



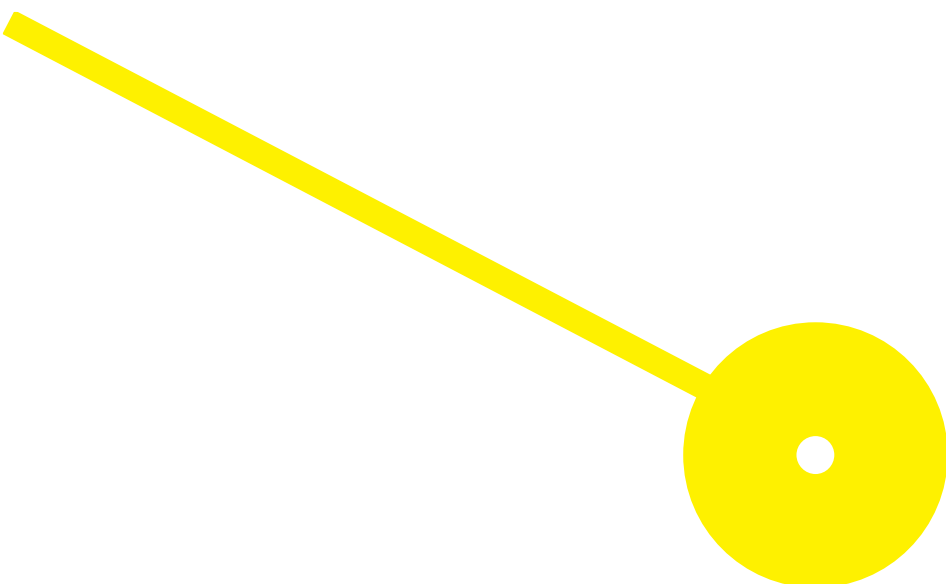
MESTRADO

Técnicas Laboratoriais em Biopatologia – Patologia Molecular

# Concordância mutacional em casos de Cancro Colorretal Síncronos

Solange dos Santos Semião

09/2023





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**

## **Concordância mutacional em casos de Cancro Colorretal Síncronos**

### **Autor**

Solange dos Santos Semião

### **Orientadores**

Professor Doutor Rui Caetano Oliveira, CEDAP

Professora Doutora Sara da Costa Granja, Escola Superior de Saúde do Instituto  
Politécnico do Porto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Técnicas Laboratoriais em Biopatologia** – Ramo/Área de Especialização em **Patologia Molecular** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

## **Agradecimentos**

Sem a colaboração e disponibilidade de diversas pessoas, a realização deste trabalho não seria possível.

Para começar um agradecimento especial a todo o corpo docente deste mestrado que ao longo destes dois anos, sempre esteve presente e disponível para nos ajudar. À Professora Regina, como Coordenadora, um agradecimento especial.

Ainda mais especial à Professora Sara, como coorientadora deste projeto, pelo apoio e pela compreensão.

A todos os colegas com quem partilhei este caminho. Em especial às colegas e amigas de Coimbra, que em conjunto conseguimos chegar a esta fase. À Ana, pela tranquilidade que tentava partilhar, à Marta que sempre nos orientou e sempre teve disponível para ajudar em tudo e a qualquer hora, nem que fosse para dar o ombro para nos lamentarmos.

À Ângela, a minha “parceira”, de vida académica e de laboratório, sem ela, sem o seu apoio, teria sido muito mais complicado.

Ao Doutor Rui Caetano, como orientador deste trabalho, mas principalmente como amigo que o CHUC me deu. Um agradecimento mais que especial, por todo o apoio na realização deste projeto, e das horas de desespero, em que ouviu os meus desabafos.

A todo o Serviço de Anatomia Patológica, em particular, à Dra. Maria Augusta Cipriano, diretora do SAP, a todos os colegas que de forma direta ou indireta participaram neste projeto. Um agradecimento especial á equipa do Laboratório de Patologia Molecular, à Ana Gomes, ao Paulo Teixeira, Dr. Rui Almeida, Dra. Ana Lai e Dra. Bárbara Sepodes.

A todos os meus amigos e família pelo apoio incondicional.

À Mãe Licas, por ser um dos meus pilares, sem o seu apoio nada seria possível.

Ao Rodrigo, companheiro de todas as horas, por me aturar nos momentos mais difíceis, e ser compreensivo.

## Resumo

O cancro colorretal (CCR) é a segunda causa de morte relacionada com o cancro, representando o terceiro tumor mais prevalente em todo o mundo.

A identificação de mutações genéticas, nomeadamente mutações *RAS* e *BRAF*, são usadas como marcadores preditivos de resposta à terapia em doentes com CCR.

Existem casos de CCR, que poderão apresentar dois ou mais tumores no mesmo paciente, denominados de tumores síncronos. Neste tipo de tumores podemos ter ou não concordância nas mutações. O conhecimento destas, pode ser bastante importante para a escolha adequada da terapêutica dirigida a administrar.

A literatura atual não é conclusiva sobre a existência de concordância mutacional em tumores CCR síncronos, logo o objetivo deste estudo consistiu em avaliar a concordância mutacional em casos de CCR síncronos, especificamente a incidência de mutações *KRAS*, *NRAS* e *BRAF*.

Este estudo foi efetuado com sistema *Biocartis Idylla™*, utilizando tecidos fixados em formaldeído e impregnados em parafina, de um total de 30 amostras provenientes de 14 doentes com CCR síncronos.

Com a realização deste estudo, verificou-se que 35,7% dos tumores síncronos não exibam concordância mutacional relativamente aos genes *RAS* e *BRAF*. Estes resultados poderão ter grandes implicações prognósticas, no entanto serão necessários estudos mais alargados.

**Palavras-chave:** cancro colorretal; cancro colorretal síncrono; *KRAS*; *BRAF*; *NRAS*; Terapias dirigidas; Concordância mutacional.

## Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the third leading cause of cancer-related death, representing the third most prevalent tumor worldwide.

The identification of genetic mutations, namely *RAS* and *BRAF*, are used as predictive markers of response to therapy in patients with CRC.

There are cases of CRC, which may present two or more tumors in the same patient, called synchronous tumors. In this type of tumors, we may or may not have concordance in the mutations. The knowledge of these can be quite important for the appropriate choice of therapy to be administered.

Current literature is not conclusive about the existence of mutational concordance in synchronous CRC tumors, therefore the objective of this study was to evaluate mutational concordance in synchronous CRC cases, specifically the incidence of *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* mutations.

This study was carried out with the *Biocartis Idylla™* system, using tissues fixed in formaldehyde and impregnated in paraffin, from a total of 30 samples from 14 patients with synchronous CRC. With this study, it was found that 35.7% of synchronous tumors do not exhibit mutational concordance regarding the *RAS* and *BRAF* genes. These results could have a major prognostic implication, however, larger studies will be needed.

**Keywords:** colorectal cancer; synchronous colorectal cancer; *KRAS*; *BRAF*; *NRAS*; Mutation; Targeted therapies; Mutational concordance.

## Abreviaturas e Siglas

BRAF – Oncogene viral B1 homólogo ao sarcoma murino v-raf, do inglês *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

CCHNP – Cancro Colorretal hereditário não associado à polipose, Síndrome de Lynch

CCR – Cancro Colorretal

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic acid*

EGFR – Recetor do fator de crescimento epidérmico, do inglês *Epidermal growth factor receptor*

EPCAM – Molécula de adesão de célula epitelial, do inglês *epithelial cell adhesion molecule*

FOLFIRI: quimioterapia baseada em iriotecabno

FOLFOX: quimioterapia baseada em oxaliplatina

KRAS – Oncogene viral homólogo do sarcoma de rato Kirsten, do inglês *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

MAPK: Proteína Cinase Ativada por Mitogénio, do inglês *Mitogen activated protein kinase*

MLH1 – *MutL homolog 1*

MSH2 – *MutS homolog 2*

MSH6 – *MutS homolog 6*

MSI – Instabilidade de microssatélites, do inglês *Microsatellite instability*

MUTYH – *mutY DNA glycosylase*

NRAS – Oncogene viral homólogo RAS do neuroblastoma, do inglês *neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAF: Polipose Adenomatosa Familiar

PD-1 – Morte programada 1, do inglês *Programmed Death 1*

PD-L1 – Ligando da morte programada 1, do inglês *Programmed Death 1 ligand*

PMS2 – *PMS1 homolog 2*

VEGF – Recetor do crescimento endotelial vascular, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*

## Índice

|   |    |
|---|----|
| 1. Introdução.....                                | 1  |
| 1.1. Epidemiologia e Fatores de Risco.....        | 1  |
| 1.2. Diagnóstico.....                             | 4  |
| 1.3. Tipos de Tumor.....                          | 5  |
| 1.4. Estadiamento.....                            | 6  |
| 1.5. Caracterização Molecular.....                | 8  |
| 1.6. Tratamento.....                              | 10 |
| 1.7. Tumores síncronos.....                       | 11 |
| 1.8. Objetivo.....                                | 12 |
| 2. Metodologia.....                               | 13 |
| 2.1. Material.....                                | 13 |
| 2.2. Métodos.....                                 | 13 |
| 2.3. <i>Idylla™ KRAS Mutation Test</i> .....      | 16 |
| 2.4. <i>Idylla™ NRAS-BRAF Mutation Test</i> ..... | 16 |
| 2.5. Estudo Estatístico.....                      | 16 |
| 3. Resultados.....                                | 17 |
| 3.1. Caracterização da amostra.....               | 17 |
| 3.2. Caracterização Molecular.....                | 18 |
| 3.3. Caracterização dos doentes.....              | 19 |
| 4. Discussão.....                                 | 22 |
| 5. Conclusão.....                                 | 24 |
| Referências Bibliográficas.....                   | 25 |

## Índice de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Classificação TNM .....                       | 7  |
| Tabela 2: Caracterização das amostras .....             | 17 |
| Tabela 3: Classificação Molecular .....                 | 18 |
| Tabela 4: Mutação mais comum no estudo mutacional ..... | 18 |
| Tabela 5: Resultados obtidos do estudo mutacional ..... | 19 |

## Índice de Figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Número de mortes, em ambos os sexos, no Mundo              | 1  |
| Figura 2 (A e B): Números estimado de novos casos, em ambos os sexos | 2  |
| Figura 3: Sistema TNM  | 6  |
| Figura 4: Esquema da via de sinalização das MAPK                     | 8  |
| Figura 5: Sistema <i>Biocartis Idylla™</i>                           | 14 |
| Figura 6: Preparação dos cortes dos blocos de parafina               | 15 |

## 1. Introdução

O cancro surge quando uma célula, ou um grupo de células, cresce de forma anormal e descontrolada, devido a fatores endógenos, tais como mutações genéticas, como devido a fatores exógenos, como por exemplo consumo de álcool, tabaco e exposição a radiações. Este crescimento, pode levar à formação de uma lesão tumoral, com origem em qualquer órgão do corpo humano, podendo encontrar-se limitado a este, ou em casos de doença em estádios mais avançados, ter a capacidade de circular e metastizar para outros órgãos, sendo que a lesão secundária características celulares similares às da lesão primária.<sup>(1)</sup>

O cólon e o reto não diferem do resto dos órgãos. Este pode-se subdividir em três segmentos, cólon proximal, cólon distal e reto. Segundo a literatura, a localização mais comum das lesões é no cólon proximal, sendo que em indivíduos com idades mais jovens é mais comum surgirem lesões no reto e cólon distal.<sup>(2,3)</sup>

### 1.1. Epidemiologia e Fatores de Risco

O cancro colorretal (CCR) é o terceiro tipo de cancro mais diagnosticado e a segunda causa de morte relacionada com o cancro, em todo o mundo, e em ambos os sexos (Figura 1).<sup>(4)</sup>

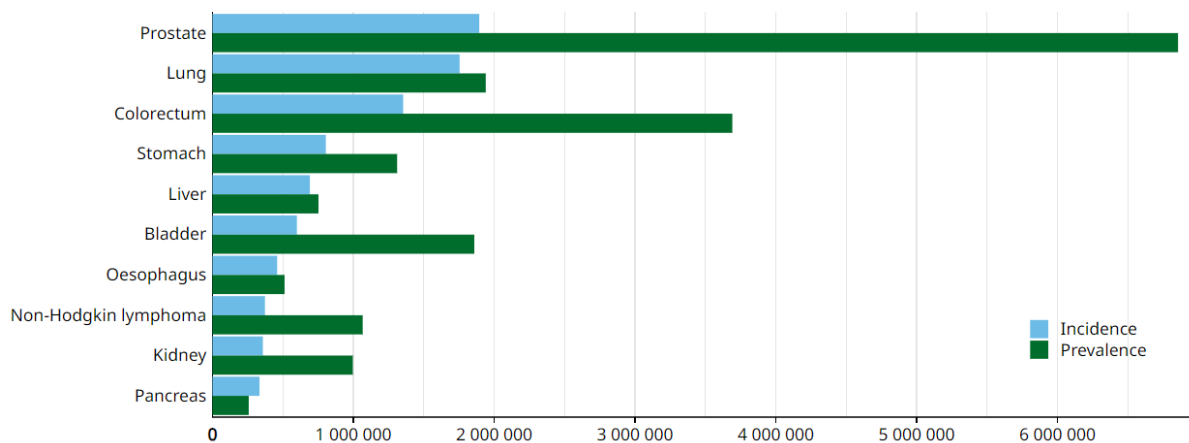


Figura 1: Número estimado de mortes, em ambos os sexos, no Mundo, em doentes com Cancro Colorretal. Neste gráfico é facilmente perceptível que o carcinoma colorretal apresenta elevada incidência e prevalência, fazendo dele um magno problema de saúde pública. Fonte: GLOBOCAN; <https://qco.iarc.fr/today/home>.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), só em 2020 houveram 1,93 milhões de novos casos de CCR, e este número deverá continuar a aumentar, em parte devido aos programas de rastreio e aos métodos de diagnóstico precoce.<sup>(4)</sup>

Em Portugal, o panorama não difere do resto do mundo. Em 2020, foram diagnosticados cerca de 7000 novos casos. A maior incidência desta patologia encontra-se no sexo masculino, correspondendo a 19% de todos os tumores diagnosticados, sendo que no sexo feminino, corresponde a 15,3% (Figura 2A e B).<sup>(4)</sup>

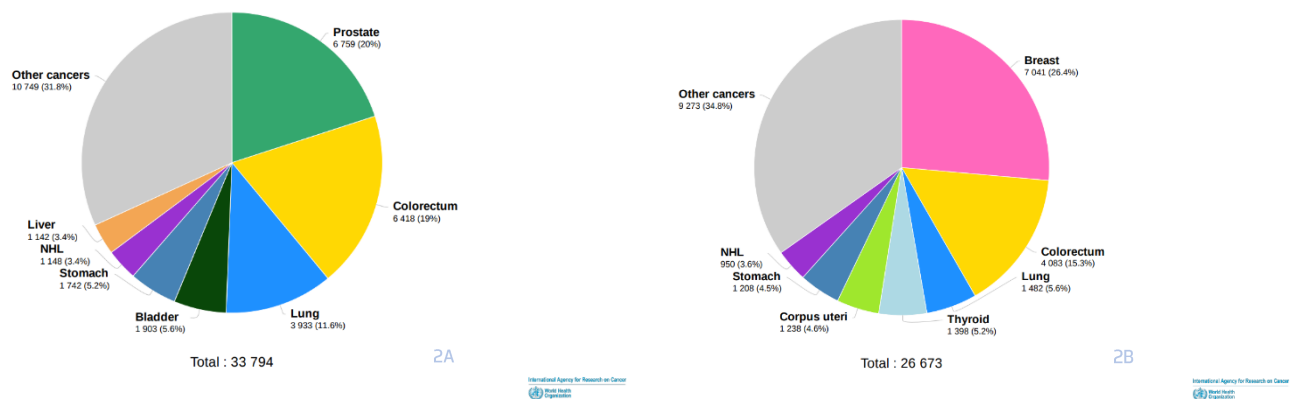


Figura 2: Número estimado de novos casos de cancro colorretal, no sexo masculino (A) e no sexo feminino (B), em Portugal. No género masculino o carcinoma colorretal é o segundo tumor maligno mais frequente, assim como no género feminino, aqui em igualdade com o carcinoma pulmonar. Fonte: GLOBOCAN. <https://gco.iarc.fr/today/home>.

Em todo o mundo, são muitas as pessoas que vivem com CCR. Devido aos esforços e avanços para melhor entender a fisiopatologia desta doença, bem como a evolução no desenvolvimento de novos tipos de tratamentos, a sobrevivência destes doentes aumentou.<sup>(3)</sup>

Existem vários fatores que podem contribuir para uma maior predisposição para o aparecimento deste tipo de lesões.

Relativamente ao sexo, apesar do risco ao longo da vida ser semelhante para ambos (4,4% em homens e 4,1% em mulheres), a incidência é maior em indivíduos do sexo masculino.<sup>(5-7)</sup>

O cancro é considerado uma doença de envelhecimento. A incidência e a mortalidade do CCR estão altamente relacionadas com a idade, aumentando a partir dos 50 anos, apesar de vários estudos terem vindo a demonstrar um aumento de novos casos em gerações mais jovens.<sup>(5-7)</sup>

O CCR é uma doença muito característica dos países desenvolvidos, por isso o consumo de álcool e tabaco, o sedentarismo, obesidade e a alimentação, estão relacionados com um risco aumentado de desenvolvimento deste tipo de lesões.<sup>(5-7)</sup>

Para além disso, existem outros fatores, como antecedentes pessoais/familiares de CCR, antecedentes de lesões benignas e de doenças inflamatórias intestinais, que estão associados à severidade do CCR e à resistência aos tratamentos. <sup>(5-8)</sup>

A maioria das lesões tumorais têm origem esporádica (80%), tendo uma parte origem hereditária (20%). Alguns casos têm origem em síndromes hereditárias sendo as mais comuns, o cancro colorretal hereditário não associado à polipose (CCHNP), também conhecido por Síndrome de Lynch, a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF), a Polipose associada ao *MUTYH*, entre outras. <sup>(5-7,9,10)</sup>

A Síndrome de Lynch é uma doença autossómica dominante, causada por mutações nos genes de reparação do DNA, mais concretamente nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2*, ou mutação no gene *EPCAM*, que promove o silenciamento do gene *MSH2*, mostrando um padrão autossómico dominante de transmissão. <sup>(5-7,9,10)</sup>

As proteínas codificadas por estes genes, são responsáveis pela reparação de erros no DNA, que ocorrem durante a divisão celular. A maioria dos casos de CCHNP está relacionada com mutações nos genes *MLH1* e *MSH2*. No entanto, existem outras mutações genéticas que podem dar origem a esta síndrome (por exemplo, *MSH6*, *MLH3*, *TGBR2*, *PMS1* e *PMS2*). Doentes com esta síndrome têm um risco aumentado em cerca de 20% de desenvolver CCR aos 50 anos, e cerca de 80% aos 85 anos. <sup>(5-7,9,10)</sup>

A PAF, em semelhança à Síndrome de Lynch, também apresenta um padrão de hereditariedade autossómico dominante. É causada por erros no gene *APC*, classificado como um gene supressor tumoral, que codifica uma proteína que desempenha um papel significativo na regulação da replicação do DNA e na divisão celular. Indivíduos com esta patologia começam a desenvolver centenas ou mesmo milhares de pólipos no cólon, com início na adolescência e, com grande probabilidade, da maioria desses pólipos poderem evoluir para lesões malignas. Estudos demonstraram que a maioria dos doentes com a síndrome PAF, não diagnosticados, serão posteriormente diagnosticados com CCR antes dos 35-40 anos. <sup>(7,11)</sup>

## 1.2. Diagnóstico

Na maioria das vezes, os sintomas não estão relacionados com o cancro, e podem ser associados a outras situações, como lesões benignas.

Os sintomas mais comuns, são a presença de sangue nas fezes (vermelho vivo ou muito escuro), alteração dos hábitos intestinais, diarreia, obstipação e/ou sensação de que o intestino não esvazia completamente, a quantidade de fezes menor do que o habitual, desconforto abdominal (dores de gases, inchaço, enfartamento e/ou câibras), perda de peso, cansaço constante, náuseas e vômitos.<sup>(12)</sup>

A taxa de sobrevivência dos doentes com CCR, está diretamente relacionada com o estágio da doença no momento do diagnóstico. Esta patologia geralmente é assintomática. Quando os sintomas aparecem, como sangramento retal, anemia ou dor abdominal, a maioria dos doentes já estão num estágio avançado, apresentando lesões agressivas, e muitas vezes já metastizadas. O diagnóstico em estágios avançados é um dos pontos determinantes da disparidade na sobrevivência e de um grande número de mortes, em todo o mundo. Assim, os programas de rastreio têm sido uma estratégia em alguns países desenvolvidos, há mais de 10 anos, com o objetivo de mudar o futuro destes doentes.<sup>(12,13)</sup>

Considerando as elevadas taxas de incidência e mortalidade em Portugal, foi desenvolvido e implementado, um programa de rastreio. Para além de indivíduos com sintomatologia sugestiva de doença do cólon ou reto, indivíduos com fatores de risco pessoais e familiares para CCR e todos os indivíduos com idade superior a 50 anos deverão de ser incluídos.<sup>(13)</sup>

Na população assintomática, com faixa etária entre os 50-74 anos, o rastreio consiste na pesquisa de sangue oculto nas fezes, de dois em dois anos.<sup>(13)</sup>

Nos casos onde é detetada a presença de sangue, os doentes são encaminhados para um acompanhamento adequado, sendo efetuada uma colonoscopia para a confirmação ou não de lesão.<sup>(13,14)</sup>

Após este rastreio, e se na coloscopia for identificada uma lesão é efetuada biópsia/ressecção cirúrgica. Perante uma amostra neoplásica são feitos exames complementares para caracterizar o tumor, podendo desta forma escolher o tipo de tratamento mais adequado ao doente.<sup>(14)</sup>

### 1.3. Tipos de Tumor

A maioria (90%) de todos os CCR's são classificados histologicamente como adenocarcinomas. A sua característica histológica é a invasão através da *Muscularis mucosa*, para a submucosa.<sup>(15,16)</sup> Mas existem vários subtipos histopatológicos de CCR, de acordo com características clínicas e moleculares específicas.<sup>(15,16)</sup>

Um desses subtipos é o adenocarcinoma mucinoso, tumor em que se observa uma grande quantidade (mais de 50%) de mucina e com epitélio maligno evidente como aglomerados ou células tumorais individuais, incluindo células em anel de sinete. Este é o subtipo mais comum, com prevalência que varia de 5% a 20%. Não existe diferença prognóstica em comparação com o adenocarcinoma, referido anteriormente, embora haja uma resposta relativamente baixa ao tratamento, quando estamos perante um cenário metastático.<sup>(15,16)</sup>

Quando estamos perante uma lesão, onde se observe mais de 50% de células tumorais, com mucina intracitoplasmática proeminente, e geralmente com alteração morfológica do núcleo, estamos perante um tumor designado de carcinoma de células pouco coesas em anel de sinete. Este subtipo tem uma taxa de prevalência baixa, aproximadamente 1%, tendo maior prevalência em tumores com localização no cólon direito. Geralmente são diagnosticados em estádios avançados. As metástases desenvolvem-se rapidamente, e existe uma forte relação com a Síndrome de *Lynch*.<sup>(15,16)</sup>

Os carcinomas medulares (aproximadamente 4% dos tumores colorretais) são caracterizados por células tumorais com núcleos vesiculares, nucléolos proeminentes e citoplasma eosinofílico abundante, num padrão sincicial, exibindo ainda uma infiltração proeminente por linfócitos e granulócitos. As mutações no gene *BRAF*, são comuns, e está associado a um bom prognóstico.<sup>(15,16)</sup>

O adenocarcinoma serreado tem características morfológicas semelhantes aos pólipos serreados, com serreação proeminente, sendo geralmente acompanhado de produção de muco. Aproximadamente 10% a 15% de todos os CCR's são classificados como adenocarcinoma serreado.<sup>(15,16)</sup>

O subtipo histológico micropapilar é caracterizado por pequenos aglomerados de células tumorais dentro de espaços estromais, que simulam canais vasculares. A sua incidência varia de 5% a 20%, e apresenta um alto risco de metástase ganglionares, estando associado a um mau prognóstico. Invasão linfática, vascular, extramural e invasão perineural são frequentes neste subtipo tumoral.<sup>(15,16)</sup>

Existem ainda outros subtipos, raros e de difícil caracterização histológica como os carcinomas adenoescamosos, os carcinomas com componente sarcomatoide, os carcinomas indiferenciados e os *adenoma-like*.<sup>(15,16)</sup>

Após a confirmação de diagnóstico histológico, o estadiamento e a caracterização genética destes tumores, a combinação destes parâmetros é crucial para a determinação do tratamento e prognóstico dos doentes.

#### 1.4. Estadiamento

Um dos passos importantes para a caracterização da doença é o estadiamento. No caso das neoplasias do cólon e do reto, o sistema de estadiamento recomendado é o sistema tumor, nódulos e metástases (Sistema TNM). Este método é baseado no tamanho e invasão de toda a espessura da parede, ou para além desta, a invasão ou aderência para órgãos e estruturas adjacentes (T), o número de gânglios linfáticos envolvidos (N) e a presença ou ausência de metástases distantes (M) (Figura 3).<sup>(17)</sup>

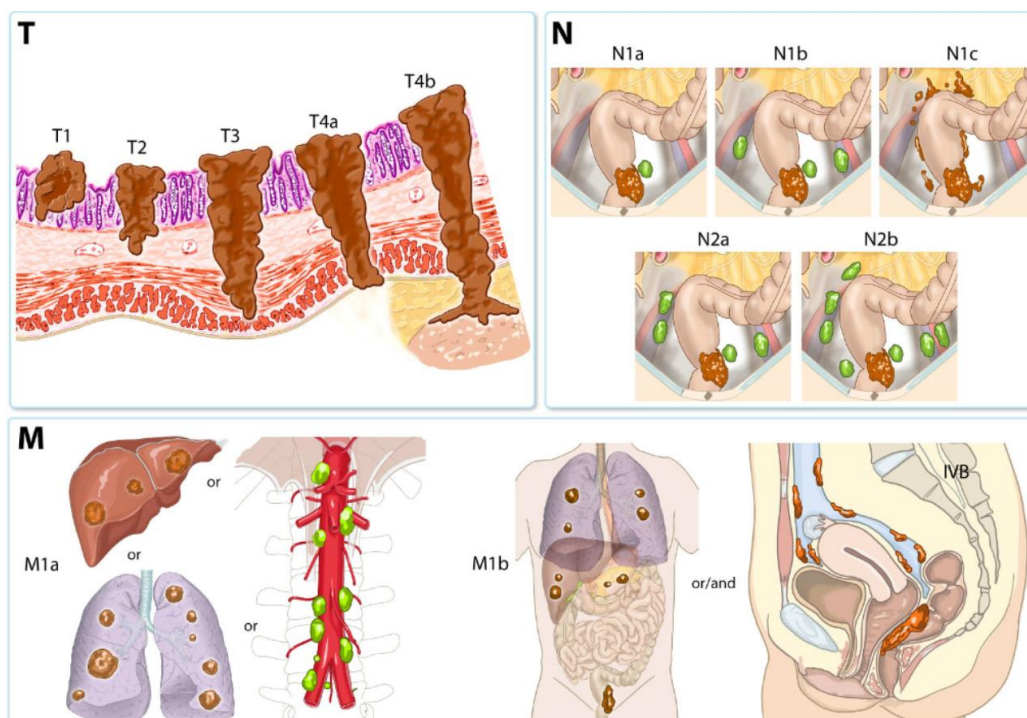


Figura 3: Sistema TNM, sistema para classificação do estadiamento das lesões neoplásicas. T1: invade a submucosa; T2: invade a Muscularis Propria; T3: invade a subserosa através da Muscularis Propria; T4: invade ou adere outros órgãos/estruturas e/ou invadem a superfície do peritôneo visceral. N0: gânglios linfáticos não foram invadidos; N1: invasão de 1 a 3 gânglios; N2: invasão de 4 ou mais gânglios. M0: não há metástases distantes; M1: existência de metástases à distância. Fonte: IMAIO (<https://www.imaio.com/en/e-cases/imaio/classifications-in-radiology-medical>)

Em relação ao primeiro parâmetro do TNM, o tamanho/invasão (T), podemos classificar em T1, lesões que invadem a submucosa, T2, lesões que invadem a *Muscularis Propria*, T3, lesões que invadem a subserosa através da *Muscularis Propria*, e por fim, T4, lesões que invadem diretamente ou aderem a outros órgãos ou estruturas e/ou invadem a superfície do peritoneu visceral.<sup>(17)</sup>

No caso dos gânglios linfáticos regionais (N), podem se classificar como N0, quando gânglios linfáticos não foram invadidos, N1, com invasão de 1 a 3 gânglios, e N2 com invasão de 4 ou mais gânglios.<sup>(17)</sup>

O último parâmetro, que diz respeito às metástases distantes (M), podemos classificar como, M0, nos casos em que não foram encontradas metástases distantes e M1, nos casos em que foram encontradas metástases à distância.<sup>(17)</sup>

Perante a combinação dos parâmetros anteriormente descritos, é efetuado o estadiamento da lesão em causa, como explica a tabela seguinte (Tabela 1).<sup>(17)</sup>

Tabela 1 - Classificação TNM, parâmetros utilizados para estadiamento de lesões neoplásicas. Fonte: [https://www.researchgate.net/figure/American-Joint-Committee-on-Cancer-AJCC-staging-system-for-colorectal-cancer-29\\_tbl1\\_236636422](https://www.researchgate.net/figure/American-Joint-Committee-on-Cancer-AJCC-staging-system-for-colorectal-cancer-29_tbl1_236636422)

| AJCC stage | TNM stage        | Definition   |
|------------|------------------|--|
| I          | T1; N0; M0       | T1: tumour invades submucosa   |
| I          | T2; N0; M0       | T2: tumour invades muscularis propria  |
| IIa        | T3; N0; M0       | T3: tumour invades through muscularis propria into subserosa or non-peritonealised pericolic tissues |
| IIb        | T4; N0; M0       | T4: tumour directly invades other organs or structures and/or perforates visceral peritoneum         |
| IIIa       | T1 or T2; N1; M0 | T1/2; N1: metastases to 1–3 regional lymph nodes   |
| IIIb       | T3 or T4; N1; M0 | T3/4; N1: metastases to 1–3 regional lymph nodes   |
| IIIc       | Any T; N2; M0    | N2: metastases to $\geq 4$ regional lymph nodes  |
| IV         | Any T; Any N; M1 | M1: distant metastases   |

T, tumour; N, node; M, metastases.

American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system for colorectal cancer. 29 .

Posteriormente a esta classificação, e para os clínicos procederem á escolha do tratamento (cirúrgico e adjuvante) que mais beneficiará o paciente, é de extrema importância o estudo molecular.

## 1.5. Caracterização Molecular

O estudo exaustivo da carcinogénese, nomeadamente na pesquisa de alterações genéticas e novos biomarcadores permitiu o desenho e desenvolvimento de novos fármacos direcionados a alvos específicos, otimizando desta forma os resultados obtidos nos tratamentos. Estas terapias, usadas conjuntamente entre si ou com quimioterapia convencional, permitiram o aumento da sobrevivência e da qualidade de vida dos doentes com lesões neoplásicas.

O CCR é descrito como uma doença heterogénea, onde podemos distinguir pelo menos três grandes vias moleculares, que levam ao seu desenvolvimento, a via cromossómica, a via da instabilidade de microssatélites (MSI) e a via da metilação das ilhas CpG.<sup>(11,18)</sup>

A primeira, e mais comum (70%), é a via de instabilidade cromossómica. Tumores com instabilidade cromossómica são distinguidos pela acumulação de mutações em oncogenes específicos (por exemplo, *APC*, *KRAS*, *PIK3CA*, *BRAF*, *SMAD4*, *TP53*, etc.) e genes supressores tumorais, ativando assim vias para a carcinogénese do CCR.<sup>(11,18)</sup>

A via de sinalização das MAPK (do inglês *mitogen activated protein kinases*) é das vias mais importantes para a regulação, proliferação e sobrevivência de células neoplásicas (Figura 4).<sup>(19,20)</sup>

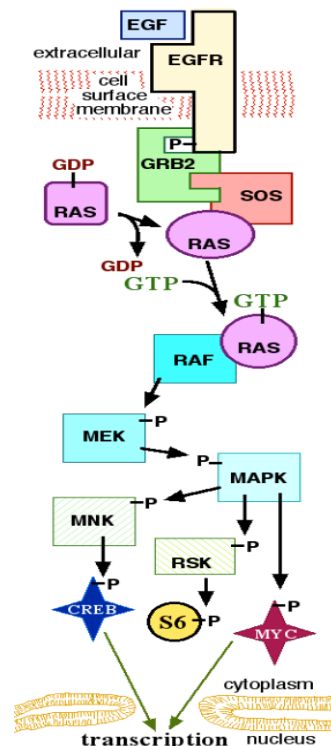


Figura 4: Esquema da via sinalização das MAPK, umas das vias que pode dar origem a tumores colorretais. Fonte: Materiais Universidade Évora ([http://materiais.dbio.uevora.pt/BD/Crescimento/Vias\\_transducao\\_sinal.html](http://materiais.dbio.uevora.pt/BD/Crescimento/Vias_transducao_sinal.html))

Vários estudos demonstraram que a ativação constitutiva desta via está relacionada com diferentes graus de agressividade dos tumores CCR, frequentemente devido a mutações ativadoras em proteínas iniciais dessa mesma via, tais como a proteína cinase *RAS* e *RAF*.<sup>(11,17,18)</sup>

Estas proteínas são mediadoras dos sinais do recetor do fator de crescimento (do inglês *epithelial growth factor receptor - EGFR*) e, conseqüentemente, essenciais para a proliferação, sobrevivência e diferenciação celular.<sup>(19-21)</sup>

As mutações ativadoras dos proto-oncogenes *RAS* resultam na ativação constitutiva da proteína *RAS* GTPase, mesmo estando na ausência da sinalização do *EGFR*, o que resulta de um sinal de proliferação celular. A presença de mutações nos genes *RAS* tem sido implicada na patogênese de vários tumores. Estando presente em cerca de 56% dos casos de CCR metastáticos, onde se identifica mutações nos exões 2, 3 e 4 (exão 2 do *KRAS* em 43%; exão 3 do *KRAS* em 4%; exão 4 do *KRAS* em 6%; exão 2 do *NRAS* em 3%; exão 3 do *NRAS* em 4%; exão 4 do *NRAS* em 0,3%).<sup>(19-21)</sup>

Outro proto-oncogene, o gene *BRAF* é membro da família da proteína quinase *RAF*, quinases de proteínas de transdução de sinais de crescimento. As mutações deste gene resultam na ativação constitutiva da via de sinalização *MAPK*, sendo que 90% das mutações deste gene, é a mutação *BRAF V600E*.<sup>(19,20)</sup>

A via de instabilidade de microssatélites (*MSI*), que tem como base os microssatélites, que são sequências curtas repetidas (1 a 6 pares), dispersas ao longo de todo o genoma humano, constituindo 3% do mesmo, e que devido à sua estrutura repetida têm uma maior probabilidade para sofrerem mutações. Tais como inserções, deleções ou incompatibilidade de bases. O melhor exemplo desta via é a Síndrome de *Lynch*, já explicado anteriormente.<sup>(5-7,9,10)</sup>

Outra característica comum das lesões tumorais é forma como conseguem combater o sistema imunológico dos doentes. O PD-1 é um dos recetores expresso por macrófagos, linfócitos T e B, células NK (*Natural Killer*) e células apresentadoras de antígenos (*APCs*), e que tem como função controlar a atividade e a proliferação dos linfócitos T, de forma a impedir reações do sistema imunitário contra as próprias células do indivíduo. É da ligação PD-1 ao seu ligando PD-L1, que resulta esta função.<sup>(22-24)</sup>

Quando estamos perante células tumorais com expressão de PD-L1 na sua superfície, estas têm a capacidade de adquirir resistência aos linfócitos T citotóxicos, logo conseguir controlar o sistema imunitário, não sofrendo apoptose, desta forma conseguindo sobreviver e havendo progressão da doença.<sup>(22-24)</sup>

O tecido tumoral, como o tecido não tumoral, necessita também de oxigénio e nutrientes para puder crescer e para o desenvolvimento de metástases. Este fornecimento é conseguido através da formação de novos vasos, processo denominado de angiogénese. Um dos reguladores deste

processo é o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (*VEGF*, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*), neste momento o mais estudado, e o qual tem valor prognóstico elevado, estando relacionado com a progressão da doença, com o desenvolvimento de metástases, e uma maior probabilidade de recorrência da doença, conseqüentemente a um pior prognóstico para o paciente.<sup>(25,26)</sup>

## **1.6. Tratamento**

A escolha do tratamento dos doentes com CCR é feita depois de uma avaliação por uma equipa multidisciplinar, constituída por vários profissionais de diversas áreas, que em conjunto escolhem o tratamento que mais beneficiará o doente.<sup>(27-29)</sup>

Essa escolha vai depender do estadiamento da lesão e das possíveis comorbilidades dos doentes, que possam afetar negativamente os resultados dos tratamentos.<sup>(27-29)</sup>

A cirurgia é o principal tratamento dos doentes com CCR. O objetivo, independentemente da localização da lesão, é a remoção desta, com margens de segurança, incluindo possíveis metástases de gânglios regionais. O tipo de cirurgia vai depender da localização e do tamanho/invasão da lesão, podendo esta variar de uma mucosectomia a uma colectomia total.<sup>(30,31)</sup>

A quimioterapia e a radioterapia podem ser, tanto uma opção de tratamento neo-adjuvante, como adjuvante.<sup>(32)</sup>

A escolha de terapêutica neo-adjuvante é necessária em doente com lesões do reto em estádios avançados (II e III). A quimioterapia adjuvante será administrada a doentes com lesão em estágio avançado, com envolvimento ganglionar e metástases á distância.<sup>(32)</sup>

Apesar da quimioterapia convencional, ter em muitos doentes boa resposta, por vezes é necessário ir mais além, e optar por um tratamento personalizado. Isto é adequar a terapêutica ao doente em questão, e aqui o perfil molecular é crucial.<sup>(5,33)</sup>

Atualmente, e cada vez mais, as terapias moleculares dirigidas são uma opção para os tratamentos de doentes com neoplasias, como os doentes com CCR, muitas vezes em conjunto com quimioterapia convencional.<sup>(33)</sup>

O estudo molecular de mutações, por exemplo, nos genes *RAS* e *BRAF*, irá indicar quais os doentes que melhor responderão a terapêuticas *anti-EGFR*. Pois doentes com estas mutações não obterão resposta a estas terapias.<sup>(33)</sup>

A imunoterapia tem sido também uma opção para muitos destes doentes. Como já falado anteriormente, existem células tumorais capazes de ultrapassar o sistema imunitário, e desta forma evitar a apoptose. É aqui que entram os inibidores do checkpoint imunológico, que são anticorpos monoclonais, que tem a capacidade de inibirem recetores com função de supressão do sistema imunitário, como é o caso do PD-L1.<sup>(33)</sup>

### **1.7. Tumores síncronos**

Nos tumores colorretais podemos encontrar situações de tumores síncronos, ou seja, a presença de dois ou mais tumores no mesmo paciente, que se desenvolvem e ou são detetados ao mesmo tempo, ou num espaço de seis meses entre si. A sua prevalência não é elevada, representando cerca de 2,4% a 3,9% de todos os tumores colorretais.<sup>(34-36)</sup>

Assim como nos casos de CCR com uma lesão única, também os tumores síncronos tem uma prevalência maior nos homens, mostrando estudos anteriores um rácio de 1,8:1.<sup>(36)</sup>

A média de idade de diagnósticos de CCR solitários e CCR síncronos é muito semelhante, apesar de haverem estudos que mostrem que a idade média de diagnóstico dos tumores síncronos possa ser maior do que a idade dos doentes com lesões isoladas.<sup>(36)</sup>

Os fatores de risco deste tipo de CCR são os mesmos dos doentes com CCR solitário, sendo que portadores de doenças inflamatórias intestinais e doenças hereditárias, tais como Síndrome de Lynch e a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF), são mais propensos a desenvolver lesões síncronas, devido ao facto destes indivíduos serem portadores de várias lesões de origem benigna, as quais podem progredir para tumores malignos.<sup>(36)</sup>

O adenocarcinoma mucinoso é o tipo histológico mais observado em doentes com tumores síncronos. Na maioria dos casos destes tumores, estamos perante um tumor mais desenvolvido ou mais agressivo, sendo que o/os outro/os são menores e menos invasivos.<sup>(36)</sup>

O tipo de cirurgia destes doentes varia da localização e do estágio das lesões, podendo variar de opções menos invasivas, como mucosectomias, como opções mais radicais como colectomias totais. Nos casos em que as lesões estejam muito distantes entre si, a excisão pode ser efetuada em mais do que um segmento cólico.<sup>(36)</sup>

No que diz respeito ao prognóstico destes doentes não há consenso. Existem estudos que mostram que estes indivíduos tem um pior prognóstico, na medida em que são doentes com mais

do que uma lesão, sendo que outros mostram não haver diferença entre indivíduos com apenas uma lesão tumoral, ou várias lesões.<sup>(36)</sup>

O estudo molecular faz parte da rotina da caracterização destas lesões, assim como dos CCR solitários, estudando como por exemplo, a instabilidade de microssatélites e as mutações *RAS* e *BRAF*. Os resultados deste estudo molecular, são por vezes discordantes entre lesões do mesmo indivíduo, o que pode sugerir que o mecanismo de formação das lesões síncronos é complexo.<sup>(34-</sup>

<sup>36)</sup> As mutações *KRAS* e *BRAF* são as mais comuns no CCR. Mutações no gene *KRAS* estão associadas a um mau prognóstico, a lesões em estádios mais avançados e metastáticos e a uma taxa de sobrevivência menor. Enquanto mutações *BRAF* estão também associadas a um mau prognóstico e a uma taxa de sobrevivência menor, especialmente quando associadas a instabilidade de microssatélites.<sup>(37,38)</sup>

O conhecimento exato destas mutações pode ser bastante importante para a escolha adequada da terapêutica dirigida a seguir para o doente.<sup>(34,35)</sup>

Sabe-se que doentes com mutação *RAS* não vão obter resposta nas terapias dirigidas, com Cetuximab e com o Panitumumab (terapêutica *anti-EGFR*). E doentes com mutação *BRAF* tem mostrado uma resposta positiva quando submetidos a terapêutica com Encorafenib, em segunda linha, e em associação com Cetuximab, quando perante um doente sem mutação *RAS*.<sup>(33)</sup>

## **1.8. Objetivo**

Devido à pouca informação, na rotina de muitos laboratórios anatómo-patológicos, nos casos de CCR Síncronos, os estudos mutacionais são muitas vezes feitos nos tumores com maiores dimensões, ou com o estágio mais avançado.<sup>38</sup> Correndo o risco de estes apresentarem mutações diferentes, desta forma, podendo haver hipótese da resposta a terapias dirigidas ser diferente.

O objetivo deste estudo foi avaliar a concordância mutacional em casos de Cancro Colorretal Síncronos, avaliando especificamente a incidência de mutações *KRAS*, *NRAS* e *BRAF*.

Com este estudo pretende-se contribuir para uma melhor caracterização dos tumores, sabendo se há ou não concordância entre estes, desta forma podendo contribuir para a escolha do tratamento mais adequado ao doente, nomeadamente se é necessário o estudo genético dos múltiplos tumores.

## **2. Metodologia**

O estudo realizado teve caráter retrospectivo, utilizando amostras de doentes diagnosticados com CCR Síncronos entre março de 2019 e agosto de 2022, no serviço de Anatomia Patológica (SAP) do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). Todos os diagnósticos foram efetuados na rotina laboratorial do serviço.

Após pedido de aprovação enviado á Comissão de Ética do CHUC, este foi autorizado com o número CHUC-137-20.

### **2.1. Material**

Entre março de 2019 e agosto de 2022, foram diagnosticados no SAP, 28 doentes com CCR Síncrono, mas em apenas 14 doentes foram feitos testes moleculares em todas as lesões, correspondendo a um total de 30 amostras.

Todas estas amostras foram fixadas em formaldeído a 4% e impregnadas em parafina, segundo o protocolo implementado no SAP dos CHUC.

De cada doente foram recolhidas as informações clinico-patológicas: idade, género, tipo histológico, estágio e TNM e status mutacional.

### **2.2. Métodos**

O método de diagnóstico complementar que está implementado no SAP desde março de 2019, encontrando-se ainda em vigor, é o Sistema *Biocartis Idylla™*. Um teste de diagnóstico in vitro, utilizado para a deteção qualitativa de várias mutações, em tecidos fixados em formaldeído e impregnados em parafina (Figura 5).

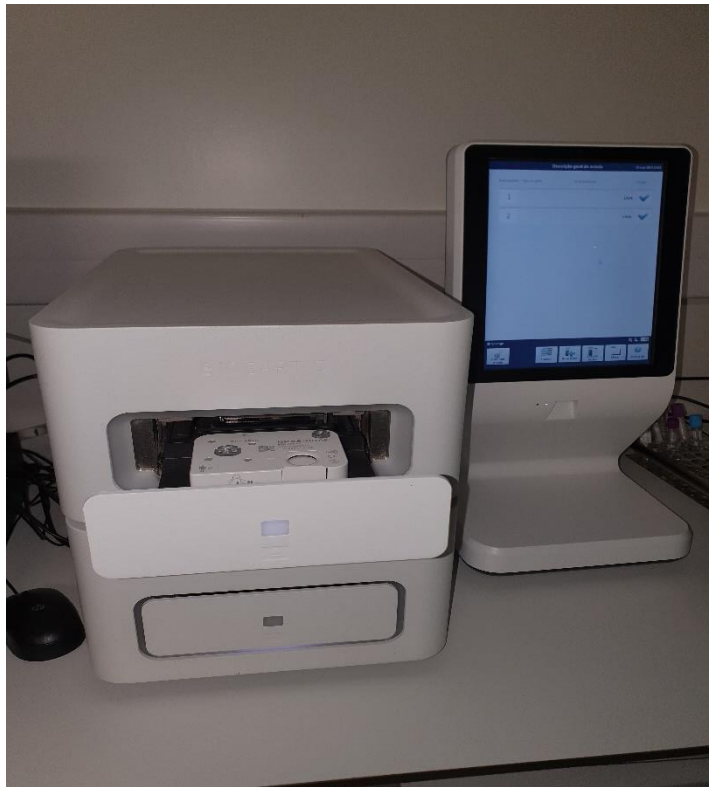


Figura 5: Sistema Biocartis Idylla™, sistema de real-time PCR. Imagem do laboratório de Patologia Molecular, dos CHUC. É possível observar o cartuxo à esquerda e a consola à direita

Tanto no Teste de Mutação *Idylla™ KRAS* como no Teste Mutação *Idylla™ NRAS-BRAF* ocorrem cinco reações de polimerase em cadeia (do inglês *polymerase chain reaction* – PCR) multiplex específicas dos alelos, desenhadas para amplificar especificamente as sequências destes genes.

(38)

Após a seleção da área de interesse e da quantificação da percentagem das células tumorais, por parte de um patologista nas lâminas de hematoxilina-eosina, delimita-se essa mesma área no bloco de parafina, efetuando nos casos necessários macrodissecção. São posteriormente efetuados cortes dos blocos de parafina, num micrótomo, sendo que a quantidade de cortes e a espessura necessária, depende do tamanho e da quantidade de células tumorais existentes na amostra.

Os cortes são envolvidos com um papel de filtro, humedecido com água sem nucleases, e posteriormente introduzidos num cartuxo (Figura 6). Cada cartuxo corresponde a uma amostra.



### **2.3. *Idylla™ KRAS Mutation Test***

O Teste de Mutação *Idylla™ KRAS* deteta mutações nos exões 2, 3 e 4 do oncogene *KRAS*. O teste consiste em cinco reações PCR multiplex específicas dos alelos, concebidas para amplificar especificamente as sequências de genes *KRAS* com mutação nos codões 12, 13, 59, 61, 117 e 146. Um fragmento conservado na região juncional do intrão 4/exão 5 do gene *KRAS* é amplificado em simultâneo. Esta reação PCR serve como controlo de processamento de amostra (*sample processing control, SPC*) que verifica a execução adequada de todo o processo, desde a amostra até ao resultado, e está presente em cada um dos cinco multiplexes. Adicionalmente, esta reação de controlo é uma medida para a quantidade de DNA amplificável na amostra e é utilizada na análise do estado de mutação da mesma.<sup>(38)</sup>

Cada Teste de Mutação *Idylla™ KRAS* inclui controlos de processamento de amostra integrados para verificar a conclusão adequada de todo o processo, desde a amostra até ao resultado. Adicionalmente, estas reações de controlo constituem uma medida para controlar a quantidade de DNA amplificável na amostra e são utilizadas na análise do estado de mutação da amostra.<sup>(38)</sup>

### **2.4. *Idylla™ NRAS-BRAF Mutation Test***

O Teste de Mutação *Idylla™ NRAS-BRAF*, efetuado no Sistema *Biocartis Idylla™*, é um teste de diagnóstico *in vitro* para a deteção qualitativa de mutações nos codões 12, 13, 59, 61, 117, 146 do gene *NRAS* e no codão 600 do gene *BRAF*.<sup>(38)</sup>

Cada Teste de Mutação *Idylla™ NRAS-BRAF* inclui controlos de processamento de amostra, como explicado no Teste de Mutação *Idylla™ KRAS*.<sup>(38)</sup>

### **2.5. Estudo Estatístico**

O tratamento dos dados foi efetuado de uma forma descritiva, utilizando o programa Microsoft Excel.

### 3. Resultados

#### 3.1. Caracterização da amostra

Para este estudo foram selecionados 14 doentes, diagnosticados com CCR síncrono no SAP do CHUC. A maioria desses doentes apresentavam uma idade acima dos 50 anos (12 doentes), sendo que apenas dois tinham menos de 50 anos. Doze destes eram do sexo masculino e dois do sexo feminino (Tabela 2).

Dos 14 doentes, obtivemos um total de 30 lesões (12 doentes com duas lesões e 2 doentes com três lesões), em relação ao diagnóstico histológico o tipo mais comum foi o adenocarcinoma, que variava entre baixo e alto grau (26 lesões), três lesões do subtipo mucinoso e uma do subtipo serreado. 71,5% estas encontravam-se num estágio avançado, estágio III (Tabela 2).

Tabela 2: Caracterização clínico-patológica dos 14 doentes

| CARACTERISTICA CLINICO-PATOLÓGICA | N (%)      |
|-----------------------------------|------------|
| <b>IDADE</b>                      |            |
| <50                               | 2 (14,3%)  |
| >50                               | 12 (85,7%) |
| <b>SEXO</b>                       |            |
| FEMININO                          | 2 (14,3%)  |
| MASCULINO                         | 12 (85,7%) |
| <b>ESTADIO TNM</b>                |            |
| II                                | 1 (7,1%)   |
| III                               | 10 (71,5%) |
| IV                                | 3 (21,4%)  |
| <b>Nº DE LESÕES</b>               |            |
| 2                                 | 12 (85,7%) |
| 3                                 | 2 (14,3%)  |

A identificação das lesões foi feita através de numeração (1, 2 e 3), sendo que o Tumor número 1 foi definido como a lesão maior/mais invasiva.

### 3.2. Caracterização Molecular

Às amostras desses 14 doentes, foi efetuado o estudo mutacional nos genes *KRAS*, *NRAS* e *BRAF*. Observamos que 17 amostras apresentavam mutações no gene *KRAS*, 5 amostras mutação no gene *NRAS*, 3 amostras no gene *BRAF* e 5 não apresentavam nenhuma destas mutações (*wild-type*) (Tabela 3).

Tabela 3: Caracterização Molecular dos 14 doentes, relativamente a mutações *KRAS*, *NRAS* e *BRAF*

| CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR             | Nº (%)     |
|--------------------------------------|------------|
| Nº DE LESÕES COM MUTAÇÃO <i>KRAS</i> | 17 (56,6%) |
| Nº DE LESÕES COM MUTAÇÃO <i>NRAS</i> | 5 (16,7%)  |
| Nº DE LESÕES COM MUTAÇÃO <i>BRAF</i> | 3 (10%)    |
| Nº DE LESÕES WT                      | 5 (16,7%)  |

Após a comparação das amostras entre os mesmos doentes, verificou-se que 5 destes não apresentaram concordância mutacional, enquanto 9 mostraram (Tabela 4).

Em relação a estes doentes que não apresentavam concordância mutacional entre lesões, verificou-se que ambas foram classificadas histologicamente como adenocarcinomas de baixo grau.

Tabela 4: Resultados do estudo mutacional, relativamente aos genes *KRAS*; *NRAS* e *BRAF*, dos 14 doentes. As amostras identificadas a vermelho correspondem às amostras que não apresentam concordância mutacional.

| Doente | Tumor 1  | Tumor 2  | Tumor 3                                   |
|--------|--|--|---|
| 1      | p.Gly13Asp (c.38G>A) no gene <i>KRAS</i>   | p.Gly12Asp (c.35G>A) no gene <i>KRAS</i>   | p.Gly13Asp (c.38G>A) no gene <i>KRAS</i>  |
| 2      | p.Gln61His (c.183A>C ; c.183A>T) no gene <i>KRAS</i>   | p.Gln61His (c.183A>C ; c.183A>T) no gene <i>KRAS</i>   |   |
| 3      | <i>RAS</i> WT; V600E/D, p.Val600Glu / p.Val600Asp (c.1799T>A; c.1799_1800delinsAA / c.1799_1800delinsAC) no gene <i>BRAF</i> | <i>RAS/BRAF</i> WT   |   |
| 4      | <i>RAS/BRAF</i> WT   | p.Gly13Asp (c.38G>A) no gene <i>KRAS</i>   |   |
| 5      | <i>RAS/BRAF</i> WT   | p.Gly13Asp (c.38G>A) no gene <i>KRAS</i>   |   |
| 6      | p.Gly12Asp (c.35G>A) no gene <i>KRAS</i>   | p.Gly12Asp (c.35G>A) no gene <i>KRAS</i>   |   |
| 7      | p.Gly12Asp (c.35G>A) no gene <i>NRAS</i>   | p.Gly12Ser (c.34G>A) no gene <i>KRAS</i>   | p.Gln61Leu (c.182A>T) no gene <i>NRAS</i> |
| 8      | p.Gly12Asp (c.35G>A) no gene <i>KRAS</i>   | p.Gln61Arg/p.Gln61Leu (c.182A>G / c.182A>T, Q61R/L) no gene <i>KRAS</i>  |   |
| 9      | p.Gly12Val (c.35G>T) no gene <i>KRAS</i>   | <i>RAS/BRAF</i> WT   |   |
| 10     | p.Gly12Val (c.35G>T) no gene <i>KRAS</i>   | p.Gly12Val (c.35G>T) no gene <i>KRAS</i>   |   |
| 11     | <i>RAS/BRAF</i> WT   | p.Gly12Asp (c.35G>A) no gene <i>KRAS</i>   |   |
| 12     | p.Gly12Val (c.35G>T) no gene <i>KRAS</i>   | p.Gly13Asp (c.38G>A) no gene <i>KRAS</i>   |   |
| 13     | p.Gln61Lys (c.181C>A) no gene <i>NRAS</i>  | p.Gln61Lys (c.181C>A) no gene <i>NRAS</i>  |   |
| 14     | <i>RAS</i> WT; V600E/D, p.Val600Glu / p.Val600Asp (c.1799T>A; c.1799_1800delinsAA / c.1799_1800delinsAC) no gene <i>BRAF</i> | <i>RAS</i> WT; V600E/D, p.Val600Glu / p.Val600Asp (c.1799T>A; c.1799_1800delinsAA / c.1799_1800delinsAC) no gene <i>BRAF</i> |   |

A mutação mais comum em todas as amostras foi a mutação no codão 12, do gene *KRAS* (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados obtidos do estudo mutacional. relativamente aos genes KRAS; NRAS e BRAF, dos 14 doentes. As amostras identificadas a vermelho, são as amostras que apresentam a mutação genética no codão 12 do gene KRAS, a mutação mais comum identificadas nas 30 amostras.

| Doente | Tumor 1  | Tumor 2  | Tumor 3                            |
|--------|--|--|------------------------------------|
| 1      | p.Gly13Asp (c.38G>A) no gene KRAS  | p.Gly12Asp (c.35G>A) no gene KRAS  | p.Gly13Asp (c.38G>A) no gene KRAS  |
| 2      | p.Gln61His (c.183A>C; c.183A>T) no gene KRAS   | p.Gln61His (c.183A>C; c.183A>T) no gene KRAS   |                                    |
| 3      | RAS WT; V600E/D, p.Val600Glu / p.Val600Asp (c.1799T>A; c.1799_1800delinsAA / c.1799_1800delinsAC) no gene BRAF | RAS/BRAF WT  |                                    |
| 4      | RAS/BRAF WT  | p.Gly13Asp (c.38G>A) no gene KRAS  |                                    |
| 5      | RAS/BRAF WT  | p.Gly13Asp (c.38G>A) no gene KRAS  |                                    |
| 6      | p.Gly12Asp (c.35G>A) no gene KRAS  | p.Gly12Asp (c.35G>A) no gene KRAS  |                                    |
| 7      | p.Gly12Asp (c.35G>A) no gene NRAS  | p.Gly12Ser (c.34G>A) no gene KRAS  | p.Gln61Leu (c.182A>T) no gene NRAS |
| 8      | p.Gly12Asp (c.35G>A) no gene KRAS  | p.Gln61Arg/p.Gln61Leu (c.182A>G / c.182A>T, Q61R/L) no gene KRAS   |                                    |
| 9      | p.Gly12Val (c.35G>T) no gene KRAS  | RAS/BRAF WT  |                                    |
| 10     | p.Gly12Val (c.35G>T) no gene KRAS  | p.Gly12Val (c.35G>T) no gene KRAS  |                                    |
| 11     | RAS/BRAF WT  | p.Gly12Asp (c.35G>A) no gene KRAS  |                                    |
| 12     | p.Gly12Val (c.35G>T) no gene KRAS  | p.Gly13Asp (c.38G>A) no gene KRAS  |                                    |
| 13     | p.Gln61Lys (c.181C>A) no gene NRAS   | p.Gln61Lys (c.181C>A) no gene NRAS   |                                    |
| 14     | RAS WT; V600E/D, p.Val600Glu / p.Val600Asp (c.1799T>A; c.1799_1800delinsAA / c.1799_1800delinsAC) no gene BRAF | RAS WT; V600E/D, p.Val600Glu / p.Val600Asp (c.1799T>A; c.1799_1800delinsAA / c.1799_1800delinsAC) no gene BRAF |                                    |

### 3.3. Caracterização dos doentes

Olhando para os doentes com resultado do estudo mutacional discordante, o paciente número 3 era um indivíduo do sexo feminino, com 62 anos, que apresentava dois adenocarcinomas, classificados com T4aN2b, estadio IIIC. O tumor mais invasivo apresentava mutação V600E, no gene *BRAF*, enquanto a segunda lesão era *wild-type*. Após o episódio cirúrgico não houve muitas informações, apenas que faleceu um mês após a cirurgia.

O doente 4, era um indivíduo do sexo masculino, com 74 anos, com dois adenocarcinomas, classificados com T3N1c, estadio IIIA. O tumor mais invasivo, no estudo mutacional, revelou ser *wild-type*, enquanto a segunda lesão mostrou mutação no codão 13 do gene *KRAS*. Foi submetido a quimioterapia neo-ajuvante, sem informação dos fármacos utilizados, tendo sido proposta quimioterapia paliativa com Folfiri e Bevacizumab (*anti-VEGF*). Este doente já apresentava metastização cerebral, tendo falecido 10 meses após a cirurgia.

O doente 5, um indivíduo do sexo masculino, com 79 anos, apresentava dois adenocarcinomas, classificados com T4aN2b, estadio IIIC. O tumor mais invasivo, revelou ser *wild-type*, enquanto a segunda lesão mostrou mutação no codão 13, do gene *KRAS*. Foi submetido a quimioterapia noutra instituição, não havendo informações dos fármacos utilizados. Nove meses após a cirurgia, é internado por um quadro de oclusão e suspeita de IPMN pancreático (neoplasia mucinosa intraductal pancreática, do inglês *intraductal papillary mucinous neoplasm*). Teve consulta 6 meses após este episódio, tendo faltado a consulta marcada para 10 meses depois, não havendo informações do estado atual deste.

O doente 9, um individuo do sexo masculino, com 71 anos, apresentava dois adenocarcinomas, classificados com T4N+/T3N0, sem informação do estágio. O tumor mais invasivo apresentava mutação no codão 12 do gene *KRAS*, enquanto a segunda lesão era *wild-type*. Foi submetido a quimioterapia neoadjuvante, com Capecitabina. Após a terapêutica as lesões foram classificadas com T2N0. Posteriormente foi submetido a quimioterapia adjuvante com Capox (Capecitabina e oxaliplatina). Atualmente, encontra-se clinicamente bem.

Por fim o doente 11, individuo do sexo masculino, com 59 anos, apresentava dois adenocarcinomas, classificados com T4bN1C, estágio IIIC. O tumor mais invasivo era *wild-type*, sendo que a segunda lesão apresentava mutação no codão 12 do gene *KRAS*. Este doente foi submetido a quimioterapia, não havendo informação dos fármacos. Atualmente, encontra-se clinicamente bem.

Analisando os restantes doentes, os que tinham concordância mutacional entre lesões, verificamos que o doente 1, com três lesões, duas com mutação no codão 13 do gene *KRAS* e outra no codão 12, submetido a quimioterapia convencional, teve progressão da doença, acabando por falecer 11 meses após a cirurgia.

O doente 2, com duas lesões com mutação no codão 61 do gene *KRAS*, devido a problemas cardíacos, não foi submetido a terapêuticas adjuvantes, falecendo um ano e cinco meses após a cirurgia.

O doente 6, com duas lesões com mutação no codão 12 do gene *KRAS*, foi submetido a quimioterapia convencional. Houve progressão da doença, com metastização hepática e pulmonar. Neste momento, encontra-se sob quimioterapia paliativa.

O doente 7, este com três lesões, uma com mutação no codão 12 do gene *NRAS*, outra com mutação no codão 12 no gene *KRAS* e outra no codão 61, do gene *NRAS*. Foi submetido a quimioterapia convencional, havendo progressão da doença, com metastização hepática e pulmonar. Faleceu dois anos após a cirurgia.

O doente 8, com duas lesões, uma com mutação no codão 12 e outra no codão 61 do gene *KRAS*, foi submetido a quimioterapia convencional. Falece dois anos e três meses após a cirurgia.

O doente 10, com duas lesões, ambas com mutação no codão 12 do gene *KRAS*, não submetido a terapêutica adjuvante, por se apresentar muito debilitado. Falece dois meses após a cirurgia.

O doente 12, com duas lesões, uma com mutação no codão 12 outra no codão 13 do gene *KRAS*, inicia protocolo de quimioterapia adjuvante convencional. Onze meses depois tem progressão da

doença, e inicia quimioterapia Folfox com Bevacizumab. Nove meses depois, tem nova progressão da doença (junho 2023), não havendo informação atual.

O doente 13, com duas lesões, ambas com mutação no codão 61 do gene *NRAS*, foi submetido a quimioterapia convencional, encontrando-se atualmente bem.

Por fim, o doente 14, este com duas lesões, ambas com mutação V600E do gene *BRAF*, falece 7 dias após a cirurgia. Era um doente com múltiplas patologias, e antecedentes de neoplasia da próstata.

#### 4. Discussão

O CCR, apesar de todos os desenvolvimentos sobre a sua fisiopatologia, é um dos tipos de cancro mais fatal. Esta patologia é descrita como uma patologia dinâmica, com várias etapas, podendo desenvolver-se lentamente, ao longo de vários anos, evoluindo de lesões benignas, até atingir um estado maligno, com alta probabilidade de invadir tecidos adjacentes ou mesmo órgãos distantes.<sup>(18)</sup>

Neste tipo de cancro, podemos encontrar situações de tumores síncronos, ou seja, quando é detetado mais de um tumor no mesmo paciente em simultâneo ou com um intervalo de 6 meses. Apesar de existirem poucos estudos na literatura, acredita-se que a fisiopatologia destes tumores é muito semelhante aos tumores colorretais solitários. Comparando os doentes com CCR com apenas uma lesão, com os doentes com tumores síncronos, estudos anteriores não são concordantes no seu prognóstico.<sup>(35,39-41)</sup>

A maioria dos estudos em relação aos CCR síncronos, focam-se nas características clínicas e na epidemiologia e por isso ainda não são conhecidos os mecanismos que levam à origem destes tumores, mas pensa-se que tenham origem independente.<sup>(39)</sup>

Tal como no CCR, o perfil molecular dos tumores síncronos é bastante complexo, podendo ocorrer várias mutações genéticas, mostrando a heterogeneidade característica destas lesões.<sup>(18,35)</sup> Assim, no que diz respeito ao tratamento destes doentes, não se encontra definido qual o mais indicado, sendo que estes são tratados de igual forma aos doentes com apenas uma lesão<sup>(35,39)</sup>, e tendo por base o perfil genético dos tumores. Segundo a literatura, o tumor com maior dimensão ou mais invasivo é o escolhido para a realização de testes de diagnóstico complementar, como guia para o prognóstico e para a escolha da terapêutica<sup>(35,40)</sup>.

Evidências demonstram que poderá haver discordância no status mutacional entre lesões do mesmo paciente o que poderá ter um impacto na escolha da terapêutica e conseqüentemente no prognóstico dos doentes. Devido à sua heterogeneidade, os potenciais alvos terapêuticos destes casos, podem variar de lesão para lesão, sendo que a escolha de terapias dirigidas deveria ser feita com bastante prudência, e cada lesão deveria ser tratada de forma independente.<sup>(39)</sup>

Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a concordância mutacional, numa coorte de doentes com tumores síncronos, do CHUC.

Tendo em conta, os resultados obtidos com este trabalho, e olhando para os 14 doentes, verificamos que a mutação mais comum é a mutação no codão 12, do gene *KRAS*, indo de acordo com mutação mais comum encontrada noutros estudos de doentes com CCR.<sup>(42)</sup>

De realçar que destes 14 doentes, 5 (35,7%) apresentaram discordância mutacional, quando comparados os resultados dos estudos entre lesões. Sendo um valor significativamente relevante, e indo de acordo com outros estudos efetuados.<sup>(35,39,43,44)</sup>

Apesar do objetivo deste estudo ser comparar o estado mutacional entre lesões síncronas, fomos ver a evolução destes doentes após a realização destes mesmos testes.

Como foi dito anteriormente, mutações no codão 13 do gene *KRAS* e mutações no gene *BRAF*, estão associadas a um pior prognóstico e a taxas de sobrevivência menor.<sup>(37,38)</sup> Olhando para os nossos resultados, verificamos que os doentes, com e sem concordância, portadores destas mutações, faleceram pouco tempo depois do diagnóstico, indo de acordo com os estudos já mencionados. No que diz respeito ao doente três, portador também de mutação no codão 13 do gene *KRAS*, não se obteve informação em relação á sua evolução clínica.

Apesar da mutação no codão 13 do gene *KRAS* estar associada a um pior prognóstico e a uma taxa de sobrevivência menor, existem estudos que tem relatado alguma sensibilidade dos doentes portadores desta mutação, a terapêuticas *anti-EGFR*.<sup>(45,46)</sup>

Existem também evidências, que doentes com tumores *wild-type*, estadio IV, quando submetidos a quimioterapia convencional, combinada com terapêutica *anti-EGFR*, tem uma melhoria significativa no seu prognóstico.<sup>(47)</sup>

Olhando para os nossos doentes, os doentes número 3,5 e 11, poderiam ter sido submetidos a esta combinação terapêutica, podendo mostrar que a discordância poderia influenciar a resposta ao tratamento.

Apesar de estudos, demonstrarem existir discordância mutacional entre lesões,<sup>(35,39,43,44)</sup> estudos mais alargados são de extrema importância para entender a fisiopatologia destes casos específicos de CCR.

No nosso estudo verificou-se que 35,7% dos tumores síncronos não exibiam concordância mutacional relativamente aos genes *RAS* e *BRAF*, o que poderá ter grandes implicações na determinação do prognóstico destes doentes.

## 5. Conclusão

Em 2020, o CCR foi responsável por 10% dos casos de cancro em todo o mundo, correspondendo a 9,4% das mortes, um valor um pouco menor do que os casos de cancro do pulmão. É de se esperar que em 2040 o número de novos casos chegue a 3,2 Milhões, tendo em conta o crescimento e o envelhecimento populacional e o desenvolvimento humano.<sup>(20)</sup>

Os avanços na compreensão da fisiopatologia do CCR, levaram a um aumento dos conhecimentos a nível dos tratamentos, tanto curativos, como paliativos. Conseguindo-se, em alguns casos, travar a progressão da doença e aumentar a sobrevivência global.<sup>(20)</sup>

Apesar de todos estes avanços, o CCR ainda é o terceiro tipo de cancro mais diagnosticado, sendo a segunda principal causa de morte, em todo o mundo.<sup>(20)</sup>

Outra das consequências do aumento do conhecimento da fisiopatologia dos tumores foi o desenvolvimento de fármacos direcionados para eliminar ou travar o crescimento de células/moléculas específicas.<sup>(20)</sup>

A escolha por este tipo de tratamento, é cada vez mais uma opção para estes doentes, mas para isso é necessário o conhecimento profundo das lesões.

No caso do CCR, estas terapias dependem, muitas vezes, do estado mutacional dos genes *RAS* e *BRAF*, que influencia a escolha das terapêuticas *anti-EGFR*.

No caso dos tumores síncronos, não existem normas definidas na pesquisa mutacional nomeadamente se deverão ser testados todos os tumores, ou apenas aquele que apresenta um estágio mais avançado, podendo estes estar, ou não, em concordância mutacional entre si.

Com a realização deste estudo, verificou-se que 35,7% dos tumores síncronos não exibiam concordância mutacional relativamente aos genes *RAS* e *BRAF*. Estes resultados poderão ter grandes implicações prognósticas, nomeadamente na escolha terapêutica e consequente *outcome*.

O esclarecimento destas implicações carece de estudos mais alargados, contudo os dados obtidos neste trabalho suportam a importância de testar todas neoplasias em doentes com tumores síncronos.

## Referências Bibliográficas

1. Fialkowski A, Beasley TM, Tiwari HK. Multifactorial Inheritance and Complex Diseases. Em: Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics [Internet]. Elsevier; 2019 [citado 7 de setembro de 2023]. p. 323–58. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128125373000111>
2. Baran B, Mert Ozupek N, Yerli Tetik N, Acar E, Bekcioglu O, Baskin Y. Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterol Res.* 2018;11(4):264–73.
3. Xi Y, Xu P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Transl Oncol.* outubro de 2021;14(10):101174.
4. Cancer today [Internet]. [citado 7 de setembro de 2023]. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/today/home>
5. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi M. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 19 de janeiro de 2017;18(1):197.
6. Stjepanovic N, Moreira L, Carneiro F, Balaguer F, Cervantes A, Balmaña J, et al. Hereditary gastrointestinal cancers: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol.* outubro de 2019;30(10):1558–71.
7. Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T, Przybyłowicz KE. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers.* 22 de abril de 2021;13(9):2025.
8. Lynch HT, Shaw TG. Practical genetics of colorectal cancer. *Chin Clin Oncol.* junho de 2013;2(2):12.
9. Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev.* julho de 2008;129(7–8):391–407.
10. Nouri Nojaded J, Behrouz Sharif S, Sakhinia E. Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI J* 17Doc159 ISSN 1611-2156 [Internet]. 2018 [citado 7 de setembro de 2023]; Disponível em: [https://www.excli.de/vol17/Sakhinia\\_22012018\\_proof.pdf](https://www.excli.de/vol17/Sakhinia_22012018_proof.pdf)
11. Bogaert J, Prenen H. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol.* 2014;27(1):9–14.
12. Cancro LPC o. Sintomas - Cancro do Cólon e do Recto : Liga Portuguesa Contra o Cancro [Internet]. [citado 7 de setembro de 2023]. Disponível em: <http://www.ligacontracancro.pt/cancro-do-colon-e-do-recto-sintomas>
13. Médico de Família, Santiago LM, Paiva JM, Médico de Família. Carcinoma colorretal nos cuidados de saúde primários em Portugal: indicadores de rastreio e frequência. *Rev Port Clínica Geral.* 1 de junho de 2021;37(3):205–12.

14. Colorectal Cancer Information | Understanding Colorectal Cancer [Internet]. [citado 7 de setembro de 2023]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/colon-rectal-cancer.html>
15. Iris D. Nagtegaal, Mark J. Arends, Manuel Salto-Tellez. WHO Classification of Tumours Editorial Board. 5.<sup>a</sup> ed. Lyon, France; 2019. (WHO classification of tumours series; vol. 1).
16. Cancro Colorretal Um Guia para o Doente.
17. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more «personalized» approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin.* março de 2017;67(2):93–9.
18. Grizzi F, Bianchi P, Malesci A, Laghi L. Prognostic value of innate and adaptive immunity in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 14 de janeiro de 2013;19(2):174–84.
19. Biomarker Search - My Cancer Genome [Internet]. [citado 7 de setembro de 2023]. Disponível em: <https://www.mycancergenome.org/content/biomarkers/>
20. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* agosto de 2016;27(8):1386–422.
21. Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, Grody W, Cushman-Vokoun AM, Funkhouser WK, et al. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol.* 1 de maio de 2017;35(13):1453–86.
22. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol.* fevereiro de 2016;39(1):98–106.
23. Chung KY, Gore I, Fong L, Venook A, Beck SB, Dorazio P, et al. Phase II Study of the Anti-Cytotoxic T-Lymphocyte–Associated Antigen 4 Monoclonal Antibody, Tremelimumab, in Patients With Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 20 de julho de 2010;28(21):3485–90.
24. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, et al. Phase I Study of Single-Agent Anti–Programmed Death-1 (MDX-1106) in Refractory Solid Tumors: Safety, Clinical Activity, Pharmacodynamics, and Immunologic Correlates. *J Clin Oncol.* 1 de julho de 2010;28(19):3167–75.
25. Fan F, Schimming A, Jaeger D, Podar K. Targeting the Tumor Microenvironment: Focus on Angiogenesis. *J Oncol.* 2012;2012:1–16.
26. Min BS, Kim NK, Jeong HC, Chung HC. High levels of serum VEGF and TIMP-1 are correlated with colon cancer liver metastasis and intrahepatic recurrence after liver resection. *Oncol Lett.* julho de 2012;4(1):123–30.
27. Schwartz RN, Blanke CD, Pesko LJ. Targeted therapies in the treatment of colorectal cancer: what managed care needs to know. *J Manag Care Pharm JMCP.* outubro de 2004;10(5 Suppl B):S2-13; quiz S14-17.

28. Wolpin BM, Mayer RJ. Systemic Treatment of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. maio de 2008;134(5):1296-1310.e1.
29. Leslie A, Steele RJC. Management of colorectal cancer. *Postgrad Med J*. 1 de agosto de 2002;78(922):473–8.
30. Zijp JVDVV, Hoekstra HJ, Basson MD. Evolving management of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2008;14(25):3956.
31. Compton CC. Colorectal Carcinoma: Diagnostic, Prognostic, and Molecular Features. *Mod Pathol*. abril de 2003;16(4):376–88.
32. diagnostico-estadiamento-e-tratamento-do-adenocarcinoma-do-colon-e-do-reto.pdf [Internet]. [citado 7 de setembro de 2023]. Disponível em: <https://normas.dgs.min-saude.pt/wp-content/uploads/2019/09/diagnostico-estadiamento-e-tratamento-do-adenocarcinoma-do-colon-e-do-reto.pdf>
33. Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 20 de março de 2020;5(1):22.
34. Zauber P, Huang J, Sabbath-Solitare M, Marotta S. Similarities of Molecular Genetic Changes in Synchronous and Metachronous Colorectal Cancers Are Limited and Related to the Cancers' Proximities to Each Other. *J Mol Diagn*. setembro de 2013;15(5):652–60.
35. Thomas V, Cotter MB, Tosetto M, Khaw YL, Geraghty R, Winter DC, et al. Personalised mapping of tumour development in synchronous colorectal cancer patients. *Npj Genomic Med*. 3 de julho de 2020;5(1):27.
36. Lam AKY. Synchronous colorectal cancer: Clinical, pathological and molecular implications. *World J Gastroenterol*. 2014;20(22):6815.
37. Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*. 1 de janeiro de 2011;60(1):116–29.
38. Idylla Oncology Tests | Biocartis [Internet]. [citado 7 de setembro de 2023]. Disponível em: <https://www.biocartis.com/en/meet-idylla/idylla-oncology-tests>
39. Wang X, Fang H, Cheng Y, Li L, Sun X, Fu T, et al. The molecular landscape of synchronous colorectal cancer reveals genetic heterogeneity. *Carcinogenesis*. 3 de maio de 2018;39(5):708–18.
40. Yang J, Peng JY, Chen W. Synchronous Colorectal Cancers: A Review of Clinical Features, Diagnosis, Treatment, and Prognosis. *Dig Surg*. 2011;28(5–6):379–85.
41. Nosho K, Kure S, Irahara N, Shima K, Baba Y, Spiegelman D, et al. A Prospective Cohort Study Shows Unique Epigenetic, Genetic, and Prognostic Features of Synchronous Colorectal Cancers. *Gastroenterology*. novembro de 2009;137(5):1609-1620.e3.
42. He K, Wang Y, Zhong Y, Pan X, Si L, Lu J. KRAS Codon 12 Mutation is Associated with More Aggressive Invasiveness in Synchronous Metastatic Colorectal Cancer (mCRC): Retrospective Research. *OncoTargets Ther*. dezembro de 2020;Volume 13:12601–13.

43. De Macedo MP, De Melo FM, Da Silva Ribeiro J, Lopes De Mello CA, De Souza Begnami MDF, Soares FA, 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*. 9 de fevereiro de 2015;2(2):125–30.
44. Giannini R, Lupi C, Loupakis F, Servadio A, Cremolini C, Sensi E, et al. KRAS and BRAF genotyping of synchronous colorectal carcinomas. *Oncol Lett*. maio de 2014;7(5):1532–6.
45. Tan C, Du X. KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 7 de outubro de 2012;18(37):5171–80.
46. Chen J, Ye Y, Sun H, Shi G. Association between KRAS codon 13 mutations and clinical response to anti-EGFR treatment in patients with metastatic colorectal cancer: results from a meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol*. janeiro de 2013;71(1):265–72.
47. Colon Cancer Treatment (PDQ®) - NCI [Internet]. 2023 [citado 15 de setembro de 2023]. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/colorectal/hp/colon-treatment-pdq>