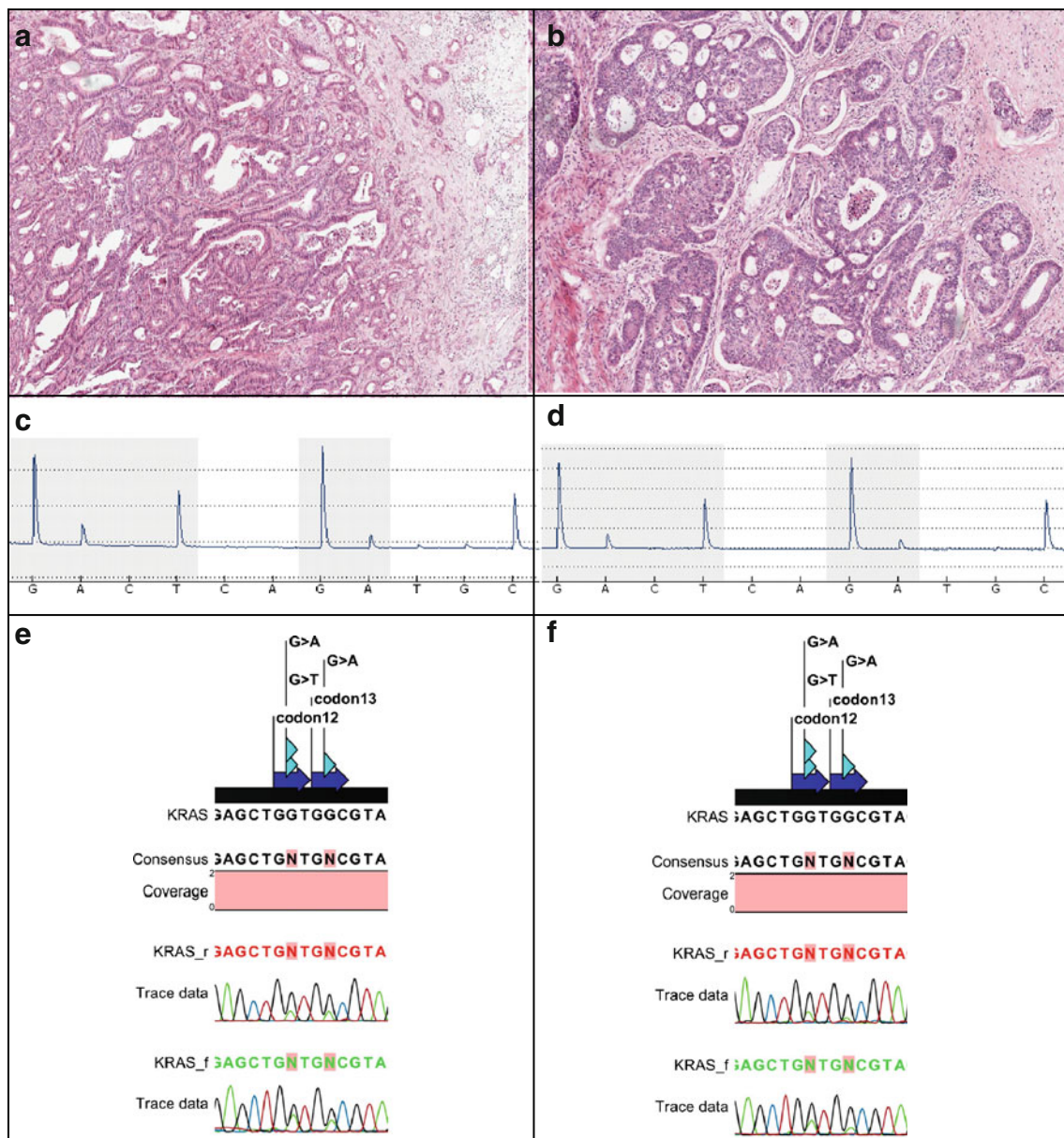


Fig. 1 Microscopic images of tumors (H&E, $\times 10$) from cases 1 (a) and 2 (b), both showing moderately differentiated usual adenocarcinoma. Pyrosequencing from cases 1 (c) and 2 (d) showing concurrent

mutations in codons 12 (GGT>GAT) and 13 (GGC>GAC) in both tumors. Direct sequence of cases 1 (e) and 2 (f), confirming the pyrosequencing findings

Kras mutations were examined in the primary tumor. Tumor cell samples were obtained by scraping neoplastic cells from the glass slide. By pyrosequencing of the primary tumor, we observed a mutation in codons 12 and 13 of *Kras* (Fig. 1c). The mutation in codon 12 was GGT>GAT and GGC>GAC in codon 13. These findings were confirmed by direct sequencing (Fig. 1e).

The patient was submitted to radiotherapy adding to the chemotherapy. She developed a fistula between the urinary bladder and the vaginal wall. In 2010, the positron emission tomography showed increased uptake in peribronchial, retroperitoneal, and para-aortic lymph nodes and also in the vaginal wall. Bevacizumab was introduced. The last follow-up was in April 2011. Computed tomography showed regression of peribronchial lymph node size but persistence of retroperitoneal and para-aortic lymph node sizes. The patient is alive with urinary symptoms, under chemotherapy and bevacizumab treatment, and with no progression of the disease.

Case 2

A 70-year-old man presented with a moderately differentiated usual adenocarcinoma of the colon (Fig. 1b) that infiltrated the intestinal wall diffusely; he also presented with liver metastasis. We had no access to his data with regard to tumor size or lymph node status. Sample cells

from the primary tumor were obtained by laser microdissection, and posterior pyrosequencing was performed. The tumor had a mutation in codons 12 and 13 of *Kras* (Fig. 1d). The mutation in codon 12 was GGT>GAT and GGC>GAC in codon 13. These findings were confirmed by direct sequencing (Fig. 1f). No follow-up data are available for this patient.

Review of the literature

Eligible studies

We performed an extensive review of the English literature and found 69 reported cases of multiple *Kras* mutations in primary CRC in 16 reports [1, 3, 7, 14–17, 20–22, 24, 25, 28, 32–34]. Table 1 lists the authors, number of cases studied for each series, number/percentage of mutated tumors, and number/percentage of multiple mutation tumors in each study. Table 1 also includes the two cases described above.

The studies were heterogeneous, varying in series from 53 to 2,214 patients. The detection methods varied widely as well, including direct sequencing, pyrosequencing, and different types of PCR. The percentage of mutated tumors in the reviewed series is consistent with existing reports, ranging from 22.6% to 58% (mean, 39.0%).

Table 1 Review of *Kras* multiple mutation frequency among primary colorectal cancer

Source [ref]	Studied cases (<i>n</i>)	Mutated cases (<i>n</i>)	% Mutated cases	MM cases (<i>n</i>)	% MM of mutated cases	% MM in CRC
Amado et al., 2008 [1]	427	184	43.1%	1	0.5%	0.2%
Andreyev et al., 1998 [3]	2,214	835	37.7%	11	1.3%	0.5%
Brink et al., 2003 [7]	737	271	36.8%	10	3.7%	1.4%
De Roock et al., 2010 [33]	747	299	40.0%	4	1.3%	0.5%
Jonsson et al., 2009 [14]	136	53	39.0%	3	5.6%	2.2%
Kampman et al., 2000 [15]	185	66	35.7%	1	1.5%	0.5%
Keller et al., 2009 [17]	75	23	30.7%	1	4.3%	1.3%
Ma et al., 2009 [20]	100	58	58.0%	1	1.7%	1.0%
Moerkerk et al., 1994 [21]	73	39	53.4%	12	30.8%	16.4%
Neumann et al., 2009 [22]	879	349	39.7%	2	0.6%	0.2%
Sameer et al., 2009 [24]	53	12	22.6%	1	8.3%	1.9%
Samowitz et al., 2000 [25]	1,413	449	31.8%	4	0.9%	0.3%
Tol et al., 2009 [28]	511	201	39.3%	1	0.5%	0.2%
Yunxia et al., 2010 [32]	101	33	32.7%	1	3.0%	1.0%
Karapetis et al., 2008 [16]	394	164	41.6%	7	0.4%	1.8%
Vaughn et al., 2011 [34]	2,121	900	42.4%	9	1.0%	0.4%
Petaccia et al. ^a	314	126	40.1%	2	1.6%	0.6%

MM multiple mutations, *n* number of cases, % percentage, CRC colorectal cancer

^a Unpublished data

Frequency of multiple mutations in Kras

Multiple mutations occurred in less than 10% of mutated tumors in all but one study—the oldest and second smallest report [21]—which observed multiple mutation tumors in 30% of its series. Excluding this study, based on the data in Table 1, multiple mutations occur in 2.1% of mutated tumors. We can also infer that approximately 1.0% of primary CRC patients harbor a multiple mutation tumor.

Patterns of multiple mutations

The patterns of multiple mutations were determined in 64 of the 71 listed cases. Table 2 lists the authors, the codons that were affected by the multiple mutations, and the mutated nucleotide sequences, including the two cases in this report. Multiple mutations were observed in the same codon (only codon 12 or 13) or different codons (e.g., simultaneously in codons 12 and 13). Most multiple mutations occurred in a single codon (38 cases, 59% of

Table 2 Reported cases of multiple Kras mutations in primary CRC regarding the affected codons and nucleotide changes

	Source [ref]	Nucleotides	Number of cases
Mutations in the same codon			
Two mutations in codon 12 (28 cases)			
	Moerkerk et al., 1994 [21]	GTT and GCT	7
	Moerkerk et al., 1994 [21]	TGT and GTT	2
	Brink et al., 2003 [7]	Not specified	6
	Samowitz et al., 2000 [25]	AAT	1
	Samowitz et al., 2000 [25]	TTT	1
	Samowitz et al., 2000 [25]	CTT	1
	Andreyev et al., 1998 [3]	GTT and TGT	1
	Neumann et al., 2009 [22]	ATT	1
	Neumann et al., 2009 [22]	TTT	1
	De Roock et al., 2010 [33]	GTT(12) e AGT (12)	1
	Amado et al., 2008 [1]	GAT and CGT	1
	Vaughn et al., 2011 [34]	TTT	4
	Vaughn et al., 2011 [34]	TGG	1
Three or more mutations in codon 12 (4 cases)			
	Jonsson et al., 2009 [14]	GAT, TGT, and GTT	1
	Moerkerk et al., 1994 [21]	TGT, GTT, and GCT	3
Two mutations in codon 13 (6 cases)			
	Andreyev et al., 1998 [3]	GTC and TGC	1
	Keller et al., 2009 [17]	TTC	1
	Tol et al., 2009 [28]	GAG	1
	Vaughn et al., 2011 [34]	GAA	2
	Vaughn et al., 2011 [34]	GTT	1
Mutations in different codons			
Mutation in codon 12 and 13 (17 cases)			
	Jonsson et al., 2009 [14]	GAT (12) and GAC (13)	1
	Jonsson et al., 2009 [14]	TGT (12) and GAC (13)	1
	Kampman et al., 2000 [15]	Not specified	1
	Samowitz et al., 2000 [25]	AGT (12) and GAC (13)	1
	Andreyev et al., 1998 [3]	Not specified	9
	Sameer et al., 2009 [24]	GAT (12) and GAC (13)	1
	Vaughn et al., 2011 [34]	GGA (12) and TGC (13)	1
	Petaccia et al. (present study)	GAT (12) and GAC (13)	2
Mutation in codons 12 or 13 and/or other (9 cases)			
	Brink et al., 2003 [7]	Not specified	4
	Yunxia et al., 2010 [32]	GAC (12) and (69) ^a	1
	MA et al., 2009 [20]	TGC (13) and (60) ^a	1
	De Roock et al., 2010 [33]	GTT (12) e (146) ^a	2
	De Roock et al., 2010 [33]	(146) ^a e (61) ^a	1
Total of multiple mutation cases			64 cases

^a Amino acid sequence not specified

64 cases reviewed). Two different codons were mutated in 40% of cases.

Multiple mutations solely in codon 12 are the most frequent type, encountered in 32 of 64 cases (50%) of concurrent mutations. The presence of two mutations in codon 12 (not 3 or more) is the most frequent of this group, representing 44% of total cases, indicating that it is the most common multiple mutation in *Kras*. Four cases had three or more mutations in codon 12 (6%). Multiple mutations solely in codon 13 constituted 9% of cases.

Comutations in codons 12 and 13 in the same tumor, as observed in our cases, were found in 17 cases, representing 27% of the cases that we reviewed. The mutational status of seven of these cases was available: GAT in codon 12 and GAC in codon 13 (4 cases), TGT (12) and GAC (13) (1 case), AGT (12) and GAC (13) (1 case), and GGA (12) and TGC (13) (1 case). The GAC sequence in codon 13 was ubiquitous in all but one case of comutations in codons 12 and 13; this mutation was observed in our two cases and is the most frequent type of mutation that occurs in codon 13. The sequences for codon 12 varied. Alternatively, comutations can occur in codon 12 or 13 and another codon, or in two codons that are not 12 or 13. This type was seen in nine cases (14%).

We excluded certain reports from our analysis. Kimura et al. [18] noted four cases of multiple mutations in *Kras* in CRC by direct sequencing—one involving only codon 12, and the other three in codons 12 and 13—but could not confirm these findings by examining the same samples by another methodology; thus, this study was not included in this review. Three other papers [6, 10, 29] each reported one case of multiple mutations, but the study populations were enrolled in a larger study group that had already been included in the review [3, 33]; we excluded these cases to avoid duplicating data. In one of these excluded reports for duplication [29], more data could be collected about the reported case that consisted of a mutation involving codons 12 (GTT) and 13 (GAC) in a 55-year-old man with moderately differentiated rectal adenocarcinoma and Duke C stage.

Another study [17] reported one multiple mutation case in a primary tumor and three others in metastatic disease. Two of the three metastatic disease cases had the finding reproduced in the primary tumor. It was not possible to determine which of three metastatic cases were the cases that were confirmed; thus, we did not use them in the analysis—only the initial primary tumor. Karapetis et al. [16] reported seven patients with multiple mutations in *Kras* but failed to specify the mutational status or provide additional data; thus, this finding was not used in Table 2 but was included in Table 1 to calculate the frequency of this mutation between series.

Discussion

We reported two cases of primary CRC with comutations in codons 12 and 13 of *Kras*. Both patients were adults (aged 53 and 70 years) with deep, invasive, moderately differentiated rectum sigmoid adenocarcinomas. One case experienced locoregional tumor spread and lymph node invasion, and the other presented with liver metastasis. The mutations were the same in the patients, wherein codon 12 was mutated to GAT, and codon 13 was mutated to GAC. The mutation in codon 12 in both tumors (GAT) is the most frequent single mutation but is not the type that is associated with more aggressive behavior (GGT) [2]. The mutation in codon 13 (GAC) [8] is the most common in this codon. Mutations in both codons 12 and 13 are rare.

We also performed an extensive review of multiple *Kras* mutations in primary CRC. We observed that multiple mutations in the *Kras* gene are infrequent, constituting 2.1% of mutations in CRC and existing in 1.0% of CRC patients. Most comutations in *Kras* in tumors affect just one codon (59%); codon 12 is most frequently affected. Multiple mutations in different codons also develop. Codons 12 and 13 were simultaneously affected in only 27% of the cases that we reviewed. The most frequent amino acid sequences that were altered in multiple mutation tumors involving codons 12 and 13 were GAT (12) and GAC (13).

Much effort has been made to link the *Kras* status with prognosis in CRC. Evidences are being accumulated correlating specific types of amino acid substitutions with either a good outcome [35] or poor outcomes [2, 9]. Multiple *Kras* mutations are being targeted with regard to their impact on prognosis. One group [21] showed a strong association between advanced clinical stage and the presence of multiple *Kras* mutations in CRC. Both tumors that we reported here and five other cases [14, 21, 24, 29] harbored mutations in both codons 12 and 13 and were at an advanced clinical stage. Two other cases [10, 14] had multiple mutations in codon 12 and were associated with aggressive disease.

The detection methods that were used by the groups quoted in this review were not considered. There has been an increased demand by laboratories, drug companies, clinicians, and patients to determine the mutational status of *Kras*; consequently, more institutions are beginning to perform such tests. The settlement of the ideal methodology and the cutoff for each assay has not been well established and currently under the scope of several molecular pathologists. The true clinical impact of multiple *Kras* mutations is unknown, primarily due to the scarcity of such data. Most reports do not use the information about MM as an individual bias when interpreting and correlating their data.

The percentage of tumors that contain multiple mutations might be underestimated, because most groups have analyzed only codons 12 and 13. Few groups have studied the impact of

mutations in other codons, such as 61 and 146. Multiple mutations in *Kras* exist in carcinomas other than CRC. One group reported two cases of multiple mutations in lung carcinoma [11].

The presence of more than one mutation in the same tumor can reflect the existence of a heterogeneous population of tumor cells. *Kras* mutations represent an early event in colorectal carcinogenesis, but some reports exist on the disconnection with regard to *Kras* status between primary and metastatic tumors. One group [13] reviewed 285 cases, comparing *Kras* mutational status between primary tumors and metastasized tumors. A lack of an association was observed in 14 (5%) cases. A mutation in the primary tumor and a lack of mutation in the metastasis were seen in six cases, and the converse was noted in eight cases. These data may reflect increased genetic instability in cells that progressively acquire mutations or the presence of a heterogeneous group of neoplastic cells inside the tumor [5, 13]. Multiple mutation tumors can reflect the gradual accumulation of mutations, which is consistent with the aggressive behavior of the multiple mutation tumors that we have presented here, as well as other cases [14, 17, 21, 24, 29].

This is the first large review of the literature that has grouped cases of multiple *Kras* mutations in CRC. We have described the frequency of such phenomena in mutated tumors, the incidence among CRC patients, the patterns of multiple mutations in the literature, and the frequency of specific amino acid changes and have made clinical correlations with these findings. The findings add information for the increasing effort to determine the clinical and therapeutic implications of specific amino acid changes in the *Kras* gene.

Conflicts of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Amado RG, Wolf M et al (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26(10):1626–1634
- Andreyev HJ, Norman AR et al (2001) Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 85(5):692–696
- Andreyev HJ, Norman AR et al (1998) Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst* 90(9):675–684
- Bardelli A, Siena S (2010) Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 28(7):1254–1261
- Bouchahda M, Karaboue A et al (2010) Acquired KRAS mutations during progression of colorectal cancer metastases: possible implications for therapy and prognosis. *Cancer Chemother Pharmacol* 66(3):605–609
- Breivik J, Meling GI et al (1994) K-ras mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location. *Br J Cancer* 69(2):367–371
- Brink M, de Goeij AF et al (2003) K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 24(4):703–710
- Capella G, Cronauer-Mitra S et al (1991) Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environ Health Perspect* 93:125–131
- Cerottini JP, Caplin S et al (1998) The type of K-ras mutation determines prognosis in colorectal cancer. *Am J Surg* 175(3):198–202
- De Roock W, Piessevaux H et al (2008) KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* 19(3):508–515
- Do H, Krypuy M et al (2008) High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer* 8:142
- Hayes VM, Westra JL et al (2000) New comprehensive denaturing-gradient-gel- electrophoresis assay for KRAS mutation detection applied to paraffin-embedded tumours. *Genes Chromosom Cancer* 29(4):309–314
- Italiano A, Hostein I et al (2010) KRAS and BRAF mutational status in primary colorectal tumors and related metastatic sites: biological and clinical implications. *Ann Surg Oncol* 17(5):1429–1434
- Jonsson M, Ekstrand A et al (2009) Experiences from treatment-predictive KRAS testing; high mutation frequency in rectal cancers from females and concurrent mutations in the same tumor. *BMC Clin Pathol* 9:8
- Kampman E, Voskuil DW et al (2000) Animal products and K-ras codon 12 and 13 mutations in colon carcinomas. *Carcinogenesis* 21(2):307–309
- Karapetis CS, Khambata-Ford S et al (2008) K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 359(17):1757–1765
- Keller G, Geist B et al (2009) Novel multiple, monoallelic KRAS mutations at codon 12 and 13. *Int J Cancer* 125(11):2744–2745
- Kimura K, Nagasaka T et al (2007) No duplicate KRAS mutation is identified on the same allele in gastric or colorectal cancer cells with multiple KRAS mutations. *J Int Med Res* 35(4):450–457
- Lievre A, Blons H et al (2010) Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. *Oncogene* 29(21):3033–3043
- Ma ES, Wong CL et al (2009) Detection of KRAS mutations in colorectal cancer by high-resolution melting analysis. *J Clin Pathol* 62(10):886–891
- Moerkerk P, Arends JW et al (1994) Type and number of Ki-ras point mutations relate to stage of human colorectal cancer. *Cancer Res* 54(13):3376–3378
- Neumann J, Zeindl-Eberhart E et al (2009) Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract* 205(12):858–862
- Plesec TP, Hunt JL (2009) KRAS mutation testing in colorectal cancer. *Adv Anat Pathol* 16(4):196–203
- Sameer AS, ul Rehman S et al (2009) Molecular gate keepers succumb to gene aberrations in colorectal cancer in Kashmiri population, revealing a high incidence area. *Saudi J Gastroenterol* 15(4):244–252
- Samowitz WS, Curtin K et al (2000) Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival:

- a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 9 (11):1193–1197
26. Seth R, Crook S et al (2009) Concomitant mutations and splice variants in KRAS and BRAF demonstrate complex perturbation of the Ras/Raf signalling pathway in advanced colorectal cancer. *Gut* 58(9):1234–1241
 27. Spano JP, Fagard R et al (2005) Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. *Ann Oncol* 16(2):189–194
 28. Tol J, Dijkstra JR et al (2009) High sensitivity of both sequencing and real-time PCR analysis of KRAS mutations in colorectal cancer tissue. *J Cell Mol Med* 14(8):2122–2131
 29. Urosevic N, Krtolica K et al (1993) Prevalence of G-to-T transversions among K-ras oncogene mutations in human colorectal tumors in Yugoslavia. *Int J Cancer* 54(2):249–254
 30. Van Krieken JH, Jung A et al (2008) KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch* 453(5):417–431
 31. Wang HL, Lopategui J et al (2010) KRAS mutation testing in human cancers: the pathologist's role in the era of personalized medicine. *Adv Anat Pathol* 17(1):23–32
 32. Yunxia Z, Jun C et al (2010) Mutations in epidermal growth factor receptor and K-ras in Chinese patients with colorectal cancer. *BMC Med Genet* 11:34
 33. De Roock W, Claes B, Bernasconi D et al (2010) Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 11(8):753–762
 34. Vaughn CP, ZoBell SD et al (2011) Frequency of Kras, BRAF and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes Chromosom Cancer* 50(5):307–312
 35. De Roock W, Jonker DJ et al (2010) Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA* 304 (16):1812–1820



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental and Molecular Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexmp

KRAS insertions in colorectal cancer: What do we know about unusual KRAS mutations? ☆



Mariana Petaccia de Macedo ^{a,*}, Luiz Guilherme Cernaglia Aureliano de Lima ^a,
 Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami ^a, Fernanda Machado de Melo ^a, Louise D Brot Andrade ^a,
 Bianca Cristina Garcia Lisboa ^a, Luisa Martelli Soares ^b, Fernando Augusto Soares ^a,
 Dirce Maria Carraro ^c, Isabela Werneck da Cunha ^a

^a Department of Molecular Diagnosis, Anatomic Pathology Department, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

^b Veterinary Medicine School, UNESP, Botucatu, Brazil

^c Laboratory of Genomics and Molecular Biology, CIPE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 February 2014

Available online 2 March 2014

Keywords:

Molecular pathology

Genetics

KRAS mutation

Colorectal cancer

ABSTRACT

Introduction: KRAS mutations are negative predictors of the response to anti-EGFR therapy in colorectal carcinomas (CRCs). Point mutations in codons 12, 13, and 61 are the most common KRAS mutations in CRC. There are few reports on insertions in KRAS, and little is known about its ability to activate the RAS pathway. The scarcity of data regarding insertion frequencies and nucleotide additions in KRAS impedes the management of patients with such mutations. We present data on KRAS insertions in CRC and discuss a case.

Materials and methods: Pyrosequencing and Sanger sequencing were performed to identify KRAS and BRAF mutations in paraffin-embedded samples of CRC. Expression of mismatch repair proteins was examined by immunohistochemistry.

Results: We detected a GGT insertion between codons 12 and 13 (c.36_37insGGT;p.G12_G13insG) in a CRC patient. We found that insertions in KRAS is very rare in CRC and that the most frequent type of insertion is c.36_37insGGT.

Conclusions: KRAS gene insertions represent a diagnostic and clinical challenge due to the difficult and unusual pyrosequencing findings and the lack of information regarding its clinical impact.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Core tip

KRAS mutation is a negative predictor of the response to anti-EGFR therapy in colorectal carcinoma. The most frequent and extensively studied mutation is found in codons 12, 13, and 61. Little is known about the impact of unusual KRAS mutations on treatment response or their impact on tissue morphology and clinical characteristics. Insertion type mutations can also be technically challenging to detect.

Introduction

KRAS mutations are found in 35% to 40% of colorectal carcinomas (CRCs) and are negative predictors of the response to anti-EGFR therapy

☆ **Supporting Foundations:** We acknowledge Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant 2011/08510-2) for financial support and Fundação Antônio Prudente—AC Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil for institutional support.

* Corresponding author at: AC Camargo Cancer Center, Rua Antonio Prudente, 211, Liberdade, São Paulo 01509-010, Brazil.

E-mail address: maripetaccia@gmail.com (M.P. Macedo).

(Lièvre et al., 2006). Such mutations can result from nucleotide exchange and deletion or insertion of DNA segments.

In CRC, most mutations in KRAS are single-base substitutions that result in a missense mutation that involves 1 codon, most commonly codons 12 and 13 (73% and 22%, respectively). The most frequent point mutations in codon 12 are GGT > GAT (c.35G > A; p.Gly12Asp) and GGT > GTT (c.35G > T p.Gly12Val), and that in codon 13 is GGC > GAC (c.38G > A; p.Gly13Asp) (Andreyev et al., 1998; Bos et al., 1987; Urosevic et al., 1993). Other less frequent missense mutations in KRAS have been reported in codons 61, 117, and 146 and other rare sites (Brink et al., 2003; Palmirotta et al., 2009). Single-base substitutions that involve more than 1 codon in the same tumor and the exchange of more than 1 base in the same codon have also been reported (Macedo et al., 2011).

The lack of experimental data on the pathogenicity of insertion-type mutations in KRAS and few findings regarding their frequency and nucleotide insertions impede the treatment of patients with such mutations. Insertions in KRAS have been reported in only 16 tumors.

We present data on insertions in KRAS and discuss a case of a GGT insertion between codons 12 and 13 of KRAS in a CRC patient with additional clinical and molecular findings.

Materials and methods

Clinical history

A 65-year-old male underwent a colonoscopy due to anemia that was diagnosed in the preoperative exams for drainage of a hydrocephaly due to vascular encephalic infarction. He had a history of arterial systemic hypertension and diabetes. No gastrointestinal symptoms were present at the time of the colonoscopy. The colonoscopy showed a 7.0-cm stenosing mass on the right colon, with confirmation of the adenocarcinoma by biopsy. CEA levels were normal. The patient was subjected to thoracic, abdominal, and pelvic tomography staging exams, which were negative for metastatic lesions. A right colectomy resection was performed.

Histopathological findings

The tumor was a moderately differentiated invasive adenocarcinoma (Fig. 1A) with a mucinous component that constituted 5% of the tumor area, arising from a high-grade tubulovillous adenoma (Fig. 1B). Neoplastic cells had infiltrated the pericolonic subserous tissue, and the patient showed no vascular or perineural invasion. Sixty lymph nodes (LNs) were examined, all of which were negative for metastasis. Surgical margins were negative, and the small intestine mucosa and appendix were unremarkable with regard to microscopic alterations.

Per the AJCC 7th edition, the final pathological stage was pT3pN0pM0. The patient was classified as clinical stage II, and no adjuvant treatment was indicated, because there were no other high risk features of malignancy. After 12 months of follow-up, the patient did not experience recurrence of the tumor or metastasis.

Molecular pathology findings

The tumor was analyzed by immunohistochemistry to examine the loss of expression of gene repair machinery protein, due to its association with poor response to 5-fluorouracil-based treatments and as a prognostic marker (Jover et al., 2009) following an institutional workflow for all CRC specimens. Antibodies to MSH-2 (G219-1129-Cell Marque), MSH-6 (44-Ventana), MLH-1 (G168-728-Cell Marque), and PMS-2 (A16-4-BD) were with a streptavidin–biotin system. Internal and external positive controls worked properly.

Loss of expression was defined as lack of nuclear staining throughout the tumor and positive staining of non-neoplastic tissue on the same slide. In our case, all repair proteins were expressed.

KRAS mutation analysis was performed initially on 1 representative slide of the invasive tumor area. DNA was obtained by scraping neoplastic tissue from 5-um paraffin-embedded sections and extracted with a commercial kit (FFPE Qiagen). The DNA was sequenced by pyrosequencing reaction per manufacturer's instructions (*KRAS* Pyro KIT Q24, Qiagen). The pyrogram showed a GGT insertion in *KRAS* between codons 12 and 13 (c.36_37insGGT, p.G12_G13insG) (Fig. 1C). These findings were confirmed by standard Sanger reaction of the same DNA sample (Fig. 1D).

BRAF mutations in codon 600 were examined in the same DNA sample by pyrosequencing per manufacturer's instructions (*BRAF* Pyro KIT Q24, Qiagen); the tumor contained wild-type *BRAF*.

KRAS heterogeneity

To examine the intratumoral heterogeneity of the *KRAS* alteration, one different invasive neoplastic area than the first one examined and a preneoplastic adenomatous lesion were tested for the *KRAS* mutation by pyrosequencing; all areas had the same GGT insertion between

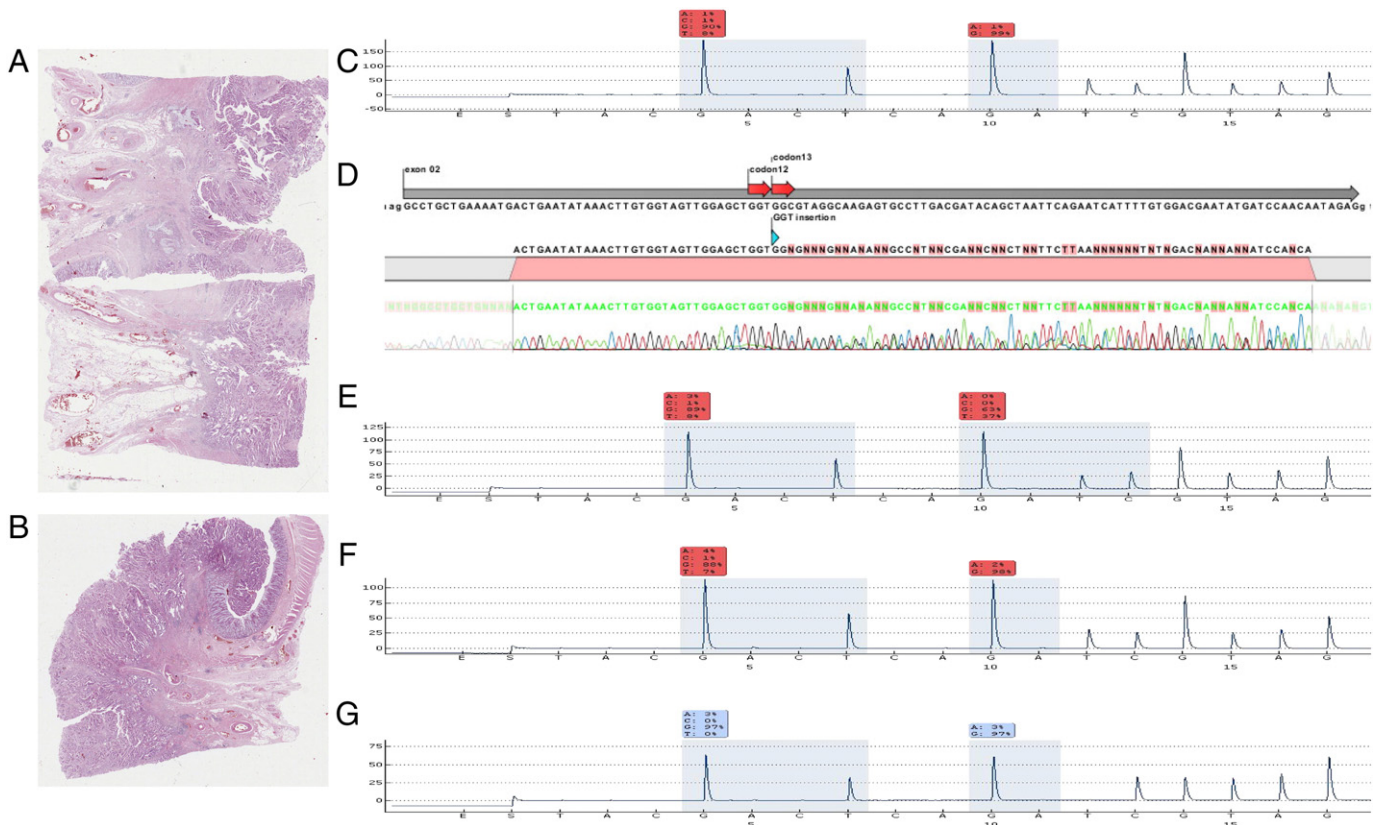


Fig. 1. A & B). Hematoxylin and eosin slides showing an invasive colorectal adenocarcinoma arising in an adenomatous lesion with high-grade dysplasia. The circled area indicates from where DNA was extracted. Pyrogram showing a GGT insertion between codons 12 and 13 of *KRAS* in an invasive area (C) with direct sequencing confirming the result (D). A distinct invasive area (E) and an adenomatous lesion (F) showing the same mutation. Pyrogram (G) showing wild-type *KRAS* in normal mucosa.

codons 12 and 13 of *KRAS* (Fig. 1E–F). DNA from the non-neoplastic intestinal mucosa and a pericolic lymph node were also tested for *KRAS* alterations by pyrosequencing; both harbored wild-type *KRAS* (Fig. 1G).

Discussion

We detected a GGT insertion between codons 12 and 13 of *KRAS* in 2 invasive tumor areas and a preneoplastic lesion from a CRC patient.

KRAS insertions are rare mutations: eight cases have been reported in CRC (9, including our patient), 6 in hematological tumors, and 3 in lung carcinomas. Table 1 lists these cases and describes the mutation, patient, tumor, detection technique, and the mutation frequency in CRC cases (Table 1).

Servomaa et al. (2000) have reported a duplication of *KRAS* codon 12 in 14% of 118 female CRC patients. All mutations except 1 were missense. One case had a 3-base pair (GGT) insertion in codon 12, representing 6% of mutations, with no other clinical or pathological information about the patient with the insertion

Another study reported an insertion in *KRAS* that did not involve codon 12 in a series of 163 CRC, 35.6% of which harbored a *KRAS* mutation. All mutations except 1 were point mutations. The insertion was a 15-base pair insertion between codons 62–66 of *KRAS* (c:198_199insGAGGAGTACAGTGCA), representing 1.7% of all *KRAS* mutations. The patient was a 64-year-old woman with well-differentiated CRC, with a mucinous component, pathological stage pT2pN0, low-grade microsatellite instability (MSI-L), and no recurrence after 43 months of follow-up Wójcik et al., 2008).

Another author reported a case of *KRAS* insertion (c.39_40insGGC) in a 23-year-old female with multiple adenomas and invasive adenocarcinoma of the distal colon with LN metastasis (Balschun et al., 2011). The insertion was detected in the primary tumor and LN metastasis, representing 0.24% of the *KRAS* mutation casuistic. Four other groups reported 1 case of *KRAS* insertion in CRC each, with no clinical or pathological data on the patients—the insertions were c.48_49insTGG (Ahlquist et al., 2008), c.33_34insGGAGCT (Vaughn et al., 2011), c.30_31insCGA (Simi et al., 2008), and p.V14_G15insG (Weidlich et al., 2011) and constituted 1.5%, 0.1%, 0.9%, and 1% of *KRAS* mutations detected in their casuistic, respectively.

Three studies reported *KRAS* insertions in lung carcinomas. One study examined EGFR and *KRAS* mutations in 237 lung carcinomas by direct sequencing; 3.8% of which had *KRAS* mutations, most of which (90%) were point mutations. One case (10%) was a duplication/insertion in *KRAS* exon 2 (DupT50_M72) in a 68-year-old nonsmoking male with wild-type EGFR lung adenocarcinoma (Wu et al., 2008).

Another study examined 418 lung carcinomas for EGFR and *KRAS* exon 2 mutations by direct sequencing; 12% had EGFR mutation and 24% had *KRAS* mutations. The *KRAS* mutations were primarily point mutations in codons 12 and 13 (99%); 1 case (1%) was an insertion in exon 1 (G12–G13insG) (Sartori et al., 2009), that showed no additional clinical or pathological data. The third study reported c.198_199ins15 in *KRAS* from a pT1pN1 lung carcinoma sample in a 69-year-old female with wild-type *BRAF* and EGFR. The patient carried the mutation in the primary tumor but not the LNs (Schmid et al., 2009).

Six cases of *KRAS* insertions in hematologic tumors have been reported. One group identified 2 cases of a GGT insertion between codons 12 and 13 of *KRAS* in leukemia cells from a 2-month-old and 3-year-old patient (Reimann et al., 2006). Another group found a GGA insertion between codons 10 and 11 of *KRAS* in a 4-year-old male with myeloid leukemia (Bollag et al., 1996). Three other cases of *KRAS* insertions in hematologic tumors have been reported—between codons 9 and 10 (p.V9_G10insV; c.27_28insGTA) (Tartaglia et al., 2004), c.36_37insGCG (Zhang et al., 2011), and c.31_32insGAG (Dolnik et al., 2012).

Our molecular pathology lab performed 1039 *KRAS* tests in CRC by pyrosequencing, targeting codons 12 and 13 for 30 months between

Table 1
Reported cases of *KRAS* insertions in human malignancies.

Author	Insertion type	Sex	Age	Tumor type	Technique	% <i>KRAS</i> mutation	% insertion	Analysed codons
Servomaa et al., 2000	p.G12_G13insG	Female	NS	CRC	SSCP and DS	14	6.0	Codons 12, 13, 61
Wójcik et al., 2008	p.A66_M67insEEYSA	Female	64 yrs	CRC	SSCP and DS	35	1.7	Codons 12, 13, 61, 117
Macedo et al.	p.G12_G13insG	Male	65 yrs	CRC	Pyrosequencing	40	0.2	Codons 12 and 13
Ahliquist et al., 2008	p.K16_S17insL	Not specified	NS	CRC	DS	40	1.5	Exons 2 and 3
Balschun et al., 2011	p.G13_V14insG	Female	23 yrs	CRC	Pyro and DS	NS	0.14	Codons 12 and 13
Vaughn et al., 2011	p.A11_G12insGA	Not specified	NS	CRC	Pyro	44	0.1	Codons 12, 13, 61 and 146
Simi et al., 2008	p.G10_A11insG	Not specified	NS	CRC	HRMA and DS	43	0.9	NS
Weidlich et al., 2011	p.V14_G15insG	Not specified	NS	CRC	Pyro and DS	32	1.0	Codons 12, 13, 61 and 146
Reimann et al., 2006	p.G12_G13insG	Not specified	2 months	Hematologic	Direct sequencing	-	-	-
Reimann et al., 2006	p.G12_G13insG	Male	3 yrs	Hematologic	Direct sequencing	-	-	-
Bollag et al., 1996	p.G10_A11insG	Male	4 yrs	Hematologic	SSCP	-	-	-
Tartaglia et al., 2004	p.V9_G10insV	Not specified	NS	Hematologic	DHPLC and DS	-	-	-
Zhang et al., 2011	p.G12_G13insA	Not specified	NS	Hematologic	DS	-	-	-
Dolnik et al., 2012	p.G10_A11insG	Not specified	NS	Hematologic	NGS	-	-	-
Wu et al., 2008	dupT50_M72	Male	68 yrs	Lung carcinoma	Direct sequencing	-	-	-
Sartori et al., 2009	G12-G13 ins G	Not specified	NS	Lung carcinoma	Direct sequencing	-	-	-
Schmid et al., 2009	p.A66_M67insEEYSA	Female	69 yrs	Lung carcinoma	Direct sequencing	-	-	-

CRC = colorectal carcinoma; NS = Not specified; SSCP = single-strand conformation polymorphism; DS = direct sequencing; bp = base pairs; DHPLC = Denaturing high-performance liquid chromatography; HRMA = High-resolution melting analysis; NGS = Next-generation sequencing; % Insertion = regarding all *KRAS* mutations.

2011 and 2013), 40.62% of which had *KRAS* mutations. The distribution of mutations between codons 12 and 13 was consistent with the reported frequency (data not published). The most common mutations were missense mutations, constituting 99.8% of cases, with the insertion case reported here representing the remaining 0.2%.

KRAS insertions have been reported in 6% (Servomaa et al., 2000), 1.7% (Wójcik et al., 2008), 1.5% (Ahlquist et al., 2008), 1.0% (Weidlich et al., 2011), 0.9% (Simi et al., 2008), 0.14% (Balschun et al., 2011), and 0.1% (Vaughn et al., 2011) of CRC cases. The frequencies that exceed 1% are likely attributed to the fewer cases that were studied.

Among the 17 reported cases (16 reviewed plus our case) of *KRAS* insertions in human malignancies, we noted 10 types of mutations. The GGT insertion between codons 12 and 13 (c.36_37insGGT; p.G12_G13insG) is the most frequent (five tumors: 2 CRC, 2 hematological, and 1 lung cancer). Despite the rarity and difficulty in determining the frequency of insertions in *KRAS* gene, we found that the most common *KRAS* insertion in human malignancy was a GGT insertion between codons 12 and 13, representing 30% of all insertions.

Using experimental assays, a previous study demonstrated the ability of a *KRAS* insertion between codons 10–11 to activate the RAS cascade by impairing GTP hydrolysis in a leukemia patient (Bollag et al., 1996). No data are available regarding this activity of a GGT insertion between codons 12 and 13 or the predictive value of the response to anti-EGFR treatment. The ability of this specific alteration to activate the RAS pathway must be examined further.

Regarding treatment decisions, the clinical and biological significance of the various types of *KRAS* mutations must be understood better. Some data indicate that *KRAS* codon 13 mutations (p.G13D) respond to anti-EGFR therapy (Tejpar et al., 2012). The rarity of certain mutations, such as the insertions in this report, renders such data difficult to generate.

In a study of genetic alterations during CRC tumor development, Vogelstein showed that *KRAS* mutations are an early step in CRC carcinogenesis (Vogelstein et al., 1988). Our findings support these data—the insertion in our patient was detected in an adenoma and throughout the tumor in 2 invasive areas.

Only 3 of the 8 cases of *KRAS* insertions in CRC have reported clinical and pathological findings. Our patient and a subject who was reported by Wójcik et al. (2008) were elderly, with tumors that had a mucinous component and no lymph node metastasis, and in the initial clinical stages. The patient who was reported by Balschun et al. (2011) was younger and had a more aggressive tumor with LN metastasis and, like our case, associated with adenomas.

There are many techniques that can be used to test *KRAS* mutations, differing in sensitivity, specificity, cost, time, and ability to identify mutations (Gonzalez de Castro et al., 2012). Certain techniques only detect known mutations in the more commonly involved codons (12, 13, and 61), which might be why the true frequency of rare mutations is unknown.

In most of the 16 cases, direct sequencing was used to search for *KRAS* mutations. Three groups used pyrosequencing, and the remaining studies used single-strand conformation polymorphism, denaturing high-performance liquid chromatography, high-resolution melting analysis, next-generation sequencing, or their combination (Table 1). These techniques allow one to identify insertion-type mutations. Our study is the fourth one of a *KRAS* insertion detected by pyrosequencing and the first to report the pyrogram. Our *KRAS* insertion was challenging to detect by pyrosequencing, because the pyrogram was unusual and difficult to interpret.

In conclusion, we have reported a case of *KRAS* insertion in CRC by pyrosequencing, correlating it with clinical and pathological characteristics; reviewed insertions in *KRAS*; and determined the frequency (0.2%) of this insertion in our *KRAS*-mutated CRC casuistic. Based on a

literature review, the GGT insertion between codons 12 and 13 is the most frequent type of *KRAS* insertion in human malignancy.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Ahlquist, T., Bottillo, I., Danielsen, S.A., et al., 2008. RAS signaling in colorectal carcinomas through alteration of RAS, RAF, NF1, and/or RASSF1A. *Neoplasia* 10 (7), 680–686.
- Andreyev, H.J., Norman, A.R., Cunningham, D., Oates, J.R., Clarke, P.A., 1998. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter 'RASCAL' study. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 675–684.
- Balschun, K., Haag, J., Wenke, A.K., von Schönfels, W., Schwarz, N.T., Röcken, C., 2011. *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA* exon 20, and *BRAF* genotypes in synchronous and metachronous primary colorectal cancers diagnostic and therapeutic implications. *J. Mol. Diagn.* 13 (4), 436–445.
- Bollag, G., Adler, F., elMasry, N., et al., 1996. Biochemical characterization of a novel *KRAS* insertion mutation from a human leukemia. *J. Biol. Chem.* 271, 32491–32494.
- Bos, J.L., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Verlaan-de Vries, M., et al., 1987. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327, 293–297.
- Brink, M., de Goeij, A.F.P.M., Weijenberg, M.P., et al., 2003. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in the Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 24, 703–710.
- Dolnik, A., Engelmann, J.C., Scharfenberger-Schmeer, M., et al., 2012. Commonly altered genomic regions in acute myeloid leukemia are enriched for somatic mutations involved in chromatin remodeling and splicing. *Blood* 120 (18), e83–e92.
- Gonzalez de Castro, D., Angulo, B., Gomez, B., et al., 2012. A comparison of three methods for detecting *KRAS* mutations in formalin-fixed colorectal cancer specimens. *Br. J. Cancer* (107), 345–351.
- Jover, R., Zapater, P., Castells, A., et al., 2009. The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status. *Eur. J. Cancer* 45, 365–373.
- Lièvre, A., Bachelot, J.B., Le Corre, D., et al., 2006. K-RAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 66, 3992–3995.
- Macedo, M.P., Andrade Lde, B., Coudry, R., et al., 2011. Multiple mutations in the *KRAS* gene in colorectal cancer: review of the literature with two case reports. *Int. J. Colorectal Dis.* 26, 1241–1248.
- Palmirotta, R., Savonarola, A., Formica, V., Ludovici, G., Del Monte, G., Roselli, M., Guadagni, F., 2009. A novel K-ras mutation in colorectal cancer. A case report and literature review. *Anticancer Res.* 29, 3369–3374.
- Reimann, C., Arola, M., Bierings, M., et al., 2006. A novel somatic K-Ras mutation in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia* 20, 1637–1638.
- Sartori, C., Cavazza, A., Sgambato, A., et al., 2009. EGFR and K-ras mutations along the spectrum of pulmonary epithelial tumors of the lung and elaboration of a combined clinicopathologic and molecular scoring system to predict clinical responsiveness to EGFR inhibitors. *Am. J. Clin. Pathol.* 131, 478–489.
- Schmid, K., Oehl, N., Wrba, F., et al., 2009. M. EGFR/*KRAS*/*BRAF* mutations in primary lung adenocarcinomas and corresponding locoregional lymph node metastases. *Clin. Cancer Res.* 15 (14), 4554–4560.
- Servomaa, K., Kiuru, A., Kosma, V.M., Hirvikoski, P., Rytömaa, T., 2000. p53 and K-ras gene mutations in carcinoma of the rectum among Finnish women. *Mol. Pathol.* 53, 24–30.
- Simi, L., Pratesi, N., Vignoli, M., et al., 2008. High-resolution melting analysis for rapid detection of *KRAS*, *BRAF*, and *PIK3CA* gene mutations in colorectal cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 130 (2), 247–253.
- Tartaglia, M., Martinelli, S., Cazzaniga, G., et al., 2004. Genetic evidence for lineage-related and differentiation stage-related contribution of somatic PTPN11 mutations to leukemogenesis in childhood acute leukemia. *Blood* 104 (2), 307–313.
- Tejpar, S., Celik, I., Schlichting, M., Sartorius, U., Bokemeyer, C., Van Cutsem, E., 2012. Association of *KRAS* G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J. Clin. Oncol.* 30, 3570–3577.
- Urošević, N., Krtolica, K., Skaro-Milic, A., Knezevic-Usaj, S., Dujic, A., 1993. Prevalence of G-to-T transversions among K-ras oncogene mutations in human colorectal tumors in Yugoslavia. *Int. J. Cancer* C54, 249–254.
- Vaughn, C.P., Zobel, S.D., Furtado, L.V., Baker, C.L., Samowitz, W.S., 2011. Frequency of *KRAS*, *BRAF*, and *NRAS* mutations in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 50 (5), 307–312.
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., et al., 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319, 525–532.
- Weidlich, S., Walsh, K., Crowther, D., et al., 2011. Pyrosequencing-based methods reveal marked inter-individual differences in oncogene mutation burden in human colorectal tumours. *Br. J. Cancer* 105 (2), 246–254.
- Wójcik, P., Kulig, J., Okoń, K., et al., 2008. *KRAS* mutation profile in colorectal carcinoma and novel mutation–internal tandem duplication in *KRAS*. *Pol. J. Pathol.* 59, 93–96.
- Wu, C.C., Hsu, H.Y., Liu, H.P., et al., 2008. Reversed mutation rates of *KRAS* and *EGFR* genes in adenocarcinoma of the lung in Taiwan and their implications. *Cancer* 113, 3199–3208.
- Zhang, J., Mullighan, C.G., Harvey, R.C., et al., 2011. Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* 118 (11), 3080–3087.



Training in molecular pathology during residency: the experience of a Brazilian hospital

Mariana Petaccia de Macedo, Louise D Brot Andrade, Victor Piana Andrade, et al.

J Clin Pathol 2014 67: 647-648 originally published online April 24, 2014

doi: 10.1136/jclinpath-2014-202271

Updated information and services can be found at:

<http://jcp.bmj.com/content/67/7/647.full.html>

These include:

References

This article cites 7 articles, 1 of which can be accessed free at:

<http://jcp.bmj.com/content/67/7/647.full.html#ref-list-1>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Notes

To request permissions go to:

<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:

<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:

<http://group.bmj.com/subscribe/>

Training in molecular pathology during residency: the experience of a Brazilian hospital

We have read with great interest the recent publication 'Integrating molecular diagnostics into histopathology training: the Belfast model' by Flynn *et al.*¹ We would like to contribute this discussion by presenting a model that we introduced at AC Camargo Cancer Center several years ago.

Molecular pathology (MP) and its application in making diagnoses, prognoses and in developing therapeutics are significant with regard to the scientific community and patient care, being an area in which pathology residents must be trained properly.² Much knowledge has been accumulated in recent years in this field³—some of which remains far from reaching clinical practice; nevertheless, many findings have been applied toward patient care. Clinical applications will increase the demand of knowledge in MP rapidly, representing a major challenge for pathology training programmes.

Goals for MP education have been established, comprising the acquisition of basic concepts in molecular biology; familiarisation with basic technologies and instrumentation; an understanding of the requirements for specimen for molecular tests; knowledge in interpreting test results; clinical application of molecular tests; knowledge on how to search the scientific literature; skills in laboratory management; quality control; and the legal, ethical and social implications of such tests.^{4 5}

The Federal Ministry of Education regulates medical residency programmes in Brazil. The pathology programme is a 3-year programme that begins after 6 years of medical school and covers anatomic pathology exclusively. Laboratory medicine is a different programme. According to Brazilian guidelines for pathology residency, first-year residents should be trained in autopsy, surgical pathology (mainly gross), cytopathology, and laboratory techniques. In the second year, skills in legal medicine and laboratory administration are emphasised. The third year intensifies the training

into subspecialties—surgical pathology, cytopathology and fetal autopsy (resolution for the National Council of Residency-CNRM/05/2002). Training in MP is not established per the guidelines in Brazil.

The MP training programme was established in AC Camargo Cancer Center in 2008. Third-year residents participate in a 2-month rotation that is dedicated exclusively to our MP section. We offer a 1-year fellowship in oncopathology for those who have concluded the residency, and these residents experience 2 months of a molecular diagnostic rotation as well. Since then, 25 residents were trained in our MP programme, and six are presently under training.

Residents in the MP rotation participate in the routine interpretation of dual-color dual-hapten brightfield *in situ* hybridization (DDISH) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) results, and also learn how to perform the ISH lab reactions. By the end of the rotation, they have acquired knowledge of the technique, the indication, the interpretation, possible artefacts and how to report a FISH test. Today, the FISH test for *HER2-neu* amplification (breast and stomach), adenocarcinoma/lymphoma/sarcoma translocations, and other chromosomal structural alterations are covered during the rotation.

Gene sequencing is one of the strengths of the rotation. Residents analyse sporadic and germline gene alterations by two methods (traditional Sanger and pyrosequencing). During the rotation, residents participate in all steps of the sequencing methods, including selection of the ideal tumour tissue by laser capture or manual microdissection, DNA extraction (frozen, paraffin, or blood), DNA quantification, DNA amplification by PCR, DNA electrophoresis, and the sequencing itself. Recently, we incorporated next-generation sequencing into our services. Thus, residents will be exposed to these tests, which include 'drugable' gene profiles and complete exome and genome sequencing.

Further, all residents in our department attend lectures on molecular biology basic concepts once a week approximately, throughout the 3 years of residency. The lectures cover basic concepts of DNA/RNA structure, replication, repair and functional aspects. Also, they include all types of technology to study gene expression, sequencing, structural abnormalities and microRNA profiles. Later, technologies that are used in MP investigations become the focus, and at

the end, applications in specific diseases are discussed.

MP is part of the everyday discussion in multidisciplinary hospital meetings and under microscope sessions, whether the topic is test indications and expected results or sample quality evaluation. We also take advantage of a weekly postgraduation meeting in which predoctoral students present their research projects. This session is mandatory for residents, in which they learn about molecular techniques being used in the research field. In order to evaluate the efficacy of training, residents submit written tests as part of routine residency evaluations, and MP is a recurring topic in these tests. The improvement of the resident in this field can also be assessed during case discussions.

Pathologists have an essential function in tissue banking.⁶ Our residency programme was the first in Brazil to enrol residents in biobanking activities.⁷ During the 3 years of the programme, residents learn how to properly handle, select and bank fresh tissue specimens for proper molecular analysis in the context of patient care and research. With an average of 672 h/year at the frozen section laboratory, each resident performs an average of 13 tissue collections per week.⁸ The biobank coordinator (AHJFMC) provides annual quality reports so the residents know how their involvement in the biobank activities affects quality control metrics (eg, tissue representativeness, cold-ischemia times, DNA/RNA quality).

We understand that the training that is offered to our residents is basic and might be insufficient to allow them to become molecular pathologists for which additional training after residency might be required. Among the 25 former residents trained in our MP programme, 15 of them continue practicing some degree of molecular-related work. Those working in community laboratories properly select tissue for molecular tests sent to a referral laboratory (RL). Those working in a RL mainly interpret ISH tests. In Brazil, the sequencing and PCR-based molecular tests are still performed in a few central labs. All 25 residents improved their understanding of the indications of molecular tests currently available for diagnosis, treatment decisions and prognosis, and learned to select the best tissue to perform the test. This knowledge led to improvement in the communication between them and oncologists/surgeons, and ultimately put the pathologist in more

evidence regarding a patient's treatment decisions.

There are many problems in the application of the orientations that are proposed for MP training. We cannot minimise the importance of morphologic training in traditional pathology. The pathology residency is a 3-year or 4-year training period during which the resident needs to acquire skills in tissue management, the use of special stains, immunohistochemistry, storage and disposal of specimens, gross examinations, microscopic examination, intraoperative frozen sections and smears, autopsy, cytopathology, laboratory management, regulations, and now molecular diagnostics.⁵ The complexity and coverage of these skills are limiting, considering the time that is available to educate residents.

Another concern is that MP training requires institutions to provide a pathology residency programme and MP infrastructure and expertise. This combination is less common than that of surgical pathology alone. Improved exchange of expertise between institutions is needed to identify where MP can be taught, and thus prepare our pathology professionals for the molecular medicine era.

**Mariana Petaccia de Macedo,¹
Louise D Brot Andrade,¹ Victor Piana Andrade,¹
José Vassallo,¹ Antonio Hugo J F M Campos,^{1,2}
Clóvis Antônio Lopes Pinto,¹
Cynthia Aparecida Bueno Toledo de Osório,¹
Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami,¹
Dirce Maria Carraro,^{2,3}
Fernando Augusto Soares,¹
Isabela Werneck da Cunha¹**

¹Department of Pathology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

²A C Camargo Biobank, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

³Laboratory of Genomics and Molecular Biology, CIPE, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

Correspondence to Dr Mariana Petaccia de Macedo, Department of Pathology, AC Camargo Cancer Center, Rua Antonio Prudente, 211, Liberdade, São Paulo 01509-010, Brazil; maripetaccia@gmail.com

Acknowledgements We acknowledge Felipe D'Almeida Santos, Stephania Martins Bezerra, Patricia Maria Peresi, Luiz GCA Lima, Fernanda Machado Mello, Bianca Lisboa, Eloisa Olivieri e Louise Motta for contributions in the residency, biobanking and teaching activities. We acknowledge Fundação Antônio Prudente—AC Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil for institutional support.

Funding We acknowledge Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant 2011/08510-2) for financial support.

Contributors CALP, CABTdo, LDBA, MDFdSB, DMC analysed the data and MPdM, VPA, JV, AHJFMC, FAS and IWDc wrote the manuscript.

Competing interests None.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.



To cite Macedo MP de, Andrade L D B, Andrade VP, et al. *J Clin Pathol* 2014;**67**:647–648.

Received 6 March 2014

Revised 2 April 2014

Accepted 3 April 2014

Published Online First 24 April 2014



► <http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2014-202176>

J Clin Pathol 2014;**67**:647–648.

doi:10.1136/jclinpath-2014-202271

REFERENCES

- 1 Flynn C, James J, Maxwell P, et al. Integrating molecular diagnostics into histopathology training: the Belfast model. *J Clin Pathol* 2014;**67**:632–6.
- 2 Haspel RL, Amaout R, Briere L, et al. A call to action: training pathology residents in genomics and personalized medicine. *Am J Clin Pathol* 2010;**133**:832–4.
- 3 Sobel ME, Bagg A, Caliendo AM, et al. The evolution of molecular genetic pathology: advancing 20th-century diagnostic methods into potent tools for the new millennium. *J Mol Diagn* 2008;**10**:480–3.
- 4 The Association for Molecular Pathology Training and Education Committee. Goals and objectives for molecular pathology education in residency programs. *J Mol Diagn* 1999;**1**:5–15.
- 5 Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. Curriculum content and evaluation of resident competency in anatomic pathology: a proposal. *Hum Pathol* 2003;**34**:1083–90.
- 6 Bevilacqua G, Bosman F, Dassel T, et al. The role of pathologist in tissue banking: European Consensus Expert Group Report. *Virchows Arch* 2010;**456**:449–54.
- 7 Froes Marques Campos AHJ, Silva AB, De Carvalho Mota LD, et al. The value of a tumor bank in the development of cancer research in Brazil: 13 years of experience of the A C Camargo Hospital. *Biopreserv Biobank* 2012;**10**:168–73.
- 8 Campos AH, Begnami MD, Osorio CA, et al. Tumor banking in Brazil within the Context of a Pathology Residency Program: the experience of the A C Camargo Hospital Biobank[abstract]. *Biopreserv Biobank* 2011;**9**:P76–7.

Anexo 5 - Artigo aceito para publicação na revista Oncoscience

RAS mutations vary between lesions in synchronous primary Colorectal Cancer: Testing only one lesion is not sufficient to guide anti-EGFR treatment decisions.

Mariana Petaccia de Macedo^{1,2}, Fernanda Machado de Melo¹, Júlia da Silva Ribeiro¹, Celso Abdon Lopes de Mello³, Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami^{1,2}, Fernando Augusto Soares^{1,2}, Dirce Maria Carraro^{1,4}, and Isabela Werneck da Cunha^{1,2}

ABSTRACT

Introduction: Mutations in *KRAS* and *NRAS* genes are negative predictors of anti-EGFR therapies response in metastatic colorectal cancer. There are few reports on *RAS* testing in synchronous primary colorectal cancer (SP-CRC) and a lack of recommendations on which tissue should be tested for the mutation in this disease. This study analyzed the *RAS* status of both lesions in SP-CRC patients and in their metastasis. **Materials and methods:** DNA was obtained from formalin-fixed-paraffin-embedded tissue, and mutations were analyzed by pyrosequencing. **Results:** *RAS* status was heterogeneous in 6 (75%) of 8 SP-CRC patients between primary lesions. Five showed heterogeneity regarding *RAS* mutational status, and from these, four presented with metastasis: 3 cases (75%) had WT metastatic tissue, and 1 case (25%) had mutated metastatic tissue. One patient showed divergence regarding *RAS* mutation type. **Discussion:** *RAS* mutations vary significantly between SP-CRC lesions, and the status of the metastasis is unpredictable. Testing for *RAS* mutations in only 1 of the primary lesions can misguide clinical decisions and hind the predictive potential of anti-EGFR treatment. A more appropriate approach in metastatic SP-CRC is to test the metastatic tissue or both primary lesions for providing more accurate mutation scenery and support more assertive clinical decisions.

Introduction

The definition of synchronous primary colorectal carcinoma (SP-CRC) is the existence of more than one primary colorectal carcinoma (CRC) in a single patient¹. This condition differs from metastatic synchronous CRC, in which metastasis is diagnosed at the time of the primary tumor [2]. SP-CRC is estimated to account for 3.5% of all CRCs [1]. SP-CRC is more common in men and is associated to predisposing conditions, such as inflammatory bowel disease, hereditary nonpolyposis CRC, and familial adenomatous polyposis [1].

The prognosis of SP-CRC is unknown [3, 4, 5]. Compared with solitary CRC, SP-CRC is more often associated with right-sided tumors, mucinous histology, and precursor sessile serrated adenoma (SSA). Molecularly, SP-CRC is linked to high microsatellite instability (MSI-H) and concurrent BRAF mutations [4], although these relationships are controversial [3].

Mutations in *KRAS* are well-established negative predictors of the response to anti-EGFR therapies in the treatment of metastatic CRC [6]. *KRAS* mutations are observed in 35% to 40% of CRCs and arise more often in codons 12 (80%) and 13 (15%) of exon 2 [7, 8, 9] and to a lesser extent in codons 61, 117, and 146 [7, 8, 9]. Unusual *KRAS* mutations affecting more than 1 codon and insertions have also been reported [10, 11]. Recent studies have shown that CRC patients with tumors that harbor *NRAS* mutations also have poorer response rates to EGFR inhibitors compared with those with wild-type *NRA* [12]. *NRAS* mutations, present in approximately 5% of CRC tumors, are less frequent than *KRAS* mutations [13] and also developed most often in codons 61, 12, and 13. Concomitant mutations in *KRAS* and *NRAS* are a rare finding [12].

Thus, testing for *KRAS* and *NRAS* mutations is necessary before anti-EGFR therapies are initiated [12, 14, 15]. Concerns have been raised since the *KRAS* mutation testing recommendations were issued regarding the ideal tissue that should be examined. The concordance of *KRAS* status between primary and metastatic CRC tissue in the same patient varies significantly, with heterogeneity ranging from 0% to 31% but tending to be low [16]. Studies that compared CRC biopsies before and after neoadjuvant therapy did not report any differences regarding *KRAS* status [17, 18,

19], nor did studies that compared biopsy and resection specimens in CRC [20, 21, 22].

As a result, an issue has arisen regarding patients with more than one primary lesion: should *RAS* mutations be tested in both lesions? In the daily routine of a molecular pathology laboratory, doing so is not an unusual situation, especially for those that perform high-volume *RAS* mutation testing.

The aim of this study was to analyze *KRAS* and *NRAS* mutational status in both lesions of SP-CRC patients as well as the metastatic tissue and determine the necessity of testing for both lesions in order to provide more precise information for supporting clinical decision.

Material and methods

Study population and histopathological features

Study participants were drawn from an institutional database between 2009 and 2014 and comprised patients of both genders and of all ages with a diagnosis of SP-CRC who were operated or biopsied on at AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil, and those who were being followed at our institution after tumor resection by an outside service and had their slides reviewed by our service. The SP-CRC cases in this study had invasive CRC lesions in the same surgical specimen. Pathological data were retrieved from the surgical pathology reports. The tumors were staged per the TNM, 7th edition [23].

Tissue samples and DNA isolation

Five 5- μ m sections from formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPET) blocks of 1 tumor area of both invasive adenocarcinomas were obtained from the paraffin block. Posterior deparaffinization was performed, and tumor samples were obtained by scraping the neoplastic tissue from the glass slide (macrodissection). Genomic DNA was isolated using the QIAamp Kit (Qiagen).

KRAS and *NRAS* mutation analysis

KRAS and *NRAS* mutations were analyzed in 1 area of both lesions in SP-CRC patients, as well as in the LNs and systemic metastatic lesions. First, *KRAS* codons

12 and 13 were tested, and if they were wild-type, mutations in *KRAS* codon 61 and *NRAS* codons 12, 13, and 61 were examined. If the sample remained wild-type for the tested codons, then, *KRAS* and *NRAS* codons 117 and 146 were analyzed.

Mutations were evaluated by pyrosequencing per the manufacturer's instructions [*KRAS* PyroMark™ Q24 kit, *NRAS* Pyro Kit, RAS extension KIT (Qiagen)]. Ten microliters of biotinylated PCR product was conjugated to streptavidin-sepharose beads (GE Healthcare) per a standard protocol for single-strand preparation. Pyrosequencing was performed using the PyroMark™ Gold Q24 reagent kit (Qiagen). A cutoff value of 5% was used to define a case as positive.

Ethics committee review:

This study is part of a scientific project approved by the local ethics committee (AC Camargo Cancer Center) (number1543/11, dated April 12, 2011).

Results

Clinical and pathological data

We retrieved 8 cases with SP-CRC from our molecular pathology laboratory records. The 8-patient series comprised 5 males (62.5%) and 3 females (37.5%), and the mean age was 71.5 years. All patients presented with 2 synchronous invasive CRC lesions at the time of the surgical resection (7 patients) or biopsy (1 patient). Five patients developed lymph node (LN) metastasis, 4 of whom had additional systemic metastasis (patient 1- liver, pleural and abdominal; patient 2- lung and brain; patient 5- lung; and patient 8- liver). See Table 1 for their clinical and pathological data.

Molecular pathology: *KRAS* mutational analysis of synchronous carcinomas

Of the 16 primary tumor samples in the 8 patients, 7 had wild-type *RAS* and 9 had mutated *RAS* samples. *KRAS* mutation was the most frequent (8 of 9 mutations, 88%). *KRAS* codon 12 was the most frequently mutated codon (7 of 9 mutated samples, 77%). Three mutations were noted: 3 cases of c.35G>A in *KRAS* codon 12 (p.G12D), 3 cases of c.35G>T (p.G12V) in *KRAS* codon 12, and 1 case of c.34G>A (p.G12S). A *KRAS* mutation in codon 13 (c.38G>A [p.G13D]) was observed in 1 patient, and a *NRAS* mutation in codon 61 (c.182A>T [p.Q61L]) detected in 1

patient. There were no mutations in *KRAS* codons 61, 117, or 146 or in *NRAS* codons 12, 13, 117, or 146.

RAS mutations were conflicting in 6 (75%) of the 8 SP-CRC patients. Five patients (83% and 62.5% of the heterogeneous or whole study group, respectively) (patients 2, 4, 5, 6, and 8) had 1 lesion with wild-type (WT) *RAS* and 1 lesion with mutated *RAS*; both lesions in the remaining patient (patient 1) harbored a mutation in *KRAS* codon 12 c.35G>A (p.G12D) and c.34G>A (p.G12S), respectively. Of the 2 cases that showed no heterogeneity with regard to *RAS* mutation between both primary CRC lesions, patient 3 had WT *RAS* in both lesions, and patient 7 had the c.35G>T *KRAS* mutation in both lesions.

Seven of the 8 patients had LN or systemic metastasis. We noted several profiles of LN and systemic metastatic tissue in patients with heterogeneous *RAS* mutation status in the primary lesions. Of the 4 metastatic cases with both WT and mutated *RAS* status, 3 (75%) (patients 4, 5, and 8) and 1 (25%) (patient 2) resulted in the metastatic tissue *RAS* WT and mutated, respectively. In the patient with disparate *RAS* mutations in the primary lesions (patient 1), both the LN and liver metastases had the same *KRAS* c.34G>A (p.G12S) mutation. See Table 1 for *RAS* mutational data.

Discussion

In this study, we evaluated the *RAS* mutational status of both lesions in 8 patients with SP-CRC and found that *RAS* mutations are commonly heterogeneous between SP-CRC lesions.

The rate of heterogeneity between lesions was 75% with regard to *RAS* mutational status and type. Although some studies have indicated that specific *KRAS* mutations respond to EGFR inhibitors [24], specially p.G13D, *RAS*-mutated tumors generally fail to respond to anti-EGFR treatment, regardless of the nucleotide substitution. If we consider only cases with heterogeneity in *RAS* mutational status (WT and mutated), 62.5% of SP-CRC cases showed clinically relevant heterogeneity of *RAS* mutational status between primary tumors.

Previous studies have reported molecular heterogeneity of both lesions in SP-CRC. Eguchi and colleagues [25] analyzed p53 mutations in both lesions of 16 SP-

CRC and found that 7 patients harbored a p53 mutation in only 1 lesion. In 9 patients, both lesions were mutated, but the mutations always differed between lesions from the same patient. Thus, regarding the p53 mutational status in SP-CRC, the authors found no concordance in p53 mutation status between lesions, suggesting that the synchronous tumors had a multicentric, not monoclonal, origin. Another group [5] showed that the pattern of CpG island methylation was concordant in synchronous cancer pairs in the same location in the colon (proximal-proximal) and colorectum (distal-distal) but not in tumor pairs in differing locations (eg, 1 proximal cancer and 1 distal cancer).

Previous studies have reported a significant percentage of discordance in *KRAS* mutational status between both lesions in SP-CRC. Balschun et al. studied 20 patients with SP-CRC for mutations in *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, and *BRAF*. *KRAS* mutations were discordant between synchronous lesions in 6 patients: 3 patients had mutated versus wild-type *KRAS*, and 3 patients had disparate mutation types in the synchronous lesions. *NRAS* status was heterogeneous in 1 patient with 4 primary lesions, only 2 of which harbored an *NRAS* mutation. They also tested the metastatic tissue and reported the ability to predict the origin of a metastasis by comparing the type of mutation between primary lesions [26].

Ogino et al. analyzed 6 SP-CRC patients and noted 3 of 5 cases that were discordant with regard to *KRAS*, who had WT and the c.35G>C mutation, the c.35G>T and c.38G>A mutations, and WT and the c.35G>A mutation, respectively. Metastatic tissue was not tested. Further, they noted discordance for *BRAF* mutation status in 1 patient between lesions (p.V600E and WT status) and MSI status [27].

Konishi et al. evaluated 27 synchronous CRC cases and found 10 patients with discordance regarding *KRAS* mutational status (wild-type versus mutated). The authors did not report any data regarding the type of mutation, thus, the discordance rate might be underestimated if we consider the possibility that *KRAS* mutation type differed between lesions [28].

Bae et al. studied 46 patients with SP-CRC and showed that *KRAS* mutation rates did not differ statistically between synchronous and solitary CRC, stating that *KRAS* and *BRAF* mutation status was not concordant in either of the synchronous lesions [29].

Koness et al. compared *KRAS* mutations in 15 SP-CRC patients and found 7 cases with differences in *KRAS* mutational status between paired tumors but did not show data regarding the type of mutation. Of the 8 cases with similar *KRAS* status, 1 had a mutation in both lesions [30].

One group [31] compared *RAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, and *TP53* status between 84 pairs of primary CRC and liver metastases and found a discordance rate of 97.6%, 98.8%, and 92.8% for *RAS/BRAF*, *PIK3CA*, and *TP53*, respectively. Regarding the 2 discordant *KRAS* mutation cases, 1 case was actually SP-CRC operated in different times with liver metastasis, and the second case was a patient with mucinous CRC and nonmucinous liver metastasis, with no additional clinical information, which were demonstrated to have developed from different primary lesions.

Collectively, our data and those of previous studies have shown that *KRAS* and *NRAS* mutations vary widely between SP-CRC lesions and that the status of the corresponding metastasis is unpredictable. Testing for *KRAS* mutation in only 1 of the primary lesions in SP-CRC might yield an incomplete profile on *KRAS* and *NRAS* mutation status and can misguide the clinical decision with regard to anti-EGFR treatment. Question still remains in debate regarding the scenario of different *RAS* mutation status between SP-CRC lesions of a single patient which presents with a metastasis, as observed in some of our patients, such as which information should be used to predict the response to anti-EGFR treatment. We hypothesize that if the metastasis is considered the actual disease, the treatment should be based on its status.

Because it is not possible to be certain which lesion led to the metastasis without any additional study in a patient with SP-CRC, the best approach in SP-CRC with metastatic disease would be to test the metastatic tissue for *KRAS* and *NRAS* mutations. If metastatic tissue can not be obtained, if patients present with multiple metastases and examining all metastatic sites is not viable, and for SP-CRC cases in a routine molecular pathology laboratory with no additional clinical information, both primary lesions should be tested.

Financial support:

We acknowledge Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant 2011/ 08510-2) for financial support and Fundação Antônio Prudente – AC Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil, for institutional support.

Potential competing interests: We declare no conflict of interests.

References

- 1 Lam AK-Y, Chan SS-Y, Leung M. Synchronous colorectal cancer: Clinical, pathological and molecular implications. *WJG*. 2014;20:6815.
- 2 Rose JS, Serna DS, Martin LK, Li X, Weatherby LM, Abdel-Misih S, Zhao W, Bekaii-Saab T. Influence of KRAS mutation status in metachronous and synchronous metastatic colorectal adenocarcinoma. *Cancer*. 2012;118:6243–52.
- 3 Malesci A, Basso G, Bianchi P, Fini L, Grizzi F, Celesti G, Di Caro G, Delconte G, Dattola F, Repici A, Roncalli M, Montorsi M, Laghi L. Molecular heterogeneity and prognostic implications of synchronous advanced colorectal neoplasia. *Br J Cancer*. 2014;110:1228–35.
- 4 Hu H, Chang DT, Nikiforova MN, Kuan SF, Pai RK. Clinicopathologic features of synchronous colorectal carcinoma: A distinct subset arising from multiple sessile serrated adenomas and associated with high levels of microsatellite instability and favorable prognosis. *Am J Surg Pathol*. 2013;37:1660-70
- 5 Nosho K, Kure S, Irahara N, Shima K, Baba Y, Spiegelman D, Meyerhardt JA, Giovannucci EL, Fuchs CS, Ogino S. A Prospective Cohort Study Shows Unique Epigenetic, Genetic, and Prognostic Features of Synchronous Colorectal Cancers. *Gastroenterology*. 2009;137:1609–1620.
- 6 Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens, G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;360:1408-17.
- 7 Brink M, de Goeij AF, Weijnenberg MP, Roemen GM, Lentjes MH, Pachen MM, Smits, KM, de Bruïne AP, Goldbohm RA, van den Brandt PA. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis*. 2003; 24:703-10.
- 8 Samowitz WS, Curtin K, Schaffer D, Robertson M, Leppert M, Slattery ML. Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9:1193-7.
- 9 Plesec, T. P. and J. L. Hunt. KRAS mutation testing in colorectal cancer. *Adv Anat Pathol*. 2009; 16:196-203.
- 10 Macedo MP, Andrade Lde B, Coudry R, Crespo R, Gomes M, Lisboa BC, Aguiar S Jr, Soares FA, Carraro DM, Cunha IW. Multiple mutations in the Kras gene in colorectal cancer: review of the literature with two case reports. *Int J Colorectal Dis*. 2011;26:1241-8.
- 11 de Macedo MP, de Lima LG, Begnami MD, de Melo FM, Andrade LD, Lisboa BC,
- 12 Soares LM, Soares FA, Carraro DM, da Cunha IW. KRAS insertions in colorectal cancer: what do we know about unusual KRAS mutations? *Exp Mol Pathol*. 2014;96:257-60.
- 13 Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocákova I, Ruff P, Błasińska-Morawiec M, Šmakal M, Canon JL, Rother M, Williams R, Rong A, Wietzorek J, Sidhu R, Patterson SD. Panitumumab–FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2013;369:1023–34.
- 14 Irahara N, Baba Y, Nosho K, Shima K, Yan L, Dias-Santagata D, Iafrate AJ, Fuchs CS, Haigis KM, Ogino S. NRAS Mutations Are Rare in Colorectal Cancer. *Diagnostic Molecular Pathology*. 2010;19:157–63.
- 15 Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, McAllister PK, Morton RF, Schilsky RL. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol*. 2009;27:2091-6.
- 16 van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, Carneiro F, Seruca R, Bosman FT, Quirke P, Fléjou JF, Plato Hansen T, de Hertogh G, Jares P, Langner C, Hoefler G, Ligtenberg M, Tiniakos D, Tejpar S, Bevilacqua G, Ensari A. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Archiv*. 2008;453:417–431.
- 17 Knijn N, Mekenkamp LJ, Klomp M, Vink-Börger ME, Tol J, Teerenstra S, Meijer JW, Tebar M, Riemersma S, van Krieken JH, Punt CJ, Nagtegaal ID. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer*. 2011;104:1020–1026.
- 18 Ondrejka SL, Schaeffer DF, Jakubowski MA, Owen DA, Bronner MP. Does neoadjuvant therapy alter KRAS and/or MSI results in rectal adenocarcinoma testing? *Am J Surg Pathol*. 2011 Sep;35(9):1327-30.
- 19 Boissière-Michot F, Lopez-Crapez E, Frugier H, Berthe ML, Ho-Pun-Cheung A,
- 20 Assenat E, Maudelonde T, Lamy PJ, Bibeau F. KRAS genotyping in rectal adenocarcinoma specimens with low tumor cellularity after neoadjuvant treatment. *Mod Pathol*. 2012;25:731-9.
- 21 Kawamoto Y, Tsuchihara K, Yoshino T, Ogasawara N, Kojima M, Takahashi M, Ochiai A, Bando H, Fuse N, Tahara M, Doi T, Esumi H, Komatsu Y, Ohtsu A. KRAS mutations in primary tumours and post-FOLFOX metastatic lesions in cases of colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2012 Jul 10;107:340-4.
- 22 Fadhil W, Ibrahim S, Seth R, AbuAli G, Ragunath K, Kaye P, Ilyas M. The utility of diagnostic biopsy specimens for predictive molecular testing in colorectal cancer. *Histopathology*. 2012;61:1117-24.
- 23 Krol LC, 't Hart NA, Methorst N, Knol AJ, Prinsen C, Boers JE. Concordance in KRAS and BRAF mutations in endoscopic biopsy samples and resection specimens of colorectal adenocarcinoma. *Eur J Cancer*. 2012;48:1108-15.
- 24 Yang QH, Schmidt J, Soucy G, Odze R, Dejesa-Jamanila L, Arnold K, Kuslich C, Lash R. KRAS mutational status of endoscopic biopsies matches resection specimens. *J Clin Pathol*. 2012;65:604-7.
- 25 Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL and Trotti A. *AJCC Cancer Staging Manual*. Springer: New York, 2009.
- 26 Tejpar S, Celik I, Schlichting M, Sartorius U, Bokemeyer C, Van Cutsem E. Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol*. 2012 ;30:3570-7.
- 27 Eguchi K, Yao T, Konomoto T, Hayashi K, Fujishima M, Tsuneyoshi M. Discordance of p53 mutations of synchronous colorectal carcinomas. *Mod Pathol*. 2000 Feb;13:131-9.
- 28 Balschun K, Haag J, Wenke AK, von Schönfels W, Schwarz NT, Röcken C. KRAS, NRAS, PIK3CA exon 20, and BRAF genotypes in synchronous and metachronous primary colorectal cancers diagnostic and therapeutic implications. *J Mol Diagn*. 2011;13:436-45.

- 31 Ogino S, Brahmandam M, Kawasaki T, Kirkner GJ, Loda M, Fuchs CS. Epigenetic profiling of synchronous colorectal neoplasias by quantitative DNA methylation analysis. *Mod Pathol*. 2006;19:1083-90.
- 32 Konishi K, Shen L, Jelinek J, Watanabe Y, Ahmed S, Kaneko K, Kogo M, Takano T, Imawari M, Hamilton SR, Issa JP. Concordant DNA methylation in synchronous colorectal carcinomas. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009;2:814-22.
- 33 Bae JM, Cho NY, Kim TY, Kang GH. Clinicopathologic and molecular characteristics of synchronous colorectal cancers: heterogeneity of clinical outcome depending on microsatellite instability status of individual tumors. *Dis Colon Rectum*. 2012 Feb;55:181-90.
- 34 Koness RJ, King TC, Schechter S, McLean SF, Lodowsky C, Wanebo HJ. Synchronous colon carcinomas: molecular-genetic evidence for multicentricity. *Ann Surg Oncol*1996;3:136-43.
- 35 Vakiani E, Janakiraman M, Shen R, Sinha R, Zeng Z, Shia J, Cercek A, Kemeny N, D'Angelica M, Viale A, Heguy A, Paty P, Chan TA, Saltz LB, Weiser M, Solit DB. Comparative genomic analysis of primary versus metastatic colorectal carcinomas. *J Clin Oncol*. 2012;30:2956-62.

Anexo 6 - Resumos apresentados em forma de pôster em Congressos internacionais

Macedo, M.P., Lisboa, B. C., Melo, F. M., Andrade, L. D. B., Soares, F. A., Cunha, I. W., Carraro, D. M. Pyrosequencing improved by nested PCR for *KRAS* detection in Routine Practice In: **AMP 2012 Annual Meeting on Genomic Medicine, 2012, Long beach, California-USA.** journal of Molecular Diagnostics, 2012. v.14. p.740 - 740

Pyrosequencing improved by nested PCR for Kras detection in routine Practice

Introduction: Kras mutation testing is mandatory before treatment with EGFR inhibitors in colorectal cancer (CRC) patients. Pyrosequencing is one of the best techniques available due to its high sensibility and possibility of mutated allele quantification. DNA amplification from Paraffin embedded (FFPE) tissue results in good quality DNA when all the histological pre-analytical processing has been controlled. In cases not properly processed, DNA results can be poor with low amplicon quality using conventional PCR and low peak pyrosequencing results. We designed a forward and reverse primer to be used in a nested PCR method to minimize this problem before making the pyrosequencing and tested it in a series of 421 CRC. **Methods:** DNA (30-150ng) obtained from FFPE tissue was first amplified by PCR using two primers designed by our laboratory based on the human genome bank, creating an amplicon with 250 base pairs of size. The PCR reactions contained 0.4 μ M of each primer, 0.2 mM of each dNTPs, 1.5 mM of MgSO₄ and 0.5 U Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) in a final reaction volume of 20 μ l. The nested PCR was performed with 5 μ l of amplicon from the pre-amplification PCR, 1,5 μ l of forward and reverse biotinilated primers (KRAS PyroMark™ Q96 V2.0 kit Qiagen) for the regions containing codons 12 and 13, and 25 μ l of Hot StartTaq Master Mix (Qiagen) in a total volume of 50 μ l. PCR cycling conditions were 95° for 15 min, 38 cycles of (95° for 20 seconds, 53° for 30 sec, 72° for 20 seconds) and 72° for 5 min. The pyrosequencing reaction was performed according to manufacturer's instructions. 30 μ l of biotinylated PCR product was attached to streptavidin-sepharose bead (GE Healthcare) according to a standard protocol for single strand preparation. Pyrosequencing™ was performed using PyroMark™ Gold Q96 reagent kit (Qiagen). A cut off of 10% of mtated cell was used to consider a case as mutated. **Results:** Mutation was observed in 33% of the cases. Codon 12 was mutated in 76% and codon 13 in 24%. The most common nucleotide substitution in codon 12 was GAT>GGT (61%), followed by GTT>GGT (33%). All mutations in codon 13 were GAC>GGC. No inconclusive results were achieved using this method. **Conclusions:** The data show concordance with the literature regarding the frequency of Kras mutation, its distribution between codons 12 and 13 and type of nucleotide substitution. It corroborates the reproducibility of the findings using the nested PCR.

Macedo, MP., Lisboa, BC., Begnami, MD. Melo, FM., Andrade, LDB., Silva-Junior, S., Soares, FA, Carraro, DM, Cunha, IW. Prognostic Morphologic Correlations of *KRAS* gene Mutation in a Series of Unselected Colorectal Carcinoma Patients of a single Brazilian Institution In: **AMP 2012 Annual Meeting on Genomic Medicine, 2012, Long beach, California-USA**. Journal of Molecular Diagnostics. , 2012. v.14. p.715 – 715

Prognostic Morphologic Correlations of Kras gene Mutations in a Series of Unselected Colorectal Carcinoma Patients of a Single Brazilian Institution

Introduction: Kras mutation is a negative predictor of response to treatment with Epidermal Growth Factor receptor inhibitors and present in approximately 35% of Colorectal Carcinomas (CRC). Codon 12 is involved in 75% of the cases and 13 in 25%. Great attempt has been made to understand its prognostic value. Depth of invasion (pT) and lymph node (LN) status (pN) are major prognostic evaluated parameters in CRC specimens. The presence of angiolymphatic (VLI), neural (NI) invasions and more recently LN ratio (positive LN divided by total) > 0,6, are also factors of poor outcome. In this study we show the frequency of Kras mutation in a series of CRC patients and correlate the findings with morphological findings related to prognosis. **Methods:** Kras mutation in codons 12 or 13 was tested by pyro sequencing improved by nested PCR (Q96 qiagen) in samples of patients operated for primary or metastatic CRC in a single institution. DNA sample was obtained from paraffin embedded tissue. **Results:** The population consists of 421 patients (221 males and 200 females), with mean age of 60 yrs (20-93 yrs). Mutation was observed in 33% of the cases, codon 12 involved in 76% and 13 in 24% of total cases. 358 cases were from the primary tumor and 63 were from metastasis. No difference of mutation was found comparing men and women or between age groups. Right colon cancer showed a higher frequency of mutation (45%) than left side CRC (26%) (p=0,005). There was no statistical difference between mutation according to tumor pT status, VLI, LN metastasis, or LN ratio. Cases harboring perineural invasion showed an association with Kras mutation (41% versus 28% without NI) (p= 0,043). The frequency of Kras mutation in tissue from primary tumors was similar to the metastatic ones (33.8% versus 31.75%), but the codon 13 was affected more frequently in metastatic lesions (45%) than in primary tumors (21%). **Conclusion:** The data show concordance with the literature regarding the frequency of Kras mutation in a CRC population, its distribution between codons 12 and 13 and the higher frequency of mutation in right sided tumors. It was shown that perineural invasion have an association with the presence of Kras mutation. Additionally metastatic tissue showed a higher frequency of codon 13 mutation than primary tumor. The data adds information about the possible role of Kras mutation in tumor aggressiveness and also about the association of codon 13 mutation in metastatic tumors.

Macedo MP; Ucella I, Collares B, Begnami MD; Gomes B; Melo FM; Brot LD Andrade, Aguiar—Junior S, Carraro DM, Cunha IW; Soares FA. The thousandth *KRAS* mutation detections test in colorectal cancer patients: the experience of a Brazilian institution with loss of mismatch repair proteins correlation. **XXIX Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Patología, SLAP 2013, Oaxaca, Mexico.**

THE THOUSANDTH *KRAS* MUTATION DETECTION TEST IN COLORECTAL CANCER PATIENTS: THE EXPERIENCE OF A BRAZILIAN INSTITUTION WITH LOSS OF MISMATCH REPAIR PROTEINS CORRELATION.

Introduction/Background: *KRAS* mutation is a negative predictor of response EGFR inhibitors. Loss of mismatch repair proteins (L-MMR-P) is found in HNPCC patients and in 15% of sporadic CRC mostly due to MLH-1 methylation. Here we show the frequency of *KRAS* mutation and L-MMR-P in an unselected CRC patients series. **Materials and Methods:** patients from our institution or referred to us in 19 months (2011-2013) of follow up were tested for *KRAS* mutation in codons 12 or 13 by pyrosequencing (Q24 qiagen). DNA was from paraffin embedded tissue. Immunohistochemistry (IHC) was performed for MMR-P using antibodies MSH-2 (G219-1129-Cell Marque), MSH-6 (44-Ventana), MLH-1 (G168-728-Cell Marque) and PMS-2 (A16-4-BD). **Results:** *KRAS* mutation was tested in 1039 CRC patients. Mutation was detected in 40,62% of the cases, distributed 75% in Codon 12 and 25% in codon 13. GGT>GAT (p.Gly12Asp) was found in 92% of codon 12, and GAC>GGC (p.Gly13Asp) in 90% of codon 13 mutations. 10% of the 304 tested patients showed L-MMR-P, distributed: MLH-1 + PMS2 (60%), MSH-2 + MSH-6 (16%), solely MSH6 (12%), PMS-2 (9%) and MLH-1 (3%). 75% of loss cases were from the right colon. Eleven patients with L-MMR-P (34%) had concomitant *KRAS* mutation, 45% in codon 13 and 55% in codon 12. **Conclusion:** In this population 34% of patients with L-MMR-P showed concomitant *KRAS* mutation. We also show a trend toward higher frequency of mutation in codon 13 in these patients. The data show concordance with the literature regarding *KRAS* mutation frequency in CRC, codons distribution and nucleotide substitution.

MACEDO, M.P., MELO, F. M., LISBOA, B. C., ANDRADE, L. D. B., CAMPOS, A. H. F., CARRARO, D. M., SOARES, F. A., CUNHA, I. W. Comparative Analysis of Different Types of *KRAS* mutation Between Frozen and Paraffin Embedded Tissue Using the Pyrosequencing Method In: **USCAP Annual Meeting, 2013**, Baltimore, Maryland. The 102nd USCAP annual meeting abstracts. , 2013. v.26. p.497A - 497a

COMPARATIVE ANALYSIS OF DIFFERENT TYPES OF *KRAS* MUTATION BETWEEN FROZEN AND PARAFFIN EMBEDDED TISSUE USING THE PYROSEQUENCING METHOD

Background: *KRAS* mutation is a negative predictor of response to treatment with Epidermal Growth Factor receptor inhibitors and is detected in $\approx 35\%$ of Colorectal Carcinomas (CRC). *KRAS* mutation analysis is performed in routine practice in formalin fixed and paraffin embedded tissue (FFPET). Formalin fixation has been described to induce artifact mutations in selected genes, mostly due to error in DNA pairing during sequencing procedures. Some studies have compared *KRAS* status between FFPE and frozen tissue, but mostly regarding *KRAS* status (wild versus mutated). The objective of this study is to examine whether the detection of the most frequently described types of *KRAS* mutations found in CRC are reproducible between FFPET and frozen tissue using the pyrosequencing method. **Design:** Twelve previously sequenced FFPET from CRC cases mutated for *KRAS* gene were selected based on the type of mutation detected and the availability of paired frozen tissue in Hospital A.C. Camargo Biobank. DNA from FFPET was extracted using the QIAmp DNA Extraction Kit; DNA from frozen tissue was extracted using an in house technique. PCR was performed with 100 ng of DNA, targeting the regions containing codons 12 and 13 using the *KRAS* PyroMarkTM Q24 kit (Qiagen). Pyrosequencing reaction was performed using the manufacturer's instructions (*KRAS* PyroMarkTM Q24 V2.0 (Qiagen). **Results:** The twelve study cases consisted of seven tumors mutated in codon 12 and 5 in codon 13. Mutations in codon 12 were GGT>GAT (3 cases), GGT>GTT (3 cases), GGT>AGT (1 case). All mutations in codon 13 were GGC>GAC. The pyrosequencing using the DNA from the paired frozen tissue showed 100% of compatibility regarding the mutations detected in the FFPET. **Conclusion:** *KRAS* mutation detection by pyrosequencing DNA from FFPET is highly reproducible with DNA from frozen tissue. This study shows no negative impact of formalin fixation in the detection of the most common types of *KRAS* mutation in CRC by pyrosequencing method.

USCAP Annual Meeting, 2015- Boston – USA

RAS mutations vary between lesions in synchronous primary colorectal cancer: Is testing only one lesion sufficient to guide anti-EGFR treatment decisions?

Mariana Petaccia de Macedo, Fernanda Machado de Melo¹Júlia da Silva Ribeiro, Celso Abdon Lopes de Mello, Maria Dirlei Begnami, Fernando Augusto Soares, Dirce Maria Carraro, and Isabela Werneck da Cunha

Background: Mutations in *KRAS* and *NRAS* are negative predictors of the response to anti-EGFR therapies in the treatment of metastatic colorectal cancer. There are few reports on *RAS* testing in synchronous primary colorectal cancer (SP-CRC) and a lack of recommendations on which tissue should be tested for the mutation in this disease. In this study, we analyzed the *RAS* status of both lesions in SP-CRC patients and in their metastases. **Design:** DNA was obtained from formalin-fixed paraffin-embedded tissue, and mutations were analyzed by pyrosequencing. **Results:** *RAS* status was heterogeneous in 6 (75%) of 8 SP-CRC patients between primary lesions. Five showed heterogeneity regarding both *RAS* mutational status and type [1 lesion with wild-type (WT) *RAS* status and 1 mutated], and from these, four presented with metastasis: 3 cases (75%) had WT metastatic tissue, and 1 case (25%) had mutated metastatic tissue. One patient showed divergence regarding *RAS* mutation type. **Conclusion:** *KRAS* and *NRAS* mutations vary significantly between SP-CRC lesions, and the status of the metastasis is unpredictable. Testing for *RAS* mutations in only 1 of the primary lesions in SP-CRC can misguide the clinical decision and hinder the interpretation of the prediction potential with regard to anti-EGFR treatment. Based on that, in a routine molecular pathology laboratory, a more appropriate approach in metastatic SP-CRC is to test the metastatic tissue or both primary lesions for providing more accurate mutation scenery and consequently supporting more assertive clinical decisions.

Anexo 7 - Tabela geral dos resultados da pesquisa de mutação dos códons 12, 13 e 61 do gene *KRAS* entre áreas do tumor primário e da metástase dos casos avaliados neste estudo

CASO	SEXO (1=MASC, 2=FEM)	IDADE AO DIAGNOSTICO	PROCEDÊNCIA (1= int, 2= ext)	LOCALIZAÇÃO DA NEOPLASIA	pT PRIMÁRIO (=pT)	LN	SÍTIOS METÁSTASE (1=fig, 2=pulmao, 3=fig+pulmao)	Primário (B) - status da área B	Códon Alterado área B	Tipo Mutação da área B	% Alelo mutado da "B"	% Tumoral Histologia da área B	Primário (C) - status da área C	Códon Alterado área C	Tipo Mutação da área C	% Alelo mutado da "C"	% Tumoral Histologia da área C	Primário (D) - status da área D	Códon Alterado área D	Tipo Mutação da área D	% Alelo mutado da "D"	% Tumoral Histologia da área D	LN (G) - STATUS DA METÁSTASE LINFONODAL	Codon	Tipo Mutação	% Alelo mutado	Figado (H) - STATUS DA METÁSTASE HEPÁTICA	Codon	Tipo Mutação	% Alelo mutado	Pulmão (I) - STATUS DA METÁSTASE PULMONAR	Codon	Tipo Mutação	% Alelo mutado
1	1	59	1	reto	3	Neg	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
2	1	63	1	esquerdo	2	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
3	2	69	1	direita	3	Pos	1	MUT	13	GAC	23	61,93	MUT	13	GAC	7	44,3	NA	NA	NA	NA	NA	MUT	13	GAC	8	MUT	13	GAC	26	Neg	NA	NA	NA
4	1	43	1	reto	3	Neg	3	NA	NA	NA	NA	NA	MUT	13	GAC	32	NA	MUT	13	GAC	35	NA	Neg	NA	NA	NA	MUT	13	GAC	37	NA	NA	NA	NA
7	1	68	1	reto	4	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
8	2	48	1	direito	3	Pos	1	MUT	13	GAC	52	66	MUT	13	GAC	60	58,9	MUT	13	GAC	63	NA	MUT	13	GAC	4	MUT	13	GAC	18	Neg	NA	NA	NA
9	2	48	1	reto	4	Neg	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	A(5%)	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
10	1	69	1	esquerdo	4	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
11	2	71	1	esquerdo	3	Pos	1	MUT	12	GAT	41	NA	MUT	12	GAT	44	NA	MUT	12	GAT	45	NA	MUT	12	GAT	45	MUT	12	GAT	39	Neg	NA	NA	NA
12	1	40	1	esquerdo	3	Pos	1	MUT	12	GTT	58	48,65	MUT	12	GTT	29	36,6	MUT	12	GTT	38	38,19	MUT	12	GTT	16	MUT	12	GTT	8	Neg	NA	NA	NA
13	1	61	1	reto	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA

14	1	29	1	reto	3	Neg	1	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
15	2	73	1	reto	4	Neg	1	MUT	12	TGT	92	NA	MUT	12	TGT	78	NA	MUT	12	TGT	83	NA	Neg	NA	NA	NA	MUT	12	TGT	89	Neg	NA	NA	NA
17	2	33	1	esquerdo (TRS)	3	Neg	1	MUT	13	GAC	21	54,93	MUT	13	GAC	51	80	MUT	13	GAC	17	54,1	Neg	NA	NA	NA	MUT	13	GAC	15	Neg	NA	NA	NA
18	1	52	1	esquerdo	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
20	1	69	1	reto	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
21	2	54	1	reto	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
23	2	68	1	direita	3	Pos	3	MUT	12	GCT	32	NA	MUT	12	GCT	48	NA	MUT	12	GCT	44	NA	MUT	12	GCT	13	MUT	12	GCT	26	MUT	12	GCT	22
24	1	66	1	esquerdo	1	Neg	1	MUT	12	GAT	27	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	MUT	12	GAT	21	Neg	NA	NA	NA
28	2	56	1	esquerdo	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
29	2	65	1	esquerdo	3	Pos	3	MUT	12	AGT	62	NA	MUT	12	AGT	65	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	MUT	12	AGT	66	MUT	12	AGT	56
35	2	64	1	reto	3	Pos	1	MUT	12	AGT	38	NA	MUT	12	AGT	38	30	NA	NA	NA	NA	NA	MUT	12	AGT	37	MUT	12	AGT	58	Neg	NA	NA	NA
38	2	61	1	reto	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
46	2	34	1	esquerdo	4	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	MUT	12	GCT	11	Neg	NA	NA	NA	
48	2	42	1	esquerdo (TV)	3	Pos	1	MUT	12	GAT	27	NA	MUT	12	GAT	17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	MUT	12	GAT	13	Neg	NA	NA	NA	
49	1	61	1	reto	3	Pos	1	MUT	12	GTT	64	NA	MUT	12	GTT	28	NA	NA	NA	NA	NA	MUT	12	GTT	54	MUT	12	GTT	25	Neg	NA	NA	NA	
51	2	49	1	esquerdo	3	os (SLC)	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELVA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	
54	1	60	1	reto	3	Neg	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELVA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA

56	1	51	1	reto	3	Pos	3	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA		
57	1	56	1	esquerdo	4	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	NA	NA			
58	1	56	1	reto	2	Pos	1	MUT	12	GAT	16	NA	MUT	12	GAT	21	NA	MUT	12	GAT	22	NA	NA	NA	MUT	12	GAT	29	Neg	NA	NA	NA		
60	1	66	1	esquerdo	3	Neg	1	MUT	12	GAT	24	NA	MUT	12	GAT	36	40,7	MUT	12	GAT	22	NA	Neg	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	
61	1	59	1	esquerdo	3	Neg	1	MUT	13	GAC	38	54,89	MUT	13	GAC	40	57,1	MUT	13	GAC	26	46,06	Neg	NA	NA	NA	MUT	13	GAC	28	Neg	NA	NA	NA
62	1	51	1	reto	3	Pos	1	MUT	12	GTT	28	36,2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	MUT	12	GTT	12	MUT	12	GTT	37	Neg	NA	NA	NA	
64	2	44	1	esquerdo	3	Neg	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	61,7	SELVA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
65	1	53	1	esquerdo	2	Neg	1	SELV	13	GAC	8	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELVA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
66	2	56	1	esquerdo	3	Neg	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELVA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
70	1	70	1	esquerdo	3	Neg	3	MUT	12	GAT	33	NA	MUT	12	GAT	36	NA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	MUT	12	GAT	39	MUT	12	GAT	32	
71	1	63	1	esquerdo	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
72	1	44	1	reto	2	Neg	1	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	
75	2	56	1	reto	3	Neg	1	MUT	13	GAC	29	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	MUT	13	GAC	35	Neg	NA	NA	NA	
76	2	59	2	direito	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELVA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	
78	1	67	2	direito	4	Neg	1	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
79	1	79	1	reto	3	Pos	1	MUT	13	GAC	30	NA	MUT	13	GAC	45	NA	MUT	13	GAC	47	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
80	2	57	1	direita	3	Pos	1	MUT	13	GAC	30	46,83	MUT	13	GAC	45	61,9	MUT	13	GAC	47	82	NA	NA	NA	NA	MUT	13	GAC	42	Neg	NA	NA	NA

81	2	54	1	reto	3	Neg	3	MUT	12	GAT	75	60,66	MUT	12	GAT	19	41	MUT	12	GAT	50	NA	Neg	NA	NA	NA	MUT	12	GAT	50	MUT	12	GAT	39
82	1	60	1	esquerdo	3	Neg	2	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELVA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA
83	2	67	1	direita	4	Neg	2	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELVA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA
84	1	76	2	esquerdo	3	Neg	2	MUT	12	GAT	41	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	MUT	12	GAT	46
85	1	80	2	esquerdo	3	Pos	2	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	
86	1	64	1	reto	3	Pos	2	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NÃO T	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	
89	1	62	2	esquerdo (TV)	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	
93	2	45	2	esquerdo	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELVA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	
94	1	52	1	reto	2	Neg	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
95	2	43	1	esquerdo	3	Pos	2	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	
97	1	43	2	esquerdo	2	NA	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	
98	2	76	1	esquerdo	4	Neg	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELVA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
99	2	56	1	esquerdo	3	Neg	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELVA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
100	1	62	2	direito	3	Neg	1	MUT	12	GTT	45	NA	MUT	12	GTT	31	NA	MUT	12	GTT	20	NA	Neg	NA	NA	NA	MUT	12	GTT	28	Neg	NA	NA	NA
101	2	40	1	reto	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
102	1	30	1	esquerdo	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
103	1	59	1	reto	3	Neg	1	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA

104	1	49	2	esquerdo	3	Neg	3	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA		
106	1	68	1	reto	3	Pos	1	MUT	61	(C.183	29	NA	MUT	61	(C.183	36	NA	MUT	61	GTG (C	77	NA	MUT	61	GTG (C	61	MUT	61	GTG (C	76	Neg	NA	NA	NA
107	2	53	1	esquerdo	3	Pos	1	MUT	13	GAC	42	NA	MUT	13	GAC	43	NA	MUT	13	GAC	38	NA	MUT	13	GAC	4	MUT	13	GAC	39	Neg	NA	NA	NA
108	1	39	1	esquerdo	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
109	1	50	2	esquerdo (TV)	3	Pos (SLC	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	
110	1	58	1	reto	3	Neg	2	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA
111	1	59	1	esquerdo	3	Neg	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
113	1	76	1	esquerdo	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
114	1	53	1	esquerdo (TRS)	3	Neg	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
115	1	66	2	esquerdo (AE)	3	Pos	1	MUT	12	GTT	43	NA	MUT	12	GTT	35	NA	MUT	12	GTT	46	NA	MUT	12	GTT	15	MUT	12	GTT	22	Neg	NA	NA	NA
116	2	39	2	esquerdo (TV)	4	Pos	1	MUT	12	GAT	28	NA	MUT	12	GAT	33	NA	MUT	12	GAT	41	NA	MUT	12	GAT	28	MUT	12	GAT	46	Neg	NA	NA	NA
119	1	72	2	esquerdo	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
122	1	42	1	esquerdo	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
123	1	48	1	esquerdo	3	Pos	3	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA
124	1	74	2	direito	3	Pos	1	MUT	12	GAT	58	NA	MUT	12	GAT	43	NA	MUT	12	GAT	67	NA	MUT	12	GAT	29	MUT	12	GAT	15	Neg	NA	NA	NA
126	2	46	2	esquerdo	3	Pos	1	MUT	12	GTT	42	NA	MUT	12	GTT	28	NA	MUT	12	GTT	33	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
128	1	51	2	esquerdo	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA

129	1	45	1	esquerdo	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	
130	1	60	1	direita	3	Pos	1	MUT	12	GTT	24	NA	MUT	12	GAT	48	NA	MUT	12	GAT	57	NA	MUT	12	GTT	22	MUT	12	GTT	32	Neg	NA	NA	NA
131	1	63	1	esquerdo	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	A(5%)	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	
133	2	75	1	esquerdo	3	Pos	1	MUT	12	GAT	39	NA	MUT	12	GAT	45	NA	MUT	12	GAT	28	NA	NA	NA	NA	MUT	12	GAT	40	Neg	NA	NA	NA	
134	1	35	2	reto	2	Neg	1	MUT	12	GTT	23	NA	MUT	12	GTT	32	NA	MUT	12	GTT	21	NA	Neg	NA	NA	NA	MUT	12	GTT	18	Neg	NA	NA	NA
135	1	56	2	esquerdo (AE)	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	
136	1	74	2	esquerdo	4	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	
137	2	61	1	esquerdo	4	Pos	1	MUT	12	TGT	44	NA	MUT	12	TGT	36	NA	MUT	12	TGT	42	NA	MUT	12	TGT	26	MUT	12	TGT	15	Neg	NA	NA	NA
138	1	63	2	reto	4	Neg	1	MUT	12	GTT	20	NA	MUT	12	GTT	35	NA	MUT	12	GTT	36	NA	NA	NA	NA	MUT	12	GTT	9	Neg	NA	NA	NA	
140	2	56	2	esquerdo (SM)	4	Neg	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELVA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
144	2	76	1	direito	4	Pos	1	MUT	12	GTT	75	NA	MUT	12	GTT	56	NA	MUT	12	GTT	60	NA	MUT	12	GTT	43	MUT	12	GTT	71	Neg	NA	NA	NA
146	2	57	2	esquerdo (SM)	3	Pos	1	MUT	12	GTT	24	NA	MUT	12	GTT	21	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	
147	1	38	1	esquerdo	3	Pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	
158	2	26	1	reto	3	Pos	2	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA		
172	2	70	1	direito	3	pos	1	NA	NA	NA	NA	NA	MUT	12	GAT	39	NA	MUT	12	GAT	38	NA	MUT	12	GAT	19	MUT	12	GAT	43	Neg	NA	NA	NA
174	1	66	2	reto	3	pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA
175	2	64	1	reto	3	neg	1	MUT	12	GAT	42	NA	MUT	12	GAT	53	NA	MUT	12	GAT	43	NA	NA	NA	NA	MUT	12	GAT	40	Neg	NA	NA	NA	

176	2	60	1	direita	3	pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA			
177	1	67	1	esquerdo (SM)	3	neg	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA				
178	2	32	2	esquerdo (SM)	3	pos	1	MUT	13	GGT	-	NA	MUT	13	GGT	-	NA	MUT	13	GGT	-	NA	MUT	13	GGT	-	Neg	NA	NA	NA				
179	2	72	1	direita	3	pos	1	SELV	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	SELV	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA			
182	1	58	1	reto	3	neg	1	MUT	12	GAT	49	NA	MUT	12	GAT	31	NA	MUT	12	GAT	55	NA	NA	NA	NA	MUT	12	GAT	46	Neg	NA	NA	NA	
185	1	77	1	reto	3	pos	1	MUT	12	GAT	37	NA	MUT	12	GAT	63	NA	MUT	12	GAT	62	NA	MUT	12	GAT	65	MUT	12	GAT	53	Neg	NA	NA	NA

Abreviaturas: SLO= Segundo laudo original; NA= não se aplica; TRS= transição retosigmóide; TV= transversos; AE=ângulo esplênico; SM= sigmóide; MASC= masculino; FEM=feminino; INT= interno; EXT=esterno, SEL=selvagem; MUT=mutado.

Anexo 8 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 23 de Agosto de 2011.

À
Dra. Isabela Werneck da Cunha

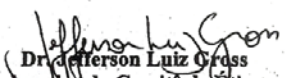
Ref.: Projeto de Pesquisa n°. 1543/11
"Análise da heterogeneidade do status mutacional do gene k-ras em carcinomas coloretais primários e metastáticos".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 16/08/2011, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 12/04/2011, aprovaram a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre a publicação dos dados de pesquisa utilizando amostras fornecidas e processadas pelo Biobanco do Hospital A.C. Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco do Hospital A.C. Camargo;
- Orçamento Financeiro detalhado;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Grass
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1