

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**Caracterização do perfil molecular e de expressão imuno-histoquímica no carcinoma colorretal de pacientes de um hospital do sul do Brasil**

**Gabriela Remonatto**

Porto Alegre, 2024

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**Caracterização do perfil molecular e de expressão imuno-histoquímica no carcinoma colorretal de pacientes de um hospital do sul do Brasil**

**Gabriela Remonatto**

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Maria Kliemann

Coorientadora: Dra. Emily Ferreira Salles Pilar

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### CIP - Catalogação na Publicação

Remonato , Gabriela

Caracterização do perfil molecular e de expressão imuno-histoquímica no carcinoma colorretal de pacientes de um hospital do sul do Brasil / Gabriela Remonato . -- 2024.

100 f.

Orientadora: Lúcia Maria Kliemann.

Coorientadora: Emily Ferreira Salles Pilar.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Carcinoma colorretal. 2. RAS. 3. BRAF. 4. NTRK. 5. Mismatch repair. I. Kliemann, Lúcia Maria, orient. II. Ferreira Salles Pilar, Emily, coorient. III. Título.

Gabriela Remonatto

**Caracterização do perfil molecular e de expressão imuno-histoquímica no carcinoma colorretal de pacientes de um hospital do sul do Brasil**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia.

Aprovado em: 11 de novembro de 2024.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Markus Berger Oliveira - UFRGS

Profa. Dra. Marcelle Reesink Cerski - UFRGS

Prof. Dr. Tiago Finger Andreis - H MV

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Professora Lúcia, pela orientação e todos os ensinamentos, sempre transmitidos através de incentivo, bom humor e alegria.

Ao Fundo de Incentivo e Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por propiciar os recursos necessários para o desenvolvimento deste estudo.

À minha amiga e co-orientadora, Dra. Emily Ferreira Salles Pilar, por contribuir com sua experiência, companheirismo, apoio e amizade, sendo uma referência para meu desenvolvimento na pesquisa.

À minha chefia, Dra. Francine Hehn de Oliveira, por autorizar os meus afastamentos da rotina de trabalho para a realização deste estudo.

Aos colegas de Hospital, Fernanda de Paris e Pedro Schaefer, pela ajuda, incentivo e amizade.

Aos colegas de laboratório, Luciana Adolfo Ferreira e Rovani Vinícius de Souza, pelo apoio quando precisei me afastar da rotina de trabalho.

Aos meus pais Ivor e Mari, por todo o amor e por sempre acreditarem no meu potencial. Este trabalho é um reflexo do suporte e da confiança que sempre recebi de vocês.

Ao meu esposo Edson e às minhas filhas Alice e Cecília, pelo total apoio e compreensão nos momentos em que eu precisei me ausentar para a realização deste trabalho. Amo vocês.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE QUADROS	11
RESUMO	12
SUMMARY	13
INTRODUÇÃO	14
BUSCA SISTEMATIZADA NA LITERATURA	16
1. Estratégias para localizar e selecionar as informações	16
2. Mapa conceitual	20
REVISÃO DA LITERATURA	21
Epidemiologia e fatores de risco	21
Classificação histopatológica e anatômica do carcinoma colorretal	22
Patologia molecular do carcinoma colorretal, prognóstico e tratamento	26
1. Status de RAS	32
2. Instabilidade de microssatélites (MSI) e Sistema Mismatch Repair (MMR)	34
3. Imunoterapia x Infiltrado linfocitário x PD1- PDL1	35
4. Status de BRAF	38
5. NTRK	39
Tratamento	42
JUSTIFICATIVA	43
HIPÓTESES	44
OBJETIVOS	45
1. Objetivo geral	45
2. Objetivos específicos	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ARTIGO 1	54
ARTIGO 2	67
CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
PERSPECTIVAS	86
APÊNDICES	87
Apêndice 1 - Checklist STROBE artigo Journal of Gastrointestinal Oncology	87
Apêndice 2 - Declaração LGPD	91
Apêndice 3 - Roteiro de ligação telefônica	92
Apêndice 4 - Autorização para acesso à planilha Medicina Personalizada	94
Apêndice 5 - Autorização para acesso à planilha da Imuno-histoquímica	95
Apêndice 6 - TCLE após ligação telefônica	96
Apêndice 7 - Fluxo de seleção dos participantes	99

ANEXO	100
Anexo 1 - Parecer consubstanciado do CEP	100

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

LILACS- Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde

GLOBOCAN - Global Cancer Observatory

INCA - Instituto Nacional do Câncer

CCR - Carcinoma Colorretal

EUA - Estados Unidos da América

TNM - Tumor, Nodes, Metastasis

UICC - Union for Internacional Cancer Control

PNI - Invasão perineural

SSP - Pólipo Serrilhado Sésil

CIN - Instabilidade Cromossômica

CIMP - Metilação das Ilhas CpG

MMR - Mismatch Repair

MSI - Instabilidade de Microsatélites

MSS - Microsatélites estável

CMS - Subtipos moleculares de consenso

CRIS - Subtipos colorretais intrínsecos

iCMS - Subtipos moleculares de consenso unicelular

PDS - Subtipo derivado de via

NCCN - National Comprehensive Cancer Network

ESMO - European Society for Medical Oncology

ASCO - American Society of Clinical Oncology

EGFR - Fator de crescimento epidérmico

PD-1 - Programmed cell death protein 1

PD-L1 - Programmed death-ligand 1



KRAS - Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

APC - Adenomatous polyposis coli

NTRK - Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase

BRAF - Oncogene viral de sarcoma murino v-raf homólogo B1

CAFs - Cancer-associated fibroblasts

TAMs - Tumor-associated macrophages

ECM - Extracellular matrix

TME - Tumor microenvironment

TILs - Tumor-infiltrating lymphocytes

NGS - Next generation sequencing

TP53 - Tumor supressor protein P53

PIK3CA - Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

MLH1 - MutL protein homolog 1

MSH2 - MutS protein homolog 2

POLE - DNA polimerase epsilon

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa conceitual	20
Figura 2. Tipos de lesões do cólon.	24
Figura 3. Diferenças no CCR em cólon do lado direito e lado esquerdo.	26
Figura 4. Principais vias moleculares no desenvolvimento do CCR .	27
Figura 5. Resumo dos sistemas de classificação da patologia molecular do CCR	31
Figura 6. A via EGFR	33
Figura 7. Gene KRAS e pontos de mutação.	34
Figura 8. Mecanismo de ação dos inibidores anti PD-1 ou PD-L1	38

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Busca sistemática no PubMed, Embase e LILACS

19

## RESUMO

**Introdução:** O carcinoma colorretal (CCR) está entre as formas de câncer mais diagnosticadas mundialmente. Nos últimos anos, diversas classificações moleculares foram desenvolvidas para entender melhor a complexidade do CCR. O contínuo refinamento dessas classificações, especialmente com o uso de tecnologias avançadas, é essencial para capturar a complexidade do CCR e melhorar as estratégias terapêuticas. O número crescente de novos marcadores moleculares no CCR, o desenvolvimento da imunoterapia e a aprovação de tratamentos agnósticos pelos órgãos reguladores, juntamente com a identificação de marcadores com valor prognóstico e preditivo desempenham hoje um importante papel no tratamento do CCR. **Objetivo:** avaliar o perfil de expressão de proteínas (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, NTRK), o perfil molecular (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*) e o infiltrado linfocitário do carcinoma colorretal em pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, investigando a associação destes achados com sexo e demais dados clínicos. **Métodos:** foram coletados no AGHUse, resultados da pesquisa por NGS de mutações nos genes *KRAS*, *NRAS* e *BRAF*, da pesquisa por imuno-histoquímica das proteínas do MMR e dados de prontuário. A expressão de NTRK foi avaliada por imuno-histoquímica e a avaliação do infiltrado linfocitário foi feita através de lâmina de H&E. **Resultados:** As mutações em *KRAS*, *NRAS* e *BRAF* mostraram prevalência variável, com destaque para a mutação *KRAS* G12C (6,6%). Cerca de 35% dos pacientes não apresentaram mutações nos genes estudados. A mutação *BRAF* V600E foi mais frequente em mulheres e em tumores do cólon direito. Houve associação entre dMMR, *BRAF* V600E e localização tumoral, sem diferenças significativas na análise de TILs. Apenas uma paciente apresentou fusão NTRK, refletindo sua baixa prevalência (<1%). **Conclusão:** este estudo contribuiu significativamente para o conhecimento do perfil molecular dos tumores colorretais em uma população específica de pacientes com carcinoma avançado, reforçando a importância da caracterização molecular e imuno-histoquímica detalhada para definição de prognóstico e tratamento.

**Palavras chave:** carcinoma colorretal, *RAS*, *BRAF*, NTRK, mismatch repair.

## SUMMARY

**Introduction:** Colorectal carcinoma (CRC) is among the most commonly diagnosed forms of cancer worldwide. In recent years, several molecular classifications have been developed to better understand the complexity of CRC. The continuous refinement of these classifications, especially with the use of advanced technologies, is essential to capture the complexity of CRC and improve therapeutic strategies. The growing number of new molecular markers, the development of immunotherapy and the approval of agnostic treatments by regulatory bodies, together with the identification of markers with prognostic and predictive value now play an important role in the treatment of CRC. **Objective:** To evaluate the protein expression profile (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, NTRK), the molecular profile (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*) and the lymphocyte infiltrate of colorectal carcinoma in patients treated at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, investigating the association of these findings with gender and other clinical data. **Methods:** Results of the RAS test (NGS search for mutations in the *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* genes), the IMUHI test for MMR (immunohistochemical search for MMR proteins) and medical record data (sex, age) were collected from AGHUse. The expression of NTRK was assessed by immunohistochemistry and the lymphocyte infiltrate was evaluated using an HE slide. **Results:** Mutations in *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* showed variable prevalence, with the *KRAS* G12C mutation standing out (6.6%). Around 35% of patients had no mutations in the genes studied. The *BRAF* V600E mutation was more frequent in women and in right colon tumors. There was an association between dMMR, *BRAF* V600E and tumor location, with no significant differences in the analysis of TILs. Only one patient had an NTRK fusion, reflecting its low prevalence (<1%). **Conclusion:** This study contributed significantly to the knowledge of the molecular profile of colorectal tumors in a specific population of patients with advanced carcinoma, reinforcing the importance of detailed molecular and immunohistochemical characterization for defining prognosis and treatment.

**Keywords:** colorectal carcinoma, *RAS*, *BRAF*, NTRK, mismatch repair.

## INTRODUÇÃO

O carcinoma colorretal (CCR) está entre as formas de câncer mais diagnosticadas mundialmente, sendo o segundo câncer mais frequente em mulheres e o terceiro em homens (1).

O desenvolvimento do CCR é um processo complexo, com várias etapas, que ocorre como resultado do acúmulo de diferentes alterações genéticas e epigenéticas que afetam o processo de regulação, controle da proliferação e diferenciação celular, apoptose e angiogênese (2).

Técnicas moleculares e estudos de farmacogenômica estão ajudando a desenvolver um número considerável de novas estratégias terapêuticas. Nos últimos 30 anos, tem havido um aumento no interesse em fatores prognósticos, clínicos e moleculares no carcinoma colorretal. A introdução de medicamentos direcionados molecularmente, como cetuximabe, panitumumabe e bevacizumabe, mudou os algoritmos de tratamento e a sobrevida dos pacientes com CCR (2,3). A compreensão molecular abrangente do CCR ofereceu aos médicos uma maior variedade de opções de tratamento com base na seleção de biomarcadores, e tem ampliado as opções terapêuticas para um número maior de pacientes (4).

Desde o final dos anos 1990, a sobrevida global mediana (OS) para pacientes com CCR metastático, aumentou de cerca de 12 meses em pacientes tratados com regimes quimioterápicos à base de 5-fluorouracil (5-FU), a aproximadamente 18 meses com a adição de irinotecano e oxaliplatina. Com a adição de medicamentos biológicos à quimioterapia, a sobrevida global aumentou para mais de 24 meses (3).

O número crescente de novos marcadores moleculares no CCR, o desenvolvimento da imunoterapia e a aprovação de tratamentos agnósticos pelos órgãos reguladores, está moldando um novo cenário para abordagens personalizadas mais eficientes para a gestão do CCR que inclui a seleção de terapia com foco no paciente.

As informações sobre a biologia do CCR, juntamente com a identificação de marcadores com valor prognóstico e preditivo desempenham hoje um importante

papel no tratamento de formas iniciais do CCR e na gestão da doença avançada, oferecendo novas ferramentas para estimar a possibilidade de cura e, de forma mais geral, o desfecho da doença no paciente.

## BUSCA SISTEMATIZADA NA LITERATURA

### 1. Estratégias para localizar e selecionar as informações

A busca de artigos para a revisão da literatura foi realizada no PubMed, Embase e LILACS com os seguintes termos:

Busca Pubmed:

Busca 1

("colorectal neoplasm\*" [Title/Abstract] OR "colorectal cancer\*" [Title/Abstract] OR "colorectal carcinoma\*" [Title/Abstract] OR "colorectal tumor\*" [Title/Abstract]) AND ("microsatellite instability\*" [Title/Abstract] OR "MMR" [Title/Abstract] OR "mismatch repair\*" [Title/Abstract]) AND ("PD-1" [Title/Abstract] OR "PD-L1" [Title/Abstract] OR "programmed cell death\*" [Title/Abstract]) AND "BRAF" [Title/Abstract] AND ("KRAS" [Title/Abstract] OR "NRAS" [Title/Abstract])

Busca 2

((("colorectal neoplasm\*" [Title/Abstract] OR "colorectal cancer\*" [Title/Abstract] OR "colorectal carcinoma\*" [Title/Abstract] OR "colorectal tumor\*" [Title/Abstract]) AND ("TRK" [Title/Abstract] OR "NTRK" [Title/Abstract])) AND (review [Filter] OR systematicreview [Filter]))

Busca 3

((("colorectal neoplasm\*" [Title/Abstract] OR "colorectal cancer\*" [Title/Abstract] OR "colorectal carcinoma\*" [Title/Abstract] OR "colorectal tumor\*" [Title/Abstract]) AND ("microsatellite instability\*" [Title/Abstract] OR "MMR" [Title/Abstract] OR "mismatch repair\*" [Title/Abstract]) AND ("PD-1" [Title/Abstract] OR "PD-L1" [Title/Abstract] OR "programmed cell death\*" [Title/Abstract]) AND "Immunotherapy" [Title/Abstract]) AND (review [Filter] OR systematicreview [Filter]))



## Busca 4

("colorectal neoplasm\*" [Title/Abstract] OR "colorectal cancer\*" [Title/Abstract] OR "colorectal carcinoma\*" [Title/Abstract] OR "colorectal tumor\*" [Title/Abstract]) AND ("tumor microenvironment\*" [Title/Abstract] OR "cancer microenvironment\*" [Title/Abstract]) AND ("microsatellite instability\*" [Title/Abstract] OR "MMR" [Title/Abstract] OR "mismatch repair\*" [Title/Abstract]) AND ("PD-1" [Title/Abstract] OR "PD-L1" [Title/Abstract] OR "programmed cell death\*" [Title/Abstract]) AND "BRAF" [Title/Abstract] AND ("KRAS" [Title/Abstract] OR "NRAS" [Title/Abstract]).

## Busca Embase:

## Busca 1:

('colorectal cancer'/exp OR 'colorectal cancer') AND ('pd l1 protein'/exp OR 'pd l1 protein') AND ('braf v600e gene'/exp OR 'braf v600e gene') AND ('kras gene'/exp OR 'kras gene') AND ('nras gene'/exp OR 'nras gene') AND ('mismatch repair'/exp OR 'mismatch repair').

## Busca 2:

'colorectal cancer' AND 'ntrk protein' AND 'ntrk'.

## Busca 3:

'colorectal cancer' AND 'programmed death 1 receptor' AND 'pd l1 protein' AND 'mismatch repair'

Busca 4:

'colorectal cancer' AND 'tumor microenvironment' AND 'braf gene' AND 'kras gene'  
AND 'nras gene' AND 'mismatch repair'

Busca LILACS

Busca 1:

(kras) AND (braf) AND (mmr) AND (colorectal) OR (colorretal)

Busca 2:

(ntrk) AND (colorectal) OR (colorretal)

Busca 3:

(mmr) AND (pd-I1) OR (immunotherapy) AND (colorectal) OR (colorretal)

Busca 4:

(tumor microenvironment) AND (colorectal) AND (kras) AND (braf) AND (pd-I1) AND  
(mmr)

Quadro 1. Busca sistemática no PubMed, Embase e LILACS

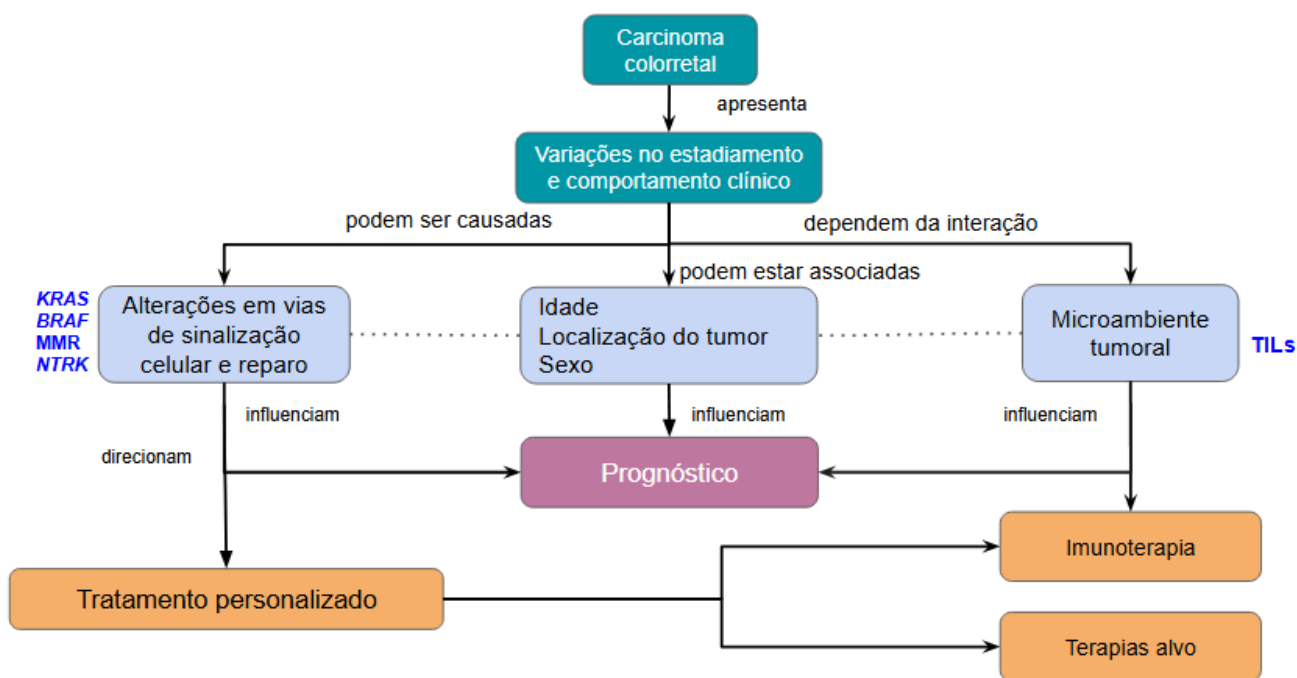
Busca	Termos relacionados	Número de artigos obtidos		
		Pubmed	Embase	LILACS
1	CCR, MMR, PD-L1, KRAS, NRAS, BRAF	23	0	2
2	CCR, NTRK	28	3	1
3	CCR, MMR, PD-1, PD-L1, Immunotherapy	65	3	3
4	CCR, tumor microenvironment, PD-1, PD-L1, BRAF, KRAS, NRAS	4	1	0

Foram incluídos 39 artigos na elaboração do projeto e também *webpages* do Instituto Nacional do Câncer (INCA), da *American Cancer Society* (ASCO), *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), e artigos sobre epidemiologia, fatores de risco, localização anatômica do tumor e classificação histopatológica do carcinoma colorretal.

Além desses, na elaboração da tese, foram buscados artigos que serviam de referência para as publicações consultadas e que foram necessários para elucidar pontos importantes que não estavam suficientemente explorados.

## 2. Mapa conceitual

O carcinoma colorretal apresenta variações no estadiamento e no comportamento clínico. Essas variações podem ser causadas pela presença de alterações em genes de vias de sinalização celular e podem estar associadas à idade do paciente, sexo, localização do tumor (cólono ascendente, cólon transversal, cólon descendente, sigmoide e reto) e a interação do tumor com o microambiente tumoral. As alterações genéticas detectadas no tumor, influenciam no prognóstico e direcionam o tratamento de maneira personalizada.



*KRAS*: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; *BRAF*: Oncogene viral de sarcoma murino v-raf homólogo B1; *MMR*: Mismatch Repair; *NTRK*: Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase; TILs: Tumor-infiltrating lymphocytes.

Figura 1. Mapa conceitual

## REVISÃO DA LITERATURA

### Epidemiologia e fatores de risco

Os carcinomas colorretais (CCR) são a terceira forma de câncer mais diagnosticada globalmente. De acordo com dados do Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) 2022, o câncer de cólon é o quarto mais incidente no mundo, e o câncer de reto ocupa a oitava posição (5,6).

No Brasil, em 2023, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), estimava-se que o carcinoma colorretal (CCR) seria o segundo câncer em novos casos diagnosticados entre homens (9,2%) e mulheres (9,7%). Para cada ano do triênio de 2023-2025, estimou-se 21.970 casos de CCR em homens e 23.660 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 20,78 casos novos a cada 100 mil homens e 21,41 para cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CCR em homens é o terceiro mais incidente na Região Sul (26,89/100 mil). Para as mulheres, é o segundo mais frequente na Região Sul (26,04 /100 mil). No Rio Grande do Sul, a estimativa para 2023 era de 26,85 casos para cada 100 mil homens e 27,15 casos para cada 100 mil mulheres (7).

O CCR é entre 3 a 4 vezes mais comum em países desenvolvidos. Nos EUA, é o terceiro câncer mais frequentemente diagnosticado, com um número estimado de 145.290 novos casos no início de 2004 (8). Na Europa, o carcinoma colorretal é a terceira causa de mortes por carcinoma em mulheres (9).

As taxas mais altas de incidência estão na Austrália e Nova Zelândia, enquanto as mais baixas estão na África Ocidental. Embora a incidência seja maior nos países desenvolvidos, nesses países a mortalidade é consideravelmente menor (694.000 mortes em ambos os sexos, 8,5% do total). O número maior de óbitos decorrentes da doença (52%) ocorre em regiões menos desenvolvidas do mundo, refletindo um pior prognóstico nessas regiões (10).

A incidência aumenta com a idade e, atualmente, mais de 80% dos novos casos são diagnosticados em indivíduos com 55 anos ou mais. A incidência e mortalidade de carcinoma colorretal em populações com mais de 65 anos, são mais elevadas nas mulheres do que nos homens.

A grande maioria dos CCR se desenvolve esporadicamente, e a maioria surge de lesões precursoras como o adenoma, transformando-se em adenocarcinoma (11).

A possibilidade de desenvolver CCR está em torno de 5% e tem sido associada a hábitos alimentares, estilo de vida e fenótipo. Os hábitos alimentares e estilo de vida podem induzir inflamação intestinal e alterações na microflora intestinal facilitando o crescimento do pólipó através de uma resposta imune. A hiperproliferação e, finalmente, a carcinogênese podem se desenvolver por mutações espontâneas ou hereditárias em genes supressores de tumor e oncogenes (12).

#### Classificação histopatológica e anatômica do carcinoma colorretal

Os carcinomas colorretais são classificados de acordo com a classificação TNM (*"Tumor"*, *"Nodes"*, *"Metastasis"*) da UICC (*Union for International Cancer Control*): profundidade da invasão local (estágio T), envolvimento dos linfonodos (estágio N) e presença de metástases à distância (estágio M). Esses estágios são combinados em uma definição de estágio geral, que fornece a base para decisões terapêuticas (13).

Embora a classificação TNM forneça valiosas informações prognósticas e de decisões terapêuticas, a resposta e o resultado individual da terapia ainda não pode ser previsto (14).

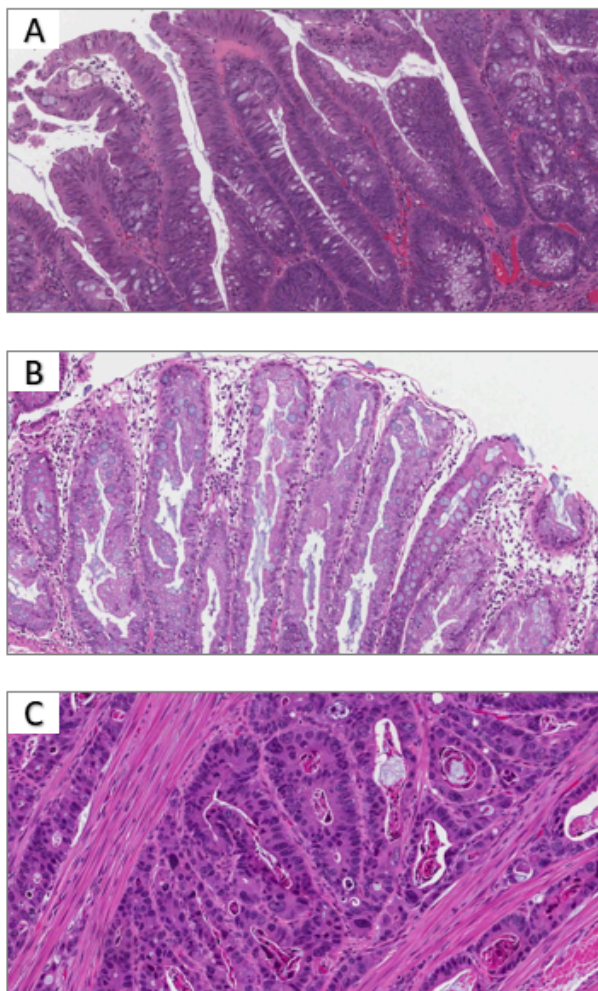
No estadiamento patológico, os seguintes parâmetros devem ser reportados: grau histológico; extensão tumoral (profundidade de penetração); número de

linfonodos avaliados e número de positivos; status das margens proximal, distal, radial e mesentérica; invasão linfovascular; invasão perineural (PNI) e brotamento tumoral (15).

A carcinogênese colorretal classicamente é descrita como a sequência adenoma-adenocarcinoma, impulsionada pelo acúmulo progressivo de várias mutações críticas. Neste modelo, o pólipso adenomatoso (ou adenoma) é o principal precursor do carcinoma colorretal. Cerca de 90% dos carcinomas colorretais são adenocarcinomas e os subtipos incluem anel medular, micropapilar, mucinoso, serrilhado e célula em anel de sinete (16–18). Adicionalmente, o pólipso serrilhado também foi reconhecido como lesão precursora alternativa do carcinoma colorretal, causando os adenocarcinomas serrilhados que representam cerca de 10% de todos os CCRs (16,17,19). Felizmente, apenas uma pequena porcentagem de pólipos adquirem características malignas, e até mesmo para aqueles que o fazem, a progressão completa de pólipos para câncer geralmente pode levar vários anos ou mesmo uma década (20).

Existem dois tipos principais de pólipos com potencial de se tornarem malignos: adenomas e pólipos serrilhados sésseis (SSPs), cada um associado a diferentes riscos para o desenvolvimento em CCR. Em geral, a maioria dos adenomas tem histologia tubular com glândulas pequenas, arredondadas e atípicas, mas muitas vezes desenvolvem áreas de arquitetura filamentosa à medida que crescem, descritos como vilosos ou tubulovilosos. Por definição, adenomas são caracterizados por displasia (baixo ou alto grau de atipia celular e estrutural) (17,21).

Adenomas tubulovilosos e vilosos, especialmente aqueles com mais de 25% de conteúdo viloso, são normalmente maiores em tamanho e têm um maior potencial para conter células malignas. Em contraste, os SSPs são planos e semelhantes a carpete, com glândulas serrilhadas ou dentadas. SSPs incluem adenomas sésseis serrilhados, adenomas serrilhados tradicionais e pólipos mistos, todos associados ao desenvolvimento de CCR (Figura 2) (17,21).



A: Adenoma tubuloviloso; B: Lesão séssil serrilhada; C: Adenocarcinoma de cólon

Figura 2. Tipos de lesões do cólon.

Disponível em: <https://www.pathologyatlas.ca/galleries/digestive-system/>

Embora apenas cerca de 10% da maioria dos adenomas avançados tornem-se cancerosos, 60% a 70% dos CCRs desenvolvem-se de adenomas. Os restantes, 25% a 35% dos CCRs desenvolvem de SSPs (17,22,23).

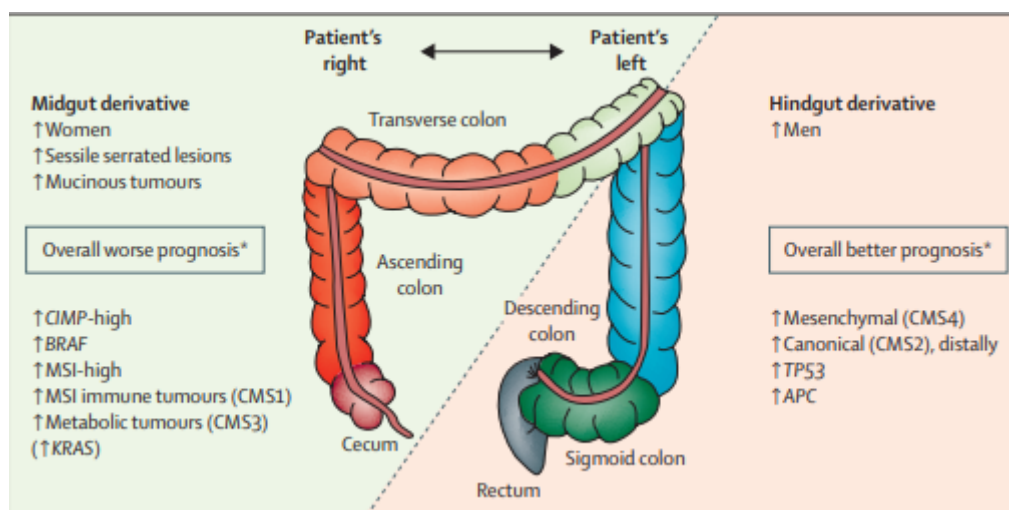
Os pólipos podem se desenvolver ao longo de todo o comprimento do cólon e reto, no entanto, pólipos que se desenvolvem na região proximal (lado direito) do



cólon, que inclui o ceco até o cólon transversal incluindo a flexura esplênica, representam 42% de todos os CCRs nos EUA (24). Os pólipos proximais são frequentemente do tipo SSP e podem ser difíceis de detectar, pois são frequentemente achatados ou deprimidos e podem não sangrar ou ulcerar (21).

Com a proliferação das células dentro do pólipo, o tamanho do pólipo aumenta, mutações genéticas e mudanças epigenéticas podem começar a acumular, refletindo em displasia celular e histológica. À medida que o dano ao DNA celular aumenta com o tempo, as características de displasia de alto grau podem se desenvolver, resultando em alto risco de progressão ao carcinoma invasivo (25).

As características moleculares do CCR em cólon direito e esquerdo são distintas (Figura 3). O cólon direito se estende do ceco até o cólon transversal. O cólon esquerdo se estende do cólon transversal distal ao reto. Os tumores do cólon esquerdo (cólon descendente, sigmoide e reto) geralmente são microssatélites estáveis (MSS), mas carregam mutações em *KRAS* (26). Por outro lado, os tumores localizados no cólon direito são ricos em instabilidade de microssatélites (MSI) e mutações no gene *BRAF* (27,28). O impacto do lado da localização do tumor no resultado clínico no CCR foi investigado em vários estágios do CCR. Estudos mostraram diferenças na prevalência, taxas de mortalidade e sobrevivência de pacientes com tumores situados no cólon esquerdo ou direito. (29–31).



CIMP: Metilação das Ilhas CpG; *BRAF*: Oncogene viral de sarcoma murino v-raf homólogo B1; MSI: Instabilidade de Microsatélites; CMS - Subtipos moleculares de consenso; *KRAS*: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; TP53: tumor suppressor protein P53; APC: Adenomatous polyposis coli.

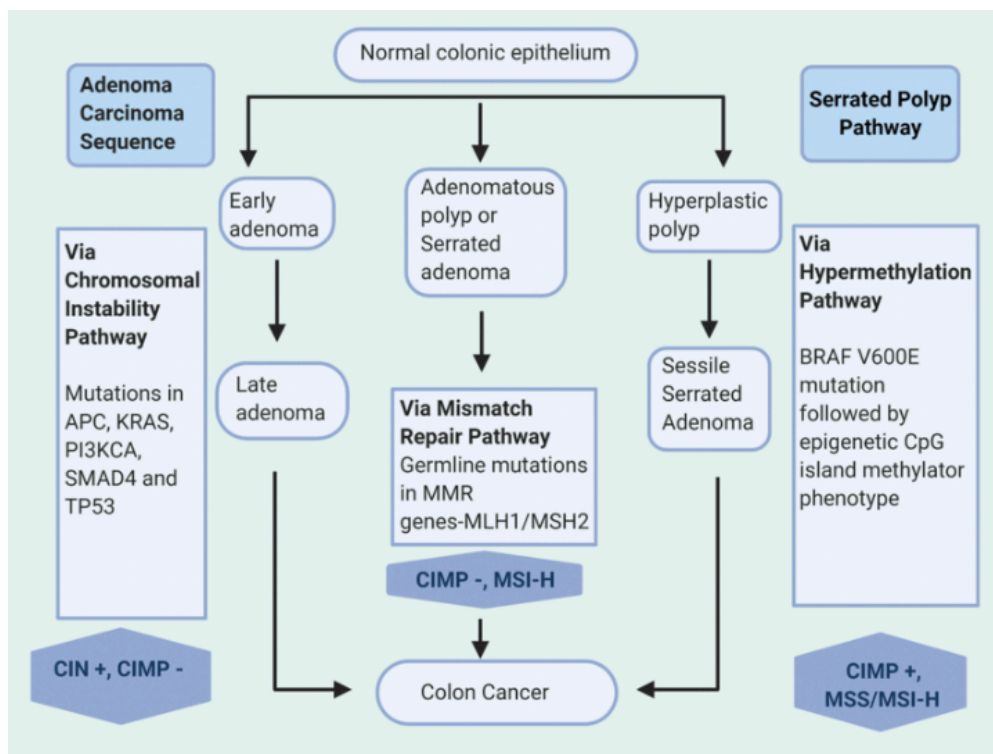
Figura 3. Diferenças no CCR em cólon do lado direito e lado esquerdo.

Disponível em: Dekker et al.2019 (32)

### Patologia molecular do carcinoma colorretal, prognóstico e tratamento

A introdução de políticas de triagem populacional para o carcinoma colorretal tem aumentado a compreensão das lesões neoplásicas precursoras e das vias moleculares associadas a cada tipo de tumor.

Em nível genômico, apesar de uma gama muito vasta de alterações genéticas individuais, o CCR apresenta dois mecanismos principais de instabilidade genômica (Figura 4) . Esse modelo de classificação de tumores baseado em alterações no DNA, distingue duas categorias principais: CIN (Instabilidade Cromossômica) e MSI (Instabilidade de Microsatélites)(33,34).



APC: Adenomatous polyposis coli; *KRAS*: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; PI3KCA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; SMAD4: Mothers against decapentaplegic homolog 4 gene; TP53: tumor suppressor protein P53; CIN: Instabilidade Cromossômica; CIMP: Metilação das Ilhas CpG; MMR: Mismatch Repair; MLH1: MutL protein homolog 1; MSH2 - MutS protein homolog 2; *BRAF V600E*: Mutação V600E Gene *BRAF*; MSI-H: Alta Instabilidade de Microssatélites; MSS - Microssatélites estável.

Figura 4. Principais vias moleculares no desenvolvimento do CCR .

Disponível em: Kasi et al. 2020 (35).

Para tumores com instabilidade cromossômica (CIN) descreve-se o acúmulo de mutações em oncogenes e genes supressores de tumores, incluindo *APC*, *TP53* e *KRAS*. Esta via é caracterizada por um desequilíbrio no número de cromossomos, resultado de perdas ou ganhos de porções cromossômicas, por alterações em proteínas de pontos de verificação mitóticos (36). De acordo com o modelo clássico de instabilidade cromossômica descrito por Vogelstein (18,37), a inativação do gene *APC* ocorre primeiro nos epitélios hiper proliferativos, seguida por mutações oncogênicas, mais comumente *KRAS* e, eventualmente, alterações cromossômicas e inativação do gene supressor de tumor, *TP53* (34). Tumores com instabilidade

cromossômica (CIN) compreendem 85% dos CCRs e são um grupo heterogêneo. Porém, de uma maneira geral tumores com CIN são diagnosticados principalmente no cólon esquerdo e reto e seu microambiente é pouco imunogênico ou inflamado, com acentuada infiltração estromal (38).

Já os tumores que apresentam instabilidade de microssatélites (*Microsatellite Instability* - MSI) representam cerca de 15% dos CCRs e são caracterizados por instabilidade em sequências do DNA conhecidas como microssatélites. Esta instabilidade tem origem em mutações nos genes do MMR (*Mismatch Repair*) - *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* ou silenciamento do promotor de *MLH1* por hipermetilação (34). Isso porque as proteínas do complexo MMR têm função de reparo, corrigindo pareamentos errôneos ocorridos após a replicação do DNA. Portanto, a perda de função destas proteínas leva a um acúmulo de erros que é refletido na instabilidade de microssatélites. Tumores com MSI tendem a surgir na região proximal do cólon, exibir pouca diferenciação, células mucinosas e infiltração linfocítica proeminente (34,39). Além disso, o CCR MSI apresenta frequentemente um fenótipo de metilação das ilhas CpG (CIMP), caracterizada por hipermetilação de ilhas CpG e, conseqüente inativação de genes supressores tumorais. A via CIMP é responsável por cerca de 17% dos CCRs. Embora as vias CIN e MSI sejam geralmente exclusivas, a via CIMP se sobrepõe substancialmente à via MSI. De fato, os CCRs MSI esporádicos são quase exclusivamente associados à metilação do promotor do gene *MLH1* (rico em sequências CpG) (40). Ainda, os tumores da via CIMP demonstram representar um subconjunto com alta frequência de mutações no gene *BRAF* (34,41). A via CIMP tem uma forte associação com a neoplasia serrilhada. A localização anatômica destes tumores tende a ser no cólon proximal e eles são mais comuns em indivíduos com maior idade, do sexo feminino (34).

O modelo baseado em alterações no DNA é capaz de separar grupos tumorais distintos, identificados por suas características de mutações e alterações no número de cópias. Contudo, há uma crescente percepção de que, mesmo dentro dessas categorias bem definidas, existe uma heterogeneidade significativa entre os tumores. Esse fenômeno de heterogeneidade tumoral tem sido o foco de diversas pesquisas recentes, cada uma propondo novos modelos de classificação. Esses

novos modelos buscam capturar com maior precisão os sinais transcricionais e os fenótipos clínicos associados a esses tumores, refletindo a complexidade e variabilidade existentes dentro das categorias CIN e MSI (33).

Um dos principais objetivos da subtipagem molecular é a geração de biomarcadores moleculares no câncer que podem ser usados para estratificar tumores de acordo com grupos de risco clínico ou subtipos biológicos, que por sua vez fornecem melhor compreensão das cascatas de sinalização que sustentam o desenvolvimento do tumor e resposta ao tratamento (33).

O primeiro modelo de classificação molecular do CCR utilizou dados multi-ômicos (mutacionais, epigenéticos, de mRNA e miRNA) e foi publicado em 2012 como parte do projeto The Cancer Genome Atlas (TCGA). Esse modelo identificou subtipos moleculares que se alinham com os conceitos de Instabilidade Cromossômica (CIN) e Instabilidade de Microssatélites (MSI), e também forneceu uma sub estratificação do grupo MSI com base na carga mutacional. Nesse modelo, o CCR foi dividido em dois grupos principais: cânceres hiper mutados, que apresentam MSI devido a defeitos no sistema MMR (dMMR) e cânceres ultra mutados, que possuem mutações no domínio exonuclease da DNA polimerase epsilon (POLE), que inativam a função de revisão do DNA (28,33). Por outro lado, os CCR com taxas de mutação mais baixas, que não são hiper mutados e são microssatélites estáveis (MSS), apresentam frequentemente mutações ou deleções em genes como *APC*, *TP53*, *KRAS*, *PIK3CA* e *SMAD4*, além de uma alta frequência de alterações no número de cópias somáticas do DNA, alterações típicas da via CIN.

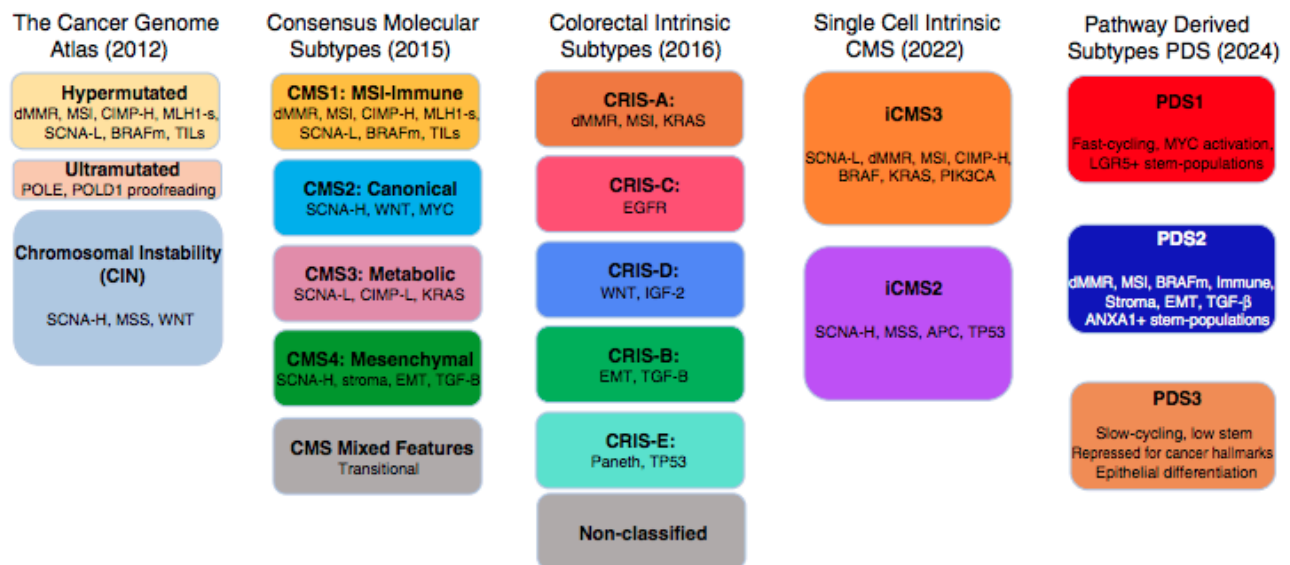
Nos anos seguintes, até os dias de hoje, foram desenvolvidas diferentes classificações do CCR. A classificação CMS (subtipos moleculares de consenso) subdividiu os subtipos moleculares em 4 subtipos moleculares de consenso com base em dados de sequência de RNA em massa: CMS1 (MSI imune), CMS2 (canônico), CMS3 (metabólico) e CMS4 (mesenquimal) (42), mas nesta classificação foi identificada a influência do microambiente tumoral nesta classificação.

Na tentativa de remover a influência do microambiente tumoral e revelar características transcricionais específicas da neoplasia, os subtipos intrínsecos (CRIS) foram desenvolvidos. A abordagem CRIS identificou cinco novos subtipos, CRIS-A a CRIS-E (43).

À medida que o sequenciamento *single cell* se tornou mais rotineiro em estudos de perfil tumoral, o surgimento da classificação molecular a partir desses tipos de dados teve o potencial de refinar as classificações provenientes de dados tumorais em massa. Usando dados derivados de aproximadamente 50.000 células epiteliais, Joanito et al. desenvolveram o modelo de classificação CMS intrínseco unicelular (iCMS), que identificou duas classes epiteliais com expressão gênica, atividade de fator de transcrição e perfis genômicos distintos (44).

Em 2024, Dunne e Arends propuseram a abordagem de classificação em nível de via de sinalização, subdividindo os tumores em três grupos *Pathway Derived*: PDS1 a PDS3 (33).

Um diagrama que resume os sistemas de classificação pode ser visto na Figura 5.



dMMR: Deficient Mismatch repair; MSI: Instabilidade de Microssatélites; CIMP: Metilação das Ilhas CpG; MLH1: MutL protein homolog 1; POLE: DNA polymerase epsilon; POLD: DNA polymerase D; SCNA: DNA somatic copy number alterations; *BRAF*: Oncogene viral de sarcoma murino v-raf homólogo B1; MSS: Microssatélites estável; TILs: tumor infiltrating lymphocytes; CMS: Consensus Molecular Subtypes; *KRAS*: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; CRIS: Colorectal Intrinsic Subtypes; IGF-2: Insulin-like growth factor 2; EGFR: epidermal growth factor receptor; EMT: epithelial-mesenchymal transition; TGF- $\beta$ : Growth transformation factor beta; CMS: Single Cell Intrinsic; PIK3CA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; APC: Adenomatous polyposis coli; TP53: tumor supressor protein P53; PDS: Pathway Derived Subtypes; MYC: MYC oncogene, ANXA1: anexin A1 gene.

Figura 5. Resumo dos sistemas de classificação da patologia molecular do CCR

Disponível em: Dunne and Arends, 2024 (33).

Tendo em vista o conhecimento dos mecanismos moleculares da carcinogênese colorretal, pode-se dizer que o prognóstico e tratamento do paciente é determinado por um conjunto de fatores que incluem atualmente os biomarcadores moleculares além dos fatores mais tradicionalmente estudados como a localização do tumor (côlon, junção retossigmoide ou reto), subtipo histológico e estágio TNM.

Atualmente, uma das análises moleculares do CCR é a determinação do status de MMR proficiente ou deficiente, principalmente por imuno-histoquímica, usando a abordagem de 4 anticorpos. Alguns laboratórios realizam testes MSI no DNA do tumor, como alternativa à imuno-histoquímica para MMR, ou em

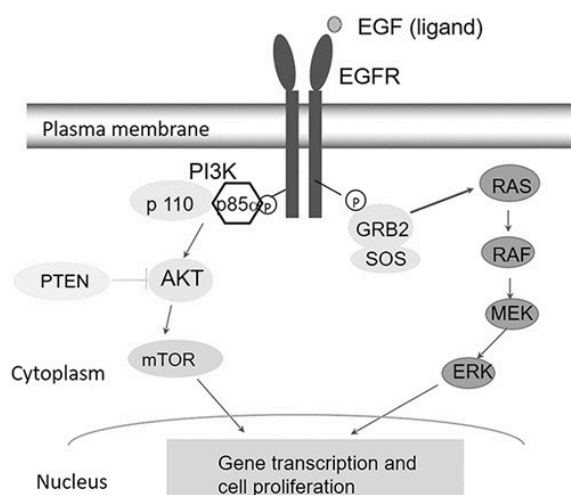
combinação com ela para resolver discrepâncias de coloração. Para CCR metastático, a análise mutacional dos genes *RAS* e *BRAF* deve ser realizada. CCR com a substituição V600E no gene *BRAF* pode apresentar comportamento agressivo e pode ser tratado com inibição combinada de *BRAF* e EGFR. Alterações de uma série de genes críticos no desenvolvimento e progressão dos CCR, como dMMR e mutação em *BRAF* demonstraram ter influência no prognóstico (45).

*Guidelines* de entidades como NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*), ESMO (*European Society for Medical Oncology*) e ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) recomendam a testagem de mutações nos genes *KRAS*, *NRAS* E *BRAF* pela técnica de sequenciamento e a detecção de instabilidade de microssatélites MSI (expressão de MMR) por imuno-histoquímica (15).

## 1. Status de RAS

A via de sinalização através do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) desempenha um papel importante no CCR (Figura 6). As proteínas RAS pertencem a uma superfamília de pequenas GTPases que regulam as vias fundamentais de sinalização intracelular envolvidas na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (46). O fator de troca de nucleotídeo Grb2-Sos faz com que o RAS normal mude para seu estado ativo ligado ao GTP, após a ativação de receptores de membrana como o EGFR (47). A ativação de RAS na cascata de sinalização da MAP quinase constitui parte dos eventos primários na carcinogênese colorretal. Anticorpos monoclonais anti-EGFR, como cetuximabe e panitumumabe, mostraram se ligar ao domínio extracelular de EGFR e bloquear a sinalização da via *downstream* RAS /RAF /MEK /ERK. No entanto, se uma molécula de sinalização *downstream* sofrer mutação, o anticorpo anti-EGFR não poderá bloquear a via, resultando em resistência (34).





EGFR: Epidermal growth factor receptor; PI3K: Phosphoinositide 3-kinase; AKT: serine/threonine kinase; mTOR: Mammalian target of rapamycin; RAS: Rat sarcoma viral oncogene homolog; RAF: Oncogene viral de sarcoma murino; MEK: mitogen-activated protein kinase/ERK kinase; ERK: extracellular-signal-regulated kinase.

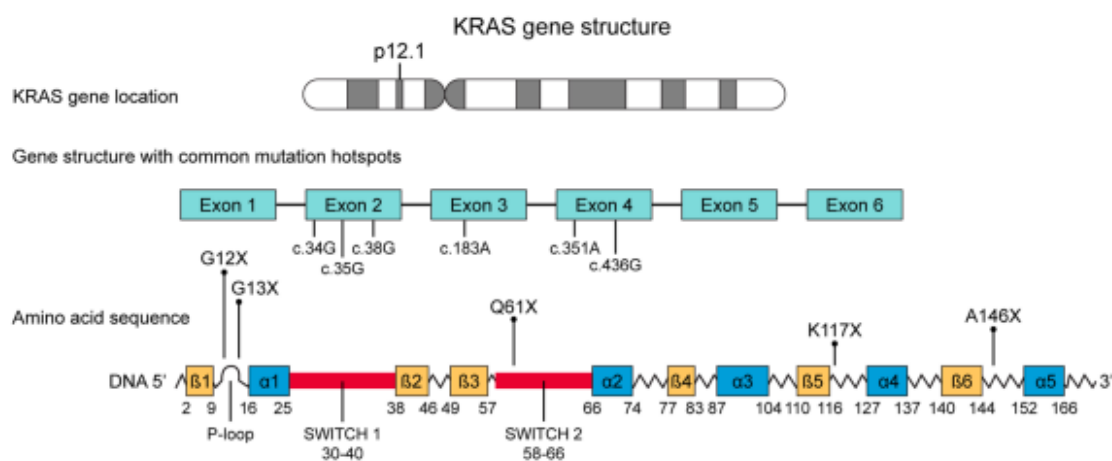
Figura 6. A via EGFR

Disponível em: Harada and Morlote (2019)(34)

Mutações de ativação no gene *KRAS* são observadas em 30% a 50% dos CCR (34). O status mutacional de *RAS* (*KRAS* e *NRAS*) é um marcador preditivo para decisões terapêuticas envolvendo terapias cujo alvo seja o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) em CCR metastático. A testagem deve ser obrigatoriamente realizada antes do tratamento com os anticorpos monoclonais direcionados ao domínio extracelular do EGFR, cetuximabe e panitumumabe, e deve incluir os éxons 2, 3 and 4 de *KRAS* (códon 12, 13, 59, 61, 117 e 146) e os éxons 2, 3 e 4 (códon 12, 13, 59, 61 e 117) de *NRAS* (48,49). O método padrão para o teste é o sequenciamento de nova geração (NGS) (15).

A mutação *KRAS* G12C (c.34G>T no éxon 2), que representa a substituição de uma glicina por uma cisteína no códon 12, ocorre em cerca de 14% dos pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células e em 3-5% dos CCRs (50,51). Os primeiros inibidores seletivos de *KRAS* G12C a obterem sucesso em ensaios clínicos foram o sotorasibe e adagrasibe, que são inibidores potentes e

irreversíveis da isoforma mutante KRAS G12C, disponíveis por via oral, para o tratamento de tumores sólidos com a mutação oncogênica KRAS G12C, incluindo o câncer do pulmão de células não pequenas (NSCLC) e o câncer colorretal (CCR) (52–55). No ano de 2022 o FDA aprovou a molécula adagrasibe (Krazati, Mirati Therapeutics, Inc.) (56). Em 2023 a Anvisa aprovou o sotorasibe (LUMAKRAS, Amgen Biotecnologia do Brasil Ltda.), para utilização em câncer de pulmão não de pequenas células(57).



KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog.

Figura 7. Gene *KRAS* e pontos de mutação.

Disponível em: Parikh et al.2022 (58).

## 2. Instabilidade de microssatélites (MSI) e Sistema *Mismatch Repair* (MMR)

Microssatélites são pequenas sequências repetidas de DNA distribuídas por todo o genoma humano, tanto em regiões codificantes, como não codificantes. Devido à sua estrutura de sequências repetidas, os microssatélites são propensos a erros de replicação do DNA, que são normalmente reparados pelo sistema *Mismatch Repair* (MMR)(59).

O sistema MMR de reparo de DNA é um processo celular altamente conservado, que envolve diversas proteínas, resultando na identificação e posterior reparo de bases incompatíveis, que tenham surgido durante a replicação do DNA, recombinação ou dano químico ou físico. As proteínas do sistema MMR incluem MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, MLH3, MSH3, PMS1 e Exo1, que formam heterodímeros para realizarem o reparo do DNA. Durante o processo normal de replicação do DNA, pequenos erros são detectados e vinculados aos dímeros MSH2/MSH6, enquanto os dímeros MLH1/PMS2 são subsequentemente recrutados para a excisão e ressíntese de uma nova fita corrigida (60). O sistema MMR deficiente (dMMR) resulta em um fenótipo de instabilidade de microssatélites (MSI). MSI é reconhecida como uma das principais vias carcinogênicas do carcinoma colorretal: representa uma marca molecular da Síndrome de Lynch, geralmente ligada a uma mutação da linhagem germinativa em um dos genes MMR; além disso, é detectado em cerca de 15% dos carcinomas colorretais esporádicos (59,61,62), mais frequentemente devido a inativação epigenética de MLH1 (59,63).

O status do sistema MMR (*Mismatch repair*) de reparo do DNA pode ter valor preditivo em alguns contextos clínicos. Dados recentes de biomarcadores moleculares mostraram a importância dos testes de instabilidade de microssatélites, um marcador de deficiência no sistema de reparo MMR (dMMR), para seleção de pacientes para imunoterapia com inibidores de *checkpoint* imunológico que exploram a via PD1/PD-L1 e CTLA-4. A testagem de MMR é recomendada para todos os pacientes que tenham histórico de carcinoma de cólon ou retal (15). Neste contexto, a imuno-histoquímica detecta a expressão das proteínas do sistema MMR (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6).

### 3. Imunoterapia x Infiltrado linfocitário x PD1- PDL1

As células neoplásicas têm sido o foco central da pesquisa em câncer durante décadas, pois permitem que os tumores cresçam e sobrevivam de forma autônoma. No entanto, as células malignas por si só, estão longe de ser o quadro completo,

pois células malignas e não malignas cooperam para promover o crescimento tumoral, resistir à morte celular, induzir angiogênese, invadir tecidos e formar metástases, evitando a vigilância do sistema imunológico. As células não malignas são recrutadas de dentro do tecido do estroma e, de outra forma, agiram para inibir o desenvolvimento do câncer. As células-chave do estroma incluem fibroblastos associados ao câncer (CAFs), macrófagos associados a tumores (TAMs) e células endoteliais vasculares. Essas células interagem entre si e com a matriz extracelular (ECM) em uma zona conhecida como microambiente tumoral (TME) (64), (65).

O microambiente tumoral possui relevância clínica, pois pode afetar o prognóstico de um paciente com câncer e potencialmente conferir resistência aos medicamentos, resultando em potencial recidiva e metástase (64).

Atualmente, a imunoterapia vem se tornando uma importante ferramenta de tratamento dos CCR, além disso, foi demonstrado que o microambiente tumoral está envolvido no surgimento e na progressão do tumor (38).

A presença de linfócitos infiltrando o tumor (TILs) desempenha um papel relevante na morte das células neoplásicas na imunoterapia. As interações entre vários componentes do microambiente imune tumoral, mediam a execução da resposta imune, estando intimamente relacionado a um prognóstico favorável no CCR, principalmente quando correlacionados a alta intensidade de TILs em alguns sítios anatômicos em especial (66).

Dados da literatura associam a presença e a intensidade de TILs a uma deficiência no sistema de reparo de incompatibilidade (MMR), devido à maior expressão de neo-antígenos causados por erros de replicação de DNA não corrigidos (67,68).

O ligante de morte programada (PD-L1) é uma proteína transmembrana localizada principalmente em células neoplásicas, incluindo carcinoma de mama, colorretal, gástrico e de pulmão. PD-L1 liga-se ao receptor PD-1 expresso nos linfócitos T para inibir a ativação dos linfócitos T, permitindo que as células tumorais escapem da vigilância imunológica, levando ao crescimento do tumor e ao mau

prognóstico dos pacientes com câncer. As células T inativadas permanecem inibidas no microambiente tumoral (39).

A via PD-1 / PD-L1 representa um mecanismo de resistência imunológica adaptativa exercido por células tumorais em resposta à atividade antitumoral imune endógena. Imunoterapia com Inibidores direcionados à morte programada PD-1 /PD-L1 têm sido amplamente utilizada no tratamento clínico de uma variedade de tumores sólidos nos últimos anos (69).

Terapias com anticorpos monoclonais explorando a ligação PD-1 e PD-L1 usadas rotineiramente incluem os seguintes medicamentos:

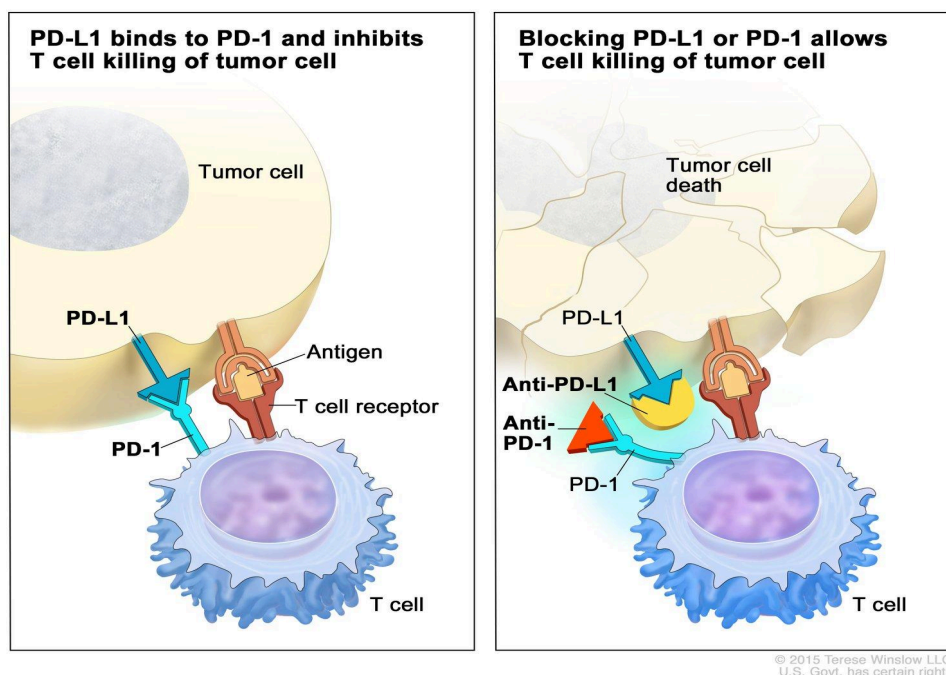
Pembrolizumabe (Keytruda®), desenvolvido Merck Sharp & Dohme, é um anticorpo monoclonal humanizado, desenhado para bloquear a interação entre a PD1 e os seus ligantes, PD-L1 e PD-L2. Em agosto de 2021, foi aprovado pela Anvisa para o tratamento de carcinoma colorretal metastático com deficiência na expressão das proteínas do MMR (70).

Nivolumabe (Opdivo®), um anticorpo monoclonal totalmente humano (HuMAb) que se liga ao receptor de morte programada 1 (PD-1) e bloqueia sua interação com PD-L1 e PD-L2, desenvolvido pela Bristol-Myers Squibb (71).

Atezolizumabe (Tecentriq®), da indústria farmacêutica Roche, é um anticorpo monoclonal de imunoglobulina G1 (IgG1) humanizado, que se liga diretamente ao PD-L1 e promove um bloqueio duplo dos receptores PD-1 e B7.1, gerando a inibição mediada pela via PD-L1/PD-1 da resposta imune (72).

Avelumabe (Bavencio®) da Merck, é um anticorpo monoclonal IgG1 (imunoglobulina humana G1) completamente humano que age contra o ligante de morte celular programada 1 (PD-L1) (73) .

Durvalumabe (Imfinzi®), da AstraZeneca é um anticorpo monoclonal 100% humano de alta afinidade (imunoglobulina G1 kappa [IgG1κ]) que bloqueia seletivamente a interação de PD-L1 com PD-1 e CD80 (B7.1) ao mesmo tempo em que deixa intacta a interação de PD-1/PD-L2 (74).



PD-1: Programmed cell death protein 1; PD-L1: Programmed death-ligand 1.

Figura 8. Mecanismo de ação dos inibidores de *checkpoint* imunológico anti PD-1 ou PD-L1.

Disponível em: <https://www.teresewinslow.com/cellular-scientific/t3bw66vzpmba0ma5gpgmvvwkxsuuy1>

#### 4. Status de *BRAF*

A via MAPK/ERK é uma cascata de quinases conservada, envolvida na regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular em resposta à sinalização extracelular.

Os genes *RAF* são membros da via MAPK, codificando quinases de serina/treonina que integram os sinais *upstream*. Uma vez recrutado na membrana celular por RAS carregado com GTP, RAF é ativada e subsequentemente fosforila as quinases *downstream*, MEKs, que induzem a ativação transcricional dos genes alvo (Figura 6) (47,63).

O mais potente ativador da MAP/ ERK quinase (MEK) é o oncogene viral de sarcoma murino v-raf homólogo B1 (*BRAF*)(75). A mutação predominante no gene *BRAF* envolve uma troca de timidina para adenosina no nucleotídeo 1.799, sendo responsável por mais de 90% das mutações observadas em *BRAF*. Isso resulta em uma mutação de ativação, devido à substituição de valina por ácido glutâmico no aminoácido 600, a mutação V600E (75).

O gene *BRAF* está mutado em uma ampla gama de cânceres, incluindo 40% a 70% dos melanomas malignos, cerca 45% do câncer papilar de tireoide e 10% dos carcinomas colorretais (76) e a mutação está localizada no domínio quinase, região 3 do exon 15 (77).

A mutação *BRAF* V600E é quase exclusivamente observada em tumores MSI esporádicos que se presume se desenvolverem através da via tumorigênica serrilhada, sendo raramente descrita na síndrome de Lynch (78). A mutação ativadora do gene *BRAF* está associada a um elevado nível de metilação global do DNA e ao silenciamento epigenético do gene *MLH1* (79).

A análise mutacional de *BRAF* V600E (p.(Val600Glu) e c.1799T>A.) deve ser realizada no CCR objetivando a estratificação prognóstica. Mutações em *BRAF* ocorrem em cerca de 8% dos pacientes com doença avançada e 14% dos pacientes com doença localizada, estágio II ou III. As mutações em *BRAF* constituem, portanto, um conjunto substancial de pacientes com CCR (80). A presença da mutação *BRAF* V600E faz com que a resposta ao tratamento com os inibidores de EGFR panitumumabe ou cetuximab, seja altamente improvável, por este motivo deve ser utilizado inibidor de EGFR em conjunto com inibidor de *BRAF* (76).

## 5. *NTRK*

As proteínas do receptor de tropomiosina quinase (TRK) pertencem a uma família de receptores tirosina quinase, incluindo TRKA, TRKB e TRKC, codificadas pelos genes *NTRK1*, *NTRK2* e *NTRK3*, respectivamente. Estruturalmente, as

proteínas TRK contêm regiões extracelulares e intracelulares separadas por um único domínio transmembrana (81,82).

A função normal dos receptores TRK é fisiologicamente importante, particularmente no desenvolvimento do sistema nervoso central e periférico, porém a ativação constitutiva dos receptores TRK contribui para a carcinogênese por causa da posterior ativação da via RAS / MAPK / ERK e da via PI3K / AKT, levando a um aumento descontrolado na proliferação celular (82,83).

A evidência inicial do papel dos genes *NTRK* no surgimento do câncer remonta a mais de 30 anos atrás, quando foram relatadas fusões de *NTRK* em tumores colorretais e tireoide (84,85). Atualmente, as fusões gênicas são as alterações mais bem descritas dentre as alterações *NTRK* que ocorrem em cânceres, sendo resultado de rearranjos intra ou inter cromossômicos (85). Fusões gênicas são conhecidas como oncogênicas por promoverem a formação de tumores por meio da ativação constitutiva de vias de crescimento celular e proliferativas. Em geral, as fusões gênicas *NTRK* causam oncogênese quando a porção 3' do gene *NTRK*, que contém o domínio quinase tirosina catalítica, se funde com a porção 5' de um gene parceiro, o que estimula a expressão gênica e facilita a dimerização de proteínas (81).

Aberrações em *NTRK* são raras na maioria das neoplasias comuns, sendo encontradas com uma frequência inferior a 5%, geralmente variando entre 0,1% e 2%, de acordo com o tipo de tumor (85). Embora as fusões *NTRK* em carcinomas colorretais (CCR) sejam raras (<1%) (86), associações moleculares características de CCR *NTRK* positivos para fusão foram encontradas especificamente em CCR MLH1-metilado esporádico, MSI-high, e tipo selvagem de *BRAF / KRAS* (87,88).

Fusões *NTRK* podem ser detectadas usando diferentes técnicas, incluindo imuno-histoquímica (IHC), hibridização in situ por fluorescência (FISH), reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) e sequenciamento de nova geração (NGS) baseado em RNA e DNA. A imuno-histoquímica (IHC) pode ser um teste específico para detectar alterações TRK na maioria dos tecidos, já que as proteínas



TRK parecem ser pouco expressas em tecidos normais de adultos, sendo encontradas apenas em músculos lisos, testículos e componentes neurais (85,89).

Nos últimos anos, as fusões de TRK têm emergido como alvo para tratamento de diversos tumores. Os inibidores de TRK, larotrectinibe e entrectinibe, foram recentemente aprovados pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de tumores de pacientes adultos e pediátricos com NTRK positivo para fusão, independentemente do tipo de tumor (90,91).

## Tratamento

O tratamento do CCR depende principalmente do tamanho, localização e extensão do tumor e saúde geral do paciente. Normalmente cirurgia, radioterapia e quimioterapia podem ser utilizados nos diferentes casos de CCR. Em relação a quimioterapia, durante os anos 90, o agente citotóxico de escolha era o fluorouracil administrado por infusão. Desde então, terapias combinadas de fluorouracil com leucovorina e irinotecano (regime FOLFIRI) ou oxaliplatina (regime mFOLFOX) foram adotadas para melhorar ainda mais a sobrevida e se tornaram o principais opções de tratamento quimioterapêutico para o carcinoma colorretal. Nos anos 2000, cetuximabe, um anticorpo monoclonal contra a proteína de superfície EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) foi aprovado para uso em combinação com irinotecano em pacientes com carcinoma colorretal avançado ou metastático (92). Desde então, novas terapias foram desenvolvidas, explorando alvos moleculares expressos pelo tumor como marcadores terapêuticos ou de prognóstico, o que se denomina de Medicina de Precisão.

## JUSTIFICATIVA

Os carcinomas colorretais (CCR) são a terceira forma de câncer mais diagnosticada globalmente e a segunda causa de morte por câncer no mundo. No Brasil, estima-se que anualmente sejam diagnosticados 20.540 casos de câncer de cólon e reto em homens e 20.470 em mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de cólon e reto em homens é o terceiro mais incidente na Região Sul e para as mulheres é o segundo mais frequente.

Até o momento, não é do nosso conhecimento outros estudos que tenham compilado e associado os achados em exames de perfis moleculares e histopatológicos dos CCR, com sexo, idade e região anatômica do tumor nos pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## **HIPÓTESES**

Hipótese nula: Não há associação entre as mutações identificadas nos carcinomas colorretais entre si, sexo, idade e lateralidade do tumor.

Hipótese alternativa: Há associação entre as mutações identificadas nos carcinomas colorretais entre si, sexo, idade e lateralidade do tumor.

## OBJETIVOS

### 1. Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o perfil de expressão de proteínas por imunohistoquímica (instabilidade de microssatélites - MMR, NTRK), perfil molecular (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*) e infiltrado linfocitário no carcinoma colorretal em pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, investigando a associação destes achados com sexo e demais dados clínicos.

### 2. Objetivos específicos

- 1) Investigar a associação entre infiltrado linfocitário, a expressão das quatro proteínas do sistema MMR (MLH1, PMS2; MSH2 e MSH6) e localização tumoral no carcinoma colorretal;
- 2) Investigar a frequência de mutações somáticas nos genes *KRAS* (exons 2, 3 e 4), *NRAS* (exons 2, 3 e 4), *BRAF* (exon 15) utilizados como potenciais biomarcadores preditivos e de prognóstico em pacientes diagnosticados com carcinoma colorretal;
- 3) Avaliar a presença de fusões tropomiosina quinase (NTRK) no carcinoma colorretal.

- 4) Verificar a associação do perfil molecular (mutações em *KRAS*, *NRAS* e *BRAF*) e imuno-histoquímico (sistema MMR, NTRK) do carcinoma colorretal nos pacientes estudados com seus parâmetros clínicos: idade e região anatômica de localização do tumor.
  
- 5) Estratificar, entre mulheres e homens, os objetivos acima descritos, buscando diferenças na prevalência.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 [Internet]. Vol. 68, CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2018. p. 394–424. Available from: <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21492>
2. Punt CJA, Koopman M, Vermeulen L. From tumour heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017 Apr;14(4):235–46.
3. De Divitiis C, Nasti G, Montano M, Fisichella R, Iaffaioli RV, Berretta M. Prognostic and predictive response factors in colorectal cancer patients: between hope and reality. *World J Gastroenterol*. 2014 Nov 7;20(41):15049–59.
4. Ros J, Baraibar I, Martini G, Salvà F, Saoudi N, Cuadra-Urteaga JL, et al. The Evolving Role of Consensus Molecular Subtypes: a Step Beyond Inpatient Selection for Treatment of Colorectal Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2021 Nov 6;22(12):113.
5. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. Global cancer observatory: cancer today. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2018. 2020.
6. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2024 Apr 4; Available from: <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21834>
7. Estatísticas de câncer [Internet]. 2023 [cited 2023 Mar 10]. Available from: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>
8. Yabroff KR, Mariotto AB, Feuer E, Brown ML. Projections of the costs associated with colorectal cancer care in the United States, 2000–2020. *Health Econ*. 2008 Aug;17(8):947–59.
9. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods [Internet]. Vol. 144, *International Journal of Cancer*. 2019. p. 1941–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.31937>
10. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359–86.
11. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2044–58.
12. Petre-Mandache CB, Margaritescu DN, Mitrut R, Kamal AM, Padureanu V, Cucu MG, et al. Risk Factors and Genetic Predisposition in Colorectal Cancer: A Study on Young and Old Adults. *Curr Health Sci J*. 2021 Jan;47(1):84–8.
13. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. TNM classification of malignant tumours [Internet]. 8th ed. Standards Information Network; 2016. 272 p. Available from:

<https://perlego.com/book/994743/tnm-classification-of-malignant-tumours-pdf>

14. Lh S, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. oxford: Wiley-blackwell; 2009.
15. National Comprehensive Cancer Network [Internet]. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Version 2.2024. Available from: <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1428>
16. Yamane LS, Scapulatempo-Neto C, Alvarenga L, Oliveira CZ, Berardinelli GN, Almodova E, et al. KRAS and BRAF mutations and MSI status in precursor lesions of colorectal cancer detected by colonoscopy. *Oncol Rep*. 2014 Oct;32(4):1419–26.
17. Yamane L, Scapulatempo-Neto C, Reis RM, Guimarães DP. Serrated pathway in colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2014 Mar 14;20(10):2634–40.
18. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759–67.
19. Leggett B, Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2088–100.
20. Stracci F, Zorzi M, Grazzini G. Colorectal cancer screening: tests, strategies, and perspectives. *Front Public Health*. 2014 Oct 27;2:210.
21. Conteduca V, Sansonno D. Precancerous colorectal lesions. *J Oncol* [Internet]. 2013; Available from: <https://www.spandidos-publications.com/ijo/43/4/973>
22. East JE, Vieth M, Rex DK. Serrated lesions in colorectal cancer screening: detection, resection, pathology and surveillance. *Gut*. 2015 Jun;64(6):991–1000.
23. Snover DC. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum Pathol*. 2011 Jan;42(1):1–10.
24. Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Trends in colorectal cancer incidence rates in the United States by tumor location and stage, 1992–2008. *Cancer Epidemiology and Prevention* [Internet]. 2012; Available from: <https://cebp.aacrjournals.org/content/21/3/411.short>
25. Frank SA. *Dynamics of Cancer: Incidence, Inheritance, and Evolution*. Princeton University Press; 2007. 378 p.
26. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 Nov 5;1:15065.
27. Sandhu J, Lavingia V, Fakhri M. Systemic treatment for metastatic colorectal cancer in the era of precision medicine. *J Surg Oncol*. 2019 Apr;119(5):564–82.
28. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012 Jul 18;487(7407):330–7.
29. 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 Jan;70:87–98.
30. Asghari-Jafarabadi M, Wilkins S, Plazzer JP, Yap R, McMurrick PJ. Prognostic factors



- and survival disparities in right-sided versus left-sided colon cancer. *Sci Rep.* 2024 May 29;14(1):12306.
31. Shida D, Inoue M, Tanabe T, Moritani K, Tsukamoto S, Yamauchi S, et al. Prognostic impact of primary tumor location in Stage III colorectal cancer-right-sided colon versus left-sided colon versus rectum: a nationwide multicenter retrospective study. *J Gastroenterol.* 2020 Oct;55(10):958–68.
  32. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet.* 2019 Oct 19;394(10207):1467–80.
  33. Dunne PD, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer-an update. *Virchows Arch.* 2024 Feb;484(2):273–85.
  34. Harada S, Morlote D. Molecular Pathology of Colorectal Cancer. *Adv Anat Pathol [Internet].* 2019 Sep 9; Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/PAP.0000000000000247>
  35. Kasi A, Handa S, Bhatti S, Umar S, Bansal A, Sun W. Molecular pathogenesis and classification of colorectal carcinoma. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2020 Sep;16(5):97–106.
  36. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology.* 2010 Jun;138(6):2059–72.
  37. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science.* 2013 Mar 29;339(6127):1546–58.
  38. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2017 Mar 23;17(4):268.
  39. Cunningham D, Atkin W, Lenz H, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet.* 2010;375(9719):1030–47.
  40. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2006 Jul;38(7):787–93.
  41. Ogino S, Noshro K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M, et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut.* 2009 Jan;58(1):90–6.
  42. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Sonesson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015 Nov;21(11):1350–6.
  43. Isella C, Brundu F, Bellomo SE, Galimi F, Zanella E, Porporato R, et al. Selective analysis of cancer-cell intrinsic transcriptional traits defines novel clinically relevant subtypes of colorectal cancer. *Nat Commun.* 2017 May 31;8:15107.
  44. Joanito I, Wirapati P, Zhao N, Nawaz Z, Yeo G, Lee F, et al. Single-cell and bulk transcriptome sequencing identifies two epithelial tumor cell states and refines the consensus molecular classification of colorectal cancer. *Nat Genet.* 2022 Jul;54(7):963–75.
  45. Des Guetz G, Schischmanoff O, Nicolas P, Perret GY, Morere JF, Uzzan B. Does

- microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2009 Jul;45(10):1890–6.
46. Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*. 2017 Jun 29;170(1):17–33.
  47. Magee T, Marshall C. New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane. *Cell*. 1999 Jul 9;98(1):9–12.
  48. Yoshino T, Arnold D, Taniguchi H, Pentheroudakis G, Yamazaki K, Xu RH, et al. Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer: a JSMO–ESMO initiative endorsed by CSCO, KACO, MOS, SSO and TOS [Internet]. Vol. 29, *Annals of Oncology*. 2018. p. 44–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdx738>
  49. Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ. Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: guideline from the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists .... *American journal of [Internet]*. 2017; Available from: <https://academic.oup.com/ajcp/article-abstract/147/3/221/2967889>
  50. Nassar AH, Adib E, Kwiatkowski DJ. Distribution of KRASG12C Somatic Mutations across Race, Sex, and Cancer Type. *N Engl J Med*. 2021 Jan 14;384(2):185–7.
  51. Tonello M, Baratti D, Sammartino P, Di Giorgio A, Robella M, Sassaroli C, et al. Prognostic value of specific KRAS mutations in patients with colorectal peritoneal metastases. *ESMO Open*. 2024 Apr 12;9(4):102976.
  52. Dhillon S. Adagrasib: First Approval. *Drugs*. 2023 Feb;83(3):275–85.
  53. Ou SHI, Jänne PA, Leal TA, Rybkin II, Sabari JK, Barve MA, et al. First-in-Human Phase I/IB Dose-Finding Study of Adagrasib (MRTX849) in Patients With Advanced KRASG12C Solid Tumors (KRYSTAL-1). *J Clin Oncol*. 2022 Aug 10;40(23):2530–8.
  54. Sabari JK, Park H, Tolcher AW, Ou SHI, Garon EB, George B, et al. KRYSTAL-2: A phase I/II trial of adagrasib (MRTX849) in combination with TNO155 in patients with advanced solid tumors with KRAS G12C mutation. *J Clin Orthod*. 2021 Jan 20;39(3\_suppl):TPS146–TPS146.
  55. Fakhri MG, Kopetz S, Kuboki Y, Kim TW, Munster PN, Krauss JC, et al. Sotorasib for previously treated colorectal cancers with KRASG12C mutation (CodeBreak100): a prespecified analysis of a single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2022 Jan;23(1):115–24.
  56. Krazati (Adagrasib). Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2022/216340s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/216340s000lbl.pdf)
  57. LUMAKRAS (sotorasibe). Available from: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351954305202117/?substancia=32089>
  58. Parikh K, Banna G, Liu SV, Friedlaender A, Desai A, Subbiah V, et al. Drugging KRAS: current perspectives and state-of-art review. *J Hematol Oncol*. 2022 Oct 25;15(1):152.
  59. De' Angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, De' Angelis N, Leandro G, Di Mario F, et al.

- Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed.* 2018 Dec 17;89(9-S):97–101.
60. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 May;7(5):335–46.
  61. Rantanen P, Keränen A, Barot S, Ghazi S, Liljegren A, Nordenvall C, et al. The prognostic significance of microsatellite instability in colorectal cancer: a Swedish multi-center study. *Int J Colorectal Dis.* 2023 Jul 17;38(1):197.
  62. Dos Santos W, Sobanski T, de Carvalho AC, Evangelista AF, Matsushita M, Berardinelli GN, et al. Mutation profiling of cancer drivers in Brazilian colorectal cancer. *Sci Rep.* 2019 Sep 23;9(1):13687.
  63. Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, Ota J, et al. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J Cancer.* 2004 Jan 10;108(2):237–42.
  64. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature.* 2013 Sep 19;501(7467):346–54.
  65. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 2012 Mar 20;21(3):309–22.
  66. Zhao Y, Ge X, He J, Cheng Y, Wang Z, Wang J, et al. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer differs by anatomical subsite: a systematic review and meta-analysis. *World J Surg Oncol.* 2019 May 22;17(1):85.
  67. Maby P, Tougeron D, Hamieh M, Mlecnik B, Kora H, Bindea G, et al. Correlation between Density of CD8+ T-cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy. *Cancer Res.* 2015 Sep 1;75(17):3446–55.
  68. Bai Z, Zhou Y, Ye Z, Xiong J, Lan H, Wang F. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Cancer: The Fundamental Indication and Application on Immunotherapy. *Front Immunol.* 2021;12:808964.
  69. Gao L, Chen Y. Autophagy controls programmed death-ligand 1 expression on cancer cells (Review). *Biomedical Reports.* 2021 Oct 1;15(4):1–9.
  70. Keytruda® (Pembrolizumabe): nova indicação [Internet]. [cited 2021 Oct 18]. Available from:  
<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/novos-medicamentos-e-indicacoes/keytruda-r-pembrolizumabe-nova-indicacao>
  71. Consultas Medicamentos ANVISA [Internet]. [cited 2021 Nov 18]. OPDIVO (nivolumabe) - Bula do Profissional. Available from:  
<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351308360201510/?substancia=25853>
  72. Consultas Medicamentos ANVISA [Internet]. [cited 2021 Nov 18]. Tecentriq (atezolizumabe) - Bula do Profissional. Available from:  
<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351102551201639/?substancia=26063>

73. Consultas Medicamentos ANVISA [Internet]. [cited 2021 Nov 18]. BAVENCIO (avelumabe) - Bula do Profissional. Available from: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351423162201735/?substancia=26285>
74. Consultas Medicamentos ANVISA [Internet]. [cited 2021 Nov 18]. IMFINZI (durvalumabe) - Bula do Profissional. Available from: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351112555201708/?substancia=26254>
75. Cantwell-Dorris ER, O'Leary JJ, Sheils OM. BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Mol Cancer Ther*. 2011 Mar;10(3):385–94.
76. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):949–54.
77. Fransén K, Klintonäs M, Osterström A, Dimberg J, Monstein HJ, Söderkvist P. Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis*. 2004 Apr;25(4):527–33.
78. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet*. 2012 Mar;49(3):151–7.
79. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012 Sep;3(3):153–73.
80. Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Y, Liao X, Yamauchi M, Nishihara R, et al. Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. *J Natl Cancer Inst*. 2013 Aug 7;105(15):1151–6.
81. Khotskaya YB, Holla VR, Farago AF, Mills Shaw KR, Meric-Bernstam F, Hong DS. Targeting TRK family proteins in cancer. *Pharmacol Ther*. 2017 May;173:58–66.
82. Rubin JB, Segal RA. Growth, survival and migration: the Trk to cancer. *Cancer Treat Res*. 2003;115:1–18.
83. Amatu A, Sartore-Bianchi A, Bencardino K, Pizzutilo EG, Tosi F, Siena S. Tropomyosin receptor kinase (TRK) biology and the role of NTRK gene fusions in cancer. *Ann Oncol*. 2019 Nov 1;30(Suppl\_8):viii5–15.
84. Martin-Zanca D, Hughes SH, Barbacid M. A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature*. 1986;319(6056):743–8.
85. Zito Marino F, Pagliuca F, Ronchi A, Cozzolino I, Montella M, Berretta M, et al. NTRK Fusions, from the Diagnostic Algorithm to Innovative Treatment in the Era of Precision Medicine. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 May 25;21(10). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21103718>
86. Okamura R, Boichard A, Kato S, Sicklick JK, Bazhenova L, Kurzrock R. Analysis of NTRK Alterations in Pan-Cancer Adult and Pediatric Malignancies: Implications for NTRK-Targeted Therapeutics. *JCO Precis Oncol* [Internet]. 2018 Nov 15;2018. Available

from: <http://dx.doi.org/10.1200/PO.18.00183>

87. Cocco E, Benhamida J, Middha S, Zehir A, Mullaney K, Shia J, et al. Colorectal Carcinomas Containing Hypermethylated MLH1 Promoter and Wild-Type BRAF/KRAS Are Enriched for Targetable Kinase Fusions. *Cancer Res.* 2019 Mar 15;79(6):1047–53.
88. Yoshino T, Pentheroudakis G, Mishima S, Overman MJ, Yeh KH, Baba E, et al. JSCO-ESMO-ASCO-JSMO-TOS: international expert consensus recommendations for tumour-agnostic treatments in patients with solid tumours with microsatellite instability or NTRK fusions. *Ann Oncol.* 2020 Jul;31(7):861–72.
89. Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, Drilon A, Zehir A, Frosina D, et al. Pan-Trk Immunohistochemistry Is an Efficient and Reliable Screen for the Detection of NTRK Fusions. *Am J Surg Pathol.* 2017 Nov;41(11):1547–51.
90. Pestana RC, Sen S, Hobbs BP, Hong DS. Histology-agnostic drug development - considering issues beyond the tissue. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020 Sep;17(9):555–68.
91. Bando H, Ohtsu A, Yoshino T. Therapeutic landscape and future direction of metastatic colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2023 May;20(5):306–22.
92. 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. *N Engl J Med.* 2004 Jul 22;351(4):337–45.

**ARTIGO 1**

**Título:** *Integrated molecular profiling of RAS, BRAF mutations, and mismatch repair status in advanced colorectal carcinoma: insights from gender and tumor laterality*

**Autores:** Gabriela Remonato, Emily Ferreira Salles Pilar, Fernanda de-Paris, Pedro Guilherme Schaefer, Lúcia Maria Kliemann.

**Revista:** *Journal of Gastrointestinal Oncology*

Aceite em: 22 de março de 2024.

# Integrated molecular profiling of *RAS*, *BRAF* mutations, and mismatch repair status in advanced colorectal carcinoma: insights from gender and tumor laterality

Gabriela Remonato<sup>1^</sup>, Emily Ferreira Salles Pilar<sup>2^</sup>, Fernanda de-Paris<sup>3^</sup>, Pedro Guilherme Schaefer<sup>1^</sup>, Lúcia Maria Kliemann<sup>1,4^</sup>

<sup>1</sup>Pathology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil; <sup>2</sup>Laboratory Research Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil; <sup>3</sup>Transplant and Personalized Medicine Unit of the Laboratory Diagnostic Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil; <sup>4</sup>Department of Pathology, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, Porto Alegre, RS, Brazil

**Contributions:** (I) Conception and design: G Remonato, LM Kliemann, E Ferreira Salles Pilar; (II) Administrative support: E Ferreira Salles Pilar, G Remonato; (III) Provision of study materials or patients: G Remonato, F de-Paris; (IV) Collection and assembly of data: G Remonato; (V) Data analysis and interpretation: G Remonato, F de-Paris, PG Schaefer; (VI) Manuscript writing: All authors; (VII) Final approval of manuscript: All authors.

**Correspondence to:** Lúcia Maria Kliemann, MD, PhD. Pathology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903, RS, Brazil; Department of Pathology, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2400, 90035-002, Porto Alegre, RS, Brazil. Email: lucia.kliemann@ufrgs.br or lkliemann@hcpa.edu.br.

**Background:** Colorectal carcinoma (CRC) is one of the most frequently diagnosed forms of cancer worldwide. The *RAS* (*KRAS*, *NRAS*) and *BRAF* genes encode proteins that are important therapeutic targets for the treatment of CRC and, together with the mismatch repair (MMR) system, are closely related to patient prognosis and survival in advanced CRC. Here we evaluate the mutational profile and the frequency of mutations in the *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* genes, along with the expression of MMR in advanced CRC, at a tertiary hospital in southern Brazil.

**Methods:** A cross-sectional retrospective study was carried out, where molecular analysis of mutations in the *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* genes was carried out, as well as immunohistochemistry for MMR proteins.

**Results:** Next-generation sequencing (NGS) analysis of 310 tumors revealed that 202 patients (65.2%) had mutations. The *KRAS* gene (53.2%) was the most frequently mutated in our sample, with G12D being the most frequent, representing 30.5% of the mutations in this gene. The most frequent mutation found in *BRAF* was V600E (n=25; 89.3%) and differed significantly in women and in the right colon in patients with MMR deficiency. Among the 283 patients tested for MMR, the rate of loss of expression was 8.8% (25/283).

**Conclusions:** Deficiency in the MMR system is associated with the presence of the *BRAF* V600E mutation, tumors located in the right colon, and the female sex. In our case series, more than 60% of patients had at least one mutation in *KRAS*, *NRAS*, or *BRAF*. The presence of mutations in these genes is closely related to CRC prognosis and helps define the best therapeutic approach in patients with metastatic CRC.

**Keywords:** Colorectal carcinoma (CRC); *KRAS*; *NRAS*; *BRAF*; mismatch repair (MMR)

Submitted Dec 29, 2023. Accepted for publication Mar 22, 2024. Published online Jul 22, 2024.

doi: 10.21037/jgo-23-1017

View this article at: <https://dx.doi.org/10.21037/jgo-23-1017>

<sup>^</sup> ORCID: Gabriela Remonato, 0000-0001-6150-9407; Fernanda de-Paris, 0000-0003-2563-9487; Pedro Guilherme Schaefer, 0000-0003-2792-6586; Emily Ferreira Salles Pilar, 0000-0003-3417-3586; Lúcia Maria Kliemann, 0000-0001-7249-7800.

## Introduction

Colorectal carcinoma (CRC) is one of the most frequently diagnosed forms of cancer worldwide (1). Excluding non-melanoma skin tumors, colon and rectal cancer ranks third among the most common cancer types (1). According to the National Cancer Institute (INCA), in Brazil, the CRC is the third most prevalent type. In the southern region, it is the second most common type of cancer in women and the third most common in men (2). CRC is observed more frequently in the left colon than in the right colon. Based on gene expression data, CRC has been divided into four consensus molecular subtypes (CMS): CMS1 (microsatellite instability), CMS2 (canonical epithelial), CMS3 (metabolic), and CMS4 (mesenchymal)—each subtype reflects significant biological differences (3). The most frequent clinically actionable types of CRC currently belong to CMS type 1 [microsatellite instability (MSI), *BRAF* mutations] and type 3 (*KRAS* mutations, mixed MSI status) (3,4).

Tumors arising in the left colon and right colon differ not only in incidence, but also in their biology and histology, which consequently influences patient

prognosis (5). Another major challenge is the clinical management of metastatic CRC (mCRC); more recently, combined therapies have shown benefits for specific subgroups (6), and several drugs have been approved for the treatment of this disease. However, to effectively benefit patients' lives, the optimal combination and sequence of these drugs likely depend on many factors, including the mutational status of tumor cells (7).

The analysis of the mutational status of *RAS* and *BRAF* genes is becoming increasingly relevant in CRC treatment, especially for determining the course of treatment in patients with metastatic CRC. Patients with *KRAS* mutations also show a low response to the epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors (8), and the presence of a *BRAF* gene mutation is an indicator of a worse prognosis (9). The *RAS* (*KRAS*, *NRAS*) and *BRAF* genes encode proteins that play a crucial role in the treatment of CRC and are closely linked to the outcome and longevity of patients (10–13). The constitutive activation of the RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK) pathway plays a critical role in the development and progression of CRC (14). Monoclonal antibodies against EGFR, such as cetuximab and panitumumab, have been shown to bind to the extracellular domain and block the signaling of this pathway (15).

The mutational status of *RAS* genes (*KRAS* and *NRAS*) is a predictive marker for therapeutic decisions in therapies targeting EGFR in metastatic CRC (15). The *KRAS* G12C mutation (c.34G>T in exon 2), which represents the substitution of a glycine for a cysteine in codon 12, occurs in around 3–4% of CRC (16). The *KRAS* G12C mutant has been identified as a potential target for novel therapies (17). First selective *KRAS* G12C inhibitors to succeed in clinical trials were sotorasib and adagrasib, which are potent and irreversible inhibitors of the mutant *KRAS* G12C isoform, available orally, for the treatment of solid tumors with the oncogenic *KRAS* G12C mutation, including non-small cell lung cancer and colorectal cancer (18,19).

Mutations in the key protein *BRAF* in the MAPK pathway result in the constitutive activation of this pathway, which suggests that *BRAF* mutation plays a crucial role in CRC (14). The V600E mutation, which is predominant in the *BRAF* gene, results from an activating mutation, with the substitution of valine for glutamic acid at amino acid 600 (20). *BRAF* mutations occur in about 8% of patients with advanced CRC and in 14% of patients with localized CRC, stages II or III (21). Previous studies substantiate the fact that the combined MSI/*BRAF* test plays a prognostic role in colorectal cancer (21,22).

### Highlight box

#### Key findings

- G12D was the most frequent mutation found in the *KRAS* gene and the deficient mismatch repair (MMR) system was associated with the presence of the *BRAF* V600E mutation and absence of the *KRAS* mutation. Lung metastasis did not present the V600E mutation.

#### What is known and what is new?

- The *RAS* and *BRAF* genes encode proteins that are important therapeutic targets for the treatment of colorectal carcinoma (CRC) and, together with the MMR system are closely related to patient prognosis and survival in advanced CRC.
- The deficiency in the MMR system was associated with the presence of the *BRAF* V600E mutation, absence of the *KRAS* mutation, tumors located in the right colon, and the female sex. The lung metastasis did not have the V600E mutation and only had a mutation in exon 2 of the *KRAS* gene.

#### What is the implication, and what should change now?

- This study provided results that can contribute to the clinical diagnosis, establish the prognosis, and improve the treatment of patients with advanced CRC. We emphasize the relevance of the investigation into the *KRAS* G12C mutation, the result of which opens up another alternative for the treatment of patients with a mutation in the *KRAS* gene, in this pioneering study in the far south of Brazil.



Another well-known biomarker is MSI, which is present in tumors with deficient mismatch repair (dMMR) systems. Mismatched bases that arise during DNA replication, recombination, or chemical/physical damage are identified and repaired by proteins of the MMR system, which is a highly conserved cellular process (21). However, a deficient MMR system produces a MSI phenotype. The MSI pathway is widely recognized as an important carcinogenic pathway in CRC, representing the molecular signature of Lynch Syndrome, which is often linked to a germline mutation in the MMR genes and 15% of sporadic CRC, most often due to the epigenetic inactivation of *MLH1* (23). The V600E mutational analysis should be performed in dMMR tumors with loss of *MLH1* to assess Lynch syndrome risk. The presence of a *BRAF* mutation is strongly associated with sporadic pathogenesis. Risk of Lynch syndrome is not excluded by the absence of the *BRAF* mutation (24).

The increasing number of molecular markers in CRC, the development of immunotherapy, and the approval of agnostic treatments by regulatory agencies, along with the identification of markers with prognostic and predictive value, currently play an important role in CRC treatment (25). Therefore, in the present context, it is important to understand the epidemiology of CRC in each population in order to better plan access to new therapeutic possibilities (26,27). The purpose of this study is to assess the mutational profile and the frequency of mutations in *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF*, along with the expression of MMR in advanced CRC, at a tertiary hospital in southern Brazil. We present this article in accordance with the STROBE reporting checklist (available at <https://jgo.amegroups.com/article/view/10.21037/jgo-23-1017/rc>).

## Methods

### *Study population and sample*

This retrospective study used data from a series of cases of stage III or IV CRC in patients treated at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Patients included in the study consented to the use of their samples, which were obtained from the Surgical Pathology Service and subjected to molecular analyses by the Personalized Medicine Program of HCPA from 2018 to 2022. Tumor samples from 310 patients were included in this study. Clinical data were obtained from a review of patient medical records. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (as revised in 2013). The study was approved by

the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, under CAAE (Certificate of Presentation for Ethical Consideration) number 56230122200005327.

### *Tumor selection and DNA extraction*

The molecular analysis of mutations in the *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* genes was performed on samples from 310 patients. The paraffin block with the best representation of the tumor was selected from the corresponding H&E (hematoxylin and eosin) slide and cut on a microtome regulated to a thickness of 10 µm. Following the manufacturer's recommendations, DNA was extracted from the samples using the ReliaPrep FFPE gDNA Miniprep System kit (Promega, Madison, WI, USA). The fluorescence method was used to quantify DNA samples after extraction (Qubit 2.0 Fluorometer, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

### *Molecular analysis by next-generation sequencing (NGS)*

NGS was used for the molecular analysis of the *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* genes, with the Ion Torrent™ Ion GeneStudio™ S5 System, server version 5.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), using a customized panel for the identification of mutations in *KRAS* (exons 2, 3, and 4), *NRAS* (exons 2, 3, and 4), and *BRAF* (exon 15) (13,24,28). Data were analyzed using the Ion Torrent Suite and Ion Reporter bioinformatics platform, version 5.0, considering a minimum coverage of 800×. The NM\_003336.3 (*KRAS*), MM\_002524.3 (*NRAS*), and NM\_004333.4 (*BRAF*) sequences were used as references. The tests were conducted using research use reagents with internal validation. The limit of detection (LOD) for variant allele frequency (VAF) was 2% VAF.

For NGS analysis, primary and secondary analyses were performed with the Ion Torrent™ Ion GeneStudio™ S5 System, server version 5.12.3. The Torrent Mapping Alignment Program was used to map the human reference genome hg19. Initial quality control and evaluation of the coverage of the amplification product for the regions of interest were carried out using the Torrent CoverageAnalysis plugin implemented in version 5.12.3 of the Torrent Suite software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After filtering the uniformity (>85%), the readings on the target (>60%) and the minimum mapped readings of 25,000, the regions of interest were obtained. Ion Reporter version 5.12 (Thermo Fisher

**Table 1** Clinical characteristic of patients

Clinical data	n	%
Sex		
Male	153	49.4
Female	157	50.6
Site		
Right colon	68	21.9
Left colon	145	46.8
Rectum	89	28.7
Not specified	8	2.6
Age at diagnosis		
<60 years	147	47.4
≥60 years	163	52.6
Metastasis		
Liver	86	27.7
Nodes	51	16.5
Liver + lung	34	11.0
Lung	30	9.7
Peritoneum	22	7.1
Other sites	87	28.0

Scientific, Waltham, MA, USA) was used to identify variants, with the following somatic parameters: minimum variant quality of 10, minimum coverage of 100, maximum chain polarization of 0.95 and minimum variant score of 6.

### *Mismatch repair (MMR) protein analysis*

The preparation of slides for the immunohistochemical analysis of the MMR system proteins MLH1, PMS2, MSH2, and MSH6 was performed on tumor samples from 283 patients using an automated platform (Benchmark ULTRA Ventana Medical Systems Inc., Tucson, Arizona, USA). The paraffin-embedded block, which contained tumor tissue and, when available, tissue devoid of morphological alterations serving as an internal control, was chosen based on the corresponding H&E stained slide. It was then sectioned using a microtome adjusted to a thickness of 3  $\mu$ m. This selection was not necessarily restricted to the same block designated for NGS. The following antibodies and detection kit were used: MLH1 clone M1 Roche™ USA, PMS2 clone A16-4 Roche™ USA,

MSH2 clone G219-1129 Roche™ USA, MSH6 clone SP93 Roche™ USA, all in ready-to-use format, and the Optiview Roche™ USA reagent kit. All slides were examined under an optical microscope and contained a positive control for each antibody. Internal sample control was also evaluated. Markers were assessed for positivity in the tumor area, and samples with brown-stained nuclei were considered positive. When all four proteins were positive, the tumor was considered pMMR (proficient MMR), and when the expression was negative in at least one of the proteins, the tumor was considered dMMR (deficient MMR).

### *Statistical analysis*

The prevalence of mutations was assessed using absolute and relative frequencies, with a confidence interval of 95%. Statistical analyses were conducted using the Statistical Package for Social Science for Windows (SPSS) version 29. To investigate the association of the molecular profile with sex, age, and tumor location, researchers performed the  $\chi^2$  test or Fisher's exact test. Results were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

## **Results**

### *Clinical characteristics of patients*

This study included 310 patients (157 women and 153 men). The mean age at diagnosis of these patients was 60 years (range, 18–84 years). The tumor was located in the right colon in 68 cases, in the left colon in 145 cases, and in the rectum in 89 cases. In eight cases, the tumor location was not specified. Eighty-six patients (27.7%) had liver metastasis, 51 (16.5%) had lymph node metastasis, and 34 (11%) had concomitant liver and lung metastasis, while other patients had metastasis at different sites (Table 1).

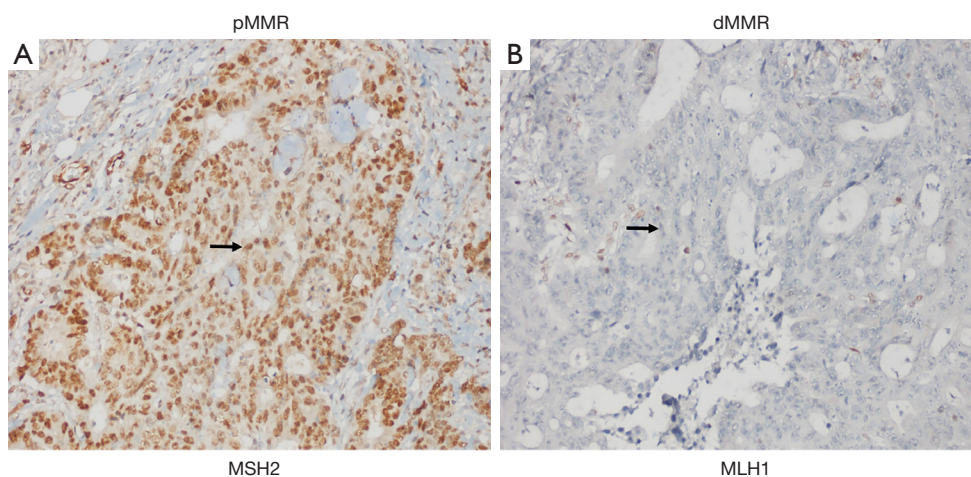
### *Relationship between MMR protein expression and clinical characteristics*

From 310 patients included in this study, 283 were tested for MMR. The remaining patients did not have a sufficient sample. The rate of loss of expression was 8.8% (25/283), and the frequency of loss of expression for each of the four MMR proteins (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) was 6.36% (18/283), 6.36% (18/283), 2.12% (6/283), and 2.47% (7/283), respectively. The rate of loss of expression of MLH1 and PMS2 was significantly higher than that of MSH2 and

**Table 2** Relationship between MMR expression and clinical characteristics

Clinical data	Total	MMR				$\chi^2$	P
		dMMR		pMMR			
		n	%	n	%		
Sex						3.864	0.049
Male	138	7	5.1	131	94.9		
Female	145	18	12.4	127	87.6		
Site						36.411	<0.001
Right colon	67	19	28.4	48	71.6		
Left colon	128	6	4.7	122	95.3		
Rectum	83	0	0.0	83	100.0		
Not specified	5	0	0.0	5	100.0		
Age at diagnosis						0.000	>0.99
<60 years	137	12	8.8	125	91.2		
≥60 years	146	13	8.9	133	91.1		

MMR, mismatch repair; dMMR, deficient MMR; pMMR, proficient MMR.



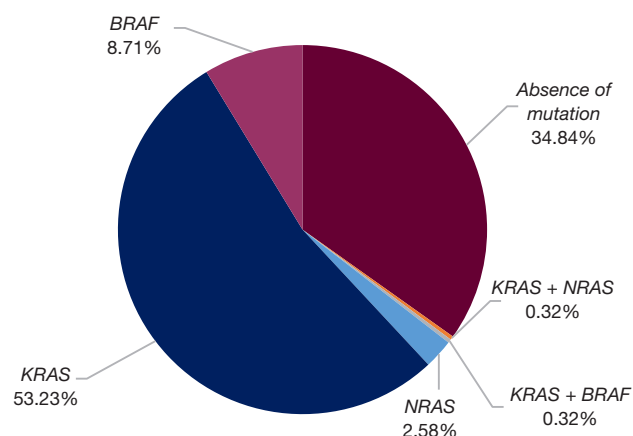
**Figure 1** Mismatch repair immunohistochemistry showing typical patterns of (A) intact MSH2 and (B) loss of MLH1. Original magnification 200 $\times$ . The arrows indicate positively stained cells (left) and negatively stained cells (right). pMMR, proficient mismatch repair; dMMR, deficient mismatch repair.

MSH6 ( $P<0.001$ ). Patients with different ages at diagnosis did not significantly differ in terms of MMR expression loss ( $P>0.05$ ) using the cut-off point of 60 years old. However, a significant difference in expression loss was observed in women ( $P=0.049$ ) and in tumors located in the right colon ( $P<0.001$ ) (Table 2). Figure 1 represents the results of immunohistochemistry for pMMR and dMMR, for the

Mismatch Repair System proteins MSH2 and MLH1.

#### ***Relationship between mutations in KRAS, NRAS, BRAF, and clinical characteristics***

NGS analyses conducted on 310 tumors revealed the presence of mutations in 202 patients (65.2%). The



**Figure 2** Frequency of somatic mutations in *KRAS*, *BRAF*, and *NRAS* in advanced colorectal tumors at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

mutational profile in this sample showed that 167 patients had mutations in *KRAS* (53.23%), 27 had mutations in *BRAF* (8.71%), eight had mutations in *NRAS* (2.58%), one had concomitant mutations in *KRAS* and *NRAS* (0.32%), and one had mutations both in *KRAS* and *BRAF* (0.32%). In 108 patients (34.84%), no mutations were detected with the panel used (Figure 2).

The frequency of mutations in *KRAS* was 7% higher in women than in men; however, this difference was not statistically significant ( $P=0.26$ ). Most patients who had no mutations detected by the panel were men, but this difference between sex was also not statistically significant ( $P=0.09$ ) (Table 3). Among the mutations in *KRAS*, G12D was the most common, accounting for 30.5% of the mutations found in this gene, followed by G12V ( $n=36$ ; 21.6%), G13D ( $n=25$ ; 15%), and G12C ( $n=11$ ; 6.6%), all in

**Table 3** Relationship between mutational profile in *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* genes, and clinical characteristics

Clinical data	Total	<i>KRAS</i>				P	<i>NRAS</i>				P	<i>BRAF</i> V600E				P		
		Wild		Mutated			Wild		Mutated			Not mutated		Mutated				
		n	%	n	%		n	%	n	%		n	%	n	%			
Sex																		
Male	153	76	49.7	77	50.3		146	95.4	7	4.6		147	96.1	6	3.9			
Female	157	67	42.7	90	57.3		155	98.7	2	1.3		138	87.9	19	12.1			
Site																		
Right colon	68	31	45.6	37	54.4	0.97	67	98.5	1	1.5	0.70	47	69.1	21	30.9		<0.001	
Left colon	145	67	46.2	78	53.8		141	97.2	4	2.8		141	97.2	4	2.8			
Rectum	89	42	47.2	47	52.8		85	95.5	4	4.5		89	100.0	0	0.0			
Not specified	8	3	37.5	5	62.5		8	100.0	0	0.0		8	100.0	0	0.0			
Age at diagnosis																		
<60 years	147	72	49.0	75	51.0	0.40	143	97.3	4	2.7	>0.99	140	95.2	7	4.8		0.07	
≥60 years	163	71	43.6	92	56.4		158	96.9	5	3.1		145	89.0	18	11.0			
Metastasis																		
Liver	86	42	48.8	44	51.2	0.045	84	97.7	2	2.3	0.77	83	96.5	3	3.5		0.005	
Nodes	51	32	62.7	19	37.3		50	98.0	1	2.0		42	82.4	9	17.6			
Liver + lung	34	15	44.1	19	55.9		32	94.1	2	5.9		32	94.1	2	5.9			
Lung	30	8	26.7	22	73.3		29	96.7	1	3.3		30	100.0	0	0.0			
Peritoneum	22	10	45.4	12	54.6		21	95.5	1	4.5		17	77.3	5	22.7			
Other sites	87	36	41.4	51	58.6		85	97.7	2	2.3		78	89.7	9	10.3			

**Table 4** Frequency of different mutations in *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* genes

Gene name	Mutation	No. of patients	Frequency (%)
<i>KRAS</i>			
Exon 2		144	86.3
	G12D	51	30.5
	G12V	36	21.6
	G13D	25	15.0
	G12C	11	6.6
	G12A	9	5.4
	G12S	5	3.0
	G13C	2	1.2
	G12E	1	0.6
	G12R	1	0.6
	G13V	1	0.6
	G12V + G12S	1	0.6
	dupG13	1	0.6
Exon 3		13	7.8
	Q61H	9	5.4
	Q61R	2	1.2
	Q61L	1	0.6
Exon 4		10	6.0
	A146T	5	3.0
	K117N	3	1.8
	A146V	2	1.2
Total		167	100
<i>NRAS</i>			
Exon 2		3	33.3
	G12D	2	22.2
	G12S	1	11.1
Exon 3		6	66.6
	Q61K	2	22.2
	Q61L	3	33.3
	Q61R	1	11.1
Total		9	100
<i>BRAF</i>			
Exon 15		25	89.3
	V600E	25	89.3
	D594G	1	3.6
	G596V	1	3.6
	N581S	1	3.6
Total		28	100

exon 2 of the *KRAS* gene (Table 4). Eight other mutations were found in exon 2. In exon 3, four different mutations were detected, and in exon 4, three mutations were found. The lung metastasis only had mutations in exon 2 of the *KRAS* gene, while the liver metastasis had mutations in exons 2, 3 and 4 (Table 5).

Only nine patients (seven men and two women) had mutations in the *NRAS* gene. A total of 28 patients had mutations in the *BRAF* gene. The most frequently found mutation in *BRAF* was V600E (n=25; 89.3%), but three patients had mutations D594G, G596V, and N581S (Table 4). Of the 30 CRC that metastasized to the lung, none had the *BRAF* V600E mutation (P=0.005). The *BRAF* V600E mutation also showed a significant difference by sex: it was more common in women (P=0.01) and also more prevalent in the right colon (P<0.001). *BRAF* V600E was more frequent in patients aged 60 or over; however, this difference was not statistically significant (P=0.07) (Table 3).

#### *Association between MMR protein expression and mutations in the KRAS, NRAS, and BRAF genes*

In this study, we found statistically significant differences when investigating the association between MMR expression loss and mutations in the *KRAS* and *BRAF* genes. When there was MMR expression loss (dMMR), the frequency of *KRAS* mutations was significantly lower than when there was no MMR expression loss (pMMR) (P<0.001). In contrast, the frequency of the *BRAF* V600E mutation was significantly higher in dMMR MLH1/PMS2 than in pMMR. There was no significant difference between dMMR and the *NRAS* gene (Table 6).

#### **Discussion**

In this study, we evaluated the mutational profile and the frequency of mutations in the *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* genes, along with the expression of MMR system proteins in advanced CRC, in patients from a tertiary hospital in southern Brazil, correlating these findings with each other.

Data from the literature demonstrate the importance of performing a molecular analysis of tumors in patients with metastatic CRC before initiating treatment, as this leads to improved overall survival and progression-free survival in patients with wild-type *KRAS* treated with anti-EGFR therapy (13-15). Other studies have extended the analysis to include testing for mutations in other genes, such as *NRAS* and *BRAF*, which are predictors of treatment failure with

**Table 5** Frequency of *KRAS* mutations by metastasis site

Metastasis	Most frequent <i>KRAS</i> mutations							
	G12D	G13D	G12V	G12C	Q61H	A146T	G12A	G12S
Liver	13	7	13	2	1	2	0	3
Lung	4	4	4	3	0	0	2	1
Peritoneum	3	1	5	0	2	0	0	0
Nodes	6	5	3	1	1	1	1	0
Liver + lung	8	3	2	0	2	1	1	1
Other sites	17	5	9	5	3	1	5	0

**Table 6** Relationship between MMR proteins and *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* genes

Gene name	Total	MMR					P
		dMMR			pMMR		
		MLH1/PMS2 (n)	MSH2/MSH6 (n)	%	n	%	
<i>KRAS</i>							<0.001
Wild	135	17	2	14.1	116	85.9	
Mutant	148	1	5	4.1	142	95.9	
<i>NRAS</i>							0.19
Wild	275	18	6	8.7	251	91.3	
Mutant	8	0	1	12.5	7	87.5	
<i>BRAF</i> V600E							<0.001
Not mutant	259	7	7	5.4	245	94.6	
Mutant	24	11	0	45.8	13	54.2	

MMR, mismatch repair; dMMR, deficient MMR; pMMR, proficient MMR.

EGFR inhibitors (12,15,29,30). In our case series, 34.8% of patients did not have mutations in the studied genes, which indicates that these patients would be eligible for treatment with EGFR inhibitors. A portion of the studied population could benefit from this targeted therapy, which suggests that this type of testing is justified for potential use in treatment decisions.

In CRC, the prevalence of mutation rates in the *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* genes has been reported to range between 15–60%, 2–15%, and 3–10%, respectively (12,31–34). In Brazil, the study by Gil Ferreira *et al.*, which analyzed the frequency of mutations in exon 2 of the *KRAS* gene in metastatic CRC in the Brazilian population, found that the mutation rate in *KRAS* was 31.9% (35). In the southern region of Brazil, the same study showed that the *KRAS* mutation rate was 32% in metastatic CRC (35).

In southeastern Brazil, a study published by Dos Santos *et al.* showed that the rates of mutation in *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* were 52.7%, 4.4%, and 8.8%, respectively (36). Also in the southeast, Ribeiro *et al.* found a *KRAS* mutation rate of 49.2% (37). In the present study, higher frequencies, compared to Gil Ferreira *et al.* study of mutations in *KRAS* (52.3%) were found, and the reason for this finding could be the fact that we also analyzed exons 3 and 4 (35). We are not aware of any other study in the southern Brazilian population that has evaluated *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* mutations by NGS and associated them with MMR expression and clinical data. In contrast to *KRAS* findings, lower frequencies of *NRAS* mutations (2.6%) were observed. Among *KRAS* mutations, G12D (Gly12Asp) was the most frequent, which is also in line with previous studies (33,34,37–39). The frequency of the G12C (Gly12Cys)

mutation was 6.6% (11/167), which is especially interesting given the use of the drugs adagrasib and sotorasib which specifically target this mutation, opening up another alternative for treating patients with a mutation in the *KRAS* gene (40-43).

The frequency of *BRAF* mutations (8.7%) we found is in line with the data from Dos Santos *et al.*, as well as the fact that the *BRAF* V600E mutation was the most common (89.3%) (36). In our study, the *BRAF* V600E mutation showed a significant difference by sex, being predominant in women, and by tumor location, occurring more commonly in the right colon, a fact already reported in the literature (44,45). Among metastasis, *BRAF* V600E was more frequent in CRCs that metastasized to the lymph nodes, while this mutation was not observed in exclusive lung metastasis. A previous study indicated that colorectal tumors located in different sites have completely different therapeutic results and specific biomolecular characteristics (44). The knowledge about the different rates of *BRAF* V600E mutation in distinct tumor sites can be useful in the development of treatment therapies for CRC located in different tumor sites (14). In CRC, the presence of the *BRAF* mutation is associated with lower survival time and resistance to standard therapeutic approaches (46). CRC with a *BRAF* mutation is an aggressive subpopulation of metastatic CRC (47). The therapeutic approach to CRC when there are mutations in the *BRAF* gene is challenging due to resistance, and this treatment does not achieve the same success as that of *BRAF* inhibitors that revolutionized the treatment of *BRAF* V600E mutated metastatic melanomas. In part, this can be explained by the fact that metastatic CRC is as a more complex disease compared to melanoma. The use of regimens combining targeted therapy and chemotherapy is the most suitable strategy to overcome resistance (48). Some guidelines recommend targeted therapy for patients with metastatic CRC and *BRAF* mutations. This subgroup seems to benefit from anti-VEGF therapies, although the available data are still limited and inconclusive (49,50).

Regarding the expression of MMR proteins, we observed that the loss of MLH1 and PMS2 was significantly higher than that of MSH2 and MSH6, which is in line with the literature (4). The dMMR status was more common in women (12.4%) than in men (5.1%) ( $P=0.049$ ). Patients with tumors located in the right colon were found to be more likely to have dMMR and the *BRAF* V600E mutation than patients with tumors in the left colon and rectum. These results are consistent with those of previous studies

(31,36). A meta-analysis (14) demonstrated an association between the *BRAF* V600E mutation and high microsatellite instability, corroborating the findings of this study. When evaluating the group of patients with dMMR, it was observed that most of these patients did not have mutations in the *KRAS* gene. During the *BRAF* analysis, we found that the *BRAF* V600E mutation was significantly more common in patients with dMMR. This mutation is quite common in these tumors and has prognostic value, being associated with worse survival (51). The site of origin of the tumor is considered an independent prognostic factor that affects treatment response. In this sense, tumors differ in various aspects, including histology and mutational profile (52). Studies have shown that CRC located in the right colon is more common in women, whereas tumors located in the left side are more common in men (45,53-56). Other studies have shown that overall survival is higher in patients with stage I, III, and IV CRC located in the left side than in those affected by this disease in the right side (57-60). Right-sided tumors carry many adverse characteristics, including MSI and a higher rate of *BRAF* V600E mutations (52,53,56), and are associated with worse clinical outcomes in patients with metastatic CRC (60,61).

Despite our findings, this study has some limitations; the main limitation of this study is that we do not have data on the clinical treatment, prognosis, and survival of these patients, and therefore we cannot explain the association of the study findings with the performance of treatment in patients. A methodological limitation is that only the exons recommended for defining the prognosis and treatment of the disease according to the National Comprehensive Cancer Network and other guidelines were sequenced. This approach did not allow us to observe other rare or as yet unreported alterations.

## Conclusions

This study analyzed the frequency of mutations in the *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* genes, as well as the loss of expression in the MMR system. We found that deficiency in the MMR system is associated with the presence of the *BRAF* V600E mutation, tumors located in the right colon, and the female sex. In our case series, more than 60% of patients had at least one mutation in *KRAS*, *NRAS*, or *BRAF*. The presence of mutations in these genes is closely related to CRC prognosis and helps define the best therapeutic approach in patients with metastatic CRC.

## Acknowledgments

*Funding:* This work was supported by the Research Funding and Incentives of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre (FIPE/HCPA).

## Footnote

*Reporting Checklist:* The authors have completed the STROBE reporting checklist. Available at <https://jgo.amegroups.com/article/view/10.21037/jgo-23-1017/rc>

*Data Sharing Statement:* Available at <https://jgo.amegroups.com/article/view/10.21037/jgo-23-1017/dss>

*Peer Review File:* Available at <https://jgo.amegroups.com/article/view/10.21037/jgo-23-1017/prf>

*Conflicts of Interest:* All authors have completed the ICMJE uniform disclosure form (available at <https://jgo.amegroups.com/article/view/10.21037/jgo-23-1017/coif>). The authors have no conflicts of interest to declare.

*Ethical Statement:* The authors are accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (as revised in 2013). The study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, under CAAE (Certificate of Presentation for Ethical Consideration) number 56230122200005327. Patients included in the study consented to the use of their samples.

*Open Access Statement:* This is an Open Access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International License (CC BY-NC-ND 4.0), which permits the non-commercial replication and distribution of the article with the strict proviso that no changes or edits are made and the original work is properly cited (including links to both the formal publication through the relevant DOI and the license). See: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

## References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394-424. Erratum in: *CA Cancer J Clin* 2020;70:313.
2. Estatísticas de câncer [Internet]. 2023 [cited 2023 Mar 10]. Available online: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>
3. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015;21:1350-6.
4. Chen W, Frankel WL. A practical guide to biomarkers for the evaluation of colorectal cancer. *Mod Pathol* 2019;32:1-15.
5. Missiaglia E, Jacobs B, D'Ario G, et al. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features. *Ann Oncol* 2014;25:1995-2001.
6. Morris VK, Kennedy EB, Baxter NN, et al. Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: ASCO Guideline. *J Clin Oncol* 2023;41:678-700.
7. Innocenti F, Ou FS, Qu X, et al. Mutational Analysis of Patients With Colorectal Cancer in CALGB/SWOG 80405 Identifies New Roles of Microsatellite Instability and Tumor Mutational Burden for Patient Outcome. *J Clin Oncol* 2019;37:1217-27.
8. Mouliere F, El Messaoudi S, Pang D, et al. Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Mol Oncol* 2014;8:927-41.
9. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 2011;29:2011-9.
10. Hardiman KM. Update on Sporadic Colorectal Cancer Genetics. *Clin Colon Rectal Surg* 2018;31:147-52.
11. Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2015;149:1177-1190.e3.
12. Palomba G, Doneddu V, Cossu A, et al. Prognostic impact of KRAS, NRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal carcinomas: a population-based study. *J Transl Med* 2016;14:292.
13. National Comprehensive Cancer Network [Internet]. [cited 2021 Nov 17]. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Version 3.2021. Available online: <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1428>
14. Wang J, Shen J, Huang C, et al. Clinicopathological Significance of BRAF(V600E) Mutation in Colorectal Cancer: An Updated Meta-Analysis. *J Cancer* 2019;10:2332-41.



15. Harada S, Morlote D. Molecular Pathology of Colorectal Cancer. *Adv Anat Pathol* 2020;27:20-6.
16. Nassar AH, Adib E, Kwiatkowski DJ. Distribution of KRAS (G12C) Somatic Mutations across Race, Sex, and Cancer Type. *N Engl J Med* 2021;384:185-7.
17. Araujo LH, Souza BM, Leite LR, et al. Molecular profile of KRAS G12C-mutant colorectal and non-small-cell lung cancer. *BMC Cancer* 2021;21:193.
18. Ou SI, Jänne PA, Leal TA, et al. First-in-Human Phase I/IB Dose-Finding Study of Adagrasib (MRTX849) in Patients With Advanced KRAS(G12C) Solid Tumors (KRYSTAL-1). *J Clin Oncol* 2022;40:2530-8.
19. Fakhri MG, Kopetz S, Kuboki Y, et al. Sotorasib for previously treated colorectal cancers with KRAS(G12C) mutation (CodeBreak100): a prespecified analysis of a single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2022;23:115-24.
20. Cantwell-Dorris ER, O'Leary JJ, Sheils OM. BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Mol Cancer Ther* 2011;10:385-94.
21. Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Y, et al. Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. *J Natl Cancer Inst* 2013;105:1151-6.
22. Funkhouser WK Jr, Lubin IM, Monzon FA, et al. Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn* 2012;14:91-103.
23. De' Angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed* 2018;89:97-101.
24. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and American Society of Clinical Oncology. *American Journal of Clinical Pathology* 2017;147:221-60.
25. Ros J, Baraibar I, Martini G, et al. The Evolving Role of Consensus Molecular Subtypes: a Step Beyond Inpatient Selection for Treatment of Colorectal Cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2021;22:113.
26. Corcoran RB, André T, Atreya CE, et al. Combined BRAF, EGFR, and MEK Inhibition in Patients with BRAF(V600E)-Mutant Colorectal Cancer. *Cancer Discov* 2018;8:428-43.
27. Vogelaar FJ, Erning FNV, Reimers MS, et al. The Prognostic Value of Microsatellite Instability, KRAS, BRAF and PIK3CA Mutations in Stage II Colon Cancer Patients. *Mol Med* 2016;21:1038-46.
28. Messersmith WA. NCCN Guidelines Updates: Management of Metastatic Colorectal Cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2019;17:599-601.
29. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:5705-12.
30. Therkildsen C, Bergmann TK, Henrichsen-Schnack T, et al. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol* 2014;53:852-64.
31. Fan JZ, Wang GF, Cheng XB, et al. Relationship between mismatch repair protein, RAS, BRAF, PIK3CA gene expression and clinicopathological characteristics in elderly colorectal cancer patients. *World J Clin Cases* 2021;9:2458-68.
32. Rasool M, Natesan Pushparaj P, Buhmeida A, et al. Mutational spectrum of BRAF gene in colorectal cancer patients in Saudi Arabia. *Saudi J Biol Sci* 2021;28:5906-12.
33. Shetty O, Vengurlekar V, Kapoor A, et al. The Prevalence of BRAF, PIK3CA, and RAS Mutations in Indian Patients with Colorectal Cancer. *South Asian J Cancer* 2022;11:190-4.
34. Benmokhtar S, Laraqui A, El Boukhrissi F, et al. Clinical Significance of Somatic Mutations in RAS/RAF/MAPK Signaling Pathway in Moroccan and North African Colorectal Cancer Patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2022;23:3725-33.
35. Gil Ferreira C, Aran V, Zalberg-Renault I, et al. KRAS mutations: variable incidences in a Brazilian cohort of 8,234 metastatic colorectal cancer patients. *BMC Gastroenterol* 2014;14:73.
36. Dos Santos W, Sobanski T, de Carvalho AC, et al. Mutation profiling of cancer drivers in Brazilian colorectal cancer. *Sci Rep* 2019;9:13687.
37. Ribeiro KB, Ribeiro KB, Feres O, et al. Clinical-Pathological Correlation of KRAS Mutation Status in Metastatic Colorectal Adenocarcinoma. *World J Oncol* 2013;4:179-87.
38. Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, et al. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract* 2009;205:858-62.
39. Marchoudi N, Amrani Hassani Joutei H, Jouali F, et al. Distribution of KRAS and BRAF mutations in Moroccan patients with advanced colorectal cancer. *Pathol Biol (Paris)* 2013;61:273-6.

40. Liu J, Kang R, Tang D. The KRAS-G12C inhibitor: activity and resistance. *Cancer Gene Ther* 2022;29:875-8.
41. Dhillon S. Adagrasib: First Approval. *Drugs* 2023;83:275-85.
42. Ji J, Wang C, Fakhri M. Targeting KRAS (G12C)-Mutated Advanced Colorectal Cancer: Research and Clinical Developments. *Onco Targets Ther* 2022;15:747-56.
43. Hong DS, Fakih MG, Strickler JH, et al. KRAS(G12C) Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. *N Engl J Med* 2020;383:1207-17.
44. Ulivi P, Scarpi E, Chiadini E, et al. Right- vs. Left-Sided Metastatic Colorectal Cancer: Differences in Tumor Biology and Bevacizumab Efficacy. *Int J Mol Sci* 2017;18:1240.
45. White A, Ironmonger L, Steele RJC, et al. A review of sex-related differences in colorectal cancer incidence, screening uptake, routes to diagnosis, cancer stage and survival in the UK. *BMC Cancer* 2018;18:906.
46. Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, et al. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology* 2015;148:88-99.
47. Korphaisarn K, Kopetz S. BRAF-Directed Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer J* 2016;22:175-8.
48. Caputo F, Santini C, Bardasi C, et al. BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights. *Int J Mol Sci* 2019;20:5369.
49. Hopirtean C, Nagy V. Optimizing the use of anti VEGF targeted therapies in patients with metastatic colorectal cancer: review of literature. *Clujul Med* 2018;91:12-7.
50. Grassi E, Corbelli J, Papianni G, et al. Current Therapeutic Strategies in BRAF-Mutant Metastatic Colorectal Cancer. *Front Oncol* 2021;11:601722.
51. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut* 2009;58:90-6.
52. Waldstein S, Spengler M, Pinchuk IV, Yee NS. Impact of Colorectal Cancer Sidedness and Location on Therapy and Clinical Outcomes: Role of Blood-Based Biopsy for Personalized Treatment. *J Pers Med* 2023;13:1114.
53. Joo HJ, Lee HS, Jang BI, et al. Sex-specific differences in colorectal cancer: A multicenter retrospective cohort study. *Cancer Rep (Hoboken)* 2023;6:e1845.
54. Limam M, Matthes KL, Pestoni G, et al. Are there sex differences among colorectal cancer patients in treatment and survival? A Swiss cohort study. *J Cancer Res Clin Oncol* 2021;147:1407-19.
55. Kotake K, Asano M, Ozawa H, et al. Gender differences in colorectal cancer survival in Japan. *Int J Clin Oncol* 2016;21:194-203.
56. Koo JH, Leong RW. Sex differences in epidemiological, clinical and pathological characteristics of colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:33-42.
57. Ulanja MB, Rishi M, Beutler BD, et al. Colon Cancer Sidedness, Presentation, and Survival at Different Stages. *J Oncol* 2019;2019:4315032.
58. Brungs D, Aghmesheh M, de Souza P, et al. Sidedness is prognostic in locoregional colon cancer: an analysis of 9509 Australian patients. *BMC Cancer* 2017;17:251.
59. Hansen IO, Jess P. Possible better long-term survival in left versus right-sided colon cancer - a systematic review. *Dan Med J* 2012;59:A4444.
60. Holch JW, Ricard I, Stintzing S, et al. 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.
61. Kerr DJ, Domingo E, Kerr R. Is sidedness prognostically important across all stages of colorectal cancer? *Lancet Oncol* 2016;17:1480-2.

**Cite this article as:** Remonatto G, Ferreira Salles Pilar E, de-Paris F, Schaefer PG, Kliemann LM. Integrated molecular profiling of *RAS*, *BRAF* mutations, and mismatch repair status in advanced colorectal carcinoma: insights from gender and tumor laterality. *J Gastrointest Oncol* 2024;15(4):1580-1591. doi: 10.21037/jgo-23-1017

**ARTIGO 2**

**Título:** *Evaluation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Molecular Alterations in Advanced Colorectal Carcinoma: A Retrospective Study in Southern Brazil*

**Autores:** Gabriela Remonato, Emily Ferreira Salles Pilar, Fernanda de-Paris, Pedro Guilherme Schaefer, Lúcia Maria Kliemann.

**Revista:** *Surgical and Experimental Pathology*

Submetido em setembro de 2024.

Article type: Original Article

**Evaluation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Molecular Alterations in Advanced Colorectal Carcinoma: A Retrospective Study in Southern Brazil**

Running Title: TILs and Molecular Alterations in Advanced Colorectal Carcinoma

Authors/Affiliation

Gabriela Remonatto<sup>1</sup>, Emily Ferreira Salles Pilar<sup>2</sup>, Fernanda de-Paris<sup>3</sup>, Pedro Guilherme Schaefer<sup>1</sup>, Lúcia Maria Kliemann<sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup> Pathology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil; <sup>2</sup> Laboratory Research Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil; <sup>3</sup> Transplant and Personalized Medicine Unit of the Laboratory Diagnostic Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil; <sup>4</sup> Department of Pathology, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Corresponding Author

Lúcia Maria Kliemann, MD, PhD, 1) Pathology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903, RS, Brazil. 2) Department of Pathology, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2400, 90035-002, Porto Alegre, RS, Brazil. Email: [lucia.kliemann@ufrgs.br](mailto:lucia.kliemann@ufrgs.br), [lkliemann@hcpa.edu.br](mailto:lkliemann@hcpa.edu.br)

ORCID

Gabriela Remonatto - <https://orcid.org/0000-0001-6150-9407>

Fernanda De Paris - <https://orcid.org/0000-0003-2563-9487>

Pedro Guilherme Schaefer- <https://orcid.org/0000-0003-2792-6586>

Emily Ferreira Salles Pilar - <https://orcid.org/0000-0003-3417-3586>

Lúcia M Kliemann - <https://orcid.org/0000-0001-7249-7800>

## Abstract

**Background:** Colorectal carcinoma (CRC) is a leading cause of cancer-related deaths globally, ranking second in mortality rates. Cancer progression is influenced not only by genetic mutations in tumour cells but also by the surrounding tumour microenvironment, which can promote tumour growth or dampen the host's immune response. Microsatellite instability tumours often exhibit a high presence of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs), including cytotoxic T cells. TILs are increasingly recognised as important biomarkers across various cancer types, and the mismatch repair (MMR) status is particularly relevant in determining patient eligibility for immunotherapy, especially with immune checkpoint inhibitors in advanced disease. In the present study, we evaluated the presence and intensity of lymphocytic infiltrate in patients with advanced CRC at a tertiary hospital in southern Brazil.

**Methods:** A cross-sectional retrospective study was conducted to analyse the presence and intensity of TILs and their association with clinical data, as well as alterations in *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *NTRK*, and MMR.

**Results:** Analysis of the presence and intensity of TILs in 241 tumours revealed that 70 (29.1%) were TIL+ and 171 (70.9%) were TIL-. Only one tumour was *NTRK*+; this tumour was in a female patient, located in the right colon, TIL-, and deficient in *MLH1/PMS2*. There were no significant differences in the associations between the presence and intensity of the infiltrate and the clinical characteristics and molecular alterations studied.

**Conclusions:** The data from our study differed from those reported in the literature in that we found no association between a higher frequency and intensity of TILs and MMR deficiency. Associations with the molecular profiles of the *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* genes also showed no statistically significant differences.

**Keywords:** Colorectal carcinoma, TILs, MMR, molecular status.

## Introduction

Colorectal carcinoma (CRC) is one of the most commonly diagnosed cancers worldwide, ranking second in cancer mortality (1). Cancer progression is influenced not only by genetic alterations within tumour cells but also by the surrounding environment, which can provide factors that either promote cancer growth or reduce the host's immune surveillance (2). The microsatellite instability (MSI) pathway is recognised as a carcinogenic pathway in CRC and is found in 15% of sporadic colorectal tumours (3,4). MSI is a phenotype caused by mutations or epigenetic silencing of the mismatch repair (MMR) system genes. Because the MMR system's repair proteins correct errors during DNA replication, MSI tumours with MMR deficiency (dMMR) exhibit a high mutational tumour burden and a high number of neoantigens, which are recognised by the immune system (5). These tumours are generally characterised by an increased number of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs), including cytotoxic T cells (6–8). By contrast, MMR-proficient colorectal tumour cells have low immunogenicity and are infiltrated by a limited number of immune cells, making it difficult to elicit an adequate immune response (9). Therefore, immune checkpoint blockade (ICB) therapy is ineffective in such patients. To enhance the sensitivity of immunotherapy, combination treatments are needed to boost tumour immunogenicity. The presence of TILs is increasingly recognised as an important biomarker in multiple cancer types (10), and the MMR status is gaining attention as a biomarker for determining patients' eligibility for immunotherapy with immune checkpoint inhibitors, especially for those with advanced disease (7). Generalised TIL density is a strong prognostic marker for survival in patients with colorectal cancer (10). ICB therapy works by inhibiting interactions between molecules such as cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 and programmed death-1 (PD-1), which normally suppress T cell activation and function (2). Tumours with a high mutational load and therefore increased immune infiltration respond favourably to ICB (11). ICB has provided certain patients with long-lasting benefits and a significantly improved disease prognosis. However, inhibition of PD-1 or programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) therapy has shown limited effects in the treatment of colorectal cancer. In 2017, the first anti-PD-1 drug, pembrolizumab, was approved by the Food and Drug Administration as a second-line treatment for patients with metastatic CRC who have MSI-high (MSI-H) tumours. However, only a

small proportion of patients have dMMR/MSI-H tumours (approximately 15% of patients with colorectal cancer and 4% of those with metastatic CRC), and some of these patients develop immune resistance. In this study of patients with advanced CRC at a tertiary hospital in southern Brazil, we evaluated the presence and intensity of intratumoural lymphocytic infiltrate (i.e., TILs) in relation to the mutational status of *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF*. We also examined protein alterations detected by immunohistochemistry of the *NTRK* and MMR status and histopathological features of advanced CRC.

## Methods

### Study Population and Sample

This retrospective study utilised data from a series of patients with clinical stage III or IV CRC treated at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Samples were obtained from the Surgical Pathology Service between 2018 and 2022, with patient consent for their use. Primary site tumour samples were collected from surgical specimens and biopsies, and 241 patients were included in this study. Clinical and pathological data were obtained through a review of original patient medical records. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre under CAAE number 56230122200005327.

### Evaluation of TILs

The evaluation and semi-quantification of TILs were performed with the same haematoxylin–eosin slides used in the histopathological diagnosis. Briefly, formalin-fixed, paraffin-embedded samples were cut on a microtome set at 3 µm, and haematoxylin–eosin staining was carried out using automated equipment (VENTANA HE 600 system; Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA). TIL evaluation in the surgical sections was conducted in two regions: the centre of the lesion and the margin. For biopsies, the tumour infiltrate at its specific location was considered for analysis. Microscopic evaluation was performed initially at 100× magnification, increasing to 400×, and the results were reported in four intensity levels: absent, weak (rare lymphocytes), moderate (focal infiltrate), and strong (diffuse infiltrate), according to Liu et al. (12). After semi-quantification, the results were categorised as

negative TILs (absent or weak lymphocyte infiltrate) and positive TILs (moderate or strong lymphocyte infiltrate).

#### V600E, *KRAS*, *NRAS* and MMR status

The patient tumour tissue specimens in this study were analysed for their molecular status, including the *BRAF* V600E mutation and *KRAS* and *NRAS* mutations (exons 2, 3, and 4), by next-generation sequencing. The MMR status was assessed by immunohistochemistry as previously described by Remonatto et al. (13).

#### Evaluation of *NTRK* expression

*NTRK* expression was analysed by immunohistochemistry using a Roche monoclonal anti-pan-TRK antibody, clone EPR17341, which recognises proteins resulting from the fusion of *NTRK* genes. This was performed on an automated BenchMark ULTRA Ventana® platform, using material from the primary tumour site. For the surgical specimen samples, tissue microarray (TMA) blocks were created based on the anatomical examination of each patient's specimen. Each TMA block contained 60 tumour cylinders of 2 mm, with duplicate tumours for each patient. For the biopsy blocks, a TMA was not constructed, and a single slide was prepared for each patient. The results were reported as either positive or negative for *NTRK*.

#### Statistical Analysis

Statistical analyses were conducted using SPSS for Windows, version 18 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). To investigate the association of TILs with sex, age, tumour location, molecular status, MMR status, histological grading, and mucinous component, the  $\chi^2$  test or Fisher's exact test was performed. Results were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

## Results

### Clinicopathological Characteristics of Patients



The present study involved 241 patients (124 women and 117 men). The tumour was located in the right colon in 56 patients, the left colon in 115, and the rectum in 66. In four patients, the tumour location was not specified. The mean age at diagnosis was 59 years, with a median of 61 years (range: 18–84 years). Forty-one (17%) patients had tumours with a mucinous component, and 81.7% were moderately differentiated (Table 1).

**Table 1. Clinicopathological characteristics of patients**

Clinical data	n	%
<b>Sex</b>		
Male	117	48.5
Female	124	51.5
<b>Site</b>		
Right colon	56	23.2
Left colon	115	47.7
Rectum	66	27.4
Not specified	4	1.7
<b>Age</b>		
Under 30 years	7	2.9
31-40 years	9	3.7
41-50 years	38	15.8
51-60 years	60	24.9
61-70 years	75	31.1
71-80 years	48	19.9
Over 80 years	4	1.7
<b>Histological grading</b>		
Undifferentiated	1	0.4
Poorly differentiated	26	10.8
Moderately differentiated	197	81.7
Moderately to poorly differentiated	1	0.4
Well differentiated	11	4.6
Not informed	5	2.1
<b>Mucinous component</b>		
Positive	41	17.1
Negative	200	82.9

Evaluation of TILs

When assessing the intensity of TILs, 54 (22.4%) samples showed no infiltrate, 117 (48.5%) showed a weak infiltrate, 62 (25.7%) showed a moderate infiltrate, and 8 (3.3%) showed a strong infiltrate (Figure 1). In the stratification between TIL+ and TIL-, 70 (29.1%) tumours were TIL+ and 171 (70.9%) were TIL- (Figure 2).

Figure 1. Assessing of TIL intensity in th center and at the invasive margin of the tumor.

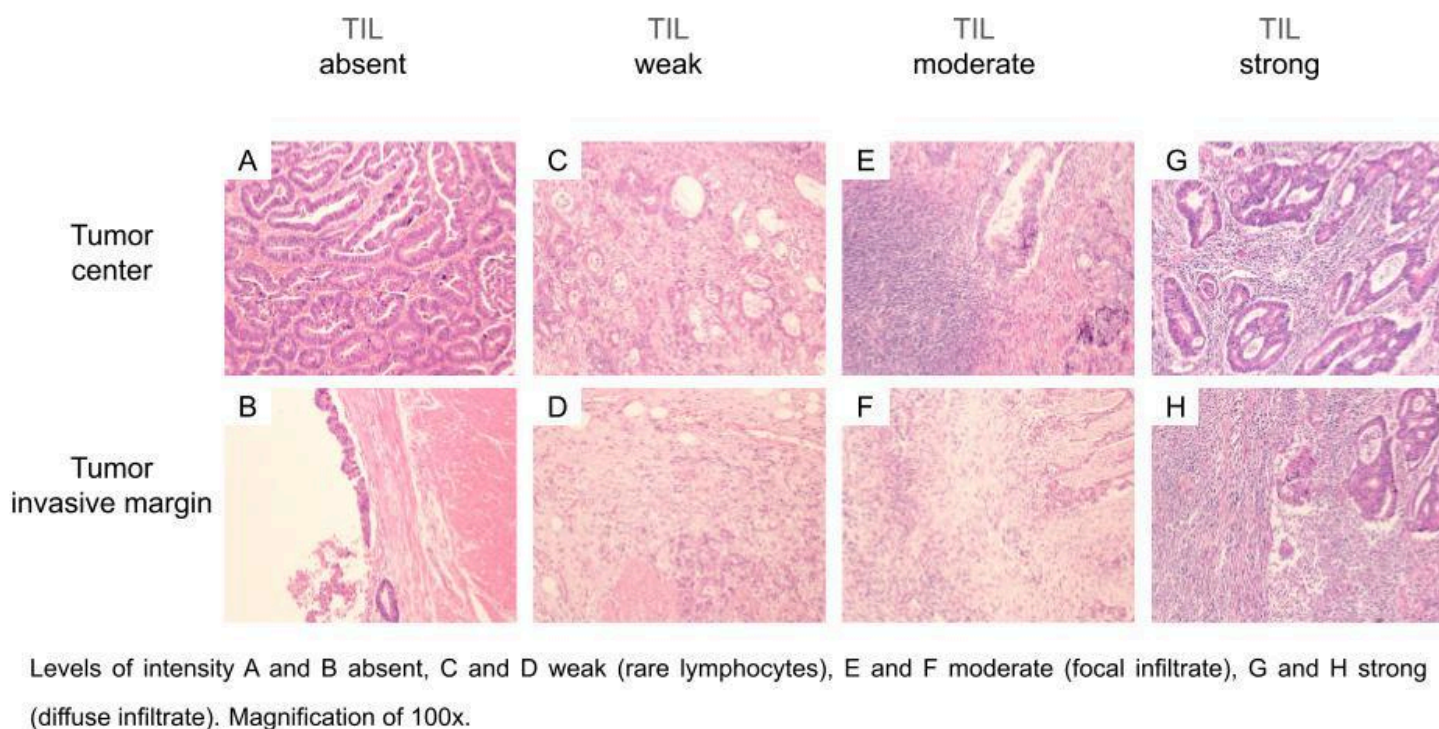
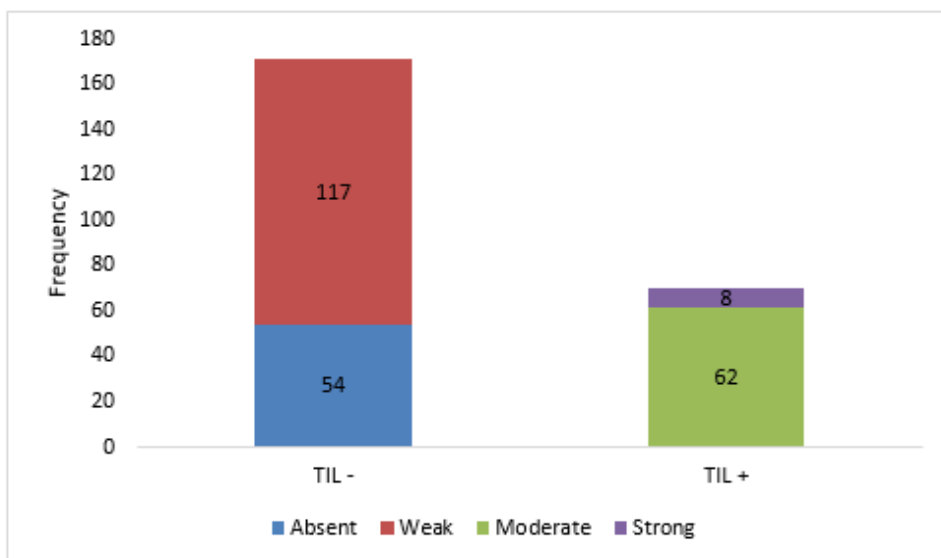


Figure 2. Frequency of tumor lymphocyte infiltration by intensity



TIL:Tumor-infiltrating lymphocyte

### Relationship Between TILs and Clinicopathological Characteristics

The evaluation of TILs and patient characteristics did not reveal a statistically significant difference in any of the variables analysed (Table 2). The primary site with the highest percentage of TIL+ was the rectum, with 34.9%. Patients under the age of 30 years had 42.9% of TIL+ tumours (3 of 7 tumours).

Table 2. Relationship between TIL and clinicopathological characteristics

Clinical data	Total	Negative		TIL Positive		P
		n	%	n	%	
<b>Sex</b>						
Male	117	85	72.6	32	27.4	0.674
Female	124	86	69.4	38	30.6	
<b>Site</b>						
Right colon	56	40	71.4	16	28.6	0.649
Left colon	115	85	73.9	30	26.1	
Rectum	66	43	65.1	23	34.9	
Not specified	4	3	75	1	25	
<b>Age at diagnosis</b>						
Under 30 years	7	4	57.1	3	42.9	0.712
31-40 years	9	7	77.8	2	22.2	
41-50 years	38	25	65.8	13	34.2	
51-60 years	60	41	68.3	19	31.7	
61-70 years	75	57	76	18	24	
71-80 years	48	35	72.9	13	27.1	
Over 80 years	4	2	50	2	50	
<b>Histological grading</b>						
Undifferentiated	1	1	100	0	0	0.513
Little differentiation	26	21	80.8	5	19.2	
Moderately differentiated	197	138	70.1	59	29.9	
Moderately to poorly differentiated	1	0	0	1	100	
Well differentiated	11	8	72.7	3	27.3	
Not informed	5	3	60	2	40	
<b>Mucinous component</b>						
Negative	200	139	69.5	61	30.5	0.363
Positive	41	32	78.1	9	21.9	

TIL: Tumor infiltrating lymphocytes

### Relationship Between TILs and Molecular Status

Of the 241 patients included in this study, 239 were tested for MMR and 235 for *NTRK*. The remaining patients did not have a viable sample. The results are presented in Table 3. When analysing TILs and the molecular status, no statistically significant differences were observed.

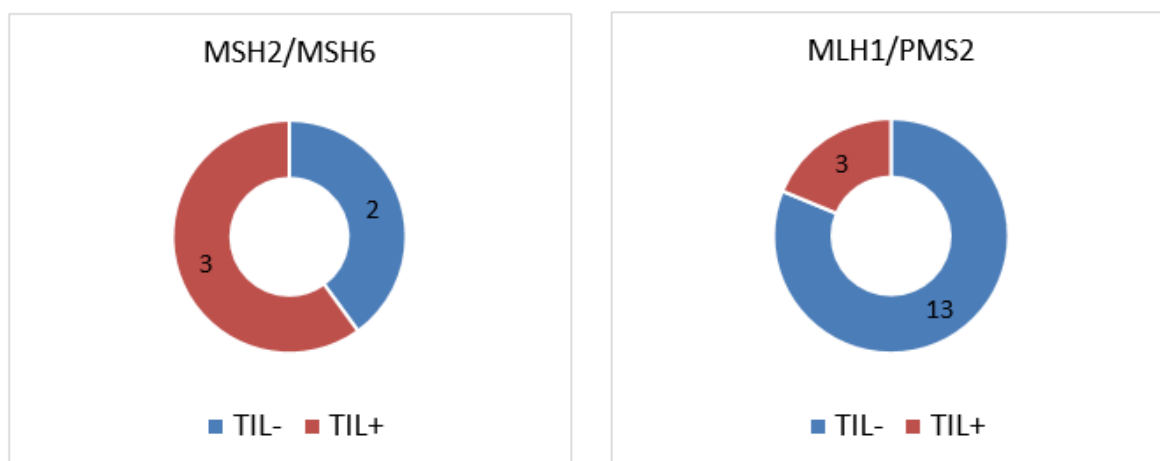
Regarding the association between TILs and MMR, most tumours deficient in MLH1/PMS2 were TIL-, while the majority of tumours deficient in MSH2/MSH6 were TIL+ (Figure 3).

Table 3. Relationship between TIL and molecular status

Molecular status	Total	TIL				P
		Negative		Positive		
		n	%	n	%	
<b>KRAS</b>						
Wild	119	84	70.6	35	29.4	1.000
Mutated	122	87	71.3	35	28.7	
<b>NRAS</b>						
Wild	232	166	71.5	66	28.5	0.246
Mutated	9	5	55.5	4	44.5	
<b>BRAF</b>						
Wild	219	155	70.8	64	29.2	1.000
Mutated	22	16	72.7	6	27.3	
<b>MMR</b>						
Deficient	23	17	73.9	6	26.1	0.909
Proficient	216	152	70.4	64	29.6	
<b>NTRK</b>						
Negative	234	164	70.1	70	29.9	0.702
Positive	1	1	100	0	0	

TIL: Tumor infiltrating lymphocytes

Figure 3. Frequency of tumor lymphocyte infiltration by type of MMR deficiency



TIL: Tumor infiltrating lymphocytes

## Discussion

This study evaluated the presence and intensity of TILs and associated the findings with clinicopathological characteristics and mutational profiles in patients with advanced CRC at a hospital in southern Brazil.

Specific features of the tumour microenvironment, including TILs, the Immunoscore, and PD-L1 expression, may predict responses to ICB (14). Research is increasingly highlighting the importance of tumour immune infiltration, which involves various immune cells such as T cells, B cells, natural killer cells, macrophages, dendritic cells, and neutrophils, and underscoring significant variability between patients (15,16). The first description in CRC of the prognostic value of tumour-infiltrating T cells, specifically the density and location of CD8+ cytotoxic T cells and Th1 cells, was reported by Galon et al. in 2006 (17). Based on these findings, the concept of the Immunoscore as a more effective prognostic factor than pathological tumour progression (T-stage), tumour invasion (N-stage), tumour metastasis (M-stage), TNM staging, and the MSI status was proposed (18). Colorectal cancer has long been considered immunogenic and challenging to treat with immunotherapy (15,16). However, advancements in the molecular characterisation of tumour-associated antigens and methods for detecting antigen-specific T-cell responses have shifted this perspective within the scientific community. The presence of TILs in tumours has been associated with improved clinical outcomes. In 2018, Mlecnik et al. demonstrated that in the metastatic context, response to treatment and prolonged survival were significantly associated with high immune infiltration (19). However, the type and function of TILs, as well as the localisation of different TILs within the tumour microenvironment, are crucial for determining whether tumour control or progression occurs (20). In our study, when evaluating the frequency and intensity of TILs, we observed that of the 241 tumours tested, 70 showed moderate to strong infiltration, characterising TIL+ samples according to Liu et al. (12).

Literature data associate the presence and intensity of TILs with a deficiency in the MMR system due to the increased expression of neoantigens resulting from uncorrected DNA replication errors (8,15). In our study, we found that patients with MSH2/MSH6 deficiency had more TIL+ than TIL- tumours, unlike what was observed in tumours deficient in MLH1/PMS2. This finding could suggest that MSH2/MSH6 dMMR tumours may attract more TILs, although this association was not statistically significant. We also found no statistically significant association between TILs and MMR overall. This may have been due to the small number of dMMR patients evaluated, likely because only patients at an advanced clinical stage were included in the study (21).

When we analysed the association between TILs and *KRAS* mutations, we found that the proportion of TIL+ was the same in mutated *KRAS* as in wild-type *KRAS*. This finding is consistent with the literature (22). In the analysis of TILs and the *NRAS* gene, we observed that of the 9 patients with mutated *NRAS*, 4 had TIL+ and 5 had TIL-. Because our previous study showed an association between dMMR and the *BRAF* V600E mutation, we expected some form of association with TILs as well. However, because we did not find any association between dMMR and TILs, the same result was observed when we analysed the *BRAF* gene.

With regard to the *NTRK* analysis, of the 235 patients analysed, only one was *NTRK+* (0.42%). This is consistent with the very low prevalence of *NTRK* fusions in CRC (<1%) (23,24). This sample belonged to a woman who was 66 years old at the time of her CRC diagnosis. The tumour was poorly differentiated, lacked a mucinous component, and was located in the right colon. It was dMMR (MLH1/PMS2), wild-type *KRAS*, wild-type *NRAS*, and wild-type *BRAF*, with a weak lymphocytic infiltrate (TIL-). This patient could be eligible for treatment with ICB drugs such as pembrolizumab and TRK inhibitors like entrectinib and larotrectinib (15,25–27). Literature data support the relationship between dMMR and *NTRK* fusions, consistent with our findings (28,29).

The main limitations of this study are the low number of dMMR patients analysed and the lack of data on clinical treatment, prognosis, and patient survival. A methodological limitation was the absence of immunohistochemical characterisation of the lymphocytes that make up the infiltrate.

Although our findings did not reveal a statistical association between the variables analysed, the study has some strengths. These include the ability to associate TIL-related findings with the molecular status of *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF*, as well as the immunohistochemical characterisation of MMR and *NTRK*.

## Conclusions

This study analysed the frequency and intensity of TILs and investigated associations between these data and the molecular and immunohistochemical profile of advanced CRC. Our findings differed from those reported in the literature in that we found no

association between a higher frequency and intensity of TILs and MMR deficiency, which may be attributed to the small number of dMMR patients in our cohort. Similarly, the associations with the molecular profiles of the *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* genes in this study also showed no statistically significant differences. Based on the data obtained from our study population of patients with advanced CRC, it was not possible to associate the presence of TILs with tumour molecular characteristics.

### *Declarations*

*Ethical Statement:* The authors are accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, under CAAE (Certificate of Presentation for Ethical Consideration) number 56230122200005327. Patients included in the study consented to the use of their samples.

*Availability of data and materials:* The authors chose not to share the data of the patients included in the study because of the General Data Protection Law (Law No. 13.709/2018) in force in Brazil. The patients consented to the use of their biological samples and associated data only for the purposes of this research.

*Funding:* This work was supported by the Research Funding and Incentives of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre (FIPE 2022-0031).

*Conflicts of Interest:* The authors have no conflicts of interest to declare.

*Contributions:* (I) Conception and design: G Remonato, LM Kliemann (II) Administrative support: E Ferreira Salles Pilar, G Remonato; (III) Provision of study materials or patients: G Remonato, F Paris; (IV) Collection and assembly of data: G Remonato; (V) Data analysis and interpretation: G Remonato, PG Schaefer (VI) Manuscript writing: All authors; (VII) Final approval of manuscript: All authors.

*Acknowledgements:* Not applicable.



## References

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2024 Apr 4; Available from: <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21834>
2. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med*. 2018 May;24(5):541–50.
3. De' Angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, De' Angelis N, Leandro G, Di Mario F, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed*. 2018 Dec 17;89(9-S):97–101.
4. Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, Ota J, et al. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J Cancer*. 2004 Jan 10;108(2):237–42.
5. Stadler ZK, Battaglin F, Middha S, Hechtman JF, Tran C, Cercek A, et al. Reliable Detection of Mismatch Repair Deficiency in Colorectal Cancers Using Mutational Load in Next-Generation Sequencing Panels. *J Clin Oncol*. 2016 Jun 20;34(18):2141–7.
6. Zhang P, Liu M, Cui Y, Zheng P, Liu Y. Microsatellite instability status differentially associates with intratumoral immune microenvironment in human cancers. *Brief Bioinform* [Internet]. 2021 May 20;22(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/bib/bbaa180>
7. Yamamoto H, Watanabe Y, Arai H, Umemoto K, Tateishi K, Sunakawa Y. Microsatellite instability: A 2024 update. *Cancer Sci* [Internet]. 2024 Mar 25; Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/cas.16160>
8. Maby P, Tougeron D, Hamieh M, Mlecnik B, Kora H, Bindea G, et al. Correlation between Density of CD8+ T-cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy. *Cancer Res*. 2015 Sep 1;75(17):3446–55.
9. Marisa L, Svrcek M, Collura A, Becht E, Cervera P, Wanherdrick K, et al. The Balance Between Cytotoxic T-cell Lymphocytes and Immune Checkpoint Expression in the Prognosis of Colon Tumors. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2018 Jan 1;110(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djx136>
10. Idos GE, Kwok J, Bonthala N, Kysh L, Gruber SB, Qu C. The prognostic implications of tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2020 Feb 25;10(1):3360.
11. Paijens ST, Vledder A, de Bruyn M, Nijman HW. Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era. *Cell Mol Immunol*. 2021 Apr;18(4):842–59.
12. Liu S, Kong P, Wang X, Yang L, Jiang C, He W, et al. Tumor microenvironment classification based on T-cell infiltration and PD-L1 in patients with mismatch repair-proficient and -deficient colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2019 Feb;17(2):2335–43.
13. Remonatto G, Ferreira Salles Pilar E, de-Paris F, Schaefer PG, Kliemann LM. Integrated molecular profiling of RAS, BRAF mutations, and mismatch repair status in advanced colorectal carcinoma: insights from gender and tumor laterality. *J Gastrointest Oncol*. 2024 Aug;15(4):1580–91.

14. González-Montero J, Rojas CI, Burotto M. Predictors of response to immunotherapy in colorectal cancer. *Oncologist* [Internet]. 2024 Jun 26; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38920285/>
15. Bai Z, Zhou Y, Ye Z, Xiong J, Lan H, Wang F. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Cancer: The Fundamental Indication and Application on Immunotherapy. *Front Immunol*. 2021;12:808964.
16. Senovilla L, Vacchelli E, Galon J, Adjemian S, Eggermont A, Fridman WH, et al. Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *Oncoimmunology*. 2012 Nov 1;1(8):1323–43.
17. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1960–4.
18. Galon J, Bruni D. The role of the immune infiltrate in distinct cancer types and its clinical implications : Lymphocytic infiltration in colorectal cancer. *Cancer Treat Res*. 2020;180:197–211.
19. Mlecnik B, Van den Eynde M, Bindea G, Church SE, Vasaturo A, Fredriksen T, et al. Comprehensive intrametastatic immune quantification and major impact of Immunoscore on survival. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2018 Jan 1;110(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28922789/>
20. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 15;12(4):298–306.
21. Weng J, Li S, Zhu Z, Liu Q, Zhang R, Yang Y, et al. Exploring immunotherapy in colorectal cancer. *J Hematol Oncol*. 2022 Jul 16;15(1):95.
22. Heriyanto DS, Yoshuantari N, Akbariani G, Lau V, Hanini H, Hidayati Z, et al. High probability of Lynch syndrome among colorectal cancer patients is associated with higher occurrence of KRAS and PIK3CA mutations. *World J Oncol*. 2024 Aug;15(4):612–24.
23. Okamura R, Boichard A, Kato S, Sicklick JK, Bazhenova L, Kurzrock R. Analysis of NTRK Alterations in Pan-Cancer Adult and Pediatric Malignancies: Implications for NTRK-Targeted Therapeutics. *JCO Precis Oncol* [Internet]. 2018 Nov 15;2018. Available from: <http://dx.doi.org/10.1200/PO.18.00183>
24. Yonemaru J, Hashimoto T, Takayanagi D, Naka T, Yatabe Y, Kanemitsu Y, et al. NTRK fusion-positive colorectal cancer in Japanese population. *Pathol Int*. 2021 May;71(5):355–9.
25. Hagopian G, Nagasaka M. Oncogenic fusions: Targeting NTRK. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2024 Feb;194:104234.
26. Morris VK, Kennedy EB, Baxter NN, Benson AB 3rd, Cercek A, Cho M, et al. Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: ASCO Guideline. *J Clin Oncol*. 2023 Jan 20;41(3):678–700.
27. Yoshino T, Pentheroudakis G, Mishima S, Overman MJ, Yeh KH, Baba E, et al. JSCO-ESMO-ASCO-JSMO-TOS: international expert consensus recommendations for tumour-agnostic treatments in patients with solid tumours with microsatellite instability or NTRK fusions. *Ann Oncol*. 2020 Jul;31(7):861–72.

28. Zhang Z, Pang J, Chen L, Chen J, Li J, Liu H, et al. Pan-tropomyosin receptor kinase immunohistochemistry is a feasible routine screening strategy for NTRK fusions in mismatch repair-deficient colorectal carcinomas. *Hum Pathol.* 2022 Nov;129:21–31.
29. Wang H, Li ZW, Ou Q, Wu X, Nagasaka M, Shao Y, et al. NTRK fusion positive colorectal cancer is a unique subset of CRC with high TMB and microsatellite instability. *Cancer Med.* 2022 Jul;11(13):2541–9.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo nos permitiu conhecer melhor o perfil dos tumores de pacientes com carcinoma colorretal avançado, tratados em um hospital terciário no sul do Brasil. Os dados obtidos corroboram a literatura, mostrando que a prevalência das mutações nos genes *KRAS*, *NRAS* e *BRAF* pode variar de acordo com a população estudada. Em nossa série de casos, 34,8% dos pacientes não apresentavam mutações nos genes estudados, o que indica que esses pacientes seriam elegíveis para tratamento com inibidores de EGFR ou inibidores de EGFR em conjunto com inibidores de BRAF. A detecção da mutação G12C em *KRAS*, com uma frequência de 6,6%, destaca-se pela sua relevância terapêutica, dado o desenvolvimento de fármacos específicos para essa alteração.

A mutação *BRAF V600E* apresentou maior prevalência em mulheres e em tumores localizados no cólon direito, características que são consistentes com achados da literatura e que reforçam a necessidade de uma abordagem terapêutica diferenciada para esses casos.

Em relação à expressão das proteínas MMR, o estudo confirmou a associação entre o status dMMR, a mutação *BRAF V600E* e a localização tumoral no cólon direito, resultados que têm implicações prognósticas importantes.

Quanto à pesquisa da frequência e intensidade de TILs, não observamos diferenças estatisticamente significativas nas associações de maior intensidade de TILs em tumores dMMR ou outras mutações.

Em relação à pesquisa de NTRK, somente uma paciente apresentou resultado positivo, o que constituiu uma importante limitação, muito embora este resultado esteja consoante com a literatura, que relata que menos de 1% dos CCR são NTRK+.

Este estudo apresenta limitações, como a ausência de dados clínicos sobre tratamento, prognóstico e sobrevida dos pacientes, o que impediu uma análise mais

aprofundada da associação entre os achados moleculares e os desfechos clínicos. A principal limitação metodológica, é que somente foram incluídos pacientes em estágio clínico avançado que realizaram os exames moleculares para *KRAS*, *NRAS* e *BRAF*.

Os resultados obtidos reforçam a importância da caracterização molecular detalhada dos tumores colorretais, tanto para o entendimento das suas características biológicas quanto para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e personalizadas.

## PERSPECTIVAS

Com base nos achados deste estudo, as perspectivas apontam para a necessidade de uma investigação mais abrangente que inclua uma análise longitudinal dos dados clínicos, incluindo tratamento, prognóstico e sobrevida dos pacientes. Além disso, identificamos que seria importante realizar a caracterização imuno-histoquímica do infiltrado linfocitário utilizando os anticorpos anti CD3 e anti CD8, bem como a avaliação digital das imagens e a realização do cálculo do *immunoscore*, que atualmente representa uma ferramenta mais acurada para a análise do microambiente tumoral.

## APÊNDICES

### Apêndice 1. Checklist STROBE artigo Journal of Gastrointestinal Oncology

#### STROBE Statement—checklist of items that should be included in reports of observational studies

Section/item	Item No	Recommendation	Reported on Page Number/Line Number	Reported on Section/Paragraph
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	2/ 41-43	Abstract/ methods
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	2	Abstract
Introduction				
Background/ rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	3-4/ 58-124	Introduction
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	4/ 124-128	Introduction
Methods				
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	4/ 131-132	Methods/ Study population and sample
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	4/ 133-140	Methods/ Study population and sample
Participants	6	(a) Cohort study—Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up Case-control study—Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls Cross-sectional study—Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants	4/ 133-136	Methods/ Study population and sample
		(b) Cohort study—For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed Case-control study—For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case	N/A	

Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	4-5/ 141-190	Methods/ Tumor Selection and DNA Extraction, Molecular Analysis by Next-generation Sequencing (NGS), Mismatch Repair (MMR) Protein Analysis
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	4-5/ 141-190	Methods/ Statistical analysis
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	N/A	
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	4/ 133-137	Methods/ Study population and sample
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	N/A	
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	6/ 191-197	Methods/ Statistical analysis
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	N/A	
		(c) Explain how missing data were addressed	N/A	
		(d) Cohort study—If applicable, explain how loss to follow-up was addressed Case-control study—If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed Cross-sectional study—If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	N/A	
		(e) Describe any sensitivity analyses	6/ 191-197	Methods/ Statistical analysis
Results				
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	6/ 200	Results



		(b) Give reasons for non-participation at each stage	6/ 208-209	Results
		(c) Consider use of a flow diagram	N/A	
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders	6/ 200-206	Results/Clinical Characteristics of Patients
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	6/ 208-209	Results/Clinical Characteristics of Patients
		(c) Cohort study—Summarise follow-up time (eg, average and total amount)	N/A	
Outcome data	15*	Cohort study—Report numbers of outcome events or summary measures over time	N/A	
		Case-control study—Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure	N/A	
		Cross-sectional study—Report numbers of outcome events or summary measures	6-7/ 199-253	Results
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included	N/A	
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized	N/A	
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	N/A	
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	N/A	
Discussion				
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	7-9/ 254-336	Discussion
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	9/ 337-344	Discussion
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	7-9/ 254-344	Discussion
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	9/ 346-352	Conclusion

Other information				
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	9/ 354-355	Acknowledgments

\*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at [www.strobe-statement.org](http://www.strobe-statement.org).

Updated on April 13, 2020

**HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**DIRETORIA DE PESQUISA**

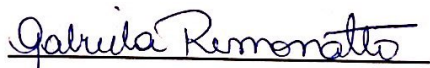

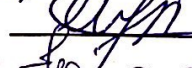
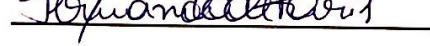
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HCPA**

**DECLARAÇÃO DE CONHECIMENTO E CUMPRIMENTO DA LEI GERAL DE  
PROTEÇÃO DE DADOS PARA PESQUISAS AVALIADAS PELO CEP HCPA**

**Título do projeto:** Caracterização do perfil molecular e de expressão imuno-histoquímica no carcinoma colorretal de mulheres e homens do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os pesquisadores declaram conhecer e cumprir os requisitos da Lei Geral de Proteção de Dados (Lei Nº 13.709, de 14 de agosto de 2018) quanto ao tratamento de dados pessoais e dados pessoais sensíveis que serão utilizados para a execução do presente projeto de pesquisa.

Declaram estar cientes que o acesso e o tratamento dos dados deverão ocorrer de acordo com o descrito na versão do projeto aprovada pelo CEP HCPA.

Nome	Assinatura
Gabriela Remonatto	
Lúcia Maria Kliemann	
Emily Ferreira Salles Pilar	
Fernanda de Paris	

Data 24/01/2022

**Paciente:**

**Contato:**

Bom dia/Boa tarde, estou falando do Hospital de Clínicas, o meu nome é **\_(nome do pesquisador)\_**, poderia falar com o/a Sr/Sra **\_(nome do paciente)\_**?

Faço parte de uma pesquisa que está sendo realizada aqui no Hospital de Clínicas, para avaliar as **alterações genéticas nos casos de câncer de intestino** e se existem **diferenças entre tumores de mulheres e homens**.

**Gostaria de solicitar a sua autorização para o acesso ao seu prontuário, aos resultados dos seus exames relacionados ao seu diagnóstico e o uso do seu material que já está arquivado no Serviço de Patologia. Nenhuma cirurgia ou biópsia a mais são necessárias. As pessoas não serão identificadas, e não haverá mudança no seu diagnóstico nem no seu tratamento.**

Caso o Sr/ a Sra não autorize, isto não interfere em nada no seu atendimento ou nas consultas e exames já agendados.

O Sr/ a Sra autoriza?:             Sim  
    Não

---

Se estiver de acordo, perguntar em qual contato de preferência gostaria de receber o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto, onde constam as informações detalhadas.

Contato para envio do TCLE (email/Whatsapp/mensagem):

Se não aceitar, agradecer pelo tempo e atenção.

Perguntar se a pessoa possui mais alguma dúvida e ressaltar que os contatos dos pesquisadores e do CEP estarão no Termo enviado.

Pesquisador: Gabriela Remonatto

Contato disponibilizado: (51) 981179714

Dados a serem preenchidos pelo pesquisador depois da ligação:

Participante:

1ª tentativa: Dia da ligação:

Hora da ligação:

2ª tentativa: Dia da ligação:

Hora da ligação:

3ª tentativa: Dia da ligação:

Hora da ligação:

4ª tentativa: Dia da ligação:

Hora da ligação:

5ª tentativa: Dia da ligação:

Hora da ligação:

Gravação da ligação ( ) Sim ( ) Não

Pesquisador que realizou a ligação:

Assinatura do Pesquisador (se impresso):

**AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO - PLANILHAS MEDICINA PERSONALIZADA**

Ao Comitê de Ética em Pesquisa,

Autorizo a Pesquisadora Gabriela Remonato a acessar as planilhas de trabalho da Medicina Personalizada, para fins de pesquisa envolvendo o projeto de número 2022-0031, intitulado: **“Caracterização do perfil molecular e de expressão imuno-histoquímica no carcinoma colorretal de mulheres e homens do Hospital de Clínicas de Porto Alegre”**.

Atenciosamente,

HCPA  
Beatriz Chamun Gil  
Chefe da Unidade de Imunologia de  
Transplantes e Medicina Personalizada

---

Beatriz Chamun Gil

Chefe da Unidade de Imunologia de Transplantes e Medicina Personalizada

Serviço de Diagnóstico Laboratorial

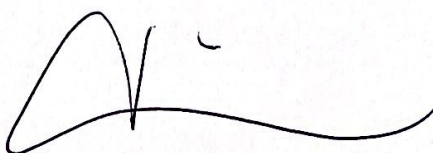
Porto Alegre, 21 de março de 2022.

**AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO - PLANILHAS IMUNO-HISTOQUÍMICA**

Ao Comitê de Ética em Pesquisa,

Autorizo a Pesquisadora Gabriela Remonato a acessar as planilhas de trabalho da Imuno-histoquímica, para fins de pesquisa envolvendo o projeto de número 2022-0031, intitulado: **"Caracterização do perfil molecular e de expressão imuno-histoquímica no carcinoma colorretal de mulheres e homens do Hospital de Clínicas de Porto Alegre"**.

Atenciosamente,



**HCPA**

Luis Fernando da Rosa Rivero

Médico - CREMERS 19828

CPF 553719810-04

---

Luis Fernando da Rosa Rivero

Chefe da Unidade de Diagnóstico

Serviço de Patologia

Porto Alegre, 21 de março de 2022.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

CAAE 56230122.2.0000.5327

Título do Projeto:

**Caracterização do perfil molecular e de expressão imuno-histoquímica no carcinoma colorretal de mulheres e homens do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é fazer um levantamento dos casos de câncer de intestino, as alterações genéticas que ele apresenta e se existe diferença entre mulheres e homens. Esta pesquisa está sendo realizada no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Não será necessário nenhum tipo de coleta de material biológico. Se você aceitar o convite, sua participação na pesquisa envolverá:

- **autorizar a utilização de uma pequena fração dos blocos de parafina de suas amostras obtidas na cirurgia ou biópsia, que estão arquivadas no Serviço de Patologia, para investigações de alterações genéticas que possam ter relevância no diagnóstico ou tratamento de futuros pacientes.**
- **autorizar a utilização das lâminas dos seus exames anatomopatológicos que estão arquivadas no Serviço de Patologia.**
- **autorizar o acesso ao seu prontuário para coleta de dados como sexo, idade e resultados de exames realizados no material obtido em cirurgia ou biópsia.**

O risco associado à participação na pesquisa é a possibilidade de quebra da confidencialidade dos dados. Contudo, os pesquisadores tomarão o cuidado para que isto não ocorra, utilizando sempre um código para identificação dos participantes.



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A utilização das suas amostras arquivadas no Laboratório de Patologia para a presente pesquisa não acarretará em gasto ou consumo do material, não havendo nenhum tipo de prejuízo para quaisquer novas pesquisas, exames ou investigações para os quais seja necessário uso do mesmo, permanecendo este à disposição do paciente e seu médico assistente.

Sua participação na pesquisa não trará benefícios diretos a você e aos outros participantes, porém, poderá contribuir para o aumento do conhecimento sobre as manifestações do câncer de intestino e a importância dos exames, podendo beneficiar futuros pacientes. Os resultados obtidos na pesquisa não terão influência sobre a conduta terapêutica adotada pela equipe assistencial.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

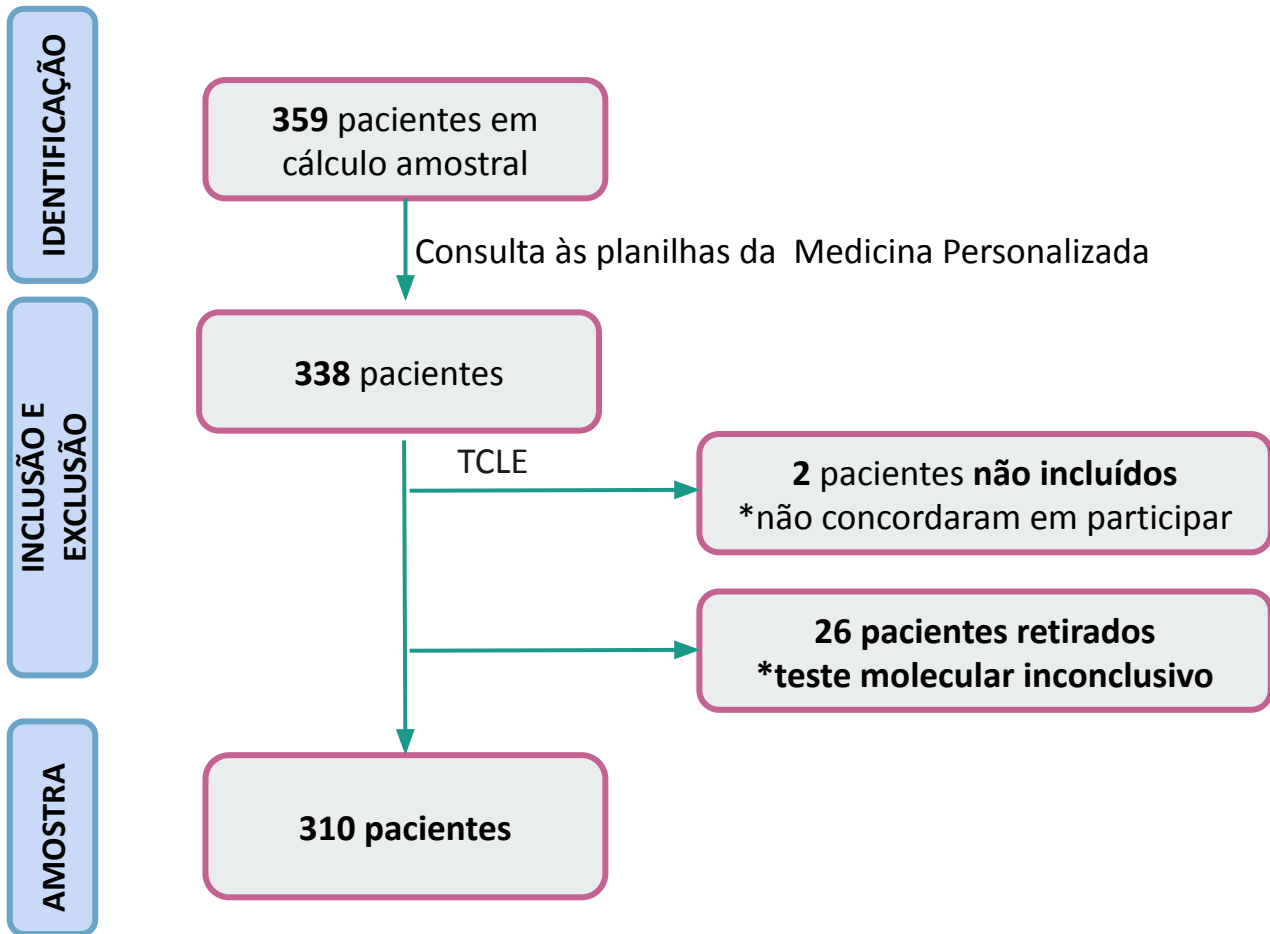
Caso você tenha dúvidas em relação a esta pesquisa ou a este Termo, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável: Lúcia Maria Kliemann, pelo telefone (051) 3359-8313, ou com Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo e-mail cep@hcpa.edu.br, telefone (51) 3359-6246 ou Av. Protásio

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Alves, 211 - Portão 4 - 5º andar do Bloco C - Rio Branco - Porto Alegre/RS, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Este Termo foi enviado aos participantes por meio eletrônico. Os pesquisadores armazenarão registro eletrônico (arquivo, imagem ou áudio) da concordância em participar do estudo.

Sugere-se que os participantes armazenem este arquivo eletrônico (salvar imagem ou arquivo em pdf) ou ainda imprimam este Termo.



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Caracterização do perfil molecular e de expressão imuno-histoquímica no carcinoma colorretal de mulheres e homens do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Pesquisador:** Lucia Maria Kliemann

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 56230122.2.0000.5327

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Patrocinador Principal:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 5.336.340

**Apresentação do Projeto:**

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo do projeto e das Informações Básicas da Pesquisa PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_ 1870239, de 30/03/2022.

**Introdução:**

O carcinoma colorretal (CCR) esta entre as formas de cancer mais diagnosticadas mundialmente, sendo a segunda causa de morte por cancer em mulheres e a terceira em homens. O desenvolvimento do CCR e um processo complexo, com varias etapas, que ocorre como resultado do acumulo de diferentes alteracoes geneticas e epigeneticas que afetam o processo de regulacao, controle da proliferacao e diferenciacao celular, apoptose e angiogenese. Pelo menos tres vias de carcinogenese molecular foram identificadas: via de instabilidade cromossomica (CIN) com acumulo de mutacoes em APC, P53, KRAS e BRAF; via de instabilidade de microssatelites (MSI), com mutacoes nos genes do MMR (Mismatch Repair) - MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 ou silenciamento do promotor de MLH1 por hipermetilacao; e via de metilacao das ilhas CpG (CIMP). Tecnicas moleculares e estudos de farmacogenomica estao ajudando a desenvolver um numero

**Endereço:** Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4

**Bairro:** Rio Branco

**CEP:** 90.440-000

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3359-6246

**Fax:** (51)3359-6246

**E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.336.340

consideravel de novas estrategias terapeuticas. Nos ultimos 30 anos, tem havido um aumento no interesse em fatores prognosticos, clinicos e moleculares no carcinoma colorretal. A introducao de medicamentos direcionados molecularmente, como cetuximabe, panitumumabe e bevacizumabe, mudou os algoritmos de tratamento e a sobrevida dos pacientes com CCR. A compreensao molecular abrangente do CCR ofereceu aos medicos uma maior variedade de opcoes de tratamento com base na selecao de biomarcadores, e tem ampliado as opcoes terapeuticas para um numero maior de pacientes. Desde o final dos anos 1990, a sobrevida global mediana (OS) para pacientes com CCR metastatico, aumentou de cerca de 12 meses em pacientes tratados com regimes quimioterapicos a base de 5-fluorouracil (5-FU), a aproximadamente 18 meses com a adicao de irinotecano e oxaliplatina. Com a adicao de medicamentos biologicos a quimioterapia, a sobrevida global aumentou para mais de 24 meses. O numero crescente de novos marcadores moleculares no CCR, o desenvolvimento da imunoterapia e a aprovacao de tratamentos agnosticos pelos orgaos reguladores, esta moldando um novo cenario para abordagens personalizadas mais eficientes para a gestao do CCR que inclui a selecao de terapia com foco no paciente. As informacoes sobre a biologia do CCR, juntamente com a identificacao de marcadores com valor prognostico e preditivo desempenham hoje um importante papel no tratamento de formas iniciais do CCR e na gestao da doenca avancada, oferecendo novas ferramentas para estimar a possibilidade de cura e, de forma mais geral, o desfecho da doenca no paciente.

Hipotese:

Hipotese nula: Nao ha associacao entre as mutacoes identificadas nos carcinomas colorretais entre si e com o genero feminino. Hipotese alternativa: Ha associacao entre as mutacoes identificadas nos carcinomas colorretais entre si e com o genero feminino.

Metodologia Proposta:

Buscando avaliar o perfil de expressao de proteinas por imuno-histoquimica, perfil molecular e do microambiente tumoral do carcinoma colorretal em pacientes atendidos no Hospital de Clinicas de Porto Alegre, sera realizado um estudo transversal. Metodos: 1) Pesquisa de prevalencia de mutacoes em BRAF, NRAS, KRAS - coleta de dados no AGHUse. Serao coletados no AGHUse, dados dos exames ja realizados em nosso Hospital para pesquisa das mutacoes dos genes BRAF, NRAS, KRAS, em resultados nos laudos de NGS (Next Generation Sequencing) emitidos pelo Programa de Medicina Personalizada desde 2018. Para o diagnostico de mutacoes, o Programa de Medicina Personalizada do HCPA utiliza o metodo de sequenciamento de nova geracao (Ion Torrent - PGM,

**Endereço:** Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4  
**Bairro:** Rio Branco **CEP:** 90.440-000  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-6246 **Fax:** (51)3359-6246 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.336.340

Thermo Fischer Scientific, servidor versão 5.0) utilizando painel customizado para identificação de mutações nos exons 18 a 21 do gene EGFR, KRAS (exons 1 e 2), NRAS (exons 1 e 2) e BRAF(exon 15). Os dados são analisados na plataforma de bioinformática Ion Torrent Suite e Ion Reporter versão 5.0, considerando uma cobertura mínima de 800x. As sequências NM\_005228.3 (EGFR), NM\_003336.3 (KRAS), MM\_002524.3 (NRAS) e NM\_004333.4 (BRAF) são utilizadas como referência. Os testes são realizados utilizando reagentes RUO (research use only), com validação interna. Os resultados coletados serão compilados em planilha própria e serão reportados como: ausência de mutação ou presença de mutação (descreve a mutação) no gene (descreve o gene), no exon (descreve o exon).2) Pesquisa de MMR - coleta de dados no AGHUseOs dados da pesquisa de MMR serão obtidos através da consulta aos laudos dos exames de imuno-histoquímica executados assistencialmente no Serviço de Patologia, onde é descrita a expressão ou perda da expressão (mutação) nas quatro proteínas do sistema MMR (MLH1, PMS2, MSH2 e MSH6). O Serviço de Patologia utiliza plataforma automatizada Benchmark ULTRA Ventana® para a realização dos protocolos imuno-histoquímicos com os seguintes anticorpos: anti-PMS2 clone A16-4 Ventana®, anti-MLH1 clone M1 Ventana®, anti-MSH2 clone G219-1129 Ventana® e anti-MSH6 clone SP93 Ventana®. Para o estudo, o resultado da pesquisa nos laudos será registrado e reportado como: expressão normal ou perda de expressão em cada uma das quatro proteínas do sistema MMR.3) Pesquisa de PD-L1 - experimental no Serviço de Patologia do HCPAA pesquisa de PD-L1 será realizada por imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti PD-L1 clone SP263 Ventana®, na plataforma automatizada BenchMark ULTRA Ventana®. Para tal, serão confeccionados na Unidade de Pesquisa Laboratorial do CPE, blocos de TMA (Tissue Microarray) a partir dos blocos do exame anatomopatológico de cada paciente. Cada bloco de TMA comportará 36 cilindros tumorais de 3mm, contendo triplicata de tumor para cada paciente. Desta maneira, cada bloco de TMA terá capacidade de 11 pacientes, além de um controle positivo para PD-L1, um controle positivo para NTRK (mencionado a seguir) e mais o controle negativo. Os resultados serão reportados em intensidade de expressão: ausente, fraca, moderada, forte.4) Pesquisa de NTRK - experimental no Serviço de Patologia do HCPA Com o mesmo bloco de TMA, serão analisadas, também por imuno-histoquímica em plataforma automatizada BenchMark ULTRA Ventana®, a presença de fusões NTRK, utilizando o anticorpo monoclonal anti pan-TRK, clone EPR17341, da marca Abcam. Os resultados serão reportados como positivo ou negativo para fusões NTRK.5) Análise do infiltrado linfocitário - experimental no Serviço de Patologia do HCPAA presença e a intensidade do infiltrado

**Endereço:** Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4  
**Bairro:** Rio Branco **CEP:** 90.440-000  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-6246 **Fax:** (51)3359-6246 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.336.340

linfocitario serao analisadas atraves das laminas da coloracao HE (Hematoxilina-Eosina) preexistentes no exame anatomopatologico original de cada paciente. Os resultados serao reportados em 4 niveis de intensidade: ausente, fraca, moderada, forte.

**Criterio de Inclusao:**

Serao incluidos casos de pacientes com diagnostico de CCR que ja tenham realizada pesquisa imuno-histoquimica de MSI (MMR) e testes moleculares para KRAS, NRAS e BRAF no HCPA no sitio primario do tumor.

**Criterio de Exclusao:**

Pacientes cujo resultado de quaisquer das pesquisas nao seja conclusivo ou adequado serao excluidos e menores de 18 anos.

**Metodologia de Analise de Dados:**

Visando contemplar o objetivo principal, sera realizada analise descritiva das variaveis categoricas, atraves de frequencias absolutas e relativas, com respectivos intervalos de confianca de 95%.

Para investigar a) a associacao entre infiltrado linfocitario, a expressao das quatro proteinas do sistema MMR, a expressao de PD-L1 e a localizacao tumoral (objetivo especifico 1) e b) a associacao do perfil molecular e imuno-histoquimico com seus parametros clinicos: idade, estadiamento tumoral e regio anatomica de localizacao do tumor (objetivo especifico 4), sera realizado teste de qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher.

Os demais estudos de prevalencia (objetivos especificos 2, 3, 5 e 6) serao realizados atraves de frequencias absolutas e relativas.

**Desfecho Primario:**

O estudo pretende, atraves de um melhor conhecimento da doenca e seu perfil de expressao na populacao local, auxiliar na tomada de decisoes nas acoes de diagnostico e tratamento, beneficiando os pacientes usuarios do Hospital de Clinicas de Porto Alegre.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primario:**

O objetivo geral deste estudo e avaliar o perfil de expressao de proteinas por imuno-histoquimica (instabilidade de microssatelites - MMR, PD-L1, NTRK), perfil molecular (KRAS, NRAS, BRAF) e do microambiente tumoral do carcinoma colorretal em pacientes homens e mulheres atendidos no Hospital de Clinicas de Porto Alegre, investigando a associacao destes achados com genero e

**Endereço:** Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4

**Bairro:** Rio Branco

**CEP:** 90.440-000

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3359-6246

**Fax:** (51)3359-6246

**E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.336.340

demais dados clínicos.

Objetivo Secundario:

1) Investigar a associacao entre infiltrado linfocitario, a expressao das quatro proteínas do sistema MMR (MLH1, PMS2; MSH2 e MSH6), expressao de PD-L1 e localizacao tumoral nas amostras de carcinoma colorretal;2) Investigar a frequencia de mutacoes somaticas nos genes KRAS (exons 2, 3 e 4), NRAS (exons 2, 3 e 4), BRAF (exon 15) utilizados como potenciais biomarcadores preditivos e de prognostico em diagnosticados com carcinoma colorretal;3) Avaliar a presenca de fusoes tropomiosina quinase (NTRK) nas amostras de carcinoma colorretal.4) Verificar a associacao do perfil molecular (mutacoes em KRAS, NRAS e BRAF) e imuno-histoquimico (sistema MMR, PD-L1, NTRK) das amostras de carcinoma colorretal dos pacientes estudados com seus parametros clínicos: idade, estadiamento tumoral e regio anatomica de localizacao do tumor. em mulheres e homens.5) Descrever a prevalencia das demais mutacoes identificadas atraves da plataforma de bioinformatica Ion Torrent Suite e Ion Reporter versao 5.0 e nao reportadas em laudo.6) Estratificar, entre mulheres e homens, os objetivos acima descritos, buscando diferencas na prevalencia.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

O estudo tem como principal risco a quebra de sigilo e confidencialidade.

Benefícios:

Ao investigar a populacao local, o estudo pode colaborar com a construcao de protocolos e politicas publicas para o fornecimento de exames e tratamento dos pacientes com diagnostico de carcinoma colorretal.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Ver conclusoes ou pendencias e lista de inadequacoes.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Ver conclusoes ou pendencias e lista de inadequacoes.

**Endereço:** Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4  
**Bairro:** Rio Branco **CEP:** 90.440-000  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-6246 **Fax:** (51)3359-6246 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.336.340

**Recomendações:**

Ver conclusões ou pendências e lista de inadequações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Análise das respostas dos pesquisadores:

1) Não fica claro no projeto de que forma os pesquisadores terão acesso ao banco de dados do serviço de Patologia e do Programa de Medicina Personalizada. Esse banco é de acesso restrito? Quem terá acesso a esse banco? Essas informações devem estar mais claras.

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: O banco é de acesso restrito. Após consultoria, conforme sugerido no parecer, foi seguida a orientação de contatar as chefias das unidades usuárias das planilhas e obter um documento de concordância deste acesso para consulta e extração de dados para essa pesquisa (anexos 5 e 6). A pesquisadora Gabriela Remonato é a única pessoa do projeto que terá acesso ao banco de dados, acesso esse que já existe pelo fato de ela ser contratada no HCPA e vinculada às duas unidades.

Informamos ainda que as informações sobre o acesso ao banco de dados foram acrescentadas à metodologia do projeto e os dados estão destacados no texto.

ANÁLISE: Pendência atendida.

2) Os autores propõem dispensa de TCLE, em virtude de pouco acesso a estes pacientes e do possível malefício que o contato com esses pacientes traria. Entretanto, a resolução do CFM No 2.169/2017, considera que "os laudos anatomopatológicos são parte integrante do prontuário médico e que as lâminas e os blocos histológicos dos mencionados procedimentos diagnósticos são propriedade do paciente, obrigados a arquivamento por cinco anos no serviço, em conformidade com a Resolução CFM no 1.472, de 10 de março de 1997, e o Parecer CFM no 13/1994". Sendo assim, para utilização de material arquivado no serviço de Patologia para exames com fins exclusivos de pesquisa nos últimos 5 anos, deve-se obter necessariamente o TCLE dos participantes da pesquisa. Sugere-se aos pesquisadores modificações nos métodos.

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: os métodos foram modificados e adequados às orientações do CEP.

- O screening de possíveis participantes para este projeto de pesquisa se dará, através de um pedido de Query pelo Qualitor a CGTIC, após a aprovação do projeto neste CEP. A Query terá os

**Endereço:** Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4  
**Bairro:** Rio Branco **CEP:** 90.440-000  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-6246 **Fax:** (51)3359-6246 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.336.340

parametros: a) filtros a serem aplicados: 1) Pacientes que realizaram os exames RAS e AKN a partir de 2018; 2) Pacientes que concordaram em ser contatados através do termo da LGPD no HCPA. . b) Colunas a serem recuperadas: 1) numero de prontuario, 2) nome do paciente, 3) contato (preferencialmente telefone para que possamos através de ligação convidar os participantes para a pesquisa e realizar o processo de consentimento livre e esclarecido para o presente projeto) e 4) informação sobre obito.

- O convite para a participação neste projeto se dará de duas maneiras. 1) Para pacientes cuja inclusão será prospectiva, os pacientes serão convidados presencialmente durante consulta assistencial e nesta ocasião assinarão o TCLE (Anexo 3). 2) Para pacientes que não estão vindo ao HCPA o contato será realizado através de ligação telefônica seguindo o roteiro (Anexo 4), nestes casos o paciente que aceitar participar poderá optar por qual meio deseja receber o TCLE (email ou whatsapp).

- Encaminhamos para avaliação do CEP/HCPA a dispensa de TCLE em caso de obito do paciente e também para aqueles em que for caracterizada a perda de seguimento. Será considerada perda de seguimento aqueles pacientes cujo telefone esteja desatualizado e por este motivo não for possível contatar e aqueles pacientes, cujo contato telefônico foi tentado pelo pesquisador por 5 vezes em turnos e dias diferentes e não foi possível realizar o convite.

ANÁLISE: Pendência atendida.

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

- Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS N.º 466/2012 e na Norma Operacional CNS/Conep N.º 001/2013, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

- O projeto está aprovado para inclusão ou revisão de registros de 359 participantes neste centro.

- Deverão ser apresentados relatórios semestrais e um relatório final.

- Os projetos executados no HCPA somente poderão ser iniciados quando seu status no sistema AGHUse Pesquisa for alterado para "Aprovado", configurando a aprovação final da Diretoria de Pesquisa.

- Textos e anúncios para divulgação do estudo e recrutamento de participantes deverão ser

**Endereço:** Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4

**Bairro:** Rio Branco

**CEP:** 90.440-000

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3359-6246

**Fax:** (51)3359-6246

**E-mail:** cep@hcpa.edu.br

**HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS**



Continuação do Parecer: 5.336.340

submetidos para apreciação do CEP, por meio de Notificação, previamente ao seu uso. A redação deverá atender às recomendações institucionais, que podem ser consultadas na Página da Pesquisa do HCPA.

- Eventos adversos deverão ser comunicados de acordo com as orientações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep (Carta Circular N.º 13/2020-CONEP/SECNS/MS). Os desvios de protocolo também deverão ser comunicados em relatórios consolidados, por meio de Notificação.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1870239.pdf	30/03/2022 17:58:16		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_apos_ligacao_telefonica.pdf	30/03/2022 17:57:32	Gabriela Remonatto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_presencial.pdf	30/03/2022 17:57:16	Gabriela Remonatto	Aceito
Outros	Roteiro_ligacao_telefonica.pdf	30/03/2022 17:53:14	Gabriela Remonatto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_versao_2.pdf	30/03/2022 17:34:39	Gabriela Remonatto	Aceito
Outros	Carta_resposta_pendencias_CEP_HCPA.pdf	30/03/2022 17:31:39	Gabriela Remonatto	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO_LUCIA_20220031.pdf	25/02/2022 12:42:04	Lucia Maria Kliemann	Aceito
Outros	LGPD.pdf	23/02/2022 17:04:38	Lucia Maria Kliemann	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

**Endereço:** Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4  
**Bairro:** Rio Branco **CEP:** 90.440-000  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-6246 **Fax:** (51)3359-6246 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.336.340

Não

PORTO ALEGRE, 07 de Abril de 2022

---

**Assinado por:**  
**Têmis Maria Félix**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4  
**Bairro:** Rio Branco **CEP:** 90.440-000  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-6246 **Fax:** (51)3359-6246 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br