

Florinda Almeida Santos

**AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA E DA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÃO DOS GENES *BRAF*, *NRAS* e DO
STATUS DE *MSI* NOS PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL METASTÁTICO *KRAS*
SELVAGEM TRATADOS COM CETUXIMABE NO HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Mestre em oncologia.

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Raphael L. C. Araújo

Coorientador: Prof. Dr. Rui Manuel Reis

Barretos, SP

2019

Florinda Almeida Santos

**AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA E DA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÃO DOS GENES *BRAF*, *NRAS* e DO
STATUS DE *MSI* NOS PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL METASTÁTICO *KRAS*
SELVAGEM TRATADOS COM CETUXIMABE NO HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Mestre em oncologia.

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Raphael L. C. Araújo

Coorientador: Prof. Dr. Rui Manuel Reis

Barretos, SP

2019

S237a Santos, Florinda Almeida.

Avaliação da sobrevida e da frequência de mutação dos genes BRAF, NRAS e do status de MSI nos pacientes com câncer colorretal metastático KRAS selvagem tratados com cetuximabe no hospital de câncer de Barretos. / Florinda Almeida Santos. - Barretos, SP 2019.

140 f. : il.

Orientador: Dr. Raphael Leonardo Cunha de Araújo.

Coorientador: Dr. Rui Manuel Reis.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2019.

1. Genes. 2. Neoplasias colorretais. 3. Proteínas Proto-Oncogênicas B-raf. 4. Instabilidade de microssatélites. 5. Sobrevida. 6. Cetuximabe. I. Autor. II. Araújo, Raphael Leonardo Cunha de. III. Reis, Rui Manuel. IV. Título.

CDD 616.994

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por (Martins Fideles dos Santos Neto) CRB 8/9570
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Florinda Almeida Santos

AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA E DA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÃO DOS GENES BRAF, NRAS e DO STATUS DE MSI NOS PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL METASTÁTICO KRAS SELVAGEM TRATADOS COM CETUXIMABE NO HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 27/09/2019

Banca Examinadora:

Dr. Allan Ândresson Lima Pereira

Oncologista clínico titular do Hospital Sírio-Libanês - Brasília-DF

Dr. Alexandre Andrade dos Anjos Jácome

MD Anderson Cancer Center, em Houston - USA

Dr. Raphael Leonardo Cunha de Araújo

Orientador

Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Coorientador

Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Presidente da Banca

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas, não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

Dedico este estudo à minha mãe Tereza, exemplo de força e luta! Ao meu irmão Nivaldo que sempre apostou em mim e me incentivou na busca dos meus sonhos! E ao meu esposo Domício e filha Lara que souberam compreender minhas ausências nos períodos de estudos!

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes e ao Hospital de Câncer de Barretos, sem os quais este estudo não seria possível.

Ao Dr. Raphael Araújo, exemplo de profissionalismo, que abraçou a minha causa, me estimulou e me ajudou em todas as etapas.

Ao Dr. Rui Reis, exemplo de liderança, profissionalismo, dedicação e paciência, pelo acolhimento e apoio constantes.

Ao meu esposo Domício e filha Lara, por compreenderem minha ausência nestes últimos 3 anos.

À Banca de Acompanhamento e Defesa (Dr Allan Andresson Lima, Dra Ana Carolina de Carvalho, Dr Alexandre Andrade dos Anjos Jácome), pelas contribuições, dedicação e disponibilidade.

Aos meus familiares, pelas orações, força e por sempre torcerem por mim.

À Lucas de Castro, que tanto me ajudou na coleta dos dados e em outras etapas do processo, excelente profissional.

Ao Gustavo Berardinelli, pela grande ajuda com a análise molecular e pela disponibilidade para me ensinar a parte técnica dos testes.

Ao Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística (NEB), em especial à **bioestatística Isabela**, por ter conduzindo todas as análises estatísticas e ter tido tanta paciência comigo.

Ao Martins e à Milene da biblioteca, pela ajuda nas horas de tempestade.

À Comissão de Pós-Graduação pela ajuda em todas as etapas deste projeto.

Aos amigos da oncologia clínica, Arinilda, Marcelo Drude e Gustavo, pelo apoio constante.

Aos Departamentos de Oncologia Clínica Digestivo, ao SAME (Serviço de Arquivos Médicos e Estatística) e à Patologia (em especial **ao Dr. Marcus Matsushita**) pelo apoio técnico na condução deste estudo.

À Dra. Josiane, por ter suportado minhas ausências na coordenação da residência.

À Jéssica, pela ajuda com a formatação deste estudo!

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer Colorretal no Mundo, nos EUA e no Brasil	1
1.2	Fatores etiológicos e patogênicos do CCR	2
1.3	Fatores moleculares no CCR	4
1.3.1	Diferenças moleculares entre cólon direito e esquerdo	5
1.3.2	Genes <i>KRAS</i> e <i>NRAS</i> no CCR	6
1.3.3	Gene <i>BRAF</i> no CCR	8
1.3.3.1	Frequência da mutação do <i>BRAF</i> V600E no Brasil	10
1.3.3.2	Mutações do <i>BRAF</i> não V600	10
1.3.4	Concordância da análise da mutação dos genes <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> e <i>BRAF</i> no tumor primário e nas metástases	11
1.3.5	Instabilidade de microssatélites no CCR	11
1.4	Tratamento com Cetuximabe no CCR	12
1.4.1	Gene <i>BRAF</i> e possível resistência à terapia anti-EGFR	14
1.4.2	Lateralidade do tumor primário e resposta terapêutica ao Cetuximabe	16
1.4.3	Cetuximabe em pacientes com CCR politratados	17
1.5	Tratamento dos pacientes com CCRm <i>BRAF</i> mutado	17
2.	JUSTIFICATIVA	19
3.	OBJETIVOS	20
3.1	Objetivo primário	20
3.2	Objetivos secundários	20

4.	MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1	Desenho do estudo	21
4.2	Coleta de dados	21
4.3	População do estudo	21
4.3.1	Critérios de inclusão	21
4.3.2	Critérios de exclusão	22
4.4	Descrição da pesquisa molecular	23
4.4.1	Extração do DNA	23
4.4.2	Avaliação da presença da mutação do gene <i>BRAF</i> V600E	24
4.4.3	Avaliação da presença da mutação dos genes <i>KRAS</i> e <i>NRAS</i>	24
4.4.4	Avaliação da instabilidade de microssatélites	25
4.5	Avaliação da taxa de resposta ao Cetuximabe	26
4.6	Descrição dos protocolos de tratamento com Cetuximabe	27
5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
6.	RESULTADOS	29
6.1	Características gerais dos pacientes incluídos no estudo	29
6.2	Dados do tratamento cirúrgico	31
6.3	Dados do tratamento pré-operatório	32
6.4	Dados do tratamento adjuvante	32
6.5	Dados da recidiva	33
6.6	Dados da quimioterapia paliativa	34
6.6.1	Quimioterapia paliativa de primeira linha	34

6.6.2	Quimioterapia paliativa de segunda linha	35
6.6.3	Quimioterapia paliativa de terceira linha	36
6.6.4	Quimioterapia paliativa de quarta linha	37
6.6.5	Quimioterapia paliativa de quinta linha	38
6.7	Dados do tratamento paliativo com Cetuximabe	38
6.8	Dados moleculares	40
6.8.2	Dados moleculares do gene <i>BRAF</i>	40
6.8.3	Dados moleculares do gene <i>NRAS</i>	43
6.8.4	Dados da análise de instabilidade de microssatélites	47
6.8.5	Associação entre o status de <i>BRAF</i> e <i>NRAS</i> com o status de MSI	51
6.9	Avaliação de resposta ao Cetuximabe	52
6.10	Análises de sobrevida global	55
6.10.1	Análises de sobrevida global geral	55
6.10.2	Análises de sobrevida global estratificada por subgrupos	56
6.10.3	Análises de sobrevida global estratificada por protocolo de tratamento com Cetuximabe	59
6.10.4	Análises de sobrevida global estratificada pela lateralidade do tumor primário	59
6.10.5	Análises de sobrevida global estratificada por <i>status</i> de <i>BRAF</i>	60
6.10.6	Análises de sobrevida global estratificada por <i>status</i> de MSI	63
6.10.7	Análises de sobrevida global estratificada por <i>status</i> de <i>NRAS</i>	66
6.10.8	Análise de sobrevida global estratificada pelo <i>status de BRAF e MSI</i>	69
6.10.9	Análise de sobrevida global estratificada por <i>status</i> de <i>BRAF</i> e de <i>NRAS</i>	71

6.11	Análise multivariada para sobrevida por meio de regressão de Cox	72
7.	DISCUSSÃO	74
7.1	Dados demográficos e de tratamento	74
7.2	Dados moleculares	75
7.3	Avaliação de resposta ao Cetuximabe	80
7.4	Análises de sobrevida global	83
7.5	Análise multivariada para sobrevida por meio de regressão de Cox	93
8.	CONCLUSÃO	95
9.	REFERÊNCIAS	96
10.	ANEXOS	114
10.1	Anexo A - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	114
10.2	Anexo B - Ficha estruturada para coleta de dados clínico-patológicos	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição de casos e mortes para os 10 cânceres mais comuns no mundo em 2018 para ambos os sexos. Os cânceres de pele não-melanoma estão incluídos na categoria “outros”.	1
Figura 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.	2
Figura 3 - Anatomia do intestino grosso	3
Figura 4 - Via de sinalização celular no CCR.	7
Figura 5 - Via de sinalização MAPK no câncer colorretal	9
Figura 6 - Mecanismo de ação da terapia anti-EGFR, destacando-se o Cetuximabe.	13
Figura 7 - Fluxograma do número de pacientes em cada estágio do estudo	23
Figura 8 - Localização do tumor primário.	30
Figura 9 - Protocolos de quimioterapia adjuvante	33
Figura 10 - Sítios de metástase na recidiva	34
Figura 11 - Protocolos de quimioterapia administrados na primeira linha	35
Figura 12 - Protocolos de quimioterapia administrados na segunda linha	36
Figura 13 - Protocolos de quimioterapia administrados na terceira linha	37
Figura 14 - Protocolos de quimioterapia administrados na quarta linha	37
Figura 15 - Protocolos de quimioterapia administrados na quinta linha	38
Figura 16 - Linhas de Tratamento com Cetuximabe	39
Figura 17 - Exemplo de laudo do resultado do teste cobas 4800 para pesquisa da mutação do gene <i>BRAF</i>	41

Figura 18 - Resultados da pesquisa da mutação do <i>BRAF</i>	42
Figura 19 - Análise de mutação do <i>NRAS</i> (códon 12) por sequenciamento direto	45
Figura 20 - Resultados da pesquisa da mutação do <i>NRAS</i>	46
Figura 21 - Análise de fragmentos com seis marcadores (NR27, NR21, NR24, BAT25, BAT26 e HSP110) para pesquisa molecular de MSI em uma amostra com estabilidade de microsatélite (MSS).	48
Figura 22 - Análise de fragmentos com seis marcadores (NR27, NR21, NR24, BAT25, BAT26 e HSP110) para pesquisa molecular de MSI em uma amostra com instabilidade de microsatélite (MSI-H)	49
Figura 23 - Resultados da pesquisa da Instabilidade de microsatélites	50
Figura 24 - Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global	56
Figura 25 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global por protocolo de tratamento com Cetuximabe	59
Figura 26 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global pela lateralidade do tumor primário	60
Figura 27 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global pelo <i>status</i> de <i>BRAF</i>	61
Figura 28 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global dos pacientes <i>BRAF</i> mutado pela lateralidade do tumor primário	62
Figura 29 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global dos pacientes <i>BRAF</i> não mutado pela lateralidade do tumor primário	63
Figura 30 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global pelo <i>status</i> de MSI	64
Figura 31 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global dos pacientes MSI-H pela lateralidade do tumor primário	65

Figura 32 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global dos pacientes MSS/MSI-L pela lateralidade do tumor primário	66
Figura 33 - Curvas de Kaplan Meier de sobrevida global pelo <i>status</i> de <i>NRAS</i>	67
Figura 34 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global dos pacientes <i>NRAS</i> mutado pela lateralidade do tumor primário	68
Figura 35 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global dos pacientes <i>NRAS</i> não mutado pela lateralidade do tumor primário	69
Figura 36 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global para os pacientes MSI-H pelo <i>status</i> de <i>BRAF</i>	70
Figura 37 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global para os pacientes MSI-L/MSS pelo <i>status</i> de <i>BRAF</i>	71
Figura 38 - Curvas de Kaplan- Meier de sobrevida global estratificada pelo <i>status de BRAF</i> e <i>NRAS</i> (<i>BRAF</i> e <i>NRAS</i> não mutados versus <i>BRAF</i> mutado versus <i>NRAS</i> mutado)	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características gerais dos 211 pacientes incluídos no estudo	29
Tabela 2 - Sítios de metastasectomia	31
Tabela 3 - Características clínicas e demográficas dos pacientes com mutação do <i>BRAF</i>	42
Tabela 4 - Análise do <i>status</i> de <i>BRAF</i> estratificada pelo sexo, idade, grau histológico e lateralidade do tumor primário	43
Tabela 5 - Características clínicas e demográficas dos pacientes com mutação do <i>NRAS</i>	46
Tabela 6 - Análise do <i>status</i> de <i>NRAS</i> estratificada pelo sexo, idade, grau histológico e lateralidade do tumor primário	47
Tabela 7 - Características clínicas e demográficas dos pacientes MSI-H	50
Tabela 8 - Análise do <i>status</i> de MSI estratificada pelo sexo, idade e grau histológico	51
Tabela 9 - Associação entre o <i>status</i> de <i>NRAS</i> e <i>BRAF</i> com o <i>status</i> de MSI	52
Tabela 10 - Avaliação de resposta ao Cetuximabe por <i>status</i> de <i>BRAF</i> , <i>NRAS</i> , lateralidade do tumor primário e protocolo de tratamento com Cetuximabe	53
Tabela 11 - <i>Status</i> de sobrevida dos pacientes incluídos no estudo	54
Tabela 12 - Estimativa de sobrevida global para os pacientes tratados com Cetuximabe	55
Tabela 13 – Análises de sobrevida por subgrupos nos pacientes tratados com Cetuximabe	57
Tabela 14 - Estimativa de sobrevida pela lateralidade do tumor primário	60
Tabela 15 - Probabilidade de sobrevida por <i>status</i> do gene <i>BRAF</i>	61
Tabela 16 - Sobrevida global por <i>status</i> de <i>BRAF</i> e lateralidade do tumor primário	62
Tabela 17 - Estimativa de sobrevida global quanto ao <i>status</i> de MSI	64
Tabela 18 - Sobrevida global por <i>status</i> MSI e lateralidade do tumor primário	65

Tabela 19 - Estimativa de sobrevida global por <i>status</i> de <i>NRAS</i>	67
Tabela 20 - Sobrevida global por <i>status</i> de <i>NRAS</i> e lateralidade do tumor primário	68
Tabela 21 - Sobrevida global por <i>status</i> de <i>BRAF</i> e MSI	70
Tabela 22 - Análise de sobrevida global estratificada pelo <i>status</i> de <i>BRAF</i> e <i>NRAS</i>	71
Tabela 23 - Análise multivariada para sobrevida global	73
Tabela 24 - Características dos estudos incluídos e frequência de mutação do <i>BRAF</i>	76
Tabela 25 - Dados de frequência de MSI no Brasil e no mundo	79
Tabela 26 - Resultados de taxa de resposta em pacientes com CCR metastático tratados com Cetuximabe + Irinotecano no Brasil e no Mundo	81
Tabela 27 - Resultados de sobrevida global em pacientes com CCR metastático tratados com Cetuximabe + Irinotecano no Brasil e no Mundo	85
Tabela 28 - Características dos estudos incluídos e resultados de sobrevida global para os pacientes <i>BRAF</i> mutado	90

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT	Protein kinase B
BRAF-V	Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CCRm	Câncer Colorretal Metastático
CD	Cólon Direito
CE	Cólon Esquerdo
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer CCR - Câncer Colorretal
CIMP	CpG island methylator phenotype (fenótipo metilante)
CIN	Chromosomal Instability (instabilidade cromossômica)
CMS	Consensus Molecular Subtypes
DNA	Deoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ESMO	European Society for Medical Oncology (Sociedade Européia de Oncologia Médica)
GDP	Difosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
IAL	Invasão Angio-Linfática
IC	Intervalo de Confiança
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPN	Invasão Perineural
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
MLH	1 MutL Homolog 1
MMR	Mismatch Repair
MSH2	MutS Homolog 2
MSH3	MutS Homolog 3
MSH6	MutS Homolog 6
MSI	Microsatellite Instability (Instabilidade de Microsatélite)

MSI-H	Microsatellite Instability – High (Alta Instabilidade de Microsatélite)
MSI-L	Microsatellite Instability – Low (Baixa Instabilidade de Microsatélite)
MSS	Microsatellite Stable (Estabilidade de Microsatélite)
MTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
Mut	Mutado
NGS	Next-generation sequencing
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NRAS	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
OR	Odds Ratio
ORR	Objective response rate (taxa de resposta objetiva)
p53	Tumor Protein P53
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
PMS2	PMS1 Homolog 2
QT	Quimioterapia
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (Critérios de Avaliação de resposta em tumores sólidos)
RR	Risco Relativo
SAME	Serviço de Arquivos Médicos e Estatística
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results
SG	Sobrevida Global
SISONCO	Sistema Informatizado de Dados Oncológicos
SLP	Sobrevida livre de Progressão
SNC	Sistema Nervoso Central
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TGFB	Transforming Growth Factor Beta
TP53	Tumor Protein P53
WNT	Wingless Type MMTV Integration Site Family

WT

Wild- Type

μL

Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
μL	Microlitro
≤	Menor ou Igual
≥	Maior ou Igual
=	Igual
+	Mais ou Positivo
>	Maior
=	Igual

RESUMO

Santos FA. Avaliação da sobrevida e da frequência de mutação dos genes *BRAF* e *NRAS* e do status de MSI nos pacientes com câncer colorretal metastático *KRAS* selvagem tratados com Cetuximabe no Hospital de Câncer de Barretos. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2019.

JUSTIFICATIVA: Este estudo justifica-se pela relevância prognóstica dos genes *BRAF* e *NRAS* e do status de MSI no câncer colorretal (CCR) e pelo pequeno número de estudos avaliando a frequência de mutação destes genes e do status da instabilidade de microssatélites nos tumores colorretais na população brasileira. Justifica-se também por ser um dos primeiros estudos na população brasileira que tem o intuito de confirmar os achados prévios em relação à eficácia do Cetuximabe no tratamento do CCR avançado em uma população enriquecida de pacientes politratados, refratários. **OBJETIVO:** Avaliar a sobrevida e a frequência da mutação dos genes *BRAF* e *NRAS* e do status de MSI nos pacientes com câncer colorretal avançado *KRAS* selvagem tratados com Cetuximabe no Hospital de Câncer de Barretos. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Trata-se de um estudo de coorte retrospectivo, realizado através da avaliação dos prontuários de pacientes com diagnóstico de câncer colorretal metastático ou localmente avançado, *KRAS* selvagem, submetidos a tratamento com Cetuximabe no Hospital de Câncer de Barretos. Dados demográficos, clínicos e patológicos foram avaliados de maneira descritiva. Foram realizadas análises univariadas para sobrevida global por variáveis e regressão de Cox foi usada para análise multivariada. **RESULTADOS:** A sobrevida mediana dos 211 pacientes tratados com Cetuximabe no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2016 foi 10,4 meses (IC 95%: 8,14-12,75), sendo de 6,6 meses (IC 95%: 5,27-8,06) para os tumores do cólon direito e 11,5 meses (IC 95%: 9,18-13,87) para os tumores do cólon esquerdo ($p=0,02$). A frequência de mutação do *BRAF* foi de 3,9% com sobrevida mediana de 4,9 meses (IC 95%: 0,61-9,17) e para o *NRAS* foi encontrada mutação em 3,38% dos pacientes com mediana de sobrevida de 6,9 meses (IC 95%: 1,40-12,53). Foi encontrada uma frequência de MSI-H de 3,3%, com sobrevida mediana de 4,6 meses (IC 95%: 4,48-4,65). Na análise multivariada para estimativa de sobrevida apenas a variável lateralidade manteve significância estatística (HR = 2,6, [IC 95% 1,41–4,72]), sendo maior o risco de óbito nos pacientes com tumores do cólon D. **CONCLUSÃO:** A sobrevida global bem como a frequência de mutação de *NRAS* e de MSI foram próximas às encontradas em outros estudos que avaliaram o Cetuximabe em pacientes politratados e refratários a outras linhas de tratamento. Já a frequência de mutação do *BRAF* foi inferior ao encontrado em estudos prévios. As mutações de *BRAF* e *NRAS*, bem como a presença de MSI, estão associados a menor sobrevida nas análises univariadas, mas apenas a lateralidade manteve-se como fator prognóstico independente após análise multivariada.

PALAVRAS-CHAVE: Genes; Neoplasias Colorretais; Proteínas Proto-Oncogênicas B-raf; Instabilidade de Microssatélites; Sobrevida; Cetuximabe.

ABSTRACT

Santos FA. *Survival and mutation frequency of BRAF and NRAS genes and MSI status in patients with wild-type metastatic colorectal cancer treated with Cetuximab at Barretos Cancer Hospital. Dissertation (Master)*. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2019

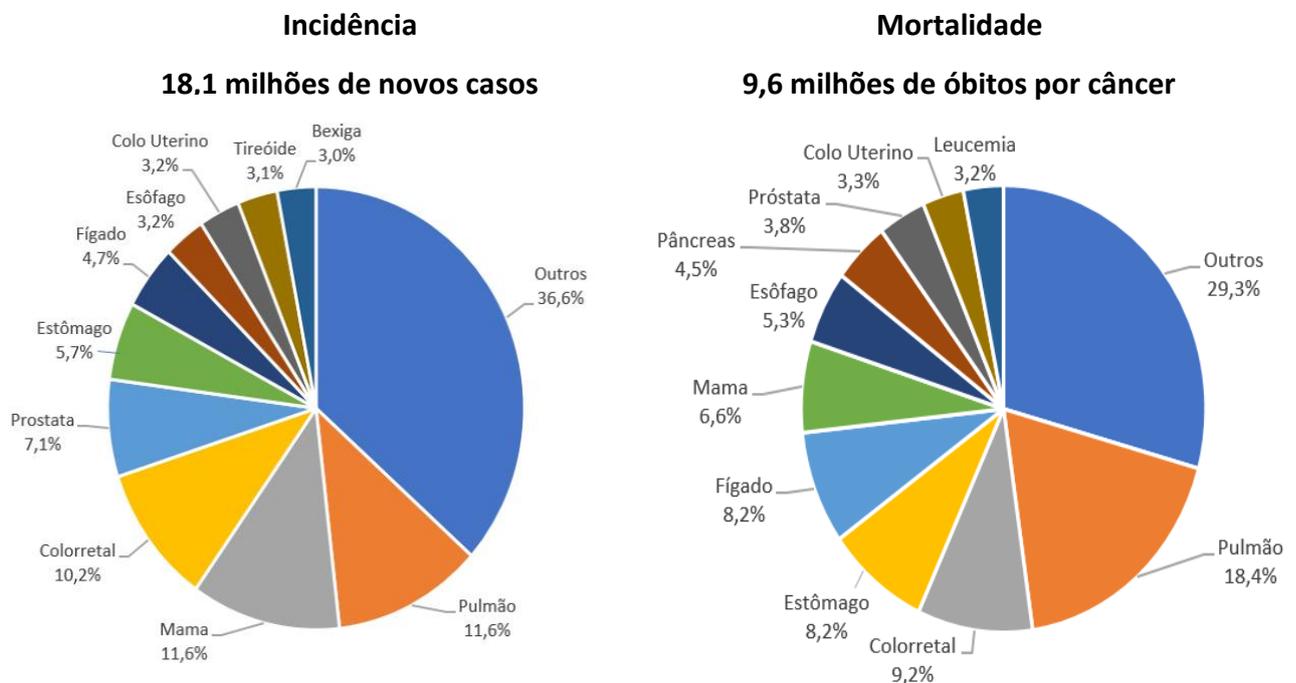
BACKGROUND: This study is justified by the prognostic relevance of *BRAF* and *NRAS* genes and microsatellite instability (MSI) status in colorectal cancer (CRC), and the small number of studies evaluating the mutation frequency of these genes as well as the status of MSI in colorectal tumors in Brazil. In addition, it is one of the first studies in the Brazilian population that aims to confirm previous findings regarding the efficacy of Cetuximab in the treatment of advanced CRC in an enriched population of refractory polytreated patients. **AIM:** To evaluate the survival and frequency of *BRAF* and *NRAS* gene mutation and MSI status in patients with advanced colorectal cancer treated with Cetuximab at Barretos Cancer Hospital. **METHODS:** This is a retrospective cohort study conducted through the medical records of patients diagnosed with metastatic or locally advanced colorectal cancer, wild-type *KRAS*, treated with Cetuximab at the Barretos Cancer Hospital. Demographic, clinical and pathological data were evaluated descriptively. Univariate analyzes were performed for overall survival by variables and Cox regression was used for multivariate analysis. **RESULTS:** Median survival for patients treated with Cetuximab from January 2011 to December 2016 was 10.4 months (95% CI 8.14-12.75), for right colon tumors was 6.6 months (95% CI 5.27-8.06) and for left colon tumors 11.5 months (95% CI 9.18-13.87), $p=0.02$. The *BRAF* mutation frequency was 3.9%, median survival of 4.9 months (95% CI 0.61-9.17) and for *NRAS* the mutation was found in 3.38% of patients with median survival of 6.9 months (95% CI 1.40-12.53). The frequency of MSI-H of 3.3% was found, with a median survival of 4.6 months (95% CI 4.48-4.65). In the multivariate analysis for survival only the laterality variable was statistically significant (HR = 2.6, [95% CI 1.41–4.72]), being the risk of death higher in patients with right colon tumors. **CONCLUSION:** Survival of Cetuximab-treated patients, as well as *NRAS* mutation and MSI frequency, were approximate to that found in other studies evaluating Cetuximab in polytreated patients refractory to other treatment lines. The *BRAF* mutation frequency is not as high as other studies previously done. *BRAF* and *NRAS* mutation as well MSI are associated with a smaller survival in univariate analyzes, but only the laterality maintained statistical significance after the multivariate analysis.

KEYWORDS: Genes; Colorectal neoplasms; Proto-Oncogene proteins B-raf; Microsatellite Instability; Survival; Cetuximab.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Colorretal no Mundo, nos EUA e no Brasil

O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia muito comum no Brasil, nos EUA e no mundo. Segundo dados do GLOBOCAN 2018, a estimativa foi de 1,096,601 novos casos de câncer de cólon e 704,376 novos casos de câncer de reto no mundo. Somando os casos de tumores de cólon e reto, totalizando 10,2% dos novos casos de câncer em 2018. A estimativa de mortes para câncer de cólon foi de 551,269 (5,8% das mortes por câncer) e para câncer de reto 310,394 (3,2% das mortes por câncer) (Figura 1)¹.



Fonte: Adaptado de GLOBOCAN 2018¹

Figura 1 - Distribuição de casos e mortes para os 10 cânceres mais comuns no mundo em 2018 para ambos os sexos. Os cânceres de pele não-melanoma estão incluídos na categoria “outros”.

Nos EUA, o CCR é o terceiro câncer mais comum em homens e mulheres. A estimativa para 2018 foi de 140,250 novos casos (97,220 para câncer de cólon e 43,030 para câncer de reto). Estimou-se 50,630 mortes para 2018 em decorrência do câncer colorretal, sendo a terceira causa de morte por câncer em homens e em mulheres ².

No Brasil, estima-se 36,360 novos casos de câncer colorretal por ano para o biênio 2018-2019 (17,380 em homens e 18,980 em mulheres). O câncer de cólon e reto é o terceiro câncer mais comum em homens e o segundo câncer mais comum em mulheres (Figura 2)³. A estimativa de mortes segundo o Atlas de Mortalidade por câncer de 2015 foi de 16,697, sendo 8,163 mortes em homens e 8,533 em mulheres⁴.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	15.820	26,9%	Homens 	Mulheres 	Mama feminina	11.860	20,3%
Estômago	3.140	5,3%			Colo do útero	6.030	10,3%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	2.920	5,0%			Cólon e Reto	2.800	4,8%
Cólon e Reto	2.260	3,8%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	2.310	3,9%
Cavidade Oral	1.890	3,2%			Glândula Tireoide	2.220	3,8%
Laringe	1.550	2,6%			Estômago	2.110	3,6%
Esôfago	1.460	2,5%			Ovário	1.480	2,5%
Leucemias	1.380	2,3%			Corpo do útero	1.470	2,5%
Sistema Nervoso Central	1.290	2,2%			Sistema Nervoso Central	1.100	1,9%
Linfoma não Hodgkin	1.000	1,7%			Leucemias	1.090	1,9%

Fonte: Adaptado de Estimativa 2018 INCA³.

Figura 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.

Nas últimas 2 décadas, houve um lento, mas constante declínio nas taxas de mortalidade por CCR. No entanto, esta tendência não é presente em todos os subgrupos, em especial quanto a localização anatômica dos tumores, já que existem informações contraditórias na relação entre a localização do CCR e a sua mortalidade⁵. Usando o banco de dados do SEER entre os anos de 1998 e 2003, houve um aumento de 5% na mortalidade para tumores do lado direito comparado a tumores de cólon esquerdo nos EUA. A sobrevida mediana para os tumores do lado direito foi de 78 meses versus 89 meses para cânceres do lado esquerdo ($P < 0,001$)⁶. O mesmo comportamento foi observado na base de dados criada por um estudo observacional multicêntrico alemão que encontrou um aumento ainda maior (12%) na mortalidade para cânceres do lado direito em comparação com o lado esquerdo⁷.

1.2 Fatores etiológicos e patogênicos do CCR

Os fatores causais envolvidos no desenvolvimento do CCR são heterogêneos e complexos. Existem várias diferenças embriológicas e biológicas entre o cólon proximal e

distal. O segmento proximal do intestino grosso, incluindo o ceco, cólon ascendente e dois terços proximais do cólon transverso, surgem do intestino médio embrionário e recebem perfusão sanguínea da artéria mesentérica superior. Por sua vez, o segmento distal do intestino grosso da flexura esplênica até o canal anal superior se origina no intestino posterior embrionário e recebe a perfusão sanguínea da artéria mesentérica inferior⁸.

O CCR está localizado no intestino grosso que é a parte final do tubo digestivo, composto pelo ceco, cólon e reto. São divididos em tumores do cólon direito (CD) e tumores do cólon esquerdo (CE) baseado na localização antes ou depois da flexura esplênica, respectivamente. Sabidamente os cânceres do cólon direito tendem a ser volumosos, pouco diferenciados, exofíticos e polipóides, crescendo no lúmen intestinal e causando anemia. Por outro lado, os tumores do cólon esquerdo tendem a ser constrictivos causando muitas vezes obstrução intestinal como apresentação inicial da doença⁹ (Figura 3).



Fonte: Medical 2019¹⁰.

Figura 3 - Anatomia do intestino grosso

Os fatores de risco para o desenvolvimento do CCR incluem fatores genéticos, dietéticos e de estilo de vida. Dentre os fatores genéticos destacam-se a polipose adenomatosa familiar e a Síndrome de Lynch, responsáveis por 5% dos casos de CCR¹¹. Até 10% dos casos de CCR apresentam uma ou mais mutações patogênicas, dentre elas, mutações nos genes *APC*, *BRCA*, *TP53*, *PALB2*¹².

Outros mecanismos de propensão ao CCR, incluem a doença inflamatória intestinal, obesidade, diabetes mellitus, alto consumo de carnes vermelhas, tabagismo, etilismo,

sedentarismo^{13,14}. Os pólipos adenomatosos, são, provavelmente, as mais importantes lesões precursoras do CCR¹⁵.

1.3 Fatores moleculares no CCR

Existem alterações gênicas bem definidas envolvidas na patogênese do CCR. A instabilidade cromossômica (CIN - *Chromosomal Instability*), a instabilidade de microssatélite (MSI - *Microsatellite Instability*), e o fenótipo metilante (CIMP - *CpG Island Methylator Phenotype*) são as três vias genéticas clássicas na patogênese do CCR e funcionam de forma interligada. Quando alteradas, afetam importantes vias de sinalização celular do CCR, como a via MAPK (*KRAS*, *NRAS* e *BRAF*), PI3K, e TP53¹⁶. Aproximadamente 85-90% dos casos de CCR se originam na via de instabilidade cromossômica e apresentam um perfil não hipermutado, ou seja, não possuem elevadas taxas de mutação em seu genoma. O mesmo perfil não hipermutado ocorre nos casos de CCR com o fenótipo metilante. Tumores com CIN apresentam mutações em genes característicos (*APC*, *KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *SMAD4*, *TCF7L2*)¹⁷. Diferentemente disso, os tumores com MSI apresentam um perfil hipermutado, com altas taxas de mutação no genoma¹⁷, sendo os genes *BRAF* (V600E), *APC*, *MSH3* e *MSH6* alvos frequentes de mutação¹⁷.

Estudo multicêntrico recente avaliou dados moleculares de 4151 pacientes e estabeleceu 4 subtipos moleculares do CCR¹⁸. O subtipo molecular 1 (CMS1) ou imune (14% dos casos) é caracterizado pela expressão aumentada de genes associados com um infiltrado imune difuso, principalmente composto por TH1 e células T citotóxicas, em conjunto com forte ativação de vias de evasão imune e associação com MSI e mutações do gene *BRAF*. Tumores CMS2 ou canônicos (37%) exibem diferenciação epitelial e forte regulação positiva dos alvos a jusante das vias de sinalização celular WNT e MYC, implicadas na carcinogênese do CCR. O subtipo CMS3 (13%) é caracterizado pela desregulação metabólica, *KRAS* mutado e um misto de MSI, baixo CIMP e baixo SCNA (alterações no número de cópias somáticas). O CMS4 ou mesenquimal (24%) apresenta ativação de genes implicados na transição epitelial-mesenquimal, ativação do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) da angiogênese e das vias de remodelação da matriz e o sistema inflamatório mediado pelo complemento¹⁸. Esta classificação é a base para futuras estratificações clínicas e intervenções baseadas nos subtipos.

O impacto das mutações dos genes *KRAS* e *BRAF V600E* no CCR varia conforme presença ou ausência de instabilidade de microssatélite. Smeby et al avaliaram o impacto destas mutações nos subtipos moleculares, sendo encontrado um enriquecimento de mutações *BRAF V600E* em tumores CMS1 estando associados à doença metastática com mau prognóstico nestes pacientes. Mutações do *KRAS* foram associadas a resultados adversos em tumores epiteliais (CMS2 / CMS3) com estabilidade de microssatélites. Mutações do gene *BRAF V600E* e do gene *KRAS* foram associadas a menor sobrevida global apenas nos pacientes com estabilidade de microssatélite (MSS)¹⁹.

1.3.1 Diferenças moleculares entre cólon direito e esquerdo

Além de diferentes características clínico patológicas, existem também diferenças moleculares entre o cólon direito e cólon esquerdo. A instabilidade de microssatélites (MSI) e a instabilidade cromossômica são as duas mais frequentemente mencionadas. Os tumores do cólon direito são mais frequentemente diplóides, têm histologia mucinosa, alta MSI, mutações ativadoras dos genes *RAS*, *BRAF* e *PIK3CA* e uma associação com o subtipo 1 do consenso molecular (CMS1). Os cânceres do cólon esquerdo são caracterizados por uma ocorrência mais frequente de instabilidade cromossômica, um perfil de expressão gênica correspondente a uma ativação do receptor de crescimento epitelial (EGFR) e são mais frequentemente aneuplóides^{18, 20, 21}.

Loree et al.²² revisaram retrospectivamente o painel clínico e molecular de 1876 pacientes com CCRm e comparou a prevalência de mutações e sobrevida conforme lateralidade e localização do tumor primário. Foi encontrado uma diferença na prevalência das mutações de vários genes, destacando *BRAF V600*, *KRAS*, *TP53* e *PIK3CA*. A prevalência de mutações do gene *KRAS/NRAS* foi maior nos tumores de ceco e reduziu progressivamente até chegar no cólon descendente, quando o número de mutações voltou a aumentar. A frequência de mutações do *BRAF* foi maior nos tumores de cólon ascendente, flexura hepática (principalmente) e cólon transverso. A partir do cólon transverso a prevalência dessas mutações reduz progressivamente, atingindo as menores frequências nos tumores do reto. Nos tumores de reto e sigmóide foi encontrada maior frequência de mutações do *TP53* e menor frequência de mutações dos genes *PIK3CA*, *BRAF* e MSI. Quanto aos subtipos moleculares, foi encontrado declínio dos subtipos CMS1 e CMS3 e aumento do subtipo CMS2 movendo distalmente (sentido ceco/reto)²².

As diferenças moleculares entre cólon direito versus esquerdo se traduzem em diferentes desfechos clínicos, sendo os tumores de cólon direito de prognóstico acentuadamente pior. Apesar disso, a localização do tumor primário não tem sido, até o momento, fator de estratificação em ensaios clínicos e a influência da localização do tumor primário na resposta a determinadas terapias não é claramente estabelecida²³.

1.3.2 Genes *KRAS* e *NRAS* no CCR

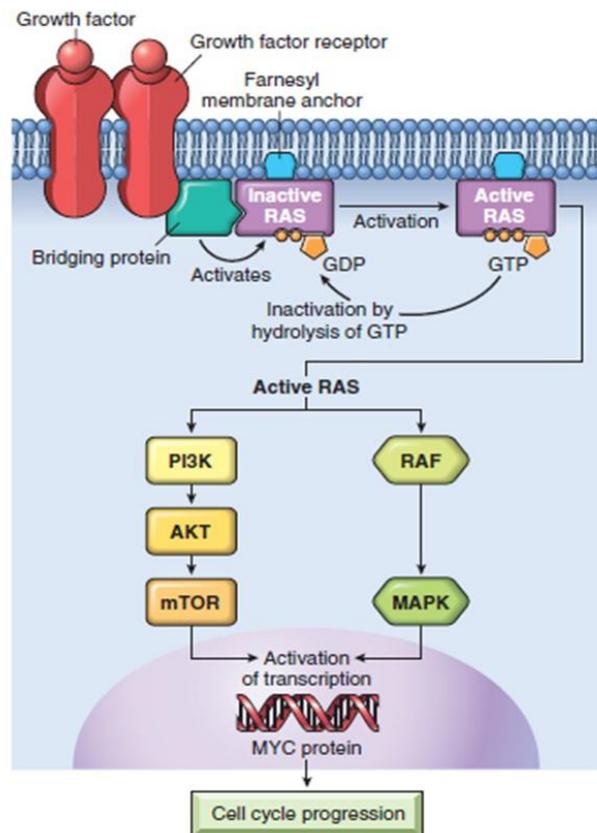
O CCR é caracterizado por mutações recorrentes que desregulam cascatas de sinalização e proporcionam às células do câncer novas características funcionais. A alta frequência de mutações nos genes da via RAS/RAF/MAP/MEK/ERK, nomeadamente em *KRAS* e *BRAF* em câncer humano sugere o seu importante papel tanto na iniciação do tumor quanto na manutenção do seu crescimento²⁴.

Um dos mais importantes alvos moleculares na gênese tumoral do CCR é representada pela via do EGFR²⁵. A ativação do EGFR estimula a proteína quinase ativadora de RAS/RAF e a via PI3K/AKT/mTOR, levando a um estímulo à proliferação celular tumoral²⁵.

KRAS e *NRAS* são oncogenes membros da família RAS. Quando mutados, resultam na ativação constitutiva da sinalização via RAS/MAPK, sendo este um dos mecanismos envolvidos na resistência à terapia anti-EGFR^{26, 27}.

O oncogene *KRAS*, localizado no cromossomo 6, codifica uma proteína com importante papel fisiológico e patogênico no câncer colorretal. Em condições normais, em que o gene *KRAS* codifica a proteína em seu estado denominado selvagem ou wildtype (wt), ou seja, sem mutação a ligação de um fator de crescimento ao seu receptor de membrana (por exemplo, o EGFR) ativa a proteína RAS. Isso desencadeia uma série de etapas enzimáticas que culminam na ativação de genes importantes na manutenção do fenótipo neoplásico. Na presença de determinadas mutações ocorre ativação da proteína independentemente da presença do fator de crescimento. Dessa forma, a presença dessas mutações passou a ser utilizada como biomarcador de resposta ao uso de anticorpos contra EGFR, visto que o bloqueio do receptor passa a não ter efeito terapêutico quando a proliferação celular está continuamente estimulada devido a ativação constitutiva da via pela proteína RAS mutada²⁸. O mesmo processo (molecular e fator preditivo de resposta) ocorre na presença da mutação do gene *NRAS* (Figura 4)²⁶.

Existem outras vias de sinalização celular que são dependentes da ativação pela proteína RAS como a via PI3K/AKT/mTOR²⁹. Esta via promove a proliferação celular e está intimamente ligada ao ciclo celular²⁹. Sua ativação através da interação de fatores de crescimento e seus receptores se dá por intermédio da ativação de RAS. A proteína RAS ativada ativa PI3K levando a formação de PIP3, que por sua vez ativa Akt e leva a uma série de eventos celulares a jusante, sendo mTOR um dos alvos²⁹. Dados retrospectivos sugerem que esta via pode estar associada à resistência a terapia anti-EGFR, no entanto, parece que apenas mutações específicas do gene *PIK3CA* no éxon 20 podem estar associadas à esta resistência³⁰.



Fonte: kumar et al. 2013³¹

Figura 4 - Via de sinalização celular no CCR.

Aproximadamente 40% dos CCRs exibem mutações ativadoras no *KRAS* (a base de dados COSMIC³² refere 36%, enquanto TCGA³³ relata 42%) e estão localizadas nos éxons 2, 3 e 4; estas afetam os códon 12 e 13 (80% dos casos), códon 61 (4%), códon 146 (1-2%). Além disso,

as mutações adicionais em *KRAS* em várias posições (por exemplo, 68, 117) são catalogadas nas bases de dados, contudo o impacto na função da proteína *KRAS* é desconhecido.

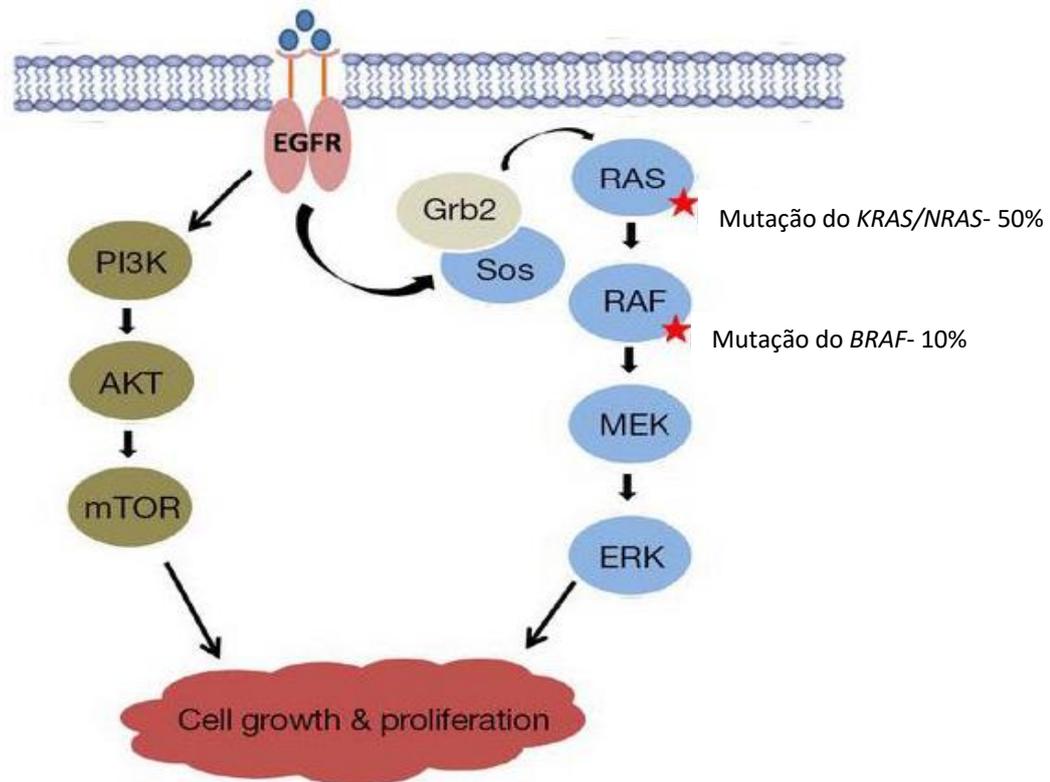
O oncogene *NRAS* está localizado no cromossomo 1 e abriga mutações em 2-4% de todos os CCRs^{27, 28}. As mutações de *NRAS* (assim como as mutações de *KRAS*) são constitutivamente ativas, devido à redução da atividade intrínseca da GTPase e à insensibilidade às proteínas ativadoras da GTPase²⁷. Estas mutações ocorrem geralmente nos códons 12, 13 e principalmente no códon 61. Irahara et al.²⁷ relataram que as mutações do *NRAS* são mutuamente excludentes com mutações do *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* e são encontradas mais frequentemente no câncer de cólon esquerdo e no sexo feminino²⁷. A frequência desta mutação neste estudo foi de 2,2%²⁷, sendo essa informação consistente com dados de sequenciamento do genoma do câncer disponíveis publicamente no banco de dados do Instituto Sanger, COSMIC database³² que lista uma frequência de mutações *NRAS* em aproximadamente 3% no câncer de cólon. Clarke et al. relataram que 50% dos CCR apresentam mutação nos genes *KRAS* e *NRAS*³⁴.

Pouco é conhecido a respeito do impacto das mutações de *NRAS* no CCR²⁷. Assim como as mutações de *RAS*, as mutações de *NRAS* também predizem ausência de resposta à terapia anti-EGFR, sendo que estas terapias podem ter um efeito detrimental em pacientes com CCR *NRAS* mutado³⁵⁻³⁷. Porém, diferentemente das mutações de *KRAS*, apenas mais recentemente as mutações de *NRAS* foram associadas à resistência a terapia anti-EGFR, e desde então a avaliação do gene *NRAS* foi incorporada à prática clínica rotineira.

1.3.3 Gene *BRAF* no CCR

O oncogene *BRAF* se localiza no cromossomo 7 no locus 7p34, e é o mais potente ativador da via MAPK. É composto por 18 éxons, totalizando 190286 nucleotídeos. Ele codifica uma quinase/serina/treonina citoplasmática que participa do mecanismo de transdução de sinais da família RAS/RAF/MAP/MEK/ERK²⁸. Essa via é responsável pela regulação de sinais para o crescimento celular. Quando o receptor extracelular desta via recebe o respectivo ligante/fator de estímulo, como por exemplo fatores de crescimento, ele ativa o seu domínio citoplasmático, tornando-se fosforilado. Essa fosforilação é então transmitida através de uma cascata enzimática até promover a remoção de GDP (difosfato de guanosina) de um membro da família RAS. Essa remoção permite que a proteína RAS seja ativada através da ligação de GTP (trifosfato de guanosina). Quando ativada, RAS ativa a proteína quinase RAF, codificada

pelo gene *BRAF*, que fosforila e ativa MEK que, por sua vez, fosforila e ativa MAPK, transmitindo o sinal para o núcleo. Ao receber o sinal, os genes relacionados ao crescimento celular são ativados, promovendo proliferação celular. Mutações com ganho de função nos genes responsáveis por essa via de crescimento celular podem aumentar a expressão dos mesmos, resultando em um descontrolado processo de divisão celular e tumorigênese²⁸ (Figura 5).



Fonte: Imagem adaptada de Clarke et al³⁴.

Figura 5 - Via de sinalização MAPK no câncer colorretal

As mutações do *BRAF* são menos frequentes (COSMIC e TCGA relatam 11% e 10%, respectivamente, com mutações ativadoras no *BRAF*)^{32, 33}. Dentre as mutações somáticas descritas no *BRAF*, cerca de 80 a 90% correspondem a uma mutação simples T>A (timina em adenina) no éxon 15, causando uma troca do aminoácido glutamato por valina no resíduo 600 (V600E)³⁸. Esta mutação resulta em um ganho de função da proteína levando a uma constante ativação do *BRAF* e, conseqüentemente, da cascata de fosforilação da via

RAF/MAP/MEK/ERK³⁸. Mutações do *BRAF* são mais frequentes em tumores com MSI e conferem um prognóstico pior quando comparado com os tumores *BRAF* selvagem³⁹.

As mutações do *BRAF* estão associadas a infiltração de linfócitos, localização no cólon direito, ocorrência em doentes do sexo feminino com idade mais avançada e, com maior frequência, são tumores pouco diferenciados e subtipo mucinoso³⁹. Além disso, apresentam um padrão distinto de disseminação metastática com alta frequência de metástases peritoneais e linfonodais e taxas menores de metástases pulmonares em comparação com tumores *BRAF* selvagem. As mutações do *BRAF* V600E também têm sido associadas à baixa sobrevida, mas esse fenômeno se restringe a carcinomas que não apresentam MSI^{39,40}.

1.3.3.1 Frequência da mutação do *BRAF* V600E no Brasil

Existem poucos estudos avaliando a frequência da mutação do *BRAF* na população brasileira em pacientes com CCR, com resultados variáveis. Dois estudos encontraram mutação em 6,5% dos pacientes^{41,42}. Jr PLU et al.⁴³ relataram uma frequência de mutação do *BRAF* V600E de 1,3% em pacientes com CCRm. Berardinelli et al.⁴⁴ avaliaram a frequência de mutação do gene *BRAF* V600E em 106 pacientes com CCR com MSI-H, sendo a mutação encontrada em 26,4% dos casos⁴⁴. Yamane et al.⁴¹ encontraram uma frequência de 6,5% de mutação do *BRAF* V600E em 47 pacientes com CCR, com estadiamento clínico variado.

1.3.3.2 Mutações do *BRAF* não V600

Com os avanços do sequenciamento de nova geração (next-generation sequencing - NGS), outras mutações têm sido identificadas e muitas vezes possuem significado clínico e prognóstico incertos. Um exemplo disso são as mutações do gene *BRAF* fora do códon V600 (não V600). Em uma coorte com 9643 pacientes com CCRm, Jones et al.⁴⁵ encontraram uma frequência de mutação do *BRAF* não V600 de 2,2% (208 pacientes). Os pacientes com mutações do *BRAF* não V600 foram mais jovens, mais frequentemente do sexo masculino, portadores de tumores localizados no cólon E e com estabilidade de microssatélites. Além disso, estes pacientes com mutação do *BRAF* não V600 apresentaram menores chances de serem portadores de tumores de alto grau e de apresentarem metástases peritoneais e apresentaram maior sobrevida global quando comparado com pacientes com mutação do *BRAF* V600 ou com pacientes sem nenhuma mutação do *BRAF* (60,7 meses x 11,4 meses x 43

meses, respectivamente)⁴⁵. Além disso, mutações *RAS* concomitantes podem ocorrer mais frequentemente em pacientes portadores de mutações do *BRAF* não V600⁴⁵.

1.3.4 Concordância da análise da mutação dos genes *KRAS*, *NRAS* e *BRAF* no tumor primário e nas metástases

Cejas et al.⁴⁶ avaliaram a concordância do perfil molecular dos tumores primários e das metástases em 117 pacientes. O nível de concordância na presença de mutações no *KRAS* e *BRAF* foi de 91% e 100%, respectivamente, entre o tumor primário e as metástases. Esses achados sugerem que o *status* mutacional de *KRAS* e *BRAF* no tumor primário é um marcador substituto adequado do *status* na doença metastática relacionada⁴⁶. Estudo adicionais também encontraram concordância >90% ao analisar o gene *BRAF*, *KRAS* e *NRAS* entre tumor primário e metástases e, portanto, esses testes podem ser realizados tanto no tumor primário como na metástase^{47, 48}. Bhullar et al.⁴⁹ relataram concordância de 90 a 100% entre o tumor primário e o sítio de metástase ao analisarem o gene *NRAS*.

1.3.5 Instabilidade de microssatélites no CCR

Microssatélites são sequências de dois a quatro nucleotídeos que se repetem várias vezes ao longo do DNA e são consideradas eventos normais na composição do DNA. As microssatélites apresentam taxas mais altas de mutação genética em relação a outras regiões do DNA^{50, 51}. A instabilidade de microssatélites é definida como qualquer alteração no tamanho dessas seqüências repetitivas de DNA por inserções e deleções e são causadas por mutações que comprometem a função dos genes que codificam proteínas de reparo de DNA “*Mismatch Repair*” (MMR) tais como: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*, o que leva ao distúrbio na identificação e excisão de erros durante a replicação do DNA^{50, 52}.

Instabilidade de microssatélites (MSI) ocorre em 10 a 15% dos CCRs esporádicos e em aproximadamente 100% dos casos de síndrome de Lynch^{53, 54}. Entre 75-80% dos casos de CCR esporádicos ocorrem devido a perda da atividade do MMR causada por hipermetilação do promotor do gene *MLH1*⁵⁵, sendo este evento uma das principais alteração genéticas presente no CCR⁵². Os tumores de cólon direito são mais propensos a apresentarem MSI do que os tumores do cólon E. Instabilidade de microssatélites tem sido um dos mais promissores marcadores moleculares estudados até o momento⁵⁶.

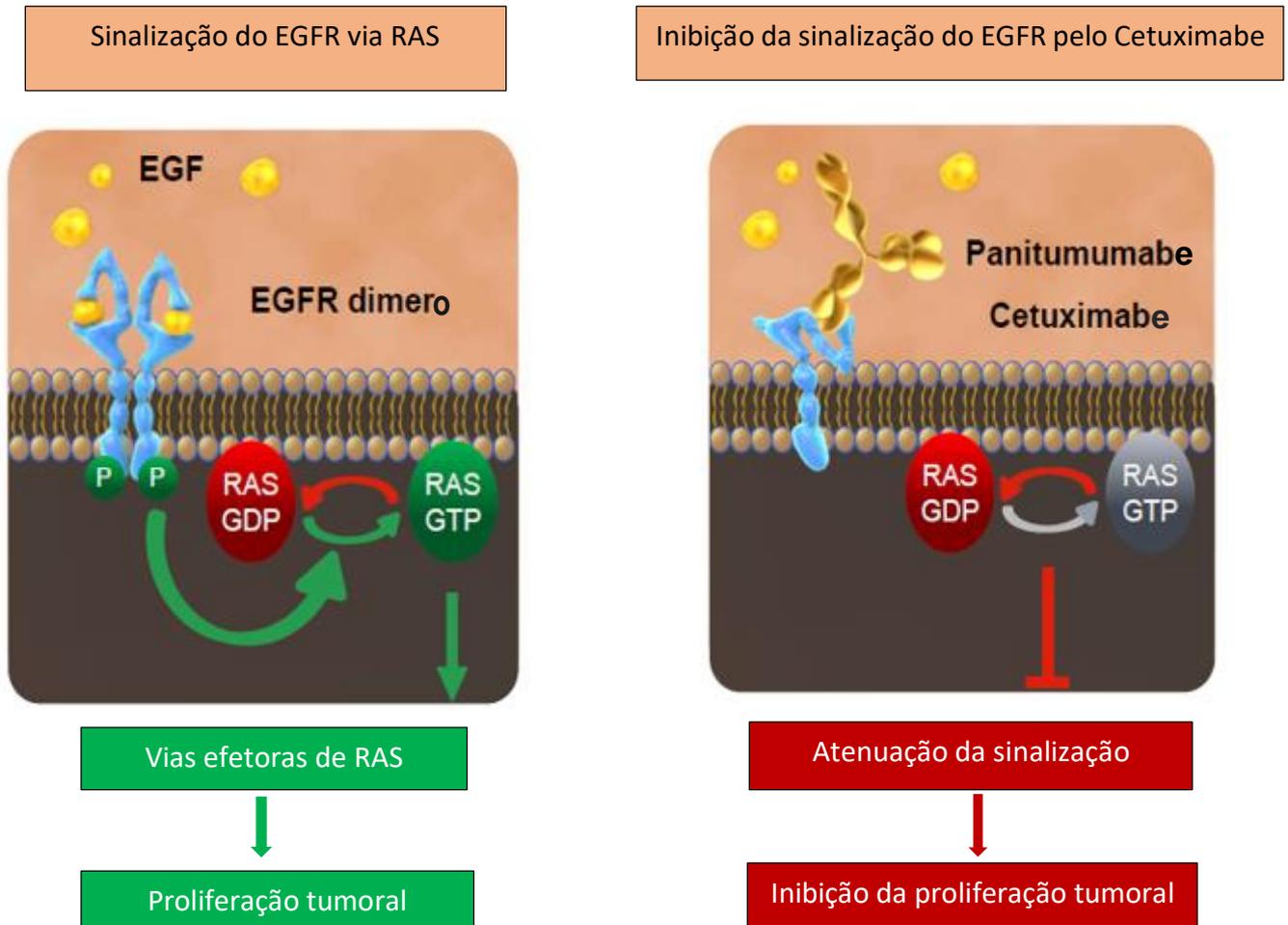
As características que diferenciam o CCR com instabilidade de microssatélites do CCR com estabilidade de microssatélites são: predomínio em localização proximal no cólon, maior incidência em idades mais precoces (abaixo de 40 a 50 anos), maior incidência em tumores múltiplos e mucinosos⁵².

MSI é um marcador prognóstico bem validado no tratamento adjuvante do CCR e atualmente é o único biomarcador nesse cenário⁵⁷. É uma ferramenta auxiliar na prática clínica quanto a indicação de quimioterapia adjuvante, em especial no estágio clínico (EC) II, sendo que os resultados favoráveis indicam que tais pacientes não devem receber quimioterapia adjuvante⁵⁴. Portanto, MSI é um marcador de bom prognóstico em estádios iniciais, estando associada a menores taxas de recidiva e, possivelmente, resistência ao Fluorouracil no cenário adjuvante⁵⁸, porém essa afirmativa requer estudos adicionais para confirmação.

No cenário metastático, a prevalência de MSI é baixa (em torno de 4%) e os dados prognósticos são desfavoráveis⁵⁹. Dados da literatura revelam uma frequência de MSI-H variável conforme estadiamento do tumor, sendo mais frequente no estágio II (20%) e no estágio III e bem menos frequente no estágio I (6%) e IV (5%)⁶⁰. Pacientes com câncer colorretal metastático (CCRm) com MSI apresentam pior sobrevida quando comparado com pacientes com estabilidade de microssatélite (MSS), sendo este fator motivado, provavelmente, pela associação com a mutação do *BRAF*³⁹.

1.4 Tratamento com Cetuximabe no CCR

O Cetuximabe é um anticorpo monoclonal quimérico IgG1 que se liga à porção extracelular do receptor para o fator de crescimento epidérmico (epidermal growth factor receptor, EGFR). O EGFR é uma glicoproteína transmembrana que pertence à família do tipo I de receptores tirosina quinase. Com ação anti-EGFR, o Cetuximabe se liga ao domínio extracelular do EGFR (ErB1) impedindo a dimerização do receptor (Figura 6). Esta ligação gera internalização do complexo receptor-anticorpo e impede a autofosforilação de EGFR-tirosina e, conseqüentemente, a ativação da cascata de proteínas. Sendo assim, o Cetuximabe age inibindo a proliferação celular e induzindo a apoptose⁶¹, estando indicado desde a primeira linha paliativa de tratamento. Além do Cetuximabe, existe outra droga anti-EGFR, chamada de Panitumumabe.



Fonte: Adaptado de Schubert S, et al.⁶²

Figura 6 - Mecanismo de ação da terapia anti-EGFR, destacando-se o Cetuximabe.

A inibição do receptor transmembrana de tirosina quinase EGFR provou ser benéfica para um subconjunto considerável de pacientes com CRC metastático. Após tratamento com anticorpos inibidores de EGFR (Cetuximabe ou Panitumumabe), os doentes mostraram um benefício de sobrevida global de 3-5 meses quando o câncer era tipo *KRAS* selvagem, mas nenhum benefício quando o câncer era *KRAS* mutado. Portanto, as mutações no gene *KRAS* são consideradas marcadores preditivos negativos para terapia anti-EGFR⁶³ e mais recentemente, os estudos tem evidenciado que as mutações do gene *NRAS* também conferem o mesmo impacto, estando associadas à resistência às drogas anti-EGFR^{25, 35, 36}.

1.4.1 Gene *BRAF* e possível resistência à terapia anti-EGFR

Em contraste com as mutações dos genes *KRAS* e *NRAS* (que são mutuamente excludentes das mutações do gene *BRAF*), as mutações no *BRAF* não foram identificadas como um marcador preditivo independente à terapia de primeira linha anti-EGFR.

Em uma análise retrospectiva, Di Nicolantonio et al.⁶⁴, avaliaram o *status* de *KRAS* e *BRAF* de 113 pacientes com CCRm tratados com Cetuximabe e Panitumumabe. A mutação do *KRAS* foi encontrada em 30% dos pacientes e associada à resistência aos anti-EGFR. Mutações do *BRAF* V600E foi encontrada em 11 dos 79 pacientes *KRAS*-wt. Nenhum dos pacientes com mutação no *BRAF* responderam ao tratamento e nenhum dos respondedores tinham a mutação do *BRAF* ($p=0,029$). Pacientes *BRAF* mutado tiveram significativamente menor sobrevida livre de progressão e menor sobrevida global quando comparado aos pacientes *BRAF* selvagem (wt). Portanto, este estudo sugere que ausência de mutação do *BRAF* é requerido para resposta aos anti-EGFR e deve ser usado para selecionar pacientes que são elegíveis para o tratamento⁶⁴.

Evidências crescentes sugerem que a resposta à terapia anti-EGFR é pouco provável em pacientes com CCRm *BRAF* V600E mutado. O American Joint Committee on Câncer (AJCC) considera que há evidência de nível I para a ausência de resposta à terapia anti-EGFR nestes pacientes⁶⁵. A NCCN⁶⁶ (National Comprehensive Cancer Network) e a ESMO³⁵ (Sociedade Européia de Oncologia Médica) sugerem não utilizar terapia anti-EGFR em pacientes com CCRm com mutação do *BRAF* V600E.

Em metanálise recente, Pietrantonio et al.⁴⁰ avaliaram a mutação do *BRAF* como marcador preditivo em pacientes com CCR avançado. Foram avaliados os resultados de dez ensaios randomizados com mais de quatrocentos doentes *KRAS*-wt/*BRAF* mutado tratados com ou sem Cetuximabe ou Panitumumabe na primeira linha ou em linhas subsequentes. Foi evidenciado que a adição de terapia anti-EGFR à quimioterapia padrão não está associada a um aumento significativo de sobrevida global, sobrevida livre de progressão ou taxa de resposta em pacientes *RAS*-wt/*BRAF*-mutado, particularmente na primeira linha paliativa. Portanto, esses doentes não se beneficiam da terapia dirigida a EGFR e devem ser testados antes da administração de Cetuximabe ou Panitumumabe⁴⁰.

Em contrapartida, metanálise de Rowland et al.⁶⁷ pesquisou a mutação do *BRAF* como fator preditor de resposta a terapia anti-EGFR em pacientes com CCRm *RAS* selvagem. Para os

tumores *RAS* selvagem / *BRAF* mutado, a razão de risco para benefício de sobrevida global com anticorpos anti-EGFR foi de 0,97 (IC 95%; 0,67–1,41), enquanto a razão de risco foi 0,81 (95% CI; 0,70–0,95) para *RAS* selvagem / *BRAF* selvagem, com teste de interação não estatisticamente significativa. Com relação ao benefício da sobrevida livre de progressão com anticorpos anti-EGFR, a razão de risco foi de 0,86 (95% CI; 0,61-1,21) para tumores *RAS* selvagem / *BRAF* mutado em comparação com 0,62 (IC 95%; 0,50 a 0,77) para tumores *RAS* selvagem / *BRAF* selvagem (teste de interação, $p=0,07$). Portanto, esses dados são insuficientes para justificar a exclusão da terapia com anticorpos anti-EGFR para pacientes com CRCm, *RAS* selvagem / *BRAF* mutado⁶⁷.

Assim, esta possível resistência ao tratamento deve ser confirmada em ensaios clínicos randomizados que incluam um grupo controle que não seja tratado com os anti-EGFR⁴⁰. Porém, conduzir tais estudos esbarra nas baixas frequências das mutações do *BRAF* o que dificulta o recrutamento do número de pacientes necessários para alcançar a significância estatística. Além disso, os pacientes com mutações *BRAF*, em particular aqueles com estabilidade de microssatélites (MSS), têm um mau resultado, que é independente da terapia aplicada^{40, 68}.

Em relação à previsão da resposta terapêutica, não está claro se a resistência à terapia anti-EGFR também está presente em pacientes com mutação *BRAF* não V600⁶⁹, sendo desconhecido o impacto destas mutações na resposta à terapia anti-EGFR. A esse respeito, De Roock et al.³⁶ reportaram resposta à quimioterapia em combinação com Cetuximabe em um paciente com CCRm portador da mutação do *BRAF* D594G, refratário à quimioterapia³⁶.

JY Blay et al.⁷⁰ avaliaram o uso de Vemurafenibe em estudo *basket* de fase II com 78 pacientes com mutação no gene *BRAF* V600 e não V600. Quatorze pacientes com mutação do *BRAF* não V600 foram tratados e destes, nenhum apresentou resposta ao Vemurafenibe⁷⁰.

As mutações do *BRAF* não V600 (também chamadas de atípicas) são classificadas em dois grupos, baseados em dados pré-clínicos: classe II (níveis intermediário e alto de atividade de quinase e independente de RAS) e classe III (baixo nível de atividade de quinase e dependente de RAS). Johnson et al.⁷¹ avaliaram a frequência de mutação do *BRAF*, (V600E e não V600) bem como seu potencial papel preditor de resistência à terapia anti-EGFR em 2084 pacientes com CCRm. Foi encontrada mutação do *BRAF* em 257 pacientes, incluindo 36 com mutações atípicas (22 mutações de classe III, 10 mutações de classe II e quatro não classificadas). Relatou-se uma maior sobrevida global mediana para os pacientes com

mutação atípica (36,1 meses para as classes II e III), bem como uma maior frequência destas mutações nos tumores do cólon E, quando comparado à sobrevida dos pacientes com mutação do *BRAF* V600E (21 meses) que predominaram no cólon D. Trinta e três por cento dos pacientes apresentaram mutações RAS. A eficácia da terapia anti-EGFR foi limitada nos 36 pacientes com mutações atípicas não V-600E, sendo que nenhum destes pacientes apresentaram resposta à terapia anti-EGFR e 6 pacientes apresentaram doença estável como melhor resposta⁷¹.

Análises futuras com maior número de pacientes são dificultadas pela raridade dessas mutações no CCRm, sua heterogeneidade e a possível presença de uma mutação *RAS* concomitante. No entanto, parece valioso colocar esforços na identificação de pacientes com uma mutação *BRAF* não V600 para elucidar o papel preditivo desta mutação em relação a vários agentes, na tentativa de oferecer tratamentos mais personalizados⁶⁹.

1.4.2 Lateralidade do tumor primário e resposta terapêutica ao Cetuximabe

Vários estudos evidenciam que pacientes *RAS* selvagem (*KRAS* e *NRAS*) apresentam diferentes respostas à terapia anti-EGFR baseado na localização do tumor primário^{72, 73}. Análise retrospectiva do estudo NCIC CTGCO.17⁷⁴ recentemente relatou que a localização do tumor primário foi preditiva de benefício ao tratamento. Nesta população de pacientes refratários a quimioterapia com CCR metastático *KRAS* selvagem, a adição de Cetuximabe aos cuidados suportivos significativamente beneficiou pacientes com tumores de cólon esquerdo, porém, teve benefício limitado em pacientes com tumores de cólon direito. Além disso, observou-se uma interação significativa entre localização do tumor e tratamento para sobrevida livre de progressão⁷⁵.

Wang et al.⁷⁶ encontraram diferenças significativas nas taxas de resposta objetiva e SG entre os pacientes com CCRm do lado direito e CCRm do lado E. A adição de Cetuximabe a quimioterapia de primeira ou segunda linha aumentou significativamente as taxas de resposta, SLP e SG em pacientes com câncer de cólon esquerdo. No entanto, pacientes com CCRm do lado D não apresentaram benefício em SG ou SLP com a adição de Cetuximabe. Além disso, tem sido relatado que a via do EGFR não é comparativamente ativada em tumores do cólon esquerdo versus cólon direito, e um fenótipo sensível ao inibidor do EGFR parece ser

mais predominante nos tumores de cólon esquerdo, levando à hipótese de que os anti-EGFR podem exibir atividade diferencial baseada em localização tumoral⁷⁶.

1.4.3 Cetuximabe em pacientes com CCR politratados

O Cetuximabe também tem se mostrado efetivo nos pacientes com CCRm *RAS* selvagem politratados, refratários a quimioterapia com Fluoropirimidas, Oxaliplatina e Irinotecano. Pode ser utilizado em monoterapia ou combinado à quimioterapia. Quando comparado a cuidados paliativos exclusivos, Cetuximabe promoveu uma melhora na qualidade de vida e aumento da SG e SLP⁷⁴. Em pacientes com CCRm que progrediram com regime de quimioterapia contendo Irinotecano, a associação do Irinotecano ao Cetuximabe aumentou a taxa de resposta e sobrevida livre de progressão quando comparado ao Cetuximabe isolado⁷⁷.

A combinação de Cetuximabe e Irinotecano foi avaliada por Buzaid et al.⁷⁸ em estudo brasileiro de fase 2, braço único, com 79 pacientes. O objetivo do estudo foi demonstrar a atividade do Cetuximabe combinado com Irinotecano em pacientes com CCRm que falharam no tratamento com Irinotecano em linhas prévias. Os seguintes resultados foram encontrados: taxa de resposta de 27%, taxa de controle da doença de 56%, duração mediana da resposta de 23,9 semanas, SLP mediana de 17,4 semanas, SG mediana de 9,2 meses e 38% de sobrevida em 12 meses. Esses dados confirmam a atividade desta combinação de quimioterapia em pacientes latino-americanos⁷⁸. Estudo asiático com desenho similar também evidenciou efetividade da combinação de Cetuximabe com Irinotecano neste mesmo perfil de pacientes⁷⁹.

1.5 Tratamento dos pacientes com CCRm *BRAF* mutado

Apesar do melhor entendimento biológico obtido a partir de estudos de perfil de expressão gênica, o tratamento de pacientes com CCR avançado *BRAF* mutado ainda é um grande desafio para os médicos. De fato, tem sido demonstrado que a mutação *BRAF* V600E está correlacionada com um fenótipo extremamente agressivo e de mau prognóstico, geralmente com uma sobrevida global mediana de menos de um ano⁴⁰. A análise retrospectiva e pós-hoc de estudos randomizados revelou que os regimes padrões de primeira linha, incluindo uma combinação de quimioterapia mais um anticorpo monoclonal, levam a resultados decepcionantes e tempos médios de SLP menores que seis meses⁸⁰⁻⁸².

A escolha de uma estratégia de primeira linha é crucial para pacientes com CRCm, uma vez que alguns deles se tornarão inelegíveis para regimes de salvamento potencialmente eficazes principalmente devido à rápida progressão da doença. Isto é ainda mais relevante para o subconjunto de pacientes com mutações do *BRAF* V600E devido ao fenótipo agressivo e ao curso clínico da doença⁴⁰.

A intensificação da primeira linha terapêutica tem mostrado resultados encorajadores em termos de sobrevida em estudo de fase III (TRIBE) que comparou a combinação de tríplice quimioterapia (FOLFOXIRI) com bevacizumabe versus quimioterapia com FOLFIRI + bevacizumabe⁸³. Há uma outra análise de subgrupo de acordo com a mutação *BRAF* recentemente relatada em pacientes incluídos neste mesmo estudo. Nesta análise, mesmo sendo a mutação *BRAF* um fator de prognóstico ruim em ambos os braços e o número de pacientes sendo baixo, o FOLFOXIRI mais bevacizumabe pareceu melhorar a sobrevida livre de progressão e sobrevida global no subgrupo *BRAF* mutado, em comparação com FOLFIRI mais bevacizumabe^{84, 85}. Assim, uma abordagem inicial mais agressiva pode ser justificada nesses pacientes com prognóstico desfavorável.

A resistência à terapia anti-EGFR conferida pela mutação do *BRAF* V600E pode ser superada com os inibidores de *BRAF* mas a melhor abordagem destes pacientes não está estabelecida. A monoterapia com o Vemurafenibe, inibidor de *BRAF*, não é eficaz devido ao rápido aumento da ativação do EGFR após início deste antineoplásico⁸⁶. A combinação de um inibidor de *BRAF* (Dabrafenibe) e um inibidor de *MEK* (Trametinibe) obteve taxas de resposta de 12% e doença estável em 56% dos pacientes⁸⁷. Outra opção seria a combinação de um inibidor de *BRAF* e anti-EGFR com um modesto benefício, com taxas de resposta de até 19%⁸⁸. A estratégia de combinação de 3 drogas (inibidor de *BRAF*, inibidor de EGFR mais um inibidor de *MEK*) foi a que obteve os melhores resultados, atingindo sobrevida livre de progressão de 8 meses e taxa de resposta de 48%, conforme reportado por Van Cutsem et al.⁸⁹ em uma publicação inicial do estudo BEACON para análise de segurança.

2. JUSTIFICATIVA

Este estudo justifica-se pela relevância prognóstica do gene *BRAF* e *NRAS* e do status de MSI no CCR. Justifica-se ainda pelo pequeno número de estudos avaliando a frequência da mutação destes marcadores moleculares na população brasileira. O conhecimento de marcadores moleculares é imprescindível para a caracterização da doença em nosso meio, sendo que poucos trabalhos foram conduzidos até o momento com esse fim. Estes estudos, no geral, envolvem pequeno número de pacientes e poucos deles exclusivamente em pacientes EC IV. Este é um dos primeiros estudos na população brasileira que tem o intuito de confirmar os achados prévios em relação à eficácia do Cetuximabe no tratamento do CCR avançado em uma população enriquecida de pacientes politratados, refratários (enquanto a maior parte dos estudos concentram-se na primeira ou segunda linha).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo primário

Avaliar a sobrevida e a frequência das mutações dos genes *BRAF* (V600E) e *NRAS* e do *status* de *MSI* nos pacientes com câncer colorretal avançado *KRAS* selvagem tratados com Cetuximabe no Hospital de Câncer de Barretos.

3.2 Objetivos secundários

- Descrever as características clínicas, patológicas e terapêuticas dos pacientes com CCRm tratados com Cetuximabe;

- Avaliar o impacto das mutações dos genes *BRAF* (V600E) e *NRAS* e do *status* de *MSI* na sobrevida dos pacientes com câncer colorretal metastático tratados com Cetuximabe.

- Avaliar a associação das mutações dos genes *BRAF* (V600E), *NRAS* e da instabilidade de microssatélites com as características clínicas dos pacientes incluídos no estudo.

- Avaliar a associação da lateralidade do tumor primário com características moleculares, assim como seu impacto na sobrevida dos pacientes com câncer colorretal metastático tratados com Cetuximabe.

- Avaliar a taxa de resposta ao Cetuximabe.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

O presente estudo foi avaliado e aceito para realização pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos com o processo número 3.498.377 (Anexo A).

Trata-se de um estudo de coorte retrospectivo, realizado através da avaliação dos prontuários de pacientes com diagnóstico de câncer colorretal metastático ou localmente avançado irresssecável, *KRAS* selvagem, submetidos a tratamento com Cetuximabe no Hospital do Câncer de Barretos no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2016.

4.2 Coleta de dados

Foi confeccionada uma planilha de coleta de dados (Anexo B) sob o sistema RedCap⁹⁰. Nela, foram coletados um total de 185 variáveis contendo dados demográficos, informações do tratamento cirúrgico, dados do tratamento neoadjuvante, adjuvante e paliativo, dados do tratamento com Cetuximabe, dados moleculares e informações relativas à sobrevida. Para realização do estadiamento dos pacientes foi utilizado a 7^o edição do AJCC (Comitê Conjunto Americano de Câncer).

4.3 População do estudo

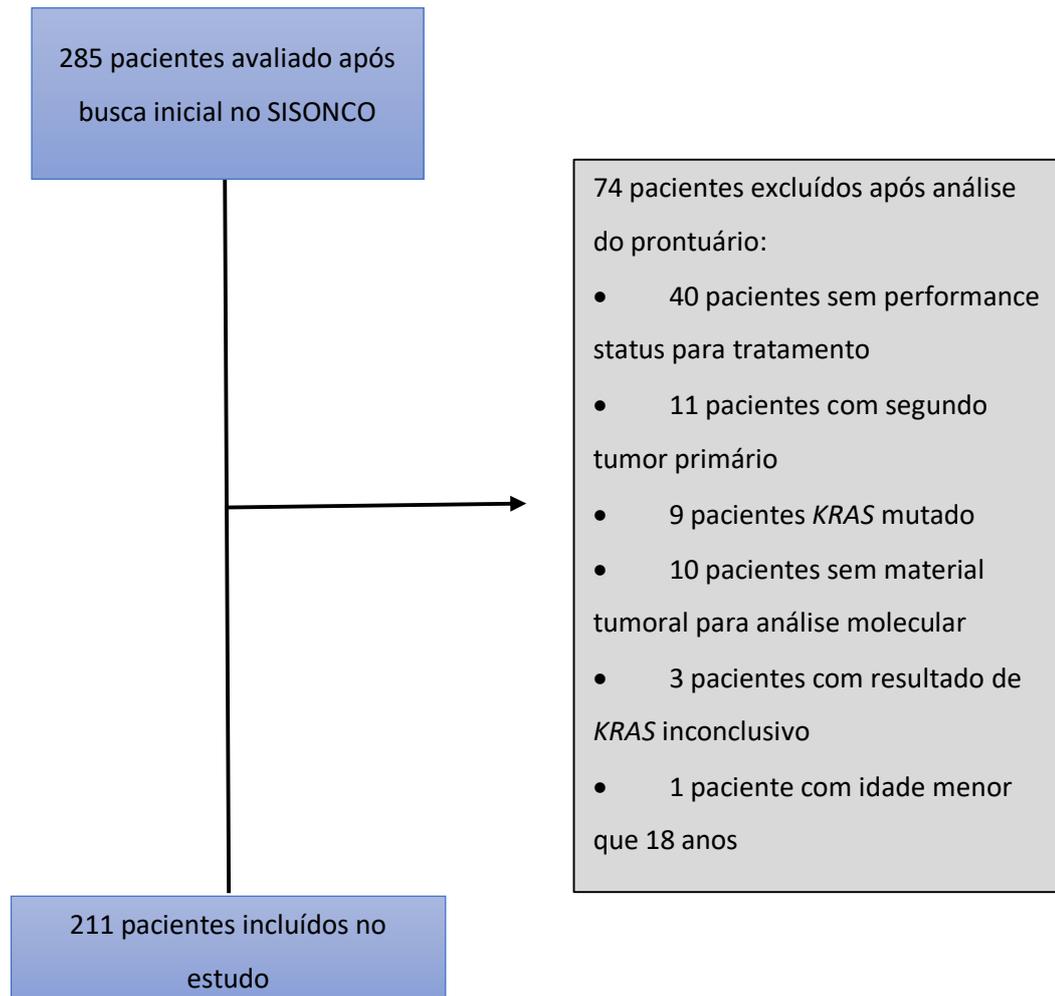
4.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos os pacientes adultos de ambos os sexos com idade igual ou maior a 18 anos e com diagnóstico de câncer colorretal metastático, *KRAS* selvagem, submetidos a tratamento com Cetuximabe no Hospital de Câncer de Barretos no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2016. Foi considerado *KRAS* selvagem os tumores que não possuíam mutação nos códons 12 e 13, uma vez que apenas 138 pacientes incluídos no estudo possuíam pesquisa de mutação do *KRAS* no códon 61, sendo selvagem para este códon.

4.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos os pacientes com segundo tumor primário nos cinco anos prévios ao diagnóstico de CCR (exceto câncer de pele não melanoma), pacientes sem dados suficientes sobre o diagnóstico ou tratamento, assim como os pacientes que não possuíam material biológico tumoral (bloco de parafina ou tecido congelado).

Realizamos inicialmente uma busca no SISONCO (Sistema Eletrônico Informatizado de Dados Oncológicos que permite acesso às informações dos pacientes do Hospital de Câncer de Barretos) dos pacientes tratados com Cetuximabe no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2016. Foram encontrados 285 pacientes. Realizamos a análise dos 285 prontuários. O processo para liberação do Cetuximabe via Secretaria do Estado de São Paulo demora, em média, 50 dias. Como os pacientes incluídos neste estudo são na sua grande maioria politratados, 40 deles perderam performance *status* durante a espera pela medicação, e, apesar do tratamento estar programado no SISONCO, eles efetivamente não foram tratados. Por esse motivo foram excluídos do estudo. Além destes, outros 34 pacientes foram excluídos: 11 portadores de segundo tumor primário, 9 pacientes tinham *KRAS* mutado, 10 pacientes não tinham material tumoral para análise molecular, 3 pacientes apresentaram *KRAS* inconclusivo e 1 paciente era < 18 anos. Portanto, após análise dos prontuários dos 285 pacientes quanto aos critérios de inclusão e exclusão, totalizamos 211 casos incluídos no estudo (Figura 7).



Fonte: Arquivo Próprio (2019)

Figura 7 - Fluxograma do número de pacientes em cada estágio do estudo

4.4 Descrição da pesquisa molecular

4.4.1 Extração do DNA

Cortes de parafina de 5 μm foram obtidas a partir dos blocos de parafina de cada lesão incluída. O DNA foi isolado a partir de tecido tumoral a partir de uma lâmina de cada lesão. Os tecidos foram desparafinizados a 80°C seguidos por uma série de lavagens com xilol e etanol (100, 70 e 50%). Utilizando uma lâmina corada com hematoxilina e eosina (H & E) a área do tumor ou da lesão precursora foi delimitada pelo patologista, e macrodissecada utilizando uma agulha estéril (18G x 1 1/2) (BD, Curitiba, Brasil) e cuidadosamente transferida para um

microtubo. O DNA foi extraído utilizando o QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo trabalho anterior do grupo e as instruções do fabricante⁴¹. O DNA foi quantificado e qualificado através do Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) e posteriormente diluído para uma concentração final de 50 ng/μL. Amostras de DNA foram armazenadas a -20°C para posteriores análises moleculares.

4.4.2 Avaliação da presença da mutação do gene *BRAF V600E*

A presença da mutação do gene *BRAF* (V600E) foi realizada por meio da técnica de PCR em tempo real- plataforma cobas (ROCHE) seguindo as instruções do fabricante⁹¹. Resumidamente, o teste de mutação *BRAF V600* do cobas[®] 4800 baseia-se em dois processos principais: (1) preparação manual de amostras para obter DNA genômico a partir de tecido fixado em formalina e conservado em parafina (FFPET); (2) amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR) do DNA alvo em tempo-real utilizando um par de iniciadores complementares e duas sondas de detecção oligonucleotídicas marcadas com diferentes corantes fluorescentes. Uma sonda é concebida para detectar a sequência do *wild-type BRAF V600* e a outra para detectar a sequência da mutação V600E. São fornecidos dois controles externos da corrida e o alelo *wild-type* é utilizado como um controle interno total do processo.

4.4.3 Avaliação da presença da mutação dos genes *KRAS* e *NRAS*

As regiões de hotspots dos oncogenes *KRAS* e *NRAS* (códon 12 e 13 do éxon 1) foram analisadas através de sequenciamento direto como previamente descrito por nosso grupo^{92, 93}.

A reação de PCR foi realizada com um volume final de 15 μL, sob as seguintes condições: 1,5 μL tampão (Qiagen, Hilden, Alemanha); 2 mM MgCl₂ (Qiagen, Hilden, Alemanha); 100mM dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, USA); 0,2 mM de primers, senso e anti-senso (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), 1 unidade de HotStarTaq DNA polimerase (Qiagen, Hilden, Alemanha) e 1 μL de DNA. Os primers para *KRAS* utilizados foram: 26 GTGTGACATGTTCTAATATAGTCA (senso) e GAATGGTCCTGCACAGTAA (antisenso)⁹³. Os primers para *NRAS* utilizados foram: ATGACTGAGTACAACTGGT (senso) e CTCTATGGTGGGATCATATT (antisenso)⁹⁴.

A PCR foi realizada em um termociclador Veriti (Applied Biosystems, USA) utilizando Taq polimerase (Qiagen, Hilden, Alemanha). Os produtos da PCR foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose.

Os produtos da PCR de cada éxon analisado foram primeiramente purificados com Exo-Sap (GE Technology, Cleveland, USA), então, os produtos da PCR foram submetidos a uma reação de sequenciamento utilizando 1 µL de BigDye (Applied Biosystems, USA), 1,5 µL de tampão para sequenciamento (Applied Biosystems, USA) e 1 µL de primer. A reação de sequenciamento foi seguida por purificação com X-Terminator (Applied Biosystems, USA), conforme instruções do fabricante.

Vale ressaltar que a definição de *KRAS* selvagem foi baseada na ausência de mutação nos códons 12 e 13. Por tratar-se de estudo retrospectivo, na ocasião em que a maior parte dos pacientes iniciaram o tratamento, o padrão era realizar a pesquisa da mutação apenas nesses dois genes. Apenas mais recentemente foi incorporado a análise do códon 61, razão pela qual poucos pacientes incluídos neste estudo possuem a pesquisa neste códon.

4.4.4 Avaliação da instabilidade de microssatélites

Para o estudo de instabilidade de microssatélites foi realizada uma reação de PCR em multiplex composto por 6 marcadores mononucleotídeos quasimonomórficos (NR27, NR21, NR24, BAT25 e BAT26, HSP110) segundo metodologia descrita previamente por nosso grupo^{95, 96}.

Um par de primers para cada marcador foi adicionado a reação, sendo que o primer forward estava conjugado a moléculas fluorescentes: BAT26–FAM, BAT25–HEX, NR24–NED, NR21–FAM, NR27–HEX e HSP110–PET. Para a reação de PCR foi utilizado 1 µL de mix de primers em concentração de 10 mM. Além disso, 5 µL de Master Mix Multiplex (Qiagen), 3 µL de água e 1 µL de DNA com concentração de 50 ng/µL foram adicionados, totalizando um volume final de 10 µL. As condições de ciclagem no termociclador foram as seguintes: 95 °C por 15 minutos para a desnaturação inicial do DNA, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 90 s e 72 °C por 30 s que proporcionaram a desnaturação, o anelamento e a extensão, respectivamente. A extensão final foi proporcionada pela etapa de 72 °C por 40 minutos e temperatura de stand by de 4 °C.

Os produtos de PCR foram então preparados para a eletroforese capilar adicionando-se 1 µL do produto amplificado, 8,7 µL de Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) e 0,3 µL de GeneScan 600 LIZ size standard (Applied Biosystems).

A análise de fragmentos dos produtos de PCR foi realizada no sistema 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os dados gerados pelo equipamento 3500 Genetic Analyzer foram analisados pelo software GeneMapper versão 4 (Applied Biosystems). Para isso, cada marcador teve seu tamanho em pares de base (pb) pré-definido para que o *status* de MSI fosse definido como: MSI-High (MSI-H, instabilidade em 2 ou mais marcadores); MSI-Low (MSI-L, instabilidade em 1 marcador) e estabilidade de microssatélite (MSS, ausência de instabilidade).

Os casos descritos como fenótipo MSI-H, são os casos com instabilidade de microssatélites (MSI).

4.5 Avaliação da taxa de resposta ao Cetuximabe

A resposta tumoral foi avaliada a cada 12 semanas com o uso de tomografia computadorizada ou ressonância magnética, segundo rotina local. A avaliação foi realizada por oncologistas clínicos (investigadora do estudo e demais oncologistas clínicos que atenderam os paciente) em discussão com os radiologistas locais. Os dados foram coletados segundo informações contidas em prontuário médico. Além disso, os pacientes foram avaliados quanto a sinais de progressão clínica a cada consulta médica, e em caso de suspeita de progressão de doença, foi realizado tomografias para confirmação. Por se tratar de estudo retrospectivo, não houve padronização de tomografias basais de início de tratamento.

Resposta parcial foi definida como uma redução na somatória das lesões alvo maior ou igual a 30% em relação às tomografias basais de início de tratamento. Progressão de doença foi definida como um aumento na somatória das lesões alvo maior ou igual a 20% em relação às tomografias basais de início de tratamento e doença estável foi definida como um aumento na somatória das lesões alvo menor que 20% ou uma redução na somatória das lesões alvo menor que 30% em relação às tomografias basais de início de tratamento. A taxa de resposta corresponde aos pacientes que avaliaram resposta ao tratamento e que apresentaram resposta parcial.

4.6 Descrição dos protocolos de tratamento com Cetuximabe

Os protocolos de tratamento com Cetuximabe utilizados pelos pacientes foram:

1-Cetuximabe + Irinotecano- Cetuximabe na dose inicial de 400mg/m² seguido de infusão semanal de 250mg/m², EV. O Irinotecano foi administrado na dose de 125mg/m² semanal por 4 semanas consecutivas, EV, seguido de pausa de 2 semanas;

2-Cetuximabe semanal- Cetuximabe na dose inicial de 400mg/m², EV, seguido de infusão semanal de 250mg/m²;

3-Cetuximabe quinzenal- Cetuximabe na dose de 500mg/m², EV, a cada 2 semanas;

4-Cetuximabe + Irinotecano modificado- Cetuximabe 500mg/m² e Irinotecano 180mg/m² a cada 2 semanas, ambos EV;

5-Outros protocolos:

✓ Cetuximabe + Folfiri- Cetuximabe na dose de 500mg/m² a cada 2 semanas. O FOLFIRI consiste em Irinotecano, 180 mg/m² EV, por 90 min, seguido de DL-leucovorin, 400 mg/m² (EV, por 2 h, com Irinotecano, seguido por 5-Fluorouracil, 400 mg/m² EV bolus, seguido por 5-Fluorouracil 2.400 mg/m² EV, em infusão contínua, por 46 h, a cada 2 semanas;

✓ FOLFOX6 consiste em oxaliplatina, 85 mg/m² EV, por 2 h, no D1, DL-leucovorin, 400 mg/m² EV, por 2 h (com oxaliplatina no D1), e 5-Fluorouracil, 400 mg/m² EV *bolus*, no D1 (logo após leucovorin), seguido de 5-Fluorouracil, 2.400 mg/m² EV, em infusão contínua, por 46 h, a cada 2 semanas.

A quimioterapia foi administrada até progressão de doença ou toxicidade limitante, sendo suspenso se desejo do paciente.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A caracterização da amostra foi realizada por meio de tabelas de frequência e/ou contingência para as variáveis qualitativas e quantitativas, medidas de tendência central e dispersão (média, desvio padrão, mediana).

A relação entre as variáveis clinicopatológicas, dados moleculares e de tratamento foi avaliada utilizando o teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher. As probabilidades de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e as curvas comparadas pelo teste de Log-rank. As tabelas de estimativa de sobrevida global (SG) e os gráficos de curvas de Kaplan-Meier foram gerados por meio do *software* SPSS, sendo o evento de interesse, o óbito por qualquer causa. Análises univariadas foram realizadas para comparar as variáveis respostas de interesse do estudo, com as demais variáveis. Para todos os testes aplicados no estudo, o nível de significância foi de 5%.

Para a análise de regressão de Cox, avaliamos as variáveis com nível de significância de até 10% nas análises univariadas, assim como as variáveis de interesse do estudo (*NRAS*, *BRAF* e *status* de *MSI*).

A análise de sobrevida global foi contabilizada partir da data de início do Cetuximabe até a data do óbito por qualquer causa ou até a data da última informação do prontuário médico, sendo o evento, o óbito.

Para as análises estatísticas gerais (exceto da análise multivariada e das análises envolvendo o gene *NRAS*) foram excluídos os pacientes com mutação do gene *NRAS* (7 pacientes), assim como os 3 pacientes com resultado *NRAS* inconclusivo e 1 paciente sem análise do *NRAS* devido à ausência de material tumoral, totalizando 200 pacientes. Para as análises envolvendo o gene *BRAF*, excluímos mais 6 pacientes com o resultado *BRAF* inconclusivo, totalizando 194 pacientes. Para as análises de *NRAS* foram excluídos 3 pacientes *NRAS* inconclusivo e 1 paciente sem análise do *NRAS* devido à ausência de material tumoral, totalizando 207 pacientes

6. RESULTADOS

6.1 Características gerais dos pacientes incluídos no estudo

Os dados demográficos e as características clínico-patológicas dos 211 pacientes incluídos no estudo foram adquiridos pela análise de prontuários no SAME (Serviço de Arquivos Médicos e Estatística) e do SISONCO (Sistema Informatizado de Dados Oncológicos) do Hospital de Câncer de Barretos. As variáveis e os dados de idade ao diagnóstico, sexo, localização do tumor primário, estadiamento ao diagnóstico, sítio de metástases e tipo histológico constam na Tabela 1.

Tabela 1 - Características gerais dos 211 pacientes incluídos no estudo

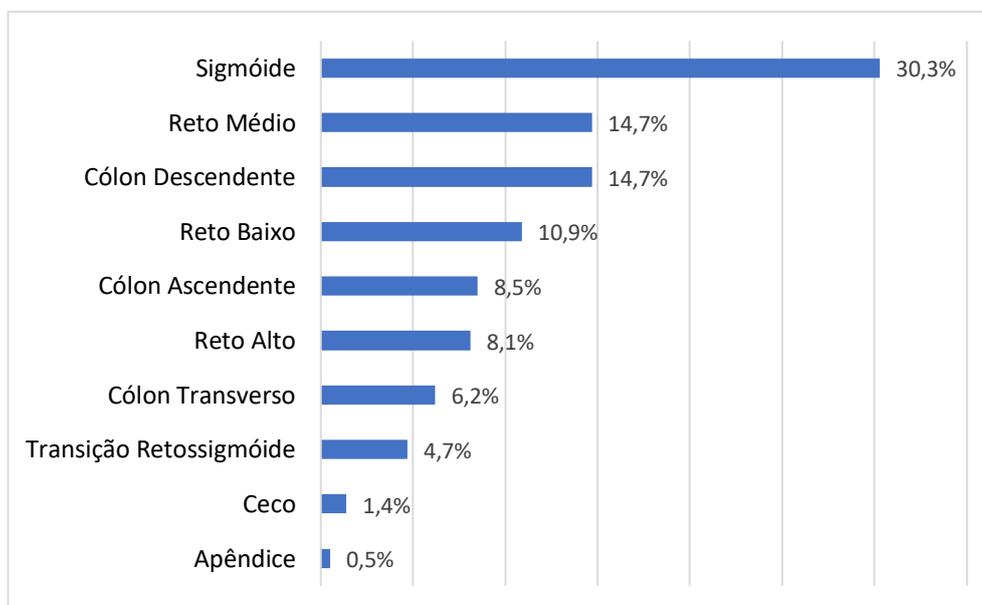
Características		N (Porcentagem)
Idade Média (anos)		52,6 anos (DP ± 13,2)
Sexo	Masculino	115 (54,5)
	Feminino	96 (45,5)
Localização do tumor primário	Colon D	35 (16,6)
	Colon E	176 (83,4)
Estadiamento ao diagnóstico	I	2 (0,9)
	II	37 (17,6)
	III	60 (28,5)
	IV	110 (52,1)
	Desconhecido	2 (0,9)
Sítio de metástase	Fígado	84 (74,3)
	Pulmão	27 (23,9)
	LFN não regional	20 (17,7)
	Osso	6 (5,3)
	Peritônio	29 (25,7)
Tipo histológico	Adenocarcinoma	209 (99,1)
	Adenocarcinoma mucinoso	2 (0,9)

DP – Desvio padrão

Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Dos 211 pacientes, 115 (54,5%) eram do sexo masculino e 96 (45,5%) eram do sexo feminino. A idade média dos pacientes ao diagnóstico foi de 52,6 anos (desvio-padrão de 13,2 anos). Entre os tumores de reto, encontramos uma maior proporção em homens do que em mulheres (40% x 26%) enquanto que entre os tumores de cólon houve uma maior proporção entre as mulheres (75% versus 60%).

O tipo histológico mais comum foi o adenocarcinoma, presente em 209 pacientes (99,1%). Apenas 2 pacientes eram portadores de adenocarcinoma mucinoso (0,9%). Não foram encontrados outros tipos histológicos. Os sítios de metástases mais comuns ao diagnóstico foram fígado (84, 74,3%), pulmão (27, 23,9%) e peritônio (29, 25,7%). Dos tumores primários, 83,4% estavam localizados no cólon E e 16,6% no cólon D (Figura 8). Quanto ao estadiamento ao diagnóstico, houve predomínio do estágio III (60, 28,5%) e IV (110, 52,1%). Houve predomínio de tumores localizados no cólon E (176, 83,4%). Cento e quarenta tumores (66,3%) estavam localizados no cólon e 71 (33,7%) no reto, sendo que todos os casos estavam assim distribuídos: cólon descendente (31, 14,7%), cólon sigmóide (64, 30,3%), transição retossigmóide (10, 4,7%), reto alto (17, 8,1%), reto médio (31, 14,7%) e reto baixo (23, 10,9%). Trinta e cinco tumores (16,6%) estavam localizados no cólon D, assim distribuídos: ceco (3, 1,4%), apêndice cecal (1, 0,5%), cólon ascendente (18, 8,5%) e cólon transverso (13, 6,2%).



Fonte: Arquivo Próprio (2019)

Figura 8 - Localização do tumor primário.

6.2 Dados do tratamento cirúrgico

Do total de 211 pacientes, 83,4% (176) realizaram cirurgia do tumor primário em algum momento da evolução. Dos 176 pacientes operados, 22,7% (40 pacientes) foram operados na urgência. O número médio de linfonodos ressecados foi 16,3 (desvio padrão de 12,3) e a média de linfonodos positivos foi 4,1 (desvio padrão de 5,5). A maior parte dos tumores eram T3 em 74,5% dos casos (T4- 15,1%, T2- 4,8%, Tx- 5,6%). A positividade para invasão angiolinfática (IAL) foi encontrada em 70 pacientes, ou seja, 39,8% dos casos (42,6% sem IAL, 15,9% sem informação e 1,7% obteve resposta completa ao tratamento neoadjuvante, não sendo possível avaliar a IAL). A positividade para invasão perineural (IPN) foi de 20,5%, ou seja, presente em 36 pacientes (59,1% sem IPN, 19,3% sem informação e 1,1% obteve resposta completa ao tratamento neoadjuvante). Houve predomínio do grau histológico II, presente em 150 pacientes, 85,2% dos casos (grau I- 10 pacientes, 5,7%; grau III- 11 pacientes, 6,3%, sem informação- 4 pacientes, 2,3% e 1 paciente, 0,6%, obteve resposta completa ao tratamento neoadjuvante, não sendo possível avaliar o grau histológico).

A maioria dos pacientes não realizaram metastasectomia (169, 80,1%). Quarenta e dois pacientes (19,9%) foram submetidos a metastasectomia, sendo que o mesmo paciente pode ter feito ressecção de mais do que 1 local de metástase. Os sítios de metastasectomia mais frequentes foram: fígado (21, 50%), ovário (10, 23,8%) e pulmão (7, 16,6%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Sítios de metastasectomia

Total 42 Pacientes	N (%)
Fígado	21 (50%)
Ovário	10 (23,8%)
Pulmão	7 (16,6%)
Omento	2 (4,7%)
LFN não regional	1 (2,3%)

Fonte: Arquivo Próprio (2019)

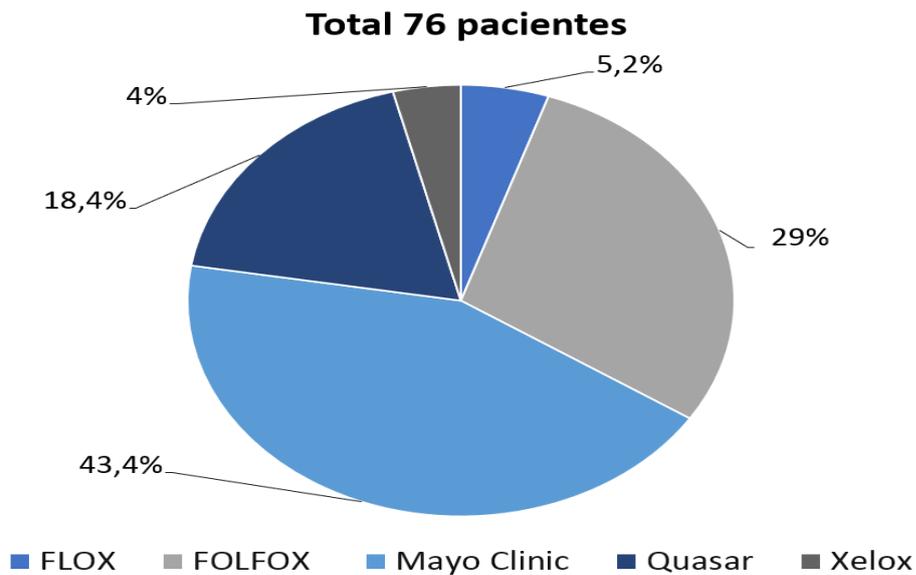
Do total de 211 pacientes incluídos do estudo, 16 (7,6%) realizaram radioablação e 195 (92,4%) não o fizeram. Quatorze pacientes (87,5%) realizaram radioablação hepática e dois pacientes (12,5%) realizaram radioablação hepática e pulmonar.

6.3 Dados do tratamento pré-operatório

Do total de 211 pacientes operados, 46 (21,8%) foram submetidos a tratamento pré-operatório. Quanto a lateralidade do tumor primário, estes 46 tumores estavam assim localizados: 20 no reto baixo, 19 no reto médio, 5 no reto alto, 1 no cólon transversal e 1 na transição retossigmóide. Destes 46 pacientes, a maioria (43 pacientes, 93,5%) realizou tratamento combinado com quimioterapia + radioterapia, 2 pacientes (4,3%) realizaram quimioterapia exclusiva e 1 paciente (2,2%) foi submetido a radioterapia exclusiva. Do total de 45 pacientes que realizaram quimioterapia pré-operatória, 40 pacientes (89%) receberam 2 ciclos (1 paciente recebeu 1 ciclo, 1 paciente recebeu 3 ciclos, 1 paciente recebeu 4 ciclos e 2 pacientes receberam 6 ciclos). Quanto ao protocolo de quimioterapia neoadjuvante realizado, Fluorouracil + Leucovorin foi utilizado por 41 pacientes (91,2%). Três pacientes (6,6%) receberam Capecitabina e 1 paciente (2,2%) recebeu Capecitabina + Oxaliplatina.

6.4 Dados do tratamento adjuvante

Do total de 211 pacientes, 76 foram submetidos a tratamento adjuvante. O protocolo de quimioterapia mais utilizado foi o Mayo Clinic (Fluorouracil + Leucovorin), administrado a 33 pacientes, 43,4% dos casos. O segundo protocolo mais indicado foi o FOLFOX (22 pacientes, 29%), seguido pelo QUASAR (14 pacientes, 18,4%). Apenas 4 pacientes (5,2%) receberam FLOX e apenas 3 pacientes (4%) receberam Xelox (Figura 9).

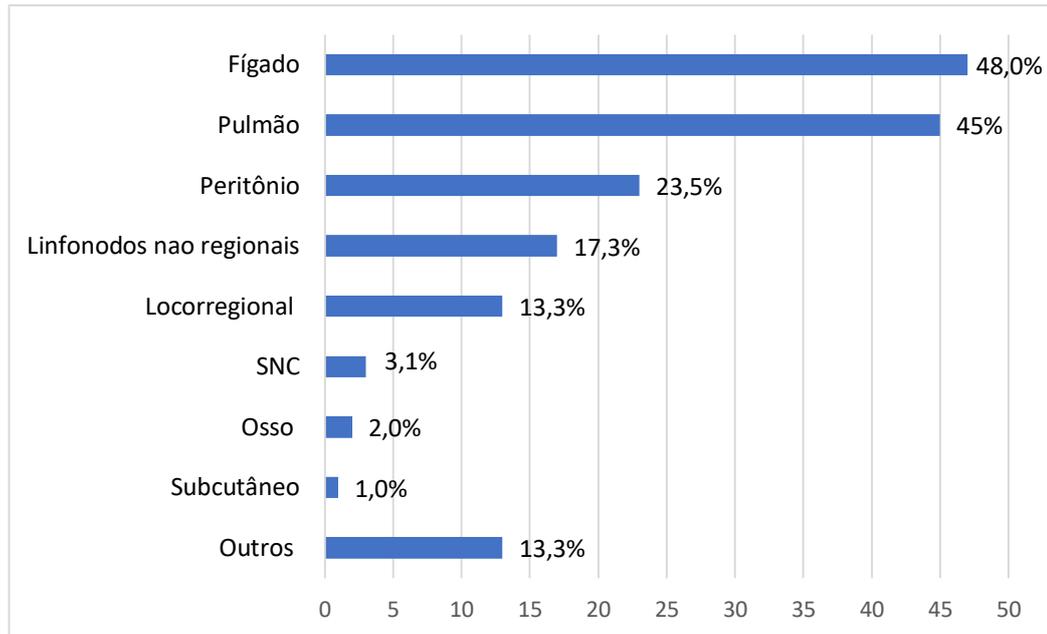


Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 9 - Protocolos de quimioterapia adjuvante

6.5 Dados da recidiva

Todos os pacientes inicialmente operados com intenção curativa apresentaram recorrência do tumor (alguns pacientes recorreram em mais de um sítio). O principal sítio de recorrência foi fígado, registrado em 47 pacientes, 48%. Os demais sítios de recorrência foram assim distribuídos: pulmão/pleura (45 pacientes, 45,9%), peritônio (23 pacientes, 23,5%), linfonodos não regionais (17 pacientes, 17,3%), locorreional (13 pacientes, 13,3%), osso (2 pacientes, 2,0%), SNC (3 pacientes, 3,1%), subcutâneo (1 paciente, 1,0%), outros (13 pacientes, 13,3%) (Figura 10).



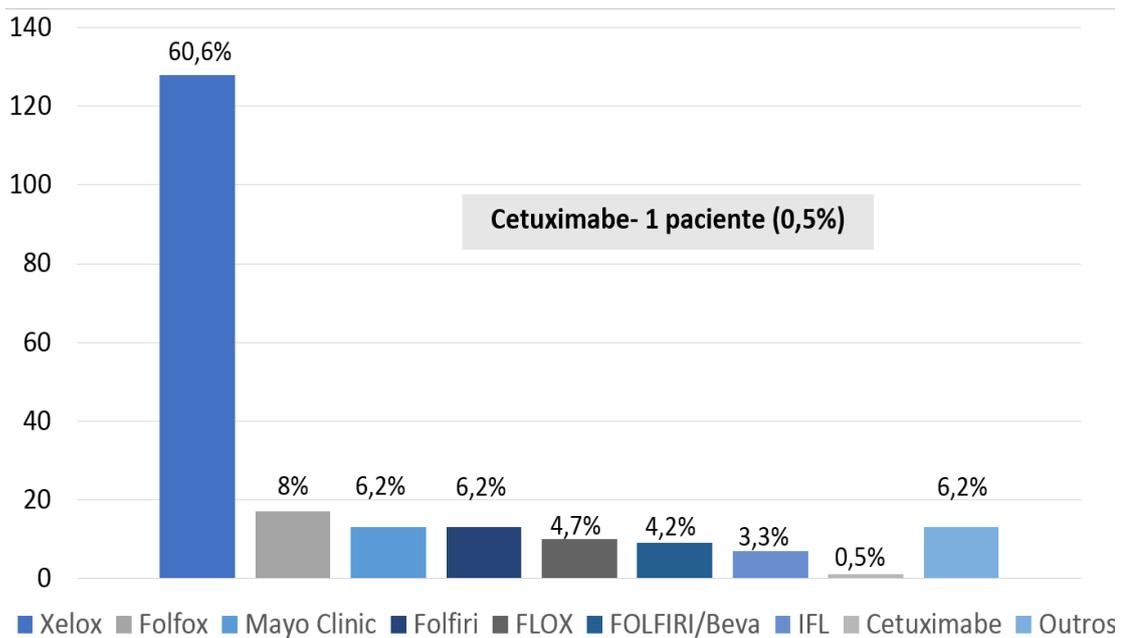
Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 10 - Sítios de metástase na recidiva

6.6 Dados da quimioterapia paliativa

6.6.1 Quimioterapia paliativa de primeira linha

Do total de 211 pacientes tratados na primeira linha paliativa, 60,6% (128 pacientes) deles receberam Xelox. Os demais pacientes foram assim distribuídos: FOLFOX (17 pacientes, 8%), Mayo Clinic, ou seja, Fluorouracil + Leucovorin (13 pacientes, 6,2%), FOLFIRI (13 pacientes, 6,2%), FLOX (10 pacientes, 4,7%), FOLFIRI + Bevacizumabe (9 pacientes, 4,2%), IFL (7 pacientes, 3,3%), outros (13 pacientes, 6,2%). Apenas 1 paciente recebeu o tratamento investigacional (Cetuximabe) na primeira linha (Figura 11).

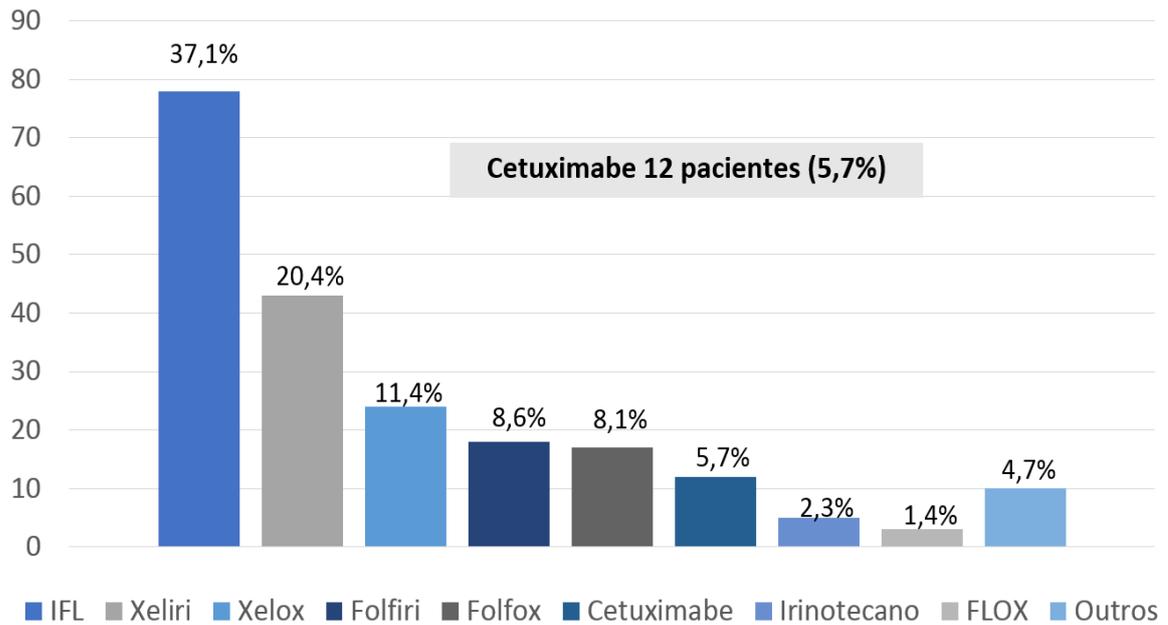


Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 11 - Protocolos de quimioterapia administrados na primeira linha

6.6.2 Quimioterapia paliativa de segunda linha

Do total de 210 pacientes tratados na segunda linha paliativa, 37,1% (78 pacientes) deles receberam IFL. O segundo protocolo de quimioterapia paliativa mais utilizado foi o Xeliri (20,4%, 43 pacientes). Os demais protocolos utilizados foram: Xelox (24 pacientes, 11,4%), FOLFIRI (18 pacientes, 8,6%), FOLFOX (17 pacientes, 8,1%), Irinotecano (5 pacientes, 2,3%), FLOX (3 pacientes, 1,4%), outros protocolos (10 pacientes, 4,7%). Doze pacientes (5,7%) receberam o Cetuximabe na segunda linha (Figura 12).

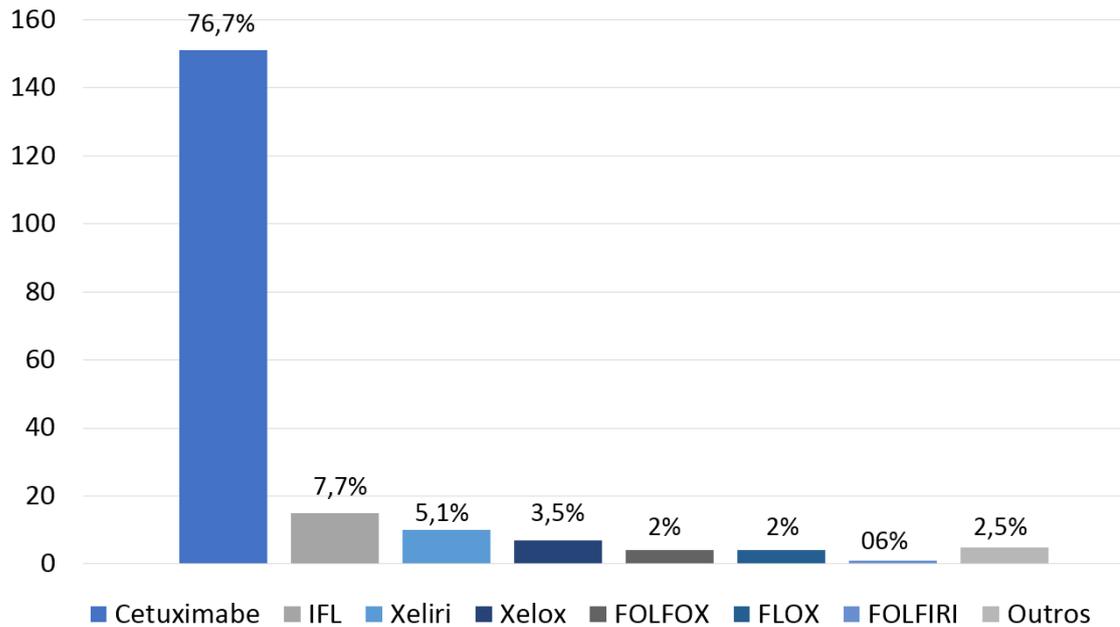


Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 12 - Protocolos de quimioterapia administrados na segunda linha

6.6.3 Quimioterapia paliativa de terceira linha

Do total de 197 pacientes tratados na terceira linha paliativa, 76,7% deles (151 pacientes) receberam Cetuximabe. O segundo protocolo de quimioterapia paliativa mais utilizado foi o IFL (15 pacientes, 7,7%). Os demais protocolos utilizados foram: Xeliri (10 pacientes, 5,1%), Xelox (7 pacientes, 3,6%), FOLFIRI (1 paciente, 0,6%), FOLFOX (4 pacientes, 2%), FLOX (4 pacientes, 2%), outros (5 pacientes, 2%) (Figura 13).

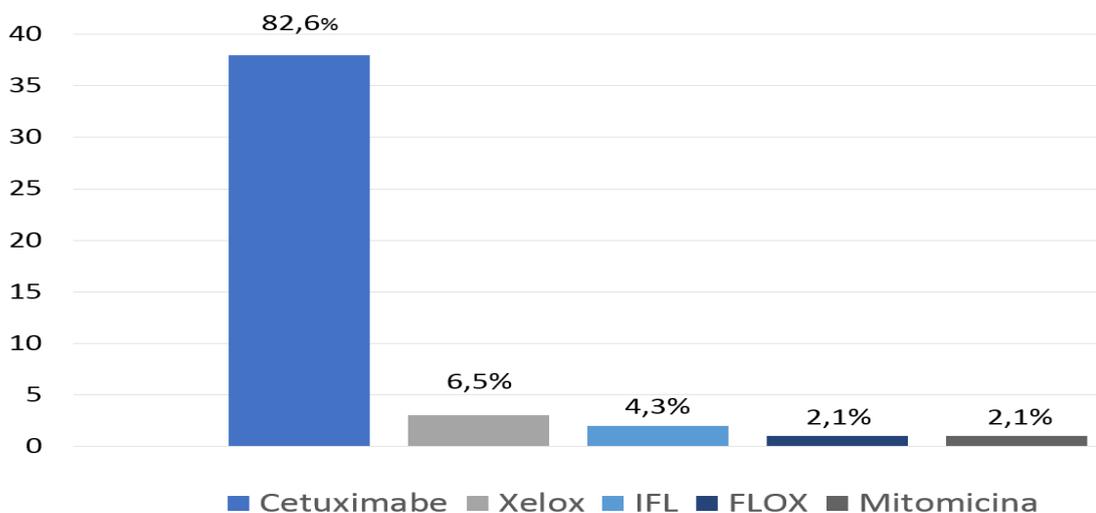


Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 13 - Protocolos de quimioterapia administrados na terceira linha

6.6.4 Quimioterapia paliativa de quarta linha

Do total de 46 pacientes tratados na quarta linha paliativa, 82,6% (38 pacientes) deles receberam Cetuximabe. Três pacientes (6,5%) receberam Xelox e 2 pacientes receberam IFL (4,3%). Um paciente recebeu FLOX (2,1%) e um paciente (2,1%) recebeu Mitomicina (Figura 14).

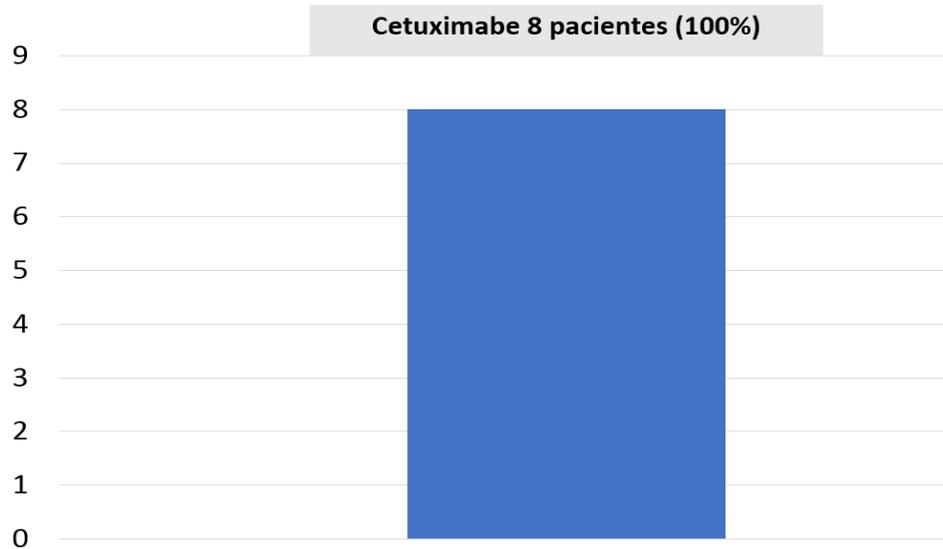


Fonte: Arquivo Próprio (2019)

Figura 14 - Protocolos de quimioterapia administrados na quarta linha

6.6.5 Quimioterapia paliativa de quinta linha

Apenas 8 pacientes receberam quimioterapia paliativa de quinta linha e todos eles foram tratados com Cetuximabe. Portanto, os pacientes receberam, no máximo, 5 linhas de quimioterapia paliativa (Figura 15).



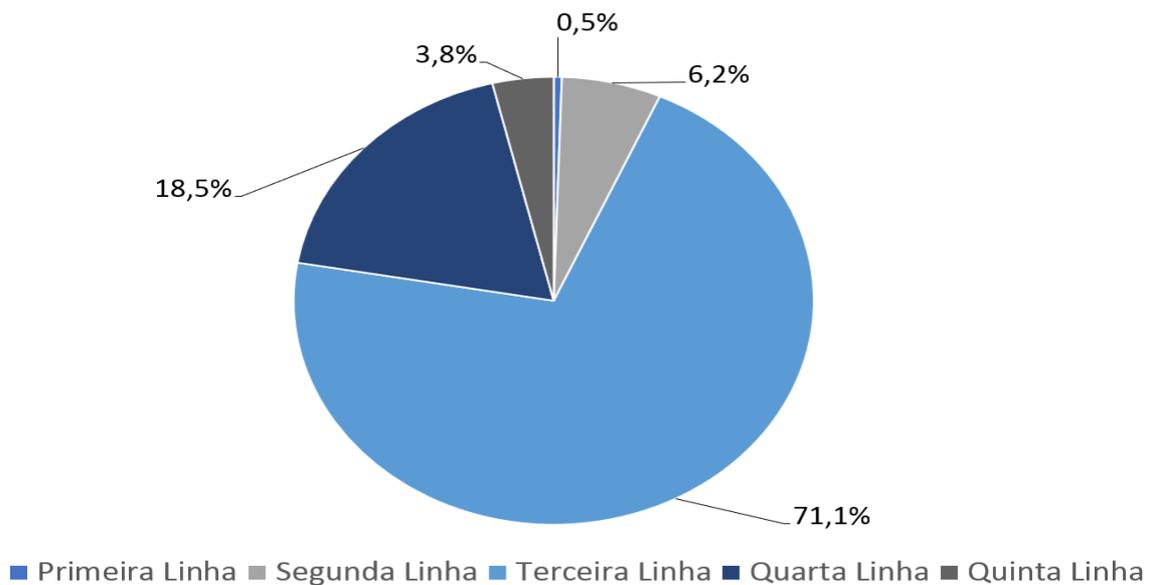
Fonte: Arquivo Próprio (2019)

Figura 15 - Protocolos de quimioterapia administrados na quinta linha

6.7 Dados do tratamento paliativo com Cetuximabe

Todos os 211 pacientes incluídos no estudo foram tratados com Cetuximabe. A maior parte dos pacientes (168, 80%) interromperam o tratamento devido a progressão de doença. As outras razões para suspensão foram: evento adverso proibitivo (3 pacientes, 1,4%), desejo do paciente (4 pacientes, 1,9%), comorbidade (2 pacientes, 1%), óbito por câncer (24 pacientes, 11,4%), óbito por outras causas (1 paciente, 0,5%), queda de performance (7 pacientes, 3,3%). A duração média do tratamento foi 172 dias (desvio-padrão de 154) e a média de ciclos realizados foi 20,4 (desvio-padrão de 17).

A maior parte dos pacientes (150, 71,1%) receberam o Cetuximabe na terceira linha. Trinta e nove pacientes (18,5%) receberam o Cetuximabe na quarta linha, 13 pacientes (6,2%) na segunda linha, 1 paciente (0,5%) na primeira linha e 8 pacientes (3,8%) receberam na quinta linha (Figura 16).



Fonte: Arquivo Próprio (2019)

Figura 16 - Linhas de Tratamento com Cetuximabe

O principal regime de administração do Cetuximabe foi o semanal, realizado por 201 (95,3%) pacientes. Dez pacientes (4,7%) receberam o Cetuximabe quinzenalmente.

Quanto ao protocolo de quimioterapia, 149 pacientes (70,6%) receberam Cetuximabe + Irinotecano, 53 pacientes (25,1%) receberam Cetuximabe semanal. Os outros protocolos realizados foram: Cetuximabe quinzenal (2 pacientes, 0,9%), Cetuximabe+ Irinotecano modificado (2 pacientes, 0,9%), outros protocolos (5 pacientes, 2,4%). No total, 151 pacientes receberam a combinação de Irinotecano com Cetuximabe e 53 pacientes receberam Cetuximabe monodroga. Dos 151 pacientes que receberam a combinação de Cetuximabe com Irinotecano, 24 (15,9%) tiveram o Irinotecano suspenso durante o tratamento. As suspensões do Irinotecano ocorreram devido a toxicidade (23 pacientes, 95,8%) ou queda de performance *status* (1 paciente, 4,2%).

Do total de 211 pacientes incluídos no estudo, 210 (99,5%) finalizaram o tratamento com Cetuximabe e 1 paciente continua em tratamento.

Após a finalização do Cetuximabe, 43 pacientes (20%) receberam outros protocolos de quimioterapia, assim distribuídos: 4 pacientes (9%) receberam Capecitabina, 7 pacientes (16%) receberam FLOX, 1 paciente (2,5%) recebeu FOLFIRI + metformina, 8 pacientes (19%) receberam FOLFOX, 1 paciente (2,5%) recebeu IFL, 1 paciente (2,5%) recebeu Irinotecano, 10

pacientes (23%) receberam Irinotecano + metformina, 1 paciente (2,5%) recebeu Xeliri e 10 pacientes (23%) receberam Xelox.

6.8 Dados moleculares

A análise molecular dos 211 pacientes incluídos no estudo foi realizada no material do tumor primário em 82% dos pacientes e no material da metástase em 18%. No momento da pesquisa molecular, 62% dos pacientes não haviam recebido nenhuma quimioterapia, enquanto 38% haviam recebido algum tipo de tratamento quimioterápico, sendo, destes: quimioterapia neoadjuvante 23,5%, quimioterapia adjuvante 25% e quimioterapia paliativa 51,5%.

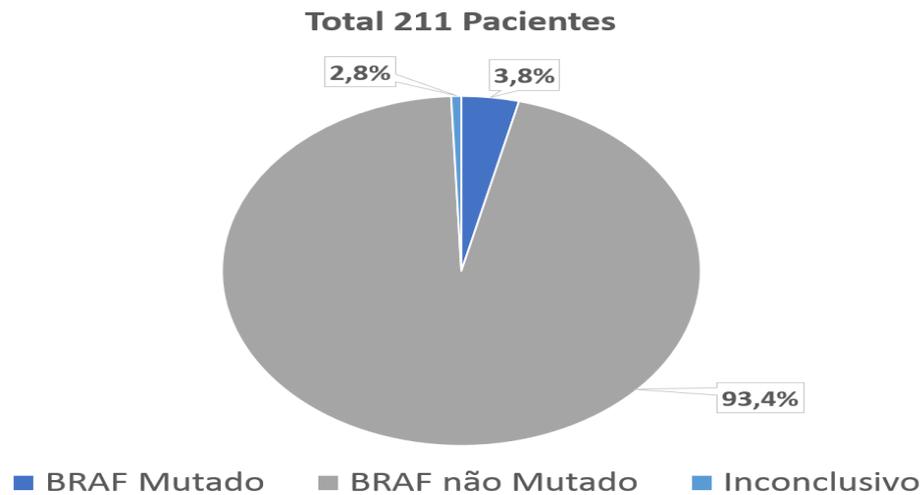
Para descrição dos dados referentes ao *status* de instabilidade de microssatélite, tumores com instabilidade de microssatélites de alta frequência (MSI-H) foram referidos como MSI ao longo deste estudo e tumores com instabilidade de microssatélites de baixa frequência (MSI-L) ou tumores com estabilidade de microssatélites foram descritos com MSS ao longo deste estudo.

6.8.1- Dados moleculares do gene *KRAS*

Todos os 211 pacientes incluídos no estudo são *KRAS* códon 12 e 13 selvagem (sem mutação). A pesquisa da mutação do códon 61 do *KRAS* foi realizada em 138 pacientes; destes, 137 pacientes (99,2%) não possuem a mutação neste códon e 1 paciente apresentou resultado inconclusivo.

6.8.2 Dados moleculares do gene *BRAF*

Foram incluídos e analisados 211 casos de CCR quanto ao *status* de *BRAF* V600E (Figura 17). Obtivemos 3,8% (8) casos *BRAF* mutado, 93,4% (197) casos *BRAF* não mutado e 2,8% (6) casos inconclusivos (Figura 18). Portanto, após exclusão dos casos inconclusivos, totalizamos 205 pacientes e obtivemos uma frequência de mutação do *BRAF* de 3,9%.



Fonte: Arquivo Próprio (2019)

Figura 18 - Resultados da pesquisa da mutação do *BRAF*

Ao analisar as características clínicas e demográficas dos pacientes com mutação do *BRAF*, percebemos que 7 pacientes eram do sexo feminino e 1 paciente do sexo masculino. Cinco pacientes apresentavam idade menor que 50 anos e 3 pacientes apresentavam idade \geq a 50 anos. Os pacientes estavam divididos igualmente entre cólon direito e cólon esquerdo. Dois pacientes eram grau histológico II e dois pacientes grau III. Três pacientes não tinham informação de grau histológico. A maior parte dos pacientes eram EC IV ao diagnóstico (Tabela 3).

Tabela 3 - Características clínicas e demográficas dos pacientes com mutação do *BRAF*

Paciente	Sexo	Idade	Localização	Grau histológico	Estadiamento ao diagnóstico
39	F	67	CD	III	IIIc
51	F	34	CD	II	I
61	F	70	CD	II	IV
152	F	43	CE	SI	IV
153	F	33	CE	SI	IV
154	F	46	CE	III	IV
166	F	57	CE	SI	IV
178	M	18	CD	II	IIIc

F = feminino; M = masculino; CD = cólon direito; CE = cólon esquerdo; SI = sem informação.

Fonte: Arquivo Próprio (2019)

Realizamos análise estratificada do *status* de *BRAF* pelo sexo, idade, grau histológico e lateralidade do tumor primário. Encontramos uma maior proporção de mutação do *BRAF* no sexo feminino (com diferença estatisticamente significativa), assim como uma tendência à maior proporção desta mutação nos tumores de grau histológico III (p=0,059). Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à idade. Quanto à análise da associação do *status* de *BRAF* e lateralidade do tumor primário, encontramos uma proporção de mutação do *BRAF* de 12,1% entre os tumores do cólon D e 2,5% entre os tumores do cólon E. Portanto, observamos uma maior proporção de mutação do *BRAF* no cólon D do que no cólon E, com significância estatística, p=0,01 (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise do *status* de *BRAF* estratificada pelo sexo, idade, grau histológico e lateralidade do tumor primário

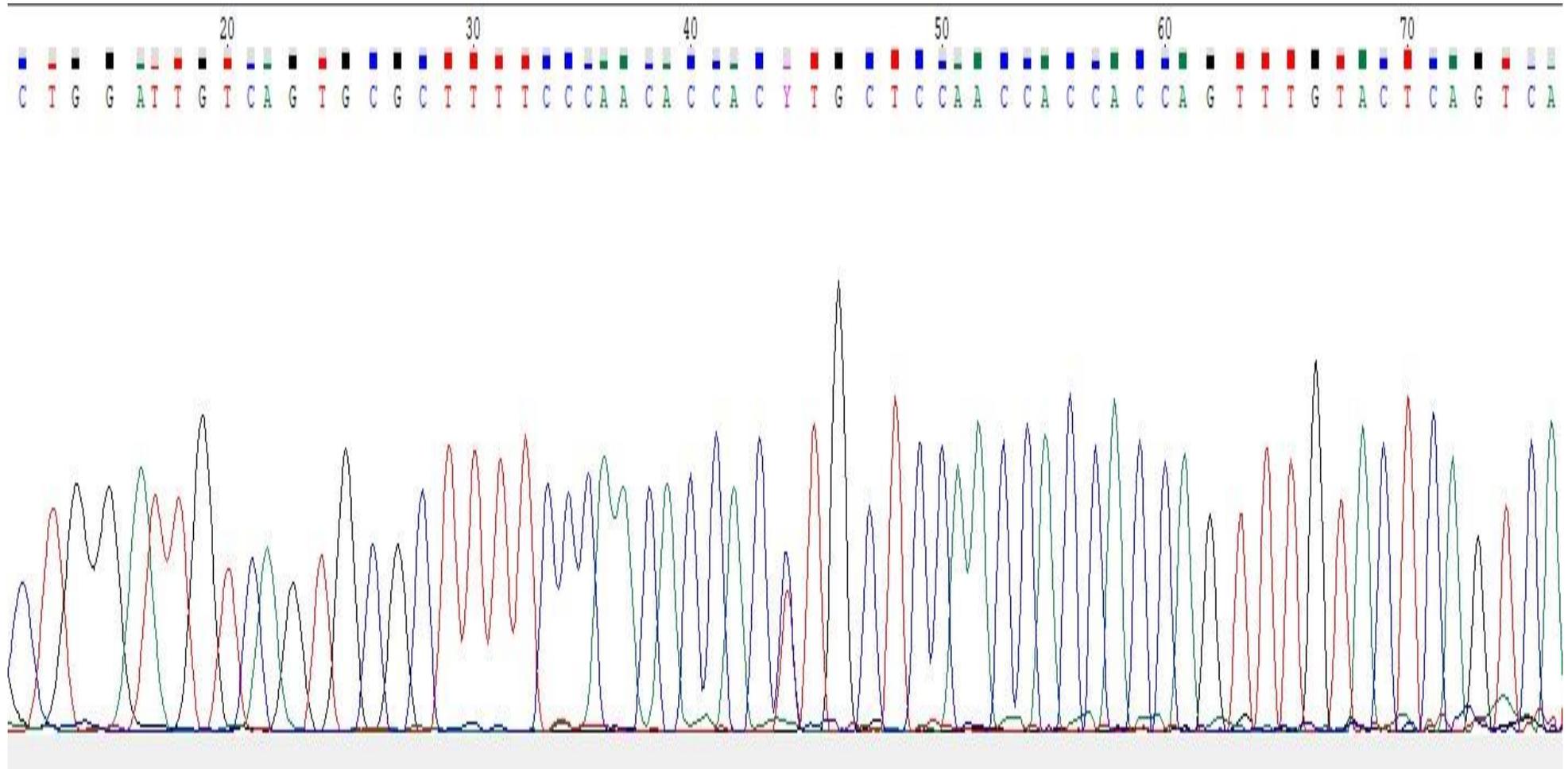
Variável	Categoria	BRAF N (%)		P-valor
		Mutado	Não Mutado	
Sexo	Feminino	7 (7,9%)	82 (92,1%)	0,025
	Masculino	1(1%)	104 (99%)	
Idade (anos)	< 50	5 (6%)	78 (94%)	0,291
	≥ 50	3 (2,7%)	108 (97,3%)	
Grau Histológico	I	0 (0%)	9 (100%)	0,059
	II	3 (2,2%)	136 (97,8%)	
	III	2 (20%)	8 (80%)	
Lateralidade do tumor primário	Direito	4 (12,1%)	29 (87,9%)	0,01
	Esquerdo	4 (2,5%)	157 (97,5%)	

Fonte: Arquivo Próprio (2019)

6.8.3 Dados moleculares do gene *NRAS*

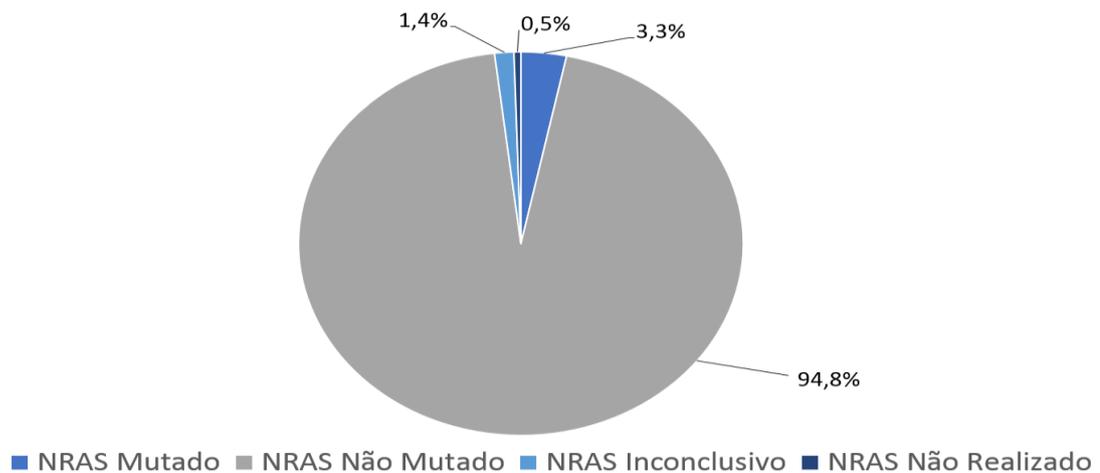
Foram incluídos e analisados 211 casos de CCR quanto ao *status* de mutação do *NRAS* (Figura 19). Obtivemos 3,3% (7) casos *NRAS* mutado, 94,8% (200) casos *NRAS* não mutado, 1,4% (3) casos inconclusivos e 0,5% (1) caso em que o *NRAS* não foi avaliado por ausência de material tumoral. Portanto, após exclusão dos casos inconclusivos e não realizado,

totalizamos 207 pacientes e obtivemos uma frequência de mutação do *NRAS* de 3,38%. Todas as mutações do *NRAS* ocorreram no códon 12 (Figura 20).



Fonte: Arquivo Próprio (2019)

Figura 19 - Análise de mutação do *NRAS* (códon 12) por sequenciamento direto



Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 20 - Resultados da pesquisa da mutação do *NRAS*

Ao analisar as características clínicas e demográficas dos pacientes com mutação do *NRAS*, percebemos que 3 pacientes eram do sexo feminino e 4 pacientes eram do sexo masculino. Três pacientes apresentavam idade menor que 50 anos e 4 pacientes apresentavam idade \geq a 50 anos. A maior parte dos tumores estavam localizados no cólon esquerdo (6). Um paciente apresentava grau histológico I, 4 pacientes apresentavam grau histológico II, 1 paciente era grau III e 1 paciente não apresentava informação de grau histológico. A maior parte dos pacientes eram EC IV ao diagnóstico (Tabela 5).

Tabela 5 - Características clínicas e demográficas dos pacientes com mutação do *NRAS*

Paciente	Sexo	Idade	Localização	Grau histológico	Estadiamento ao diagnóstico
48	M	56	CE	I	II
50	F	65	CD	II	IIIb
82	F	49	CE	II	IV
85	F	47	CE	II	IV
96	M	66	CE	II	IV
101	M	27	CE	III	IV
196	M	54	CE	SI	Ila

F = feminino; M = masculino; CD = cólon direito; CE = cólon esquerdo; SI = sem informação.

Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Realizamos análise estratificada do *status* de *NRAS* pelo sexo, idade, grau histológico e lateralidade do tumor primário. Encontramos uma proporção de mutação do *NRAS* no sexo feminino de 3,1% e no sexo masculino de 3,6%, sem diferença estatisticamente significativa. A proporção de mutação de *NRAS* por faixa etária foi igual (3,4% nos pacientes < 50 anos e 3,4% nos pacientes ≥ 50 anos). Em relação ao grau histológico, 10% dos pacientes eram grau I, 2,7% eram grau II e 9,1% eram grau III, sem diferença estatisticamente significativa (p=0,162). Quanto à associação entre lateralidade do tumor primário e *status de NRAS*, encontramos uma proporção ligeiramente maior de mutação do *NRAS* nos tumores do cólon E (3,5%) quando comparado aos tumores do cólon D (2,9%), porém, sem significância estatística (p=0,85) (Tabela 6).

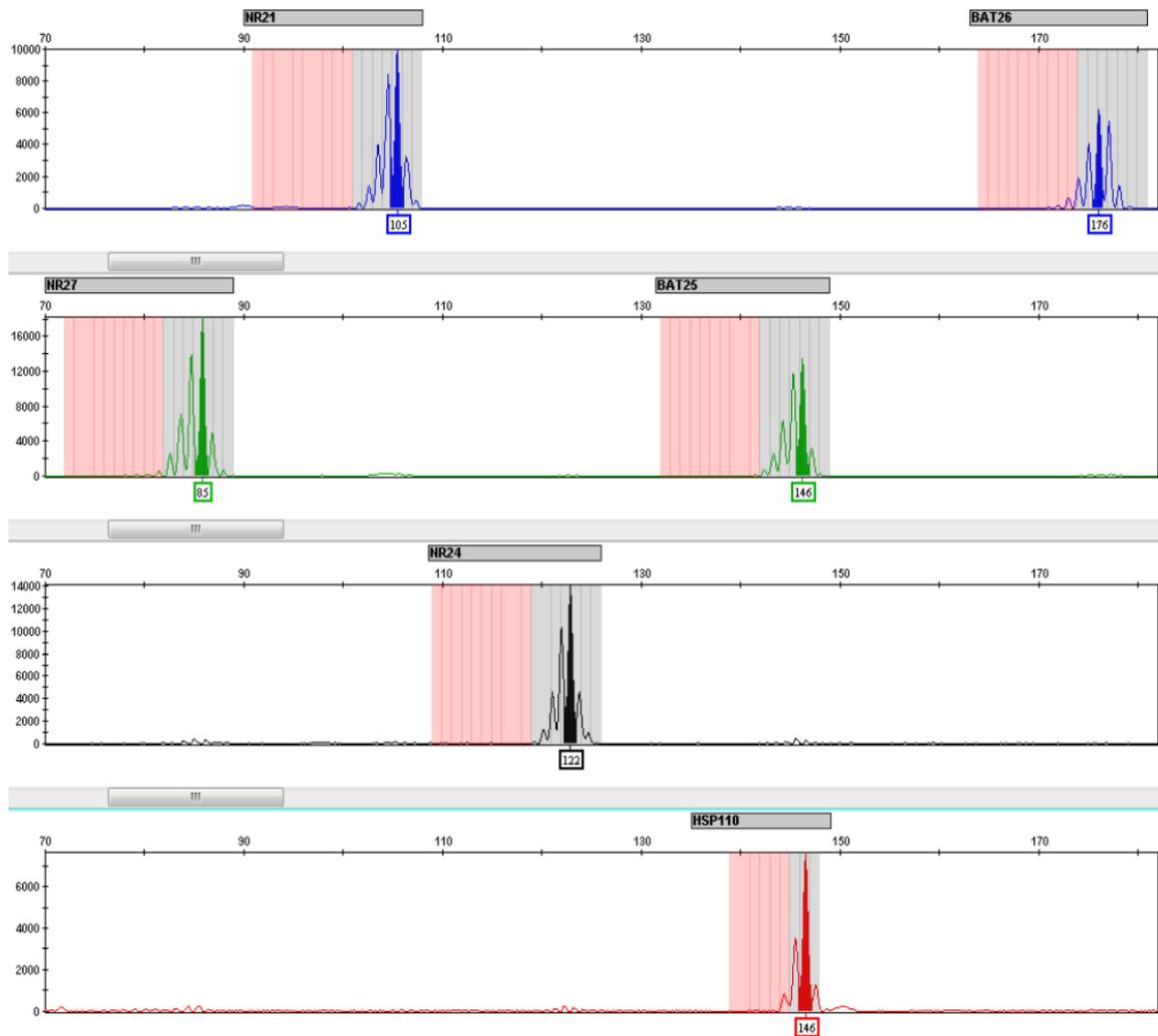
Tabela 6 - Análise do *status* de *NRAS* estratificada pelo sexo, idade, grau histológico e lateralidade do tumor primário

Variável	Categoria	NRAS N(%)		P-valor
		Mutado	Não Mutado	
Sexo	Feminino	3 (3,1%)	93 (96,9%)	1,0
	Masculino	4 (3,6%)	107 (96,4%)	
Idade (anos)	< 50	3 (3,4%)	86 (96,6%)	1,0
	≥ 50	4 (3,4%)	114 (96,6%)	
Grau Histológico	I	1 (10%)	9 (90%)	0,162
	II	4 (2,7%)	144 (97,3%)	
	III	1 (9,1%)	10 (90,9%)	
Lateralidade do tumor primário	Direito	1 (2,9%)	34 (97,1%)	0,85
	Esquerdo	6 (3,5%)	166 (96,5%)	

Fonte: Arquivo Próprio (2019)

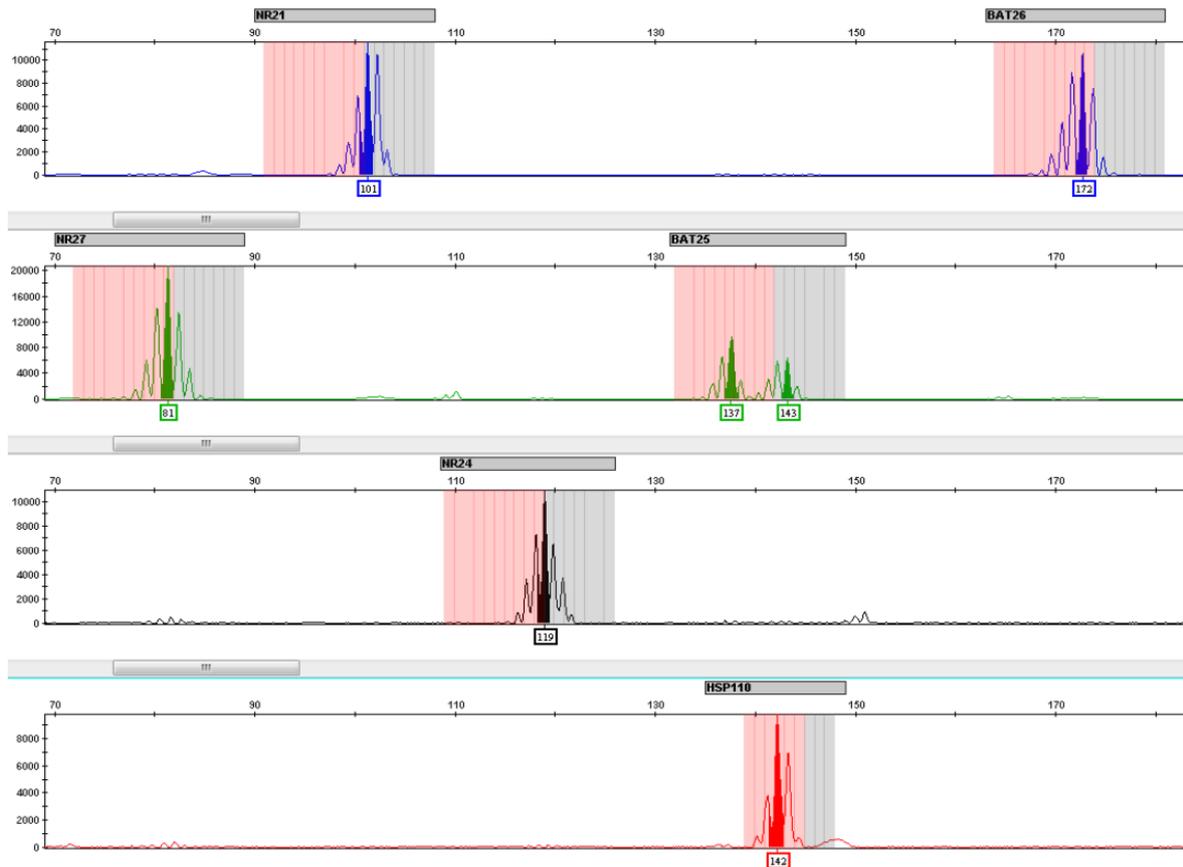
6.8.4 Dados da análise de instabilidade de microssatélites

Foram incluídos e analisados 211 casos de CCR quanto ao *status* de MSI (Figuras 21 e 22).



Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 21 - Análise de fragmentos com seis marcadores (NR27, NR21, NR24, BAT25, BAT26 e HSP110) para pesquisa molecular de MSI em uma amostra com estabilidade de microsatélite (MSS).

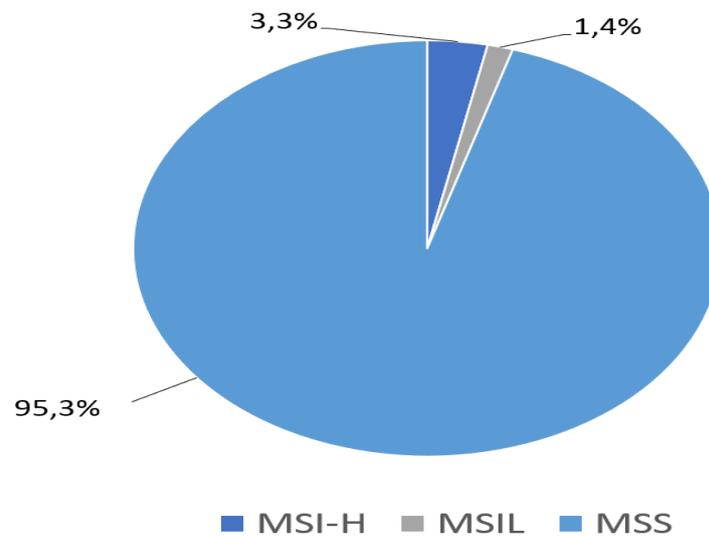


Fonte: Arquivo Próprio (2019)

Figura 22 - Análise de fragmentos com seis marcadores (NR27, NR21, NR24, BAT25, BAT26 e HSP110) para pesquisa molecular de MSI em uma amostra com instabilidade de microsatélite (MSI-H)

Obtivemos 3,3% (7) casos MSI-H, 1,4% (3) casos MSI-L e 95,3% (201) casos MSS (Figura 23).

Para as análises estatísticas, foram agrupados os casos MSS e MSI-L em apenas um grupo, tendo assim: MSS+MSI-L e MSI-H. Essa abordagem em apenas dois grupos é apoiada pela literatura que demonstra uma similaridade tanto clínica quanto molecular entre casos MSS e MSI-L⁵⁴.



Fonte: Arquivo Próprio (2019)

Figura 23 - Resultados da pesquisa da Instabilidade de microsatélites

Ao analisar as características clínicas e demográficas dos 7 pacientes MSI-H observamos que 4 pacientes apresentavam idade menor que 50 anos e 3 pacientes apresentavam idade \geq a 50 anos. Cinco pacientes eram do sexo masculino e 2 pacientes do sexo feminino. Cinco pacientes apresentaram grau histológico II e 2 pacientes apresentaram grau III. A maior parte dos pacientes eram EC IV ao diagnóstico. Quatro casos estavam localizados no cólon D e 3 casos no cólon E (Tabela 7).

Tabela 7 - Características clínicas e demográficas dos pacientes MSI-H

Paciente	Sexo	Idade	Localização	Grau histológico	Estadiamento ao diagnóstico
39	F	67	CD	III	IIIc
46	M	56	CE	II	IIb
84	F	30	CD	II	IVa
89	M	45	CD	III	IVa
106	M	42	CD	II	IVa
189	M	53	CE	II	IVa
205	M	47	CE	II	IV

F = feminino; M = masculino; CD = cólon direito; CE = cólon esquerdo; SI = sem informação.

Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Realizamos análise estratificada do *status* MSI pelo sexo, idade, grau histológico e lateralidade do tumor primário. Encontramos uma proporção de MSI-H no sexo feminino de 2,2% e no sexo masculino de 4,7% (p- 0,453). Quatro pacientes (4,7%) tinham menos de 50 anos e 3 pacientes (2,6%) tinham 50 anos ou mais (p-0,466). Cinco pacientes (3,5%) eram grau histológico II e 2 pacientes (20%) eram grau III (p-0,108). Nenhuma destas variáveis apresentaram diferença estatisticamente significativa (p<0,05). Quanto à associação entre lateralidade do tumor primário e *status* de MSI, encontramos, entre os tumores do cólon D, uma proporção de MSI-H de 11,8% e entre os tumores do cólon E foi encontrada uma proporção de 1,8%. Portanto, observamos uma maior proporção de MSI-H entre os tumores do cólon D do que do cólon E, com significância estatística, p-0,004 (Tabela 8).

Tabela 8 - Análise do *status* de MSI estratificada pelo sexo, idade e grau histológico

Variável	Categoria	MSI N (%)		P-valor
		MSI-H	MSI-L/MSS	
Sexo	Feminino	2 (2,2%)	91 (97,8%)	0,453
	Masculino	5 (4,7%)	102 (95,3%)	
Idade (anos)	< 50	4 (4,7%)	82 (95,3%)	0,466
	≥ 50	3 (2,6%)	111 (97,4%)	
Grau Histológico	I	0 (0%)	9 (100%)	0,108
	II	5 (3,5%)	139 (96,5%)	
	III	2 (20%)	8 (80%)	
Lateralidade do tumor primário	Direito	4 (11,8%)	30 (88,2%)	0,004
	Esquerdo	3 (1,8%)	163 (98,2%)	

Fonte: Arquivo Próprio (2019).

6.8.5 Associação entre o status de *BRAF* e *NRAS* com o status de MSI

Realizamos uma análise para avaliar se existe associação entre os dados moleculares de *BRAF* e MSI. Encontramos uma maior proporção de mutação do *BRAF* em pacientes MSI-H (16,7%) quando comparado com pacientes MSS/MSI-L (3,7%), porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa, com p-0,117 (Tabela 9).

Ao analisar a associação entre os dados moleculares de *NRAS* e MSI, encontramos uma maior proporção de mutação do *NRAS* em pacientes MSS/MSI-L (3,5%) quando comparado com pacientes MSI-H (0%), porém, sem diferença estatisticamente significativa (Tabela 9).

Tabela 9 - Associação entre o *status* de *NRAS* e *BRAF* com o *status* de MSI

			Mutado	Não mutado	Total	P- Valor
NRAS	MSI	MSI-H	0 (0%)	7 (100%)	7 (100%)	1,000
		MSS/MSI-L	7 (3,5%)	193 (96,5%)	200 (100%)	
		Total	7 (3,4%)	200 (96,6%)	207 (100%)	
BRAF	MSI	MSI-H	1 (16,7%)	5 (83,3%)	6 (100%)	0,117
		MSS/MSI-L	7 (3,7%)	181 (96,3%)	188 (100%)	
		Total	8 (4,1%)	186 (95,9%)	194 (100%)	

Fonte: Arquivo Próprio (2019).

6.9 Avaliação de resposta ao Cetuximabe

Para as análises de resposta ao Cetuximabe (Tabela 10) foram excluídos os pacientes com mutação do gene *NRAS* (7 pacientes), assim como os 3 pacientes com resultado *NRAS* inconclusivo e 1 paciente sem análise do *NRAS* devido à ausência de material tumoral, totalizando 200 pacientes avaliados.

Do total de 200 pacientes analisados, 54 pacientes (27%) apresentaram doença estável, 74 pacientes (37%) apresentaram progressão de doença, 40 pacientes (20%) apresentaram resposta parcial e 32 pacientes (16%) não realizaram avaliação de resposta. Nenhum paciente apresentou resposta completa. Entre os 168 pacientes que fizeram avaliação de resposta ao Cetuximabe, 54 (32%) apresentaram doença estável, 74 pacientes (44%) apresentaram progressão de doença e 40 pacientes (24%) apresentaram resposta parcial. Portanto, a taxa de resposta ao Cetuximabe foi de 24%.

Tabela 10 - Avaliação de resposta ao Cetuximabe por *status* de *BRAF*, *NRAS*, lateralidade do tumor primário e protocolo de tratamento com Cetuximabe

Variável	Categoria	N	Doença estável N (%)	Progressão N (%)	Resposta Parcial N (%)	p – valor
Geral		168	54 (32) IC 95%: 25-39	74 (44) IC 95%: 37-52	40 (24) IC 95%: 17-30	
<i>BRAF</i>	Mutado	4	2 (50)	2 (50)	0	0,68
	Não Mutado	160	50 (31)	70 (44)	40 (25)	
<i>NRAS</i>	Mutado	7	1 (14)	5 (72)	1 (14)	0,48
	Não Mutado	164	52 (32)	72 (44)	40 (24)	
Lateralidade	Direito	22	7 (32)	12 (54)	3 (14)	0,42
	Esquerdo	146	47 (32)	62 (42)	37 (26)	
Protocolo de tratamento	Cetuximabe + Irinotecano	127	38 (30)	55 (43)	34 (27)	0,25
	Cetuximabe	40	16 (40)	18 (45)	6 (15)	

Fonte: Arquivo Próprio (2019)

Realizamos a análise de resposta ao Cetuximabe estratificada pelo *status* de *BRAF*. Entre os pacientes *BRAF* não mutado a taxa de resposta foi de 25%, enquanto que entre os pacientes *BRAF* mutado, a taxa de resposta foi de 0% (p=0,68).

Realizamos a análise de resposta ao Cetuximabe estratificada pelo *status* de *NRAS*. Entre os pacientes *NRAS* não mutado a taxa de resposta foi de 24%, enquanto que entre os pacientes *NRAS* mutado, a taxa de resposta foi de 14% (p=0,48).

Realizamos também a análise de resposta ao Cetuximabe estratificada pela lateralidade do tumor primário. Entre os tumores do cólon D a taxa de resposta foi de 14%, enquanto que entre os tumores do cólon E a taxa de resposta foi de 26% (p=0,42).

Quanto a análise de resposta ao Cetuximabe estratificada pelo protocolo de tratamento, encontramos uma taxa de resposta de 27% entre os pacientes que realizaram tratamento com Cetuximabe + Irinotecano e de 15% entre os pacientes que realizaram tratamento com Cetuximabe em monoterapia (p=0,25).

6.10 *Status* de sobrevida

Após análise do *status* de sobrevida observamos que a grande maioria dos pacientes do estudo (201 pacientes, 95,3%) faleceram em virtude do câncer. A tabela 11 mostra o *status* atual de sobrevida dos 211 pacientes incluídos no estudo:

Tabela 11 - *Status* de sobrevida dos pacientes incluídos no estudo

Total 211 pacientes	
Vivo com doença	4(1,9%)
Óbito por câncer	201(95,2%)
Perda de seguimento	5(2,4%)
Óbito por outras causas	1(0,5%)

Fonte: Arquivo Próprio (2019).

6.10 Análises de sobrevida global

6.10.1 Análises de sobrevida global geral

Foram geradas tabelas de estimativa de sobrevida global (SG) e gráficos de curvas de Kaplan-Meier, sendo o evento de interesse, o óbito por qualquer causa.

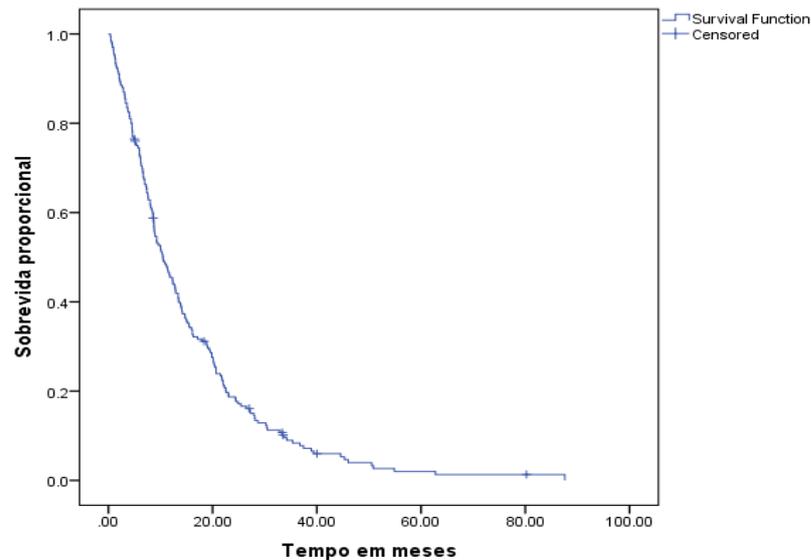
Para as análises gerais de sobrevida foram excluídos os pacientes com mutação do gene *NRAS* (7 pacientes), assim como os 3 pacientes com resultado *NRAS* inconclusivo e 1 paciente sem análise do *NRAS* devido à ausência de material tumoral, totalizando 200 pacientes (obviamente, nas análises envolvendo o gene *NRAS*, estes pacientes foram mantidos, totalizando 211 pacientes). Para as análises envolvendo o gene *BRAF*, do total de 200 pacientes, excluímos mais 6 pacientes com o resultado *BRAF* inconclusivo.

De modo geral, para nossa casuística, a sobrevida global mediana foi estimada em 10,4 meses (IC 95%: 8,14-12,76). A probabilidade de sobrevida para os pacientes com CCR estimada para 6 meses foi de 73%, doze meses de 45,5%, 24 meses de 18,7%, 36 meses de 8,4% e em 60 meses de 2% (Tabela 12 e Figura 24). O tempo médio de seguimento dos casos foi de 14,6 meses (desvio-padrão de 13,7 meses)

Tabela 12 - Estimativa de sobrevida global para os pacientes tratados com Cetuximabe

N (casos)	N (eventos)	Probabilidade de sobrevida (%)					Mediana (meses)
		6m	12m	24m	36m	60m	
200	191	73	45,5	18,7	8,4	2	10,4 (IC 95%: 8,14-12,76)

Fonte: Arquivo Próprio (2019).



Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 24 - Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global

6.10.2 Análises de sobrevida global estratificada por subgrupos

Avaliamos, de forma exploratória, o impacto de algumas variáveis na sobrevida global dos pacientes tratados com Cetuximabe. Em relação à idade, percebemos uma maior sobrevida para os pacientes ≥ 50 anos (12,7 x 8,9m), porém, sem diferença estatística. Não houve diferença de sobrevida em relação ao sexo (feminino x masculino). A presença de invasão angiolinfática não impactou na sobrevida, assim como a realização de ablação por radiofrequência. Pacientes com grau histológico I (16,2m) apresentaram sobrevida superior aos pacientes com grau histológico II (12,8m) e grau III (4,6m) porém, não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,10$). Trinta e cinco pacientes apresentaram invasão perineural positiva com sobrevida mediana de 8,6 meses e 97 pacientes não apresentaram invasão perineural com sobrevida mediana de 13,4 meses ($p=0,02$). Quarenta e um pacientes que realizaram metastasectomia apresentaram uma maior sobrevida (18,9m) quando comparado aos 159 pacientes que não a fizeram (sobrevida de 8,9m), $p<0,001$. O *status* linfonodal positivo versus negativo assim como o número de linfonodos ressecados ($<12, \geq 12$) não impactaram na sobrevida. Quanto ao número de linfonodos positivos, observamos que pacientes com menos de 2 linfonodos positivos apresentou uma sobrevida superior (13,4 meses) à dos pacientes com mais que 2 linfonodos positivos (10,8 meses), sendo esta

diferença estatisticamente significativa ($p=0,01$). Não houve associação significativa entre o estadiamento ao diagnóstico ($p=0,76$), realização de radioablação (0,17) ou linha de tratamento com Cetuximabe ($p=0,54$). Em relação ao protocolo de quimioterapia na primeira linha, 147 pacientes realizaram Oxaliplatina e 33 pacientes realizaram Irinotecano. A sobrevida dos pacientes submetidos a Oxaliplatina na primeira linha foi superior à dos pacientes que realizaram Irinotecano com um p -valor estatisticamente significativo ($p=0,01$) (Tabela 13). Os resultados das análises moleculares serão descritos nos tópicos mais à frente, em separado.

Tabela 13 – Análises de sobrevida por subgrupos nos pacientes tratados com Cetuximabe

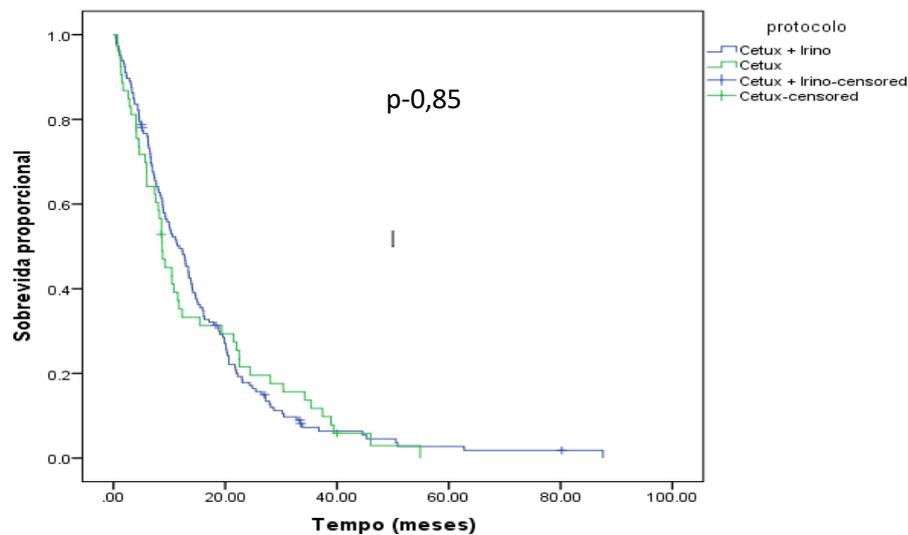
Variável	N (casos)	N (eventos)	Sobrevida mediana (meses)	p-valor
Lateralidade do tumor primário				
Direito	34	33	6,6 (IC 95%: 5,27-8,06)	0,02
Esquerdo	166	158	11,5 (IC95%: 9,18-13,87)	
Idade				
<50 anos	86	82	8,9 (IC 95%: 7,28-10,52)	0,12
≥50anos	114	109	12,7 (IC95%: 9,71-15,71)	
Sexo				
Feminino	93	86	10,1 (IC 95%: 7,99-12,30)	0,72
Masculino	107	103	11,4 (IC 95%: 8,20-14,53)	
Grau histológico				
Grau I	9	9	16,2 (IC 95%: 3,01-29,51)	0,10
Grau II	144	138	12,8 (IC95%:10,04-15,58)	
Grau III	10	9	4,6 (IC 95%: 0,0-9,35)	
Invasão angiolinfática				
Positiva	68	67	11,5 (IC 95%: 7,25-15,81)	0,17
Negativa	69	64	12,2 (IC 95%: 9,70-14,87)	
Invasão neural				
Positiva	35	35	8,6 (IC 95%: 5,45-11,69)	0,02
Negativa	97	91	13,4 (IC 95%: 11,07-15,73)	
Ressecção de metástase				
Sim	41	154	18,9 (IC 95%: 9,86-27,91)	<0,001
Não	159	37	8,9 (IC 95%: 7,62-10,17)	

<i>Status</i> linfonodal					
Negativo	56	51	13,4 (IC 95%: 8,54-18,26)		
Positivo	111	108	11 (IC 95%:8,59-13,55)		0,22
Número de LNF positivos					
< 2	70	64	13,4 (IC 95%: 7,63-19,17)		
≥ 2	97	95	10,8 (IC 95%: 8,15-13,46)		0,01
Número de LFN ressecados					
< 12	71	67	12,8 (IC 95%: 9,97-15,65)		
≥ 12	96	92	10,8 (IC 95%: 7,55-14,06)		0,36
Estadiamento ao diagnóstico					
I	2	2	4,8		
II	37	32	15,1 (IC 95%: 12,05-18,17)		
III	60	58	12,3 (IC 95%: 8,63-16,07)		0,76
IV	110	97	8,7 (IC 95%: 7,36-10,05)		
QT 1º linha					
Oxaliplatina	147	139	10,3 (IC 95%: 7,32-13,3)		
Irinotecano	33	33	8,2 (IC 95%: 5,73-10,69)		0,01
Linha de tratamento com Cetuximabe					
1º e 2º	14	14	13,8 (IC 95%: 11,66-16,08)		
3º	141	134	9,2 (IC 95%: 7,57- 11,02)		
4º e 5º	45	43	11,7 (IC 95%: 9,34-14,24)		0,54
Radioablação					
Sim	15	14	17,1 (IC 95%: 9,33-24,89)		
Não	185	177	10 (IC 95%: 8,11-11,92)		0,17
<i>BRAF</i>					
Mutado	8	7	4,8 (IC 95%: 0,61-9,17)		
Não mutado	186	179	10,5(IC95%: 8,28-12,73)		0,64
<i>NRAS</i>					
Mutado	7	7	6,9 (IC 95%: 1,40-12,53)		0.40
Não mutado	207	191	10,4 (IC 95%: 8,14-12,75)		
<i>Status</i> de MSI					
MSI-H	7	6	4,5 (IC 95%: 4,48-4,65)		
MSI-L/MSS	193	185	10,8 (IC 95%: 8,49-13,12)		0.09

Fonte: Arquivo Próprio (2019).

6.10.3 Análises de sobrevida global estratificada por protocolo de tratamento com Cetuximabe

Foi realizada uma análise de sobrevida estratificada pelo protocolo de tratamento com Cetuximabe. Para esta análise, avaliamos apenas os pacientes do estudo que receberam Cetuximabe isolado ou Cetuximabe + Irinotecano. Pacientes que realizaram outros protocolos foram excluídos desta análise. Foram avaliados 199 pacientes, sendo 146 destes tratados com Cetuximabe + Irinotecano e 53 tratados com Cetuximabe. Observamos uma maior sobrevida para os 146 pacientes submetidos à tratamento com Cetuximabe + Irinotecano (11,8 meses, IC95%: 9,29-14,29) quando comparado aos 53 pacientes submetidos à tratamento apenas com Cetuximabe (8,7 meses, IC95%: 7,48-9,92), porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,85$) (Figura 25).



Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 25 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global por protocolo de tratamento com Cetuximabe

6.10.4 Análises de sobrevida global estratificada pela lateralidade do tumor primário

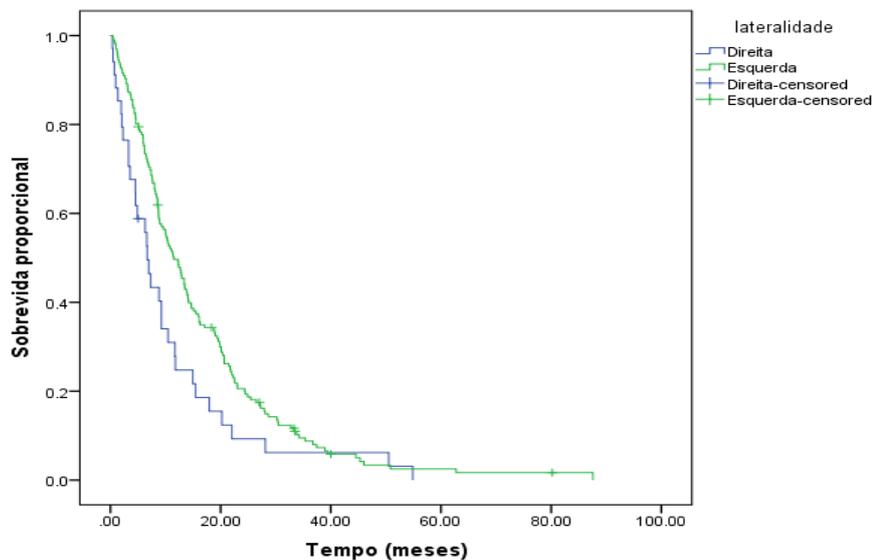
Foi realizada a estratificação da sobrevida global pela lateralidade do tumor primário. Encontramos uma sobrevida mediana de 11,5 meses (IC 95%: 9,18-13,87) para os tumores do

cólon E e de 6,6 meses (IC 95%: 5,27-8,06) para os tumores do cólon D. Esta diferença foi estatisticamente significativa com $p = 0,02$. A probabilidade de sobrevida foi superior para os tumores de cólon E em todas as análises de tempo realizadas (6, 12, 24, 36 e 60 meses) (Tabela 14 e Figura 26).

Tabela 14 - Estimativa de sobrevida pela lateralidade do tumor primário

Variável	Categoria	N (casos)	N (eventos)	Probabilidade de sobrevida (%)					Mediana meses	p-valor
				6 m	12m	24m	36m	60m		
Lateralidade	Cólon D	34	33	58,8	24,8	9,3	6,2	0	6,6 (IC 95%: 5,27-8,06)	0,02
	Cólon E	166	158	75,9	49,7	20,6	8	2,5		

Fonte: Arquivo Próprio (2019).



Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 26 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global pela lateralidade do tumor primário

6.10.5 Análises de sobrevida global estratificada por *status* de *BRAF*

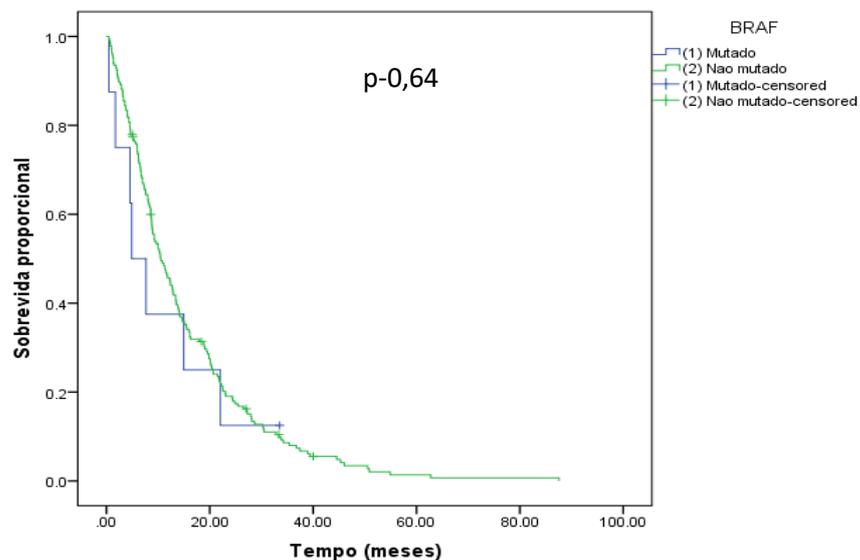
Foi realizada análise de sobrevida estratificando a casuística total em relação ao *status* de *BRAF*. Encontramos uma sobrevida mediana de 4,9 meses (IC 95%: 0,61-9,17) para os 8

pacientes *BRAF* mutado e 10,5 meses (IC 95%: 8,28-12,73) para os 186 pacientes *BRAF* não mutado. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos (p-0,64). A tabela a seguir contém o número de casos (N casos) analisados para cada categoria da variável em questão, assim como a probabilidade de sobrevida (%) estimada em um determinado período de tempo e o p-valor (Tabela 15, Figura 27).

Tabela 15 - Probabilidade de sobrevida por *status* do gene *BRAF*

Variável	Categoria	N (casos)	N (eventos)	Probabilidade de sobrevida (%)					Mediana (meses)	P-valor
				6m	12m	24m	36m	60m		
<i>BRAF</i>	Mutado	8	7	50	37,5	12,5	0	0	4,9 (IC95%: 0,61-9,17)	0,64
	Não mutado	186	179	74	45,7	19	8	1,4	10,5 (IC95%: 8,28-12,73)	

Fonte: Arquivo Próprio (2019).



Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 27 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global pelo *status* de *BRAF*

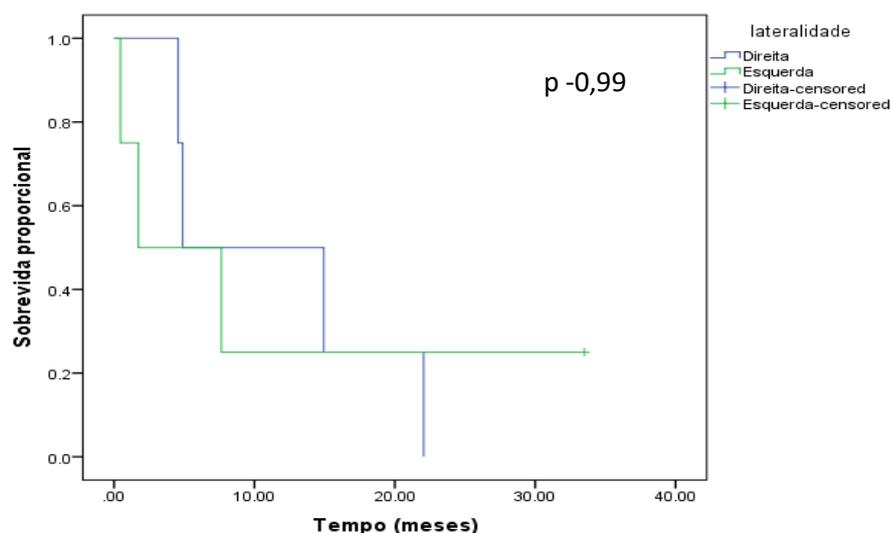
Realizamos também uma análise de sobrevida associando *status* de *BRAF* com a lateralidade do tumor primário. Encontramos uma sobrevida mediana de 4,9 meses para os pacientes *BRAF* mutado localizados no cólon D e de 1,7 meses para aqueles com tumores do

cólon E. Percebemos que a lateralidade do tumor primário não impactou na sobrevida dos pacientes com mutação do gene *BRAF* ($p=0,99$). Entre os pacientes sem mutação do *BRAF*, percebemos uma tendência a maior sobrevida para os pacientes com tumores localizados no cólon E (11,5 meses) quando comparado a sobrevida dos pacientes com tumores do cólon D (6,9 meses), $p=0,06$. (Tabela 16, Figuras 28 e 29).

Tabela 16 - Sobrevida global por *status* de *BRAF* e lateralidade do tumor primário

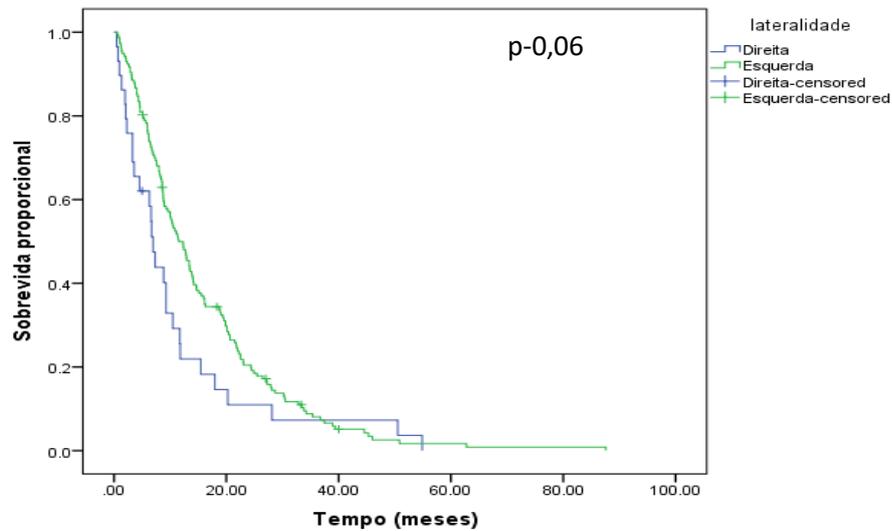
		Lateralidade	N (casos)	N (eventos)	Mediana (meses)	p-valor
BRAF	Mutado	D	4	4	4,9	0,99
		E	4	3	1,7	
		Global	8	7	4,9	
	Não mutado	D	29	28	6,9	0,06
		E	157	151	11,5	
		Global	186	179	10,5	

Fonte: Arquivo Próprio (2019).



Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 28 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global dos pacientes *BRAF* mutado pela lateralidade do tumor primário



Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 29 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global dos pacientes *BRAF* não mutado pela lateralidade do tumor primário

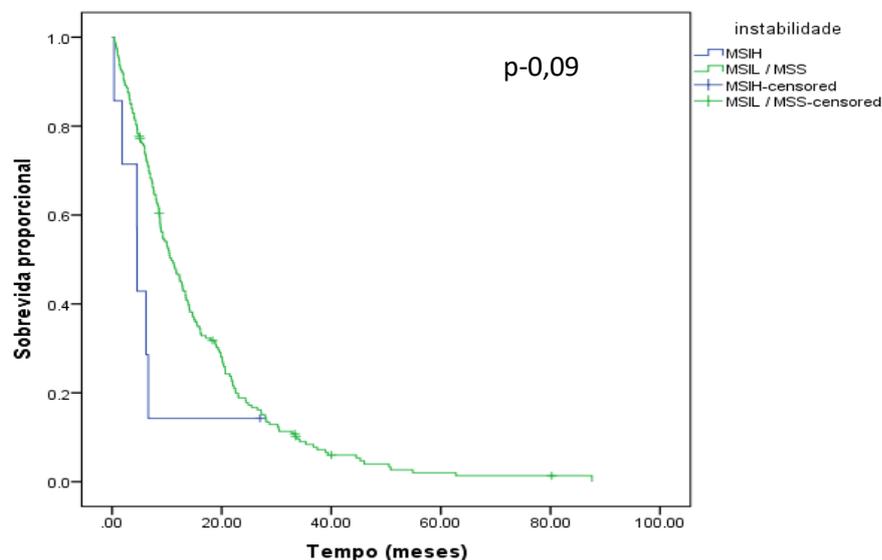
6.10.6 Análises de sobrevida global estratificada por *status* de MSI

Foi realizada análise de sobrevida estratificando a casuística total em relação ao *status* de *MSI* (MSS+MSI-L e MSI-H). A sobrevida mediana para os pacientes com MSI-H foi de 4,6 meses (IC 95%: 4,48-4,65) e para os pacientes MSS/MSI-L foi de 10,8 meses (IC 95%: 8,49-13,12). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os 2 grupos ($p=0,09$). A tabela a seguir contém o número de casos (N casos) analisados para cada categoria da variável em questão, assim como a probabilidade de sobrevida (%) estimada em um determinado período de tempo e o p-valor (Tabela 17, figura 30).

Tabela 17 - Estimativa de sobrevida global quanto ao *status* de MSI

Variável	Categoria	N (casos)	N (eventos)	Probabilidade de sobrevida (%)					Mediana meses	p- valor
				6 m	12m	24m	36m	60m		
MSI	MSI-H	7	6	42,9	14,3	14,3	14,3	14,3	4,6 (IC 95%: 4,48-4,65)	0,09
	MSS/MSI-L	193	185	74	46,6	18,9	8,4	2	10,8 (IC 95%: 8,49-13,12)	

Fonte: Arquivo Próprio (2019).



Fonte: Arquivo Próprio (2019).

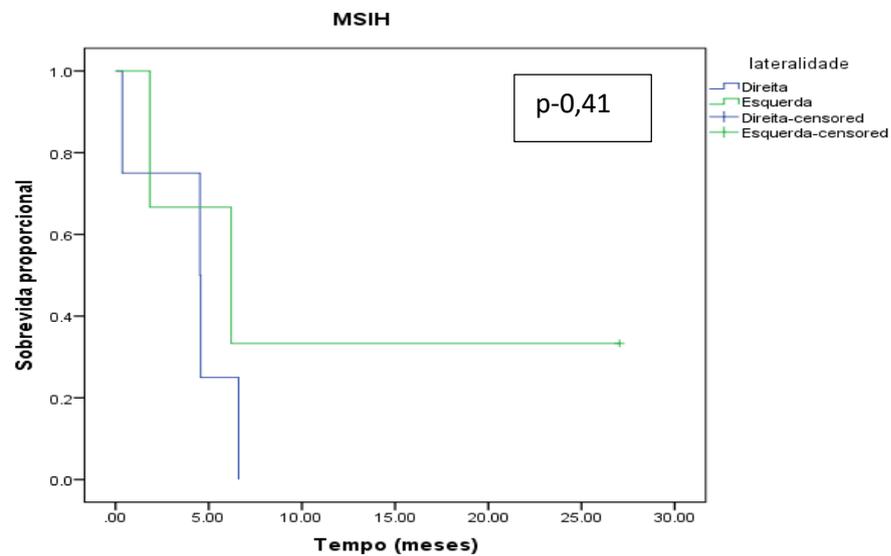
Figura 30 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global pelo *status* de MSI

Realizamos também uma análise de sobrevida associando o *status* de MSI com a lateralidade do tumor primário. Encontramos uma SG mediana de 4,5 meses para os pacientes MSI-H localizados no cólon D e de 6,2 meses para aqueles MSI-H localizados no cólon E. Percebemos que a lateralidade do tumor primário não impactou na sobrevida dos pacientes MSI-H ($p=0,41$). Entre os pacientes MSS/MSI-L a sobrevida foi de 7,3 meses para os tumores do cólon D e 11,5 meses para os tumores do cólon E, também, sem diferença estatisticamente significantes ($p=0,1$) (Tabela 18 e Figuras 31 e 32).

Tabela 18 - Sobrevida global por status MSI e lateralidade do tumor primário

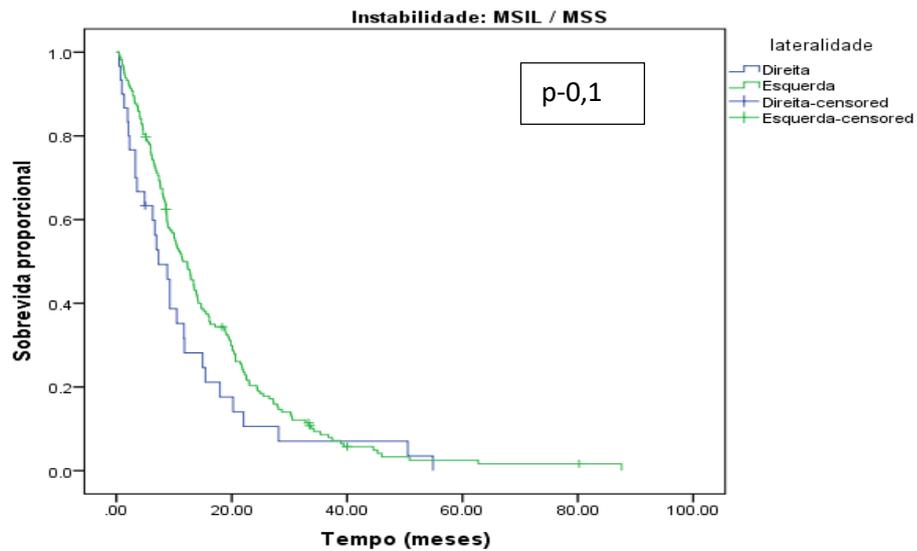
MSI	Lateralidade	N (casos)	N (eventos)	Mediana (meses)	p-valor
MSI-H	D	4	4	4,5	0,41
	E	3	2	6,2	
	Global	7	6	4,5	
MSI-L/MSS	D	30	29	7,3	0,10
	E	163	156	11,5	
	Global	193	185	10,8	

Fonte: Arquivo Próprio (2019).



Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 31 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global dos pacientes MSI-H pela lateralidade do tumor primário



Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 32 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global dos pacientes MSS/MSI-L pela lateralidade do tumor primário

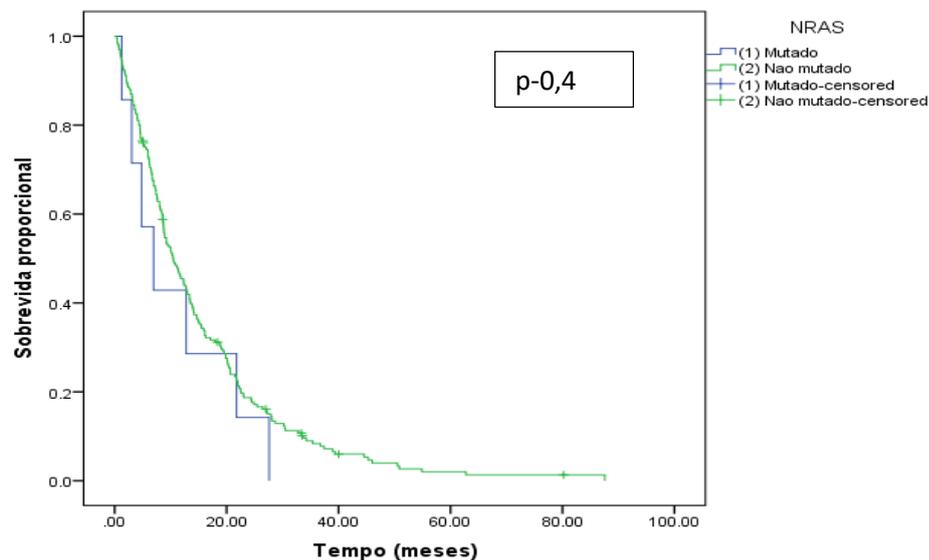
6.10.7 Análises de sobrevida global estratificada por *status* de *NRAS*

Foi realizada análise de sobrevida estratificando a casuística total em relação ao *status* de *NRAS*. A sobrevida mediana para os 7 pacientes *NRAS* mutado foi de 6,9 meses (IC 95%: 1,40-12,53) e para os 200 pacientes *NRAS* não mutado de 10,4 meses (IC 95%: 8,14-12,75), sem diferença estatisticamente significante ($p=0,4$). A tabela a seguir contém o número de casos (N casos) analisados para cada categoria da variável em questão, assim como a probabilidade de sobrevida (%) estimada em um determinado período de tempo e o p-valor (Tabela 19, Figura 33).

Tabela 19 - Estimativa de sobrevida global por *status* de *NRAS*

Variável	Categoria	N	Probabilidade de sobrevida (%)					Mediana (meses)	p-valor	
			6m	12m	24m	36m	60m			
NRAS	Mutado	7	7	57	42,9	14,3	0	0	6,9 (IC 95%: 1,40-12,53)	0,4
	Não mutado	200	191	73	45,5	18,7	8	2	10,4 (IC 95%: 8,14-12,75)	

Fonte: Arquivo Próprio (2019).



Fonte: Arquivo Próprio (2019).

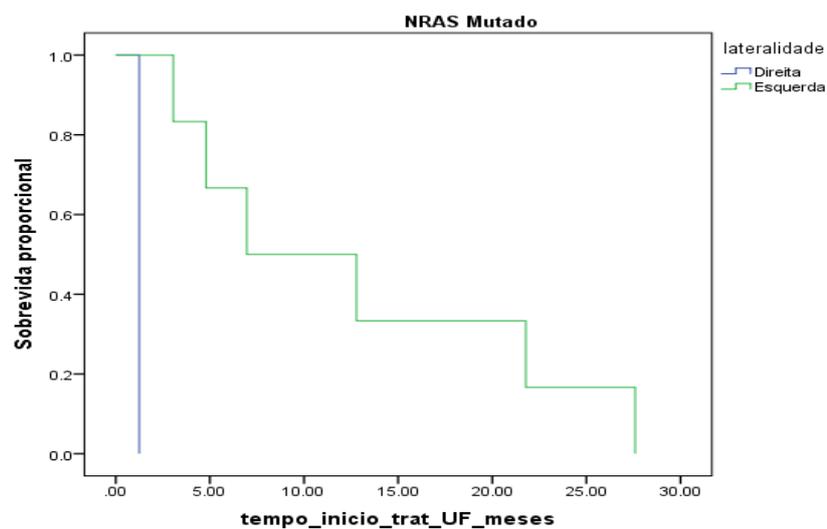
Figura 33 - Curvas de Kaplan Meier de sobrevida global pelo *status* de *NRAS*

Realizamos também uma análise de sobrevida associando a lateralidade do tumor primário com o *status* de *NRAS*. Encontramos uma SG mediana de 1,2 meses para os pacientes *NRAS* mutado localizados no cólon D e de 6,9 meses para aqueles *NRAS* mutado localizados no cólon E, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,01$). Entre os pacientes *NRAS* não mutado a sobrevida foi de 6,6 meses para os tumores do cólon D e 11,5 meses para os tumores do cólon E, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,02$) (Tabela 20 e Figuras 34 e 35).

Tabela 20 - Sobrevida global por *status* de *NRAS* e lateralidade do tumor primário

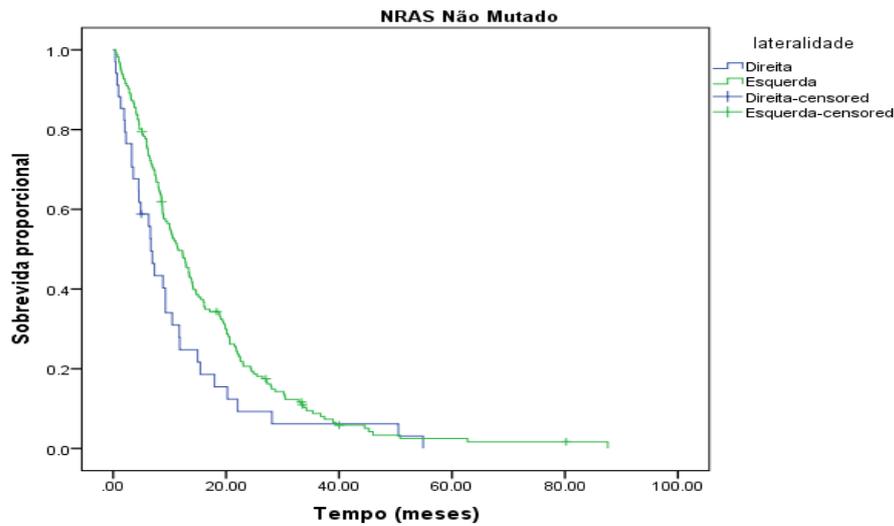
	Lateralidade	N (casos)	N (eventos)	Mediana (meses)	p-valor
NRAS					
<i>NRAS</i> mutado	D	1	1	1,2	0,014
	E	6	6	6,9	
	Global	7	7	6,9	
<i>NRAS</i> não mutado	D	34	33	6,6	0,028
	E	166	158	11,5	
	Global	200	191	10,4	

Fonte: Arquivo Próprio (2019).



Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 34 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global dos pacientes *NRAS* mutado pela lateralidade do tumor primário



Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 35 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global dos pacientes *NRAS* não mutado pela lateralidade do tumor primário

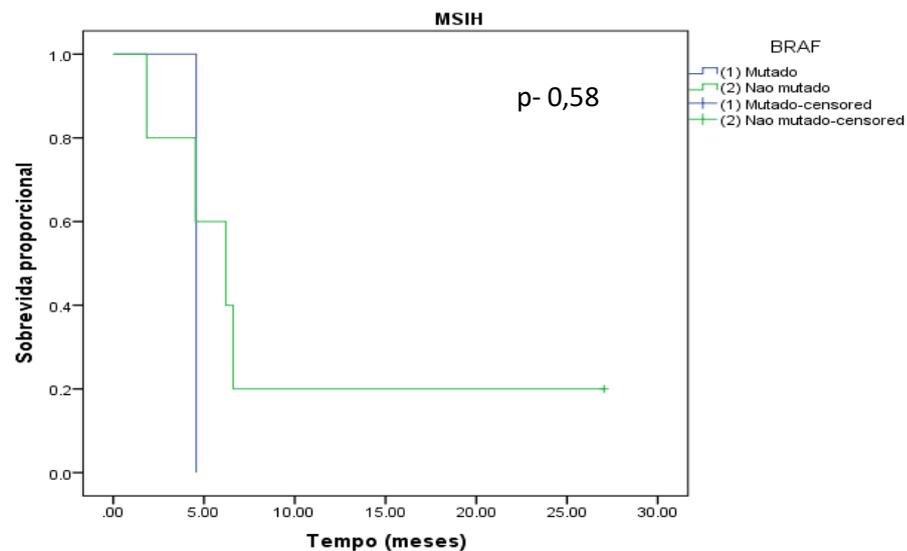
6.10.8 Análise de sobrevida global estratificada pelo *status de BRAF* e MSI

Foi realizada uma análise de sobrevida associando o *status* de *BRAF* e MSI. Entre os pacientes MSI-H, encontramos uma sobrevida mediana de 4,5 meses para os pacientes *BRAF* mutado e de 6,2 meses para os pacientes não mutados. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p=0,58$). Entre os pacientes MSI-L/MSS, a sobrevida mediana foi de 7,6 meses para os pacientes *BRAF* mutado e 10,8 meses para os pacientes sem mutação do *BRAF*. Esta diferença não apresentou significância estatística ($p=0,86$) (Tabela 21, Figuras 36 e 37).

Tabela 21 - Sobrevida global por *status* de *BRAF* e MSI

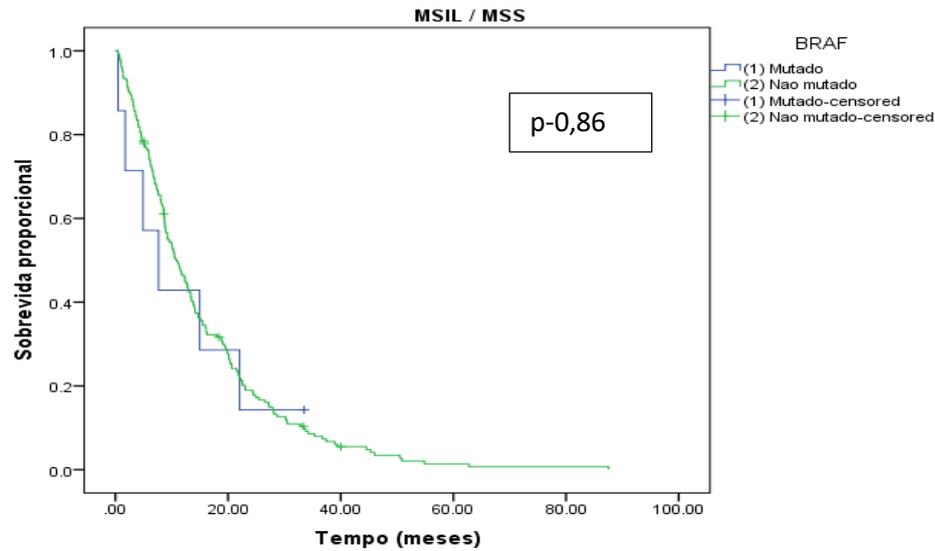
MSI		<i>BRAF</i>	N (casos)	N (eventos)	Mediana (meses)	p-valor
MSI-H	Mutado		1	1	4,5	0,58
	Não mutado		5	4	6,2	
	Global		6	5	4,5	
MSIL/MSS	Mutado		7	6	7,6	0,86
	Não mutado		181	175	10,8	
	Global		188	181	10,8	

Fonte: Arquivo Próprio (2019).



Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 36 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global para os pacientes MSI-H pelo *status* de *BRAF*



Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 37 - Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global para os pacientes MSI-L/MSS pelo *status* de *BRAF*

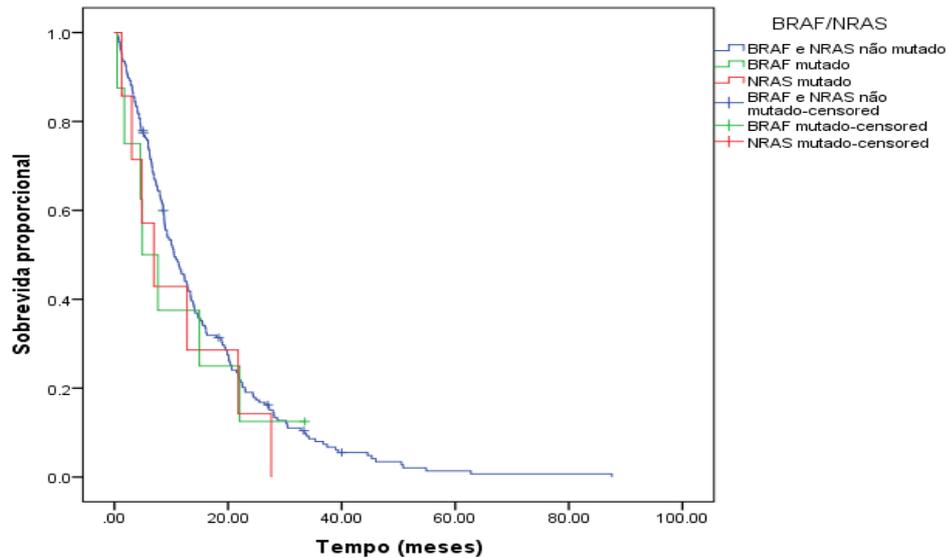
6.10.9 Análise de sobrevida global estratificada por *status* de *BRAF* e de *NRAS*

Foi realizada uma análise de sobrevida comparativa entre 3 grupos de pacientes: grupo 1 (pacientes *BRAF* não mutado + pacientes *NRAS* não mutado), grupo 2 (pacientes *BRAF* mutado) e grupo 3 (pacientes *NRAS* mutado). Nesta análise foram incluídos 201 pacientes, sendo 186 no grupo 1, 8 pacientes no grupo 2 e 7 pacientes no grupo 3. Encontramos uma sobrevida mediana de 10,5 meses para os pacientes *BRAF* não mutado e *NRAS* não mutado, 4,9 meses para os pacientes *BRAF* mutado e 6,9 meses para os pacientes *NRAS* mutado. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,63$) (Tabela 22 e Figura 38).

Tabela 22 - Análise de sobrevida global estratificada pelo *status* de *BRAF* e *NRAS*

Categoria	N (casos)	N (eventos)	Sobrevida Medida (meses)	P valor
<i>BRAF</i> / <i>NRAS</i> não mutados	186	179	10,5	0,63
<i>BRAF</i> Mutado	8	7	4,9	
<i>NRAS</i> Mutado	7	7	6,9	
Total	201	193	10,41	

Fonte: Arquivo Próprio (2019).



Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Figura 38 - Curvas de Kaplan- Meier de sobrevida global estratificada pelo *status de BRAF e NRAS* (*BRAF e NRAS* não mutados versus *BRAF* mutado versus *NRAS* mutado)

6.11 Análise multivariada para sobrevida por meio de regressão de Cox

A análise multivariada para a estimativa da sobrevida global foi realizada utilizando o modelo de regressão de Cox para estimar o risco de sofrer o evento (óbito) para cada uma das variáveis analisadas. Foi estimado a Hazard Ratio (HR) com as variáveis significativas a um nível de 10% na análise univariada, além das variáveis que são objeto do estudo deste trabalho (*NRAS* e *BRAF*).

As variáveis que compuseram a modelagem foram: invasão perineural, lateralidade do tumor primário (direito versus esquerdo), número de linfonodos positivos (<2, ≥2), quimioterapia (QT) paliativa de primeira linha (Oxaliplatina versus Irinotecano), ressecção de metástase, *status* de MSI (MSI-H vs MSI-L/MSS), *BRAF* e *NRAS*.

Foram selecionados para esta análise, 201 pacientes do total de 211 incluídos no estudo (excluímos 3 pacientes com *NRAS* inconclusivo, 1 *NRAS* não realizado e 6 *BRAF* inconclusivo). Do total de 201 selecionados, 124 foram incluídos na regressão de Cox (77 pacientes foram excluídos por falta de dados) (Tabela 23).

Tabela 23 - Análise multivariada para sobrevida global

Variável	H.R.	IC. 95%	p-valor
Invasão perineural	1,3	0,85 – 2,0	0,231
Lateralidade do tumor primário (direito x esquerdo)	2,81	1,55 – 5,08	0,001
≥ 2 linfonodos positivos	1,13	0,76 - 1,69	0,545
QT de 1º linha (Oxaliplatina versus Irinotecano)	1,39	0,93 – 2,08	0,11
Ressecção de metástase	0,7	0,43 – 1,11	0,131
Status de MSI (MSI-H versus MSI-L/MSS)	1,24	0,49 – 3,11	0,652
<i>BRAF</i>	0,39	0,13 – 1,13	0,084
<i>NRAS</i>	2,1	0,9 – 4,89	0,085

Fonte: Arquivo Próprio (2019).

Ao analisar a tabela acima, observamos que apenas a variável lateralidade do tumor primário se apresentou estatisticamente significativa na análise multivariada (p-0,001). O risco de morte foi 2,8 vezes maior nos tumores de cólon direito quando comparado com os tumores do cólon E.

A mutação do *NRAS* aumentou o risco de óbito em 2,1 vezes quando comparado com ausência de mutação, porém, sem diferença estatisticamente significativa (p- 0,085).

Apenas duas variáveis reduziram o risco de morte (mutação de *BRAF* e ressecção de metástases), apesar da ausência de significância estatística. Invasão perineural (p-0,23), ≥2 linfonodos positivos (p-0,54), QT de primeira linha (Oxaliplatina versus Irinotecano) (p-0,11), status de MSI (MSI-H versus MSI-L/MSS- p-0,65) e mutação de *NRAS* aumentaram o risco de óbito, mas sem significância estatística.

7. DISCUSSÃO

7.1 Dados demográficos e de tratamento

O câncer colorretal representa um dos tipos de câncer mais incidentes em todo o mundo, sendo o quarto tipo de câncer mais incidente em homens e o terceiro em mulheres segundo dados do INCA de 2018⁹⁷. É uma importante causa de morte por câncer. Apesar da mortalidade pelo câncer colorretal estar reduzindo em países ocidentais, tem aumentado em países menos desenvolvidos como o Brasil, que passaram por uma rápida transição econômica nas décadas mais recentes⁹⁸.

Neste estudo, foram caracterizados 211 pacientes submetidos a tratamento com Cetuximabe no Hospital de Câncer de Barretos no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2016. Dentre os pacientes estudados, 115 (54,5%) eram do sexo masculino e 96 (45,5%) do sexo feminino. A distribuição da doença de acordo com gênero, observada no presente estudo, foi semelhante ao achado de Cruz et al.⁹⁹ que também observaram uma prevalência ligeiramente maior em homens (52,2%) do que entre mulheres (47,8% em uma população de 490 pacientes com câncer colônico de Belo Horizonte).

Com relação a localização dos tumores primários, foi observada uma frequência muito superior de tumores do cólon E (83,4%) quando comparado ao cólon D (16,6%). Esse dado é muito variável entre os estudos e depende da população avaliada, mas, no geral, a literatura evidencia uma frequência maior de tumores do cólon D e menor do cólon E. Dados de um estudo americano encontrou 70% dos tumores localizados no cólon E e 30% no cólon D¹⁰⁰. Esta menor frequência de tumores do cólon D no presente estudo pode ser explicada pelo fato de os pacientes deste estudo serem pacientes politratados, sendo que a maior parte deles recebeu o Cetuximabe na terceira ou quarta linha paliativa (3,8% receberam na quinta linha). Como a sobrevida dos tumores do cólon D é menor do que os do cólon E (metanálise do Holch et al. com 13 estudos randomizados de pacientes com CCRm na primeira linha, revelou uma sobrevida mediana de 21 a 43 meses para os tumores do cólon E e de 11 a 29 meses para os tumores do cólon D)²⁰, muitos pacientes com tumores do cólon D acabaram falecendo mais precocemente e não conseguiram chegar na terceira linha para receber o Cetuximabe.

Relativamente ao número de linhas de quimioterapia paliativa as quais os pacientes foram submetidos antes de iniciar o Cetuximabe, percebe-se que a maioria dos pacientes já havia recebido pelo menos 2 linhas. Este padrão não se encaixa nas recomendações atuais

que seria os pacientes serem submetidos a terapia anti-EGFR em linhas iniciais, visando aumento de sobrevida. No entanto, no Hospital de Câncer de Barretos, o Cetuximabe é fornecido pela Secretaria de Saúde do estado de São Paulo apenas a partir da terceira linha paliativa, isoladamente ou em combinação com o Irinotecano, não sendo possível o uso mais precocemente.

7.2 Dados moleculares

No presente estudo, encontramos uma significativa maior proporção de mutação do *BRAF* no sexo feminino (7,9%) quando comparado com uma proporção de 1% no sexo masculino, com a ressalva de que apenas 1 paciente era do sexo masculino. Quanto à lateralidade, a proporção de mutação do *BRAF* foi significativamente maior nos tumores do cólon D (12,1%) quando comparado aos tumores do cólon E (2,5%). Quanto à análise do grau histológico, foi evidenciado uma maior proporção de mutação do *BRAF* nos tumores de grau histológico 3 (20%) quando comparados com o grau histológico II (2,2%), com p-valor marginal (0,059). Nenhum paciente com mutação do *BRAF* apresentava tumores com grau histológico I. Estes achados são compatíveis com os dados da literatura vigente, que evidenciam uma associação da mutação do *BRAF* à ocorrência no sexo feminino, idade mais avançada, localização no cólon D e com tumores de alto grau histológico^{39, 101}. Apesar da ausência de significância estatística, encontramos uma maior proporção de mutação do *BRAF* nos pacientes com menos de 50 anos (6%) quando comparado aos pacientes ≥ 50 anos (2,7%, p=0,291), o que vai contra a evidência da literatura que evidencia uma maior frequência nos pacientes mais idosos^{39, 101}.

A frequência da mutação do *BRAF* V600E (3,9%) foi, no geral, inferior ao observado entre outras populações. O banco de dados COSMIC³² e TCGA³³ relatam uma taxa de 11% e 10%, respectivamente. Di Nicolantonio et al encontraram uma taxa de mutação do *BRAF* de 13,9% numa população de 113 pacientes com CCRm tratados com Cetuximabe ou Panitumumabe em várias linhas de tratamento⁶⁴. Metanálise de Pietrantonio et al.⁴⁰, com 10 estudos randomizados totalizando 6256 pacientes com CCRm submetidos a quimioterapia + cuidados de suporte ou quimioterapia + anti-EGFR relatou taxas de mutação do *BRAF* V600E que variaram de 4,8 a 20%, a depender da linha de tratamento à qual o paciente foi submetido⁴⁰ (Tabela 24).

Tabela 24 - Características dos estudos incluídos e frequência de mutação do *BRAF*

Autor/Ano	Tipo de Estudo/ n pts análise RAS + RAF/ pts com tecido disponível para mutações da RAF (%)	Comparação de Tratamento	Linha de tratamento	<i>BRAF</i> -mut % ⁽ⁿ⁾
Bokemeyer/ 2012 ¹⁰²	Análise agrupada de 2 RCTs/ 845/94	FOLFIRI/ FOLFOX ± C	1ª	8.2(70)
Douillard/ 2013 ¹⁰³	Fase III/1183/97.7	FOLFOX ± P	1ª	10.3(53)
Stintzing/ 2014 ¹⁰⁴	Fase III/342/100	FOLFIRI + C ou B	1ª	13.7(48)
Karapetis/ 2014 ¹⁰⁵	Fase III/359/87.5	C x BSC	Refratária	4.8(10)
Peeters/ 2014 ¹⁰⁶	Fase III/243/84	P x BSC	Refratária	7(18)
Peeters / 2013 ³⁷	Fase III/421/100	FOLFIRI ± P	2ª	8.3(45)
Seymour/ 2013 ¹⁰⁷	Fase III/460/100	IRI ± P	2ª	14.8(68)
Smith / 2013 ¹⁰⁸	Fase III/1,946/99	QT a base de OXA ± C	1ª	9(102)
Tveit / 2012	Fase III/457/81	FLOX ± C	1ª	20(55)

FOLFIRI = 5-Fluorouracil + ácido folínico + irinotecano; FOLFOX = bolus + infusão contínua de 5-Fluorouracil + ácido folínico em bolus nos dias 1 e 2 + oxaliplatina; C = cetuximabe; P = panitumumabe; *BRAF*=Proto-oncogene *BRAF*; OXA = oxaliplatina; FLOX = bolus 5-Fluorouracil + ácido folínico em bolus + oxaliplatina; BSC = melhor cuidado de suporte; QT= quimioterapia

Fonte: Adaptado Pietrantonio et al. 2015⁴⁰

Existem duas possíveis explicações para esta baixa taxa de mutação do *BRAF* no presente estudo. Em primeiro lugar, trata-se de uma população de pacientes politratados, refratários. Como a sobrevida dos pacientes com mutação do *BRAF* é inferior à dos pacientes sem a mutação, muitos pacientes *BRAF* mutado evoluem para óbito nas primeiras linhas de tratamento e não conseguem viver o suficiente para receber o Cetuximabe na terceira linha paliativa. Portanto, acabamos selecionando pacientes com uma doença mais indolente (diferentemente dos pacientes *BRAF* mutado, que tendem a apresentar doença mais agressiva) que conseguiram chegar na terceira linha paliativa. Apesar da taxa de mutação encontrada no presente estudo ter sido baixa, ela está mais próxima de outras populações de pacientes politratados, semelhante à população deste estudo. Na metanálise de Pietrantonio et.al.⁴⁰ citada acima, a frequência de mutação variou de 8 a 20% nos estudos de primeira linha, 8,3 a 14,8% na segunda linha e em pacientes refratários de 4,8 a 7%⁴⁰.

Outra possível explicação seria a baixa frequência de tumores do cólon D (16,6%) neste estudo, quando comparado com cólon E (83,4%), já que é sabido que a proporção de mutação

do *BRAF* é maior nos tumores do cólon D. Berardinelli GN⁴⁴ evidenciou uma maior porcentagem de mutação do *BRAF* V600E em tumores do cólon D quando comparado com cólon E (35,1% versus 8,3%). Os dados do presente estudo corroboram esta associação entre mutação do *BRAF* V600E e lateralidade direita do tumor primário. Encontramos uma proporção de 12,1% de mutação do *BRAF* nos tumores do cólon D e de 2,5% nos tumores de cólon E, com significância estatística (p=0,01).

No Brasil existem poucos estudos avaliando a frequência da mutação do *BRAF* e de outros genes, assim como as características clínicas dos casos de CCR. Rasuck⁴² e Yamane⁴¹ encontraram uma frequência de mutação do *BRAF* de 6,5% em pacientes com CCR atendidos em Belo Horizonte (77 pacientes) e em Barretos (47 pacientes), respectivamente. Portanto, a frequência de mutação do *BRAF* no Brasil parece ser menor do que o que evidencia a literatura mundial, e os dados do presente estudo são mais próximos da estimativa brasileira.

Em relação ao *status* do gene *NRAS*, encontramos mutação em 7 pacientes (3,38%). Esta frequência corrobora os achados de outros estudos com porcentagens de 2-4 % em CCR^{27, 28, 32}. De Roock et al. encontraram uma porcentagem de mutação do *NRAS* de 2,6% em pacientes refratários com CCRm em tratamento com Cetuximabe³⁶.

No presente estudo, encontramos uma proporção de mutação do *NRAS* muito semelhante entre o sexo feminino (3,1%) e o sexo masculino (3,6%) e entre o cólon direito e cólon E (2,9% versus 3,5%, respectivamente) e uma igual proporção (3,4%) de mutação de *NRAS* entre as faixas etárias (< 50 e ≥ 50 anos), sendo estas 3 análises sem diferença estatisticamente significativa. Quanto à análise quanto ao grau histológico, foi encontrado uma maior proporção de mutação do *NRAS* nos tumores de grau histológico I (10%) e III (9,1%), quando comparado aos tumores de grau II (2,7%), mas sem diferença estatisticamente significativa. Assim como ocorrido no estudo do Irahara et al.²⁷, não foi encontrada nenhuma associação clinicamente significativa da mutação do *NRAS* com características clínico-patológicas, de sobrevivência ou moleculares²⁷.

A avaliação da instabilidade de microssatélites revelou uma porcentagem de MSI-H de 3,3%. Dados da literatura brasileira e mundial (Tabela 25) revelam frequências de MSI-H superiores aos encontrados no presente estudo. Dados do TCGA (*The Cancer Genome Atlas Network*) revelaram uma frequência de MSI-H em CCR de 16%¹⁷ em CCR geral. Outros estudos internacionais tem revelado frequências de MSI-H em CCR de 12-15%^{17, 109}. Koopman et al.¹¹⁰ evidenciaram que as taxas de MSI variam conforme estágio do tumor, sendo de 22% no

estágio II, 12% no estágio III e 2% no estágio IV da doença¹¹⁰. Portanto, a taxa de MSI-H de 3,3% encontrada no presente estudo é semelhante à encontrada em pacientes de outros estudos com CCR estágio IV. Tais estudos evidenciam frequências de MSI-H inferiores nos casos de doença avançada. Merok et al.⁶⁰ encontraram uma frequência de MSI-H de 5% e Muller et al.⁵⁹ encontraram uma frequência de 4%, ambos os estudos no estágio IV. No estudo brasileiro do Leite et al.¹¹¹, foi encontrada uma frequência de MSI-H de 22,7%, muito superior ao encontrado no presente estudo. Porém, estes autores avaliaram 66 pacientes, sendo encontrado uma maior porcentagem de tumores do cólon direito (33%) quando comparado ao presente estudo (16,6%), e, conforme dito previamente, existe uma maior frequência de instabilidade de microssatélites nos tumores do cólon D. Além disso, no estudo do Leite et al.¹¹¹ não foi feita referência ao estadiamento dos tumores dos pacientes incluídos e sabemos que a porcentagem de MSI-H nos tumores avançados é menor do que nos pacientes com estádios mais iniciais, o que pode justificar a menor porcentagem de MSI-H encontrada no presente estudo. No estudo brasileiro do Berardinelli GN⁴⁴ também foi encontrada uma maior frequência de MSI-H quando comparado ao presente estudo (10,5 versus 3,3%), o que pode ser justificado pela maior frequência de tumores do cólon D no estudo do Berardinelli GN⁴⁴ e pelo fato de apenas 19% dos pacientes serem EC IV, sendo que no presente estudo 100% dos pacientes eram metastáticos ao iniciar o Cetuximabe.

Tabela 25 - Dados de frequência de MSI no Brasil e no mundo

	Ano Divulgação	Origem Amostral	N amostral	Casos MSI-H (%)
Berardinelli GN ⁴⁴	2017	Brasil	1013	10,5
Leite et al. ¹¹¹	2010	Brasil	66	22,7
The Cancer Genome Atlas Network ¹⁷	2012	TCGA	224	16
Nam et al. ¹¹²	2016	Coréia do Sul	191	1,6
Markovic et al. ¹¹³	2013	Sérvia	200	3,4
Kim et al. ¹¹⁴	2014	Coréia do Sul	1867	7,5
Miwata et al. ¹¹⁵	2014	Japão	233	8
Krivokapic et al. ¹¹⁶	2012	Sérvia	150	9
Yoon et al. ¹¹⁶	2011	Coréia do Sul	2028	10,5
Gonsalves et al. ¹¹⁷	2014	EUA	2326	13
Miwata et al. ¹¹⁵	2014	Vietnã	60	22
Simons et al. ¹¹⁸	2013	Holanda	509	12,6

N: Número. MSI-H: alta instabilidade de microssatélite

Fonte: Adaptado de Berardinelli GN⁴⁴. 2017

Conforme dito na introdução, MSI ocorre preferencialmente nos tumores do cólon direito. Bem Tran³⁹ et al. encontraram uma proporção aumentada de MSI-H em tumores primários do lado direito (68% versus 37%, $p < 0,001$). Berardinelli GN⁴⁴ encontrou maior porcentagem do status MSI-H nos tumores do cólon D quando comparado com os tumores do cólon E (29% versus 8%)⁴⁴. Esta associação de MSI com lateralidade direita é confirmada no presente estudo, onde encontramos uma proporção de MSI-H de 11,8% nos tumores do cólon D e 1,8% nos tumores do cólon E.

Uma das características que diferenciam o CCR com instabilidade de microssatélites do CCR com estabilidade microssatélites é a maior incidência em idades mais precoces (abaixo de 40 a 50 anos)⁵². No presente estudo foi encontrada uma maior proporção de instabilidade de microssatélites nos pacientes com menos de 50 anos (4,7%) quando comparado aos pacientes \geq 50 anos (2,6%), porém, não houve diferença estatisticamente significativa.

Encontramos uma maior proporção de instabilidade de microssatélites em pacientes com tumores de grau histológico III (20%) e nos pacientes do sexo masculino (4,7%) quando comparado aos pacientes com tumores de grau II (3,5%) e do sexo feminino (2,2%), porém, sem diferença estatística.

Em relação à análise para avaliar se existe associação entre os dados moleculares de *BRAF*, *NRAS* e MSI, encontramos uma proporção de 16,7% de mutação do *BRAF* e de 0% de mutação do *NRAS* em pacientes com MSI-H quando comparado com 3,7% de mutação do *BRAF* e 3,5% de mutação do *NRAS* nos pacientes MSS/MSI-L. Apesar desta diferença não ter sido estatisticamente significativa, os dados de *BRAF* corroboram os da literatura que evidenciam uma maior proporção de mutação do *BRAF* em pacientes MSI-H. Berardinelli GN⁴⁴ evidenciou uma taxa de mutação do *BRAF* de 26,4% em pacientes MSI-H. Apesar da menor porcentagem de mutação do *BRAF* quando comparado ao estudo do Berardinelli GN⁴⁴, a população do presente estudo é composta de pacientes politratados, com poucos tumores localizados no cólon D, portanto, uma menor taxa de mutação já seria esperada. Ben Tran et al. reportou maior taxa de mutação do *BRAF* (30%) entre os pacientes com CCR MSI-H, quando comparado com os pacientes MSS/MSI-L (10%), com diferença estatisticamente significativa³⁹. Em relação aos dados de associação entre *NRAS* e MSI, também não se encontrou nenhuma associação clinicamente relevante, sendo que achados semelhantes foram relatados por Irahara et al²⁷, que também não evidenciaram associação de *NRAS* com características moleculares. Lorre et al²². relataram uma maior frequência de mutação do *NRAS* no ceco, sendo que esta frequência tende a reduzir progressivamente em direção ao cólon descendente, quando volta a subir.

7.3 Avaliação de resposta ao Cetuximabe

Encontramos uma taxa de resposta global ao Cetuximabe de 24%, semelhante ao descrito na maior parte dos principais estudos prévios. Quando estratificamos por protocolo

de tratamento com Cetuximabe, percebemos que os pacientes submetidos à tratamento com Cetuximabe + Irinotecano apresentaram taxa de resposta de 27% (Tabela 26), ligeiramente superior à maioria dos estudos com Cetuximabe + Irinotecano em pacientes politratados. Este valor foi muito próximo dos 26,6% encontrado no estudo do Buzaid et al.⁷⁸, em uma população latino-americana. Lim et al.⁷⁹ relataram uma taxa de resposta de 13,8% em uma população asiática tratada com Cetuximabe + Irinotecano. No estudo do Wilke et al.¹¹⁹ com 1147 pacientes tratados com Cetuximabe + Irinotecano, a taxa de resposta foi de 20,1% e no estudo do Cunningham et al.⁷⁷ a taxa de resposta foi de 22,9% (Tabela 26).

Tabela 26 - Resultados de taxa de resposta em pacientes com CCR metastático tratados com Cetuximabe + Irinotecano no Brasil e no Mundo

	Presente Estudo	ELSIE	LABEL	MABEL	BOND
Autores	-	Lim R et al. ⁷⁹	Buzaid et al. ⁷⁸	Wilke et al. ¹¹⁹	Cunningham et al. ⁷⁷
Nº de pacientes	151	123	79	1147	218
Região Geográfica	Brasil	Ásia Pacífico	América Latina	Europa	Europa
Taxa de resposta %	27	13.8	26.6	20.1	22.9

Fonte: Adaptado de Lim R et al.⁷⁹

No presente estudo, os pacientes tratados com Cetuximabe monodroga apresentaram uma taxa de resposta de 15%, enquanto no estudo do Jonker et al.⁷⁴, foi encontrada uma taxa de resposta de 8% e no estudo do Cunningham et al.⁷⁷ a taxa de resposta foi de 10,8%.

Realizamos a comparação entre os dois principais protocolos de tratamento aos quais os pacientes do estudo foram submetidos. Apesar da ausência de significância estatística, encontramos uma maior taxa de resposta nos pacientes submetidos à tratamento com Cetuximabe + Irinotecano, quando comparado aos pacientes que receberam apenas Cetuximabe (27% versus 15%), o que está em consonância com os achados prévios da literatura que evidenciam maior taxa de resposta com os protocolos combinados. Cunningham et al.⁷⁷ encontraram uma taxa de resposta de 22,9% em pacientes tratados com

Cetuximabe + Irinotecano, versus 10,8% para os pacientes que receberam apenas Cetuximabe. A taxa de resposta encontrada no presente estudo foi ligeiramente superior à encontrada no estudo do Cunningham⁷⁷.

Esta discreta superioridade nas taxas de resposta pode ser devido à maior porcentagem de tumores do cólon esquerdo, (quando comparado ao cólon D) na população do presente estudo, quando comparado à maioria dos dados da literatura. No presente estudo, encontramos uma maior taxa de resposta nos tumores do cólon E (26% versus 14%- p 0,42), o que reproduz os achados de estudos prévios que tem evidenciado que os tumores do cólon E apresentam maior resposta ao tratamento com Cetuximabe quando comparado com os tumores do cólon D²³. Moretto et al.¹²⁰ encontraram uma taxa de resposta de 0% para os tumores de cólon D versus 41% para os tumores do cólon E (p-0,032) em uma população de 75 pacientes com CCRm *RAS* e *BRAF* selvagem, tratados com terapia anti-EGFR (Cetuximabe ou Panitumumabe), sendo que mais da metade dos pacientes já haviam sido submetidos a 2 linhas prévias de quimioterapia. No estudo de Wang et al., a adição do Cetuximabe à quimioterapia padrão na primeira linha paliativa não aumentou significativamente as taxas de resposta nos pacientes com tumores do cólon D (36.4 % versus 26.2 %, p-0.349), mas aumentou nos tumores do cólon E (49.4 % versus 28.6 %, p- 0.005). Nos estudos clássicos de tratamento com Cetuximabe + Irinotecano em pacientes politratados relatados na tabela 24 não há referência à porcentagem de pacientes com tumores de cólon D e E, já que, na ocasião da publicação destes estudos o impacto da lateralidade do tumor primário não era tão bem estabelecido.

Outra possível justificativa para esta discreta maior taxa de resposta no presente estudo é que a avaliação de resposta foi realizada por oncologistas clínicos em discussão com os radiologistas locais, porém, não foi realizado o laudo de avaliação seguindo a rigorosidade dos critérios do RECIST (Critérios de Avaliação de Resposta em Tumor Sólido). Além disso, por se tratar de estudo retrospectivo, não houve padronização de tomografias basais de início de tratamento.

Quanto à análise de resposta estratificada pelo *status* de *BRAF*, encontramos uma ausência de resposta entre os pacientes *BRAF* mutado. Di Nicolantonio et al.⁶⁴ também não observaram resposta nos pacientes com mutação do *BRAF* tratados com terapia anti-EGFR. Karapetis et al.¹⁰⁵ também não encontraram resposta em 4 pacientes politratados, com mutação do *BRAF*, *KRAS* selvagem, tratados com Cetuximabe. Por outro lado, Bokemeyer et

al.¹⁰² encontraram uma taxa de resposta de 21,9% em 70 pacientes *KRAS* selvagem/*BRAF* mutado tratados na primeira linha paliativa com quimioterapia + Cetuximabe quando comparados com uma taxa de resposta de 13,2% nos pacientes *KRAS* selvagem/*BRAF* mutado tratados apenas com quimioterapia, porém, sem diferença estatisticamente significativa. De Roock et al.³⁶ relataram uma taxa de resposta de 8,3% em pacientes *BRAF* mutado versus 38% em pacientes sem mutação, em uma população de pacientes com CCRm refratários à quimioterapia (87% dos pacientes já haviam sido submetidos a pelo menos 2 linhas prévias de quimioterapia). Metanálise de Pietrantonio et al.⁴⁰ avaliando a mutação do *BRAF* como fator preditivo de resposta à terapia anti-EGFR, não encontrou um aumento significativo das taxas de resposta com a adição de Cetuximabe ou Panitumumabe à quimioterapia padrão em 463 pacientes *RAS* selvagem, *BRAF* mutado.

Ao analisarmos a taxa de resposta ao Cetuximabe estratificada pelo *status* de *NRAS*, encontramos uma maior taxa de resposta nos pacientes *NRAS* não mutado (24% versus 14%), sem diferença estatisticamente significativa. Este achado é semelhante ao evidenciado em outros estudos. De Roock et al.³⁶ relataram uma taxa de resposta de 7,7% em pacientes *NRAS* mutado versus 38% em pacientes sem mutação, em uma população de pacientes com CCRm refratário à quimioterapia (87% dos pacientes já haviam sido submetidos a pelo menos 2 linhas prévias de quimioterapia).

7.4 Análises de sobrevida global

Um dos objetivos deste estudo foi demonstrar a atividade do Cetuximabe no tratamento de pacientes brasileiros com CCRm, politratados.

As análises de sobrevida global (SG) da presente série evidenciaram uma probabilidade de sobrevida estimada de 73% em 6 meses e de 45,5% em 12 meses com uma SG mediana de 10,4 meses (IC 95%: 8,14-12,76). Os 146 pacientes tratados com a combinação de Cetuximabe + Irinotecano apresentaram uma SG mediana de 11,8 meses e os 53 pacientes tratados com Cetuximabe em monoterapia apresentaram uma SG mediana de 8,7 meses, sem diferença estatisticamente significativa. A SG mediana do presente estudo de 8,7 meses para os pacientes tratados com Cetuximabe monoterapia foi superior ao encontrado por Jonker et al.⁷⁴. Este avaliou a eficácia do Cetuximabe isolado em 572 pacientes previamente tratados com Oxaliplatina, Irinotecano e fluoropirimidinas e obteve uma SG mediana de 6,1 meses para

os pacientes tratados com Cetuximabe versus 4,6 meses para os pacientes do grupo placebo. A probabilidade de sobrevida em 6 e 12 meses foi de 50% e 33%, respectivamente, para pacientes tratados com Cetuximabe monodroga e placebo⁷⁴. Buzaid et al.⁷⁸ encontraram uma SG mediana de 9,2 meses e uma probabilidade de sobrevida de 38% em 12 meses em uma população latino-americana de 79 pacientes com CCR metastático após falha ao Irinotecano (estudo LABEL). Neste estudo⁷⁸, os pacientes foram submetidos a tratamento com Cetuximabe + Irinotecano, sendo que 63% destes pacientes haviam recebido pelo menos 2 linhas de quimioterapia antes de entrarem no estudo. No estudo asiático (ELSIE)⁷⁹ de fase II com 123 pacientes após falha ao Irinotecano, os pacientes foram tratados com Cetuximabe + Irinotecano e apresentaram uma SG mediana de 9,5 meses, próxima (ligeiramente inferior) à apresentada pelos pacientes tratados com o esquema combinado no presente estudo (11,8 meses). Wilke et al. (estudo MABEL)¹¹⁹ avaliou a eficácia do Cetuximabe + Irinotecano em 1147 pacientes com CCRm após falha ao Irinotecano em linhas prévias, tendo encontrado uma SG mediana de 9,2 meses, também próxima (discretamente inferior) à apresentada pelos pacientes tratados com o esquema combinado no presente estudo (11,8 meses). Percebemos que o presente estudo apresentou uma sobrevida global próxima ao encontrado nos estudos citados acima, com uma discreta superioridade. Esta discreta superioridade, provavelmente ocorreu devido à ausência de seleção pelo *status* do gene *KRAS* nos estudos acima. Na ocasião do desenho destes estudos, o critério para inclusão era ter expressão do EGFR. O conhecimento sobre a importância do *status* do gene *KRAS* na eficácia e resposta aos anti-EGFR (aqui representado pelo Cetuximabe) ainda não existia. Conseqüentemente, os pacientes apresentaram um menor benefício com o Cetuximabe, com SG subestimada, já que pacientes *KRAS* mutado também foram tratados. Diferentemente disso, no presente estudo foram incluídos apenas pacientes *KRAS* selvagem e da análise estatística foram excluídos os pacientes *NRAS* mutado. Outra possível explicação para esta discreta maior sobrevida encontrada no presente estudo seria a diferença de vários anos entre o estudo atual e os estudos já publicados. Com o avanço tecnológico e da medicina as modalidades de tratamento foram se aprimorando, e, conseqüentemente, houve aumento da sobrevida dos pacientes oncológicos. O estudo do Cunningham, por exemplo, é de 2004, enquanto que os primeiros pacientes do presente estudo foram tratados em 2011 (Tabela 27).

Conforme mencionado previamente, os pacientes tratados com Cetuximabe em monoterapia apresentaram uma SG menor quando comparado aos pacientes tratados com

Cetuximabe + Irinotecano (8,7 meses versus 11,8 meses, respectivamente). Este dado de menor sobrevida para os pacientes que receberam Cetuximabe isolado são compatíveis com dados de outros estudos. No estudo do Cunningham et al.⁷⁷ (estudo BOND), a SG mediana foi de 8,6 meses para o grupo tratado com o esquema combinado versus 6,9 meses para o grupo que recebeu Cetuximabe isolado, sem diferença estatisticamente significativa. A ausência de diferença estatística nas curvas de sobrevida no presente estudo e no estudo do Cunningham et al.⁷⁷ pode ser decorrente do menor número de pacientes submetidos a tratamento com Cetuximabe (53 pacientes no presente estudo e 111 no estudo do Cunningham), quando comparado ao maior número de pacientes tratados com Cetuximabe + Irinotecano (146 no presente estudo e 218 no estudo do Cunningham) (Tabela 27).

Tabela 27 - Resultados de sobrevida global em pacientes com CCR metástático tratados com Cetuximabe + Irinotecano no Brasil e no Mundo

	Presente Estudo	ELSIE	LABEL	MABEL	BOND
Autores	-	Lim R et al. ⁷⁹	Buzaid et al. ⁷⁸	Wilke et al. ¹¹⁹	Cunningham et al. ⁷⁷
Nº de pacientes	151	123	79	1147	218
Região Geográfica	Brasil	Ásia Pacífico	América Latina	Europa	Europa
S6 mediana meses (IC 95%)	11,8 (9,2-14,2)	9,5 (7,5-11,7)	9,2 (7,9-10,8)	9,2 (8,6-9,8)	8,6 (7,9-9,6)
S6 em 1 ano % (IC 95%)	45,5 (39- 52)	38 (29-37)	38 (27-48)	38 (35-41)	29 (22-37)

IC – Intervalo de confiança; CCR – Câncer colorretal.

Fonte: Adaptado de Lim R et al⁷⁹. Arquivo Próprio (2019)- Presente estudo

Ao analisar o impacto da variável lateralidade do tumor primário na SG dos pacientes do presente estudo encontramos uma SG mediana de 11,5 meses para os tumores do cólon E versus 6,6 meses para os tumores do cólon D (p=0,02). Nossos dados replicam os achados e muitos estudos prévios que evidenciam uma pior sobrevida para os tumores do cólon D

quando comparado com os tumores do cólon E, sendo a lateralidade, um fator prognóstico independente do estadiamento (apesar do maior impacto ser no EC IV), raça ou uso de quimioterapia adjuvante^{121, 122}. Heinemann et al.¹²³ observaram uma SG mediana de 18 meses para os tumores do cólon D versus 38 meses para os tumores do cólon E para uma população de pacientes *KRAS* selvagem tratados na primeira linha com Cetuximabe + FOLFIRI¹²³. A SG encontrada no presente estudo foi inferior à encontrada no estudo do Heinemann, já que no presente estudo trata-se de população politratada, enquanto no estudo do Heinemann os pacientes foram tratados na primeira linha paliativa. Nos estudos clássicos^{74, 77-79, 119} de Cetuximabe em pacientes politratados, a análise de sobrevida global não foi estratificada pela lateralidade do tumor primário, uma vez que, na ocasião da publicação de tais estudos, o impacto da lateralidade do tumor primário na resposta a determinadas terapias não era bem estabelecido.

Uma das possíveis explicações para esta diferença na sobrevida entre os tumores do cólon direito e esquerdo diz respeito ao perfil molecular destes tumores, como por exemplo, uma maior frequência de mutação dos genes *BRAF* e *KRAS* (que sabidamente conferem uma pior sobrevida) nos tumores do cólon D, enquanto que os tumores do cólon E são mais propensos a serem não mutados^{21, 22, 124}.

Além do impacto prognóstico conferido pela lateralidade do tumor primário, estudos mais recentes tem avaliado a lateralidade como um preditor da resposta à terapia anti-EGFR e estes estudos tem mostrado que em pacientes *RAS* selvagem, a adição de terapia anti-EGFR à quimioterapia padrão beneficia pacientes com tumores do cólon esquerdo, diferentemente dos tumores do cólon direito, que apresentam benefício limitado^{72, 75, 76}. Metanálise do Holtch et al.²⁰ que avaliou a relevância da localização do tumor primário em pacientes com câncer colorretal metastático tratados na primeira linha paliativa mostrou que pacientes com tumores do cólon E *RAS* selvagem apresentaram um significativo maior benefício de sobrevida com a adição de terapia anti-EGFR à quimioterapia padrão em comparação à adição de anti-VEGF (HR 0,71; IC 95%: 0,58-0,85; p- 0,0003). Por outro lado, pacientes com tumores do cólon D, apresentaram maior sobrevida com a adição de bevacizumabe (HR 1,3; IC 95%: 0,97-1,74; p-0,081)²⁰. Metanálise do Wang et al.⁷⁶ avaliando resposta ao Cetuximabe estratificada pela lateralidade do tumor primário evidenciou ganho de sobrevida global tanto na primeira linha (28,9 meses versus 20,1 meses, p-0,036) quanto na segunda linha (17,1 versus 12,4 meses, p-0,047) com a adição de Cetuximabe à quimioterapia no tratamento dos tumores do cólon E.

Na segunda linha houve apenas tendência à ganho de SLP e taxa de resposta com a adição desta medicação. Por outro lado, no tratamento dos tumores do cólon D, este estudo não evidenciou nenhum benefício em sobrevida ou taxa de resposta com a adição do Cetuximabe à quimioterapia padrão, na primeira ou segunda linhas⁷⁶. Portanto, apesar de sabermos que a lateralidade do tumor primário é fator prognóstico independente, podemos pensar que a diferença de sobrevida entre os tumores do cólon D e cólon E no presente estudo foi, em parte, associada ao uso do Cetuximabe (terapia anti-EGFR) que, conforme dito anteriormente, são mais eficazes nos tumores do cólon E e pouco eficazes nos tumores do cólon D.

No presente estudo, foram realizadas análises de sobrevida estratificando a casuística total em relação as seguintes variáveis: lateralidade, idade, sexo, estadiamento, grau histológico, IAL (invasão angiolinfática), IPN (invasão perineural), *status* linfonodal, número de linfonodos positivos, número de linfonodos ressecados, QT primeira linha (Oxaliplatina versus Irinotecano) e linha de tratamento com Cetuximabe. Encontramos diferenças significativas entre as curvas para as variáveis: lateralidade do tumor primário, IPN, número de linfonodos positivos e QT primeira linha. Assim como relatado por Buzaid et al⁷⁸., nosso estudo não encontrou diferença estatisticamente significativa na sobrevida para os subgrupos idade, sexo, estadiamento ao diagnóstico ou número de linhas de tratamento prévias ao Cetuximabe.

O comprometimento linfonodal regional é um dos mais importantes preditores de sobrevida em CCR, perdendo apenas para a presença de metástase à distância, sendo fator de estratificação na classificação TNM para estadiamento^{125, 126}. Nossos dados estão em conformidade com a afirmação acima, já que encontramos uma sobrevida superior para os pacientes com até 1 linfonodo comprometido quando comparado com os pacientes com 2 ou mais linfonodos positivos (13,4 meses versus 10,8 meses; $p = 0,01$). A presença de IPN é considerado um fator prognóstico adverso de sobrevida, estando incluída na definição de CCR estágio II de alto risco, podendo influenciar na indicação de quimioterapia adjuvante^{125, 127}. Encontramos sobrevida estatisticamente inferior para os pacientes com invasão perineural positiva (8,6 versus 13,4 meses), o que confirma o prognóstico adverso da IPN.

Em relação à variável QT primeira linha, foi evidenciado uma SG superior para os pacientes que fizeram quimioterapia com Oxaliplatina quando comparado aos que fizeram Irinotecano. Esta informação confronta com a evidência existente atualmente de que, no cenário paliativo, a sobrevida final é independente do protocolo de quimioterapia (se Oxaliplatina ou Irinotecano) utilizado na primeira linha. Isso pode ser justificado pelo fato de

que grande parte dos pacientes que fizeram Irinotecano na primeira linha foram pacientes com alto volume de doença que receberam a associação de FOLFIRI + Bevacizumabe. Na instituição onde os pacientes do estudo foram tratados, o acesso ao Bevacizumabe é limitado, sendo fornecido pela Secretaria do Estado de São Paulo apenas na primeira linha em combinação com o Irinotecano. Devido a esta limitação no acesso, temos indicado a combinação do FOLFIRI + Bevacizumabe apenas para pacientes com alto volume de doença, consequentemente, com menor sobrevida.

Avaliamos o impacto da mutação do *BRAF* V600E na sobrevida. Foi observado uma sobrevida mediana de 4,9 para os tumores *BRAF* mutado versus 10,5 meses para os tumores *BRAF* não mutado. Apesar da ausência de significância estatística, estes achados reforçam os já existentes do impacto prognóstico adverso conferido por esta mutação, independente da terapia aplicada. Ben Tran et al.³⁹ avaliaram retrospectivamente o impacto da mutação do *BRAF* na sobrevida de pacientes com CCRm e encontraram uma menor sobrevida global para os pacientes *BRAF* mutado (10,4 meses versus 34,7 meses, $p < 0,001$) quando comparado aos pacientes sem mutação do *BRAF*. Yokota et al.¹²⁸ avaliaram retrospectivamente pacientes com CCRm previamente tratados e relataram uma sobrevida global de 11 meses para pacientes *BRAF* mutado e 40,6 meses para os pacientes *KRAS* e *BRAF* não mutados. A maior sobrevida encontrada no estudo do Yokota foi atribuída a viés de seleção (seleção de pacientes com melhor prognóstico) e viés de tratamento¹²⁸.

Vários estudos têm avaliado a mutação do *BRAF* V600E como preditor de resposta à terapia anti-EGFR. Metanálise de Pietrantonio et al.⁴⁰ não evidenciaram ganho de sobrevida global (HR, 0,91; IC 95%, 0,62–1,34; $p = 0,63$), sobrevida livre de progressão (HR, 0,88; IC 95% 0,67–1,14; $p = 0,33$) ou taxa de resposta (HR, 1,31; IC 95% 0,83–2,08, $p = 0,25$) ao adicionar terapia anti-EGFR (Cetuximabe ou Panitumumabe) à quimioterapia no tratamento de pacientes com câncer colorretal metastático *RAS*-selvagem/*BRAF* mutado, em várias linhas de tratamento. Ao avaliar a tabela abaixo (tabela 28), retirada do mesmo estudo de Pietrantonio et al.⁴⁰, observamos que, no geral, os pacientes tratados com anti-EGFR na primeira linha apresentaram sobrevida superior aos pacientes tratados na segunda linha e aos pacientes refratários. A sobrevida dos pacientes *BRAF* mutado do presente estudo (4,9 meses) foi inferior à dos pacientes do estudo do Pietrantonio et al.⁴⁰ tratados na primeira linha, já que a nossa população de pacientes, em sua maioria, é composta de pacientes na terceira ou quarta linha paliativas, politratados; por outro lado, a sobrevida dos pacientes *BRAF* mutado do

presente estudo (4,9 meses) foi superior ao estudo do Karapetis et al.¹⁰⁵ em pacientes politratados. Karapetis et al.¹⁰⁵ avaliaram pacientes com CCRm refratários e encontraram uma SG mediana de 1,7 meses para os pacientes *BRAF* mutado tratados com Cetuximabe e 2,9 meses para os pacientes *BRAF* mutado tratados com placebo¹⁰⁵. Uma das possíveis justificativas para esta maior sobrevida encontrada no presente estudo quando comparado ao estudo do Karapetis et al.¹⁰⁵ pode ser o grande número de tumores do cólon E que apresentam maior sobrevida em comparação com os tumores do cólon D, já que em ambos estudos tratava-se de pacientes politratados e refratários. Em análise retrospectiva avaliando o efeito da mutação do *BRAF* na resposta à terapia anti-EGFR em pacientes com CCRm refratário, Di Nicolantonio et al.⁶⁴ encontraram uma menor sobrevida global para os 113 pacientes *BRAF* mutado quando comparado aos não mutados (p=0,001), sendo os valores absolutos de sobrevida não relatados no estudo. Por outro lado, metanálise do Rowland et al.⁶⁷ não encontrou diferença estatisticamente significativa no benefício de sobrevida com a adição de terapia anti-EGFR à quimioterapia padrão entre os pacientes *RAS* selvagem/*BRAF* selvagem e *RAS* selvagem/*BRAF* mutado.

Tabela 28 - Características dos estudos incluídos e resultados de sobrevida global para os pacientes *BRAF* mutado

Autor/Ano	Tipo de Estudo/ n pts análise <i>RAS</i> + <i>RAF</i>/ pts com tecido disponível para mutações da <i>RAF</i> (%)	Comparação de Tratamento	Linha de tratamento	<i>BRAF</i>-mut %⁽ⁿ⁾	Sobrevida global (meses)
Bokemeyer/2012 ¹⁰²	Análise agrupada de 2 RCTs/ 845/94.6	FOLFIRI/ FOLFOX ±C	1ª	8.2(70)	14,1 versus 9,9
Douillard/2013 ¹⁰³	Fase III/1183/97.7	FOLFOX ± P	1ª	10.3(53)	10,5 versus 9,2
Stintzing/2014 ¹⁰⁴	Fase III/342/100	FOLFIRI + C ou B	1ª	13.7(48)	12,3 versus 13,7
Karapetis/2014 ¹⁰⁵	Fase III/359/87.5	C x BSC	Refratária	4.8(10)	1,77 versus 2,97
Peeters / 2013 ³⁷	Fase III/243/84	P x BSC	Refratária	7(18)	Não avaliado
Peeters / 2014 ¹⁰⁶	Fase III/421/100	FOLFIRI ± P	2ª	8.3(45)	4,7 versus 5,7
Seymour/2013 ¹⁰⁷	Fase III/460/100	IRI ± P	2ª	14.8(68)	Não avaliado
Smith/ 2013 ¹⁰⁸	Fase III/1,946/99	QT baseada em OXA ± C	1ª	9(102)	Não avaliado
Tveit / 2012 ¹²⁹	Fase III/457/81	FLOX ± C	1ª	20(55)	Não avaliado

FOLFIRI = 5-Fluorouracil + ácido folínico + irinotecano; FOLFOX = bolus + infusão contínua de 5-Fluorouracil + ácido folínico em bolus nos dias 1 e 2 + oxaliplatina; C = cetuximabe; P = panitumumabe; *BRAF*=Proto-oncogene *BRAF*; OXA = oxaliplatina; FLOX = bolus 5-Fluorouracil + ácido folínico em bolus + oxaliplatina; BSC = melhor cuidado de suporte; QT= quimioterapia

Fonte: Adaptado Pietrantonio et al. 2015⁴⁰

Devido ao impacto prognóstico negativo da mutação do *BRAF* V600E na sobrevida dos pacientes com CCRm, tem surgido estudos avaliando combinações de drogas (anti-*BRAF*, anti-EGFR e anti-MEK), visando superar esta resistência à terapia anti-EGFR conferida pela mutação do *BRAF*. Recentemente, tivemos acesso à atualização dos resultados do estudo BEACON¹³⁰ que reportou uma sobrevida global mediana de 9 meses para os pacientes tratados com terapia tríplice (inibidor de *BRAF*- Encorafenibe, inibidor de EGFR- Cetuximabe mais um inibidor de MEK- Binimetinibe), quando comparado com 5,4 meses para os pacientes que receberam tratamento padrão (Irinotecano ou FOLFIRI + Cetuximabe)¹³⁰.

Vale ressaltar que os principais estudos^{77-79, 119} com Cetuximabe em pacientes politratados, refratários, não realizaram análise de sobrevida ou taxa de resposta estratificada pelo *status* de *BRAF*, uma vez que, na ocasião da publicação destes estudos, o impacto da mutação do *BRAF* ainda não era claramente definido. Em virtude disso, não é possível comparar os resultados do presente trabalho com estes estudos referência em pacientes politratados.

Quando estratificamos os casos quanto ao *status* de MSI não observamos diferença estatisticamente significativa entre as 2 curvas, embora a SG em 5 anos tenha sido de 4,6 meses para o grupo MSI-H e 10,8 meses para o grupo MSS/MSI-L. De modo semelhante, não se observou diferença estatisticamente significativa entre as curvas de sobrevida quando Nam et al¹¹². analisaram casos de CCR avançado estratificados pelo *status* de MSI. Tran Ben et al.³⁹ avaliaram uma população de pacientes metastáticos e encontraram uma sobrevida global superior para os pacientes MSI-L/MSS quando comparado com os pacientes MSI-H (22,1 versus 11,1 meses, p-0,017), mas essa diferença foi evidente apenas nos pacientes *BRAF* selvagem. Diferentemente do cenário paliativo, no cenário de adjuvância os estudos têm evidenciado que MSI é fator de bom prognóstico. Yoon et al.¹³¹ ao analisar pacientes submetidos a quimioterapia adjuvante demonstraram que os pacientes MSI-H apresentaram maiores taxas de sobrevida global do que aqueles com MSI-L/MSS, com diferença estatisticamente significativa entre as curvas de sobrevida¹³¹. Metanálise de 2010¹³² avaliando pacientes com estádios clínicos variados, evidenciou uma sobrevida 40% superior para os pacientes MSI-H quando comparado com os pacientes MSI-L/MSS. Portanto, no cenário adjuvante, MSI confere um bom prognóstico, em especial nos pacientes com ECII¹³¹. No cenário metastático, o impacto de MSI ainda não está muito claro e carece de estudos

adicionais, mas existe evidência de que MSI está associado à pior sobrevida, embora isso seja motivado por sua associação com a mutação do *BRAF*³⁹.

Encontramos uma SG mediana de 6,9 meses para os pacientes *NRAS* mutado e 10,4 meses para aqueles sem mutação. Apesar da ausência de significância estatística, esse dado está em consonância com os achados de Cremolini et al. em primeira linha paliativa que evidenciou que a mutação do *NRAS* acarreta uma redução da sobrevida em aproximadamente 33% quando comparado aos tumores sem mutação⁸⁴. De Roock et al.³⁶ avaliaram o impacto da mutação do *NRAS* em pacientes com CCR metastático tratados com Cetuximabe, refratários. Foi encontrada uma SG mediana de 9,5 meses para os pacientes *NRAS* mutado e 12,5 meses para aqueles sem a mutação ($p=0,051$)³⁶. Esses estudos confirmam o impacto prognóstico negativo da mutação no *NRAS* no CCR.

Em relação à associação de *NRAS* com lateralidade, entre os tumores *NRAS* mutado, foi encontrada uma maior sobrevida para os tumores do cólon E (6,9 meses) quando comparado aos tumores do cólon D (1,2 meses), com diferença estatisticamente significativa ($p=0,014$). O mesmo ocorreu entre os pacientes *NRAS* não mutado, com sobrevida de 6,6 meses para os tumores do cólon D versus 11,5 meses para os tumores do cólon E ($p=0,028$).

Nas análises de sobrevida para associação entre o *status* de MSI e lateralidade do tumor primário foi encontrada uma sobrevida superior para os tumores de cólon E quando comparado aos tumores do cólon D, tanto entre os pacientes MSI-H quanto entre os pacientes MSI-L/MSS, mas com um p-valor não significativo.

Com relação à associação de *BRAF* com lateralidade do tumor primário, entre os pacientes *BRAF* não mutado encontramos uma maior sobrevida para os tumores do cólon E quando comparado aos tumores do cólon D (11,5 meses versus 6,9 meses), com uma p valor tendendo a significância (0,06). Diferentemente disso, entre os pacientes *BRAF* mutado, apesar da ausência de significância estatística, foi encontrada uma maior sobrevida para os tumores do cólon D quando comparado aos tumores do cólon E (4,9 meses versus 1,7 meses). Este dado diverge da evidência atual da maior sobrevida para os tumores do cólon E. Além disso, encontramos, no presente estudo, uma maior proporção de mutação do *BRAF* nos tumores do cólon D, e, sendo assim, esperávamos uma menor sobrevida neste grupo. É sabido que mutação do *BRAF* é fator de mau prognóstico apenas nos pacientes sem instabilidade de microsatélites^{39, 40}. Uma das hipóteses é que talvez o *status* de MSI tenha interferido na análise de associação do *BRAF* com lateralidade, uma vez que, a proporção de MSI-H também

foi maior nos tumores do cólon D. O que vai contra esta hipótese é que, dos 8 pacientes *BRAF* mutado, apenas 1 paciente era MSI-H. Estes dados servem para reforçar o impacto prognóstico negativo da mutação do *BRAF* nos tumores do cólon E, já que a sobrevida dos pacientes *BRAF* mutado foi de 1,7 meses versus 11,5 meses para os pacientes sem mutação do *BRAF*. Além disso, reforçam o impacto prognóstico negativo da lateralidade direita, que apresentou uma sobrevida limitada, independente do *status* de *BRAF*.

Foi realizada uma análise de comparação de sobrevida entre 3 grupos de pacientes *BRAF* não mutado + *NRAS* não mutado versus *BRAF* mutado versus *NRAS* mutado. Observamos redução importante da sobrevida para os tumores com mutação do *BRAF* ou do *NRAS*, porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Mutação do *BRAF* foi a variável que mais impactou na sobrevida, dado também evidenciado em Cremolini et al.⁸⁴.

7.5 Análise multivariada para sobrevida por meio de regressão de Cox

Os resultados da análise de regressão de Cox evidenciam que após avaliação das variáveis significativas a um nível de 10% na análise de Log Rank, apenas a lateralidade do tumor primário prevaleceu e manteve-se significativa na análise multivariada. Isso reforça a importância já conhecida e confirmada por vários autores^{23, 133} da lateralidade no prognóstico dos pacientes com CCRm.

Os resultados da análise da variável *NRAS* remete à importância prognóstica da mutação deste gene, dobrando o risco de morte, apesar da ausência de significância estatística.

A mutação do *BRAF* foi fator de proteção. Apesar do p-valor não significativo, esse dado vai contra a evidência^{40, 64, 105} já existente de pior sobrevida conferida pela mutação deste gene. Existe uma possível explicação para o fato da mutação do *BRAF* ter sido fator de proteção. No presente estudo, encontramos uma baixa frequência de mutação do *BRAF* (3,9%, apenas 8 pacientes mutados) e ao analisar a proporção de óbitos, percebemos que esta proporção foi maior entre os pacientes não mutados (96,4%) e menor entre os pacientes mutados (87,5%).

O aumento do risco de óbito (apesar da ausência de significância estatística) conferido pela invasão perineural, número de linfonodos positivos (<2, ≥2) e *status* de MSI (MSI-H vs MSI-L/MSS) nos pacientes com CCRm, reproduzem as evidências já apontadas pela literatura existente do impacto prognóstico negativo conferido por estas variáveis.

Quanto à análise da variável quimioterapia paliativa de primeira linha (Oxaliplatina versus Irinotecano), encontramos que fazer Oxaliplatina na primeira linha aumentou o risco de óbito (1,39 vezes) quando comparado com Irinotecano ($p=0,11$, não significativa). Este dado contraria os achados da análise univariada do presente estudo que evidenciou uma maior sobrevida para os pacientes que fizeram Oxaliplatina na primeira linha paliativa quando comparado aos pacientes que fizeram Irinotecano (10,3 versus 8,2 meses, $p=0,01$). A literatura evidencia que, no tratamento de primeira linha do CCRm, no geral, Irinotecano confere sobrevida similar a Oxaliplatina, desde que a droga de combinação (geralmente as fluoropirimidinas) seja a mesma e seja administrada em tempos de infusão similares^{134, 135}.

Este estudo possui limitações. Em virtude da baixa frequência da mutação dos genes *BRAF* e *NRAS* e da instabilidade de microssatélites na população de pacientes com CCR EC IV, a amostragem de pacientes incluídos no estudo foi insuficiente para encontrar um número de mutações que demonstrasse diferença estatisticamente significativa nas análises de sobrevida e de taxa de resposta. Quanto à pesquisa da mutação do gene *KRAS*, o resultado foi baseado apenas na análise dos códons 12 e 13, uma vez que apenas 138 pacientes possuíam a análise do códon 61. Apenas mais recentemente a análise do códon 61 foi incorporada na rotina do serviço. Por se tratar de estudo retrospectivo, não houve padronização das tomografias de avaliação de resposta ao tratamento com Cetuximabe, o que limitou a análise de resposta terapêutica ao Cetuximabe.

8. CONCLUSÃO

Este estudo foi desenhado para avaliar a sobrevida bem como a frequência de mutação dos genes *BRAF* e *NRAS* e do status de MSI nos pacientes refratários a outras linhas de quimioterapia tratados com Cetuximabe no Hospital de Câncer de Barretos. Após análise dos resultados e da discussão apresentada ao longo desta dissertação, podemos concluir que:

A sobrevida dos pacientes, bem como a frequência de mutação de *NRAS* (3,38%) e a frequência de MSI (3,3%) foram próximas à encontrada em outros estudos que avaliaram o Cetuximabe em pacientes politratados e refratários a outras linhas de quimioterapia, porém, a frequência de mutação do *BRAF* (3,9%) foi inferior ao encontrado em estudos prévios. Na análise multivariada para sobrevida, apenas a variável lateralidade do tumor primário apresentou significância estatística;

As mutações de *BRAF* e *NRAS*, bem como a presença de MSI, estão associadas a menor sobrevida, mas a mutação do gene *BRAF* foi a variável com maior impacto prognóstico negativo, apesar da ausência de significância estatística;

Encontramos uma maior proporção de mutação do *BRAF* nos pacientes do sexo feminino (7,6% versus 0,9%, $p=0,024$). Não houve diferença estatisticamente significativa na proporção de mutação de *NRAS* ou de MSI quanto ao sexo na população do estudo.

Encontramos uma maior sobrevida para os tumores do cólon esquerdo quando comparado aos tumores do cólon direito (11,5m versus 6,6 meses; $p=0,02$). Ao avaliar a associação da lateralidade do tumor primário com o perfil molecular, encontramos uma maior proporção de mutação do *BRAF* (12,1% versus 2,5%) e de MSI (11,8 versus 1,8%) nos tumores do cólon D quando comparado aos tumores do cólon E, com diferença estatisticamente significativa. Não houve associação estatisticamente significativa da lateralidade com o status de *NRAS*;

A taxa de resposta dos pacientes do estudo foi de 24%, semelhante à maioria dos estudos já publicados.

9. REFERÊNCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians.* 2018.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics, 2018. CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7-30.
3. Câncer INd. *Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil Rio de Janeiro: Coordenação de Ensino;* 2017 [cited 2019 22 maio].
4. INCA. *Estatísticas do Câncer.* [Internet] Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2019 [cited Abril 22]; Available from: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>.
5. Weiss JM, Pfau PR, O'Connor ES, King J, LoConte N, Kennedy G, et al. *Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results-Medicare data. J Clin Oncol.* 2011;29(33):4401-9.
6. Meguid RA, Slidell MB, Wolfgang CL, Chang DC, Ahuja N. *Is there a difference in survival between right- versus left-sided colon cancers? Ann Surg Oncol.* 2008;15(9):2388-94.
7. Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H, et al. *Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. Dis Colon Rectum.* 2010;53(1):57-64.
8. Huang CW, Tsai HL, Huang MY, Huang CM, Yeh YS, Ma CJ, et al. *Different clinicopathologic features and favorable outcomes of patients with stage III left-sided colon cancer. World J Surg Oncol.* 2015;13:257.
9. Bufill JA. *Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. Ann Intern Med.* 1990;113(10):779-88.

10. DISCLAIMER M. *The Colon and Rectal Clinic*. [Internet] Fort Lauderdale 2019 [cited April 22]; Available from: <http://www.crcftlauderdale.com/education/anatomy-of-the-colon.php>.
11. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, et al. *Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review*. **Gastroenterology**. 1993;104(5):1535-49.
12. Yurgelun MB, Kulke MH, Fuchs CS, Allen BA, Uno H, Hornick JL, et al. *Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer*. **J Clin Oncol**. 2017;35(10):1086-95.
13. Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. *The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence*. **International journal of cancer**. 2009;125(1):171-80.
14. Slattery ML, Fitzpatrick F. *Convergence of hormones, inflammation, and energy-related factors: a novel pathway of cancer etiology*. **Cancer Prevention Research**. 2009;2(11):922-30.
15. Fearon ER. *Molecular genetics of colorectal cancer*. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**. 2011;6:479-507.
16. Markowitz SD, Bertagnolli MM. *Molecular basis of colorectal cancer*. **New England journal of medicine**. 2009;361(25):2449-60.
17. Network CGA. *Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer*. **Nature**. 2012;487(7407):330.
18. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, De Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. *The consensus molecular subtypes of colorectal cancer*. **Nature medicine**. 2015;21(11):1350.

19. Smeby J, Sveen A, Merok M, Danielsen S, Eilertsen I, Guren M, et al. *CMS-dependent prognostic impact of KRAS and BRAF V600E mutations in primary colorectal cancer*. **Annals of Oncology**. 2018;29(5):1227-34.
20. Holch JW, Ricard I, Stintzing S, Modest DP, Heinemann V. *The relevance of primary tumour location in patients with metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of first-line clinical trials*. **Eur J Cancer**. 2017;70:87-98.
21. Missiaglia E, Jacobs B, D'ario G, Di Narzo A, Sonesson C, Budinska E, et al. *Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features*. **Annals of oncology**. 2014;25(10):1995-2001.
22. Loree JM, Pereira AA, Lam M, Willauer AN, Raghav K, Dasari A, et al. *Classifying colorectal cancer by tumor location rather than sidedness highlights a continuum in mutation profiles and consensus molecular subtypes*. **Clinical Cancer Research**. 2018;24(5):1062-72.
23. Tejpar S, Stintzing S, Ciardiello F, Tabernero J, Van Cutsem E, Beier F, et al. *Prognostic and Predictive Relevance of Primary Tumor Location in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: Retrospective Analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 Trials*. **JAMA Oncol**. 2016.
24. Phillips B, Kalady M, Kim R. *BRAF testing in advanced colorectal cancer: is it ready for prime time?* **Clin Adv Hematol Oncol**. 2010;8(6):437-44.
25. Meriggi F, Vermi W, Bertocchi P, Zaniboni A. *The emerging role of NRAS mutations in colorectal cancer patients selected for anti-EGFR therapies*. **Reviews on recent clinical trials**. 2014;9(1):8-12.
26. DeStefanis RA, Kratz JD, Emmerich PB, Deming DA. *Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer: Current Standards and Novel Agents in Review*. **Current Colorectal Cancer Reports**. 2019:1-9.

27. Irahara N, Baba Y, Nosho K, Shima K, Yan L, Dias-Santagata D, et al. *NRAS mutations are rare in colorectal cancer. Diagnostic molecular pathology: the American journal of surgical pathology, part B.* 2010;19(3):157.
28. Morkel M, Riemer P, Blaker H, Sers C. *Similar but different: distinct roles for KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer development and therapy resistance. Oncotarget.* 2015;6(25):20785-800.
29. *Tratado de Oncologia.* Hoff PMG, editor. **São Paulo: Atheneu;** 2013.
30. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, et al. *PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. Cancer research.* 2009;69(5):1851-7.
31. Vinay K, K AA, C AJ, L RS. *Neoplasia Robbins Basic Pathology.* 9 ed. **Philadelphia Elsevier Saunders;** 2013. p. 179-80.
32. Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, Leung K, Bindal N, Boutselakis H, et al. *COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D805-11.
33. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. *Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. Sci Signal.* 2013;6(269):pl1.
34. Clarke CN, Kopetz ES. *BRAF mutant colorectal cancer as a distinct subset of colorectal cancer: clinical characteristics, clinical behavior, and response to targeted therapies. Journal of gastrointestinal oncology.* 2015;6(6):660.
35. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken J, Aderka D, et al. *ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. Annals of Oncology.* 2016;27(8):1386-422.

36. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, et al. *Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis.* **The lancet oncology.** 2010;11(8):753-62.
37. Peeters M, Oliner KS, Parker A, Siena S, Van Cutsem E, Huang J, et al. *Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer.* **Clinical Cancer Research.** 2013;19(7):1902-12.
38. Jarry A, Masson D, Cassagnau E, Parois S, Laboisie C, Denis MG. *Real-time allele-specific amplification for sensitive detection of the BRAF mutation V600E.* **Mol Cell Probes.** 2004;18(5):349-52.
39. Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang ZQ, Lieu CH, et al. *Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer.* **Cancer.** 2011;117(20):4623-32.
40. Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, Di Bartolomeo M, Borgonovo K, Maggi C, et al. *Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis.* **Eur J Cancer.** 2015;51(5):587-94.
41. Yamane L, Scapulatempo-Neto C, Alvarenga L, Oliveira C, Berardinelli G, Almodova E, et al. *KRAS and BRAF mutations and MSI status in precursor lesions of colorectal cancer detected by colonoscopy.* **Oncology reports.** 2014;32(4):1419-26.
42. Rasuck CG, Leite SM, Komatsuzaki F, Ferreira AC, Oliveira VC, Gomes KB. *Association between methylation in mismatch repair genes, V600E BRAF mutation and microsatellite instability in colorectal cancer patients.* **Molecular biology reports.** 2012;39(3):2553-60.
43. Jr PLU, Bugano DD, Moura F, Carvalho RS, Maluf FC. *Worst outcomes according to RAS mutation variants: an analysis in patients with metastatic colorectal adenocarcinoma.*

44. GN B. *Elucidação do impacto molecular e clínico da instabilidade de microssatélite em pacientes com câncer colorretal do Hospital de Câncer de Barretos. Tese (Doutorado)*. Barretos: Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos; 2017.
45. Jones JC, Renfro LA, Al-Shamsi HO, Schrock AB, Rankin A, Zhang BY, et al. *Non-V600 BRAF mutations define a clinically distinct molecular subtype of metastatic colorectal cancer*. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**. 2017;35(23):2624-30.
46. Cejas P, Lopez-Gomez M, Aguayo C, Madero R, Moreno-Rubio J, de Castro Carpeno J, et al. *Analysis of the concordance in the EGFR pathway status between primary tumors and related metastases of colorectal cancer patients: implications for cancer therapy*. **Current cancer drug targets**. 2012;12(2):124-31.
47. Vakiani E, Janakiraman M, Shen R, Sinha R, Zeng Z, Shia J, et al. *Comparative genomic analysis of primary versus metastatic colorectal carcinomas*. **Journal of Clinical Oncology**. 2012;30(24):2956.
48. Baas JM, Krens LL, Guchelaar H-J, Morreau H, Gelderblom H. *Concordance of predictive markers for EGFR inhibitors in primary tumors and metastases in colorectal cancer: a review*. **The oncologist**. 2011:theoncologist. 2011-0024.
49. Bhullar D, Barriuso J, Mullamitha S, Saunders MP, O'Dwyer ST, Aziz O. *Biomarker concordance between primary colorectal cancer and its metastases*. **EBioMedicine**. 2019;40:363-74.
50. Parreiras FC, Santiago GMZ, Costa AMd, Lacerda Filho A. *Aspectos genéticos do câncer colorretal e seu impacto no manejo da doença*. **Rev Med Minas Gerais**. 2013;23(2):221-7.
51. Pinho M. *Câncer colo-retal com instabilidade de microssatélites: uma doença diferente*. **Rev Bras Coloproctol**. 2002;22:139-44.

52. Losso GM, Moraes RdS, Gentili AC, Messias-Reason IT. *Microsatellite instability-MSI markers (BAT26, BAT25, D2S123, D5S346, D17S250) in rectal cancer. ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*. 2012;25(4):240-4.
53. Laghi L, Bianchi P, Roncalli M, Malesci A. *Re: Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(18):1402-3.
54. Sinicrope FA, Sargent DJ. *Clinical implications of microsatellite instability in sporadic colon cancers. Current opinion in oncology*. 2009;21(4):369.
55. Li X, Yao X, Wang Y, Hu F, Wang F, Jiang L, et al. *MLH1 promoter methylation frequency in colorectal cancer patients and related clinicopathological and molecular features. PLoS One*. 2013;8(3):e59064.
56. Yahagi M, Okabayashi K, Hasegawa H, Tsuruta M, Kitagawa Y. *The worse prognosis of right-sided compared with left-sided colon cancers: a systematic review and meta-analysis. Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2016;20(3):648-55.
57. Tejpar S, Bertagnolli M, Bosman F, Lenz H-J, Garraway L, Waldman F, et al. *Prognostic and predictive biomarkers in resected colon cancer: current status and future perspectives for integrating genomics into biomarker discovery. The oncologist*. 2010;15(4):390-404.
58. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. *Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. European journal of cancer*. 2010;46(15):2788-98.
59. Müller C, Schulmann K, Reinacher-Schick A, Andre N, Arnold D, Tannapfel A, et al. *Predictive and prognostic value of microsatellite instability in patients with advanced colorectal cancer treated with a fluoropyrimidine and oxaliplatin containing first-line*

chemotherapy. A report of the AIO Colorectal Study Group. International journal of colorectal disease. 2008;23(11):1033-9.

60. Merok M, Ahlquist T, Røyrvik E, Tufteland K, Hektoen M, Sjo O, et al. *Microsatellite instability has a positive prognostic impact on stage II colorectal cancer after complete resection: results from a large, consecutive Norwegian series.* **Annals of Oncology.** 2012;24(5):1274-82.

61. Baselga J. *The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab.* **Eur J Cancer.** 2001;37 Suppl 4:S16-22.

62. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. *Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer.* **Nature Reviews Cancer.** 2007;7(4):295.

63. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. *K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer.* **N Engl J Med.** 2008;359(17):1757-65.

64. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, et al. *Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer.* **J Clin Oncol.** 2008;26(35):5705-12.

65. , Jessup JM GR, Asare EA, et al.. Colon and Rectum. In: AJCC Cancer Staging Manual, 8th, Amin MB (Ed), AJCC, Chicago 2017. p.251. *Colon and Rectum.* In: Jessup JM GR, Asare EA, et al, editor. *AJCC Cancer Staging Manual.* **Chicago: Amim MB;** 2017. p. 251.

66. *NCCN Guidelines for Treatment of Cancer by Site. Colon/Rectal Cancer.* [Internet] Plymouth Meeting: National Comprehensive Cancer Network; 2019 [cited 2019 May 19]; Available from: www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf.

67. Rowland A, Dias M, Wiese M, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis C, et al. *Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal*

antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. British journal of cancer. 2015;112(12):1888.

68. Heinemann V, Douillard JY, Ducreux M, Peeters M. *Targeted therapy in metastatic colorectal cancer -- an example of personalised medicine in action. Cancer Treat Rev.* 2013;39(6):592-601.

69. Van Cutsem E, Dekervel J. *Not All BRAF-Mutant Metastatic Colorectal Cancers Are Identical: Distinct Clinical Consequences of non-V600 BRAF Mutations. American Society of Clinical Oncology;* 2017.

70. Blay J, Mazieres J, Perol D, Barlesi F, Moro-Sibilot D, Quere G, et al. *Vemurafenib (VM) in non-melanoma V600 and non-V600 BRAF mutated cancers: first results of the ACSE trial. Annals of Oncology.* 2016;27(suppl_6).

71. Johnson B, Loree JM, Jacome AA, Mendis S, Syed M, Morris II VK, et al. *Atypical, Non-V600 BRAF Mutations as a Potential Mechanism of Resistance to EGFR Inhibition in Metastatic Colorectal Cancer. JCO Precision Oncology.* 2019.

72. Arnold D, Lueza B, Douillard J-Y, Peeters M, Lenz H-J, Venook A, et al. *Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. Annals of oncology.* 2017;28(8):1713-29.

73. Loree JM, Kopetz S. *Recent developments in the treatment of metastatic colorectal cancer. Therapeutic advances in medical oncology.* 2017;9(8):551-64.

74. Jonker DJ, O'callaghan CJ, Karapetis CS, Zalberg JR, Tu D, Au H-J, et al. *Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. New England Journal of Medicine.* 2007;357(20):2040-8.

75. Brule SY, Jonker DJ, Karapetis CS, O'Callaghan CJ, Moore MJ, Wong R, et al. *Location of colon cancer (right-sided versus left-sided) as a prognostic factor and a predictor of benefit from cetuximab in NCIC CO.17*. **Eur J Cancer**. 2015;51(11):1405-14.
76. Wang F, Bai L, Liu TS, Yu YY, He MM, Liu KY, et al. *Right-sided colon cancer and left-sided colorectal cancers respond differently to cetuximab*. **Chin J Cancer**. 2015;34(9):384-93.
77. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. *Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer*. **New England journal of medicine**. 2004;351(4):337-45.
78. Buzaid AC, de Cerqueira Mathias C, Perazzo F, Simon SD, Fein L, Hidalgo J, et al. *Cetuximab plus irinotecan in pretreated metastatic colorectal cancer progressing on irinotecan: the LABEL study*. **Clinical colorectal cancer**. 2010;9(5):282-9.
79. Lim R, Sun Y, Im S-A, Hsieh R-K, Yau TK, Bonaventura A, et al. *Cetuximab plus irinotecan in pretreated metastatic colorectal cancer patients: the ELSIE study*. **World journal of gastroenterology: WJG**. 2011;17(14):1879.
80. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zobel A, et al. *Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study*. **Ann Oncol**. 2011;22(7):1535-46.
81. Tol J, Nagtegaal ID, Punt CJ. *BRAF mutation in metastatic colorectal cancer*. **N Engl J Med**. 2009;361(1):98-9.
82. Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. *Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status*. **J Clin Oncol**. 2011;29(15):2011-9.

83. Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, et al. *Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer*. **N Engl J Med**. 2014;371(17):1609-18.
84. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lupi C, Sensi E, Lonardi S, et al. *FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study*. **Lancet Oncol**. 2015;16(13):1306-15.
85. Loupakis F, Cremolini C, Rossini D, Falcone A. *TRIBE study: are all three cytotoxic drugs crucial? - Authors' reply*. **Lancet Oncol**. 2015;16(16):e578-9.
86. Kopetz S, Desai J, Chan E, Hecht JR, O'Dwyer PJ, Maru D, et al. *Phase II pilot study of vemurafenib in patients with metastatic BRAF-mutated colorectal cancer*. **Journal of clinical oncology**. 2015;33(34):4032.
87. Corcoran RB, Atreya CE, Falchook GS, Kwak EL, Ryan DP, Bendell JC, et al. *Combined BRAF and MEK inhibition with dabrafenib and trametinib in BRAF V600-mutant colorectal cancer*. **Journal of clinical oncology**. 2015;33(34):4023.
88. van Geel RM, Tabernero J, Elez E, Bendell JC, Spreafico A, Schuler M, et al. *A phase Ib dose-escalation study of encorafenib and cetuximab with or without alpelisib in metastatic BRAF-mutant colorectal cancer*. **Cancer discovery**. 2017;7(6):610-9.
89. Van Cutsem E, Huijberts S, Grothey A, Yaeger R, Cuyle P-J, Elez E, et al. *Binimetinib, Encorafenib, and Cetuximab Triplet Therapy for Patients With BRAF V600E-Mutant Metastatic Colorectal Cancer: Safety Lead-In Results From the Phase III BEACON Colorectal Cancer Study*. **Journal of Clinical Oncology**. 2019:JCO. 18.02459.
90. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. *Research electronic data capture (REDCap)—a metadata-driven methodology and workflow process for providing*

translational research informatics support. Journal of biomedical informatics. 2009;42(2):377-81.

91. Systems RM. *Cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test* [Internet] Pleasanton, CA 2011 [cited April 20]; Available from: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:aHIPwq2EJY4J:https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf11/P110020c.pdf+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br.

92. Valadão M, Braggio D, Santos AF, Pimenta-Inada HK, Linhares E, Gonçalves R, et al. *Involvement of signaling molecules in the prediction of response to imatinib treatment in metastatic GIST patients.* **journal of surgical research.** 2012;178(1):288-93.

93. Martinho O, Gouveia A, Viana-Pereira M, Silva P, Pimenta A, Reis RM, et al. *Low frequency of MAP kinase pathway alterations in KIT and PDGFRA wild-type GISTs.* **Histopathology.** 2009;55(1):53-62.

94. Di Cristofaro J, Marcy M, Vasko V, Sebag F, Fakhry N, Wynford-Thomas D, et al. *Molecular genetic study comparing follicular variant versus classic papillary thyroid carcinomas: association of N-ras mutation in codon 61 with follicular variant.* **Human pathology.** 2006;37(7):824-30.

95. Viana-Pereira M, Almeida I, Sousa S, Mahler-Araújo B, Seruca R, Pimentel J, et al. *Analysis of microsatellite instability in medulloblastoma.* **Neuro-oncology.** 2009;11(5):458-67.

96. Viana-Pereira M, Lee A, Popov S, Bax DA, Al-Sarraj S, Bridges LR, et al. *Microsatellite instability in pediatric high grade glioma is associated with genomic profile and differential target gene inactivation.* **PLoS One.** 2011;6(5):e20588.

97. Estimativa I. *Incidência de câncer no Brasil [Internet]. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.* 2017. 130 p. 2018.

98. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. *Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality*. 2016.
99. Cruz G, Santana JL, Santana S, Constantino JRM, Chamone BC, Ferreira R. *Câncer colônico: epidemiologia, diagnóstico, estadiamento e gradação tumoral de 490 pacientes*. **Rev Bras Coloproct**. 2007;27(2):139-53.
100. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics, 2019*. **CA: a cancer journal for clinicians**. 2019;69(1):7-34.
101. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, et al. *Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial*. **Journal of clinical oncology**. 2009;28(3):466-74.
102. Bokemeyer C, Van Cutsem E, Rougier P, Ciardiello F, Heeger S, Schlichting M, et al. *Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials*. **European journal of cancer**. 2012;48(10):1466-75.
103. Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. *Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer*. **New England Journal of Medicine**. 2013;369(11):1023-34.
104. Stintzing S, Jung A, Rossius L, Modest DP, Fischer von Weikersthal L, Decker T, et al. *Mutations within the EGFR signaling pathway: Influence on efficacy in FIRE-3—A randomized phase III study of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab as first-line treatment for wild-type (WT) KRAS (exon 2) metastatic colorectal cancer (mCRC) patients*. **American Society of Clinical Oncology**; 2014.
105. Karapetis CS, Jonker D, Daneshmand M, Hanson JE, O'Callaghan CJ, Marginean C, et al. *PIK3CA, BRAF, and PTEN status and benefit from cetuximab in the treatment of advanced*

colorectal cancer—results from NCIC CTG/AGITG CO. 17. **Clinical Cancer Research.** 2014;20(3):744-53.

106. Peeters M, Oliner KS, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, et al. *Updated analysis of KRAS/NRAS and BRAF mutations in study 20050181 of panitumumab (pmab) plus FOLFIRI for second-line treatment (tx) of metastatic colorectal cancer (mCRC).* **American Society of Clinical Oncology;** 2014.

107. Seymour MT, Brown SR, Middleton G, Maughan T, Richman S, Gwyther S, et al. *Panitumumab and irinotecan versus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type, fluorouracil-resistant advanced colorectal cancer (PICCOLO): a prospectively stratified randomised trial.* **The lancet oncology.** 2013;14(8):749-59.

108. Smith CG, Fisher D, Claes B, Maughan TS, Idziaszczyk S, Peuteman G, et al. *Somatic profiling of the epidermal growth factor receptor pathway in tumors from patients with advanced colorectal cancer treated with chemotherapy±cetuximab.* **Clinical Cancer Research.** 2013;19(15):4104-13.

109. Boland CR, Goel A. *Microsatellite instability in colorectal cancer.* **Gastroenterology.** 2010;138(6):2073-87. e3.

110. Koopman M, Kortman G, Mekenkamp L, Ligtenberg M, Hoogerbrugge N, Antonini N, et al. *Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer.* **British journal of cancer.** 2009;100(2):266.

111. Leite SM, Gomes KB, Pardini VC, Ferreira AC, Oliveira VC, Cruz GM. *Assessment of microsatellite instability in colorectal cancer patients from Brazil.* **Molecular biology reports.** 2010;37(1):375-80.

112. Nam SK, Yun S, Koh J, Kwak Y, Seo AN, Park KU, et al. *BRAF, PIK3CA, and HER2 oncogenic alterations according to KRAS mutation status in advanced colorectal cancers with distant metastasis.* **PloS one.** 2016;11(3):e0151865.

113. Markovic S, Antic J, Dimitrijevic I, Zogovic B, Bojic D, Svorcan P, et al. *Microsatellite instability affecting the T17 repeats in intron 8 of HSP110, as well as five mononucleotide repeats in patients with colorectal carcinoma*. **Biomarkers in medicine**. 2013;7(4):613-21.
114. Kim SJ, Kim HR, Kim SH, Han JH, Cho YB, Yun SH, et al. *hMLH1 promoter methylation and BRAF mutations in high-frequency microsatellite instability colorectal cancers not fulfilling the revised Bethesda guidelines*. **Annals of surgical treatment and research**. 2014;87(3):123-30.
115. Miwata T, Hiyama T, Quach DT, Le HM, Hua HNT, Oka S, et al. *Differences in K-ras and mitochondrial DNA mutations and microsatellite instability between colorectal cancers of Vietnamese and Japanese patients*. **BMC gastroenterology**. 2014;14(1):203.
116. Krivokapić Z, Marković S, Antić J, Dimitrijević I, Bojić D, Svorcan P, et al. *Clinical and pathological tools for identifying microsatellite instability in colorectal cancer*. **Croatian medical journal**. 2012;53(4):328-35.
117. Gonsalves WI, Mahoney MR, Sargent DJ, Nelson GD, Alberts SR, Sinicrope FA, et al. *Patient and tumor characteristics and BRAF and KRAS mutations in colon cancer, NCCTG/Alliance N0147*. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**. 2014;106(7):dju106.
118. Simons C, Hughes L, Smits K, Khalid-de Bakker C, De Bruïne A, Carvalho B, et al. *A novel classification of colorectal tumors based on microsatellite instability, the CpG island methylator phenotype and chromosomal instability: implications for prognosis*. **Annals of oncology**. 2013;24(8):2048-56.
119. Wilke H, Glynn-Jones R, Thaler J, Adenis A, Preusser P, Aguilar EA, et al. *Cetuximab plus irinotecan in heavily pretreated metastatic colorectal cancer progressing on irinotecan: MABEL Study*. **Journal of Clinical Oncology**. 2008;26(33):5335-43.
120. Moretto R, Cremolini C, Rossini D, Pietrantonio F, Battaglin F, Mennitto A, et al. *Location of primary tumor and benefit from anti-epidermal growth factor receptor monoclonal*

antibodies in patients with RAS and BRAF wild-type metastatic colorectal cancer. The oncologist. 2016;21(8):988-94.

121. Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, Ghidini M, Turati L, Dallera P, et al. *Prognostic survival associated with left-sided vs right-sided colon cancer: a systematic review and meta-analysis. JAMA oncology.* 2017;3(2):211-9.

122. Zhang Y, Ma J, Zhang S, Deng G, Wu X, He J, et al. *A prognostic analysis of 895 cases of stage III colon cancer in different colon subsites. International journal of colorectal disease.* 2015;30(9):1173-83.

123. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran S-E, et al. *FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. The lancet oncology.* 2014;15(10):1065-75.

124. Sinicrope FA, Mahoney MR, Yoon HH, Smyrk TC, Thibodeau SN, Goldberg RM, et al. *Analysis of molecular markers by anatomic tumor site in stage III colon carcinomas from adjuvant chemotherapy trial NCCTG N0147 (Alliance). Clinical Cancer Research.* 2015;21(23):5294-304.

125. UpToDate. *Pathology and prognostic determinants of colorectal cancer.* [Internet] Waltham, MA: Post TW; 2019 [cited June 02, 2019]; Available from: www.uptodate.com/contents/pathology-and-prognostic-determinants-of-colorectal-cancer?source=history_widget.

126. Edge SB, Compton CC. *The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. Annals of surgical oncology.* 2010;17(6):1471-4.

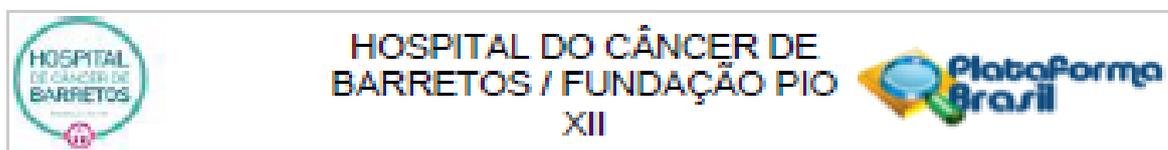
127. Quah H-M, Chou JF, Gonen M, Shia J, Schrag D, Landmann RG, et al. *Identification of patients with high-risk stage II colon cancer for adjuvant therapy*. **Diseases of the Colon & Rectum**. 2008;51(5):503-7.
128. Yokota T, Ura T, Shibata N, Takahari D, Shitara K, Nomura M, et al. *BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer*. **British journal of cancer**. 2011;104(5):856.
129. Tveit KM, Guren T, Glimelius B, Pfeiffer P, Sorbye H, Pyrhonen S, et al. *Phase III trial of cetuximab with continuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX) versus FLOX alone in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: the NORDIC-VII study*. **Journal of clinical oncology**. 2012;30(15):1755-62.
130. Kopetz S, Grothey A, Van Cutsem E, Yaeger R, Wasan H, Yoshino T, et al. *LBA-006 BEACON CRC: a randomized, 3-Arm, phase 3 study of encorafenib and cetuximab with or without binimetinib vs. choice of either irinotecan or FOLFIRI plus cetuximab in BRAF V600E-mutant metastatic colorectal cancer*. **Annals of Oncology**. 2019;30(Supplement_4):mdz183.004.
131. Yoon YS, Yu CS, Kim TW, Kim JH, Jang SJ, Cho DH, et al. *Mismatch repair status in sporadic colorectal cancer: immunohistochemistry and microsatellite instability analyses*. **Journal of gastroenterology and hepatology**. 2011;26(12):1733-9.
132. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. *Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: A meta-analysis of colorectal cancer survival data*. **European Journal of Cancer**. 2010;15(46):2788-98.
133. Loupakis F, Yang D, Yau L, Feng S, Cremolini C, Zhang W, et al. *Primary tumor location as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer*. **J Natl Cancer Inst**. 2015;107(3).

134. Neugut AI, Lin A, Raab GT, Hillyer GC, Keller D, O'Neil DS, et al. *FOLFOX and FOLFIRI Use in Stage IV Colon Cancer: Analysis of SEER-Medicare Data*. **Clinical colorectal cancer**. 2019;18(2):133-40.

135. Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. *FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study*. **Journal of Clinical Oncology**. 2004;22(2):229-37.

10. ANEXOS

10.1 Anexo A - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA E DA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÃO DOS GENES BRAF, NRAS e DO STATUS DE MSI NOS PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL METASTÁTICO KRAS SELVAGEM TRATADOS COM CETUXIMABE NO HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS

Pesquisador: Flávia Almeida Santos

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 72877217.8.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Fundação Pio XII

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.498.377

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos denominados "apresentação do projeto", "objetivos" e "avaliação dos riscos e benefícios" foram retiradas do documento intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1409477_E2.pdf" (submetido na Plataforma Brasil em 06/08/2019)

Resumo:

Este estudo visa avaliar a sobrevivência e a frequência das mutações dos genes BRAF (V600E) e NRAS e do status de MSI nos pacientes com câncer colorretal avançado KRAS selvagem tratados com Cetuximabe no Hospital de Câncer de Barretos. A presença destas mutações, bem como da instabilidade de microssatélites estão associados a uma doença mais agressiva e com pior prognóstico. Trata-se de um dos primeiros estudos na população brasileira que tem o intuito de confirmar os achados prévios em relação à eficácia do Cetuximabe no tratamento do CCR avançado em uma população enriquecida de pacientes politratados, refratários, enquanto a maior parte dos estudos já existentes concentram-se na primeira linha.

Introdução:

Endereço: Rua Antenor Duarte Viela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6800 **E-mail:** cep@hccancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 3.490.377

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais comum em homens e mulheres nos Estados Unidos. A estimativa para 2017 é de 135.430 novos casos (95520 para câncer de cólon e 39910 para câncer de reto). Estima-se 50.260 mortes para 2017 em decorrência do câncer colorretal, sendo a segunda causa de morte por câncer em homens e a terceira causa em mulheres[1]. No Brasil, estimou-se 34.280 novos casos de câncer colorretal para 2016(16.660 em homens e 17.620 em mulheres). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de cólon e reto é o terceiro câncer mais comum em homens e o segundo câncer mais comum em mulheres. A estimativa de mortes para o mesmo período foi de 15.415, sendo 7.387 homens e 8.024 mulheres[2]. Os tumores colorretais abrangem um grupo heterogêneo e complexo de doenças que resultam do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas distintas. Apesar da maior compreensão das vias moleculares envolvendo o câncer colorretal (CCR), relativamente poucos biomarcadores são prognósticos para sobrevida. A presença de mutações germinativas das enzimas de reparo dos erros de pareamento do DNA, definidoras da síndrome de Lynch, no EC- II e III da doença e mutações do BRAF V600E no estágio IV são notáveis exceções [3]. Existem várias diferenças embriológicas e biológicas entre o cólon proximal e distal. O segmento proximal do intestino grosso, incluindo o ceco, cólon ascendente e dois terços proximais do cólon transverso, surgem do intestino médio embrionário e recebem perfusão sanguínea da artéria mesentérica superior. Por sua vez, o segmento distal do intestino grosso da flexão esplênica até o canal anal superior se origina no intestino posterior embrionário e recebe a perfusão sanguínea da artéria mesentérica inferior[4]. Sabidamente os cânceres do cólon direito tendem a ser volumosos, pouco diferenciados, exofíticos e polipóides, crescendo no lúmen intestinal e causando anemia. No entanto, os tumores do cólon esquerdo tendem a ser constritivos causando muitas vezes obstrução intestinal como apresentação inicial da doença[5]. Além de diferentes características clínico patológicas, existem também diferenças genéticas entre o cólon direito e cólon esquerdo. A instabilidade de microssatélites (MSI) e a instabilidade cromossômica são as duas mais frequentemente mencionadas. Os tumores do cólon direito são mais frequentemente diploides, têm histologia mucinosa, alta MSI, metilação da ilha CpG e mutações ativadoras dos genes RAS, BRAF e PI3KCA. Em contraste, os cânceres do cólon esquerdo são caracterizados por uma ocorrência mais frequente de instabilidade cromossômica, um perfil de expressão de genes correspondente a uma ativação do receptor de crescimento epitelial (EGFR) e são mais frequentemente aneuploides[6]. Nas últimas 2 décadas, houve um lento mas constante declínio nas taxas de mortalidade por CCR. No entanto, esta tendência não é presente em todos os subgrupos, em especial quanto a localização anatômica dos tumores. Existem informações

Endereço: Rua Antenor Duarte Viela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6800 E-mail: cep@hccancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 3.496.377

Importante papel tanto na iniciação do tumor quanto na manutenção do seu crescimento[11]. Aproximadamente 40% dos CCRs exibem mutações ativas no KRAS (a base de dados COSMIC [12] refere 36%, edisso, observou-se uma interação significativa entre localização do tumor e tratamento para sobrevida livre de progressão (PFS)[17].O Cetuximabe é um anticorpo monoclonal quimérico IgG1 que se liga à porção extra-celular do receptor para o fator de crescimento epidérmico (epidermal growth factor receptor, EGFR). O EGFR é uma glicoproteína transmembrana que pertence à família do tipo I de receptores tirosina quinase. Com ação anti-EGFR, o Cetuximabe se liga ao domínio extracelular do EGFR (Erb1) impedindo a dimerização do receptor. Esta ligação gera internalização do complexo receptor-anticorpo e impede a autofosforilação de EGFR-tirosina e, conseqüentemente, a ativação da cascata de proteínas. Sendo assim, o Cetuximabe age sobre a inibição da proliferação celular e indução de apoptose[18].A inibição do receptor transmembrana de tirosina quinase EGFR provou ser benéfica para um subconjunto considerável de pacientes com CRC metastático. Após tratamento com anticorpos inibidores de EGFR tais como Cetuximabe ou Panitumumabe, os doentes mostraram um benefício de sobrevida global de 3-5 meses quando o câncer era tipo KRAS selvagem, mas nenhum benefício quando o câncer era KRAS mutado. Portanto, as mutações KRAS e agora também NRAS são consideradas marcadores preditivos negativos para terapia anti-EGFR [19]. Wang et AL relataram que a adição de Cetuximabe a quimioterapia de primeira ou segunda linha significativamente aumentou a taxa de resposta objetiva (ORR), PFS e sobrevida global (OS) em pacientes com câncer de cólon esquerdo metastático, mas com benefício limitado em pacientes com tumores do cólon direito. Além disso, tem sido relatado que a via do EGFR não é comparativamente ativada em tumores do cólon esquerdo versus cólon direito, e um fenótipo sensível ao inibidor do EGFR parece ser mais predominante nos tumores de cólon esquerdo, levando à hipótese de que os inibidores de EGFR podem exibir atividade diferencial baseada em localização tumoral. No entanto, diferenças nos resultados do estudo podem ser atribuídas ao tamanho da amostra, heterogeneidade no tratamento e informações limitadas sobre características moleculares e patológicas[20]. Em contraste com as mutações RAS, mutações no BRAF não foram identificadas como um marcador preditivo independente à terapia de primeira linha anti-EGFR em um estudo clínico. Isso é justificado pelo fato de que as mutações de BRAF ocorrem em frequências baixas e assim nenhum estudo clínico consegue recrutar o número de pacientes necessários para alcançar a significância estatística. Além disso, os pacientes com mutações BRAF, em particular aqueles com estabilidade de microssatélites (MSS), têm um mau resultado, que é independente da terapia aplicada[15,21]. Apesar dos insights biológicos obtidos a partir de estudos de perfil de expressão gênica, o

Endereço: Rua Artur Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Preta CEP: 14.764-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-8600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



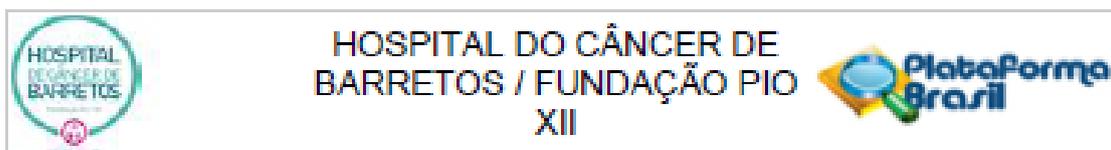
HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 3.498.377

tratamento de pacientes com CCR avançado BRAF-mutado ainda é um grande desafio para os médicos. De fato, tem sido demonstrado que a mutação BRAF V600E está correlacionada com um fenótipo extremamente agressivo e mau prognóstico, geralmente com uma sobrevida global mediana de menos de um ano [22]. A análise retrospectiva e pós-hoc de estudos randomizados revelou que os regimes de primeira linha padrão, incluindo uma combinação de quimioterapia mais um anticorpo monoclonal, levam a resultados decepcionantes e tempos médios de SLP menores que seis meses[23-25]. Além do impacto prognóstico das mutações BRAF na CCR, os dados retrospectivos sugerem que estas mutações podem ser preditivas da resistência primária aos anticorpos monoclonais do receptor do fator de crescimento anti-epidérmico Cetuximabe e Panitumumabe. No entanto, a resistência ao tratamento deve ser confirmada em ensaios clínicos randomizados que incluem um grupo de controle que não é tratado com o anticorpo[22]. Recentemente, todas as mutações RAS foram validadas como um fator preditivo negativo da terapia antiEGFR em análises retrospectivas não pré-especificadas de vários estudos de fase III. No entanto, a mesma análise realizada em pacientes com mutações de BRAF, que são mutuamente exclusivas com mutações de RAS, apresentou um valor prognóstico invariavelmente pobre independentemente do braço de tratamento e não forneceu evidência para a sua utilidade como biomarcador preditivo devido ao pequeno número de doentes e falta de poder estatístico[26,27]. Em meta-análise recente, Pietrantonio et al, avaliaram a mutação do BRAF como marcador preditivo em pacientes com CCR avançado. Foram avaliados resultados de dez ensaios randomizados com mais de quatrocentos doentes KRAS-wt/BRAFmutado tratados com ou sem Cetuximabe ou Panitumumabe na primeira linha ou em linhas subsequentes. Foi evidenciado que a adição de agentes anti-EGFR à quimioterapia padrão não está associada a um aumento significativo de sobrevida global, sobrevida livre de progressão ou taxa de resposta em pacientes RAS-wt/BRAF-mutado, particularmente na primeira linha paliativa. Portanto, esses doentes não se beneficiam da terapia dirigida a EGFR e devem ser testados antes da administração de Cetuximabe ou Panitumumabe[22]. Em outra meta-análise, Yuan et al mostraram que em pacientes com câncer colorretal metastático (mCCR) KRAS-wt, a ausência de mutação do gene BRAF foi associada a menor risco de progressão (HR 0,29, p = 0,001) e morte (HR 0,26, p = 0,001), e a maiores taxas de resposta (P = 0,001) em relação aos pacientes BRAF mutado[28]. Em uma análise retrospectiva, Nicolantonio et al, avaliaram o status KRAS e BRAF de 113 pacientes com mCCR tratados com Cetuximabe e Panitumumabe. A mutação do KRAS foi encontrada em 30% dos pacientes e associada à resistência aos anti-EGFR. Mutação do BRAF V600E foi encontrada em 11 dos 79 pacientes KRAS wt. Nenhum dos pacientes com mutação no BRAF responderam ao tratamento e

Endereço: Rua Antenor Duarte Viçela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-8600 E-mail: cep@hccancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 3.498.377

nenhum dos respondedores tinham a mutação do BRAF ($p=0,029$). Pacientes BRAF mutado tiveram significativamente menor SLP e menor SG quando comparado aos pacientes BRAF selvagem (wt). Portanto, ausência de mutação do BRAF é requerido para resposta aos anti-EGFR e deve ser usado para selecionar pacientes que são elegíveis para o tratamento[29]. A escolha de uma estratégia de primeira linha é crucial para pacientes com mCRC, uma vez que alguns deles se tornarão ineligiáveis para regimes de salvamento potencialmente eficazes principalmente devido à rápida progressão da doença. Isto é ainda mais relevante para o subconjunto de pacientes com mutações do BRAF devido ao fenótipo agressivo e ao curso clínico da doença. De fato, uma vez que os pacientes com câncer colorretal RAS-wt

Hipótese:

Espera-se encontrar uma sobrevida próxima ao evidenciado pela literatura já existente, para os pacientes tratados com Cetuximabe. Espera-se também que pacientes com mutação do BRAF e NRAS, bem como com instabilidade de microssatélites, apresentem uma menor sobrevida e taxa de resposta objetiva quando comparado aos pacientes sem mutação e com estabilidade de microssatélites. Estima-se frequência de mutação destes genes e de MSI próximo do já evidenciado por estudos prévios.

Objetivo da Pesquisa:

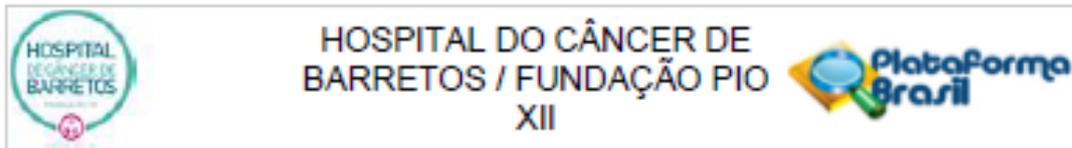
Objetivo Primário:

Avaliar a sobrevida e a frequência das mutações dos genes BRAF (V600E) e NRAS e do status de MSI nos pacientes com câncer colorretal avançado KRAS selvagem tratados com Cetuximabe no Hospital de Câncer de Barretos.

Objetivo Secundário:

- Descrever as características clínicas, patológicas e terapêuticas dos pacientes com CCRm tratados com Cetuximabe;
- Avaliar o impacto das mutações dos genes BRAF (V600E) e NRAS e do status de MSI na sobrevida dos pacientes com câncer colorretal metastático tratados com Cetuximabe.
- Avaliar a associação das mutações dos genes BRAF (V600E), NRAS e da instabilidade de microssatélites com as características clínicas dos pacientes incluídos no estudo.
- Avaliar a associação da lateralidade do tumor primário com características moleculares, assim

Endereço: Rua Antenor Duarte Viçela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.764-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 3.498.377

como seu impacto na sobrevida dos pacientes com câncer colorretal metastático tratados com Cetuximabe.
- Avaliar a taxa de resposta ao Cetuximabe.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos são mínimos, para os participantes envolvendo a análise dos dados de seus prontuário. Todos os dados utilizados serão provenientes de procedimentos e exames já disponíveis no prontuário, independentemente da participação no estudo. A realização da pesquisa da mutação do BRAF será realizada no bloco tumoral já disponível no laboratório de anatomia patológica, não sendo necessária a realização de nova biópsia. Cuidado será tomado para que após os cortes histológicos, o material tumoral remanescente seja suficiente para potencial confirmação anatomopatológica. Há o risco de quebra da confidencialidade de dados entre os membros relacionados com o estudo, mas este será evitado ao máximo.

Benefícios:

Pretende-se avaliar a mutação do BRAF como fator preditivo de benefício à quimioterapia com Cetuximabe, além de correlacionar a presença da referida mutação com o prognóstico dos pacientes. Espera-se encontrar uma sobrevida reduzida nos pacientes com a mutação do BRAF e uma ausência de resposta objetiva assim como uma tendência a piora da sobrevida global nos pacientes submetidos à terapia anti-EGFR. Uma vez que essa associação seja confirmada, pretendemos utilizar estes dados como uma ferramenta para melhorar o tratamento quimioterápico dos pacientes com câncer colorretal, avaliando a não indicação de um tratamento desprovido de benefício nesta população de pacientes. Além disso, poderemos discutir mudanças no protocolo quimioterápico institucional, visando melhorar o prognóstico destes pacientes. A publicação deste estudo pode trazer informações importantes e contribuições para o futuro do possível papel da mutação do BRAF como fator preditivo de benefício à quimioterapia com anti-EGFR. Ou seja, a pesquisa não proporcionará benefícios diretos aos seus participantes mas poderá trazer benefícios aos futuros pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente submissão trata-se de E2 ao projeto para aprovação dos seguintes documentos:

- PROJETOversao001.docx;

Endereço:	Rua Antenor Duarte Vilela, 1331		
Bairro:	Dr. Paulo Presta	CEP:	14.784-400
UF:	SP	Município:	BARRETOS
Telefone:	(17)3321-0347	Fax:	(17)3321-8600
		E-mail:	cep@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 3.498.377

- Formulárioemendadois.pdf;
- folhaderosodols.pdf;
- PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1409477_E2.pdf

Trata-se da submissão de emenda, a constar:

Mudança do título do projeto.

Mudança na justificativa e objetivos.

Os pesquisadores acrescentaram a avaliação de mutações no gene NRAS, assim como redirecionaram os objetivos.

As emendas não alteram os riscos e benefícios do estudo, não havendo impactos éticos e sendo assim, aprovadas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram adequadamente apresentados.

Recomendações:

Recomenda-se a inclusão da descrição da metodologia de avaliação da mutação NRAS, que foi introduzida como objetivo do estudo nesta emenda.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

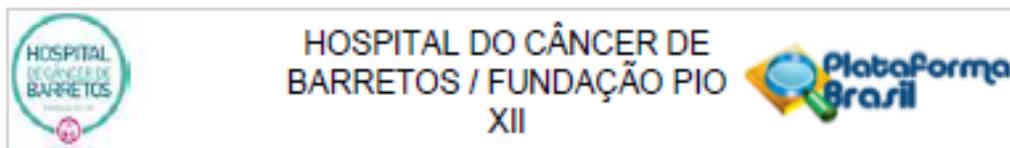
O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos analisou o(s) seguinte(s) documento(s) do projeto 1424/2017, e:

- Aprovou a emenda ao estudo, submetida em 06/08/2019;

Após análise do(s) documento(s) supracitado(s), o Comitê faz a seguinte recomendação:

- O Estudo deve Continuar;
- O Estudo dever ser Interrompido;
- O Estudo está Finalizado;

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331		CEP: 14.784-400
Bairro: Dr. Paulo Preta		
UF: SP	Município: BARRETOS	
Telefone: (17)3321-0347	Fax: (17)3321-8800	E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 3.498.377

() Solicita-se Esclarecimento;

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1409477_E2.pdf	06/08/2019 16:26:06		Acelto
Folha de Rosto	foihaderostodois.pdf	06/08/2019 16:24:33	Florinda Almelda Santos	Acelto
Outros	Formularioemendadois.pdf	06/08/2019 16:12:18	Florinda Almelda Santos	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOversaodois.docx	06/08/2019 15:45:00	Florinda Almelda Santos	Acelto
Outros	Formulario_Emenda_mestrado.docx	23/04/2019 09:19:26	Florinda Almelda Santos	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	FUSO_E_EGF_PROJETO_CEP_EDITA DO_VERSAO_FINAL.docx	23/04/2019 09:16:07	Florinda Almelda Santos	Acelto
Outros	Formulario_Emenda.pdf	23/04/2019 09:15:56	Florinda Almelda Santos	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	08/08/2017 08:35:29	Florinda Almelda Santos	Acelto
Outros	Declaracao.pdf	01/08/2017 15:05:37	Florinda Almelda Santos	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BARRETOS, 09 de Agosto de 2019

Assinado por:

Malcon Fernando Zanon da Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-8600 E-mail: cep@hccancerbarretos.com.br

10.2 Anexo B - Ficha estruturada para coleta de dados clínico-patológicos

Ficha de Coletas			
Identificação			
1	ID NAP	1	
2	Nome	2	
3	Iniciais do paciente	3	
4	RH	4	
5	Sexo	5	
6	Data de nascimento	6	/ /
1- Feminino; 2- Masculino			
DD/MM/AAAA			
DADOS DO DIAGNOSTICO			
7	Data do diagnostico	7	/ /
DD/MM/AAAA			
8	Localização do tumor primário	8	
1- Ceco; 2- Apêndice cecal; 3- Cólon ascendente; 4- Cólon transverso; 5- Cólon descendente; 6- Cólon sigmoide; 7- Transição retossigmóide; 8- Reto alto; 9- Reto médio; 10- Reto Baixo			
9	Estadiamento	9	
1- Clínico; 2- Patológico			
10	Estadiamento agrupado	10	
0- 0; 1- I; 2- IIa; 3- IIb; 4- II Clínico; 5- IIIa; 6- IIIb; 7- IIIc; 8- III Clínico; 9- IVa; 10- IVb; 11- IV Clínico; 12- Desconhecido			
12	Tumor primário	12	
Descrever			
13	Linfonodos regionais	13	
Descrever			
14	Metástase	14	
Descrever			
15	Sítio de metástase	15	
1- Pulmão; 2- Pleura; 3- Fígado; 4- Osso; 5- SNC; 6- Linfonodo não-regional; 7- Subcutâneo; 8- Peritoneo; 9- Outros; 88- Não aplicável			
16	Tipo histológico	16	
0- Não possui; 1- Adenocarcinoma; 2- Adenocarcinoma Mucinoso; 3- Misto; 4- Outros			
Tratamento cirúrgico			
18	Fez cirurgia?	18	
0- Não; 1- Sim			
19	Data da cirurgia	19	BL: 18 = 1 / /
DD/MM/AAAA			
	Tipo de cirurgia realizada		
Descrever			
20	Cirurgia de urgência	20	
0- Não; 1- Sim			
21	Motivo da cirurgia de urgencia	21	BL: 20 = 1
1- Obstrução; 2- Perfuração; 3- Sangramento			
22	Após tratamento neoadjuvante	22	
0- Não; 1- Sim			
23	Número de linfonodos ressecados	23	
Número			
24	Número de linfonodos positivos	24	
Número			

25	Grau ressecção 0- R0; 1- R1; 2- R2; 3- SI	25	
26	Invasão Angiolinfática 0- Resposta completa ao tto neo; 1- Positivo; 2- Negativo; 3- SI	26	
27	Invasão perineural 0- Resposta completa ao tto neo; 1- Positivo; 2- Negativo; 3- SI	27	
28	Grau histológico 0- Resposta completa ao tto neo; 1- I; 2- II; 3- III; 4- SI	28	
29	Tipo histológico 0- Resposta completa ao tto neo; 1- Adenocarcinoma; 2- Adenocarcinoma Mucinoso; 3- Misto; 4- Outros	29	
30	Estadiamento final Descrever	30	
31	Realizou colostomia/iliostomia 0- Não; 1- Sim (próprio ato cirúrgico); 2- Sim (previamente)	31	
Tratamento pré operatório			
32	Realizou tratamento pré operatório 0- Não; 1- Sim; 2- SI	32	
33	Tipo de tratamento 1- Radioterapia + QT concomitantes; 2- Radioterapia exclusiva; 3- Quimioterapia exclusiva; 4- Outros	33	BL: 32 = 1
34	Fez radioterapia 0- Não; 1- Sim	34	
35	Início da radioterapia DD/MM/AAAA	35	BL: 3 = /___/_____
36	Término da radioterapia DD/MM/AAAA	36	BL: 3 = /___/_____
37	Dose total da radioterapia Descrever	37	BL: 32 = 1
38	Concluiu a radioterapia? 0- Não; 1- Sim	38	BL: 32 = 1
39	Fez quimioterapia 0- Não; 1- Sim	39	
40	Início da quimioterapia DD/MM/AAAA	40	BL: 3 = /___/_____
41	Término da quimioterapia DD/MM/AAAA	41	BL: 3 = /___/_____
42	Número de ciclos de quimioterapia Número	42	BL: 39 = 1
43	Protocolo de quimioterapia Descrever	43	BL: 39 = 1
44	Concluiu a quimioterapia? 0- Não; 1- Sim	44	BL: 39 = 1
45	Estadiamento após tratamento pré-operatório 0- 0; 1- I; 2- IIa; 3- IIb; 4- IIc 5- IIIa; 6- IIIb; 7- IIIc; 8- IVa; 9- IVb	45	
46	Tumor primário após tratamento pré operatório 0- Tis; 2- T0; 3- T1; 4- T2; 5- T3; 6-T4a; 7 T4b	46	
47	Linfonodos regionais 0- N0; 1- N1b; 2-N1c; 3- N2a; 4- N2b	47	
48	Metástase após tratamento pré-operatório 0- M0; 1- M1a; 2- M1b	48	
TUMOR SINCRÔNICO COLORRETAL			
49	Tumor sincrônico colorretal? 0- Não; 1- Sim	49	
50	Localização do tumor sincrônico 1- Ceco; 2- Apêndice cecal; 3- Cólon ascendente; 4-Cólon transverso; 5- Cólon descendente; 6- Cólon sigmoide; 7- Transição retossigmóide; 8- Reto alto; 9- Reto médio; 10- Reto Baixo; 11- Outro	50	
51	Se outro local, descrever Descrever	51	BL: 50 = 11

52	Estádio ao diagnóstico 0- 0; 1- I; 2- IIa; 3- IIb; 4- IIc 5- IIIa; 6- IIIb; 7- IIIc; 8- IVa; 9- IVb	52	
53	Tumor primário 0- Tis; 2- T0; 3- T1; 4- T2; 5- T3; 6-T4a; 7 T4b	53	
54	Linfonodos regionais 0- N0; 1- Nx; 2-N+; 3- N2a; 4- N2b; 5- N1a; 6- N1b; 7-N1c; 8- N2a; 9- N2b	54	
55	Metástases 0- M0; 1- M1a; 2-M1b	55	
56	Tipo histológico 1- Adenocarcinoma; 2- Adenocarcinoma Mucinoso; 3- Misto; 4- Outros	56	
57	Se outro, descrever Descrever	57	BL: 56 = 11
58	Grau histológico 1- I; 2- II; 3- III; 4- SI	58	
59	Invasão Angiolinfática 0- Não; 1- Sim	59	
60	Invasão perineural 0- Não; 1- Sim	60	
Quimioterapia adjuvante			
61	Quimioterapia adjuvante 0- Não; 1- Sim; 2- SI	61	
62	Motivo de não realização 1- Estádio 0, I, II; 2- Tempo entre cirurgia e avaliação de qt; 3- Idade; 4- Comorbidades; 5- ECOG ruim; 6- Complicações pós operatórias; 7- Óbito por complicação pós operatória; 8- Óbito por outras causas; 9- Progressão de doença; 10- Doença metastática; 11- Outro motivo	62	[Checkbox]
63	Se outro motivo, descrever Descrever	63	BL: 62 = 11
64	Início de QT adjuvante DD/MM/AAAA	64	/ /
65	Término de QT adjuvante DD/MM/AAAA	65	/ /
66	Esquema de QT Descrever	66	
68	Completo o tratamento proposto? 0- Não; 1- Sim	68	
69	Se não, qual o motivo 1- Comorbidade; 2- Queda de PS; 3- Toxicidade; 4-Recidiva de doença; 5- Óbito por toxicidade; 6- Óbito por doença; 7- Óbito por outras causas; 8- Desejo do paciente	69	
Radioterapia adjuvante			
70	Radioterapia adjuvante 0- Não; 1- Sim; 2- SI	70	
71	Início de Radioterapia adjuvante DD/MM/AAAA	71	BL: 70 = 1 / /
72	Término de Radioterapia adjuvante DD/MM/AAAA	72	BL: 70 = 1 / /
73	Dose total Descrever	73	BL: 70 = 1
74	Fez QT concomitante? 0- Não; 1- Sim; 2- SI	74	
75	Esquema de QT Descrever	75	BL: 74 = 1
76	Número de ciclos Descrever	76	BL: 74 = 1
77	Início de QT concomitante DD/MM/AAAA	77	BL: 74 = 1 / /
78	Término de QT concomitante DD/MM/AAAA	78	BL: 74 = 1 / /

Tratamento paliativo			
79	Houve recorrência	0- Não; 1- Sim	79
80	Data do primeiro diagnóstico de doença recorrente ou metastático	DD/MM/AAAA	80 BL: 79 = 1 / /
81	Sítio da recorrência 1- Locorregional; 2- Linfonodos não regionais; 3- Peritônio; 4- Fígado; 5- Pulmão/Pleura; 6- Osso; 7- SNC; 8- Subcutâneo; 9- Outros		81 BL: 79 = 1 Checkbox
82	Se outro (s) qual (is)?	Descrever	82 BL: 81 = 9
83	Quimioterapia paliativa de 1ª linha?	0- Não; 1- Sim; 2- Tratamento investigacional	83
84	Protocolo de QT	Descrever	84 BL: 83 = 1
85	Início de QT	DD/MM/AAAA	85 BL: 83 = 1 / /
86	Término de QT	DD/MM/AAAA	86 BL: 83 = 1 / /
87	Número de ciclos	Descrever	87 BL: 83 = 1
93	Realizou outra linha?	0- Não; 1- Sim; 2- Tratamento investigacional	93
94	Protocolo de QT 2ª linha	Descrever	94 BL: 93 = 1
95	Início de QT 2ª linha	DD/MM/AAAA	95 BL: 93 = 1 / /
96	Término de QT 2ª linha	DD/MM/AAAA	96 BL: 93 = 1 / /
97	Número de ciclos 2ª linha	Descrever	97 BL: 93 = 1
103	Realizou outra linha?	0- Não; 1- Sim; 2- Tratamento investigacional	103
104	Protocolo de QT 3ª linha	Descrever	104 BL: 103 = 1
105	Início de QT 3ª linha	DD/MM/AAAA	105 BL: 103 = 1 / /
106	Término de QT 3ª linha	DD/MM/AAAA	106 BL: 103 = 1 / /
63	Se outro motivo, descrever	Descrever	63 BL: 62 = 11
64	Início de QT adjuvante	DD/MM/AAAA	64 / /
65	Término de QT adjuvante	DD/MM/AAAA	65 / /
66	Esquema de QT	Descrever	66
68	Completou o tratamento proposto?	0- Não; 1- Sim	68
69	Se não, qual o motivo 1- Comorbidade; 2- Queda de PS; 3- Toxicidade; 4- Recidiva de doença; 5- Óbito por toxicidade; 6- Óbito por doença; 7- Óbito por outras causas; 8- Desejo do paciente		69

70	Radioterapia adjuvante	0- Não; 1- Sim; 2- SI	70	
71	Início de Radioterapia adjuvante	DD/MM/AAAA	71	BL: 70 = 1 / /
72	Término de Radioterapia adjuvante	DD/MM/AAAA	72	BL: 70 = 1 / /
73	Dose total	Descrever	73	BL: 70 = 1
74	Fez QT concomitante?	0- Não; 1- Sim; 2- SI	74	
75	Esquema de QT	Descrever	75	BL: 74 = 1
76	Número de ciclos	Descrever	76	BL: 74 = 1
77	Início de QT concomitante	DD/MM/AAAA	77	BL: 74 = 1 / /
78	Término de QT concomitante	DD/MM/AAAA	78	BL: 74 = 1 / /
79	Houve recorrência	0- Não; 1- Sim	79	
80	Data do primeiro diagnóstico de doença recorrente ou metastático	DD/MM/AAAA	80	BL: 79 = 1 / /
81	Sítio da recorrência 1- Locorregional; 2- Linfonodos não regionais; 3- Peritônio; 4- Fígado; 5- Pulmão/Pleura; 6- Osso; 7- SNC; 8- Subcutâneo; 9- Outros		81	
82	Se outro (s) qual (is)?	Descrever	82	BL: 81 = 9
83	Quimioterapia paliativa de 1ª linha?	0- Não; 1- Sim; 2- Tratamento investigacional	83	
84	Protocolo de QT	Descrever	84	BL: 83 = 1
85	Início de QT	DD/MM/AAAA	85	BL: 83 = 1 / /
86	Término de QT	DD/MM/AAAA	86	BL: 83 = 1 / /
87	Número de ciclos	Descrever	87	BL: 83 = 1
93	Realizou outra linha?	0- Não; 1- Sim; 2- Tratamento investigacional	93	
94	Protocolo de QT 2ª linha	Descrever	94	BL: 93 = 1
95	Início de QT 2ª linha	DD/MM/AAAA	95	BL: 93 = 1 / /
96	Término de QT 2ª linha	DD/MM/AAAA	96	BL: 93 = 1 / /
97	Número de ciclos 2ª linha	Descrever	97	BL: 93 = 1
103	Realizou outra linha?	0- Não; 1- Sim; 2- Tratamento	103	

		investigacional		
104	Protocolo de QT 3ª linha	Descrever	104	BL: 103 = 1
105	Início de QT 3ª linha	DD/MM/AAAA	105	BL: 103 = 1 / /
106	Término de QT 3ª linha	DD/MM/AAAA	106	BL: 103 = 1 / /
142	Término do tratamento	DD/MM/AAAA	142	/ /
143	Linha de tratamento 1- 1ª; 2- 2ª; 3- 3ª; 4- 4ª; 5- 5ª; 6- 6ª; 7- Outra		143	
144	Se outra linha, descrever	Descrever	144	BL: 143 = 7
145	Número de ciclos realizados	Numero	145	
147	Regime de administração 1- Semanal; 2- Quinzenal; 3- Ambos		147	
148	Protocolo 1- Cetuximab + Irinotecano; 2- Cetuximab semanal; 3- Cetuximab quinzenal; 4-Cetuximab + CPT11 modificado; 5- Outro protocolo		148	
	Se outra protocolo, descrever	Descrever		
149	O Irinotecano foi suspenso em definitivo durante o tratamento	0- Não; 1- Sim	149	
150	Data do início da suspensão	DD/MM/AAAA	150	BL: 149 = 1 / /
151	Ciclo de suspensão	Descrever	151	BL: 149 = 1
152	Motivo da suspensão 1- Toxicidade; 2- Queda de performance; 3- Óbito por toxicidade; 4- Óbito por câncer; 5- Outros		152	BL: 149 = 1
153	O Irinotecano modificado foi suspenso em definitivo durante o tratamento	0- Não; 1- Sim	153	
154	Data da suspensão	DD/MM/AAAA	154	BL: 153 = 1 / /
155	Ciclo de suspensão	Descrever	155	BL: 153 = 1
156	Motivo da suspensão 1- Toxicidade; 2- Queda de performance; 3- Óbito por toxicidade; 4- Óbito por câncer; 5- Outros		156	BL: 153 = 1
157	Concluiu o tratamento proposto	0- Não; 1- Sim	157	
158	Motivo da suspensão 1- EA proibitivo; 2- Desejo por comorbidade; 3- Óbito por câncer; 4- Óbito por câncer; 5- Óbito por outras causas		158	BL: 157 = 0
159	Recebeu QT após finalização do Cetuximab	0- Não; 1- Sim; 2- Não aplicável	159	
160	Descreva esquema de QT recebida	Descrever	160	BL: 159 = 1
161	Início de QT recebida	DD/MM/AAAA	161	BL: 159 = 1 / /
162	Término de QT recebida	DD/MM/AAAA	162	BL: 159 = 1 / /
163	Cuidados paliativos após o fim de Cetuximab	0- Não; 1- Sim	163	

Melhor resposta ao

tratamento			
165	Melhor resposta ao tratamento 1- Doença estável; 2- Progressão; 3- Resposta parcial; 4- Resposta completa	165	
166	Resposta ao tratamento após quantos ciclos de QT Descrever	166	
167	Data da melhor resposta DD/MM/AAAA	167	/ /
168	Houve progressão de doença 0- Não; 1- Sim	168	
169	Data da progressão DD/MM/AAAA	169	BL: 172 = 1 / /
171	Progressão após quantos ciclos de QT Descrever	171	BL: 172 = 1
172	Progressão pós quantas aplicações Descrever	172	BL: 172 = 1
173	Sítio de progressão 1- Locorregional; 2- Hepático; 3- Pulmonar; 4- Pleural; 5- Linfonodo não regional; 6- Osso; 7- Peritônio; 8- SNC; 9- Subcutâneo; 10- Outros	173	[Checkbox]
174	Se outro sítio descreva Descrever	174	BL: 173 = 9
DADOS MOLECULARES			
175	KRAS 1- Mutado; 2- Não mutado; 3- Inconclusivo; 4- Não realizado	175	
176	NRAS 1- Mutado; 2- Não mutado; 3- Inconclusivo; 4- Não realizado	176	
177	Instabilidade de microssatélite de alta frequência (MSLH) 0- Não realizado; 1- Presente; 2- Ausente	177	
178	Instabilidade de microssatélite de baixa frequência (NSIL) 0- Não realizado; 1- Presente; 2- Ausente	178	
179	Estabilidade de microssatélite (MSS) 0- Não realizado; 1- Presente; 2- Ausente	179	
180	BRAF 1- Mutado; 2- Não mutado; 3- Inconclusivo; 4- Não realizado	180	
SOBREVIDA GLOBAL			
181	Status 1- Vivo com doença; 2- Vivo sem doença; 3- Óbito por câncer; 4- Perda de seguimento	181	
182	Houve óbito 0- Não; 1- Sim	182	
183	Data do óbito DD/MM/AAAA	183	BL: 182 = 1 / /
184	Houve perda de seguimento 0- Não; 1- Sim	184	
185	Data da última informação DD/MM/AAAA	185	BL: 184 = 1 / /