

**ANÁLISE DA HETEROGENEIDADE DO *STATUS*
MUTACIONAL NO CÓDON 600 DO GENE *BRAF* EM
CARCINOMAS COLORRETAIS PRIMÁRIOS E
METASTÁTICOS**

FERNANDA MACHADO DE MELO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Isabela Werneck da Cunha

Co-Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Melo, Fernanda Machado

Análise da heterogeneidade do *status* mutacional no códon 600 do gene *BRAF* em carcinomas colorretais primários e metastáticos /
Fernanda Machado de Melo - São Paulo, 2016.

69p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Isabela Werneck da Cunha

Descritores: 1. NEOPLASIAS COLORRETAIS. 2. GENE *BRAF*.
3. HETEROGENEIDADE GENÉTICA. 4. MUTAÇÕES GENÉTICAS.

*“A mente que se abre a uma nova ideia,
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, com minha eterna gratidão;
Ao meu esposo, com o meu sincero e imenso amor;
Ao meu amado filho, a melhor parte de mim,
por quem eu quero ser melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Ivan e Dulce, por toda base que me proporcionaram, por dedicarem a mim as suas vidas, por sempre apoiarem e acreditarem nas minhas escolhas, e por me ajudarem de todas as formas para que elas se concretizassem.

Ao meu esposo Rodrigo, que nunca me deixa parar de sonhar. Sem o seu apoio incondicional, amor e dedicação à nossa família, nada disso seria possível. Obrigada pela paciência e por todo bem que me faz.

Ao meu filho Leonardo, dono do meu mais puro e sublime amor, que trouxe à minha vida um novo sentido, cheio de forças e motivos para continuar.

Ao meu irmão Marcelo e toda minha família, de sangue ou não. Sem vocês a vida não teria tanta graça.

A todas as amigas que responderam aos meus “Não vou poder ir, preciso estudar” com palavras de força e incentivo.

À minha orientadora, Dra. Isabela Werneck da Cunha, pela oportunidade, pela paciência e por sempre me mostrar que as coisas são mais simples do que parecem.

À minha co-orientadora, Dirce Maria Carraro, por todos os ensinamentos de biologia molecular e pela oportunidade que me concedeu.

À Dra. Mariana Petaccia de Macêdo, por todo seu entusiasmo e envolvimento.

Às meninas do laboratório de Patologia Molecular e Genômica Diagnóstica, Júlia Ribeiro, Maristela Pimenta e Raquel Stabellini, por dividirem comigo longos dias de trabalho, em especial à Maristela, por todo incentivo e por partilhar comigo seus conhecimentos.

Aos colegas da Anatomia Patológica, especialmente à Liliane Cilento, por acompanhar essa trajetória e estar sempre disposta a me escutar. Ao Fábio Lourenço, pela ajuda com os materiais do arquivo. Ao Severino, da Patologia Investigativa, pela disposição de confeccionar os cortes histológicos, sempre urgentes.

Aos amigos e colegas do CIPE e da pós-graduação, principalmente à Ana Claudia Urvanegia, com quem dividi longas noites de experimentos.

A todos os professores das disciplinas da pós-graduação e aos colegas que foram ouvintes ao meu lado.

A toda equipe da pós-graduação, pela disponibilidade e paciência.

À Suely da biblioteca, pelo auxílio na formatação desse trabalho.

À banca examinadora dessa dissertação, pela disponibilidade e pela avaliação do meu trabalho.

Ao A.C.Camargo Cancer Center, pelas portas sempre abertas.

RESUMO

Melo FM. **Análise da heterogeneidade do *status* mutacional no códon 600 do gene *BRAF* em carcinomas colorretais primários e metastáticos.** São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: A via de sinalização do Receptor do Fator Epidermal do Crescimento (EGFR) desempenha um importante papel na carcinogênese do câncer colorretal (CCR). Terapias dirigidas à inibição desta via têm sido utilizadas com sucesso no tratamento de alguns pacientes com CCR metastático. Tumores que apresentam mutação no códon 600 do gene *BRAF* frequentemente não apresentam resposta a essa inibição, pois essa mutação leva a uma ativação da proteína BRAF, levando a via MAPK/ERK a ficar ativada constantemente. Assim, a análise de mutação do gene *BRAF* se faz necessária, porém, não há indicação sobre a amostra mais adequada a ser testadas: tumor primário ou metástases. **Objetivo:** Avaliar o *status* e frequência de mutação no códon 600 do gene *BRAF* em CCR primários e suas metástases, bem como avaliar a existência de heterogeneidade mutacional entre eles. **Material e Métodos:** Um total de 58 casos de CCR primários e metastáticos, selvagens para os códons 12, 13 e 61 do gene *KRAS*, tiveram seus tumores testados, por pirosequenciamento, para mutações no códon 600 do gene *BRAF*. **Resultados:** 2 dos 58 casos testados (3,45%) apresentaram mutação c.1799A>T; p.(V600E) do gene *BRAF*, ambos casos detectados tanto no tumor primário, quanto em suas metástases. Os dois casos mutados foram tumores de pacientes do sexo feminino, diagnosticados na sexta década de vida e com metástases linfonodais e hepáticas, uma com tumor primário no cólon direito e a outra no reto. **Conclusão:** A mutação do gene *BRAF* foi encontrada em apenas 2 casos (3,4%) dentre 58 carcinomas colorretais sabidamente selvagens para os códons 12, 13 e 61 do gene *KRAS*, avaliados neste estudo. O *status* mutacional do códon 600 do gene *BRAF* se mostrou concordante em tumor primário e suas respectivas metástases nos casos estudados.

SUMMARY

Melo FM. [Analysis of *BRAF* codon 600 mutation heterogeneity in primary and metastatic colorectal cancer]. São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: The Epidermal Growth Factor Pathway (EGFR) plays an important role in colorectal cancer carcinogenesis. Therapies that target its inhibition have been successfully used for some patients with metastatic colorectal cancer. Tumors with *BRAF* codon 600 mutation often show not response to this inhibition, as this mutation leads to an activation of BRAF protein, leading the MAPK/ERK pathway to be active constantly. Thus, the analysis of this mutation in *BRAF* gene is required, however, there is none recommendation about the most appropriate sample to be tested: primary tumor or metastasis. **Objective:** To evaluate the mutation *status* and frequency of *BRAF* gene codon 600 in primary CCR and their matched metastases and to assess the presence of disagreement between the results. **Methods:** A total of 58 primary and metastatic CCR tumors, wild-type to codons 12, 13 and 61 of *KRAS* gene, have been tested by pyrosequencing, to evaluate mutations in codon 600 of *BRAF* gene. **Results:** Two of the 58 tested patients (3,45%), showed the c.1799T>A; p.(V600E) mutation in *BRAF* gene, both detected in the primary tumors and in its matched metastasis. The two cases were mutated tumor removed from female patients diagnosed in the sixth decade of life and with committed lymph node and liver metastases. One of the patients had a primary tumor in the right colon and the other in the rectum. **Conclusion:** The mutation V600E in *BRAF* gene was found in only 2 cases (3,4%) among 58 colorectal carcinomas with wild-type *KRAS* gene (codons 12, 13 and 61) evaluated in this study. The mutational *status* in codon 600 of *BRAF* gene showed to be concordant in the primary tumor and its matched metastases for the two cases studied.

LISTA DE FIGURAS E QUADRO

Figura 1	Representação esquemática da sequência adenoma-carcinoma.....	8
Figura 2	Representação esquemática da via MAPK/ERK.....	11
Figura 3	Demonstração da ação do anti-EGFR em casos de ausência ou de presença de mutação nos genes <i>KRAS</i> ou <i>BRAF</i>	18
Figura 4	Representação esquemática da metodologia de microdissecção manual (<i>scrape</i>).....	26
Figura 5	Representação esquemática da metodologia de microdissecção a laser (<i>LCM – Laser Capture Microdissection</i>).....	27
Figura 6	Imagens do resultado da técnica de microdissecção a laser.....	28
Figura 7	Ilustração da reação química da técnica de pirosequenciamento.....	32
Figura 8	Demonstração do resultado de amplificação em gel de agarose..	35
Figura 9	Demonstração da diferença entre o resultado esperado e o resultado obtido no pirosequenciamento.....	36
Figura 10	Gel de agarose demonstrando a condição de PCR que apresentou melhor amplificação.....	37
Figura 11	Gel de agarose demonstrando quatro combinações entre diferentes temperaturas e número de ciclos e o resultado das amplificações.....	39

Figura 12	Pirogramas demonstrando resultados distintos, de uma mesma amostra, para as diferentes combinações de condições de PCR testadas.....	41
Figura 13	Representação da distribuição da casuística em relação aos sítios de metástases.....	45
Figura 14	Pirogramas das amostras tumorais do caso nomeado como 21....	46
Figura 15	Pirogramas das amostras tumorais do caso nomeado como 76 ...	47
Figura 16	Lâminas histológicas com coloração H&E, demonstrando adenocarcinomas moderadamente diferenciados.....	48
Quadro 1	Características gerais dos pacientes mutados e de seus tumores	48

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
APS	Adenosina 5' fosfosulfato
ARAF	<i>A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
BMPR1A	<i>Bone morphogenetic protein receptor type 1A</i>
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
CCR	Câncer colorretal
CpG	<i>Citosina- phosphato - Guanina</i>
CRAF	<i>C-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
DCC	<i>Deleted in Colorectal Cancer</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxi-ribonucleotídeo trifosfatado
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (Receptor do Fator Epidermal do Crescimento)
ERK	<i>Extracellular Regulated MAP-kinase</i>
FAP	<i>Familial Adenomatous Polyposis</i> (Polipose Adenomatosa Familiar)
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
GAPs	<i>GTPase-activating protein</i>
GDP	Guanosina difosfato
GEFs	<i>Guanine Nucleotide Exchange Factors</i>
GTP	Guanosina trifosfato
H&E	Hematoxilina-Eosina

HNPCC	<i>Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer</i> (Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose)
HRAS	<i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LCM	<i>Laser Capture Microdissection</i>
MEK	<i>MAP kinase / ERK kinase</i>
MLH1	<i>MutL homolog1</i>
MMR	<i>Mismatch Repair</i>
MSH2	<i>MutS homolog 2</i>
MSH6	<i>MutS homolog 6</i>
MSI-H	Alta Instabilidade de Microssatélites
MUTYH	<i>MutY DNA glycosylase</i>
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF1	<i>Neurofibromin 1</i>
ng	nanograma
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
NRAS	<i>Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
NTC	<i>No Template Control</i>
p53	<i>Tumor protein p53</i>
pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
pmoles	picomoles
PMS1	<i>Post-meiotic segregation increased 1</i>
PMS2	<i>Post-meiotic segregation increased 2</i>
PPi	Pirofosfato
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RAF	<i>Root Abundant Factor</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>

RNAse	Ribonoclease
SL	Síndrome de Lynch
<i>SMAD4</i>	<i>SMAD family member 4</i>
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
<i>STK11</i>	<i>Serine/threonine kinase 11</i>
TGF-alpha	<i>Transforming Growth Factor-alpha</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	<i>Wild Type</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia do câncer colorretal.....	1
1.2	Câncer colorretal hereditário e esporádico	2
1.3	Vias de carcinogênese do câncer colorretal esporádico	6
1.4	A via da MAPK/ERK e o Receptor do Fator Epidermal do Crescimento (EGFR)	10
1.5	Genes da família <i>RAS</i>	12
1.6	Gene <i>BRAF</i>	14
1.7	Tratamento com drogas anti-EGFR	16
1.8	Heterogeneidade tumoral.....	19
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo Geral.....	22
2.2	Objetivos Específicos	22
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1	Material	23
3.1.1	Delineamento do Estudo	23
3.1.2	Casuística.....	23
3.1.3	Critérios de Exclusão.....	24
3.2	Métodos.....	24
3.2.1	Levantamento das Amostras e Seleção da Área Neoplásica.....	24
3.2.2	Extração de DNA.....	25
3.2.3	Reação de Pirosequenciamento.....	29
3.2.4	Padronização de <i>Primers</i>	32
3.2.5	Interpretação dos Dados	42
3.2.6	Considerações Éticas.....	43

4	RESULTADOS	44
4.1	Caracterização da amostra.....	44
4.2	Resultados obtidos pelo pirosequenciamento	45
4.3	Características dos casos mutados	48
5	DISCUSSÃO	49
6	CONCLUSÕES	58
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ANEXOS

Anexo 1 Protocolo de desparafinação e coloração para LCM

Anexo 2 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-
CEP

Anexo 3 Parecer relatório de acompanhamento CEP/Plataforma
Brasil

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal (CCR) foi considerado em 2012, pelo projeto GLOBOCAN do *International Agency for Research on Cancer* (IARC), o terceiro tipo de câncer mais frequente mundialmente (excluindo o câncer de pele não-melanoma) estando à sua frente somente o câncer de pulmão, em primeiro lugar, e o câncer de mama, em segundo. No sexo feminino foi estimado como segundo tipo mais comum, depois do câncer de mama, e no sexo masculino como terceiro, depois dos cânceres de pulmão e próstata, respectivamente (FERLAY et al. 2014). Dados desse estudo foram analisados por TORRE et al. (2015), onde observou-se que as taxas de incidência dessa neoplasia são mais evidentes em países bem desenvolvidos quando comparados a países com menor desenvolvimento. De acordo com a *World Health Organization-WHO*, o CCR é a quarta causa mais comum de morte por câncer no mundo (BOSMAN 2014).

No Brasil, o câncer colorretal está entre as quatro localidades topográficas mais frequentes de neoplasia, em ambos os sexos, sendo superado somente pelos cânceres de pele não-melanoma, de próstata e de mama feminina. Em uma análise individual de gêneros, as taxas nacionais seguem a mesma colocação mundial de terceiro lugar para homens, depois do câncer de próstata e pulmão, e segundo lugar para mulheres, depois do

câncer de mama. Essa elevada incidência da doença, faz com que ela seja considerada um problema de saúde pública. (GUIMARÃES et al. 2012; Ministério da Saúde 2013; Ministério da Saúde 2016).

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), no Brasil, foram estimados para 2016, aproximadamente, 34.280 novos casos de CCR, sendo 16.660 em homens e 17.620 em mulheres. (Ministério da Saúde 2016).

A sobrevida dos portadores de CCR está diretamente ligada ao estágio da doença no momento do diagnóstico. Quando detectado precocemente, ainda em estadio inicial, a sobrevivência em 5 anos é de aproximadamente 90%, porém, somente 39% dos CCR são diagnosticados nesta fase. Vinte e cinco por cento dos casos já apresentam a forma metastática da doença no momento do diagnóstico, caindo para 10% a taxa de sobrevida em 5 anos nesses pacientes. Em resumo, quanto mais precoce for detectada a doença, maiores são as chances de sobrevivência. (GOLDBERG et al. 2007; HAGGAR e BOUSHEY 2009).

1.2 CÂNCER COLORRETAL HEREDITÁRIO E ESPORÁDICO

O câncer colorretal pode ocorrer em três padrões distintos: hereditário, familiar ou esporádico (CALVERT e FRUCHT 2002).

Estima-se que 30% de todos os casos de CCR sejam causados por alterações genéticas de linhagem germinativa. Aproximadamente 5% desses casos representam o padrão hereditário, ou seja, são síndromes associadas

a mutações hereditárias de alta penetrância e apresentações clínicas que já estão bem caracterizadas. O restante dos CCR com herança germinativa pertence ao padrão familiar. Nas famílias afetadas esses tumores se desenvolvem em uma frequência relativamente alta para serem considerados esporádicos, mas não em um padrão consistente como de uma síndrome hereditária. O diagnóstico é feito com base na história da família estudada (CALVERT e FRUCHT 2002; JASPERSON et al. 2010).

Dentre os 5% dos casos que representam as síndromes hereditárias de predisposição relacionadas ao CCR, destacam-se como principais o Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose *Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer* (HNPCC) e a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP - *Familial Adenomatous Polyposis*) (RUSTGI 2007; HAGGAR e BOUSHEY 2009).

Cerca de 3 a 5% de todos os casos de cânceres colorretais correspondem à HNPCC, também conhecida como Síndrome de Lynch (SL). Portadores desta síndrome apresentam predisposição ao desenvolvimento precoce de câncer de cólon e reto, bem como de outros tumores pélvicos como de endométrio, ovário, intestino delgado, estômago e trato urinário (DOMINGUEZ et al. 2008). A SL é caracterizada por um alto nível de Instabilidade de Microsatélites (MSI-H) e por mutações germinativas deletérias em um dos cinco genes de reparo (MMR – Mismatch Repair), sendo a maioria nos genes *MLH1* (*MutL homolog1*) e *MSH2* (*MutS homolog 2*), mas também nos genes *MSH6* (*MutS homolog 6*), *PMS1* (*Post-meiotic segregation increased 1*) ou *PMS2* (*Post-meiotic segregation increased 2*)

(JASPERSON et al. 2010; SILVA et al. 2015).

A Polipose Adenomatosa Familiar é caracterizada pela presença de centenas e até milhares de pólipos adenomatosos no cólon e no reto que normalmente aparecem durante a adolescência ou na terceira década de vida (FEARNHEAD et al. 2002). Outra variante desta doença é a FAP atenuada, que se apresenta de forma menos severa e é caracterizada pela presença de até cem pólipos colorretais (JASPERSON et al. 2010). Ambas as doenças são causadas por mutações no gene *APC* (*Adenomatous polyposis coli*) que tem um importante papel como gene supressor de tumor (TORREZAN et al. 2013).

Além da FAP e da HNPCC, existem outras síndromes hereditárias menos frequentes. Uma delas é a Polipose associada ao *MUTYH* (*mutY DNA glycosylase*). Causada por mutações bialélicas no gene *MUTYH*, é caracterizada pela presença de pólipos adenomatosos, porém, a presença de pólipos hiperplásicos também é comum nesses casos (JASPERSON et al. 2010).

Outras síndromes hereditárias têm como característica a presença de pólipos hamartomatosos na região colorretal. Elas podem ser raras e conferir pouco ou até nenhum risco ao desenvolvimento de câncer de cólon, como é o caso da síndrome de *Cowden*, causada por mutações no gene *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*). Já outras síndromes associadas à presença deste tipo de pólipos, estão associadas ao risco elevado de desenvolver câncer colorretal e outras doenças. É o caso da Síndrome de

Peutz Jegher's e da Síndrome de Polipose Juvenil (JASPERSON et al. 2010).

A Síndrome de Peutz Jegher's é uma doença autossômica dominante caracterizada pela presença de pólipos hamartomatosos no intestino delgado, onde pode ocorrer obstrução e sangramentos. Pode ser facilmente reconhecida pela pigmentação da região peri-oral, mãos, pés e órbita periorcular, que acomete seus portadores. As mutações germinativas associadas ocorrem no gene *STK11* (*Serine/threonine kinase 11*) (FEARNHEAD et al. 2002; JASPERSON et al. 2010).

A Síndrome de Polipose Juvenil também é uma doença autossômica dominante e os genes envolvidos são o *SMAD family member 4* (SMAD4) e o *Bone morphogenetic protein receptor type 1^a* (BMPR1A). Seus portadores apresentam predisposição de presença de pólipos hamartomatosos juvenis, que se manifestam na infância ou na adolescência, com acometimento do estômago e intestino delgado. A ausência de característica extra-colônicas pode dificultar o diagnóstico (FEARNHEAD et al. 2002; RUSTGI 2007; JASPERSON et al. 2010).

Embora existam diversas síndromes hereditárias para esse tipo de câncer, a forma esporádica da doença ainda representa a grande maioria dos casos de câncer colorretal, ocorrendo em aproximadamente 70% dos CCR na população. O CCR esporádico é comum em pessoas com mais de 50 anos de idade (CALVERT e FRUCHT 2002). A exposição a fatores ambientais associados com o risco para esta doença, particularmente a dieta, são as principais razões para a disparada incidência mundial da

doença, especialmente na região ocidental, pois estão fortemente relacionadas ao alto consumo de carne vermelha e gorduras, bem como o baixo consumo de frutas, vegetais e fibras. Está associada também com a falta de atividade física, obesidade e tabagismo. Nos casos esporádicos ocorrem múltiplas mutações em células normais que se acumulam e as levam a um estado de hiperplasia, adenoma, carcinoma e até metástases (WICKHAM e LASSERE 2007).

Para esse acúmulo de mutações, foi caracterizada uma ordem denominada Sequência Adenoma-Carcinoma, onde constam os genes envolvidos e a qual estágio eles induzem o tumor, quando encontram-se mutados (FEARON e VOLGESTEIN 1990; PINHO e ROSSI 1999). Essa sequência está presente na maior parte dos casos de CCR, porém, aproximadamente 20% dos casos, se desenvolvem a partir de lesões de padrão serrilhado, onde a via de carcinogênese envolvida é chamada de Via Serrilhada (PATAI et al. 2013; SZYLBURG et al. 2015).

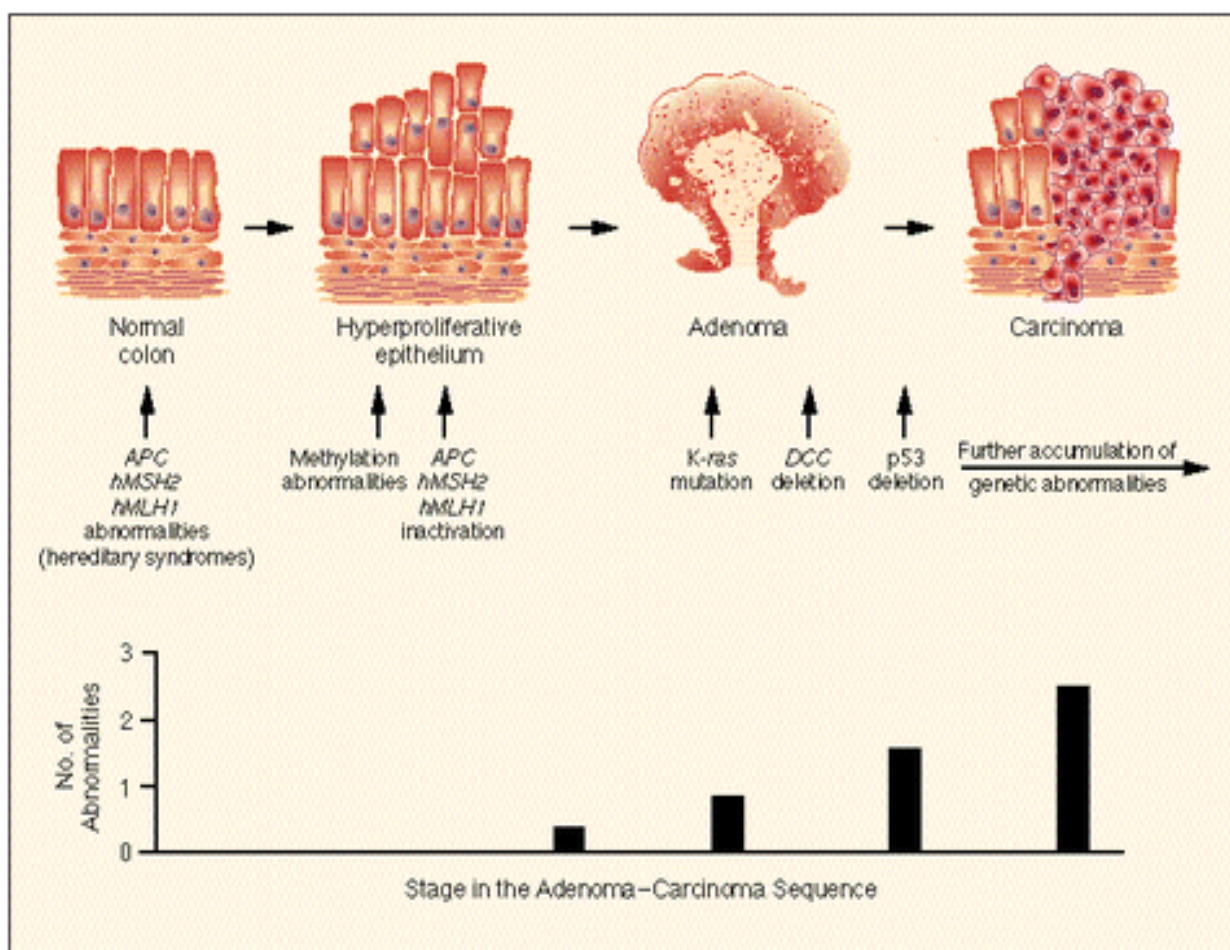
1.3 VIAS DE CARCINOGENESE DO CÂNCER COLORRETAL ESPORÁDICO

O modelo genético de tumorigênese colorretal, conhecido como sequência Adenoma-Carcinoma, foi estudado e proposto por FEARON e VOLGESTEIN (1990).

Resumidamente, o estudo citado postulou que a Sequência Adenoma-Carcinoma (Figura 1), que ocorre nos casos de tumor esporádico,

pode ser dividida em etapas. No primeiro estágio ocorre a mutação do gene *APC*, responsável por regular a proliferação celular que, quando mutado, perde sua função e então surge um estado hiperproliferativo e como consequência a formação de um pequeno adenoma. Seguindo esta etapa, há a hipometilação do DNA. A presença de um radical metila nas regiões promotoras, com ilhas *Citosina- phosphato – Guanina* (CpG), de um determinado gene, impede a leitura deste, porém, quando este radical é ausente (hipometilação), servirá como estímulo à proliferação celular, contribuindo para o desenvolvimento do adenoma inicial originado pela mutação do gene *APC*. O segundo estágio se dá pela ativação da proteína *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS), que é responsável pela ativação do crescimento e diferenciação celular a partir de estímulos extracelulares. Quando essa proteína está alterada por decorrência de uma mutação, funciona como oncogene que estimula ainda mais a proliferação, fazendo com que ocorra uma evolução do adenoma inicial para um adenoma intermediário. O terceiro estágio consiste na mutação da proteína *Deleted in Colorectal Cancer* (DCC), que apresenta uma importante função de adesão celular. Uma vez mutada, a DCC perde a capacidade de aglutinação celular. Essa alteração é frequentemente encontrada em adenomas tardios. E finalmente, no quarto estágio é onde ocorre a mutação da proteína p53 (*Tumor protein p53*), etapa que é considerada a alteração decisiva no processo de malignização de uma lesão adenomatosa benigna. A p53 funciona como um fator de segurança contra a reprodução de células contendo alterações no DNA. Havendo perda dessa função em um tecido

com estado hiperproliferativo, há então o acúmulo de mutações cromossomais, sendo esta, uma característica básica nos carcinomas invasivos. Vale ressaltar que, embora essa sequência Adenoma-Carcinoma ocorra na maioria dos casos, o acúmulo dessas mutações é mais importante do que a ordem que elas ocorrem. (FEARON e VOLGESTEIN 1990; PINHO e ROSSI 1999; LESLIE et al. 2002).



Fonte: TORIBARA e SLEISINGER (1995)

Figura 1 – Representação esquemática da sequência adenoma-carcinoma. Modificação do epitélio colônico, desde o estado normal até o carcinoma, e as alterações genéticas envolvidas em cada estágio.

Embora a maioria dos casos de CCR se desenvolva seguindo o padrão de carcinogênese já citado, aproximadamente 20% dos casos de CCR se desenvolve a partir de lesões de padrão serrilhado, com a ativação de uma via de carcinogênese conhecida como Via Serrilhada, que está associada com uma sequencia de alterações genéticas e epigenéticas que representa um mecanismo alternativo de carcinogênese colorretal (PATAI et al. 2013; KEDRIN e GALA 2015; SZYLBURG et al. 2015).

O mecanismo dos carcinomas mais comuns da Via Serrilhada começa com uma mutação ativadora do gene *BRAF*. Lesões portadoras de mutações nesse gene podem se desenvolver em lesões de padrão serrilhado. Estas lesões são propensas à hipermetilação das chamadas ilhas CpGs nas regiões promotoras de genes supressores de tumor, com consequente silenciamento epigenético dos genes envolvidos. O gene silenciado é um evento aleatório e determina o que acontecerá com a lesão posteriormente. O silenciamento epigenético mais bem caracterizado nessas lesões é o do gene *MLH1*, um dos genes de reparo. Quando esse silenciamento ocorre, a lesão passa a apresentar uma instabilidade de microssatélite (MSI) e ficando propensa ao desenvolvimento de mutações adicionais em um curto espaço de tempo (SNOVER 2011; KEDRIN e GALA 2015).

Embora na maioria das lesões pareça que a metilação do promotor do gene *MLH1* seja um evento tardio, ocorrendo provavelmente depois de muitos anos depois do desenvolvimento da lesão inicial, uma vez que o gene *MLH1* é inativado, há um rápido desenvolvimento de displasia

citológica, seguido pelo desenvolvimento potencialmente rápido de uma transformação maligna (SNOVER 2011).

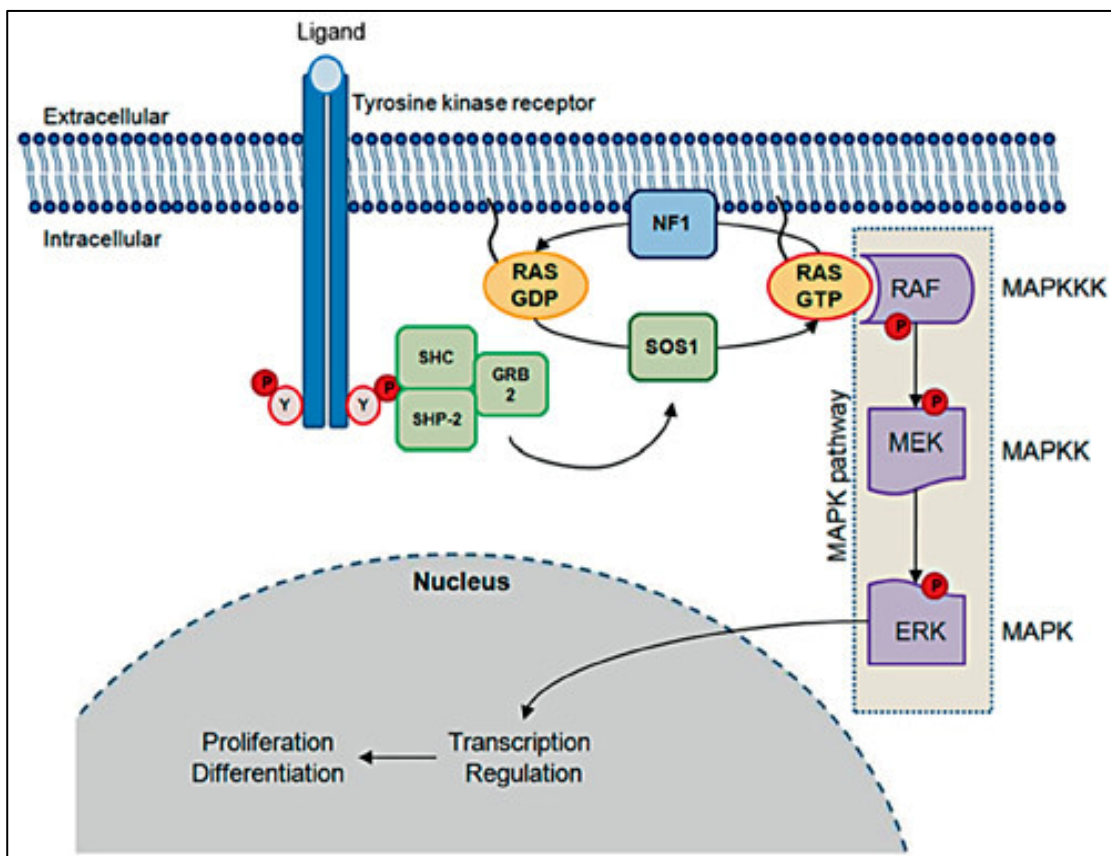
1.4 A VIA DA MAPK/ERK E O RECEPTOR DO FATOR EPIDERMAL DO CRESCIMENTO (EGFR)

A via MAPK/ERK (também conhecida como via Ras-Raf-MEK-ERK) é caracterizada por uma série de proteínas que se comunicam de uma forma complexa a partir de um sinal extracelular culminando na regulação transcricional de genes importantes. Entre as diversas proteínas importantes, o *Receptor do Fator Epidermal do Crescimento*-EGFR, proteína transmembrana com atividade de tirosina quinase, desempenha um papel importante nesta via. Esta proteína é responsável pela transdução de sinal para o núcleo celular, regulando processos como proliferação, migração, invasão, angiogênese e resistência à apoptose (STINTZING et al. 2009).

A proteína EGFR encontra-se superexpressa em 82% dos carcinomas de cólon e reto, o que está associado ao crescimento, progressão e ao maior risco de desenvolvimento de metástases (SPANO et al. 2005; VAN KRIEKEN et al. 2008).

A proteína EGFR faz a ligação entre o espaço extracelular e o interior da célula. Sua estrutura consiste em um receptor extracelular, um domínio lipofílico transmembrana e um domínio intracelular com atividade de tirosina quinase. O EGFR é ativado extracelularmente por um ligante, como o *Epidermal Growth Factor*-EGF ou *Transforming Growth Factor-alpha*-TGF-

alpha, levando a sua homodimerização. Como resultado temos a fosforilação deste receptor que ativa a cascata de sinais intracelulares responsável pelo crescimento, proliferação, migração e angiogenese. A cascata de sinalização se inicia com a ativação da proteína *Rat Sarcoma* (RAS), que envia um sinal adicional de transdução ao *Root Abundant Factor* (RAF), *MAP kinase / ERK kinase* (MEK) e *Extracellular Regulated MAP-kinase* (ERK), respectivamente e, por último, conduz a transcrição dos genes no núcleo das células levando a uma maligna progressão do tumor (Figura 2) (JORISSEN et al. 2003; STINTZING et al. 2009).



Fonte: JORGE et al. (2009)

Figura 2 – Representação esquemática da via MAPK/ERK.

Mutações nos genes *RAS* ou no gene *BRAF*, resultam em uma ativação constitutiva independente da sinalização do EGFR, levando a via a uma ativação permanente e independente desta proteína (VAN KRIEKEN et al. 2008; SCLAFANI et al. 2013).

1.5 GENES DA FAMÍLIA *RAS*

A família dos oncogenes *RAS* (*Rat sarcoma*) é representada pelos genes *Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog* (*HRAS*), *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (*KRAS*) e *Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog* (*NRAS*). São pequenas proteínas transdutoras de sinais recebidos da proteína EGFR (ARMAGHANY et al. 2012) controlando diversas respostas celulares, como proliferação, diferenciação e sobrevivência (SCHUBBERT et al. 2007).

As proteínas *RAS* são pequenas GTPases que ciclam entre a forma inativa e ativa. Elas encontram-se na forma inativa quando ligadas ao GDP (Guanosina difosfato), formando *RAS*-GDP e na forma ativa, quando ligadas ao GTP (Guanosina trifosfato), formando *RAS*-GTP (SCHUBBERT et al. 2007).

As proteínas *RAS* são ligadas à superfície interna da membrana plasmática (GARNETT e MARAIS 2004). Em células quiescentes normais essas proteínas encontram-se originalmente em sua forma inativa, ou seja, ligadas ao GDP. Estímulos extracelulares causam a transição para a forma ativa ligada ao GTP. O fator de crescimento (EGF), ligado aos receptores de

superfície celular (EGFR), cria sítios de acoplamento na porção intracelular por moléculas adaptadoras e as proteínas de retransmissão de sinais que recrutam e ativam *Guanine Nucleotide Exchange Factors* (GEFs). RasGEFs, por exemplo os membros da família *Son of Sevenless* (SOS), promovem a transformação do RAS-GDP para RAS-GTP ativo, ao passo que as (*GTPase-activating protein* (GAPs), por exemplo *Neurofibromin 1* (NF1), estimula a hidrólise do GTP passando para forma inativa RAS-GDP. Quando em sua forma ativa, a proteína RAS pode interagir produtivamente, estimulando mais de 20 vias efetoras. Dentre essas vias, destaca-se a via efetora subsequente RAF/MEK/ERK, que leva à regulação de respostas celulares (SCHUBBERT et al. 2007; DADRAS 2011; ROBERTS e STINCHCOMBE 2013).

Mutações ativadoras dos genes *RAS* ocorrem em aproximadamente 20% de todos os cânceres humanos. As mutações em *KRAS* ocorrem frequentemente em cólon, pâncreas e pulmão, enquanto as de *NRAS* são mais encontradas em leucemias mieloides, e melanomas cutâneos (IRAHARA et al. 2010). As mutações pontuais se dão por meio de substituição de uma determinada base, podendo acarretar em mutações com perda de sentido, ocasionando na troca de um aminoácido crítico na configuração da proteína (VAN KRIEKEN et al. 2008).

Mutações nos códons 12, 13, 61, 117 ou 146 dos genes *KRAS* e *NRAS* levam a um ganho de função fazendo com que a ativação da sinalização intracelular seja independente da ativação pelo EGFR, resultando em proliferação de células tumorais, proteção contra apoptoses,

aumento da invasão e metástases e ativação da indução de angiogênese (VAN KRIEKEN et al. 2008). As proteínas RAS mutantes são constitutivamente ativas, devido à redução da atividade GTPase e insensibilidade às GAPs (IRAHARA et al. 2010).

No câncer colorretal, o gene *KRAS* é o membro mais frequentemente mutado e se apresenta nessa condição em, aproximadamente, 40% dos casos esporádicos (DI NICOLANTONIO et al. 2008; REBERSEK et al. 2011; ARMAGHANY et al. 2012). Mutações no gene *KRAS* estão bem estabelecidas como preditores negativos de resposta a terapias anti-EGFR no tratamento de CCR metastático (MACEDO et al. 2015).

Estudos recentes têm demonstrado que pacientes com tumores com mutações no gene *NRAS* também apresentam baixa resposta aos tratamentos com inibidores de EGFR, quando comparados a tumores com *NRAS* selvagem. As mutações em *NRAS* estão presentes em aproximadamente 5% dos tumores colorretais, sendo menos frequente que as mutações no gene *KRAS*. Mutações concomitantes nos genes *KRAS* e *NRAS* raramente são encontradas (MACEDO et al. 2015)

1.6 GENE *BRAF*

A família de genes *Root Abundant Factor* (RAF) é composta por três membros: *A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase* (ARAF), *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase* (BRAF) e *C-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase* (CRAF) - também conhecido como *RAF1*. As

proteínas originadas desses genes possuem atividade de serina/treonina quinases e são componentes da via de sinalização que regula respostas à sinais extracelulares (via do EGFR). As proteínas RAF são os primeiros elementos desta cascata que estão localizadas no citoplasma. Elas encontram-se logo após as proteínas RAS, que estão ligadas à superfície interna da membrana plasmática. Quando a proteína RAS encontra-se em sua forma ativada (RAS-GTP), ela se liga à proteína RAF e a recruta do citosol para se ligar à membrana plasmática, que é onde RAF é ativada. Uma vez ativada, a proteína RAF fosforila e ativa uma proteína quinase chamada MEK, que por sua vez fosforila e ativa uma outra proteína quinase denominada ERK. A ERK fosforila proteínas no citosol e também se transloca para o núcleo, onde fosforila proteínas como os fatores de transcrição. Assim, a ERK regula a expressão gênica, rearranjos do citoesqueleto e o metabolismo para coordenar respostas aos sinais extracelulares e regular a proliferação, diferenciação, senescência e apoptose da célula (GARNETT e MARAIS 2004; HOUBEN et al. 2004).

Aproximadamente 8% dos cânceres humanos possuem mutação do gene *BRAF*. Contudo, a prevalência desta alteração em diferentes tipos de tumor é altamente variável. Melanoma, carcinoma papilífero de tireóide e câncer colorretal, demonstram a maior incidência desta mutação (SCLAFANI et al. 2013).

O gene *BRAF* está localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q34) e é composto por 18 éxons. Embora haja descrição de diversos tipos de mutações, a mutação ativa mais comum ocorre em 90% dos casos

mutados e é encontrada no éxon 15, onde acontece a troca da base timina por adenina no nucleotídeo 1799 (c.1799T>A), resultando na tradução de um glutamato no lugar de uma valina no códon 600 (V600E) (SHARMA e GULLEY 2010; CANTWELL-DORRIS et al. 2011). A proteína codificada por este gene mutado é 10 vezes mais ativa do que em sua forma selvagem, portanto, o *BRAF* pode ser considerado como um oncogene (DAVIES et al. 2002; SHARMA e GULLEY 2010).

Aproximadamente 5 a 15% dos tumores colorretais apresentam mutação no gene *BRAF* (PALOMBA et al. 2012; THIEL e RISTIMÄKI 2013), e a mutação desse gene está relacionada ao pior prognóstico em casos de CCR (PHIPPS et al. 2012; VAN CUTSEM et al. 2014).

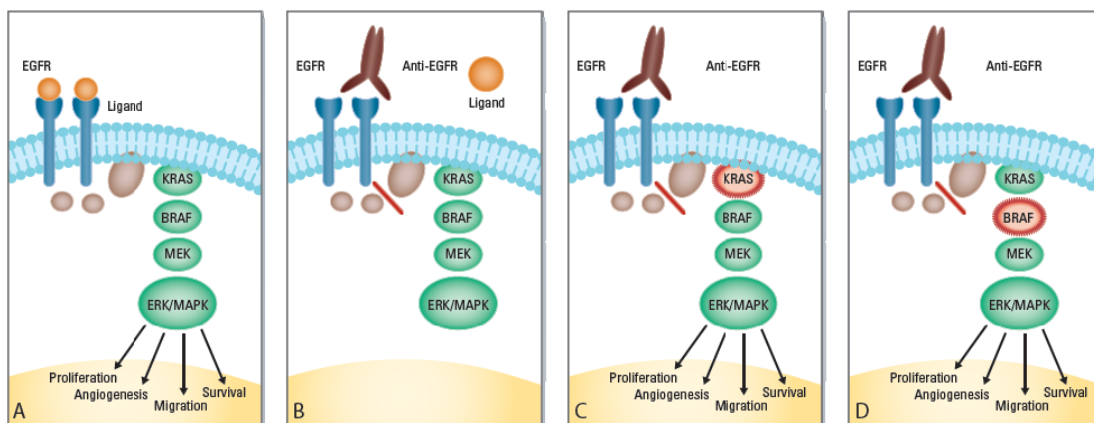
1.7 TRATAMENTO COM DROGAS ANTI-EGFR

A via de sinalização do EGFR é reconhecida por desempenhar um importante papel na carcinogênese do câncer colorretal. A inibição desta via tem sido utilizada como tratamento potencial para diversos tipos de tumores sólidos. Para os casos de CCR metastático, dois tipos de inibidores da via do EGFR foram aprovados pelo *US Food and Drug Administration* (FDA). São eles os anticorpos monoclonais Cetuximabe, produzido pela Merck S.A., com nome comercial Erbitux®, e Panitumumabe, produzido pela Amgen Ltda., com nome comercial Vectibix®. O cetuximabe é um anticorpo monoclonal quimérico IgG1, enquanto o panitumumabe é um anticorpo IgG2 totalmente humanizado. Esses dois tipos de anticorpos se ligam

especificamente ao domínio de ligação extracelular da proteína EGFR evitando sua dimerização e fosforilação, bloqueando assim a via de ativação subsequente, impedindo a proliferação celular e crescimento tumoral (SIENA et al. 2009; CHEN et al. 2010; RUZZO et al. 2010). As drogas anti-EGFR como cetuximabe e panitumumabe, podem ser usadas sozinhas, ou combinadas com outros fármacos como fluorouracil, irinotecan ou oxaliplatin (LAURENT-PUIG et al. 2009).

Apesar dos benefícios para alguns pacientes, estas drogas possuem custo elevado e são altamente tóxicas, portanto, se o uso for feito de forma não seletiva, pode não apresentar benefício algum ao usuário (RICHMAN et al. 2011). Infelizmente, somente uma baixa porcentagem (10-20%) dos pacientes não testados para nenhum gene, respondem ao tratamento com este tipo de terapia alvo (BARDELLI e SIENA 2010; MOSTERT et al. 2013; MAO et al. 2015).

Pacientes com alterações nos genes *RAS* ou *BRAF*, não apresentam resposta ao tratamento com cetuximabe ou panitumumabe, sendo essas mutações consideradas como preditores negativos de resposta a este tipo de terapia individualizada (BARDELLI e SIENA 2010). Tal resistência deve-se ao ganho de função da proteína, *RAS* ou *RAF*, modificada estruturalmente em decorrência de uma mutação, que leva a uma ativação da via proliferativa constante e independente da sinalização pela proteína EGFR (Figura 3) (VAN KRIEKEN et al. 2008).



Fonte: Clariant – A GE Healthcare Company (2013).

Figura 3 - Demonstração da ação do anti-EGFR em casos de ausência ou de presença de mutação nos genes *KRAS* ou *BRAF*. A) Estado normal da proteína EGFR ativando a via de proliferação RAS-RAF-MEK-ERK MAPkinase; B) Anti-EGFR ligado ao receptor de membrana, bloqueando o envio de sinais para proliferação, angiogênese, migração e sobrevivência; C) Gene *KRAS* mutado ativando, de forma independente e permanente, a via proliferativa; D) Gene *BRAF* mutado ativando, de forma independente e permanente, a via proliferativa.

As mutações do gene *KRAS* são encontradas em aproximadamente 30 a 40% dos pacientes com câncer colorretal (DI NICOLANTONIO et al. 2008; REBERSEK et al. 2011; ARMAGHANY et al. 2012), mas somente 40 a 60% dos pacientes com *KRAS* selvagem, respondem ao tratamento com anti-EGFR, o que sugere a existência de outras alterações moleculares que também determinam resposta (LAURENT-PUIG et al. 2009; REBERSEK et al. 2011). Dentre os tumores com ausência de mutação do *KRAS*, em média 5 a 15% possuem mutação para o gene *BRAF* (PALOMBA et al. 2012; THIEL e RISTIMÄKI 2013).

Em janeiro ALLEGRA et al. (2016) publicaram uma nova atualização das diretrizes de tratamento, baseadas em estudos da *American Society of Clinical Oncology* (ASCO), onde indica que adicionalmente à análise das

mutações dos códons 12 e 13 do gene *KRAS* (éxon 2), como era recomendado previamente, os pacientes com câncer colorretal metastático devem ter seus tumores testados também para mutações em:

- *KRAS* éxon 3 (códons 59 e 61) e éxon 4 (códons 117 e 146);
- *NRAS* éxon 2 (códons 12 e 13), éxon 3 (códons 59 e 61) e éxon 4 (códons 117 e 146).

Enquanto as mutações no éxon 2 do gene *KRAS* ocorrem em aproximadamente 40% dos casos de CCR, as outras mutações éxons 3 e 4 do mesmo gene e as mutações citadas em *NRAS*, quando somadas, acometem cerca de 10 a 15% dos pacientes com CCR (VAN CUTSEM et al. 2014).

Da mesma forma, a análise de mutação do gene *BRAF* se faz necessária e poderia ser utilizada como ferramenta adicional para selecionar os pacientes que podem ser beneficiados com as terapias anti-EGFR, tornando a ideia de tratamento individualizado mais completa (DI NICOLANTONIO et al. 2008; REBERSEK et al. 2011).

1.8 HETEROGENEIDADE TUMORAL

O câncer colorretal é uma doença heterogênea que apresenta diferentes aspectos em sua apresentação clínica, em suas características moleculares, bem como no prognóstico do paciente (LINNEKAMP et al. 2015).

A existência de um fenótipo heterogêneo, representado pela variação morfológica entre diferentes regiões de um mesmo tumor, é comumente observada na rotina dos médicos patologistas (FISHER et al. 2013; BARRANHA et al. 2015).

Teorias apontam que os cânceres são originados por subclones celulares distintos, que acumulam mutações somáticas que lhes conferem um aumento de carga mutacional, tornando-os mais aptos para enfrentar o processo de seleção natural que são submetidos. A progressão dos cânceres humanos é classicamente entendida como o desenvolvimento de uma única célula mutada que passa por uma expansão clonal maligna seguida de alterações genéticas e genômicas adicionais. A aquisição contínua dessas mutações pode levar ao surgimento dos subclones tumorais, com diversas vantagens proliferativas, capazes de desenvolver estratégias para aumentar a sua aptidão para sobreviver num ambiente potencialmente adverso (BARRANHA et al. 2015).

A heterogeneidade tumoral tem sido identificada em diversos tipos de cânceres e refere-se à existência de subpopulações celulares com genótipos e fenótipos distintos que podem apresentar comportamentos biológicos diferentes. Pode ocorrer dentro de um mesmo tumor, conhecida como heterogeneidade intratumoral, ou entre um tumor primário e suas metástases, conhecida como heterogeneidade intertumoral (YANCOVITZ et al. 2012; FISHER et al. 2013; NORMANNO et al. 2015).

Alguns subclones celulares menores, não detectados em amostra de biópsias dos tumores primários, podem ter uma maior capacidade de

metástase do que a maioria das outras células, o que pode levar a um determinado grau de heterogeneidade entre o tumor precursor e o tumor à distância, por isso, tumores originados de um mesmo órgão podem ter perfis moleculares completamente diferentes e, portanto, podem ser sensíveis ou resistentes a diferentes drogas alvo. (BARRANHA et al. 2015; NORMANNO et al. 2015).

Tal heterogeneidade é potencialmente importante, uma vez que tem sido demonstrada como responsável por afetar significativamente a eficácia das drogas baseadas em terapia alvo, portanto, é preciso utilizar estratégias para detecção de mutações destinadas a esses oncogenes a fim de avaliar a heterogeneidade intra e intertumoral nessas amostras (YANCOVITZ et al. 2012; FISHER et al. 2013; NORMANNO et al. 2015).

Até o momento, não há indicação formal a respeito de quais amostras são mais representativas do tumor como um todo e, portanto, mais adequadas para serem testadas: tumor primário, linfonodo ou metástases à distância. (BARRANHA et al. 2015).

Neste sentido, nos casos de câncer colorretal, avaliar a heterogeneidade genética de mutações em oncogenes com valor prognóstico e/ou preditivo de resposta à terapia alvo nos tumores primários e suas metástases é fundamental para o correto planejamento terapêutico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o *status* mutacional do códon 600 do gene *BRAF* em carcinomas colorretais, que possuem metástases hepáticas, pulmonares e/ou linfonodais, sabidamente selvagens para os códons 12, 13 e 61 do gene *KRAS*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a frequência de mutações do códon 600 do gene *BRAF* em carcinomas colorretais e suas respectivas metástases, com *status* selvagem para o gene *KRAS* (códons 12, 13 e 61);
- b) Avaliar a existência de heterogeneidade, quanto à presença ou ausência de mutação do códon 600 do gene *BRAF*, entre neoplasias primárias e suas metástases originadas de carcinomas colorretais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo de coorte retrospectivo, contendo 58 casos de carcinomas colorretais primários e metastáticos, com status selvagem para os códons 12, 13 e 61 do gene *KRAS*.

3.1.2 Casuística

Os casos estudados neste trabalho foram avaliados e selecionados a partir de um estudo prévio denominado “ANÁLISE DA HETEROGENEIDADE DO STATUS MUTACIONAL DO GENE *KRAS* EM CARCINOMAS COLORRETAIS PRIMÁRIOS E METASTÁTICOS” da doutora MACEDO (2014).

No estudo acima citado foram selecionados pacientes com diagnóstico anátomo-patológico comprovado de adenocarcinoma colorretal, que possuíam materiais disponíveis em bloco de parafina no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica, de tumor primário e suas respectivas metástases, podendo essa metástase ser hepática, e/ou pulmonar e/ou linfonodal.

Foram considerados elegíveis pacientes de ambos os sexos; de todas as idades; com peças cirúrgicas provenientes do A.C.Camargo Cancer Center ou de outros hospitais, com acompanhamento posterior no

A.C.Camargo Cancer Center; com neoplasias em qualquer região do cólon e/ou reto; e independente da etapa ou tipo de tratamento em que se encontravam.

Neste estudo prévio foram analisados tumores primários e metastáticos de adenocarcinomas colorretais de 102 pacientes. Destes, 58 casos apresentaram *status* selvagem para os códons 12, 13 e 61 do gene *KRAS* e, portanto, foram os casos selecionados para o presente estudo.

3.1.3 Critérios de Exclusão

Pacientes cujos blocos de parafina não continham quantidade mínima de 10% de área neoplásica, necessária para avaliação de mutação pontual por pirosequenciamento, e amostras com massa total de DNA inferior a 300ng (concentração de 10ng/μL de DNA eluído em 30 μL de água), foram excluídos do estudo.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Levantamento das Amostras e Seleção da Área Neoplásica

A partir da análise de prontuários eletrônicos de pacientes do A.C.Camargo Cancer Center, foram selecionados casos de adenocarcinomas colorretais com histórico de metástase em fígado, e/ou pulmão e/ou linfonodo(s).

As lâminas histológicas, coradas por Hematoxilina-Eosina (H&E), foram retiradas do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center.

As avaliações microscópicas foram realizadas pela médica patologista, da instituição, Dra. Mariana Petaccia de Macêdo, a fim de confirmar o diagnóstico de adenocarcinoma colorretal e de selecionar as áreas representativas de neoplasia. Nas lâminas contendo os cortes histológicos foram marcadas as áreas com maior concentração de células tumorais e menor quantidade de estroma, muco e infiltrado inflamatório entre as células, com representatividade neoplásica de, pelo menos, 10%.

Em seguida, os blocos de parafina, correspondentes aos espécimes selecionados, foram retirados no setor responsável pelo arquivo de blocos e lâminas, do Departamento de Anatomia Patológica, e encaminhados ao setor de histologia, onde foram confeccionados, em média, cinco cortes histológicos, com uma espessura padrão de 5µm, sem coloração, para posterior extração de DNA destes tecidos.

Em todos os 58 casos escolhidos para avaliação do *status* de mutação do códon 600 do gene *BRAF*, foi selecionada uma região do tumor primário e as regiões de metástases disponíveis.

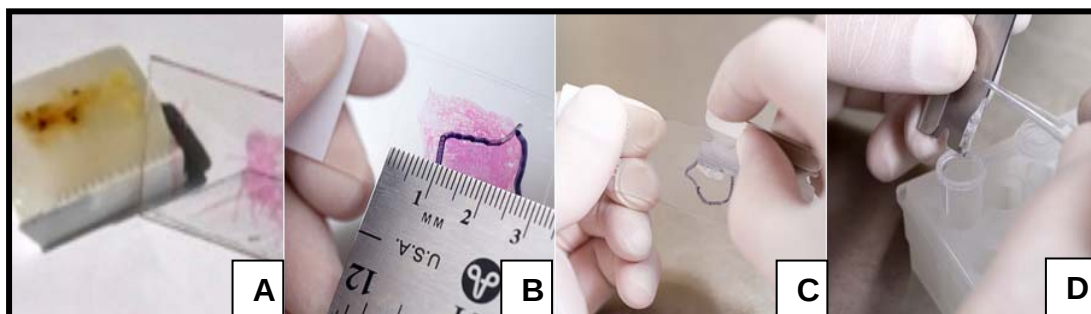
3.2.2 Extração de DNA

A metodologia utilizada para dissecção da área tumoral varia de acordo com a concentração e quantidade de células neoplásicas presentes no material. Para os casos com maior incidência neoplásica, superior a 30%,

a técnica utilizada foi a de microdissecção manual (*scrape*). Nos casos de escassez tumoral, com 10 a 30% de células representativas de neoplasia, foi realizada a microdissecção a laser (*Laser Capture Microdissection* (LCM) no equipamento PixCell Ile® da marca Arcturus®.

Para ser possível a extração do DNA genômico destes tecidos, antes de iniciar a microdissecção manual, é necessário realizar a desparafinação dos cortes presentes nas lâminas. A desparafinação foi feita com 3 banhos de xilol, de 5 minutos cada, seguidos de 2 banhos de álcool 100%, de 2 minutos cada.

A técnica do *scrape* consiste na raspagem da área selecionada do tecido, fixado em lâmina de vidro, com auxílio de uma lâmina de bisturi e introdução desse raspado em um microtubo, como demonstrado na Figura 4.

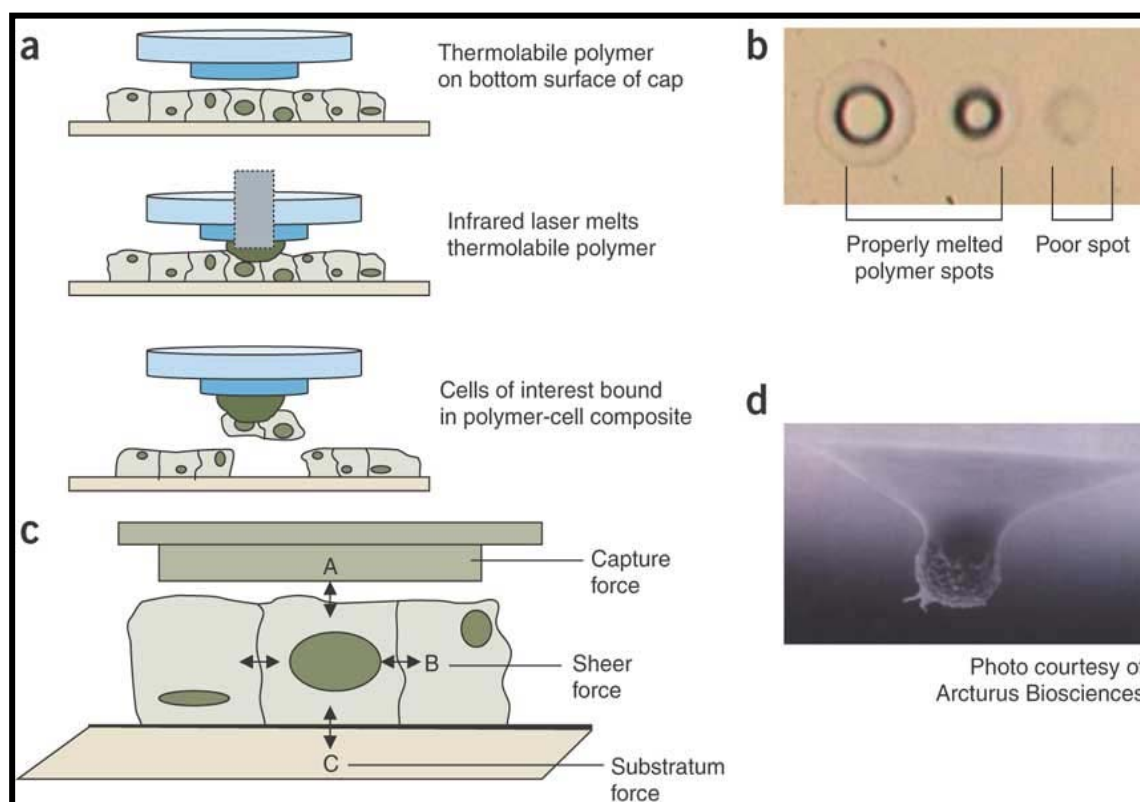


Fonte: HTG Molecular (2016)

Figura 4 - Representação esquemática da metodologia de microdissecção manual (*scrape*). A) Bloco de parafina contendo o tumor e lâmina com o corte histológico corado por H&E; B) Seleção da área de maior concentração tumoral; C) Raspagem do tecido desparafinado; D) Introdução do raspado em um microtubo.

A técnica de LCM, utilizada para enriquecer amostras com pouca representatividade tumoral, consiste na captura de células neoplásicas de tecidos com tumores escassos, através da utilização de uma cápsula contendo um polímero termoplástico. Esta cápsula é sobreposta à lâmina e, ao receber um feixe de laser, o polímero é derretido fixando-se ao tecido e, ao retrair, captura a região de interesse (Figuras 5 e 6).

Para a realização da microdissecção a laser, é necessário efetuar a desparafinação dos tecidos seguida de coloração, conforme o protocolo do Anexo 1.



Fonte: ESPINA et al. (2006)

Figura 5 - Representação esquemática da metodologia de microdissecção a laser (LCM).

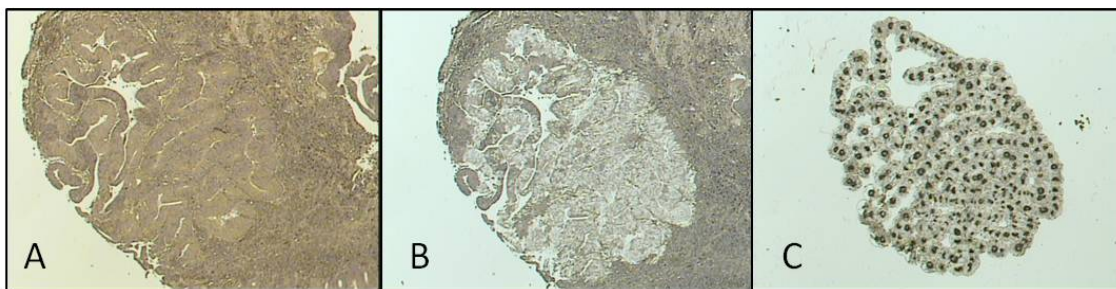


Figura 6 – Imagens do resultado da técnica de microdissecção a laser. A) Tecido com área de células neoplásicas antes da captura; B) Tecido com área vazia onde foram microdissecadas as células neoplásicas; C) Cápsula contendo as células capturadas do tecido.

Após dissecção dos tecidos tumorais, por *scrape* ou LCM, seguiu-se a extração do DNA utilizando o kit comercial, apropriado para uso em tecidos que sofreram processo de inclusão em parafina, denominado “*QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit*” da Qiagen®. Algumas adaptações do protocolo foram necessárias, pois, após alguns testes, viu-se a necessidade da alteração do tempo de digestão com o *Buffer ATL* e a *Proteinase K*, de 1 hora, como descrito no protocolo original do fabricante, para um período de 12 a 16 horas (*overnight*), tendo assim, um melhor rendimento de moléculas extraídas. O restante do protocolo foi rigorosamente realizado conforme orientação do referido kit.

Posteriormente à extração, o eluato obtido (30 μ L) foi quantificado, pelo princípio de espectrofotometria, no Nanodrop™ 1000. Para as etapas seguintes, foram consideradas válidas somente as amostras que apresentaram quantidade igual ou superior à 10ng/ μ L, equivalente à 300 ng de massa total, valor mínimo para que houvesse quantidade suficiente para realizar a amplificação de todas as regiões de interesse nos estudos.

3.2.3 Reação de Pirosequenciamento

A técnica de pirosequenciamento foi escolhida neste projeto por fornecer resultados qualitativos e quantitativos, além de ter alta sensibilidade para detecção de mutações pontuais.

Previamente à reação de pirosequenciamento é necessária a realização de uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para que haja quantidade de molde de DNA suficiente para ser sequenciada. Um dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) dessa reação de PCR (senso ou antisenso) deve conter uma marcação com biotina, que permite o isolamento da fita de DNA sintetizada a partir desse oligonucleotídeo. Esse isolamento se dá por meio da ligação da molécula de biotona com partículas de estreptavidinas. Para isolar a estrutura biotina-estreptavidina dos demais resíduos presentes no produto de PCR, as reações são submetidas a uma pressão negativa, gerada por um vácuo, na plataforma de preparação de amostras denominada *PyroMark Vacuum WorkStation*. Ao serem aspiradas, as amostras passam por um filtro, onde as estreptavidinas ficam retidas juntamente com os moldes, e o restante das impurezas vão para um descarte. Nessa mesma plataforma, as amostras são lavadas com álcool 70%, removendo os resíduos provenientes da PCR. Em seguida, as amostras passam por uma solução denaturante de NaOH que faz com que as pontes de hidrogênio sejam rompidas, deixando ligadas às estreptavidinas somente as hemi-fitas de DNA presas à biotina. Por fim, as amostras passam por uma solução de lavagem para garantir que na próxima

etapa estarão presentes somente as hemi-fitas moldes de DNA, sem qualquer tipo de interferente.

Posteriormente, essas moléculas de fita simples são incubadas em uma solução de anelamento contendo um *primer* de sequenciamento complementar a elas. A temperatura dessa reação é elevada a 80°C, o que garante o anelamento das duas estruturas.

Finalmente, após esse preparo das amostras, estas vão para o pirosequenciador *PyroMark Q24* (Qiagen®), onde acontece o sequenciamento por síntese de uma fita complementar à fita inserida no equipamento.

O pirosequenciamento é um tipo de sequenciamento de DNA baseado na detecção da liberação de Pirofosfato (PPi) durante a síntese da molécula de DNA (RONAGHI 2001). No processo são utilizadas quatro enzimas: DNA Polimerase, ATP Sulfurilase, Luciferase e Apirase; e 2 substratos: APS (adenosina 5' fosfosulfato) e Luciferina (AHMADIAN et al. 2006).

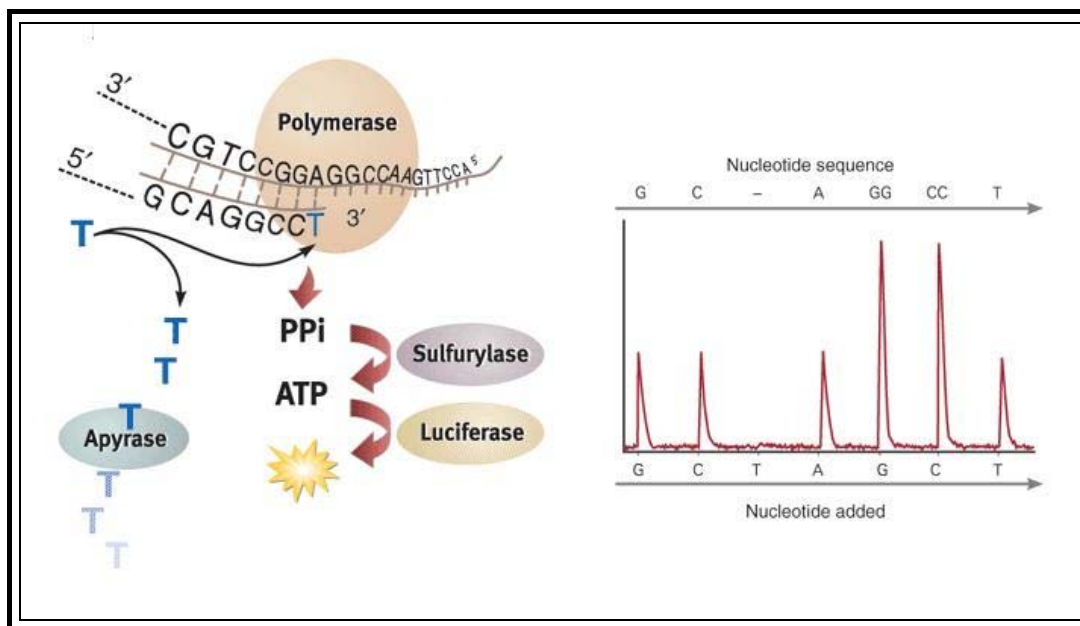
A cascata se inicia com a reação de polimerização, onde a enzima polimerase utiliza os dNTPs (desoxi-ribonucleotídeo trifosfatado) para sintetizar uma nova fita de DNA a partir da fita molde. Os dNTPs são dispensados na reação um a um, conforme a ordem de dispensação informada pelo *software*, realizando um sequenciamento cíclico. Quando o dNTP dispensado é complementar ao nucleotídeo do DNA molde, essa base é incorporada à nova fita de DNA que está sendo sintetizada. Ao mesmo

tempo, um PPI é liberado como resultado dessa incorporação (COUDRY 2008; SHEN e QIN 2012).

Na presença de APS este PPI é convertido em uma molécula de Adenosina trifosfato (ATP) pela enzima ATP Sulfurilase, e a enzima Luciferase utiliza essa molécula de ATP para oxidar a Luciferina e produzir fótons de luz que são detectados por uma câmara de *Charge Coupled Device* (CCD), presente no interior do equipamento. Se nenhum fóton de luz for produzido, significa que a base liberada não corresponde à base complementar da fita de DNA molde a ser sequenciada, mas quando o fóton é produzido, sabe-se qual base foi adicionada na reação e a quantidade de luz emitida é proporcional ao número de nucleotídeos incorporados (RONAGHI 2001; ARMOUGOM e RAOULT 2009; SOUZA e BRUSAMARELLO 2009). A Apirase é a enzima responsável pela degradação dos nucleotídeos não incorporados e do excesso de ATP produzido pela adição das bases (AHMADIAN et al. 2006).

Os dados do pirosequenciamento são reportados como gráfico denominado pirograma. O pirograma consiste em uma série de picos com diferentes alturas que traduzem a sequência de nucleotídeos do segmento de DNA testado. A altura do pico é proporcional ao número de bases complementares ao molde, em cada ponto de dispensação (YEO et al. 2011; SHEN e QIN 2012)

A reação química do pirosequenciamento está ilustrada na Figura 7.



Fonte: ENGLAND e PETTERSSON (2005).

Figura 7 - Ilustração da reação química da técnica de pirosequenciamento.

3.2.4 Padronização de *primers*

Para realizar o pirosequenciamento do códon 600 do gene *BRAF*, foi necessário realizar o desenho dos *primers* a serem utilizados tanto na reação de PCR, quanto na reação de sequenciamento.

Na primeira tentativa, os *primers* foram desenhados com o auxílio de programas como *CLC Genomics Workbench* e *OligoTech*, tendo como base a sequência de referência do gene *BRAF* obtida no NCBI (NG_007873). Os resultados obtidos mostraram-se insatisfatórios e não esclarecedores, pois não apresentaram resultado na reação de pirosequenciamento, mesmo após repetições, diferentes combinações de *primers* e condições de PCR.

Foi realizada a síntese de novos *primers* que, desta vez, foram desenhados com auxílio de um programa próprio para pirosequenciamento, o *Assay Design Software*, da Qiagen®.

Foram testadas as reações de PCR com os novos *primers* sintetizados. A sequência do *primer* senso (*Foward*) é 5' TGC TTG CTC TGA TAG GAA AAT GA 3' e do *primer* anti-senso (*Reverse*) biotinilado (purificado pela plataforma *HPLC*) é 5' CAT CTC AGG GCC AAA AAT TTA A 3'. A PCR realizada com esses *primers* gera um amplicon de 226 pares de bases (pb). A sequência do *primer* de sequenciamento utilizada na reação de pirosequenciamento é 5' GGT GAT TTT GGT CTA GCT 3'.

O kit utilizado para execução da reação de PCR foi o *HotStarTaq Master Mix*, da Qiagen®. Cada reação de PCR teve um volume final de 25µL, sendo compostos por 12,5 µL de *HotStarTaq Master Mix 2x*; 8,5 µL de água livre de DNase e RNase; 1µL do mix de *primers* (0,5µL senso + 0,5µL antisenso), com quantidade de 0,5 pmoles; e DNA de interesse, diluído em água, em uma quantidade de 80 a 120 ng.

Essas reações foram submetidas à amplificação em termociclador, respeitando as seguintes condições de ciclagem: ativação da *HotStarTaq DNA polymerase* a 95°C por 15 minutos; amplificação da região de interesse, composta por 42 ciclos de denaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 53°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 20 segundos; extensão final a 72°C por 5 minutos; e armazenamento a 4°C.

Para todos os testes de validação dos novos *primers* foram analisados:

- ✓ amostras com resultados de presença ou ausência de mutação conhecidos previamente;
- ✓ um controle de DNA comercial de linhagem celular (WiDr) com presença da mutação c.1799 T>A; p.(V600E) no gene *BRAF* com uma frequência de 50%;
- ✓ um controle de DNA selvagem (controle WT);
- ✓ uma reação sem DNA (*No Template Control-NTC*).

A confirmação do funcionamento da reação de PCR foi realizada por meio de testes em gel de agarose a 1%, observando a presença de produto de amplificação e a ausência de contaminação no NTC.

Com a utilização desses *primers* de PCR, foi possível observar sucesso na amplificação com a ciclagem indicada, conforme demonstrado no gel de agarose representado na Figura 8.

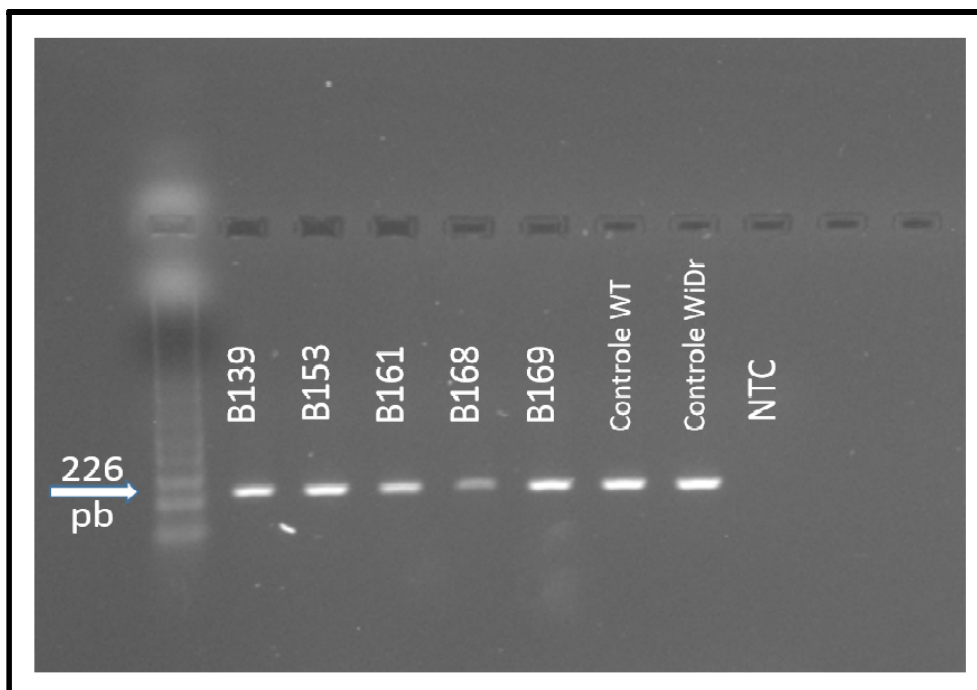


Figura 8 - Demonstração do resultado de amplificação em gel de agarose. Gel de agarose a 1%, demonstrando o marcador de peso molecular de 100 pb, amplificação de um fragmento de 226 pb nas cinco amostras testadas (B139, B153, B161, B168 e B169), nos dois controles (Controle WT e Controle WiDr) e sem qualquer amplificação no NTC.

Foi realizada a corrida de pirosequenciamento utilizando os produtos da reação da PCR anterior. Nos resultados obtidos, observou-se picos inespecíficos em algumas amostras, não sendo possível realizar a análise, como pode-se observar na Figura 9.

Resultado Esperado X Resultado Obtido

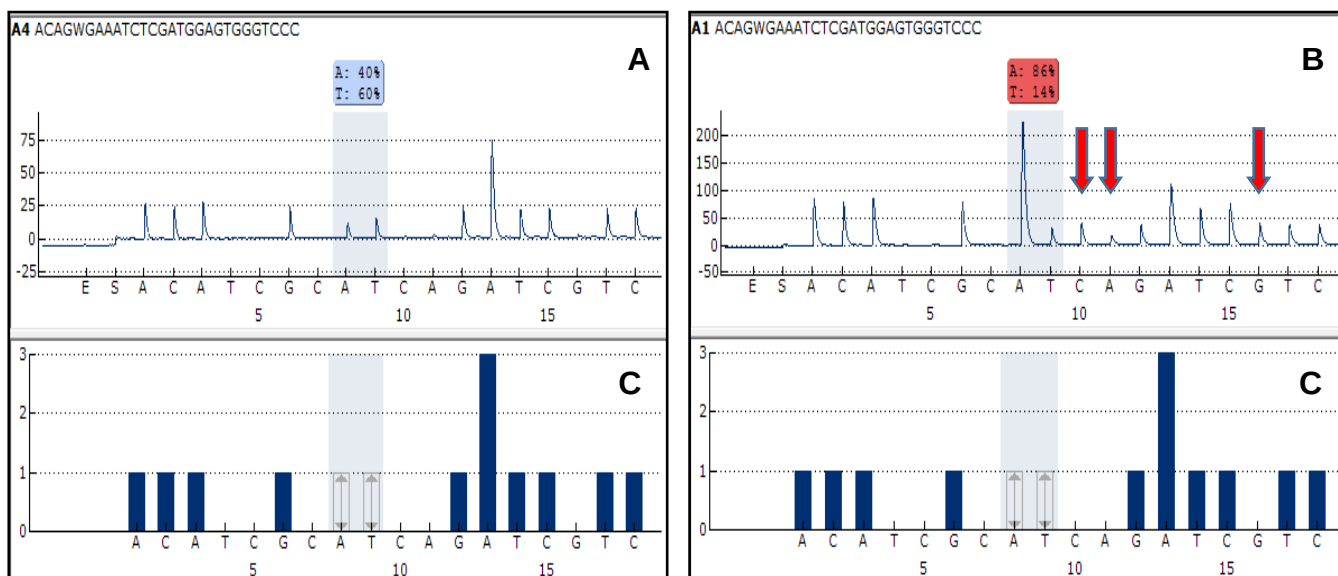


Figura 9 - Demonstração da diferença entre o resultado esperado e o resultado obtido no pirosequenciamento. A) Pirograma mostrando picos nas posições e quantidades esperadas, quando comparadas com o histograma de referência (C); B) Pirograma com presença de picos inespecíficos em posições em que não deveria haver incorporação de bases, apontados pelas setas vermelhas; C) Histograma de referência com representação dos picos esperados, as bases que não devem ser incorporadas e a região variável da alteração pesquisada.

A fim de otimizar o funcionamento da reação de PCR e, conseqüentemente, da reação de pirosequenciamento, para obtenção de resultados satisfatórios, novos testes foram realizados esperando a obtenção de amplicons mais específicos e, com isso, menos ruídos nos pirogramas, tornando possível a análise de seus resultados.

Três variáveis de PCR foram testadas e ajustadas: quantidade dos *primers* de PCR, temperatura de anelamento e número de ciclos de amplificação.

Foram testadas 4 quantidades diferentes de *primers* de PCR, entre 0,35 pmoles e 0,50 pmoles, com uma variação de 0,05 picomoles entre elas.

O melhor resultado obtido foi com o uso de *primers* a uma quantidade de 0,50 pmoles, onde todas as amostras foram amplificadas com bandas mais específicas, conforme é possível verificar na Figura 10.

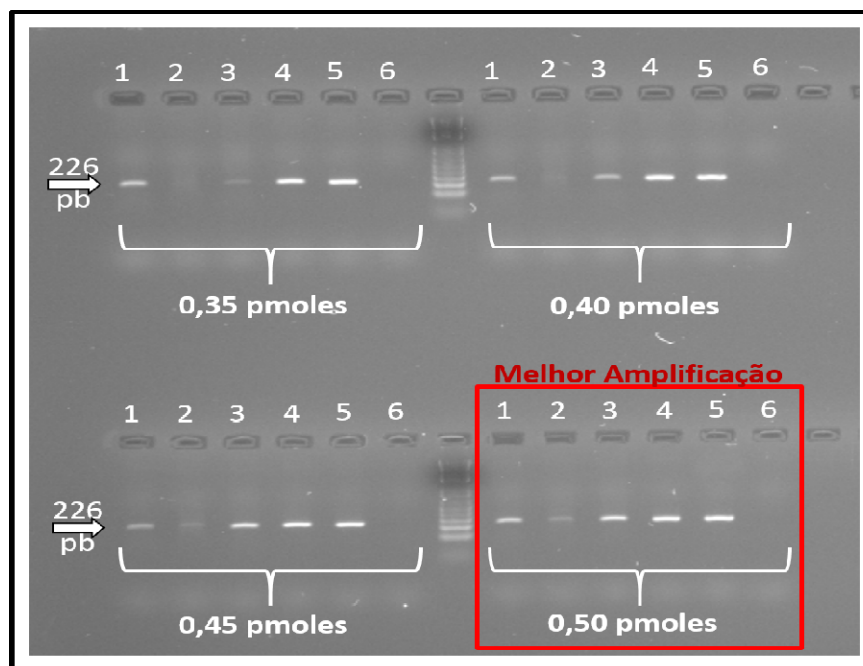


Figura 10 - Gel de agarose demonstrando a condição de PCR que apresentou melhor amplificação. Gel de agarose a 1%, com os produtos de PCR de 226 pb, obtidos através de diferentes quantidades de *primers*, demonstrando que a reação com 0,50 pmoles apresentou melhor amplificação. As amostras aplicadas no gel, representadas pelos números de 1 a 6 são: B161, B168, B169, Controle WT, Controle Widr e NTC, respectivamente. O marcador de peso molecular utilizado foi de 100 pb.

Com o conhecimento da melhor quantidade de *primers* a ser utilizada, foram realizados novos testes com diferentes temperaturas de anelamento (60°C ou 62°C) e diferentes números de ciclos de amplificação (38 ou 42), com combinações entre as variáveis.

Quatro reações de PCR foram realizadas, com combinações diferentes entre as variáveis testadas, respeitando as seguintes condições

de ciclagem: ativação da *HotStarTaq DNA polymerase* a 95°C por 15 minutos; amplificação da região de interesse composta por 38 ou 42 ciclos de denaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 60 ou 62°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 20 segundos; extensão final a 72°C por 5 minutos; e armazenamento a 4°C.

As combinações e seus resultados de amplificação podem ser observados a seguir na Figura 11.

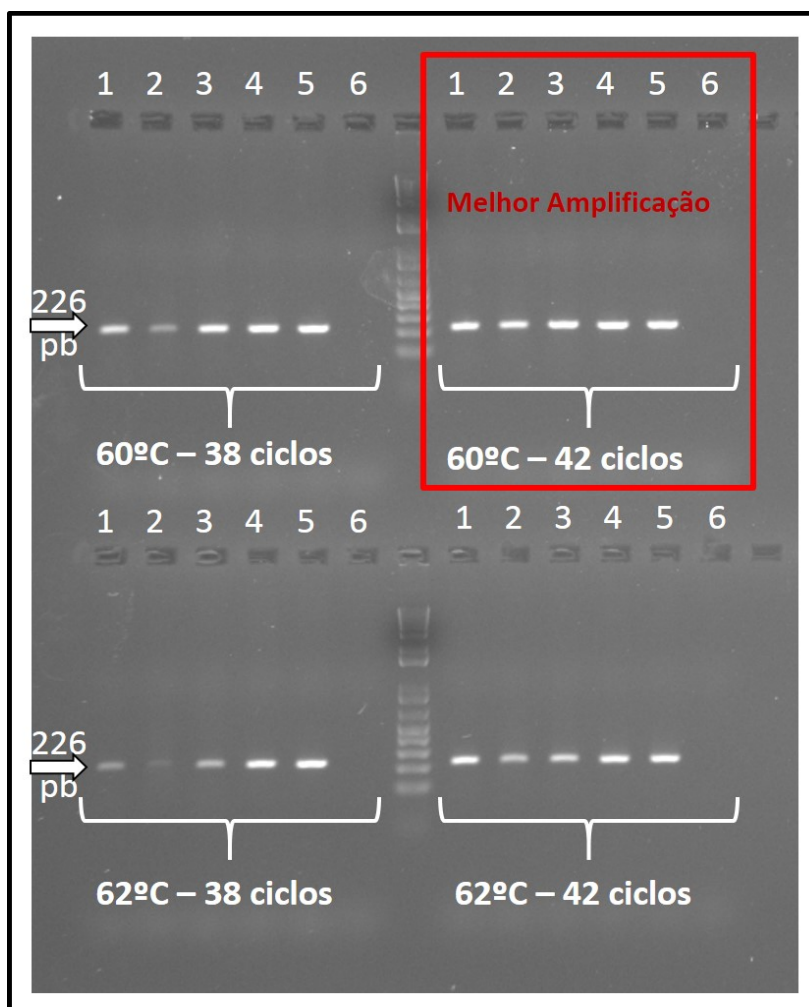


Figura 11 - Gel de agarose demonstrando quatro combinações entre diferentes temperaturas e número de ciclos e o resultado das amplificações.

Gel de agarose a 1%, com os produtos de PCR de 226 pb, obtidos por meio de diferentes combinações entre as variáveis testadas (temperaturas de anelamento de 60°C ou 62°, e amplificação de 38 ou 42 ciclos). Indicação de combinação que apresentou melhores bandas de amplificação (60°C de anelamento e 42 ciclos de amplificação). As amostras aplicadas no gel, representadas pelos números de 1 a 6 são: B161, B168, B169, Controle WT, Controle Widr e NTC, respectivamente. O marcador de peso molecular utilizado foi de 100 pb.

A combinação que apresentou melhores bandas de amplificação foi quando utilizada temperatura de anelamento de 60°C e 42 ciclos de amplificação.

Para observar se essa qualidade na reação de PCR também estaria presente na reação de pirosequenciamento e verificar se o problema de picos inespecíficos havia sido solucionado, as amostras foram pirosequenciadas e os resultados obtidos corroboram com os obtidos no gel. Na Figura 12 estão representados os resultados das 4 combinações, em uma mesma amostra, confirmando que o melhor resultado aparece quando se combina a temperatura de anelamento de 60°C e 42 ciclos de amplificação.

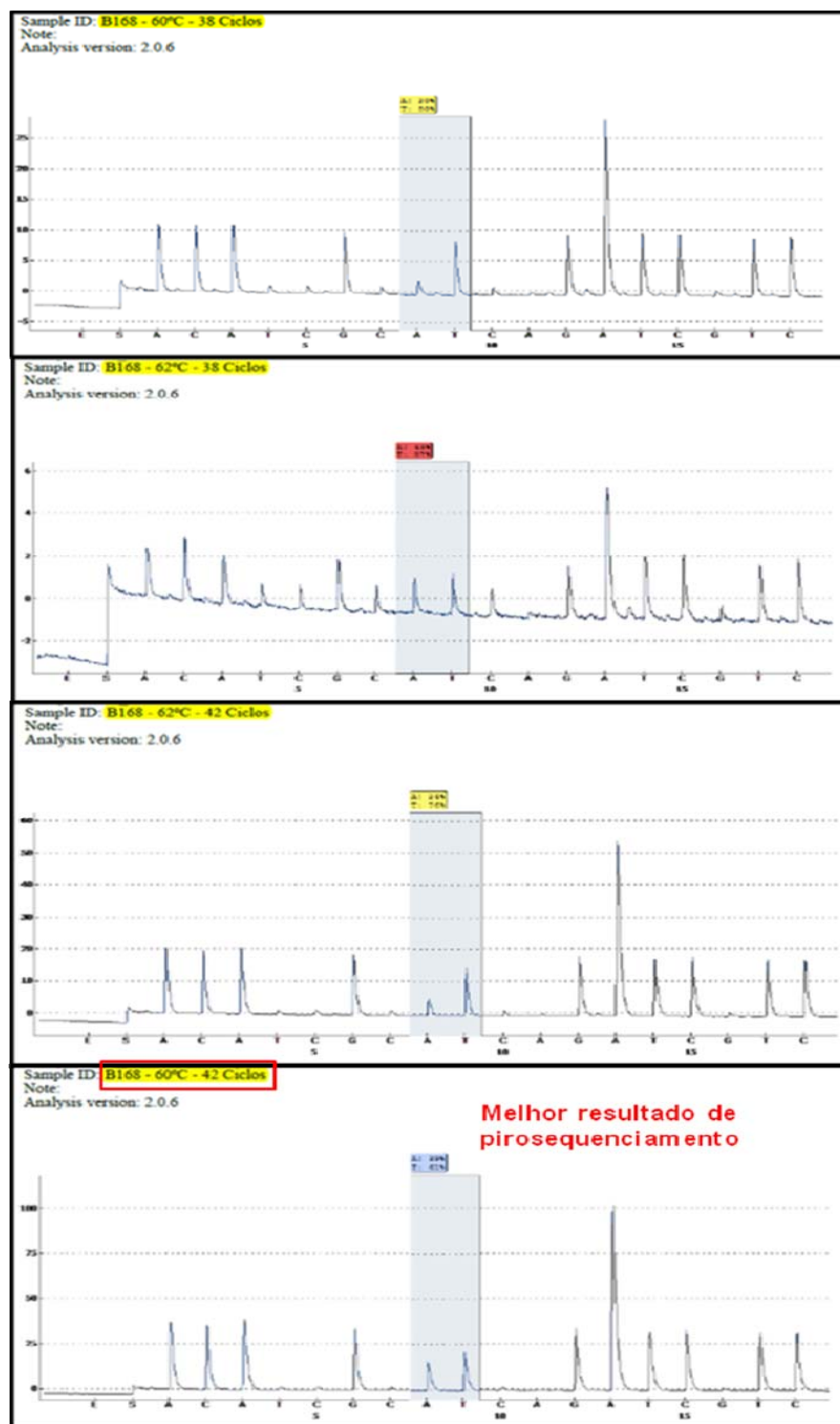


Figura 12 - Pirogramas demonstrando resultados distintos, de uma mesma amostra, para as diferentes combinações de condições de PCR testadas.

- A) Pirograma da amostra amplificada a 60°C de anelamento e 38 ciclos de amplificação;
- B) Pirograma da amostra amplificada a 60°C de anelamento e 42 ciclos de amplificação;
- C) Pirograma da amostra amplificada a 62°C de anelamento e 38 ciclos de amplificação;
- D) Pirograma da amostra amplificada a 62°C de anelamento e 42 ciclos de amplificação.

Com a análise dos pirogramas acima, é possível notar que a reação de pirosequenciamento que apresentou melhor qualidade em relação ao resultado reportado foi feita nas mesmas condições em que obtivemos melhor resultado na reação de PCR, indicado no gel de agarose. É importante observar também, que a mutação encontrada nesta reação (V600E), já era conhecida nesta amostra por análises anteriores e foi detectada com sucesso.

Portanto, as condições para amplificação por PCR foram validadas. Todas as amostras do estudo, foram realizadas com 12,5 μ L de *HotStarTaq Master Mix 2x*; 8,5 μ L de água livre de DNase e RNase; 1 μ L do mix de *primers* (0,5 μ L senso + 0,5 μ L antisenso), com quantidade de 0,50 pmoles; e 3 μ L do DNA de interesse, diluído em água, em uma quantidade de 80 a 120 ng.

A cilclagem padrão estabelecida foi: ativação da *HotStarTaq DNA polymerase* a 95°C por 15 minutos; amplificação da região de interesse composta por 42 ciclos de denaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 20 segundos; extensão final a 72°C por 5 minutos; e armazenamento a 4°C.

3.2.5 Interpretação dos Dados

Com o auxílio do software PyroMark 2.0.6, os pirogramas obtidos por meio da reação de pirosequenciamento foram analisados para verificação de ausência ou presença de mutações no códon 600 do gene *BRAF*, bem como a porcentagem da mutação, quando encontrada.

Os resultados obtidos foram tabulados em planilhas no programa Microsoft Excel, analisados e interpretados em conjunto entre a aluna e as orientadoras.

3.2.6 Considerações Éticas

Termo de consentimento livre e esclarecido: Não foi necessário o termo de consentimento informado, pois o estudo foi realizado a partir de casos selecionados obtidos dos arquivos de Anatomia Patológica, não envolvendo experimentação ou entrevista com os pacientes. Os pesquisadores garantiram o sigilo de todos os pacientes, não divulgando publicamente o nome ou qualquer outra informação que pudessem identificar os pacientes envolvidos neste estudo.

Este Estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-VEC em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente e registrado sob número 1783/13 em 13.06.2013 (Anexo 2). O Projeto foi também submetido na Plataforma Brasil e teve sua aprovação sob Parecer Número 302.980 em 13.06.2013 (Anexo 3).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Dos 58 casos eleitos a partir do estudo anteriormente citado, 40 (68,96%) eram provenientes de pacientes do sexo masculino e 18 (31,04%) representantes do sexo feminino.

A média de idade entre os avaliados foi de 55,5 anos, tendo o representante mais jovem 26 anos e o mais velho 80.

Em relação à localização do tumor primário, foram selecionadas amostras de diferentes regiões de origem, sendo 35 casos originados do cólon esquerdo (60,34%), 18 casos originados do reto (31,04%) e 5 casos do cólon direito (8,62%).

Entre os casos selecionados para compor essa casuística, 23 apresentaram somente a metástase hepática; 7 casos apresentaram metástase pulmonar apenas; 1 caso apresentou somente metástase linfonodal; 25 casos apresentaram tanto metástases hepáticas quanto linfonodais e 2 casos apresentaram metástases hepáticas, linfonodais e pulmonares concomitantemente, como esquematizado na Figura 13. Assim, um total de 145 amostras de DNA de diferentes regiões tumorais foram analisadas pela metodologia de pirosequenciamento.



Figura 13 - Representação da distribuição da casuística em relação aos sítios de metástases.

4.2 RESULTADOS OBTIDOS PELO PIROSEQUENCIAMENTO

Dos 58 casos analisados, apenas 2 (3,45%) apresentaram mutação no códon 600 do gene *BRAF*, c.1799T>A; p.(V600E), ambos de maneira homogênea, ou seja, detectada tanto no tumor primário quanto em suas respectivas metástases.

As reações que apresentaram resultado mutado, foram repetidas com o kit fabricado e comercializado pela Qiagen® (*BRAF* Pyro Kit) para confirmação dos resultados obtidos. Seleccionamos também mais 2 áreas distintas do tumor primário, para avaliação de presença ou ausência de heterogeneidade intratumoral.

Tanto as repetições quanto as novas áreas selecionadas confirmaram a presença da mutação V600E, conforme demonstrado nas Figuras 14 e 15.

Todos os resultados se apresentaram de forma homogênea entre o tumor primário e suas metástases, tanto em relação ao *status* mutacional

(selvagem ou mutado), quanto em relação ao tipo de mutação encontrada (V600E).

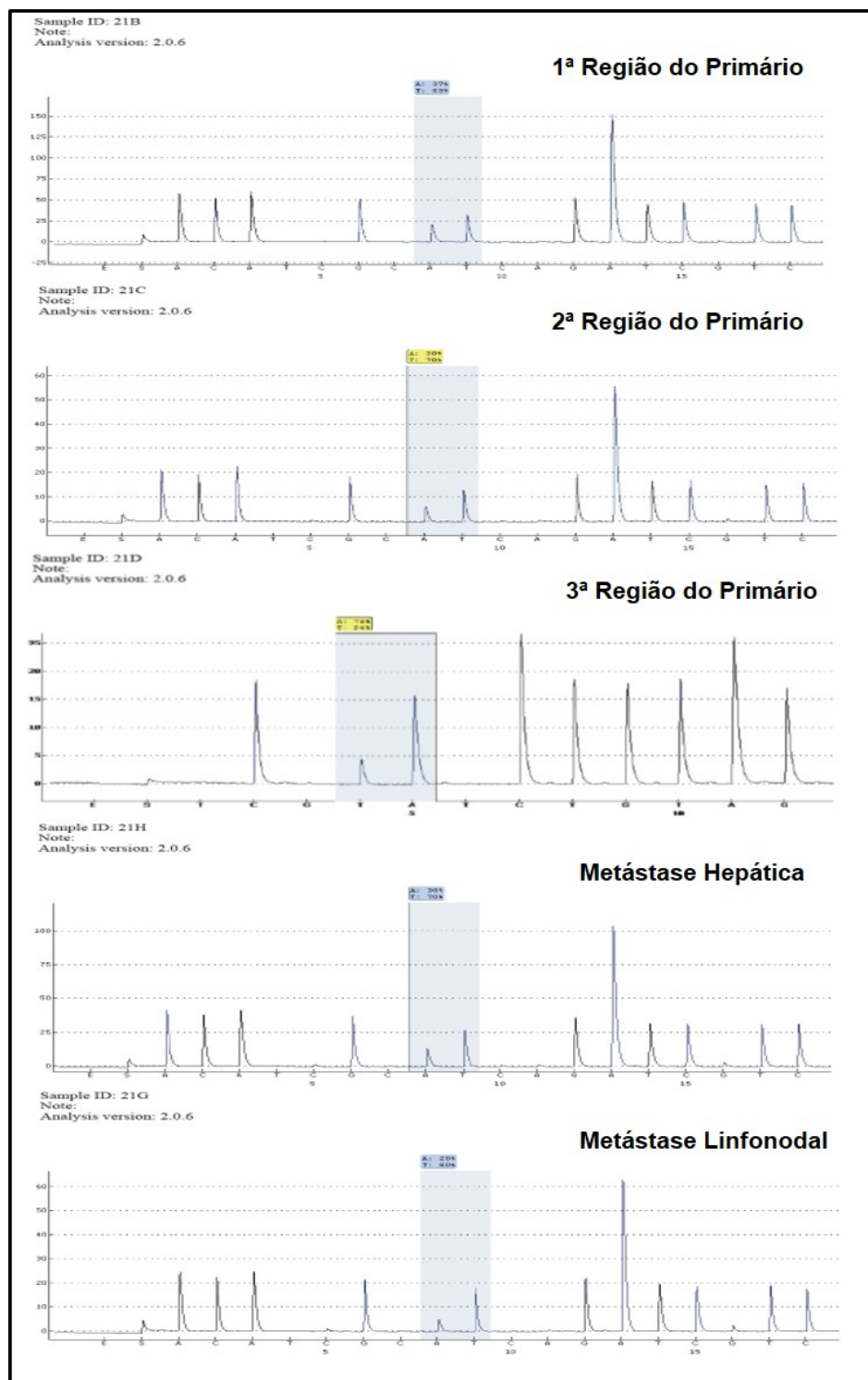


Figura 14 - Pirogramas das amostras tumorais do caso nomeado como 21.

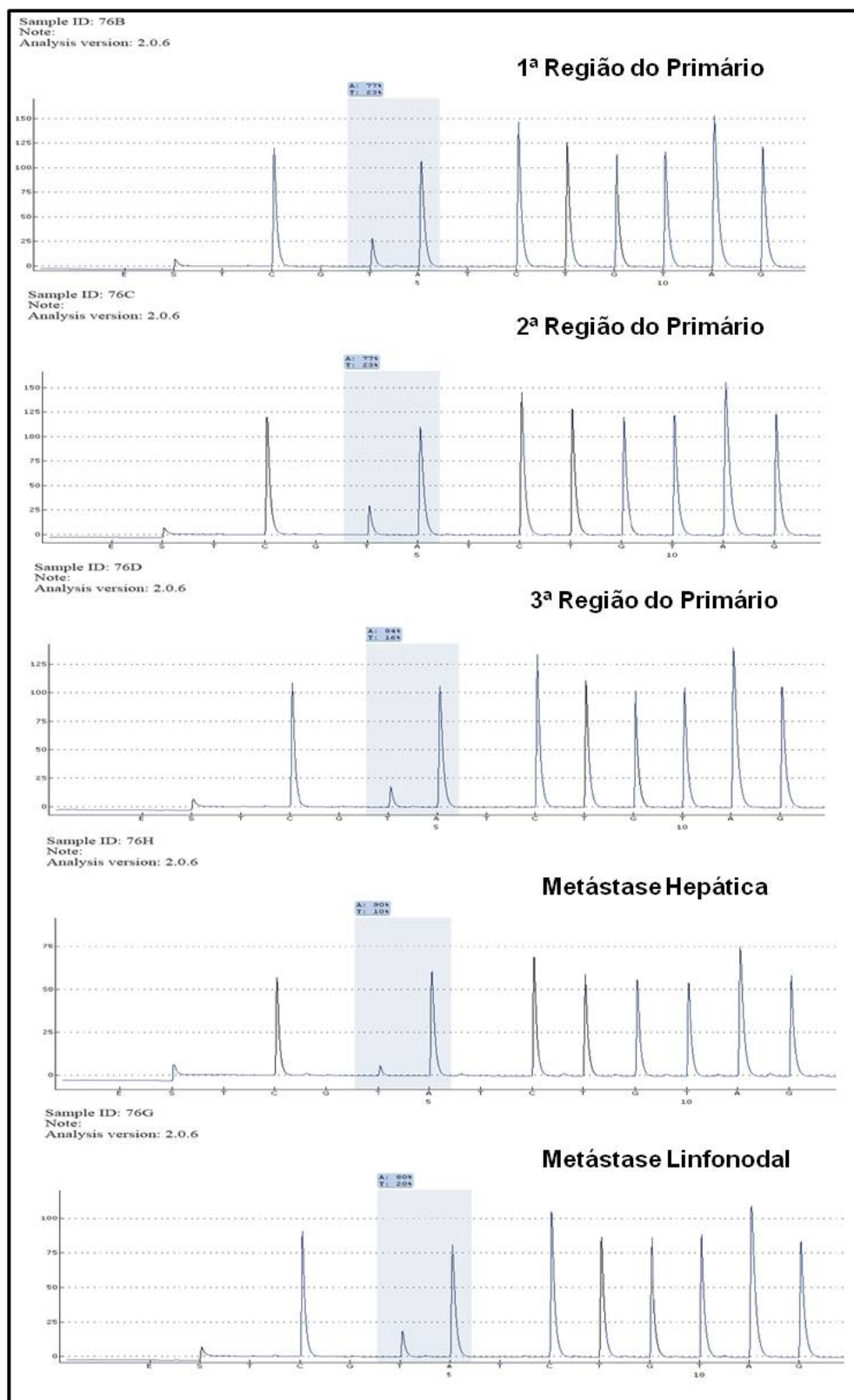


Figura 15 - Pirogramas das amostras tumorais do caso nomeado como 76.

4.3 CARACTERÍSTICAS DOS CASOS MUTADOS

É interessante notar que ambos os casos mutados para o códon 600 do gene *BRAF*, são representados por pacientes do sexo feminino, na sexta década de vida e com metástases linfonodais e hepáticas. As características de ambas as pacientes podem ser encontradas no Quadro 1 e as imagens de seus tumores primários na Figura 16.

Quadro 1 - Características gerais dos pacientes mutados e de seus tumores.

	CASO 21	CASO 76
SEXO	Feminino	Feminino
IDADE NO DIAGNÓSTICO	53 anos	58 anos
LOCAL DO TUMOR PRIMÁRIO	Reto	Cólon direito
pT PRIMÁRIO	3	3
LINFONODO POSITIVO	Sim (6/8)	Sim (4/14)
ÓRGÃO DE METÁSTASE	Fígado	Fígado

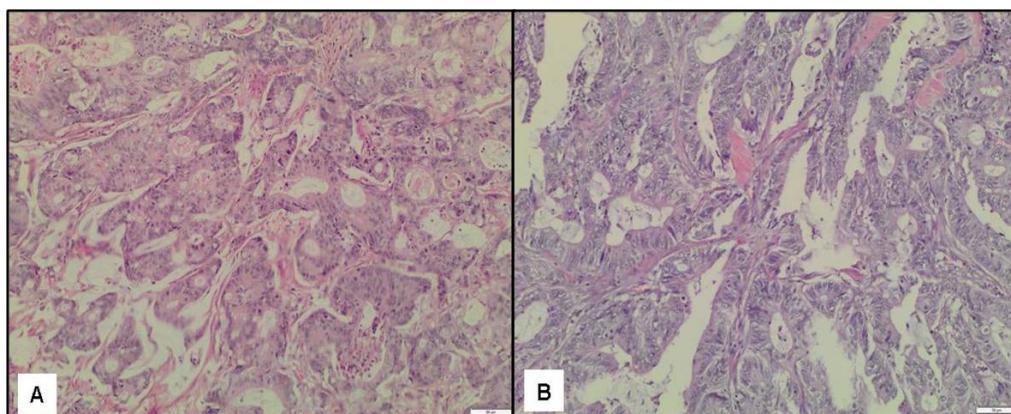


Figura 16 - Lâminas histológicas com coloração H&E, demonstrando adenocarcinomas moderadamente diferenciados. A) Tumor primário de reto referente ao caso 21; B) Tumor primário de cólon referente ao caso 76.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo retrospectivo foi formado por uma casuística de 58 pacientes com cânceres colorretais primários que continham uma ou mais metástases, com *status* mutacional sabidamente selvagem para os códons 12, 13 e 61 do gene *KRAS*.

Nesses 58 casos, a idade dos pacientes variou entre 26 a 80 anos, com uma média de 55,5 anos. Essa média na faixa etária mostrou-se bem parecida com o estudo de RUSSO et al. (2014) que analisou 222 pacientes, com tumores metastáticos de cólon ou reto, com uma média de idade de 56 anos.

Mais de 90% dos casos de câncer colorretal ocorrem em pessoas a partir de 50 anos (CALVERT e FRUCHT 2002; HAGGAR e BOUSHEY 2009), sendo que a idade avançada é um importante fator de risco, pois, a partir desta faixa etária, a incidência da doença pode aumentar exponencialmente (GUIMARÃES et al. 2012).

Analisando o grupo amostral em relação ao gênero, é possível notar que a maioria dos casos (68,96%, referente a 40 pacientes) era do sexo masculino, enquanto a minoria (31,04%, referente a 18 pacientes) do sexo feminino. Embora o INCA estime para 2016 uma porcentagem muito aproximada de novos casos de CCR para homens e mulheres - 48,6% e 51,4%, respectivamente - (Ministério da Saúde 2016), o estudo de TORRE et al. (2015), feito com base no projeto GLOBOCAN 2012, mostra que as

taxas de incidência desta neoplasia são maiores em homens do que em mulheres na maioria das partes do mundo (IARC 2012). Especificamente na América do Sul, o sexo masculino aparece em maior prevalência, assim como em 90% das 20 áreas por eles estudadas. Esse dado está de acordo com o estudo de RUSSO et al. (2014), em que 58% dos 222 pacientes testados eram homens.

No presente estudo, o sexo feminino representou pouco menos de 1/3 dos casos avaliados para a mutação no códon 600 do gene *BRAF*, ainda assim, os dois casos em que foram encontradas as mutações pertenciam a mulheres. Diversos estudos identificaram algumas características clínicas fortemente associadas à presença dessa alteração genética nos tumores de CCR, uma delas é o paciente pertencer ao sexo feminino (SCHIRRIPA et al. 2015; SORBYE et al. 2015).

Dos 1941 casos de CCR metastáticos avaliados por YAEGER et al. (2014), 92 apresentaram mutações no gene *BRAF* (5%), sendo que 59% dos pacientes alterados eram mulheres. Anteriormente, o estudo de TRAN et al. (2011) avaliou 524 pacientes e afirmou que 76% casos mutados, pertenciam ao gênero feminino.

Outra característica clínica bastante citada como associada à presença de mutação do gene *BRAF* em CCR é a localização do tumor primário, sendo os casos originados no cólon direito, os que apresentam maior incidência da mutação (SCHIRRIPA et al. 2015; SORBYE et al. 2015).

TIE et al. (2011) concluíram que 22% (41/147) dos seus pacientes com tumor primário originado em cólon direito encontravam-se mutados pra

BRAF V600E, enquanto somente 4% (7/153) dos originados no cólon esquerdo e 2% (4/173) dos iniciados no reto, demonstraram a mutação. O estudo de SCHIRRIPA et al. (2015) analisou tumores de 786 pacientes, encontrando mutação em *BRAF* em 72 deles (9%), e também concluíram que os tumores mutados eram mais frequentemente oriundos do cólon direito, uma vez que encontraram 64% no cólon direito, 13% no cólon esquerdo, 23% no reto, sendo que neste último (reto) a frequência foi maior do que a relatada em outros estudos (SARIDAKI et al. 2013; SCHIRRIPA et al. 2015).

Finalmente, a terceira característica clínica associada a essas mutações é a idade elevada dos pacientes (SCHIRRIPA et al. 2015; SORBYE et al. 2015). RUSSO et al. (2014), constataram que as mutações ocorreram em mais frequência no grupo de pacientes com idade maior ou igual a 56 anos (13,3%), quando comparados com pacientes abaixo dessa faixa etária (4,6%).

Já TIE et al. (2011) dividiram seus pacientes em dois grupos, considerando a faixa etária. Pacientes com idade acima de 80 anos apresentaram taxa de mutação de 17% (16/96), enquanto no grupo com idade inferior a 80 anos, somente 8% (36/429) dos testes eram mutados. O grupo chegou a sugerir que a proporção de pacientes com a mutação *BRAF* V600E poderia ser enriquecida, passando de 10% no total de pacientes (52 mutados em 525 testados), para 37% (19 mutados em 52 dos agrupados), quando consideradas somente mulheres, com idade superior a 70 anos com tumores primários originados no cólon direito. Ao contrário, mutações no

códon 600 do gene *BRAF* não foi encontrado no agrupamento com um total de 80 homens com tumores primários de cólon esquerdo ou reto, com idade inferior a 70 anos.

Dos 58 casos analisados, apenas 2 (3,45%) apresentaram mutação no códon 600 do gene *BRAF*. Esta porcentagem está abaixo da descrita na literatura, que diz que aproximadamente 5 a 15% dos tumores colorretais apresentam-se mutados para o gene *BRAF* (PALOMBA et al. 2012; THIEL e RISTIMÄKI 2013). SARIDAKI et al. (2013) encontraram 41 (8,2%) casos mutados em um total de 504 analisados. TIE et al. (2011), detectaram a mutação em 52 (10%) de 525 pacientes com CCR. YAEGER et al. (2014) identificaram 92 (5%), pacientes mutados no gene *BRAF* em um total de 1941 estudados.

Essa baixa frequência de pacientes portadores de mutação no códon 600 do gene *BRAF* neste trabalho, pode estar ligada ao grupo amostral estudado.

Conforme citado, a grande maioria dos casos com a mutação pertence ao sexo feminino, porém, somente 31,04% da amostra estudada pertencem a esse gênero.

Em relação à localização do tumor primário, a maioria dos casos foi originada no cólon esquerdo (60,34%, referente a 35 casos); 18 casos foram originados do reto (31,04%) e somente 5 casos (8,62%) foram iniciados no cólon direito. Esse pode ser outro fator que levou à baixa frequência de alteração encontrada, pois, dos 5 casos com lesões precursoras no cólon direito, 1 apresentou a mutação (20%).

A respeito da idade, as duas pacientes que apresentaram a mutação rastreada, não se encaixam nos valores de idade mais avançada, segundo os critérios dos trabalhos citados.

Vale observar que dos outros 4 casos restantes de pacientes com lesão precursoras em cólon direito, 1 pertence ao sexo masculino e as idades das outras 3 mulheres são 59, 67 e 72 anos.

Mesmo sendo rara a presença da mutação em tumores originados no reto, nenhum trabalho afirma sua inexistência, mas afirmam aparecer em frequência mais baixa que os demais.

Essas evidências demonstram que, muito provavelmente, a taxa de detecção de mutação encontrada foi mais baixa do que a observada na literatura devido às características do grupo testado e não pela metodologia de sequenciamento escolhida.

A técnica de sequenciamento utilizada para obtenção do *status* mutacional do códon 600 do gene *BRAF* foi o pirosequenciamento.

Por muitos anos o sequenciamento de Sanger foi considerado método de referência para mutações adquiridas em tumores. Porém, devido à baixa sensibilidade desta metodologia, a detecção de mutações em materiais tumorais requer uma alta porcentagem de células neoplásicas na amostra, o que nem sempre é possível na rotina diagnóstica de amostras humanas (COLOMBA et al. 2013).

Quando comparadas as técnicas de sequenciamento de Sanger e de pirosequenciamento, a segunda apresenta mais vantagens que desvantagens. Primeiramente é um método mais sensível. O método de

Sanger precisa de, pelo menos, 20% de células tumorais para reportar um resultado confiável, enquanto o pirosequenciamento necessita de somente 5%. Outras vantagens importantes são rapidez e facilidade da técnica de pirosequenciamento, que é menos laboriosa em relação ao Sanger; seu custo inferior ao sequenciamento tradicional; e o fato de ser uma técnica quantitativa. Como desvantagens é possível destacar a incapacidade de detectar mutações complexas e o fato de analisar somente uma sequência curta de nucleotídeos (SHEN e QIN 2012; VERMA et al. 2012).

COLOMBA et al. (2013) compararam quatro diferentes técnicas para sequenciamento da mutação pontual no códon 600 do gene *BRAF*, sendo elas: sequenciamento de Sanger, PCR em tempo real, imunohistoquímica e pirosequenciamento. O grupo concluiu que o pirosequenciamento foi o único método, entre os quatro, com 100% de sensibilidade e especificidade para detecção de alterações nesse ponto do gene, pois identificou com sucesso todos os casos mutados, incluindo aqueles com baixa proporção de alelos alterados e com mutações mais raras.

A sensibilidade analítica do pirosequenciamento é de 5%. Por ser um método sensível e quantitativo, apresenta um resultado de fácil análise, o que não gera ambiguidade nos resultados, eliminando a possibilidade de resultados falso-positivos ou negativos (YEO et al. 2011).

A técnica de pirosequenciamento, aliada à técnica de LCM, nos permitiu analisar as amostras com menos de 30% de tumor (com no mínimo 10%) pelo fato do LCM ser uma técnica que permite o enriquecimento da

amostra. Se não houvesse a disponibilidade dessa técnica, as amostras com menos de 30% de células tumorais precisariam ser excluídas do estudo.

Os resultados do pirosequenciamento revelaram a mutação c.1799T>A; p.(V600E), nos dois casos que se apresentaram alterados. Essa substituição com perda de sentido é a mutação oncogênica mais comum e representa mais de 95% das mutações encontradas no gene *BRAF*, em CCR. Mutações em outros códons do gene *BRAF* são extremamente raras, somando menos de 5% de todas as mutações nesse gene (SARIDAKI et al. 2013; SORBYE et al. 2015).

Os casos que apresentaram mutação foram testados também em mais 2 áreas distintas do tumor primário, para avaliação de presença ou ausência de heterogeneidade intratumoral. Todos os resultados se apresentaram de forma homogênea entre o tumor primário e suas metástases, tanto em relação ao *status* mutacional (selvagem ou mutado), quanto em relação ao tipo de mutação encontrada (*BRAF* V600E).

Embora o número de casos mutados encontrados tenha sido pequeno, a homogeneidade intra e intertumoral relacionada a mutações em *BRAF* nos tumores colorretais, parece corroborar com os dados recentes da literatura.

BALDUS et al. (2010) estudaram 100 amostras de CCR e não observou heterogeneidade entre o tumor primário e suas metástases a distância para o gene *BRAF*.

Em outro estudo, BRANNON et al. (2014), sequenciaram 69 tumores colorretais primários e suas metástases pela técnica de *Next-Generation*

Sequencing (NGS) com alta cobertura e profundidade e encontrou 100% de concordância nos genes *KRAS*, *NRAS* e *BRAF*.

Um grande levantamento feito por (MAO et al. 2015), demonstrou que dados atuais sobre a concordância do *status* mutacional de *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* entre os tumores primários e metastáticos em CCR são conflitantes. Eles conduziram uma revisão sistemática e uma meta análise de 44 artigos para examinar a concordância e a discordância do *status* mutacional entre o tumor primário e a metástase correspondente de pacientes com CCR. Os resultados referentes aos genes *KRAS* e *PIK3CA* apresentaram inconsistências, que foi por eles entendido como provável reflexo da diferença entre métodos, tamanho da amostra e técnicas utilizadas. A taxa de concordância agrupada foi de 96,8% para o gene *BRAF*.

No estudo de VAKIANI et al. (2012), foi sugerido que na maioria dos cenários clínicos, a análise do tumor colorretal primário é suficiente para determinar o *status* mutacional dos genes *RAS*, *BRAF*, *PIK3CA* e *TP53*. Entretanto, em pacientes com uma história de mais de um tumor colorretal primário, uma biópsia do sítio metastático deve ser considerada e a decisão do tratamento deve ser feita com base na caracterização mutacional do resultado obtido.

Um estudo publicado por nosso grupo, analisou 8 casos de tumores primários de CCR sincrônicos e encontrou resultados diferentes, entre duas regiões analisadas, em 6 deles (75%). As diferenças encontradas foram entre o *status* mutacional ou o tipo de mutação. Cinco casos apresentaram mutação do gene *KRAS* em um dos tumores e *status* selvagem no outro,

enquanto um caso apresentou duas mutações distintas neste gene (MACEDO et al. 2015), confirmando que em casos de tumores sincrônicos de CCR, é necessário realizar o teste de mutação em nova biópsia da metástase.

6 CONCLUSÕES

- a) A mutação do gene *BRAF* foi encontrada em apenas 2 casos (3,4%) dentre 58 carcinomas colorretais e suas metástases sabidamente selvagens para os códons 12, 13 e 61 do gene *KRAS*.
- b) O *status* mutacional do códon 600 do gene *BRAF* se mostrou concordante entre o tumor primário e metástase dos dois casos estudados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. **Clin Chimica Acta** 2006; 363:83-94.

Allegra CJ, Rumble RB, Hamilton SR, et al. Extended RAS gene mutation testing in metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy: American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion update 2015. **J Clin Oncol** 2016; 34:179-87.

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

Armougom F, Raoult D. Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. **J Computer Sci Syst Biol** 2009; 2:74-92.

Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, et al. Prevalence and heterogeneity of *KRAS*, *BRAF*, and *PIK3CA* mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. **Clin Cancer Res** 2010; 16:790-9.

Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:1254-61.

Barranha R, Costa JL, Carneiro F, et al. Genetic heterogeneity in colorectal cancer. **Acta Med Port** 2015; 28:370-5.

Bosman FT. Colorectal cancer. In: Stewart BW, Wild CP, editors. **World Cancer Report 2014**. Lyon: IARC Press; 2014. p.393-402.

Brannon AR, 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.

Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. **Ann Intern Med** 2002; 137:603-12.

Cantwell-Dorris ER, O'Leary JJ, Sheils OM. BRAFV600E: Implications for carcinogenesis and molecular therapy. **Mol Cancer Ther** 2011; 10:385-94.

Chen J, Huang XF, Katsifis A. Activation of signal pathways and the resistance to anti-EGFR treatment in colorectal cancer. **J Cell Biochem** 2010; 111:1082-6.

Clariant A GE Healthcare company. **The importance of KRAS and BRAF testing in colorectal cancer.** Available from: <URL:<http://www.clariantinc.com/clariant-home/kras-and-braf.aspx>> [2013 jan 27].

Colomba E, Hélias-Rodzewicz Z, Von Deimling A, et al. Detection of BRAF p.V600E mutations in melanomas: comparison of four methods argues for sequential use of immunohistochemistry and pyrosequencing. **J Mol Diagn** 2013; 15:94-100.

Dadras SS. Molecular diagnostics in melanoma: current status and perspectives. **Arch Pathol Lab Med** 2011; 135:860-9.

Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature** 2002; 417:949-54.

Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2008; 26:5705-12.

Dominguez MV, Bastos EP, Santos EMM, et al. Two new MLH1 germline mutations in Brazilian lynch syndrome families. **Int J Colorectal Dis** 2008; 23:1263-4.

England RA, Pettersson M. Pyro Q-CpG (TM): quantitative analysis of methylation in multiple CpG sites by Pyrosequencing (R) [serial on line] **Nat Methods** 2005; 2. Available from: <URL:<http://www.nature.com/nmeth/journal/v2/n10/pdf/nmeth800.pdf>> [2015 dez 12]

Espina V, Wulfkühle JD, Calvert VS, et al. Laser-capture microdissection. **Nat Protoc** 2006; 1:586-603.

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, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell** 1990; 61:759-67.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer** 2015; 136:E359-86.

Fisher R, Pusztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. **Br J Cancer** 2013; 108:479-85.

Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. **Cancer Cell** 2004; 6:313-9.

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

Guimarães RM, Muzi CD, Boccolini CS, et al. Tendência da mortalidade por câncer de cólon e reto no Brasil segundo sexo, 1980-2009. **Cad Saúde Colet** 2012; 20:121-7.

HTG Molecular. Available from: <URL:<http://www.htgmolecular.com/chemistry/sample-prep>> [2016 mar 6].

Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. **Clin Colon Rectal Surg** 2009; 22:191-7.

Houben R, Becker JC, Kappel A, et al. Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis. **J Carcinog** 2004; 3:6.

[IARC] International Agency for Research on Cancer. **GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012**. Available from: <URL:<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>> [2015 out 12]

Irahara N, Baba Y, Nosho K, et al. NRAS mutations are rare in colorectal cancer. **Diagn Mol Pathol** 2010; 9:157-63.

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

Jorge AA, Malaquias AC, Arnhold IJP, et al. Noonan syndrome and related disorders: a review of clinical features and mutations in genes of the RAS/MAPK pathway. **Horm Res** 2009; 71:185-93.

Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, et al. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. **Exp Cell Res** 2003; 284:31-53.

Kedrin D, Gala MK. Genetics of the serrated pathway to colorectal cancer. **Clin Transl Gastroenterol** 2015; 6:e84.

Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. **J Clin Oncol** 2009; 27:5924-30.

Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele JC. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. **Br J Surg** 2002; 89:845-60.

Linnekamp JF, Wang X, Medema JP, et al. Colorectal cancer heterogeneity and targeted therapy: a case for molecular disease subtypes. **Cancer Res** 2015; 75:245-9.

Macedo MP, Melo FM, Ribeiro JS, et al. RAS mutations vary between lesions in synchronous primary colorectal cancer: testing only one lesion is not sufficient to guide anti-EGFR treatment decisions. **Oncoscience** 2015; 2:125-30.

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].

Mao C, Wu XY, Yang ZY, et al. Concordant analysis of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, and PTEN expression between primary colorectal cancer and matched metastases. **Sci Rep** 2015; 5:8065.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa/2014 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2013.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa/2016 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2016.

Mostert B, Jiang Y, Sieuwerts AM, et al. KRAS and BRAF mutation status in circulating colorectal tumor cells and their correlation with primary and metastatic tumor tissue. **Int J Cancer** 2013; 133:130-41.

Normanno N, Rachiglio AM, Lambiase M, et al. Heterogeneity of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in metastatic colorectal cancer and potential effects on therapy in the CAPRI GOIM trial. **Ann Oncol** 2015; 26:1710-4.

Palomba G, Colombino M, Contu A, et al. Prevalence of KRAS, BRAF, and PIK3CA somatic mutations in patients with colorectal carcinoma may vary in the same population: clues from Sardinia. **J Transl Med** 2012; 10:178.

Patai AV, Molnár B, Tulassay Z, et al. Serrated pathway: alternative route to colorectal cancer. **World J Gastroenterol** 2013; 19:607-15.

Phipps A, 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.

Pinho M, Rossi BM. Conceitos atuais sobre a carcinogênese colorretal. **Rev Bras Coloproct** 1999; 19:57-60.

Rebersek M, Boc M, Cerkovnik P, et al. Efficacy of first-line systemic treatment in correlation with BRAF V600E and different KRAS mutations in metastatic colorectal cancer - a single institution retrospective analysis. **Radiol Oncol** 2011; 45:285-91.

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.

Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. **Genome Res** 2001; 11:3-11.

Russo AL, Borger DR, Szymonifka J, et al. Mutational analysis and clinical correlation of metastatic colorectal cancer. **Cancer** 2014; 120:1482-90.

Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. **Genes Dev** 2007; 21:2525-38.

Ruzzo A, Graziano F, Canestrari E, et al. Molecular predictors of efficacy to anti-EGFR agents in colorectal cancer patients. **Curr Cancer Drug Targets** 2010; 10:68-79.

Saridaki Z, Tzardi M, Sfakianaki M, et al. BRAFV600E mutation analysis in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) in daily clinical practice:

correlations with clinical characteristics, and its impact on patients' outcome. **Plos One** 2013; 8:1-7.

Schirripa M, Cremolini C, Loupakis F, et al. Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer. **Int J Cancer** 2015; 136:83-90.

Schubbert S, Shannoon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. **Nat Rev Cancer** 2007; 7:295-308.

Sclafani F, Gullo G, Sheahan K, et al. BRAF mutations in melanoma and colorectal cancer: a single oncogenic mutation with different tumour phenotypes and clinical implications. **Crit Rev Oncol Hematol** 2013; 87:55-68.

Sharma SG, Gulley ML. BRAF mutation testing in colorectal cancer. **Arch Pathol Lab Med** 2010; 134:1225-8.

Shen S, Qin D Pyrosequencing data analysis software: a useful tool for EGFR, KRAS, and BRAF mutation analysis. **Diagno Pathol** 2012; 7:56.

Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor – targeted therapy in metastatic colorectal cancer. **J Natl Cancer Inst** 2009; 101:1308-24.

Silva FC, Ferreira JRO, Torrezan GT, et al. Clinical and molecular characterization of Brazilian patients suspected to have lynch syndrome. **PLoS One** 2015; 10:e0139753.

Snover DC. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. **Hum Pathol** 2011; 42:1-10.

Sorbye H, Dragomir A, Sundström M, et al. High BRAF mutation frequency and marked survival differences in subgroups according to KRAS/BRAF mutation status and tumor tissue availability in a prospective population-based metastatic colorectal cancer Cohort. **Plos One** 2015; 10:1-16.

Souza ALF, Brusamarello LCC. Sequenciamento de DNA: Decifrando o manual de instruções dos seres vivos. **Genética Escola Soc Bras Genét** Ribeirão Preto 2009; 4:45-52.

Spano JP, Fagard R, Soria JC, et al. Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. **Ann Oncol** 2005; 16:189-94.

Stintzing S, Heinemann V, Moosmann N, et al. The treatment of colorectal carcinoma with monoclonal antibodies: the importance of KRAS mutation analysis and EGFR status. **Dtsch Arztebl Int** 2009; 106:202-6.

Szylberg A, Janiczek M, Popiel A, et al. Serrated polyps and their alternative pathway to the colorectal cancer: a systematic review. **Gastroenterology Res Pract** 2015; 2015:573814.

Thiel A, Ristimäki A. Toward a molecular classification of colorectal cancer: the role of BRAF. **Front Oncol** 2013; 3:1-7.

Tie J, Gibbs P, Lipton L, et al. Optimizing targeted therapeutic development: analysis of a colorectal cancer patient population with the BRAFV600E mutation. **Int J Cancer** 2011; 128:2075-84.

Toribara NW, Marvin H, Sleisenger MH. Screening for colorectal cancer. **N Engl J Med** 1995; 332:861-7.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin** 2015; 65:87-108.

Torrezan GT, Silva FCC, Santos EMM, et al. Mutational spectrum of the APC and MUTYH genes and genotype–phenotype correlations in Brazilian FAP, AFAP, and MAP patients. **Orphanet J Rare Dis** 2013; 8:54.

Tran B, Kopetz S, Tie J, et al. Impact of BRAF Mutation and Microsatellite Instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. **Cancer** 2011; 117:4623-32.

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, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D, ESMO Guidelines Working Group. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol** 2014; 25 Suppl 3:iii1-9.

Van Krieken JHJM, 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.

Verma S, Greaves WO, Ravandi F, et al. Rapid detection and quantitation of BRAF mutations in hairy cell leukemia using a sensitive pyrosequencing assay. **Am J Clin Pathol** 2012; 138:153-6.

Wickham R, Lassere Y. The ABCs of colorectal cancer. **Semin Oncol Nurs** 2007; 23:1-8.

Yaeger R, Cercek A, Chou JF, et al. BRAF mutation predicts for poor outcomes after metastasectomy in patients with metastatic colorectal cancer. **Cancer** 2014; 120:2316–24.

Yancovitz M, Litterman A, Yoon J, et al. Intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF(V600E) mutations in primary and metastatic melanoma. **PLoS One** 2012; 7:e29336.

Yeo MK, Liang ZL, Oht T, et al. Pyrosequencing cut-off value identifying BRAF^{V600E} mutation in fine needle aspiration samples of thyroid nodules. **Clin Endocrinol** 2011; 75:555–60.

Anexo 1 – Protocolo de desparafinação e coloração para LCM

- 1 Xilol – 2 minutos;
- 2 Xilol – 2 minutos;
- 3 Etanol 100% - 2 minutos;
- 4 Etanol 95% - 1 minuto;
- 5 Etanol 75% - 30 segundos;
- 6 Água deionizada autoclavada - 30 segundos;
- 7 Hematoxilina – 1 minuto;
- 8 *Blue Reagent* (~1mL de Amoníaco em Solução 25% P.A. diluído em água deionizada autoclavada) – 30 segundos;
- 9 Eosina - 30 segundos;
- 10 Etanol 75% - 30 segundos;
- 11 Etanol 95% - 30 segundos;
- 12 Etanol 100% - 1 minuto;
- 13 Xilol - 5 minutos;
- 14 Secar a temperatura ambiente - 5 minutos.

Anexo 2 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 13 de Junho de 2013.

**A
Dra. Isabela Werneck da Cunha.**

Aluna: Fernanda Machado de Melo (Mestrado).

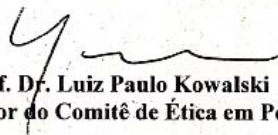
**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1783/13
“Análise da heterogeneidade do status mutacional do gene *BRAF* em carcinomas
colorretais primários e metastáticos”.**

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 21/05/2013, **aprovaram** a realização do projeto do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

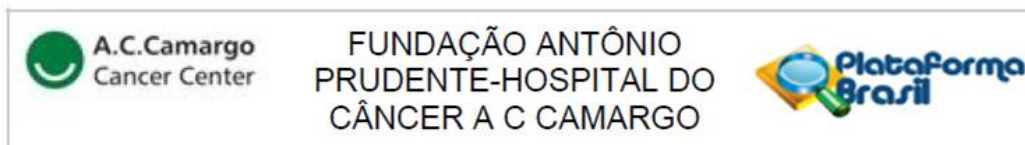
- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica do AC Camargo Cancer Center;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica do AC Camargo Cancer Center;
- Cronograma do Estudo;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

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

Atenciosamente,


**Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

Anexo 3 - Parecer Relatório de Acompanhamento CEP/ Plataforma Brasil



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA HETEROGENEIDADE DO STATUS MUTACIONAL DO GENE BRAF EM CARCINOMAS COLORRETAIS PRIMÁRIOS E METASTÁTICOS

Pesquisador: Isabela Werneck da Cunha

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 16684713.1.0000.5432

Instituição Proponente: Fundação Antônio Prudente-Hospital do Câncer-A C Camargo

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo ((FAPESP))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 302.980

Data da Relatoria: 21/05/2013

Apresentação do Projeto:

O Câncer Colorretal é a terceira neoplasia maligna mais comum. Segundo o INCA, estimam-se 940 mil novos casos por ano. O EGFR (Receptor do Fator Epidermal do Crescimento) é uma proteína transmembrana, responsável por processos como proliferação, migração, invasão, angiogênese e apoptose. Em pacientes com CCR metastático, há a possibilidade de tratamento com anticorpos monoclonais que inibem o EGFR e, consequentemente minimizam o crescimento tumoral. Pacientes com mutação no gene KRAS ou BRAF, não apresentam benefício algum com este tratamento. Tal resistência deve-se ao ganho de função da proteína modificada, decorrente de mutações nestes genes, que levam a uma ativação da via proliferativa independente da sinalização pela proteína EGFR. As mutações do gene KRAS são encontradas em aproximadamente 30 a 40% dos pacientes com CCR, sendo, portanto, avaliado rotineiramente nestes tumores, no intuito de se excluir candidatos ao tratamento com anti-EGFR. Dentre aqueles pacientes sem a mutação no gene KRAS, somente cerca de 40-60%, respondem a esta terapia. Tal fato se deve, entre outras causas, a mutação do gene BRAF, que está presente em aproximadamente 15% destes casos, sendo a mais frequente a mutação V600E. A hipótese do trabalho baseia-se em estudar se existe uma heterogeneidade tumoral em carcinomas colorretais em relação à mutação do gene BRAF e avaliar se um teste de mutação no gene BRAF em sítio primário tem validade para ser aplicado

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br

Continuação do Parecer: 302.980

também em sítio metastático.

Objetivo da Pesquisa:

- Avaliar a frequência de mutação do gene BRAF em Carcinomas Colorretais, sabidamente selvagens para o gene KRAS;
- Verificar se existe heterogeneidade quanto à presença ou ausência da mutação de BRAF entre neoplasias primárias e metastáticas de Carcinomas Colorretais;
- Estabelecer qual o melhor sítio (primário ou metastático) para realização do teste de detecção da mutação do BRAF, além de capacitar melhor a compreensão do comportamento celular em casos de metástase.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos, pois a inclusão de membros será de forma retrospectiva e as amostras já estão no banco de tumores.

O benefício do projeto diz respeito a validar melhor qual o melhor sítio (primário ou metastático) para realização do teste de detecção da mutação do BRAF, além de capacitar melhor a compreensão do comportamento celular em casos de metástase.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto envolve a avaliação de amostras previamente testadas em outro estudando, considerando novas descobertas envolvendo mutações nesses tipos tumorais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo com a Resolução CNS 196/96 e complementares. Foram apresentadas cartas de ciência dos departamentos envolvidos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências do ponto de vista ético para a realização desta pesquisa. Projeto considerado aprovado por este Comitê de Ética.

Situação do Parecer:

Aprovado

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