ALEXANDRA KHICFY ALEX

A influência da instabilidade de microssatélites e outros biomarcadores nos desfechos clínicos de pacientes com câncer colorretal metastático: um estudo caso-controle

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Dra. Rachel Simões
Pimenta Riechelmann

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Alex, Alexandra Khichfy

A influência da instabilidade de microssatélites e outros biomarcadores nos desfechos clínicos de pacientes com câncer colorretal metastático : um estudo caso-controle / Alexandra Khichfy Alex. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientadora: Rachel Simões Pimenta Riechelmann.

Descritores: 1.Neoplasias colorretais 2.Instabilidade de microssatélites
3.Imuno-histoquímica 4.Neoplasias colorretais hereditárias sem polipose
5.Marcadores biológicos de tumor 6.Quimioterapia 7.Resultado do tratamento

USP/FM/DBD-062/16

Dedico este trabalho aos grandes amigos e a minha família, em especial, aos meus pais, Nelson Orlando da Silva Alex e Rosani Khichfy Alex, os quais sempre me apoiaram na concretização dos meus sonhos e me deram força em todos os percalços do caminho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma na confecção deste trabalho, principalmente, a minha orientadora Rachel Riechelmann que, além de grande pesquisadora, é amiga especial e, com certeza, tornou-se alicerce de minha jornada.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela assistência financeira prestada ao desenvolvimento deste estudo.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Tratamento atual do câncer colorretal metastático	2
1.2 Alguns biomarcadores estudados no câncer colorretal metastático	7
1.3 Justificativa do estudo	18
2 HIPÓTESES	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 Primário	23
3.2 Secundários	23
4 DESFECHOS.....	25
5 MÉTODOS.....	27
5.1 Desenho e seleção de pacientes	27
5.2 Avaliação de MSI.....	29
5.2.1 Estudo imuno-histoquímico das proteínas de reparo do DNA	29
5.3 Avaliação de outros biomarcadores: KRAS, NRAS e BRAF	30
5.4 Dados clínicos.....	30
5.5 Avaliação de resposta à quimioterapia.....	31
5.6 Considerações estatísticas.....	32
5.6.1 Plano de análise	32
5.6.2 Tamanho da amostra	33
6 RESULTADOS	36
6.1 Características clínicas	38
6.2 Características do tratamento	41

6.2.1 Características de acordo com o tipo de quimioterapia em primeira, segunda e terceira linhas de tratamento	44
6.2 Análises moleculares	47
6.2.1 Análise de dMMR.....	47
6.2.2 Análises de KRAS, NRAS e BRAF:	48
6.3 Associação entre status MMR e taxa de resposta: desfecho primário do estudo	49
6.3.1 Pacientes submetidos à QT de primeira linha baseada em oxaliplatina	49
6.3.2 Pacientes submetidos à QT de segunda linha baseada em irinotecano	50
6.3.3 Pacientes submetidos à QT de terceira linha com irinotecano e anti-EGFR	50
6.4 Associação entre status MMR e SG	52
6.5 Desfechos clínicos em pacientes provável HNPCC vs dMMR esporádico.....	54
7 DISCUSSÃO.....	58
8 ANEXOS.....	73
8.1 Anexo A: Escala de capacidade funcional (PS)	73
8.2 Anexo B: Taxa de resposta conforme RECIST 1.1 ⁷²	74
8.3 Anexo C: Análises univariadas e multivariadas dos fatores que influenciaram a resposta à quimioterapia baseada em oxaliplatina	76
8.3.1 Modelo 1:	76
8.3.2 Modelo 2:	76
9 REFERÊNCIAS	86

LISTA DE SÍMBOLOS

=	igual
p	ligação fosfodiéster
'	linha
+	mais
<	menor
m	metil
-	ausência de expressão proteica
%	por cento
+/-	mais ou menos (com ou sem)
x	versus

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	adenina
BRAF	<i>v - Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
BRAFm	BRAF mutado
C	citossina
C1	primeiro ciclo de quimioterapia
CCR	câncer colorretal
CCRM	câncer colorretal metastático
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i> (fenótipo da ilha CpG metilada)
CIN	<i>chromosomal instability</i> (instabilidade cromossômica)
CMS	<i>consensus molecular subtype</i> (subtipo molecular adotado pelo consenso)
CRCSC	<i>Colorectal Cancer Subtyping Consortium</i>
DATASUS - SIM	Portal de Informática do SUS - Sistema de Informação sobre Mortalidade
D1	primeiro dia de quimioterapia
DE	doença estável
dMMR	<i>deficient mismatch repair</i> (deficiência nas proteínas reparadoras do DNA)
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (receptor do fator de crescimento epidermal)
EV	endovenoso
FU	5-fluoruracil
G	guanina
GAPs	<i>GTPase activating proteins</i> (proteínas ativadoras da enzima GTPase)
GDP	guanosina difosfato

GEFs	<i>guanine nucleotide exchange factors</i> (fatores de troca de guanina)
GTP	guanosina trifosfato
GTPase	enzima hidrolase que se liga e hidroliza GTP
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HGNC	<i>HUGO Gene Nomenclature Committee</i>
HNPCC	<i>Hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i> (câncer colorretal hereditário não polipoide)
HR	<i>hazard ratio</i> (razão de risco)
HRAS	<i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
IC 95%	intervalo de confiança de 95%
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IMH	imuno-histoquímica
INCA	Instituto do Câncer
kDa	kilodalton
KRAS	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
KRASm	KRAS mutado
Linfócito Th-1	linfócito T-helper 1
LV	leucovorin
MAPK/ERK	<i>Mitogen-activated protein kinases/extracellular signal regulated kinases pathway</i> (via MAPK/ERK)
mFLOX	FLOX modificado
MMR	<i>mismatch repair</i> (proteínas de reparo do DNA)
MSI	<i>microsatellite instability</i> (instabilidade de microssatélites)
MSI-H	<i>microsatellite instability-high</i> (alta instabilidade de microssatélites)
MSS	<i>microsatellite stability</i> (estabilidade de microssatélites)
MSI-L	<i>microsatellite instability-low</i> (baixa instabilidade de microssatélites)
N	número de pacientes
NASBP	<i>National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project</i>

NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>
NRASm	NRAS mutado
NS	não significativo estatisticamente
OR	<i>odds ratio</i> (razão de chances)
PCR	reação em cadeia da polimerase
PD	progressão de doença
PD-1	<i>programmed death pathway</i> (via de morte programada)
pMMR	<i>proficient mismatch repair</i> (proficiência nas proteínas reparadoras do DNA)
PS	<i>performance status</i>
QT	quimioterapia
RAF	oncogenes RAF (especialmente, BRAF)
RAS	oncogenes RAS (especialmente, KRAS e NRAS)
RASm	RAS mutado
RC	resposta completa
R0	ressecção/cirurgia R0 (sem doença residual)
R1	ressecção/cirurgia R1 (com doença residual)
RECIST	<i>International Response Evaluation Criteria In Solid Tumors</i>
RFA	radiofrequência
RNM	ressonância magnética
RP	resposta parcial
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology End Results Reports</i>
SG	sobrevida global
SGM	sobrevida global mediana
SLD	sobrevida livre de doença
SLP	sobrevida livre de progressão
T	tímina
TCs	tomografias
TR	taxa de resposta

TS enzima timidilato sintetase

VEGF *Vascular Endothelial Growth Factor* (fator de
crescimento do endotélio vascular)

vs *versus*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos utilizados para análise imuno-histoquímica	30
Tabela 2	Características clínicas dos casos (dMMR) e controles (pMMR).....	40
Tabela 3	Características do tratamento sistêmico baseado em oxaliplatina.....	45
Tabela 4	Características do tratamento sistêmico baseado em irinotecano	46
Tabela 5	Características do tratamento sistêmico baseado em irinotecano + anti-EGFR	47
Tabela 6	Análise descritiva da perda de expressão das enzimas de reparo do DNA por IMH	48
Tabela 7	Análise descritiva de mutações nos genes KRAS, NRAS e BRAF nos casos (dMMR) e controles (pMMR).....	49
Tabela 8	Presença de RAS e BRAF (mutado ou selvagem) de acordo com status MMR	49
Tabela 9	Avaliação de resposta à quimioterapia baseada em oxaliplatina em primeira linha: análise por protocolo e por intenção de tratamento	51
Tabela 10	Avaliação de resposta à quimioterapia baseada em irinotecano (sem anti-EGFR) em segunda linha, e ao irinotecano + anti-EGFR em terceira linha.....	51
Tabela 11	Classificação de resposta	75
Tabela 12	Resultados das análises univariadas na relação entre resposta à quimioterapia e cada uma das variáveis independentes	77
Tabela 13	Resultados das análises univariadas na relação entre as variáveis independentes duas a duas.....	78

Tabela 14	Resultado do modelo de regressão logística multivariada para identificar os fatores que influenciaram a resposta à quimioterapia, considerando as variáveis independentes selecionadas por critério estatístico (p-valor $\leq$ 25% na relação com a resposta à quimioterapia): status MMR e ECOG	81
Tabela 15	Resultado do modelo de regressão logística multivariada para identificar os fatores que influenciaram a resposta à quimioterapia, considerando as variáveis independentes selecionadas por critério estatístico (variáveis independentes que não se relacionam ao nível de significância de 5% na comparação duas a duas): status MMR, Idade e ECOG.....	82
Tabela 16	Resultado do modelo de regressão logística multivariada para identificar os fatores que influenciaram a resposta à quimioterapia, considerando as variáveis independentes selecionadas por critério estatístico (variáveis independentes que não se relacionam ao nível de significância de 5% na comparação duas a duas): status dMMR recategorizado e redução de dose e/ou atraso na quimioterapia	82
Tabela 17	Resultado do modelo de regressão logística multivariada para identificar os fatores que influenciaram a resposta à quimioterapia, considerando as variáveis independentes selecionadas por critério clínico (status MMR, idade, sexo, ECOG e redução/atraso na quimioterapia).....	83
Tabela 18	Resultado do modelo de regressão logística multivariada para identificar os fatores que influenciaram a resposta à quimioterapia, considerando as variáveis independentes selecionadas por critério clínico (status MMR recategorizado, idade, sexo, ECOG e redução/atraso na quimioterapia)	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Seleção de pacientes.....	37
Figura 2	Sequência de tratamento nos pacientes dMMR.	41
Figura 3	Sequência de tratamento nos pacientes pMMR.	43
Figura 4	Relação entre resposta à quimioterapia e STATUS MSI/MMR recategorizado.	78
Figura 5	Relação entre as variáveis independentes duas a duas.....	80

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Comparação das curvas de SG entre os casos (dMMR) e controles (pMMR). A – análise por protocolo; B – análise por intenção de tratamento; C – análise de todos os pacientes da amostra.....53
- Gráfico 2** Comparação das curvas de SG entre os pacientes com possível síndrome de Lynch e os com provável dMMR esporádico. A – análise por protocolo; B – análise por intenção de tratamento; C – análise de todos os pacientes da amostra.....55

RESUMO

Alex AK. *A influência da instabilidade de microssatélites e outros biomarcadores nos desfechos clínicos de pacientes com câncer colorretal metastático: um estudo caso-controle* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016

INTRODUÇÃO: O câncer colorretal metastático (CCRm) é uma doença clinicamente e molecularmente heterogênea. Os pacientes apresentam diferentes prognósticos e respostas variáveis às terapias direcionadas contra o tumor. Alterações na função do sistema de reparo do DNA (*deficiency mismatch repair* – dMMR) estão associadas com o fenótipo de instabilidade de microssatélites e bom prognóstico em tumores de estágio inicial. No entanto, dMMR é raro no CCRm e pouco se sabe sobre sua influência na taxa de resposta (TR) ao tratamento. Nosso objetivo primário foi comparar a TR, de acordo com o status dMMR, nos pacientes com CCRm. Os desfechos secundários foram TR, conforme RAS e BRAF mutados, e a sobrevida global (SG), de acordo com dMMR. **MÉTODOS:** Estudo retrospectivo com grupo controle que comparou a TR por RECIST 1.1 em pacientes com CCRm, tratados com quimioterapia (QT) sistêmica, de acordo com o status dMMR. Os dados clínicos foram coletados, retrospectivamente, dos prontuários médicos. Todas as imagens foram digitais e recuperadas para avaliação de resposta por um único radiologista, cego quanto ao status dMMR. dMMR foi definido como a perda de expressão imuno-histoquímica em pelo menos um dos genes MMR (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2). Mutações em RAS e BRAF foram investigadas por meio de sequenciamento gênico. Os casos foram os pacientes com dMMR, e os controles, com MMR proficiente (pMMR), selecionados de forma consecutiva, em proporção de 1:2. Com base em características clínicas e moleculares, os indivíduos dMMR foram classificados como provável Lynch ou dMMR esporádico. Estatística descritiva foi usada para resumir os resultados. A associação entre dMMR e os resultados específicos de cada grupo foram analisados pelo teste do qui-quadrado, e para a avaliação de SG mediana, curvas de Kaplan-Meier e teste log-rank foram utilizados. Valores bicaudados de $p < 0.05$ foram considerados significativos. **RESULTADOS:** Entre janeiro de 2009 e janeiro de 2013, de 1270 pacientes, 762 foram elegíveis e rastreados para dMMR: N = 27 (3,5%) tiveram dMMR e N = 735 (96,5%) tiveram pMMR. Dada a raridade, foram incluídos 14 indivíduos com dMMR fora do período de inclusão, totalizando 41 casos (pacientes dMMR) e 84 controles (pacientes pMMR). Em análise por intenção de tratamento, considerando os pacientes que receberam pelo menos uma dose de QT baseada em oxaliplatina (N dMMR = 34), aqueles com dMMR apresentaram TR numericamente menor, comparados aos pMMR (11.7% vs 28.6%, OR: 0.33, IC 95%: 0.08-1.40, $p = 0.088$). Em análise por protocolo, incluindo apenas os

pacientes que preencheram os critérios de inclusão (N dMMR = 33), aqueles com dMMR mantiveram TR menor à QT baseada em oxaliplatina em primeira linha, em comparação aos doentes pMMR, embora estatisticamente não significativa (12.1% vs 28.6 %, OR: 0.34, IC 95%: 0.09-1.18, $p = 0.102$). Ainda neste contexto, os pacientes com possível Lynch apresentaram maior TR do que os indivíduos com provável dMMR esporádico (16% vs 0). Mutações em RAS ou BRAF não influenciaram na TR ou sobrevida. O status “provável dMMR esporádico” foi fator de pior prognóstico, quando todos os pacientes da amostra (N dMMR = 41) foram considerados. **CONCLUSÃO:** Este estudo sugere que dMMR é preditivo de resistência à quimioterapia baseada em oxaliplatina, como mostrado por outros estudos. Aparentemente, essa resistência é mais acentuada nos pacientes dMMR esporádicos, sugerindo heterogeneidade biológica nos doentes com CCRm e dMMR.

Descritores: neoplasias colorretais; instabilidade de microssatélites; imuno-histoquímica; neoplasias colorretais hereditárias sem polipose; marcadores biológicos de tumor; quimioterapia; resultado do tratamento.

ABSTRACT

Alex AK. *The influence of microsatellite instability and other biomarkers on the clinical outcomes of patients with metastatic colorectal cancer: a case-control study*. [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016

BACKGROUND: Metastatic colorectal cancer (mCRC) is a clinically and molecularly heterogeneous disease, where patients present different prognosis and variable responses to cancer-directed therapies. Alterations in the function of DNA deficiency mismatch repair (dMMR) genes are associated with microsatellite instability and good prognosis in early stage tumors. However dMMR dysfunction is rare in mCRC and little is known about its influence on treatment response rate (RR). Our primary endpoint was to compare the RR of mCRC patients according to dMMR status and to explore differences between patients with likely sporadic versus likely Lynch-related tumors. Secondary endpoints were RR according to RAS and BRAF mutation status, and survival times as per dMMR status. **METHODS:** Retrospective study with control group that compared the RR by RECIST 1.1 in patients with mCRC treated with systemic chemotherapy according to dMMR status. Clinical data were collected retrospectively from medical charts. All images were digital and were retrieved for response evaluation by a single radiologist blinded to dMMR results. dMMR status was defined as loss of immunohistochemistry expression in at least one of the MMR genes (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2). RAS and BRAF mutations were investigated through next generation sequencing. Cases were defined as dMMR and controls, as proficient MMR (pMMR) patients, in a 1:2 fashion. Based on clinical and molecular features, dMMR patients were classified as likely Lynch or sporadic. Descriptive statistics was used to summarize the results. The association between dMMR and outcomes of each group were analyzed by chi-square test; estimates of median overall survival were done by the Kaplan-Meier method and comparisons, by the log-rank test. Two-tailed p values <0.05 were considered significant. **RESULTS:** From January 2009 to January 2013, out of 1270 patients, 762 were eligible and screened for dMMR: N = 27 (3.5%) had dMMR and N = 735 (96.5%) had pMMR. Given the rarity, 14 dMMR cases outside the inclusion period were included, with a total of 41 cases (dMMR patients) and 84 controls (pMMR patients). By intention-to-treat analysis, considering all patients who received at least one dose of oxaliplatin-based chemotherapy (N dMMR = 34), those with dMMR had numerically lower RR, compared with pMMR (RR = 11.7% vs 28.6%, OR: 0.33, 95% CI: 0.08-1.40, p = 0.088). As per protocol analysis, considering only the patients who met inclusion criteria (N dMMR = 33), those with dMMR status persisted with numerically, but non-significant, lower RR to first-line oxaliplatin-based chemotherapy compared with pMMR (12.1%

vs 28.6%, OR: 0.34, 95% CI: 0.09-1.18, $p = 0.102$); also, patients with likely Lynch-related mCRC presented higher RR than subjects with probable sporadic dMMR (16% vs 0). Either survival or RR was influenced by RAS or BRAF mutations. Probable sporadic dMMR status was a poor prognostic factor when all patients in the sample ($N_{\text{dMMR}} = 41$) were analyzed. **CONCLUSION:** This study suggests that the dMMR phenotype is predictive of resistance to oxaliplatin-based chemotherapy, as shown by other studies. Apparently, such resistance is more pronounced in the sporadic dMMR patients, suggesting biological heterogeneity within the dMMR mCRC patients.

Descriptors: colorectal neoplasms; microsatellite instability; immunohistochemistry; colorectal neoplasms, hereditary nonpolyposis; tumor markers, biological; drug therapy; treatment outcome.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tratamento atual do câncer colorretal metastático

O câncer colorretal (CCR) é uma doença comum e fatal. Enquanto as taxas de mortalidade têm declinado progressivamente desde a década de 80 nos Estados Unidos e em outros países ocidentais, elas vêm aumentando em países menos desenvolvidos, particularmente, no Leste Europeu, América do Sul e Central.¹ No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), quando comparado com outros tumores, o CCR representou a quinta causa de morte em homens e a terceira, em mulheres, entre 1998 e 2007. Em 2013, houve declínio da taxa de mortalidade por CCR tanto em homens quanto em mulheres - ocorreram 15.414 mortes (7.387 no sexo masculino e 8.024 no sexo feminino), de acordo com o Portal de Informática do SUS – Sistema de Informação sobre Mortalidade (DATASUS – SIM).²

Apesar dos avanços em diagnóstico e tratamento, a mortalidade causada por este tumor continua alta, de tal forma que, a taxa de sobrevida global (SG) em 5 anos tem sido de 55% nos países desenvolvidos e de 40% nos países em desenvolvimento.² Os Estados Unidos têm uma das maiores taxas de sobrevida e dados coletados do *Surveillance Epidemiology End Results Reports* (SEER) sugerem que, aproximadamente, 65% dos pacientes tratados para CCR, incluindo todos os estádios, estão vivos em 5 anos.³ A melhora no prognóstico pode ser atribuída à maior detecção e remoção de pólipos colônicos, ao aumento do diagnóstico da doença em fases iniciais, maior acesso a tratamento, incremento nos cuidados de suporte, surgimento de tratamentos mais efetivos, em particular, de quimioterapia (QT) adjuvante e terapia alvo molecular, e aumento da prática de ressecção de metástases hepáticas¹. Porém, 25% dos indivíduos com CCR já apresentam metástases no momento do diagnóstico e 40 a 50% irão desenvolvê-las ao longo do tempo.⁴ O prognóstico para estes pacientes é

ruim, embora QT paliativa tenha demonstrado aumento de sobrevida e melhora na qualidade de vida, quando comparada com os melhores cuidados de suporte.⁵

Terapia baseada em 5-fluoruracil (FU) e leucovorin (LV) tem sido o tratamento base do câncer colorretal metastático (CCRm) por mais de 40 anos, com taxas de resposta (TR) entre 10 e 15% e SG mediana (SGM) de 6 a 9 meses.⁶ Com o surgimento de outras drogas, como oxaliplatina e irinotecano, a sobrevida dos pacientes quase dobrou.⁷ O uso da oxaliplatina no estágio IV foi avaliada por De Gramont *et al.*⁸ em um estudo de fase III, no qual 420 pacientes foram randomizados para receberem em um braço, FU infusional e LV, em esquema quinzenal, e o mesmo regime com oxaliplatina (FOLFOX4) em outro braço. Houve aumento da sobrevida livre de progressão (SLP) (6.2 vs 9 meses, $p = 0.0001$) e melhores TR (22.3% vs 50.7%, $p = 0.0001$) a favor da oxaliplatina; no entanto, não houve aumento de SGM (14.7 vs 16.2 meses, $p = 0.12$). Douillard *et al.*,⁹ em estudo de fase III, também demonstraram que irinotecano associado ao FU infusional e LV (FOLFIRI) é superior ao FULV no tratamento de pacientes com CCRm, sem QT prévia, com maiores TR (49% vs 31%, $p < 0.001$), tempo mediano para progressão (6.7 vs 4.4 meses, $p < 0.001$) e SGM (17.4 vs 14.1 meses, $p = 0.031$). O estudo BICC-C, envolvendo 430 pacientes, mostrou que FOLFIRI apresenta menor toxicidade do que IFL (FU em bolus e irinotecano), com aumento de SLP (7.6 vs 5.9 meses, $p = 0.004$) e uma tendência a maior SG.¹⁰ Tanto as sequências FOLFOX, seguido de FOLFIRI, quanto FOLFIRI, seguido de FOLFOX foram estudadas e não houve diferenças em TR (54% vs 56%, $p = 0.26$), SLP (10.9 vs 14.2 meses, $p = 0.64$) ou SGM (20.6 vs 21.5 meses, $p = 0.99$) entre elas; diferem somente quanto às toxicidades.¹¹

Baseado no estudo NSABP C-07 (conduzido pelo grupo americano do *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*), que demonstrou a eficácia da adição de oxaliplatina ao FULV (esquema FLOX) em pacientes com CCR estágio III,¹² adotamos este regime no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) como tratamento de primeira linha para o CCRm. Esta decisão foi baseada na premissa de que a eficácia do FLOX é

semelhante à do FOLFOX, mas com menor custo para o sistema público. Nossos dados retrospectivos sugerem que FLOX modificado (mFLOX - redução da dose de leucovorin) oferece SGM de 19 meses, semelhante à reportada com FOLFOX-6 (20.2 meses). Nosso estudo também demonstrou que mFLOX é custo-efetivo para o Sistema Único de Saúde.¹³

Na segunda linha, irinotecano monodroga é utilizado após falha de esquemas contendo oxaliplatina e FU. Dois estudos de fase III mostraram superioridade em termos de SG do irinotecano, 300-350 mg/m² endovenosos (EV), a cada 3 semanas, em tratamento de segunda linha. O primeiro comparou irinotecano e melhores cuidados de suporte vs cuidados de suporte apenas, apresentando maior taxa de sobrevida em 1 ano (36.2% vs 13.8%, $p = 0.0001$) e melhor qualidade de vida a favor da QT.¹⁴ O segundo comparou irinotecano vs FU infusional e, também, demonstrou aumento de sobrevida em 1 ano (45% vs 32%, $p = 0.035$), além de maior SLP (4.2 vs 2.9 meses, $p = 0.030$).¹⁵ Desta forma, no ICESP, utilizamos irinotecano monodroga como tratamento de segunda linha do CCRm.

Com a adição de drogas de alvo molecular ao tratamento sistêmico, observou-se novo incremento na sobrevida dos pacientes com CCRm. Porém, estas terapias-alvo podem ser efetivas apenas em subpopulações específicas de pacientes, além de não sabermos dizer, ao certo, quem terá maior ou menor benefício com elas. Semelhante ao que acontece no câncer de mama, no qual o conhecimento de biomarcadores já faz parte das decisões terapêuticas,¹⁶ os aspectos moleculares podem ajudar a selecionar melhor os indivíduos com CCRm para determinada terapia, como aqueles com KRAS mutado (KRASm) para não receberem cetuximabe ou panitumumabe, por exemplo. No estudo OPUS, fase II, comparou-se cetuximabe + FOLFOX-4 vs FOLFOX-4 isolado, e o grupo com tumores KRAS selvagem apresentou aumento de resposta objetiva (61% vs 37%, $p = 0.011$) e um modesto aumento na SLP (7.7 vs 7.2 meses, $p = 0.0163$), favorecendo os pacientes que receberam cetuximabe.¹⁷ No estudo CRYSTAL, fase III, com 1217 pacientes, a combinação cetuximabe + FOLFIRI, em pacientes sem tratamento prévio, demonstrou aumento

significativo na TR objetiva (46.9% vs 38.7%, $p = 0.004$) e na SLP (8.9 vs 8 meses, HR = 0.85, IC 95%: 0.72-0.99, $p = 0.048$), comparada com FOLFIRI isolado. Quando apenas pacientes com tumores KRAS selvagem (códon 12 e 13 avaliados) foram analisados, houve maiores TR objetiva (59.3% vs 43.2%, $p = 0.0025$), SLP (9.9 vs 8.7 meses, $p = 0.02$) e SG (25 vs 21 meses, $p = 0.22$), favorecendo o braço do anticorpo.⁴ Quando se amplia a avaliação RAS/RAF para KRAS exons 3 e 4, NRAS exons 3 e 4 e BRAF exon 15, a magnitude de benefício em TR e SGM aumenta ainda mais, de forma significativa, para o subgrupo RAS/RAF todos selvagens.^{18,19} Estes dados corroboram o benefício dos anti-EGFR na população RAS selvagem.

Tanto cetuximabe quanto panitumumabe, antes mesmo de suas aprovações no tratamento de primeira e segunda linhas do CCRm, já se mostravam superiores aos melhores cuidados de suporte nos pacientes com KRAS selvagem que falhavam aos regimes baseados em oxaliplatina, irinotecano e FU. Os estudos mostraram aumento da SLP com cetuximabe (HR: 0.68, IC 95% 0.57-0.80, $p < 0.001$)²⁰ e panitumumabe (HR: 0.54, IC 95%, 0.44-0.66, $p < 0.0001$),²¹ assim como vantagem significativa em SG (HR: 0.77, IC 95%: 0.64-0.92, $p = 0.005$) a favor de cetuximabe,²⁰ quando estas drogas foram comparadas com melhores cuidados de vida. Em nosso serviço, usamos o anticorpo monoclonal anti-EGFR + irinotecano após falha de irinotecano monodroga. Um dos seguintes esquemas pode ser utilizado, a depender da disponibilidade do anticorpo: cetuximabe (500 mg/m²) + irinotecano (180 mg/m²), ambos a cada 15 dias, baseado no estudo BOND, com 329 pacientes, o qual comparou irinotecano + cetuximabe vs cetuximabe em terceira linha e mostrou maiores TR (22.9% vs 10.8%, $p = 0.007$) e tempo mediano para progressão (4.1 vs 1.5 meses, $p < 0.001$) a favor da combinação. A SGM foi de 8.6 vs 6.9 meses, respectivamente ($p = 0.48$).²² Ou o regime de panitumumabe (6 mg/Kg) + irinotecano (180 mg/m²), quinzenalmente, de acordo com estudo de fase II, com 65 pacientes, demonstrando TR objetiva de 29.2%, SGM de 9.7 meses e SLP de 5.5 meses.²³

No entanto, ainda são necessários mais trabalhos a respeito de marcadores preditivos de resposta tumoral que sejam realmente eficazes. Neste contexto, observa-se um grande interesse em conhecer o perfil molecular dos tumores para que a terapia contra o câncer seja, cada vez mais, individualizada. O status KRAS_m mostrou-se ser um forte preditor negativo na resposta aos anticorpos anti-EGFR e, mesmo na subpopulação KRAS selvagem, somente 40% respondem às medicações. Por exemplo, no estudo de fase III, PRIME, com 1183 pacientes, a combinação FOLFOX4 + panitumumabe vs FOLFOX4 melhorou a SLP (9.6 vs 8.0 meses; HR: 0.80, IC 95%: 0.66-0.97, $p = 0.02$) nos pacientes KRAS selvagem; no entanto, na subpopulação KRAS_m, a SLP foi significativamente reduzida no braço com panitumumabe (HR: 1.29, IC 95%: 1.04-1.62, $p = 0.02$) e a SGM foi de 15.5 vs 19.3 meses, respectivamente (HR: 1.24, IC 95%: 0.98-1.57, $p = 0.068$).¹⁸ Estes dados corroboram a contra-indicação desta droga, quando KRAS ou NRAS estão mutados (RAS_m).

Além de mutações em KRAS ou NRAS, mutações em BRAF também conferem resistência às drogas anti-EGFR. Quando isto acontece, geralmente, usa-se outras medicações alvo moleculares no tratamento do CCR_m, como os anti-VEGF, dentre os quais o bevacizumabe é o anticorpo monoclonal mais estudado. Uma metanálise com cinco estudos (três estudos de fase III e dois estudos de fase II), com 3037 pacientes, comparou bevacizumabe + QT vs QT isolada em primeira linha (4 estudos) e segunda linha (1 estudo), mostrando vantagens para o braço bevacizumabe + QT (FU ou oxaliplatina [FOLFOX/XELOX] ou irinotecano [IFL]) em termos de SG (HR: 0.79, IC 95%: 0.69-0.90, $p = 0.0005$), SLP (HR 0.63, IC 95% 0.49-0.81, $p = 0.0004$) e TR (RR 1.5, IC 95% 1.06-2.10, $p = 0.02$).²⁴ Outra medicação anti-VEGF desenvolvida é o aflibercept. Um estudo de fase III, com 1226 pacientes, comparou aflibercept + FOLFIRI vs placebo + FOLFIRI em segunda linha e demonstrou aumento na SG (HR: 0.817, IC 95%: 0.713-0.937, $p = 0.0032$), com SGM de 13.5 vs 12 meses a favor da combinação aflibercept + FOLFIRI. Também houve incremento significativo na SLP (HR: 0.758, IC 95%: 0.661-0.869, $p < 0.0001$) e na TR (19,8% vs 11.1%, $p <$

0.0001), quando o anti-VEGF foi usado.²⁵ Aflibercept não está aprovado para comercialização no Brasil. A mais recente incorporação ao tratamento do CCRm é o inibidor de tirosino-quinase, regorafenibe, outra droga pertencente à classe dos anti-angiogênicos que, no estudo CORRECT, fase III, com 760 indivíduos, mostrou benefício em SGM de 6.4 vs 5 meses (HR = 0.77, $p = 0.0052$) e na taxa de controle de doença aos 2 meses de 41% vs 14.9% ($p = 0.000001$), quando comparado com melhores cuidados de suporte.²⁶ Regorafenibe também não está disponível.

Ainda existem dúvidas quanto a melhor sequência de regimes quimioterápicos e de suas combinações com as drogas anti-EGFR e anti-VEGF no tratamento do CCRm. Por enquanto, permanece o conceito de que todas as classes medicamentosas, se possível, devem ser utilizadas. A terapêutica deste tumor que, antes, era somente baseada em FU e LV, atualmente, conta com um arsenal medicamentoso bem maior e, sem dúvida, a grande evolução está no conhecimento de que os testes moleculares são cada vez mais imprescindíveis para o melhor manejo desta doença.

1.2 Alguns biomarcadores estudados no câncer colorretal metastático

O CCR é uma doença heterogênea e o tradicional estadiamento patológico parece não ser suficiente para prever o prognóstico destes tumores, cuja história natural correlaciona-se fortemente com alterações genéticas, as quais ocorrem durante a progressão do adenoma ao carcinoma à doença metastática.²⁷ Recentemente, foi criado um consenso por mais de 15 instituições (*Colorectal Cancer Subtyping Consortium - CRCSC*) que estabeleceu um novo paradigma para a definição de subtipos de CCR, identificando quatro grupos (CMS 1-4) com características clínicas, moleculares e de vias de sinalização distintas e, ainda, com diferentes prognósticos. Os subtipos são:²⁸

- a) CMS 1 (14%): tumores com MSI (instabilidade de microssatélites) e BRAF mutado (BRAFM). Encontrado mais frequentemente no cólon ascendente, em mulheres e idosos;
- b) CMS 2 (42%): doença epitelial, com MSS (estabilidade de microssatélites), mutação de TP53, alta instabilidade cromossômica (CIN) e ativação da via WNT/MYC. Encontrado mais em cólon descendente;
- c) CMS 3 (8%): doença epitelial, com heterogeneidade de MSI e CIN, KRASm e hiperexpressão de IGFBP2;
- d) CMS 4 (20%): doença mesenquimal, com CIN e MSI, ativação de TGF-beta e VEGF e superexpressão de NOTCH3;
- e) Não classificados (16%): infiltração imune e estromal e ativação epitelial-mesenquimal variável.

A sobrevida após a recidiva foi significativamente distinta entre todos os grupos ($p = 0.0004$) e CMS 2 mostrou os melhores resultados (CMS 1 vs CMS2 [HR: 2.3, IC95%: 1.4-3.8, $p = 0.001$]; CMS 4 vs CMS 2 [HR: 1.5, IC 95% 1.1-2.1, $p = 0.008$]).²⁸ No entanto, ainda não se sabe o valor preditivo de resposta e de sensibilidade diferencial às drogas destes subtipos. Para isso, torna-se cada vez mais importante o conhecimento aprofundado dos aspectos moleculares do CCR, incluindo não só o papel dos oncogenes (KRAS, NRAS e BRAF), mas, também, da deficiência do sistema de reparo do DNA (dMMR), a qual leva ao fenótipo MSI.

A seguir, descrevemos alguns dos biomarcadores mais utilizados na prática clínica atual para decisão terapêutica:

KRAS, NRAS: Proto-oncogenes RAS (HRAS, KRAS e NRAS) codificadores de uma família de proteínas altamente homólogas, que se diferenciam somente nos 40 aminoácidos C-terminais e, por terem peso de 21 kDa, são denominadas p21, além de, convencionalmente, serem chamadas de k-, n-, h-ras. Estas proteínas encontram-se ancoradas na superfície interna da membrana plasmática em localizações distintas, sugerindo a existência de diferenças biológicas importantes entre as vias de

sinalização das isoformas ras.²⁹ Em alguns tipos celulares, o proto-oncogene KRAS pode ser expresso sozinho, enquanto H e NRAS são sempre expressos na presença de outra isoforma. Isto leva a crer que KRAS tem função única, diferente de H e NRAS, que seriam funcionalmente redundantes.³⁰ Segundo Fotiadou *et al.*,³¹ N-RAS regula a adesão celular, enquanto K-RAS coordena sua motilidade.

Proteínas ras exibem dois estados distintos: ligadas à GTP (ativas) ou à GDP (inativas), e apenas as formas ligadas à GTP (GTPase) são capazes de mediar a resposta à proliferação celular. A mudança de estado quanto à ligação à GTP ou GDP ocorre por ação intrínseca, realizada por duas classes de proteínas: os fatores de troca de nucleotídeos guanina (*guanine nucleotide exchange factors* – GEFs) e as proteínas ativadoras de GTPase (*GTPase activating proteins* – GAPs). Os GEFs estimulam a dissociação do GDP e a ligação à GTP do citosol, resultando na formação do estado GTP-ligante ativo. Diferentemente, as GAPs reconhecem a forma GTP-ligante e direcionam a atividade intrínseca de GTPase, o que aumenta a velocidade de hidrólise da GTP e a inativa pela formação da proteína GDP-ligante. Assim, um conjunto diversificado de sinais extracelulares (fatores de crescimento, citocinas, hormônios e neurotransmissores) estimula receptores da superfície celular, como o receptor transmembrana do fator de crescimento epidérmico (EGFR), e ativa as proteínas RAS. Uma vez ativadas, elas transmitem os estímulos extracelulares para o citoplasma da célula por meio de uma cascata de transdução de sinal, a via RAS-RAF-MEK-ERK, que regula o crescimento, diferenciação e apoptose celulares.³²

Quando ocorrem mutações ativadoras nos genes RAS, as proteínas p21 mutantes têm menor interação com GAPs e ligação permanente à GTP. Dessa forma, p21 permanece ativa mesmo na ausência de sinais de regulação e mantém sinalização contínua para o núcleo e uma forte estimulação para a proliferação celular. Enquanto as formas selvagens de RAS inibem o crescimento celular desorganizado e a formação de colônias, os alelos mutantes induzem fortemente esses eventos. Em algumas células, a expressão da forma selvagem deve ser significativamente mais alta que a

mutante para inibir tais eventos, do contrário, é possível a transformação neoplásica pelo oncogene RAS mesmo na presença da forma selvagem.³³

Mutações em RAS, principalmente nos exons 2 e 3 (códon 12, 13 e 61), ocorrem em aproximadamente 20% de todos os cânceres humanos. A maioria está no gene KRAS (85%), depois, em NRAS (15%) e HRAS (1%). Mutações em KRAS, principalmente nos códon 12 e 13, estão presentes em 35-45% dos casos de CCR como evento precoce na carcinogênese, enquanto em NRAS, estão somente em 3-5% destes tumores.^{34,35} De acordo com dados recentes, 12-17% dos pacientes com KRAS selvagem (exon 2 – códon 12 e 13) podem ter uma mutação nos exons 3 e 4 e no NRAS, exons 2, 3 e 4.³⁶

Até 90% das mutações ativadoras do gene RAS são detectados nos códon 12 e 13, e os tipos mais frequentes de mutações KRAS no CCR são transições G para A e transversões G para T. A troca de diferentes aminoácidos em sítios catalíticos resulta em mutações distintas de KRAS e NRAS, as quais são responsáveis, também, por diferentes níveis de redução da atividade GTPase intrínseca. Isto implica em efeitos variáveis sobre a biologia da doença. Porém, o significado clínico das mutações KRAS e NRAS, exceto nos códon 12 e 13, ainda não está claro. São necessários mais estudos que correlacionem aspectos clínicos e as mutações que ocorrem nos códon 15, 61, 117 e 146.³⁶

Não sabemos qual o impacto destas mutações frente à resposta à QT nos pacientes com tumores de fenótipo MSI vs MSS.

BRAF: Gene conhecido com três nomenclaturas alternativas: oncogene BRAF, BRAF1 e RAFB1. O símbolo oficial aprovado pelo *HUGO Gene Nomenclature Committee* (HGNC) é BRAF, que corresponde ao homólogo humano B1 do oncogene viral do sarcoma de murino v-raf.³⁷ Este gene codifica a proteína-kinase serina-treonina, a qual contém 766 aminoácidos e peso molecular de, aproximadamente, 84 kDa.³⁸ Sua função está relacionada à transdução de sinais mitogênicos da membrana celular para o núcleo das células via MAPK. Para ativar esta via, RAS promove a dimerização de membros da família RAF (ARAF, BRAF, CRAF), iniciando

uma cascata de sinalização por meio da fosforilação de proteínas MEK e ERK – fosfato MEK e ERK (via MAPK). ERK finalmente é capaz de levar este sinal para o interior do núcleo e ativar a expressão de fatores de transcrição importantes para a ativação de genes envolvidos em diversos processos celulares vitais, como proliferação e diferenciação celulares.³²

Em mamíferos, a proteína A-raf é predominantemente encontrada em tecidos urogenitais; B-raf é altamente expressa em neurônios e testículos e, em menores níveis, nas células hematopoiéticas, colorretais e na tireoide; e C-Raf (RAF1) é expressa de modo ubíquo.³⁹

Mutações em BRAF são importantes na carcinogênese do CCR e estão presentes em aproximadamente 10% dos casos. A alteração mais importante é a substituição do aminoácido valina por glutamina no códon 600 (V600E), que leva à ativação aberrante da via MEK-ERK/MAPK. Mutações em BRAF e KRAS costumam ser eventos mutuamente exclusivos nos tumores. Alterações em BRAF ocorrem mais frequentemente em tumores com MSI, quando comparados àqueles com MSS e conferem pior prognóstico.³⁴ Ben Tran *et al.*,⁴⁰ em análise retrospectiva de 524 pacientes com CCRm e status BRAF conhecido, mostraram maior SGM para os tumores MSS vs MSI (34.7 vs 10.4 meses, $p < 0.001$), provavelmente, devido à maior associação dos segundos com BRAFm, diferente do que acontece na doença em estágio precoce, na qual MSI é fator de melhor prognóstico. Ainda não sabemos qual o impacto das mutações BRAF frente à resposta à QT nos pacientes com tumores de fenótipo MSI vs MSS.

MLH1, MSH2, MSH6, PMS2: principais genes responsáveis por correções de bases nitrogenadas desorganizadas e de pequenas deleções ou inserções que ocorrem durante a replicação do DNA – são genes reparadores do DNA (*mismatch repair* – MMR). Mutações em pelo menos um deles, na linha germinativa, levam ao genótipo/fenótipo MSI. O status MSI germinativo é encontrado em 2-5% dos tumores colorretais e parece ser o defeito genético subjacente na maioria das famílias com CCR hereditário (*Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer* – HNPCC – câncer colorretal não polipoide hereditário), no qual todas as células dos indivíduos afetados

carreiam um alelo não funcionante de um gene MMR. Quando as alterações ocorrem em células somáticas, fazem parte da carcinogênese dos tumores esporádicos (15% dos casos) que, ao contrário da doença hereditária, não carregam uma mutação qualquer ou perda de somente um alelo nos genes MMR, e sim mudanças epigenéticas, como a hipermetilação das regiões promotoras de ambos os alelos do gene MLH1 (principalmente) – o chamado fenótipo CIMP (fenótipo da ilha CpG metilada).^{41,42} A hipermetilação consiste na exacerbada adição de um grupo metila à citosina dos pares de base C-G (citosina-guanina) do DNA. Este fenômeno ocorre em duplas de pareamento de bases: 5' mC p G3' e 3'G p mC 5' ("mC" representa a metilcitosina, e "p" indica a ligação fosfodiéster entre as bases de uma fita de DNA), e a estrutura pode ser abreviada para mCpG. Os dinucleotídeos CpG são áreas com densidade muito mais alta de C e G do que qualquer outra região do genoma e são conhecidas como "ilhas CpG". As citosinas que estão próximas a essas ilhas, normalmente, não estão metiladas e este estado "não metilado" conduz a transcrição, a qual fica restrita aonde o DNA encontra-se metilado.⁴³ Embora o estímulo que impulsione este fenômeno permaneça desconhecido, CpG metilado é "abrigado" por uma família de proteínas de ligação de domínio metil-CpG, formando um complexo multiproteico que altera a conformação da cromatina e silencia a expressão gênica.⁴⁴ Isto ocorre em alguns genes supressores do tumor, como p16, p14, MGMT e MLH1, favorecendo a carcinogênese. A hipermetilação de MLH1 (CIMP) é um dos mecanismos que leva ao fenótipo MSI esporádico.⁴⁵

Os genes MLH1 e MSH2 são os mais afetados pela perda de função no CCR, mas outros genes também participam do reparo do DNA e podem dar origem a erros de replicação através do genoma. Estes erros afetam, preferencialmente, TGF β RII, IGF2R e BAX, os quais contêm microssatélites em sua região codificadora, e o acúmulo de alterações nas sequências curtas de bases nucleotídicas, que são repetidas dezenas a centenas de vezes dentro do genoma (microssatélites), é o que vai caracterizar o genótipo MSI. Assim, a instabilidade de microssatélites cria um estado

favorável para o acúmulo de mutações em genes vulneráveis, os quais controlam atividades biológicas críticas das células e estas alterações podem levar ao desenvolvimento do câncer. Além disso, o status MSI está associado com ganho de funções em oncogenes, como mutações no gene BRAF.³⁴

A deficiência de MMR tem sido frequentemente avaliada por PCR (reação em cadeia da polimerase) e eletroforese capilar ou pela análise imuno-histoquímica (IMH) da perda de expressão das proteínas de reparo do DNA. O procedimento de comparação eletroforético entre o tecido tumoral e normal para a análise de MSI segue o padrão recomendado pelo NCI-ICG/HNPCC, no qual se utiliza um painel de referência de cinco marcadores. Este painel inclui dois mononucleotídeos (BAT25 e BAT26) e três dinucleotídeos (D2S123, D5S346 e D17S250). O número de marcadores que exibe instabilidade define três grupos diferentes de tumores: aqueles com dois ou mais marcadores instáveis ($\geq 30\text{-}40\%$) são considerados como MSI-H (alta instabilidade de microssatélites), aqueles com apenas um marcador instável ($< 30\text{-}40\%$) são considerados MSI-L (baixa instabilidade de microssatélites) e aqueles sem marcadores instáveis são considerados MSS (microssatélites estáveis). As proteínas de reparo do DNA atuam no núcleo das células; as mais comumente investigadas são: MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. À IMH, a ausência de coloração nuclear nas células tumorais é indicativa de dMMR.⁴⁶

Os tumores colorretais com MSI/dMMR ocorrem mais frequentemente em cólon direito, são pouco diferenciados, frequentemente mucinosos, diploides e apresentam infiltração linfocítica peritumoral.^{47,48} Também estão associados com o maior tamanho da lesão primária e, geralmente, têm estágio precoce ao diagnóstico e melhor prognóstico.⁴⁷ Quanto à resposta à QT nos pacientes MSI vs MSS, são poucos os dados existentes na literatura, a grande maioria advindos de trabalhos retrospectivos. Ribic *et al.*,⁽⁴⁷⁾ em 2003, avaliaram 570 pacientes de 5 estudos randomizados sobre QT adjuvante baseada em FU e mostraram, em análise agrupada, que a SLD em 5 anos foi maior nos indivíduos que apresentavam MSI vs MSS (75.3%

vs 64.1%, $p = 0.04$). Entre os pacientes que não receberam QT, tumores com MSI tiveram maior SG e SLD em 5 anos ($p = 0.004$). Análise multivariada ajustada para o estágio e grau histológico demonstrou que o status MSI em pacientes não tratados com FU adjuvante foi fator prognóstico independente de melhor sobrevida (HR 0.32, IC 95% 0.14-0.75, $p = 0.008$). Corroborando estes dados, outro estudo retrospectivo publicado em 2010, avaliando 1006 indivíduos com CCR estádios II e III, mostrou maior SGM para os tumores MSI vs MSS (89 vs 82 meses, $p = 0.01$), e os subgrupos com doença estágio II e em cólon direito/transverso tiveram melhor prognóstico. Entre os pacientes com estágio III, houve diferença na SGM a favor do fenótipo MSI (85 vs 63 meses), porém não significativa. Em análise multivariada, foram identificados outros fatores prognósticos relevantes para maior sobrevida: sexo feminino, idade < 66 anos, tumores bem ou moderadamente diferenciados, com 11 ou mais linfonodos ressecados. Não houve associação prognóstica entre o status MSI e a QT.⁴⁸ Sargent *et al.*,⁴⁹ em 2010, publicaram dados retrospectivos de 457 pacientes com CCR estádios II e III envolvidos em estudos de adjuvância com FU. Em análise univariada, pacientes com MSI que não receberam QT tiveram melhor SLD e tendência a melhor SG, quando comparados aos MSS (SLD: HR: 0.46, IC 95% 0.22-0.95, $p = 0.03$; SG: HR: 0.51, IC 95% 0.24-1.10, $p = 0.06$). Mais uma vez, nenhuma associação prognóstica foi observada entre o status MSI vs MSS e o tratamento com FU (SLD: HR: 0.90, IC 95% 0.44-1.82, $p = 0.77$; SG: HR: 0.73, IC 95% 0.35-1.54, $p = 0.41$).

Portanto, o fenótipo MSI confere melhor prognóstico ao CCR em estágio inicial, ainda que não haja dados concretos para afirmar que ele é preditor de resposta ao FULV. No trabalho de Ribic *et al.*,⁴⁷ viu-se que os pacientes com MSI tiveram uma SG menor ao receber QT (FU), quando comparados àqueles que não fizeram adjuvância, porém estes resultados não foram estatisticamente significantes (HR: 2.17, IC 95% 0.84-5.55, $p = 0.10$). Ao contrário, outros estudos mostraram maior sobrevida nos indivíduos com MSI tratados com FU vs não tratados.⁵⁰⁻⁵² Uma metanálise com 11 estudos sobre adjuvância no CCR, publicada em 2009, concluiu que

o efeito favorável do status MSI na sobrevida é explicado pelo melhor prognóstico destes tumores, e não por causa de qualquer ação da QT.⁵³ Assim, o benefício da adjuvância, se existir, deve ser muito pequeno nos pacientes com MSI.

Ainda que o status MSI pareça conferir melhor sobrevida aos pacientes com CCR em estádios precoces, na doença metastática, a sua prevalência é baixa e os dados prognósticos são limitados. Liang *et al.*⁵⁴ publicaram, em 2002, um estudo observacional prospectivo, com 244 indivíduos, no qual foi avaliada a quimiossensibilidade ao FU em altas doses dos tumores colorretais avançados, correlacionando-a com o fenótipo MSI vs MSS. No grupo tratado, tanto a TR (65.7% vs 35%, $p = 0.001$) quanto a SG foram maiores para os pacientes com MSI (24 vs 13 meses, $p = 0.0001$); porém, os indivíduos que não receberam QT tiveram sobrevida de somente 7 meses, independentemente do status MSI ($p = 0.8205$). Desta forma, os autores concluíram que a melhor SGM para estes tumores no estágio IV pode ser devido à maior sensibilidade à QT, e não a um comportamento biológico menos agressivo, diferente do que ocorre em fases iniciais da doença. Vale ressaltar, contudo, que este é um estudo pequeno, sem poder estatístico e não ajustado para variáveis prognósticas, como o ECOG, idade ou comorbidades, por exemplo.

Se o CCR com status MSI é sensível ou resistente à QT baseada em FU, isto ainda é assunto controverso. Apesar de alguns estudos mostrarem que este tumor pode ser sensível ao FU isolado^{16,54} ou associado à oxaliplatina ou irinotecano,^{55,56} outras evidências apontam para uma tendência a pior TR e sobrevida dos pacientes com MSI tratados com estes esquemas, principalmente, com QT baseada em oxaliplatina, no estágio IV.⁵⁷⁻⁶⁰ O primeiro estudo que reportou a associação do status MSI (N = 9 MSI e N = 31 MSS) e os desfechos de pacientes que receberam FOLFOX 4 ou FOLFOX 6 não encontrou diferenças na SLP, SG ou TR entre os grupos, porém a TR à QT com oxaliplatina foi numericamente menor nos pacientes MSI vs MSS (25% vs 35%, respectivamente; $p = 0.30$).⁵⁸ Uma metanálise de 5 estudos retrospectivos (N = 91 MSI e N = 873 MSS) avaliou se a presença

de MSI era preditiva de resposta à QT e, também, mostrou que não houve diferença em TR de esquemas baseados em FU isolado ou em combinação com oxaliplatina ou irinotecano nos indivíduos com CCRm e status MSI, quando comparados ao MSS (HR: 0.82, IC 95%: 0.65-1.03, $p = 0.09$); porém, nos estudos que utilizavam QT baseada em oxaliplatina, a TR foi numericamente inferior nos doentes MSI.⁵³

Os motivos pelos quais os pacientes com CCRm e MSI/dMMR parecem responder menos à QT são desconhecidos. A principal hipótese para a resistência ao FU parece estar no fato de que os tumores com o fenótipo MSI têm aumento da expressão de timidilato sintetase (TS), enzima responsável pela síntese de novas cadeias de DNA. Este aumento de TS sobrepõe à ação da droga e, conseqüentemente, a formação de células tumorais não é interrompida.^{61,62} Quanto à oxaliplatina, apesar de ser um derivado da platina, esta parece não ter sua ação influenciada pelo sistema de reparo de DNA^{63,64}, como visto em tumores de ovário, com perda de expressão de MLH1 e MSH2, tratados com cisplatina.^{65,66} Uma vez que os danos celulares causados por esta medicação não são reconhecidos pelo sistema de reparo deficiente, os mecanismos de morte celular não são ativados.⁶⁴ Ainda que defeitos em MMR pareçam estar associados com resistência à cisplatina, não sabemos em relação à oxaliplatina.^{63,64,67} Por outro lado, quanto ao irinotecano, os estudos mostram que pode haver sensibilidade dos tumores MSI a esta medicação que, por meio do bloqueio da topoisomerase I, causa um erro na replicação do DNA. Este erro não é reconhecido pelo sistema de reparo deficiente, o que culmina com a morte celular precoce.⁶⁸ Em 2003, um estudo retrospectivo com 72 pacientes mostrou melhor resposta ao irinotecano isolado ou em associação com 5-FU, quando o tumor tinha MSI vs MSS: 4 respondedores entre os 7 MSI, e 1 respondedor dentre os 65 MSS ($p=0.009$). Não houve análise de SG.⁶⁸

Apesar de algumas hipóteses explicarem a quimiossensibilidade ou quimiorresistência dos tumores MSI, ainda não há dados robustos que definam o status MMR como preditor de resposta ao tratamento quimioterápico do CCR. Mas parece que o CCRm com MSI apresenta pior

prognóstico e, provavelmente, a mutação no oncogene BRAF exerce papel importante na carcinogênese desta doença. Além disso, linfonodos e peritônio são sítios metastáticos frequentemente acometidos nestes tumores, o que dificulta as possibilidades de metastasectomia com incremento de sobrevida.⁴⁰ Estudo retrospectivo recente, envolvendo somente pacientes com CCRm e MSI (N = 55), avaliou o impacto da QT, metastasectomia e do status BRAFm no prognóstico desta doença. Portadores de BRAFm vs BRAF selvagem tiveram pior SGM (10.1 vs 17.3 meses, respectivamente; $p = 0.03$) e, em análise multivariada, também apresentaram pior SG (HR 4.04, $p = 0.005$); já os pacientes submetidos à metastatectomia tiveram aumento de SG (HR 0.11, $p = 0,001$).⁶⁹

Neste cenário de baixa probabilidade de reposta à QT do CCRm com fenótipo MSI, a imunoterapia emerge promissora. Le *et al.*⁷⁰ mostraram, em estudo de fase II, que indivíduos com CCRm e dMMR beneficiam-se de imunoterapia com pembrolizumabe, um anticorpo monoclonal IgG4 Kappa, o qual bloqueia a via PD-1 (*programmed death pathway*) – via que regula negativamente a resposta imune, prevenindo a ativação de células-T. Neste trabalho, com 41 pacientes (coorte A: N = 11 – CCRm/dMMR; coorte B: N = 21 – CCRm/pMMR; coorte C: N = 9 – tumor metastático não-colorretal/dMMR), a TR objetiva e de SLP foram, respectivamente, 40% (4/10 pacientes) e 78% (7/9 pacientes) para coorte A, e 0 (0/18 pacientes) e 11% (2/18 pacientes) para coorte B. Os indivíduos com câncer não-colorretal/dMMR apresentaram respostas similares aos com CCRm/dMMR (TR objetiva: 71% [5/7 pacientes]; taxa de SLP: 67% [4/6 pacientes]), porém o grupo C obteve uma resposta mais rápida, de acordo com *International Response Evaluation Criteria In Solid Tumors* (RECIST), quando comparado ao grupo A (12 vs 28 semanas, $p = 0.03$).

A hipótese de que os tumores MSI estimulam o sistema imune é suportada pela observação de uma infiltração linfocitária densa e de um ambiente rico em citocinas relacionadas aos linfócitos Th1 encontrados nestes tumores. Portanto, o racional para o uso do pembrolizumabe no CCRm com status dMMR está no fato de que esta doença, por possuir de 10

a 100 vezes mais mutações somáticas, quando comparada aos tumores pMMR (*proficient mismatch repair* – proficiência nas proteínas reparadoras do DNA), apresenta intensa atividade imune, e não só PD-1 e seus ligantes (PD-L1 e PD-L2), como também outras moléculas (CTLA-4, LAG-3 e IDO) estão superexpressas na superfície das células, contrabalanceando a resposta imune do hospedeiro. Assim, o aumento da expressão de PD-1 nos tumores MSI permite a sobrevivência tumoral em um ambiente inóspito, bastante reativo imunologicamente. Já o bloqueio de PD-1 tem como consequência maior atividade do linfócito T-CD8+, o que culmina com a morte celular.^{70,71}

Cada vez mais estudos tentam correlacionar a superexpressão de PD-1 com os tumores MSI, caracterizados por intensa atividade imune. Se a terapia anti-PD1 substituirá definitivamente a QT no CCRm/MSI, isto ainda é incerto, apesar dos resultados com pembrolizumabe serem bastante animadores. A expressão dos ligantes de PD-1 (PD-L1 e PD-L2) em células tumorais ou imunes é um importante, mas não definitivo marcador preditor de resposta aos anti-PD-1.⁷⁰

1.3 Justificativa do estudo

É fato que a instabilidade de microssatélites tem sido extensivamente estudada no CCR estádios II/III, mas pouco se sabe da influência deste fenótipo no tratamento e prognóstico dos tumores colorretais em fases avançadas. Embora tenham surgido dados promissores sobre imunoterapia para CCRm com dMMR,⁷⁰ na prática clínica, as decisões permanecem na QT padrão. Além disso, os estudos têm mostrado dados heterogêneos quanto a influência do status MSI na resposta à QT em CCRm. Neste cenário, realizamos um estudo retrospectivo com grupo controle, envolvendo pacientes com CCRm de nossa instituição, tratados com regimes baseados em oxaliplatina, especialmente, mFLOX em primeira linha, ou irinotecano

monodroga em segunda linha, ou irinotecano + cetuximabe/panitumumabe em terceira linha paliativa.

Apesar de ser mais um estudo retrospectivo, diferencia-se da maioria dos já publicados no assunto, devido à melhor metodologia: seleção consecutiva de pacientes; presença de grupo controle; indivíduos expostos aos mesmos quimioterápicos, de acordo com os protocolos da instituição; todos os sujeitos de pesquisa avaliados para resposta pelo mesmo radiologista. Além disso, este trabalho contou com análises de biomarcadores cada vez mais importantes para as decisões terapêuticas, como KRAS, NRAS e BRAF, e a avaliação de resposta foi feita por RECIST 1.1. (Anexo B) Adicionalmente, até o momento, nenhum estudo avaliou a resposta a vários esquemas quimioterápicos, incluindo os anticorpos anti-EGFR, quanto ao genótipo/fenótipo MSI.

2 HIPÓTESES

2 HIPÓTESES

- A. A presença de defeitos nas proteínas reparadores de DNA (dMMR) por meio da expressão imuno-histoquímica (IMH) tem influência preditiva de resposta em pacientes com CCR avançado/metastático tratados com regimes baseados em oxaliplatina ou irinotecano com ou sem anti-EGFR.
- B. Mutações em genes KRAS, NRAS, BRAF podem influenciar na resposta à QT paliativa em pacientes com dMMR.
- C. É também possível que haja associação destes biomarcadores com SG.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Primário

Correlacionar o status dMMR com TR em pacientes submetidos à QT baseada em oxaliplatina em primeira linha paliativa, especialmente, mFLOX.

3.2 Secundários

- Correlacionar o status dMMR com TR em pacientes submetidos à QT baseada em irinotecano em segunda e terceira linhas paliativas (com ou sem anti-EGFR);
- Correlacionar o status dMMR com SG;
- Avaliar a distribuição de mutações nos oncogenes KRAS, NRAS e BRAF e sua correlação com desfechos clínicos entre casos e controles.

4 DESFECHOS

O desfecho primário foi a TR objetiva (completa e parcial) avaliada segundo RECIST, versão 1.1,⁷² após pelo menos 4 semanas de mFLOX ou dois ciclos de FOLFOX ou XELOX (capecitabina + oxaliplatina).

As avaliações de resposta, independente do regime utilizado, foram feitas após um intervalo mínimo de 4 semanas do D1 (primeiro dia do ciclo) do C1 (primeiro ciclo) da QT, isto é, a cada 1-3 meses do início da QT.

Desfechos secundários foram TR aos esquemas baseados em irinotecano +/- anti-EGFR e SG. TR ao irinotecano foi avaliada dentre todos os pacientes que receberam pelo menos uma dose de QT. SG foi definida por data do D1 do C1 até morte por qualquer causa. Perda de seguimento foi considerada censura na análise dos eventos e os desfechos clínicos foram analisados até outubro de 2015.

Alguns pacientes dMMR que não realizaram QT, mas acabaram sendo incluídos no estudo, tiveram suas sobrevidas calculadas a partir do diagnóstico da doença metastática ou do tratamento local de metástases, se este ocorreu.

5 MÉTODOS

5.1 Desenho e seleção de pacientes

Comparamos, retrospectivamente, 2 grupos de pacientes com CCR, estágio IV, quanto ao fenótipo MSI. Um grupo era formado por pacientes com CCRm e presença de dMMR (casos) e o outro, por pacientes com pMMR (controles).

Foram elegíveis os pacientes que apresentaram todos os critérios abaixo:

- 1- Ter diagnóstico histológico de adenocarcinoma colorretal, estágio clínico IV.
- 2- Ter recebido QT paliativa à base de oxaliplatina em primeira linha, com pelo menos 4 semanas de mFLOX ou dois ciclos de FOLFOX ou XELOX.
- 3- Ter material do tumor disponível.
- 4- Presença de, no mínimo, duas avaliações radiológicas, pré e pós-tratamento, com intuito de avaliação de resposta à QT.

Foram excluídos os pacientes que, apesar de apresentarem os critérios de inclusão, apresentaram pelo menos um dos itens de exclusão abaixo:

- 1- Não conter informações sobre os ciclos de QT registrados no prontuário eletrônico. (Observação: houve uma transição do prontuário manual para o informatizado e somente os dados dos prontuários digitalizados foram considerados).
- 2- Ter feito droga-alvo em primeira linha, juntamente com QT baseada em oxaliplatina.

- 3- Ter feito QT baseada em oxaliplatina após metastasectomia, sem doença metastática macroscópica.

Os pacientes elegíveis foram identificados por lista administrativa dos ambulatórios de Oncologia Gastrointestinal do ICESP entre janeiro de 2009 e junho de 2013. Todos os elegíveis foram rastreados para status MSI por IMH (descrito adiante). Assim, os pacientes com fenótipo dMMR foram classificados como casos e os pMMR, como controles. Seleccionamos aproximadamente 2 controles para cada caso. Devido à raridade dos casos, pacientes identificados como dMMR na rotina, por suspeita clínica de Síndrome de Lynch, fora da nossa busca, foram incluídos para que pudéssemos ter uma amostra da sua epidemiologia. No grupo controle, os pacientes foram selecionados de forma consecutiva, desde que tivessem preenchido os critérios de inclusão.

De posse da lista de potenciais sujeitos, verificamos a elegibilidade de cada paciente.

Todos os sujeitos de pesquisa foram estadiados e seguidos conforme o protocolo do ICESP, inclusive, os que tiveram o diagnóstico do tumor primário em outro hospital. O estadiamento consistiu em história clínica, exame físico completo, colonoscopia, tomografia (TCs) de abdome, pelve e tórax.

Quanto ao tratamento, os pacientes também seguiram o protocolo institucional, o qual disponibiliza mFLOX em primeira linha: LV 20 mg/m², administrados em 2 horas, EV; FU 500 mg/m², em bolus, EV, após 1 hora do início da infusão de LV, ambos por 6 semanas consecutivas (nos dias 1, 8, 15, 22, 29 e 36 de cada ciclo), seguidos por duas semanas de descanso. Oxaliplatina 85 mg/m² administrados em 2 horas, EV, nos dias 1, 15 e 29 do ciclo. Em segunda linha, é utilizado irinotecano monodroga (350 mg/m², EV, a cada 3 semanas)^{14,15} e, em terceira linha, a combinação de irinotecano (180 mg/m²) com cetuximabe ou panitumumabe (500 mg/m²), EV, ambos nos dias 1 e 15, quando KRAS/NRAS selvagens.²²

5.2 Avaliação de MSI

A presença de MSI-H e perda de proteínas de reparo do DNA são altamente concordantes e promovem habilidade prognóstica similar.⁴⁶ Desta forma, neste projeto foi utilizado estudo IMH das proteínas de reparo do DNA para avaliar deficiência de MMR e caracterizar os pacientes em casos (dMMR) e controles (pMMR).

5.2.1 Estudo imuno-histoquímico das proteínas de reparo do DNA

A IMH é a técnica que envolve o uso de anticorpos de espécies pré-definidas, com sistema de alta sensibilidade de detecção, o que resulta em uma reação com um produto colorido, quando observado ao microscópio. O poder desta técnica é a observação simultânea da morfologia do tecido, permitindo a integração da morfologia e das informações imuno-histoquímicas da área de interesse.⁴⁶

As reações são acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado, e o controle negativo é realizado com a omissão do anticorpo primário. A leitura das lâminas é realizada em microscópio óptico comum.⁴⁶

No nosso trabalho, os cortes histológicos das lesões foram examinados por um único patologista, no Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Considerou-se perda do gene de reparo, quando ocorreu negatividade nuclear na coloração imuno-histoquímica para MLH1, MSH2, MSH6 ou PMS2, com presença de expressão proteica em mucosa colônica normal adjacente e/ou células do estroma.⁴⁶

Tabela 1 - Anticorpos utilizados para análise imuno-histoquímica

ANTICORPO	CLONE	CÓDIGO	FABRICANTE	DILUIÇÃO
MLH1	G168-728	285M-16	Cell Marque	1:200
MSH2	G219-1129	286M-16	Cell Marque	1:200
MSH6	44	287M-16	Cell Marque	1:200
PMS2	16-4	556415	BD Pharmingen	1:200

5.3 Avaliação de outros biomarcadores: KRAS, NRAS e BRAF

Em nosso estudo, as análises de mutação foram centralizadas e realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Sírio Libanês, São Paulo, Brasil. Blocos tumorais embebidos em parafina e fixado em formalina foram revistos pela qualidade e conteúdo do tumor, e um único bloco representante de cada paciente, contendo pelo menos 70% das células neoplásicas, foi selecionado. O DNA foi extraído a partir destas amostras (Qiagen: QiAmp DNA micro handbook, aug03) e, após sua quantificação (aparelho Nanodrop) e identificação com reconstrução dos primers (por PCR), passou pela purificação (Qiagen: QIAquick PCR Purification, nov06) e sequenciamento da região de interesse dos genes KRAS (exons 2, 3, e 4), NRAS (exons 3 e 4) e BRAF (códon 600) (aparelho megabacer).

Amostras tanto do tumor primário quanto da metástase puderam ser utilizadas, devido à alta concordância de mutações KRAS/NRAS/BRAF entre elas. Todos os espécimes analisados mantiveram-se em nosso laboratório para futuras pesquisas.

5.4 Dados clínicos

Além das análises de MSI e mutações em KRAS, NRAS e BRAF, foram coletados dos prontuários de cada sujeito de pesquisa os seguintes dados gerais: idade ao diagnóstico da doença metastática; sexo; ECOG (0 a

4) (Anexo A); história familiar de CCR; localização do tumor primário (cólon direito ou transversal ou esquerdo ou sigmoide ou reto) e das metástases; se metástases sincrônicas ou metacrônicas; se única ou múltiplas; subtipo histológico (adenocarcinoma com componente mucinoso ou carcinoma com células em anel de sinete ou tipo não especial – tubular, viloso, cribiforme); grau de diferenciação tumoral (bem ou moderadamente ou pouco diferenciado); quantidade de ciclos de QT realizados em primeira, segunda e terceira linhas (quando houve); se houve redução de dose e por qual motivo (baixo *performance status* [PS] pelo tumor [anexo 1] ou comorbidades/idade avançada ou toxicidades); se ocorreu atraso nos ciclos de QT e o porquê (toxicidades ou erros de marcação/falta do paciente ou interrupção para procedimentos cirúrgicos/radioterapia); e se houve tratamento local de metástases (ressecção R0 ou com margem exígua/R1 ou com margem exígua/R1 + radiofrequência [RFA] ou somente RFA/embolização ou ressecção R0 + RFA).

5.5 Avaliação de resposta à quimioterapia

Todos os pacientes elegíveis foram incluídos no cálculo da taxa de resposta. Categorias de resposta incluíram: resposta completa (RC), resposta parcial (RP), doença estável (DE) e progressão de doença (PD). (Anexo B)

Para a monitorização da resposta, realizaram-se exames de imagem (TCs ou ressonância magnética [RNM]) com periodicidade variável a depender do regime quimioterápico vigente e/ou queixa clínica específica, desde que houvesse um intervalo mínimo de 4 semanas entre o D1 do C1 da QT e o novo exame radiológico. Geralmente, estes exames foram solicitados a cada 2 ou 3 ciclos de QT, exceto quando se utilizou mFLOX, cujo ciclo dura 8 semanas e, portanto, o reestadiamento pode ser feito logo após o D22 do C1. Um único radiologista revisou todas as imagens pré e

pós-tratamento de cada paciente. As imagens pré-tratamento foram realizadas dentro de 4 semanas.

Além da avaliação de resposta radiológica, também foram considerados os dados clínicos registrados no prontuário eletrônico; assim, mesmo que o paciente não tenha realizado exames de imagem, após o início da QT, mas tenha ocorrido evidente piora na evolução da doença, esta foi considerada como PD clínica.

5.6 Considerações estatísticas

5.6.1 Plano de análise

Este foi um estudo retrospectivo que avaliou a presença de dMMR em dois grupos distintos de pacientes: grupo casos (com dMMR) e grupo controle (com pMMR). Para cada grupo de pacientes, estatística descritiva foi utilizada para reportar frequências absolutas, relativas e variáveis do tipo tempo-para-evento (SG). A associação entre presença de dMMR (sim X não), RASm, BRAFm e desfechos específicos de cada grupo foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fisher, e para comparações de SGM, utilizamos o método de Kaplan-Meier e teste log-rank. Valores bicaudados de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

Os desfechos clínicos TR à QT baseada em oxaliplatina (desfecho primário) e SG foram analisadas tanto por protocolo quanto por intenção de tratamento. A análise por protocolo foi feita somente com os pacientes que preencheram os critérios de inclusão; e a análise por intenção de tratamento englobou os indivíduos que receberam pelo menos uma dose de QT baseada em oxaliplatina. O desfecho TR à QT baseada em irinotecano +/- anti-EGFR em segunda e terceira linhas paliativas foi avaliada por protocolo, ou seja, todos os pacientes que receberam pelo menos uma dose de terapia antineoplásica foram incluídos.

Em um segundo momento, o grupo dMMR foi recategorizado em 2 subgrupos: pacientes com possível dMMR germinativo (Síndrome de Lynch) e pacientes com provável dMMR esporádico. Os indivíduos com fenótipo MSH2-/MSH6-, independente da idade ou história familiar de CCR, foram classificados como possíveis portadores de Lynch, além daqueles com MLH1-, se idade inferior ou igual a 50 anos e história familiar de CCR. Doentes com MLH1-/PMS2-, idade superior a 50 anos ou ausência de história familiar de CCR foram considerados dMMR esporádicos, assim como aqueles com BRAFm, independente do tipo de perda de expressão proteica.⁷³⁻⁷⁵

Regressão logística foi planejada para identificar potenciais fatores preditivos de resposta aos esquemas de QT com oxaliplatina. As variáveis independentes testadas foram: idade, sexo, ECOG, redução/interrupção de dose de QT, status MMR (dMMR vs pMMR) e status MMR “recategorizado” (dMMR esporádico vs dMMR germinativo – síndrome de Lynch vs pMMR).

5.6.2 Tamanho da amostra

Um cálculo de poder estatístico não foi realizado devido à raridade dos casos e caráter exploratório do estudo. Desta forma, o tamanho da amostra foi baseado em conveniência e factibilidade. Para cada paciente com status dMMR (caso), dois pacientes com pMMR (controles) foram selecionados de maneira consecutiva entre os primeiros semestres de 2009, 2010 e 2011. Como o status pMMR corresponde a 85% dos tumores colorretais e, portanto, muitos pacientes poderiam ser elegíveis para o grupo controle, inclusive, dentro de um mesmo ano, foi estabelecido o primeiro semestre de cada ano da listagem para que a amostra ficasse mais representativa de todos os indivíduos com CCRm tratados no ICESP. Quando os pacientes do primeiro semestre dos anos supracitados não preenchiam os critérios de inclusão do estudo, os consecutivos do segundo semestre foram selecionados. Buscou-se manter um número semelhante de controles entre

os anos, no entanto, como os pacientes de 2009, em sua maioria, não tinham o prontuário completamente digitalizado, foram selecionados mais pacientes de 2010 e 2011. Estimamos rastrear aproximadamente 800 casos de CCRm por IMH para identificar aproximadamente 40 casos de dMMR.

6 RESULTADOS

6 RESULTADOS

No período de janeiro de 2009 a janeiro de 2013, identificamos 1270 pacientes com CCRm tratados no ICESP, os quais foram avaliados para elegibilidade. Dos 1270, 1013 tinham material do tumor disponível em nosso serviço de patologia. Destes, selecionamos 762 doentes para pesquisa de dMMR e excluímos 251 pacientes, ou porque não fizeram QT baseada em oxaliplatina na primeira linha, ou utilizaram drogas-alvo moleculares no início do tratamento, ou realizaram QT com oxaliplatina sem doença metastática mensurável (depois de metastasecotomia).

Após IMH para enzimas de reparo do DNA, encontramos 27 casos (pacientes com dMMR). Dois controles foram selecionados de forma consecutiva para cada caso. Como o número de casos dMMR encontrado foi pequeno, 15 pacientes fora do período de inclusão, com achado de dMMR na rotina, foram incluídos e, para cada um, selecionamos de forma consecutiva 2 controles (pacientes com pMMR), entre janeiro de 2009 a dezembro de 2011, totalizando 84 sujeitos no grupo controle. Porém, 1 paciente foi excluído do grupo dMMR, porque, após nodulectomia hepática, diagnosticou-se lesão hepática não-metastática, e sim de origem inflamatória.

Figura 1 - Seleção de pacientes.

Legenda: *Identificados na rotina prática. **Sem confirmação de doença metastática, após nodulectomia hepática. CCRm: câncer colorretal metastático; dMMR: *deficient mismatch repair*; MSI: instabilidade de microssatélites; pMMR: *proficient mismatch repair*.

6.1 Características clínicas

A idade mediana dos casos foi 53 anos (22-87) e dos controles, 54.5 anos (17-78), sem diferença estatística.

Dentre os casos, a maioria foi do sexo masculino (N = 28/68.3%), apresentava ECOG 0 ou 1 na linha de base (N = 32/78%) e não reportava história familiar de CCR (N = 27/65.8%). Dezesete pacientes (41.5%) eram portadores de adenocarcinoma com característica mucinosa, enquanto o restante dividiu-se entre os subtipos histológicos tubular/viloso/cribiforme (N = 20/48.8%) ou com células em anel de sinete (N = 2). Um indivíduo teve dois tumores colônicos com diferentes histologias (tubular e com células em anel de sinete), e outro apresentou um carcinoma com variante medular. Quanto ao grau de diferenciação, mais da metade dos tumores no grupo casos (N = 30/73.2%) era bem ou moderadamente diferenciada, e 11 pacientes tiveram tumores pouco diferenciados. Cólon direito (N = 21), seguido de reto (N = 9) foram os locais principais da lesão primária. Cinco pacientes apresentaram tumores multifocais. A maioria das metástases ocorreu de forma sincrônica ao diagnóstico (N = 23/56.1%) e, geralmente, estava em múltiplos sítios (N = 23/56.1%), sendo os mais comuns: linfonodos (N = 23/56.1%), fígado (N = 19/46.3%), peritônio (N = 7/17.1%) e pulmão/pelve (N = 6/14.6% para cada). Outros locais de acometimento metastático incluíram: pele de períneo (N = 1), parede abdominal (N = 3), retroperitônio (N = 2) e osso/pleura/partes moles/cerebelo (N = 1 para cada). Quatorze (34.1%) pacientes realizaram tratamento local das lesões metastáticas, sendo que 11 foram submetidos à ressecção R0.

Já no grupo controle, a maioria foi do sexo feminino (N = 46/56.0%), apresentava ECOG 0 ou 1 (N = 71/85.7%) e, também, não relatava história familiar de CCR (N = 73/85.7%). Treze indivíduos eram portadores de adenocarcinoma com característica mucinosa, enquanto o restante dividiu-se entre os subtipos histológicos tubular/viloso/cribiforme (N = 70/82.1%) ou com células em anel de sinete (N = 1). Quanto ao grau de diferenciação, a maior parte dos tumores, assim como nos casos, era bem ou

moderadamente diferenciada (N = 71/83.3%), e 7 pacientes tiveram tumores pouco diferenciados. Reto (N = 27), seguido de sigmoide/retossigmoide (N = 24) foram os locais mais frequentes do câncer primário. Quatro pacientes apresentaram tumores multifocais. A maioria das metástases também ocorreu de forma sincrônica ao diagnóstico (N = 61/72.6%), porém em sítio único (N = 47/56%), sendo os principais: fígado (N = 40/47.7%); pulmão (N = 30/34.5%), linfonodo (N = 21/25.0%) e peritônio (N = 19/23.8%). Outros locais de acometimento metastático incluíram: pelve (N = 7), osso (N = 5), ovário (N = 4), partes moles/adrenal (N = 2 para cada) e cerebelo/pleura (N = 1 para cada). Vinte e nove (35.7%) doentes foram submetidos a tratamento local das lesões metastáticas, sendo que 19 tiveram ressecção R0.

As características idade, ECOG, realização de tratamento local das metástases, se lesões sincrônicas ou metacrônicas e se metástases em único ou múltiplos sítios não se diferenciaram significativamente entre os grupos, porém a presença de metástases sincrônicas e lesões metastáticas em múltiplos sítios foram numericamente mais frequentes nos pacientes dMMR vs pMMR. Sexo masculino ($p = 0.026$), tumores pouco diferenciados ($p = 0.021$), histologia com componente mucinoso ($p = 0.003$) e localização primária em cólon direito estiveram associados ao status dMMR, assim como lesões no cólon esquerdo e reto correlacionaram-se mais com o fenótipo pMMR ($p = 0.001$).

Tabela 2 - Características clínicas dos casos (dMMR) e controles (pMMR)

CARACTERÍSTICAS	CASOS (dMMR) N=41 (100%)	CONTROLES (pMMR) N=84 (100%)	p
Idade (mediana e dispersão)	53 (22-87)	54.5 (17-78)	NS*
Sexo			
Homens	28 (68.3)	38 (45.2)	0.026
Mulheres	13 (31.7)	46 (54.8)	
ECOG			
0 e 1	32 (78.0)	71 (84.5)	0.726
2 e 3	9 (22.0)	13 (15.5)	
História Familiar			
Sim	14 (34.2)	11 (13.1)	0.012
Não	27 (65.8)	73 (86.9)	
Histologia			
Mucinoso	17 (41.5)	13 (15.5)	0.003
Tubular, viloso ou cribiforme, células em anel de sinete, outros	24 (58.5)	71 (84.5)	
Diferenciação			
Pouco diferenciado	11 (26.8)	7 (8.4)	0.021
Bem e moderadamente diferenciado e misto	30 (73.2)	71 (84.5)	
Não identificado	0 (0.0)	6 (7.1)	
Localização			
Cólon D	21 (51.2)	17 (20.2)	0.001
Cólon E, reto e multifocal	19 (46.4)	67 (79.8)	
Não identificado	1 (2.4)	0 (0.0)	
Metástases			
Sincrônicas	23 (56.1)	61 (72.6)	0.100
Metacrônicas	18 (43.9)	23 (27.4)	
Múltiplos sítios	23 (56.1)	37 (44.0)	0.282
Único sítio	18 (43.9)	47 (56.0)	
Tratamento local de metástases			
Sim	27 (65.9)	55 (65.5)	0.978
Não	14 (34.1)	29 (34.5)	

Legenda: *valor-p pelo teste t-student. D: direito; dMMR: *deficient mismatch repair*; E: esquerdo; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; NS: não significativo estatisticamente; pMMR: *proficient mismatch repair*.

6.2 Características do tratamento

Figura 2 - Sequência de tratamento nos pacientes dMMR.

Legenda: DE: doença estável; dMMR: *deficient mismatch repair*; IAA: insuficiência arterial aguda; ITT: análise por intenção de tratamento; pMMR: *proficient mismatch repair*; PP: análise por protocolo.

Casos: 35 dos 41 indivíduos dMMR fizeram QT de primeira linha (N= 33 – mFLOX; N = 1 – IROX; N = 1 – capecitabina monodroga) e 6 pacientes não a realizaram: N = 4 apresentavam baixo PS e morreram antes de iniciar a QT, devido a complicações da doença oncológica (SGM = 133.5 dias [95-642]/4.4 meses); e N = 2 tinham pouco volume tumoral, sendo submetidos a tratamento local das metástases, sem necessidade de terapia sistêmica (N = 1 – RFA em lesão hepática; N = 1 – ressecção de metástase em pele de vagina). A avaliação de TR em análise por intenção de tratamento incluiu os pacientes dMMR que receberam pelo menos uma dose de QT baseada em oxaliplatina (N = 34). Já a avaliação de TR por protocolo incluiu somente os indivíduos que preencheram os critérios de inclusão (N = 33). Foram excluídos da análise por protocolo a paciente submetida à capecitabina

monodroga e 1 paciente submetido a mFLOX, que não foi avaliado quanto à resposta, pois faleceu de insuficiência arterial aguda antes mesmo de completar o C1 da QT. Em análise separada, a paciente tratada com capecitabina não respondeu ao tratamento e apresentou PD após o C3 da QT, seguida de morte (SLP = 46 dias/1.5 meses; SG = 178 dias/5.9 meses). Dentre os 33 indivíduos que preencheram os critérios de inclusão, 1 doente recebeu IROX, combinação de irinotecano + oxaliplatina, mas não respondeu a esta terapia, mantendo DE. Depois de 2 ciclos, ele foi submetido à metastasectomia hepática, vindo a progredir após um ano. Com isso, recebeu FU monodroga em segunda linha e faleceu depois (SG = 1364 dias/45.5 meses).

Dos 34 pacientes dMMR que receberam oxaliplatina em primeira linha (N = 1 morreu e N = 33 avaliáveis para resposta por protocolo), 22 foram submetidos à segunda linha (N = 18 – irinotecano sem anti-EGFR; N = 1 – irinotecano + anti-EGFR; N = 3 – outra terapia não baseada em irinotecano [FU ou mitomicina ou reexposição ao mFLOX]). Um doente fez irinotecano em terceira linha, após capecitabina e radioterapia, porém, foi analisado com os demais pacientes submetidos ao irinotecano em segunda linha (N = 18), e o paciente submetido ao esquema irinotecano + anti-EGFR (cetuximabe) em segunda linha, com o intuito de aumentar a taxa de resposta, foi analisado juntamente com os demais que receberam este esquema em terceira linha, conforme protocolo institucional. Onze doentes não receberam QT de segunda linha, porque N = 1 permanecia com DE após regime com oxaliplatina; N = 9 apresentaram piora clínica importante e faleceram depois da primeira linha de tratamento (SGM = 91 dias [38-282]/3 meses) e N = 1 realizou metastasectomia hepática e permanecia em seguimento clínico até o desfecho do estudo. De 22 pacientes dMMR tratados com QT de segunda linha, 11 receberam terceira linha paliativa (N = 7 – irinotecano + anti-EGFR; N = 3 – outra terapia não baseada em irinotecano [mitomicina ou FU + metformina, em protocolo experimental]). Os 11 pacientes restantes não realizaram terceira linha de QT, porque N = 2 ainda estavam sem sinais de PD até o desfecho do estudo; N = 1 estava em cuidados de suporte

somente; e N = 8 tiveram piora clínica, por toxicidade ou agravamento da doença oncológica, seguida de morte (SGM = 550 dias [141-1647]/18.3 meses) (Figura 2).

Figura 3 - Sequência de tratamento nos pacientes pMMR.

Legenda: DE: doença estável; dMMR: *deficient mismatch repair*; ITT: intenção de tratamento; pMMR: *proficient mismatch repair*; PP: por protocolo.

Controles: 84 pacientes pMMR iniciaram o tratamento para a doença metastática com QT baseada em oxaliplatina (N = 83 – mFLOX e N = 1 – XELOX) e todos foram avaliáveis para resposta pelo RECIST, tanto em análise por protocolo quanto por intenção de tratamento.

Destes 84 doentes que fizeram primeira linha, 62 foram submetidos à QT de segunda linha (N = 58 - esquemas baseados em irinotecano sem anti-EGFR; N = 1 – irinotecano + anti-EGFR; e N = 3 – outra terapia não baseada em irinotecano). O paciente que fez irinotecano + anti-EGFR (cetuximabe) foi analisado juntamente àqueles que realizaram este esquema em terceira

linha, conforme protocolo institucional. Dentre os que fizeram QT sem irinotecano, N = 1 tinha metástases pulmonares indolentes e reiniciou o tratamento com mFLOX após 13 meses da documentação de PD. Depois de 6 meses de QT, permanecia com DE e o tratamento foi interrompido por toxicidades; N = 1 fez 3 ciclos de mFLOX e evoluiu com PD em sistema nervoso central e morte (SG: 899 dias/30 meses); e N = 1, apesar de PD documentada em exames de imagem, permaneceu com QT baseada em oxaliplatina pelo benefício clínico, no entanto, perdeu seguimento, sem avaliação de resposta subsequente. Vinte e dois pacientes não realizaram QT de segunda linha, porque N = 7 ainda permaneciam com DE após oxaliplatina; N = 1 foi submetido à RFA de lesão hepática e permaneceu vivo, sem evidência de PD até a última análise do estudo; e N = 3 perderam seguimento no ICESP.

Dos 62 pacientes submetidos à QT de segunda linha, 28 receberam terceira linha paliativa (N = 21 – irinotecano + ant-EGFR e N = 7 – outra terapia sem irino ou anti-EGFR) e 34 doentes não realizaram QT. Dentre estes, N = 2 ainda estavam com DE (um deles citado anteriormente – DE à reexposição de mFLOX); N = 4 perderam seguimento no ICESP (um deles citado anteriormente – perda após à reexposição de mFLOX); N = 2 estavam em cuidados de suporte apenas, depois da PD ao irinotecano monodroga; e N = 26 morreram, a maioria por PD e complicações clínicas durante a segunda linha baseada em irinotecano (SG: 482 dias [54-1307]/16 meses) (Figura 3).

6.2.1 Características de acordo com o tipo de quimioterapia em primeira, segunda e terceira linhas de tratamento

Quando a QT foi baseada em oxaliplatina, tanto nos casos quanto nos controles, a mediana do número de ciclos realizados até a primeira avaliação de resposta foi 2 ciclos por paciente. Nove indivíduos dMMR e 20 indivíduos pMMR apresentaram redução de dose durante este período, principalmente, devido às toxicidades do tratamento; 6 pacientes dMMR e 20 pacientes

pMMR tiveram que adiar a QT , especialmente, por toxicidades. A mediana do número total de ciclos foi igual em ambos os grupos (3 ciclos por paciente). (Tabela 3)

Tabela 3 - Características do tratamento sistêmico baseado em oxaliplatina

OXALIPLATINA	CASOS (dMMR) N=41 (100%)	CONTROLES (pMMR) N=84 (100%)
Número total	34 (82.9%)	84 (100%)
Ciclos de QT até avaliação de resposta (mediana, intervalo)	2 (1-3)	2 (1-3)
Qualquer redução de dose	9/34 (26.4%)	20/84 (23.8%)
Baixo PS (sem PD)	5 (55.6%)	3 (15.0%)
Comorbidades/idade avançada	0	1 (5.0%)
Toxicidades	4 (44.4%)	15 (75.0%)
Misto	0	1 (5.0%)
Qualquer atraso de QT	6/34 (17.6%)	20/84 (23.8%)
Toxicidades	2 (33.3%)	9 (45.0%)
Marcação/falta	2 (33.3%)	3 (15.0%)
Procedimento	2 (33.3%)	8 (40.0%)
Número de ciclos (mediana, intervalo)	3 (1-4)	3 (1-6)

Legenda: dMMR: *deficient mismatch repair*; QT: quimioterapia; pMMR: *proficient mismatch repair*.

Nos pacientes submetidos a esquemas com irinotecano (sem anti-EGFR), tanto nos casos quanto nos controles, a mediana do número de ciclos realizados até a primeira avaliação de resposta foi 3 ciclos por paciente. Cinco indivíduos dMMR e 13 indivíduos pMMR apresentaram redução de dose durante este período, em geral, devido às toxicidades ou tratamento; 5 pacientes dMMR e 6pMMR atrasaram a QT por toxicidades ou por erro de marcação/falta. A mediana do número total de ciclos foi de 3 ciclos por paciente em ambos os grupos (Tabela 4).

Tabela 4 - Características do tratamento sistêmico baseado em irinotecano

IRINOTECANO	CASOS (dMMR) N=41 (100%)	CONTROLES (pMMR) N=84 (100%)
Número total	18 (43.9%)	58 (69.0%)
Ciclos de QT até avaliação de resposta (mediana, intervalo)	3 (1-8)	3 (1-6)
Qualquer redução de dose	5/18 (27.8%)	13/58 (22.4%)
Baixo PS (sem PD)	1 (20.0%)	3 (23.1%)
Comorbidades/idade avançada	0	0
Toxicidades	4 (80.0%)	10 (76.9%)
Misto	0	0
Qualquer atraso de QT	5/18 (27.8%)	6/58 (10.3%)
Toxicidades	2 (40.0%)	5 (83.3%)
Marcação/falta	3 (30.0%)	1 (16.7%)
Procedimento	0	0
Número de ciclos (mediana, intervalo)	3 (1-17)	3 (1-19)

Legenda: dMMR: *deficient mismatch repair*; QT: quimioterapia; pMMR: *proficient mismatch repair*.

Quando o tratamento foi irinotecano + anti-EGFR (cetuximabe), tanto nos casos quanto nos controles, a mediana do número de ciclos realizados até a primeira avaliação de resposta foi 4 ciclos por paciente. Dois indivíduos dMMR e 5 indivíduos pMMR apresentaram redução de dose, em geral, devido às toxicidades do tratamento; 2 pacientes dMMR e 3 pacientes pMMR tiveram que adiar a QT, principalmente, por conta de toxicidades. A mediana do número total de ciclos foi 5.5, no grupo casos, e 6 ciclos por paciente, no grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5 - Características do tratamento sistêmico baseado em irinotecano + anti-EGFR

IRINOTECANO + anti-EGFR*	CASOS (dMMR) N=34 (100%)	CONTROLES (pMMR) N=84 (100%)
Número total	8 (19.5%)	22 (26.2%)
Ciclos de QT até avaliação de resposta (mediana, intervalo)	4 (2-8)	4 (1-10)
Qualquer redução de dose	2/8 (25.0%)	5/22 (22.7%)
Baixo PS (sem PD)	0	1 (20.0 %)
Comorbidades/idade avançada	0	0
Toxicidades	2 (100.0%)	4 (80.0%)
Misto	0	0
Qualquer atraso de QT	2/8 (25.0%)	3/22 (13.0%)
Toxicidades	1 (50.0%)	3 (100.0%)
Marcação/falta	1 (50.0%)	0
Procedimento		0
Número de ciclos (mediana, intervalo)	5.5 (2-12)	6 (1-28)

Legenda: *Todos os pacientes usaram o anti-EGFR cetuximabe. MMR: *deficient mismatch repair*; QT: quimioterapia; pMMR: *proficient mismatch repair*.

6.2 Análises moleculares

6.2.1 Análise de dMMR

Dentre os pacientes com dMMR, a perda de expressão (-) das proteínas de reparo foi vista de forma isolada ou conjunta. MSH6- e MLH1- ocorreram na maioria dos casos, com perda de suas expressões em 19 e 16 indivíduos, respectivamente. MSH2- sempre esteve associada com MSH6-: MSH2-, MSH6- (N = 13); MSH2-, MSH6-, PMS2- (N = 1). MLH1-, quando não isolada (N = 10), foi vista em conjunto com PMS2- (N = 6). MSH6- ocorreu em 5 indivíduos e PMS2-, em 6 pacientes (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise descritiva da perda de expressão das enzimas de reparo do DNA por IMH

PERDA DE EXPRESSÃO PROTEICA	N
Todos	41
MLH1-	10
MSH2-	0
MSH6-	5
PMS2-	6
MLH1- e PMS2-	6
MSH2- e MSH6-	13
MSH2-, MSH6- e PMS2-	1

Legenda: (-): ausência de expressão; IMH: imuno-histoquímica; N: número de pacientes.

6.2.2 Análises de KRAS, NRAS e BRAF:

De 125 pacientes envolvidos no estudo, os espécimes tumorais de 99 sujeitos estavam disponíveis para a pesquisa de mutação RAS/BRAF (79.2%; pMMR: N = 63 e dMMR: N = 36). Dentre estes, N = 7 (4 dMMR e 3 pMMR) tinham material insuficiente para as análises de RAS e BRAF. Vinte e seis indivíduos (20.8%; pMMR: N = 21 e dMMR: N = 5) não tinham os blocos de parafina em nosso laboratório.

Dentre os pacientes com material avaliado, N= 5 (5%) tinham BRAF^m; N = 30 (30.3%) tinham KRAS^m (N = 24 - códon 12, N = 6 - códon 13) e N = 1 (1%) tinha NRAS^m (códon 61). (Tabela 7)

Considerando somente os pacientes com resultados conclusivos para pesquisa de mutações nos genes RAS (dMMR: N = 24 e pMMR: N = 41) e BRAF (dMMR: N = 29 e pMMR: N = 56), a mutação em BRAF esteve mais frequente nos pacientes com dMMR vs pMMR (13.8 vs 1.8%). O fenótipo dMMR esteve associado a uma chance 8.8 vezes maior de apresentar BRAF^m, comparado ao fenótipo pMMR (p = 0.044). A frequência de KRAS^m foi semelhante entre os grupos dMMR vs pMMR (45.8 vs 48.8%, p = 1) (Tabela 8).

Tabela 7 - Análise descritiva de mutações nos genes KRAS, NRAS e BRAF nos casos (dMMR) e controles (pMMR)

MATERIAL ANALISADO	BRAFm	KRASm	NRASm	RAS/RAF SELVAGEM	INCONCLUSIVO	INSUFICIENTE
dMMR N = 36 (100%)	4 (11.1%)	11 (30.6%)	0	9 (25%)	8 (22.2%)*	4 (11.1%)
pMMR N = 63 (100%)	1 (1.6%)	19 (30.2%)	1 (1.6%)	19 (30.2%)	20 (31.7%)**	3 (4.7%)
TOTAL N = 99 (100%)	5 (5%)	30 (30.3%)	1 (1%)	28 (28.3%)	28 (28.3%)	7 (7.1%)

Legenda: BRAm: BRAF mutado; dMMR: *deficient mismatch repair*; KRASm: KRAS mutado; NRASm: NRAS mutado; pMMR: *proficient mismatch repair*; *grupo dMMR: resultado inconclusivo para RASm: N = 5; BRAFm: N = 0; RASm e BRAFm: N = 3; **grupo pMMR: resultado inconclusivo para RASm: N = 16; BRAFm: N = 1; RASm e BRAFm: N = 3.

Tabela 8 - Presença de RAS e BRAF (mutado ou selvagem) de acordo com status MMR

	BRAFm	BRAF _s	OR (IC95%)	p*	RASm	RAS _s	OR (IC 95%)	p*
dMMR	4	25	8.8 (0.84-218.01)	0.044	11	13	0.88 (0.28-2.74)	1.0
pMMR	1	55			20	21		

Legenda: * valor-p pelo Teste exato de Fisher; BRAFm: BRAF mutado; BRAF_s: BRAF selvagem; dMMR: *deficient mismatch repair*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; MMR: *mismatch repair*; pMMR: *proficient mismatch repair*; OR: *odds ratio*; RASm: RAS mutado; RAS_s: RAS selvagem.

6.3 Associação entre status MMR e taxa de resposta: desfecho primário do estudo

6.3.1 Pacientes submetidos à QT de primeira linha baseada em oxaliplatina

Em análise por protocolo, ou seja, considerando somente os sujeitos que receberam pelo menos 4 semanas de mFLOX e tiveram avaliação de resposta após QT – critérios de inclusão - (dMMR: N = 33; pMMR: N = 84), aqueles com pMMR apresentaram TR numericamente maior, mas não significante estatisticamente, quando comparados aos indivíduos com dMMR

(TR: 28.6% vs 12.1%, OR: 0.34, IC 95%: 0.09-1.18, $p = 0.102$). Em análise por intenção de tratamento, considerando todos os indivíduos que realizaram pelo menos uma dose de QT baseada em oxaliplatina (dMMR: $N = 34$; pMMR: $N = 84$), os pacientes com pMMR continuaram com TR numericamente maior, comparados aos doentes dMMR (TR: 28.6% vs 11.7%, OR: 0.33, IC 95%: 0.08-1.40, $p = 0.088$). (Tabela 9). Quando a análise foi feita com todos os pacientes dMMR que realizaram QT em primeira linha (incluindo, agora, o indivíduo que fez capecitabina), a TR também foi numericamente maior no grupo pMMR (TR: 28.6% vs 11.4%, OR: 0.32, IC 95%: 0.08-1.10, $p = 0.076$).

6.3.2 Pacientes submetidos à QT de segunda linha baseada em irinotecano

Dentre os pacientes tratados com irinotecano, não houve diferença significativa quanto à resposta objetiva entre os grupos (dMMR: $N = 18$; pMMR: $N = 58$). Aqueles com dMMR apresentaram TR de 5.5% vs 7.4%, quando comparados aos indivíduos pMMR (OR: 0.79, IC: 0.03-8.56, $p = 1$). (Tabela 10) O paciente com status pMMR que fez FOLFIRI + Afibercept não respondeu a esta terapia e manteve DE por 16 ciclos.

6.3.3 Pacientes submetidos à QT de terceira linha com irinotecano e anti-EGFR

Dentre aqueles que receberam irinotecano + anti-EGFR (cetuximabe) em terceira linha, os indivíduos com dMMR ($N = 8$) não responderam ao tratamento e, dentre os pMMR ($N = 22$), somente 1 paciente apresentou RP. Os demais foram não respondedores. Vale lembrar que 1 paciente de cada grupo foi submetido a cetuximabe + irinotecano em segunda linha e, após C4, o doente dMMR apresentou PD, e o doente pMMR manteve DE.

Tabela 9 - Avaliação de reposta à quimioterapia baseada em oxaliplatina em primeira linha: análise por protocolo e por intenção de tratamento

RESPOSTA	CASOS (dMMR)	CONTROLES (pMMR)	TAXA DE RESPOSTA Casos/ controles %	OR (IC 95%)	p
QT com oxaliplatina – por protocolo	33	84			
RC + RP	4	24	12.1/28.6	0.34	0.102**
DE + PD	29*	60		(0.09-1.18)	
QT com oxaliplatina – por intenção de tratamento	34	84			
Respondedores	4	24	11.7/28.6	0.33	0.088**
Não respondedores	30	60		(0.08-1.40)	

Legenda: *N =1 paciente recebeu IROX em primeira linha; ** valor-p pelo Teste qui-quadrado com correção de continuidade; DE: doença estável; dMMR: *deficient mismatch repair*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; QT: quimioterapia; PD: progressão de doença; OR: *odds ratio*; pMMR: *proficient mismatch repair*; RC: resposta completa; RP: resposta parcial.

Tabela 10 - Avaliação de resposta à quimioterapia baseada em irinotecano (sem anti-EGFR) em segunda linha, e ao irinotecano + anti-EGFR em terceira linha

RESPOSTA	CASOS (dMMR)	CONTROLES (pMMR)	TAXA DE RESPOSTA Casos/ controles %	OR (IC 95%)	p
QT com irinotecano	18	58			
Respondedores	1	4	5.5/7.4	0.79	1.0**
Não respondedores	17	54*		(0.03-8.56)	
Irinotecano + anti- EGFR***	8	22			
Respondedores	0	1	0.0/4.5		
Não respondedores	8	21			

Legenda: *N =1 paciente recebeu FOLFIRI + Aflibercept em segunda linha; ** valor-p pelo Teste exato de Fisher; ***Todos os pacientes usaram o antiEGFR cetuximabe; DE: doença estável; dMMR: *deficient mismatch repair*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; QT: quimioterapia; PD: progressão de doença; OR: *odds ratio*; pMMR: *proficient mismatch repair*; RC: resposta completa; RP: resposta parcial.

Em análise univariada, apenas as variáveis independentes: status MMR, status MMR “recategorizado” e ECOG apresentaram relação significativa com resposta à QT baseada em oxaliplatina. Porém, em análise multivariada, nenhuma variável selecionada por critério estatístico ou clínico

apresentou relação significativa com resposta à QT com oxaliplatina. O status RAS não foi incluído nos modelos, porque alguns pacientes não tiveram esta pesquisa molecular. (Anexo C)

6.4 Associação entre status MMR e SG

Em análise por protocolo, os indivíduos dMMR (N = 33) vs pMMR (N = 84) apresentaram SGM de 612 vs 797 dias, respectivamente (20.4 vs 26.5 meses, $p = 0.330$). Em análise por intenção de tratamento (N dMMR = 34, N pMMR = 84), a SGM entre os pacientes dMMR vs pMMR foi 603 vs 797 dias (20.1 vs 26.6 meses, $p = 0.252$). Quando a análise foi feita com todos os pacientes (N dMMR = 41, N pMMR = 84), considerando a sobrevida a partir do D1 do C1 de QT/tratamento local das metástases ou data de diagnóstico da doença metastática (para aqueles que não preencheram critérios de inclusão), a diferença na SGM entre os pacientes dMMR vs pMMR também não foi estatisticamente significativa (603 vs 797 dias [20.1 vs 26.5 meses], respectivamente; $p = 0.105$). (Gráfico 1)

Gráfico 1 - Comparação das curvas de SG entre os casos (dMMR) e controles (pMMR). A – análise por protocolo; B – análise por intenção de tratamento; C – análise de todos os pacientes da amostra

Legenda: dMMR: *proficient mismatch repair*; pMMR: *proficient mismatch repair*; SG: sobrevida global

6.5 Desfechos clínicos em pacientes provável HNPCC vs dMMR esporádico

Em análise exploratória, quando tentamos separar os nossos pacientes com possível síndrome de Lynch (fenótipo MSH2-/MSH6-; MLH1-/PMS2- com idade igual ou inferior a 50 anos e história familiar de CCR) daqueles com dMMR esporádico (BRAFM; fenótipo MLH1-/PMS2- com idade superior a 50 anos ou sem história familiar de CCR), os doentes com provável HNPCC (N = 18/33) pareceram responder melhor à terapia baseada em oxaliplatina, comparados aos pacientes com possível dMMR esporádico (N = 15/33). Houve 3 respondedores no primeiro grupo vs nenhum respondedor no segundo, respectivamente. Além disso, na primeira avaliação de resposta por RECIST 1.1, PD foi mais observada entre os doentes com provável dMMR esporádico (10 PD/15 pacientes), comparados aos com possível síndrome de Lynch (8 PD/18 pacientes).

Quanto à SGM, considerando somente os pacientes dMMR que preencheram critérios de inclusão (N = 33), aqueles com provável HNPCC tiveram uma sobrevida mediana maior, de aproximadamente 10 meses a mais, comparado aos pacientes com dMMR esporádico (797 vs 498 dias [26.6 vs 16.6 meses], respectivamente; $p = 0.105$). Quando a análise foi feita por intenção de tratamento (incluindo todos os pacientes dMMR que receberam pelo menos uma dose de QT baseada em oxaliplatina – N = 34), a diferença em SGM entre os prováveis Lynch (N = 18) vs dMMR esporádico (N = 16) foi de, aproximadamente, 19 meses [797 vs 226 dias (26.6 vs 7.5 meses, $p = 0.072$)]. Considerando todos os indivíduos dMMR da amostra, a SGM daqueles com possível síndrome de Lynch (N = 21) vs dMMR esporádico (N = 20) foi ainda maior e significativa estatisticamente (23.9 meses a mais - 894 vs 178 dias [29.8 vs 5.9 meses], respectivamente; $p = 0.025$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Comparação das curvas de SG entre os pacientes com possível síndrome de Lynch e os com provável dMMR esporádico. A – análise por protocolo; B – análise por intenção de tratamento; C – análise de todos os pacientes da amostra

Legenda: dMMR: *proficient mismatch repair*; pMMR: *proficient mismatch repair*; SG: *sobrevivida global*

7 DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

A instabilidade de microssatélites é fator de melhor prognóstico em estádios precoces do CCR e, portanto, poucos pacientes dMMR/MSI desenvolvem metástases ao longo da vida. Isto contribui para o pequeno número de estudos neste cenário e, apesar dos avanços em diagnóstico e tratamento do tumor colorretal, não está claro o papel do status MSI como fator prognóstico e/ou preditivo de resposta à QT na doença metastática. Nosso estudo, que teve como objetivo principal avaliar a resposta a regimes baseados em oxaliplatina dos doentes com CCRm dMMR vs pMMR, na análise por intenção de tratamento, mostrou que aqueles com status dMMR tiveram TR menor, quando comparados aos pMMR. Na análise por protocolo, mesmo que não significativa, os pacientes dMMR apresentaram TR numericamente menor que os pMMR. Ainda neste contexto, doentes com possível HNPCC pareceram responder mais à QT baseada em oxaliplatina do que os sujeitos com provável dMMR esporádico. Já nas linhas subsequentes de tratamento, não identificamos TR diferentes entre os grupos. Observamos, também, que as mutações em BRAF estiveram associadas de forma significativa ao fenótipo dMMR e não houve diferença na frequência de KRASm entre os casos (dMMR) e controles (pMMR).

A frequência de aproximadamente 3.5% de dMMR na nossa população foi consistente com outros estudos, como os de Müller *et al.*⁵⁷ e Koopman *et al.*,⁵⁹ os quais reportaram frequências de 3.8% e 3.5%, respectivamente, em análise exploratória de estudos clínicos randomizados. Por outro lado, numa metanálise sobre MSI e CCRm, publicada em 2009, 3 de 6 estudos, com N = 100, 31, 449, 36, 65 e 192 pacientes, apresentaram frequências do fenótipo MSI acima de 10% (2.2 a 21.3%).⁷⁶ Não acreditamos que a nossa baixa frequência de dMMR tenha ocorrido por falha na técnica diagnóstica, pois a IMH, além de ser um método mais barato e rápido, mostrou-se ser altamente sensível e específico na detecção de dMMR, com quase 95% de

concordância em relação ao PCR.⁷⁷⁻⁸⁰ Em 2002, Lindor *et al.*⁷⁷ testaram 1144 tumores para o fenótipo MSI e todos aqueles que apresentaram ausência de expressão das proteínas MLH1 ou MSH2 foram MSI-H pela técnica de sequenciamento gênico (especificidade de 100%), e MSI-H esteve presente somente em 3.3% dos tumores com expressão normal de MLH1 e MSH2 (sensibilidade de 92.3%).^{77,78,80} Portanto, a menor frequência do status dMMR/MSI observada em alguns estudos, inclusive no nosso, parece ser melhor explicada pelo potencial reduzido dos pacientes com este fenótipo, estádios I a III, desenvolverem metástases e, em nossa amostra, mais de 45% dos indivíduos tiveram o diagnóstico de CCR em fase inicial e, só depois, tornaram-se metastáticos. Um ponto a ser discutido é sobre a pesquisa do status MMR ter sido realizada ora em tecidos do tumor primário, ora nas metástases. Não sabemos, ao certo, se isto prejudicou a nossa amostra, pois os estudos são controversos no assunto. Parece que a instabilidade de microssatélites é um evento precoce na carcinogênese do CCR e, também, faz parte da progressão da doença.⁸¹ Assim, em teoria, não há problemas em testar a instabilidade de microssatélites em tecidos do tumor primário ou das metástases. No entanto, Ishimaru *et al.*⁸² encontraram correspondência molecular entre o tumor primário e as metástases somente em 4 de 14 doentes avaliados. Por outro lado, Chen *et al.*,⁸³ em 30 lesões pareadas (tumor primário e metástase), verificaram o genótipo MSI em maior frequência nos tecidos metastáticos (43 vs 30%) e nenhum tumor primário MSI deixou de apresentar o mesmo status na metástase correspondente. Os casos em que MSI foi identificado no tumor primário, mas não no tecido metastático, sugerem que a progressão da doença ocorreu a partir de um clone celular diferente, o qual não carregava erros em regiões de microssatélite/erros na replicação do DNA.⁸⁴

Sobre as características clínicas dos nossos pacientes, estas também foram concordantes com os demais dados da literatura.^{40,85} Assim como no trabalho de Goldstein *et al.*,⁶⁹ os tumores pouco diferenciados e localizados em cólon direito estiveram significativamente associados com o status dMMR. Um estudo transversal (N total = 1144; N MSI-H = 460), publicado

em 2013, mostrou que 82% dos CCR com MSI-H, independente do estágio, estavam no cólon proximal, em especial, aqueles com mutações MMR em células germinativas (71%).⁸⁵ Em nosso estudo, como o foco não foi diferenciar os casos esporádicos daqueles com HNPCC/síndrome de Lynch, não podemos dizer, com certeza, qual tipo de mutação MMR, se germinativa ou somática, esteve mais presente, de acordo com a localização intestinal, até porque, para isso, faz-se necessário, na maioria dos casos, a confirmação da mutação por teste genético sanguíneo.⁸⁶ Porém, alguns pacientes dMMR de nossa amostra tinham tumores proximais com perda de expressão de MSH2/MSH6 ou tinham idade menor ou igual a 50 anos e antecedentes familiares de CCR. Estas características sugerem fortemente HNPCC.^{73,74} Vale ressaltar que esta síndrome é uma herança autossômica dominante e, na maioria das vezes, está associada com mutações germinativas em MLH1 ou MSH2. Porém, 1/3 dos pacientes não apresentam mutação MMR. Nestes casos, a síndrome de Lynch origina-se de epifenômenos germinativos, como a deleção de EPCAM (gene codificador de célula epitelial de adesão molecular), a qual leva à hipermetilação e silenciamento de MSH2.^{81,87} A concomitante perda de expressão de EPCAM e MSH2 é altamente específica de cânceres com deleção de EPCAM, sugerindo que a IMH para EPCAM é uma ferramenta importante na identificação da síndrome de Lynch. Contudo, ainda não está claro se existem outras mutações germinativas não associadas com os genes MMR que, também, resultam em MSI familiar e CCR.⁽⁸⁷⁾ Recentemente, Rodriguez-Soler *et al.*⁸⁸ reportaram a “Síndrome de Lynch-like” em pacientes com CCR, MSI e história familiar de síndrome de Lynch, mas sem mutações germinativas de genes MMR ou EPCAM ou hipermetilação de MLH1. Embora mutações somáticas de genes MMR tenham sido sugeridas como um mecanismo subjacente à “Síndrome de Lynch-like”, a etiologia é incerta em mais da metade dos casos. Existem 3 possibilidades: (1) a presença de mutações germinativas desconhecidas (não MMR) que resultam em MSI; (2) mutações em genes MMR que não foram detectados pelos métodos tradicionais de pesquisa; ou (3) processos genéticos que envolvem a

hipermetilação bialélica de MLH1 na manifestação de MSI.⁸⁷ Na prática, frente à perda de expressão de MSH2, HNPPC deve ser investigado e, para auxiliar o diagnóstico, a pesquisa de BRAF está indicada; BRAFm não parece estar associado ao HNPCC, mas está presente em 40-50% dos tumores MSI esporádicos.⁸¹ Em nosso trabalho, 4 pacientes dMMR apresentaram BRAFm, o que sugere fortemente que as mutações MMR ocorreram em células somáticas, e não germinativas.

A histologia mucinosa também apresentou associação significativa com o status dMMR, corroborando os achados da literatura.^{55,58,89} Alguns estudos têm demonstrado que tumores mucinosos possuem pior prognóstico, independentemente do estágio ou do status MMR.⁸⁹⁻⁹¹ Pacientes com tumores mucinosos e status MSI parecem ter pior prognóstico, quando se correlacionam com o fenótipo CIMP e BRAFm.^{85,89,90} Por outro lado, aqueles associados ao HNPCC têm melhor sobrevida, segundo Lupinacci *et al.*⁹⁰ Ainda não está claro se a quantidade de mucina interfere nos desfechos clínicos destes indivíduos. Por enquanto, a maioria dos estudos não evidenciou diferenças prognósticas entre os tumores considerados realmente mucinosos (com mais de 50% de mucina – adenocarcinoma mucinoso) e os com somente características mucinosas (com menos de 50% de mucina). Por isso, nossos sujeitos de pesquisa foram agrupados juntos, pois o prognóstico do CCR mucinoso, provavelmente, tem maior associação com a localização do tumor e alterações genéticas do que com a quantidade de mucina. De qualquer forma, a histologia mucinosa parece ser menos responsiva à QT.⁸⁹

Sexo masculino e história familiar de CCR também estiveram associados significativamente com o status dMMR em nosso trabalho. Outros aspectos como idade, ECOG, realização de tratamento local das metástases, se lesões sincrônicas ou metacrônicas não se diferenciaram de forma significativa entre os casos e controles. Porém, a associação destas características com o status MMR tem resultados bastante variáveis na literatura. Aqui, devemos levar em consideração que o CCR é uma doença heterogênea, com múltiplas vias carcinogênicas e, mesmo dentre os

pacientes com MSI, outras alterações moleculares podem levar a características clinicopatológicas diferentes. Existem pelo menos 5 classificações moleculares do CCR, envolvendo CIN, MSI, CIMP, KRAS e BRAF. Tumores MSI esporádicos, geralmente, estão associados com CIMP, metilação de MLH1, mutação em BRAF, estabilidade cromossômica e origem em pólipos serrateais. Já a síndrome de Lynch/HNPCC caracteriza-se pela ausência de CIMP ou mutação em BRAF, estabilidade cromossômica e origem em adenomas.⁹² Apesar da instabilidade de microssatélites ser evento comum nestes dois subtipos de CCR, ao contrário do HNPCC, os tumores MSI esporádicos estão associados com idade avançada ao diagnóstico, sexo feminino e tabagismo.^{79,92} Histologia mucinosa e pouco diferenciada também são mais características dos tumores esporádicos do que do HNPCC; mutação em KRAS correlaciona-se com doentes dMMR em células germinativas, e BRAFm, em células somáticas.⁹² Portanto, é compreensível, a depender das alterações moleculares, a diferença de aspectos clinicopatológicos entre os indivíduos com CCR nos estudos. E, mais uma vez, devemos considerar que a instabilidade de microssatélites é um fenômeno raro na doença metastática, limitando o número de análises prospectivas que definam melhor este fenótipo no câncer avançado.

Apesar de não haver diferença estatística entre os grupos, a disseminação do tumor pareceu ser mais agressiva em nossos pacientes dMMR do que nos indivíduos pMMR. Mais da metade apresentava múltiplos sítios metastáticos, logo ao diagnóstico da doença estágio IV, e mesmo aqueles com sítio único de metástase tinham doenças mais extensas, enquanto a maioria dos doentes pMMR tinha metástases em somente um local. Os sítios de metástases mais comuns foram linfonodos, fígado e peritônio, nos casos (dMMR), fígado e pulmão, nos controles (pMMR). Segundo Ben Tran *et al.*,⁴⁰ o padrão de disseminação do CCRm é diferente entre os tumores MSI e MSS. Os primeiros metastatizam, em especial, para linfonodos e peritônio; os segundos costumam se disseminar mais para o fígado. A histologia mucinosa, o status MSI e BRAFm podem explicar estas diferenças. A histologia mucinosa está mais correlacionada com os tumores

MSI e se espera uma menor frequência de metástases hepáticas neles.⁵⁹ A mutação em BRAF também é mais prevalente nos cânceres com MSI,^{40,59} nos quais há maior disseminação para linfonodos distantes e peritônio, além da reduzida taxa de metastasectomias.⁴⁰ Não está claro, no entanto, se a menor frequência de metástases hepáticas entre os doentes MSI vs MSS ($p = 0.010$), no estudo de Ben Tran *et al.*,⁴⁰ deve-se à histologia mucinosa, ao status MSI ou ao BRAFm. O que fica mais evidente, assim como no trabalho de Goldstein *et al.*,⁶⁹ é que os tumores MSI com mutação em BRAF têm padrão de disseminação diferente dos MSS.⁴⁰ Dentre nossos doentes com dMMR e BRAFm, nenhum apresentou metástase hepática isolada.

Sobre a resposta ao tratamento, desfecho primário deste estudo, não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os pacientes dMMR vs pMMR tratados com regimes baseados em oxaliplatina em primeira linha; porém, em análise por intenção de tratamento, a TR foi numericamente menor nos pacientes dMMR, com tendência à significância estatística (TR: 11.7% vs 28.6%; OR: 0.33, IC 95%: 0.08-1.40, $p = 0.088$). Estes dados corroboram o estudo de Guetz *et al.*⁵⁸ que, ao avaliarem pacientes submetidos à QT com FOLFOX 4 ou FOLFOX 6, também não encontraram diferença estatística na TR entre os grupos, porém ela foi menor (numericamente) nos indivíduos MSI vs MSS (22% vs 36%, respectivamente), e os únicos 2 respondedores MSI, de 9 pacientes, receberam FOLFOX 6 ao invés de FOLFOX 4. Müller *et al.*,⁵⁷ em 2008, publicaram dados de pacientes MSI ($N = 4$) vs MSS ($N = 100$), envolvidos em estudos prospectivos com FUFOX ou CAPOX e, também, não observaram diferenças estatisticamente significantes nas TR, SG ou SLP entre os pacientes; porém, em termos numéricos, os pacientes MSI apresentaram TR inferior, comparados aos pacientes MSS (25% vs 50%, respectivamente). Talvez, se tivéssemos um N maior, conseguiríamos resultados significativos estatisticamente. De qualquer forma, consistente com outros estudos, nossos doentes dMMR responderam menos à terapia baseada em oxaliplatina, o que pode sugerir resistência deste fenótipo ao mFLOX. Curiosamente, encontramos respostas heterogêneas dentro do

grupo dMMR, quando categorizamos os pacientes em possíveis Lynch ou dMMR esporádicos. Provavelmente, aqueles com dMMR esporádico apresentaram resistência total à QT. No entanto, estes resultados têm de ser analisados com cautela, porque esta foi uma análise exploratória de uma pequena amostra, e nós não confirmamos o diagnóstico molecular de Lynch com testes genéticos. No entanto, essas diferenças entre os subgrupos dMMR têm sido sugeridas no cenário adjuvante. A análise conjunta de estudos de fase III em CCR, estádios II e III, mostrou que, entre os pacientes dMMR, o benefício da terapia adjuvante com 5-FU foi restrita àqueles com fenótipo dMMR germinativo.⁷⁴

Os motivos pelos quais os pacientes com CCRm e dMMR (especialmente, os casos esporádicos) parecem responder menos à QT são desconhecidos. Provavelmente, não só o status dMMR, mas, também, a histologia mucinosa e BRAFm contribuem para ausência de resposta à QT. Além disso, não sabemos se existe resistência do fenótipo dMMR ao FU, à oxaliplatina ou a ambos. O efeito citotóxico do FU acontece por meio da ação do FdUMP (fluorodeoxiribonucleotídeo monofosfatado), metabólito da droga, o qual bloqueia a TS, impedindo-a de sintetizar bases nitrogenadas e, consequentemente, novas cadeias de DNA.⁶¹ Recentemente, Gatalica *et al.*⁶² mostraram que a TS encontra-se superexpressa em todos os tumores colorretais MSI-H analisados (N = 20) em contraste com os tumores MSS (N = 86), nos quais a expressão de TS foi inexistente ou ocorreu na minoria (36%) dos casos ($p < 0.001$). Uma vez que a TS está presente em mais de 50% das células na doença MSI,⁶² especula-se que a sua atividade pode sobrepor à ação do FU, o qual não consegue impedir o crescimento tumoral.⁶¹ Assim, o aumento da expressão da TS parece ser um dos mecanismos da falta de resposta dos tumores dMMR ao FU. Quanto à possível resistência do fenótipo MSI à oxaliplatina, não conhecemos, ao certo, como ou se isto acontece. Estudos *in vitro* demonstraram que a ligação de platina com o DNA provoca distorções significativas na dupla hélice, com desenovelamento e torção da sua estrutura, responsáveis pela indução da apoptose e necrose celulares. Sob a ação de drogas derivadas

da platina, principalmente, a cisplatina, as células entram na fase G2 do ciclo celular (fase de “descanso”) e, depois, morrem, interrompendo o processo de mitose.²⁷ Muitos fatores têm sido atribuídos à resistência adquirida à cisplatina, entre eles, um sistema de reparo do DNA deficiente (dMMR), o qual não “reconhece” as células cancerosas danificadas pelo quimioterápico e, assim, os mecanismos de morte celular não são ativados. Foi visto em tumores ovarianos que as perdas de expressão das proteínas MLH1 e MSH2 estão presentes em 90% das células não respondedoras à cisplatina.⁶⁵ Esta resistência deve-se, principalmente, à hipermetilação de ambos os alelos de MLH1, enquanto que, nas células sensíveis à droga, a hipermetilação ocorre em somente um alelo.^{66,93} Foi demonstrado *in vitro* que o tratamento das células de CCR resistentes à platina com 5-azacytidina, um inibidor de metilação, resulta em uma re-expressão de MLH1 e, conseqüentemente, em um aumento da sensibilidade à cisplatina, o que reforça o papel de MMR na resistência de certos quimioterápicos.^{63,64} Já referente à oxaliplatina, embora ela seja um derivado da platina, não parece ter sua ação influenciada pelo sistema de reparo do DNA, segundo Fink *et al.*^{63,64} e Vaisman *et al.*⁶⁷ Uma vez que células com pMMR não detectam os adutos de oxaliplatina, também não existe qualquer consequência para as células com dMMR ao acionamento da apoptose, quando submetidas à droga. Ainda que defeitos em MMR pareçam estar associados com resistência em baixo a moderado grau à cisplatina, não sabemos em relação à oxaliplatina.^{63,64,67}

Quanto aos desfechos clínicos dos nossos sujeitos de pesquisa submetidos à QT baseada em irinotecano em segunda linha, não houve diferenças na TR entre os pacientes dMMR vs pMMR (5.9% vs 7.8%, respectivamente; $p = 1$). Estas informações corroboram os achados de um estudo retrospectivo, publicado em 2011, por Kim *et al.*,⁸⁰ com 197 indivíduos, o qual avaliou a eficácia do irinotecano em primeira linha quanto ao status dMMR ($N = 23$) e, de forma similar ao nosso trabalho, não houve diferença estatisticamente significativa na TR (56.5% vs 46%, $p = 0.569$), SLP ($p = 0.089$) ou SG ($p = 0.416$) entre os grupos dMMR vs pMMR, embora

os indivíduos dMMR tenham apresentado, numericamente, maior TR à QT. Desde o ano 2000, Fallik *et al.*⁹⁴ já afirmavam que a instabilidade de microssatélites podia influenciar na TR ao irinotecano nos pacientes com tumores colorretais. Em 2003, estes autores publicaram um trabalho retrospectivo com 72 pacientes portadores de CCRm, submetidos ao irinotecano monodroga em segunda ou terceira linhas, após falha do FU, mostrando que a taxa de respondedores foi significativamente maior no grupo MSI vs MSS. Quatro de 7 pacientes MSI responderam ao irinotecano, enquanto somente 7 de 58 doentes MSS tiveram alguma resposta tumoral (57.1% vs 11.5%, $p = 0.009$).⁶⁸ Vale lembrar que estes estudos têm N pequeno e análise de caráter exploratória. Além disso, não foi avaliado o status dMMR esporádico vs Lynch nestes trabalhos.

O irinotecano é um inibidor da topoisomerase I, enzima que relaxa o DNA superenovelado e permite a ação da topoisomerase II, a qual “quebra” a dupla fita de DNA no processo de multiplicação celular. O bloqueio da topoisomerase I causa um erro na replicação das células tumorais, levando-as à morte. Na maior parte dos tumores, o fenótipo MSI resulta da inativação de MSH2 e MLH1, que costumam participar juntos nos processos de reparo do DNA. Como o irinotecano atua impedindo o processo de replicação do DNA, uma diminuição na eficiência de MMR, principalmente na fase G2 do ciclo, poderia explicar a morte celular precoce e, conseqüentemente, a quimiossensibilidade.⁶⁸ Embora alguns trabalhos mostrem maior sensibilidade dos pacientes MSI/dMMR ao irinotecano, ainda não há dados prospectivos que definam o status MMR como preditor de resposta a esta droga no CCRm. O único estudo prospectivo que avalia a eficácia de QT baseada em irinotecano entre indivíduos MSI/dMMR vs MSS/pMMR é na adjuvância do CCR estágio III e, a despeito dos pacientes MSI/dMMR terem demonstrado melhor SLD, quando tratados com IFL (HR: 0.76, IC 95%: 0.64-0.88, $p = 0.03$),⁵⁵ estes resultados não podem ser transferidos para a doença metastática; são necessários trabalhos randomizados para definir melhor o papel do status MSI no tratamento do CCR, tanto em fases iniciais quanto avançadas.

Dentre os nossos pacientes tratados com irinotecano + anti-EGFR (cetuximabe) também não houve diferenças estatisticamente significativas na TR em relação ao status MMR. Nosso estudo foi o primeiro a correlacionar o fenótipo dMMR com QT baseada em anti-EGFR e, apesar de um número pequeno de doentes avaliados, o status dMMR não influenciou na TR dos indivíduos submetidos ao cetuximabe + irinotecano em terceira linha. Atualmente, já sabemos que a resposta à terapia com anti-EGFR, no CCRm, depende não só do KRAS selvagem nos códons 12 e 13, mas, também, da ausência de mutações em outros códons (15, 61, 117 e 146), assim como, de NRAS e BRAF não mutados. Desta forma, o papel de MMR na resistência ou sensibilidade às drogas cetuximabe/panitumumabe, se existir, deve ser muito pequeno, além do que tumores MSI pouco apresentam RASm.^{34,36,92} Este status está mais correlacionado com a instabilidade cromossômica, outra via carcinogênica. Em nosso estudo, a frequência de RASm entre os grupos não foi diferente ($p = 1$).

Em relação à SG, não houve diferença estatística entre os nossos doentes dMMR vs pMMR; no entanto, em termos numéricos, os pacientes dMMR viveram aproximadamente 6 meses menos, comparados aos pMMR. Estes dados corroboram os achados de outros estudos sobre QT baseada em oxaliplatina em primeira linha nos pacientes MSI.^{57,60} Uma possível justificativa para a falta de diferença estatística em SG entre nossos pacientes dMMR vs pMMR, talvez seja a presença de um número considerável de doentes com possível síndrome de Lynch em nossa amostra (metade do grupo dMMR). Quando o fenótipo MSI deve-se a alterações em células somáticas, principalmente, às custas da hipermetilação de MLH1, o prognóstico parece ser pior, até porque estes tumores também estão mais associados com a mutação de BRAF.^{28,74,92} Koopman *et al.*,⁵⁹ ao compararem a SG entre indivíduos com CCRm/pMMR (N = 497) vs dMMR (N = 18), observaram SGM menor para o grupo dMMR (17.9 vs 10.2 meses, respectivamente; $p = 0.41$). Esta diferença foi ainda maior, numericamente, quando os doentes pMMR foram comparados aos dMMR com hipermetilação de MHL1 (N = 13) (17.9 vs 7.4 meses, respectivamente; $p =$

0.27). Nossos dados também apontam para uma menor SGM entre os pacientes com possível dMMR esporádico vs possível Lynch, quando os separamos em análise exploratória. Outro aspecto interessante é que, apesar dos tumores MSI, em estádios precoces, exibirem melhor prognóstico para recorrência e SG, quando eles se tornam metastáticos, tendem a apresentar pior sobrevida, comparados com os tumores MSS. Gavin *et al.*,⁹⁵ ao avaliarem o valor preditivo e prognóstico do status MMR em pacientes com CCR, estádios II e III, envolvidos em 2 grandes estudos prospectivos (C-07 e C-08), observaram que os doentes dMMR vs pMMR apresentaram melhor prognóstico quanto à recorrência (HR: 0.48, IC 95%: 0.33-0.70, $p < 0.0001$) e SG (HR: 0.63, IC 95%: 0.46-0.89, $p = 0.0084$), porém, quando se tornaram metastáticos, a sobrevida após a recorrência foi pior (HR: 1.60, IC 95%: 1.07-2.41, $p = 0.02$). Eles notaram também que a mutação de BRAF estava associada com piores SG ($p = 0.0002$) e sobrevida após a recorrência ($p < 0.0001$), mas não com pior SLD ($p = 0.86$). Isto pode explicar porque BRAFm não é fator prognóstico para recorrência, e sim para SG. Aproximadamente 44% dos doentes do grupo dMMR em nosso estudo eram portadores de CCR estágio precoce e evoluíram com metástases ao longo do tempo, ou seja, o prognóstico que, inicialmente, parecia ser bem melhor, tornou-se pior, comparado aos pMMR, uma vez que se tornaram metastáticos. Dois deles tinham BRAFm e a SG foi menor do que 2 anos.

Nosso estudo apresenta limitações inerentes ao próprio desenho retrospectivo e ao fato de ser unicêntrico. Embora isto possa influenciar a validade externa do trabalho, alguns pontos positivos podem ser notados: desenhos retrospectivos são apropriados para análises exploratórias de doenças raras, como é o caso do CCRm com dMMR; e a realização do estudo em um único centro garantiu a administração dos mesmos protocolos de tratamento aos pacientes, além do que todos os exames de imagem foram de boa qualidade e puderam ser recuperados para avaliação por RECIST por um único radiologista, cego quanto aos resultados da pesquisa. A definição do status MSI somente por IMH também foi uma limitação, pois já sabemos que existem outras alterações genéticas implicadas neste

fenótipo que não são detectadas pela perda de expressão proteica dos genes MMR. Alguns casos, por exemplo, com características clínicas de síndrome de Lynch podem ter sido perdidos, pois somente a IMH foi realizada, além do que, não realizamos testes genéticos sanguíneos para a diferenciação diagnóstica entre HNPCC e dMMR esporádico. Por outro lado, a análise do status MMR foi feita em um só laboratório, utilizando a mesma técnica para todos os sujeitos. Estas medidas tornam os dados menos susceptíveis a erros de informação. E apesar de não termos conseguido material adequado para todas as análises moleculares, temos que levar em consideração que, mesmo com a raridade de CCRm e MSI, levantamos dados de um número considerável de pacientes com dMMR, um dos maiores da literatura. Devido a esta raridade, selecionamos pacientes com fenótipo dMMR fora do período de inclusão, o que pode ter causado viés de seleção, pois não podemos afirmar que estes foram selecionados de forma consecutiva; talvez, somente aqueles com características de Lynch foram eleitos para o teste MSI na prática clínica. É possível que um viés de seleção na análise de todos os pacientes da amostra, tenha resultado em pior sobrevida no grupo dMMR, já que alguns desses doentes tiveram evolução muito agressiva e morreram antes de iniciarem o tratamento sistêmico. Em contrapartida, a maioria dos pacientes com CCRm ainda está apta para QT de primeira linha, ou seja, a proporção de pacientes, em maioria pMMR, que não realiza QT por baixa performance é muito pequena em comparação aos pacientes dMMR. Corroborando estes dados, recentemente, foi publicado um trabalho realizado pelo nosso grupo, no ICESP, o qual mostrou vantagem em sobrevida para alguns doentes com CCRm, ECOG 3 ou 4, que receberam QT vs melhores cuidados de suporte.⁹⁶ Neste estudo, dos 1265 pacientes com CCRm elegíveis, apenas 36 (0.028%) não receberam QT de primeira linha, devido às más condições clínicas. Este controle histórico deixa-nos mais confortáveis em relação ao nosso grupo controle, pois, mesmo que seleccionássemos doentes com status pMMR sem critérios de elegibilidade, como foi feito no grupo casos (dMMR), dificilmente estes indivíduos não teriam condições de receber algum tipo de tratamento

quimioterápico. Além disso, apesar de não termos em nosso protocolo FOLFOX e/ou bevacizumabe, em primeira linha paliativa, achamos importante avaliar os desfechos clínicos dos pacientes dMMR que receberam mFLOX, porque, cada vez mais, este esquema quimioterápico é realizado no âmbito da saúde pública de vários países, pois oferece bom custo-benefício.¹³ E como bevacizumabe não incrementou a taxa de resposta, quando combinado com FLOFOX/XELOX⁹⁷, é pouco provável que a ausência desta droga no tratamento tenha afetado nossos resultados. Por outro lado, nós avaliamos a eficácia dos anticorpos monoclonais anti-EGFR em pacientes com CCRm e dMMR, o que no nosso conhecimento, não havia sido estudado antes.

Frente à baixa probabilidade de resposta à QT do CCRm com fenótipo MSI, temos como perspectiva o uso de imunoterapia neste cenário. Estudo recente mostrou que tumores dMMR tratados com pembrolizumabe, um anticorpo que bloqueia a via PD-1 (que regula negativamente a resposta imune, prevenindo a ativação de células-T), tiveram TR e SLP superiores, comparados aos pMMR.⁷⁰ Se a terapia anti-PD-1 substituirá definitivamente a QT no CCRm/MSI, isto ainda é incerto. O que se sabe é que o tumor com dMMR têm alta expressão de ligantes imunes (checkpoints imunes), além do PD-L1/PD-1, como CTLA-4 e LAG-3, os quais podem também funcionar como alvos terapêuticos,⁽⁹⁸⁾ inclusive, no contexto adjuvante, onde ainda há dúvidas sobre o papel da QT nos pacientes com dMMR. Apesar dos dados animadores do estudo de Le *et al.*,⁷⁰ devemos lembrar que a grande maioria dos pacientes tinha síndrome de Lynch e, portanto, a eficácia da imunoterapia em tumores esporádicos dMMR permanece desconhecida. Além disso, não foram todos os pacientes dMMR que tiveram resposta, e nenhum doente pMMR teve qualquer resposta à imunoterapia. A completa ausência de respostas objetivas nos tumores proficientes sugere que o principal valor deste estudo pode estar em definir os pacientes com CCR que não devem receber terapia anti-PD-1. Se confirmado em trabalhos maiores, isto poderá ter grandes implicações práticas, considerando que

85% dos pacientes com CCR têm fenótipo pMMR e não devem ser tratados com bloqueio anti-PD-1.⁹⁹

Concluindo, este estudo mostrou que o status dMMR em pacientes com CCRm foi preditivo de resistência à primeira linha de QT baseada em oxaliplatina. Este fenômeno foi aparentemente restrito ao fenótipo dMMR esporádico. Portanto, defendemos a ideia de que os trabalhos futuros devam estratificar os pacientes dMMR germinativos vs dMMR esporádicos. Enquanto o status dMMR não foi preditivo de resposta ao irinotecano monodroga ou combinado com anti-EGFR, ele esteve associado com pior sobrevida e BRAFm. A raridade deste fenótipo limita a inclusão de pacientes tanto em séries retrospectivas quanto em estudos prospectivos randomizados. Somente a colaboração e grandes esforços entre investigadores de múltiplas instituições permitirão estudos maiores para uma melhor compreensão da história natural e desfechos clínicos dos pacientes com CCRm e dMMR.

8 ANEXOS

8.1 Anexo A: Escala de capacidade funcional (PS)

Escala de Zubrod (ECOG):¹⁰⁰

PS 0 – totalmente ativo; sem restrições de desempenho

PS 1 – atividade física extenuante restrita; totalmente ambulatorial e capaz de realizar trabalhos leves

PS 2 – capaz de cuidar de si mesmo, mas sem condições de trabalhar; permanece fora do leito mais de 50% do tempo

PS 3 – capacidade limitada de cuidar de si mesmo; confinado ao leito ou cadeira mais de 50% do tempo

PS 4 – completamente inativo, sem condições de autocuidados; totalmente confinado ao leito ou cadeira

8.2 Anexo B: Taxa de resposta conforme RECIST 1.1⁷²

Taxa de Resposta Radiológica

A resposta e a progressão foram avaliadas neste estudo utilizando os critérios internacionais propostos pelo comitê RECIST, versão 1.1, de 2009, o qual considera:

Doença Mensurável: lesões que podem ser precisamente medidas em ao menos uma dimensão (diâmetro mais longo a ser registrado), como ≥ 10 mm por meio de técnicas convencionais (exames físicos, TC, RNM) ou como ≥ 20 mm com raio-X de tórax. Linfonodos com menor eixo ≥ 15 mm também são mensuráveis.

Lesões clínicas: consideradas mensuráveis, quando superficiais apenas (por exemplo, nódulos cutâneos, linfonodos palpáveis).

Doença não mensurável: todas as outras lesões (ou locais de doença), incluindo lesões pequenas com diâmetro < 10 mm por meio de técnicas convencionais ou linfonodos com menor eixo entre 10 e 15 mm. Lesões ósseas, doença leptomeníngea, ascite, derrames pleural/pericardico, linfangite e lesões císticas são não mensuráveis.

Lesões Alvo: Todas as lesões mensuráveis – até 2 lesões por órgão e 5 lesões na representação total de todos os órgãos envolvidos – medidas nos exames basais. As lesões alvo foram selecionadas com base em seu tamanho (lesões com os diâmetros mais longos e, se linfonodo, considerado menor eixo) e sua adequação para medições repetidas precisas (por técnicas de imagem ou clinicamente). A soma dos maiores diâmetros (MD) de todas as lesões alvo foi calculada e utilizada como referência para caracterização da resposta tumoral objetiva. Se mais do que 5 lesões mensuráveis presentes, aquelas não selecionadas como lesões alvo foram consideradas, juntamente com a doença não mensurável – lesões não alvo.

Lesões não alvo: Todas as lesões não mensuráveis (ou locais da doença) além de quaisquer lesões mensuráveis e acima das 5 listadas como lesões alvo, as quais foram especificadas no exame basal e acompanhadas como “presentes” ou “ausentes”/“aumentaram” ou “diminuíram”.

Todas as pacientes tiveram sua MELHOR RESPOSTA no estudo, conforme resumido abaixo:

Resposta Completa (RC): desaparecimento de todas as evidências clínicas e radiológicas de tumor (alvo ou não alvo).

Resposta Parcial (RP): uma redução de ao menos 30% na soma de MD de lesões alvo, tendo como referência o exame basal.

Doença Estável (DE): estado de equilíbrio da doença. Nem redução suficiente para qualificar como RP nem aumento suficiente para qualificar como PD, documentado pelo menos uma vez > 4 semanas a partir do exame basal.

Progressão de Doença (PD): um aumento de ao menos 20% na soma de MD das lesões medidas, tendo como referência a menor soma dos MD registrada desde o início do tratamento. O aparecimento de novas lesões também constitui doença progressiva, assim como progressão inequívoca de lesões não alvo (mesmo que o as lesões alvo tenham reduzido ou permanecido estáveis, há crescimento importante das não alvo, motivando a troca de terapia).

Tabela 11 - Classificação de resposta

LESÕES ALVO	NÃO ALVO	NOVAS LESÕES	RESPOSTA GERAL
RC	RC	Não	RC
RC	Não-RC/Não-PD	Não	RP
RC	Não-PD	Não	RP
DE	Não-PD	Não	DE
PD	Qualquer	Sim ou Não	PD
Qualquer	PD*	Sim ou Não	PD
Qualquer	Qualquer	Sim	PD

Legenda: *progressão de doença inequívoca; DE: doença estável; PD: progressão de doença; RC: resposta completa; RP: resposta parcial.

8.3 Anexo C: Análises univariadas e multivariadas dos fatores que influenciaram a resposta à quimioterapia baseada em oxaliplatina

Foram realizadas análises univariadas e multivariadas para identificar os fatores que influenciaram a resposta à QT, considerando as variáveis independentes:

8.3.1 Modelo 1:

- (a)** status MMR/MSI (dMMR x pMMR);
- (b)** Idade;
- (c)** Sexo;
- (d)** ECOG (0 ou 1 x 2 ou 3);
- (e)** Redução / atraso na QT (sim x não).

8.3.2 Modelo 2:

- (a)** status MMR/MSI recategorizado (dMMR Lynch x dMMR esporádico x pMMR);
- (b)** Idade;
- (c)** Sexo;
- (d)** ECOG (0 ou 1 x 2 ou 3);
- (e)** Redução / atraso na QT (sim x não).

Tabela 12 - Resultados das análises univariadas na relação entre resposta à quimioterapia e cada uma das variáveis independentes

VARIÁVEIS	RESPOSTA RECIST		p-valor
	Sim (RC ou RP)	Não (DE ou PD)	
STATUS MMR			
pMMR	24 (85.7)	60 (67.4)	0.102*
dMMR	4 (14.3)	29 (32.6)	
Total	28 (100)	89 (100)	
STATUS MMR “recategorizado”			
dMMR provável esporádico	0 (0)	15 (16.9)	0.010***
dMMR provável Lynch	4 (14.3)	14 (15.7)	
pMMR	24 (85.7)	60 (67.4)	
Total	28 (100)	89 (100)	
IDADE AO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA METASTÁTICA			
Média (Desvio padrão)	55.5 (12.8)	51.7 (15.8)	0.252 [#]
Mediana (Mínimo - Máximo)	59 (30 - 78)	52 (16 - 79)	
Total	28	89	
SEXO			
Masculino	15 (53.6)	47 (52.8)	1.000*
Feminino	13 (46.4)	42 (47.2)	
Total	28 (100)	89 (100)	
ECOG			
0 ou 1	26 (92.9)	72 (80.9)	0.238**
2 ou 3	2 (7.1)	17 (19.1)	
Total	28 (100)	89 (100)	
REDUÇÃO DOSE E/OU ATRASO QT			
Sim	12 (42.9)	33 (37.1)	0.745*
Não	16 (57.1)	56 (62.9)	
Total	28 (100)	89 (100)	

Legenda: DE; doença estável; dMMR: *deficient mismatch repair*; MMR: *DNA mismatch repair*; PD: progressão de doença; pMMR: *proficient mismatch repair*; QT: quimioterapia; RC; resposta completa; RP: resposta parcial.

De acordo com os resultados da Tabela 12, ao nível de significância de 5%, há relação significativa entre resposta à QT e STATUS MMR recategorizado. Nos pacientes com dMMR esporádico há maior percentual

de resposta não (DE ou PD) e nenhum paciente com resposta sim (RC ou RP), enquanto que nos pacientes com pMMR há menor percentual de resposta não (DE ou PD) e maior percentual de resposta sim (RC ou RP). Nos pacientes com dMMR Lynch os percentuais de respostas sim (RC ou RP) e não (DE ou PD) são muito próximos.

Figura 4 - Relação entre resposta à quimioterapia e STATUS MSI/MMR recategorizado.

Legenda: dMMR: *deficient mismatch repair*; MSI: instabilidade de microssatélites

Tabela 13 - Resultados das análises univariadas na relação entre as variáveis independentes duas a duas

COMPARAÇÕES	p-valor
STATUS MMR x IDADE AO DIAGN METASTÁTICA	0.374
STATUS MMR x SEXO	0.013
STATUS MMR x ECOG	0.937
STATUS MMR x REDUÇÃO DOSE E/OU ATRASO QT	0.935
STATUS MMR recategorizado x IDADE AO DIAGN METAST	0.009
STATUS MMR recategorizado x SEXO	0.022
STATUS MMR recategorizado x ECOG	0.004
STATUS MMR recategorizado x REDUÇÃO DOSE E/OU ATRASO QT	0.887
IDADE AO DIAGN METAST x SEXO	0.932
IDADE AO DIAGN METAST x ECOG	0.078
IDADE AO DIAGN METAST x REDUÇÃO DOSE E/OU ATRASO QT	0.004
SEXO x ECOG	0.828
SEXO x REDUÇÃO DOSE E/OU ATRASO QT	1.000
ECOG x REDUÇÃO DOSE E/OU ATRASO QT	0.031

Legenda: Idade ao diagn metast: idade ao diagnóstico da doença metastática; MMR: *DNA mismatch repair*; QT: quimioterapia.

De acordo com os resultados da Tabela 13, ao nível de significância de 5%, há relação significativa entre as variáveis independentes:

STATUS MMR x SEXO: há maior percentual de pacientes do sexo masculino com dMMR enquanto que há maior percentual de pacientes do sexo feminino com pMMR.

STATUS MMR recategorizado x IDADE AO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA METASTÁTICA: pacientes com dMMR provável Lynch apresentam média de idade significativamente menor do que os pacientes com pMMR e dMMR provável esporádico, que não diferem entre si quanto à média de idade.

STATUS MMR recategorizado x SEXO: há maior percentual de pacientes do sexo masculino com dMMR Lynch e esporádico enquanto que há maior percentual de pacientes do sexo feminino com pMMR.

STATUS MMR recategorizado x ECOG: há menor percentual de ECOG 2 ou 3 tanto para pacientes pMMR quanto para pacientes dMMR provável esporádico e Lynch, porém, o percentual de ECOG 2 ou 3 é maior nos pacientes dMMR provável esporádico do que nos pacientes pMMR e dMMR provável Lynch (este último apresenta apenas ECOG 0 ou 1).

IDADE AO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA METASTÁTICA x REDUÇÃO DOSE E/OU ATRASO QT: pacientes com redução de dose e / ou atraso de QT apresentam média de idade significativamente maior do que os pacientes sem redução de dose e/ou atraso de QT.

ECOG x REDUÇÃO DOSE E/OU ATRASO QT: há maior percentual de pacientes sem redução de dose e / ou atraso de QT entre os pacientes com ECOG 0 ou 1 enquanto que há maior percentual de pacientes com redução de dose e / ou atraso de QT entre os pacientes com ECOG 2 ou 3.

Figura 5 - Relação entre as variáveis independentes duas a duas.

Legenda: dMMR: *deficient mismatch repair*; ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; MSI: instabilidade de microssatélites; pMMR: *proficient mismatch repair*; QT: quimioterapia

De acordo com os resultados da Tabela 14, apenas as variáveis independentes: STATUS MMR, STATUS MMR recategorizado e ECOG apresentaram relação significativa com a resposta à QT ao nível de significância de 25%. Portanto, o modelo 1 deveria ser composto apenas pelas variáveis independentes: STATUS MMR e ECOG enquanto que o

modelo 2 deveria ser composto pelas variáveis independentes: STATUS MMR recategorizado e ECOG, porém as variáveis independentes STATUS MMR recategorizado e ECOG se relacionam significativamente, ao nível de significância de 5%, conforme resultado da Tabela 13 e, assim, não poderiam ser selecionadas para um mesmo modelo de regressão logística multivariada. Além disso, como outras variáveis independentes relacionam-se significativamente entre si na comparação duas a duas, conforme resultado da Tabela 13, elas não poderiam entrar em um mesmo modelo de regressão logística multivariada para identificar os fatores que influenciaram a resposta à QT. Dessa forma, foram realizados alguns modelos de regressão logística multivariada com as variáveis independentes selecionadas por critério estatístico e outros com as variáveis independentes selecionadas por critério clínico, conforme descritos nas Tabelas 14 a 18 abaixo.

Tabela 14 - Resultado do modelo de regressão logística multivariada para identificar os fatores que influenciaram a resposta à quimioterapia, considerando as variáveis independentes selecionadas por critério estatístico (p -valor $\leq 25\%$ na relação com a resposta à quimioterapia): status MMR e ECOG

FATOR	ESTIMATIVA	OR	IC 95%	p-valor
STATUS MMR (dMMR x pMMR)	-1.058	0.347	(0.109; 1.101)	0.072
ECOG 0 ou 1 x 2 ou 3	1.112	0.039	(0.648; 14.252)	0.159

Legenda: dMMR: *deficient mismatch repair*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; MMR: *DNA mismatch repair*; pMMR: *proficient mismatch repair*.

De acordo com os resultados da Tabela 15, ao nível de significância de 5%, nenhuma das variáveis apresenta relação significativa com resposta à QT no modelo de regressão logística multivariada.

Tabela 15 - Resultado do modelo de regressão logística multivariada para identificar os fatores que influenciaram a resposta à quimioterapia, considerando as variáveis independentes selecionadas por critério estatístico (variáveis independentes que não se relacionam ao nível de significância de 5% na comparação duas a duas): status MMR, Idade e ECOG

FATOR	ESTIMATIVA	OR	IC 95%	p-valor
STATUS MMR (dMMR x pMMR)	0.986	0.373	(0.117; 1.193)	0.097
IDADE AO DIAGN METAST	0.019	0.019	(0.988; 1.051)	0.227
ECOG (0 ou 1 x 2 ou 3)	0.208	0.348	(0.706; 15.886)	0.128

Legenda: dMMR: *deficient mismatch repair*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; Idade ao diagn metast: idade ao diagnóstico da doença metastática; MMR: *DNA mismatch repair*; pMMR: *proficient mismatch repair*.

De acordo com os resultados da Tabela 16, ao nível de significância de 5%, nenhuma das variáveis apresenta relação significativa com resposta à QT no modelo de regressão logística multivariada.

Tabela 16 - Resultado do modelo de regressão logística multivariada para identificar os fatores que influenciaram a resposta à quimioterapia, considerando as variáveis independentes selecionadas por critério estatístico (variáveis independentes que não se relacionam ao nível de significância de 5% na comparação duas a duas): status dMMR recategorizado e redução de dose e/ou atraso na quimioterapia

FATOR	ESTIMATIVA	OR	IC 95%	p-valor
STATUS MMR recategorizado	0.000	0.000	(0; 0)	0.873
STATUS MMR recategorizado (dMMR Lynch x pMMR)	- 0.322	0.725	(0.216; 2.431)	0.602
STATUS MMR recategorizado (dMMR esporádico x pMMR)	- 20.290	0.000	(0; .)	0.998
REDUÇÃO DOSE E/OU ATRASO QT (Sim x Não)	0.256	1.292	(0.532; 3.138)	0.572

Legenda: dMMR: *deficient mismatch repair*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; MMR: *DNA mismatch repair*; pMMR: *proficient mismatch repair*.

De acordo com os resultados da Tabela 17, ao nível de significância de 5%, nenhuma das variáveis apresenta relação significativa com resposta à QT no modelo de regressão logística multivariada.

Tabela 17 - Resultado do modelo de regressão logística multivariada para identificar os fatores que influenciaram a resposta à quimioterapia, considerando as variáveis independentes selecionadas por critério clínico (status MMR, idade, sexo, ECOG e redução/atraso na quimioterapia)

FATOR	ESTIMATIVA	OR	IC 95%	p-valor
STATUS MMR (dMMR x pMMR)	-1.054	0.349	(0.106; 1.149)	0.083
IDADE AO DIAGN METAST	0.016	1.017	(0.985; 1.049)	0.305
SEXO (Masculino x Feminino)	0.271	1.312	(0.531; 3.239)	0.556
ECOG (0 ou 1 x 2 ou 3)	0.317	3.733	(0.757; 18.419)	0.106
REDUÇÃO DOSE E/OU ATRASO QT (Sim x Não)	0.282	1.326	(0.52; 3.381)	0.554

Legenda: dMMR: *deficient mismatch repair*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; idade ao diagn metast: idade ao diagnóstico da doença metastática; MMR: *DNA mismatch repair*; pMMR: *proficient mismatch repair*; QT: quimioterapia.

De acordo com os resultados da Tabela 18, ao nível de significância de 5%, nenhuma das variáveis apresenta relação significativa com resposta à QT no modelo de regressão logística multivariada.

Tabela 18 - Resultado do modelo de regressão logística multivariada para identificar os fatores que influenciaram a resposta à quimioterapia, considerando as variáveis independentes selecionadas por critério clínico (status MMR recategorizado, idade, sexo, ECOG e redução/atraso na quimioterapia)

FATOR	ESTIMATIVA	OR	IC 95%	p-valor
STATUS MMR recategorizado				0.907
STATUS MMR recategorizado (dMMR Lynch x pMMR)	- 0.296	0.744	(0.2; 2.759)	0.658
STATUS MMR recategorizado (dMMR esporádico x pMMR)	- 20.221	0.000	(0; .)	0.998
IDADE AO DIAGN METAST	0.023	1.023	(0.99; 1.058)	0.173
SEXO (Masculino x Feminino)	0.209	1.232	(0.491; 3.091)	0.656
ECOG (0 ou 1 x 2 ou 3)	1.055	2.873	(0.554; 14.893)	0.209
REDUÇÃO DOSE E/OU ATRASO QT (Sim x Não)	0.204	1.226	(0.475; 3.166)	0.673

Legenda: dMMR: *deficient mismatch repair*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; idade ao dign metast: idade ao diagnóstico da doença metastática; MMR: *DNA mismatch repair*; pMMR: *proficient mismatch repair*; QT: quimioterapia.

De acordo com os resultados da Tabela 18, ao nível de significância de 5%, nenhuma das variáveis apresenta relação significativa com resposta à QT no modelo de regressão logística multivariada.

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.
2. MS/SVS/DASIS/CGIAE/Sistema de Informação sobre Mortalidade - SIM MP/Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE MS/INCA/Conprev/Divisão de InformaçãoMS/SVS/DASIS/CGIAE/Sistema de Informação sobre Mortalidade - SIM MP/Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE MS/INCA/Conprev/Divisão de Informação; 2016.
3. National Cancer Institute - *Surveillance Epidemiology and End Result Program 2016 [Cancer Statistics]*.
4. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009;360(14):1408-17.
5. Glimelius B, Hoffman K, Graf W, Pahlman L, Sjoden PO. Quality of life during chemotherapy in patients with symptomatic advanced colorectal cancer. The Nordic Gastrointestinal Tumor Adjuvant Therapy Group. *Cancer.* 1994;73(3):556-62.
6. de Gramont A, Bosset JF, Milan C, Rougier P, Bouche O, Etienne PL, et al. Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. *J Clin Oncol.* 1997;15(2):808-15.
7. Zhang W, Azuma M, Lurje G, Gordon MA, Yang D, Pohl A, et al. Molecular predictors of combination targeted therapies (cetuximab, bevacizumab) in irinotecan-refractory colorectal cancer (BOND-2 study). *Anticancer Res.* 2010;30(10):4209-17.
8. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homérin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2000;18(16):2938-47.

9. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2000;355(9209):1041-7.
10. Fuchs CS, Marshall J, Mitchell E, Wierzbicki R, Ganju V, Jeffery M, et al. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study. *J Clin Oncol*. 2007;25(30):4779-86.
11. Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*. 2004;22(2):229-37.
12. Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ, Smith RE, Colangelo LH, Yothers G, et al. Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07. *J Clin Oncol*. 2007;25(16):2198-204.
13. Nebuloni DR, Mak MP, Souza FH, Saragiotto DF, Julio T, D. E. Castro G J, et al. Modified FLOX as first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer patients in the public health system in Brazil: Effectiveness and cost-utility analysis. *Mol Clin Oncol*. 2013;1(1):175-9.
14. Cunningham D, Pyrhonen S, James RD, Punt CJ, Hickish TF, Heikkila R, et al. Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet*. 1998;352(9138):1413-8.
15. Rougier P, Van Cutsem E, Bajetta E, Niederle N, Possinger K, Labianca R, et al. Randomised trial of irinotecan versus fluorouracil by continuous infusion after fluorouracil failure in patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet*. 1998;352(9138):1407-12.
16. Hutchins G, Southward K, Handley K, Magill L, Beaumont C, Stahlschmidt J, et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(10):1261-70.

17. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(5):663-71.
18. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol*. 2010;28(31):4697-705.
19. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Final results from PRIME: randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2014;25(7):1346-55.
20. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcborg JR, Tu D, Au HJ, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2007;357(20):2040-8.
21. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(13):1658-64.
22. 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;351(4):337-45.
23. Andre T, Blons H, Mabro M, Chibaudel B, Bachet JB, Tournigand C, et al. Panitumumab combined with irinotecan for patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer refractory to standard chemotherapy: a GERCOR efficacy, tolerance, and translational molecular study. *Ann Oncol*. 2013;24(2):412-9.
24. Welch S, Spithoff K, Rumble RB, Maroun J. Bevacizumab combined with chemotherapy for patients with advanced colorectal cancer: a systematic review. *Ann Oncol*. 2010;21(6):1152-62.

25. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Prausova J, Macarulla T, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J Clin Oncol*. 2012;30(28):3499-506.
26. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2013;381(9863):303-12.
27. Warusavitarne J, Schnitzler M. The role of chemotherapy in microsatellite unstable (MSI-H) colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2007;22(7):739-48.
28. Dienstmann R. Colorectal Cancer subtyping Consortium (CRCSC) identification of a consensus of molecular subtypes. *J Clin Oncol*. 2014.
29. Ellis CA, Clark G. The importance of being K-Ras. *Cell Signal*. 2000;12(7):425-34.
30. Olson MF, Marais R. Ras protein signalling. *Semin Immunol*. 2000;12(1):63-73.
31. Fotiadou PP, Takahashi C, Rajabi HN, Ewen ME. Wild-type NRas and KRas perform distinct functions during transformation. *Mol Cell Biol*. 2007;27(19):6742-55.
32. Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*. 1998;17(11 Reviews):1395-413.
33. Spandidos DA, Sourvinos G, Tsatsanis C, Zafiropoulos A. Normal ras genes: their onco-suppressor and pro-apoptotic functions (review). *Int J Oncol*. 2002;21(2):237-41.
34. Tejpar S, Bertagnolli M, Bosman F, Lenz HJ, Garraway L, Waldman F, et al. Prognostic and predictive biomarkers in resected colon cancer: current status and future perspectives for integrating genomics into biomarker discovery. *Oncologist*. 2010;15(4):390-404.

35. Irahara N, Baba Y, Nosho K, Shima K, Yan L, Dias-Santagata D, et al. NRAS mutations are rare in colorectal cancer. *Diagn Mol Pathol*. 2010;19(3):157-63.
36. Vaughn CP, Zobell SD, Furtado LV, Baker CL, Samowitz WS. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011;50(5):307-12.
37. Sithanandam G, Kolch W, Duh FM, Rapp UR. Complete coding sequence of a human B-raf cDNA and detection of B-raf protein kinase with isozyme specific antibodies. *Oncogene*. 1990;5(12):1775-80.
38. Pollock PM, Meltzer PS. Lucky draw in the gene raffle. *Nature*. 2002;417(6892):906-7.
39. Kolch W, Kotwaliwale A, Vass K, Janosch P. The role of Raf kinases in malignant transformation. *Expert Rev Mol Med*. 2002;4(8):1-18.
40. Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang ZQ, Lieu CH, et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2011;117(20):4623-32.
41. 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;38(7):787-93.
42. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58(22):5248-57.
43. Nussbaum RL MR, Willard HF. *Thompson and Thompson Genetics in Medicine*. 2007.
44. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003;349(21):2042-54.
45. Goel A, Nagasaka T, Arnold CN, Inoue T, Hamilton C, Niedzwiecki D, et al. The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2007;132(1):127-38.

46. de la Chapelle A, Hampel H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3380-7.
47. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2003;349(3):247-57.
48. Ohrling K, Edler D, Hallstrom M, Ragnhammar P. Mismatch repair protein expression is an independent prognostic factor in sporadic colorectal cancer. *Acta Oncol*. 2010;49(6):797-804.
49. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3219-26.
50. Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, Zeps N, Spry N, Iacopetta B. Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet*. 2000;355(9217):1745-50.
51. Hemminki A, Mecklin JP, Jarvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H. Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology*. 2000;119(4):921-8.
52. Elsaleh H, Powell B, McCaul K, Grieu F, Grant R, Joseph D, et al. P53 alteration and microsatellite instability have predictive value for survival benefit from chemotherapy in stage III colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2001;7(5):1343-9.
53. 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;45(10):1890-6.
54. Liang JT, Huang KC, Lai HS, Lee PH, Cheng YM, Hsu HC, et al. High-frequency microsatellite instability predicts better chemosensitivity to high-dose 5-fluorouracil plus leucovorin chemotherapy for stage IV sporadic colorectal cancer after palliative bowel resection. *Int J Cancer*. 2002;101(6):519-25.

55. Bertagnolli MM, Niedzwiecki D, Compton CC, Hahn HP, Hall M, Damas B, et al. Microsatellite instability predicts improved response to adjuvant therapy with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin in stage III colon cancer: Cancer and Leukemia Group B Protocol 89803. *J Clin Oncol*. 2009;27(11):1814-21.
56. Zaanan A, Cuilliere-Dartigues P, Guilloux A, Parc Y, Louvet C, de Gramont A, et al. Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. *Ann Oncol*. 2010;21(4):772-80.
57. Muller CI, Schulmann K, Reinacher-Schick A, Andre N, Arnold D, Tannapfel A, et al. Predictive and prognostic value of microsatellite instability in patients with advanced colorectal cancer treated with a fluoropyrimidine and oxaliplatin containing first-line chemotherapy. A report of the AIO Colorectal Study Group. *Int J Colorectal Dis*. 2008;23(11):1033-9.
58. des Guetz G, Mariani P, Cucherausset J, Benamoun M, Lagorce C, Sastre X, et al. Microsatellite instability and sensitivity to FOLFOX treatment in metastatic colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2007;27(4C):2715-9.
59. Koopman M, Kortman GA, Mekenkamp L, Ligtenberg MJ, Hoogerbrugge N, Antonini NF, et al. Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009;100(2):266-73.
60. Kim ST, Lee J, Park SH, Park JO, Lim HY, Kang WK, et al. The effect of DNA mismatch repair (MMR) status on oxaliplatin-based first-line chemotherapy as in recurrent or metastatic colon cancer. *Med Oncol*. 2010;27(4):1277-85.
61. Ricciardiello L, Ceccarelli C, Angiolini G, Pariali M, Chieco P, Paterini P, et al. High thymidylate synthase expression in colorectal cancer with microsatellite instability: implications for chemotherapeutic strategies. *Clin Cancer Res*. 2005;11(11):4234-40.
62. Gatalica Z, Vranic, S., et al, editor Thymidylate Synthase over-expression underlines the observed lack of 5-FU therapy benefit for MSI-H colorectal cancers. *ESMO 2014*, poster #570P; 2014; Madrid.
63. Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehme A, et al. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res*. 1996;56(21):4881-6.

64. Fink D, Zheng H, Nebel S, Norris PS, Aebi S, Lin TP, et al. In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair. *Cancer Res.* 1997;57(10):1841-5.
65. Brown R, Hirst GL, Gallagher WM, McIlwrath AJ, Margison GP, van der Zee AG, et al. hMLH1 expression and cellular responses of ovarian tumour cells to treatment with cytotoxic anticancer agents. *Oncogene.* 1997;15(1):45-52.
66. Strathdee G, MacKean MJ, Illand M, Brown R. A role for methylation of the hMLH1 promoter in loss of hMLH1 expression and drug resistance in ovarian cancer. *Oncogene.* 1999;18(14):2335-41.
67. Vaisman A, Varchenko M, Umar A, Kunkel TA, Risinger JI, Barrett JC, et al. The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res.* 1998;58(16):3579-85.
68. Fallik D, Borrini F, Boige V, Viguier J, Jacob S, Miquel C, et al. Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to irinotecan in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res.* 2003;63(18):5738-44.
69. Goldstein J, Tran B, Ensor J, Gibbs P, Wong HL, Wong SF, et al. Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). *Ann Oncol.* 2014;25(5):1032-8.
70. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2509-20.
71. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, Taube JM, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer discovery.* 2015;5(1):43-51.
72. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009;45(2):228-47.

73. Poynter JN, Siegmund KD, Weisenberger DJ, Long TI, Thibodeau SN, Lindor N, et al. Molecular characterization of MSI-H colorectal cancer by MLHI promoter methylation, immunohistochemistry, and mismatch repair germline mutation screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(11):3208-15.
74. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, Marsoni S, Monges G, Labianca R, et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(11):863-75.
75. Goodenberger M, Lindor NM. Lynch syndrome and MYH-associated polyposis: review and testing strategy. *J Clin Gastroenterol.* 2011;45(6):488-500.
76. Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Schischmanoff O, Perret GY, Morere JF. Microsatellite instability does not predict the efficacy of chemotherapy in metastatic colorectal cancer. A systematic review and meta-analysis. *Anticancer Res.* 2009;29(5):1615-20.
77. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol.* 2002;20(4):1043-8.
78. Overbeek LI, Ligtenberg MJ, Willems RW, Hermens RP, Blokx WA, Dubois SV, et al. Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(8):1246-51.
79. Sinicrope FA, Sargent DJ. Clinical implications of microsatellite instability in sporadic colon cancers. *Curr Opin Oncol.* 2009;21(4):369-73.
80. Kim JE, Hong YS, Ryu MH, Lee JL, Chang HM, Lim SB, et al. Association between deficient mismatch repair system and efficacy to irinotecan-containing chemotherapy in metastatic colon cancer. *Cancer Sci.* 2011;102(9):1706-11.
81. Kanthan R, Senger JL, Kanthan SC. Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review. *Patholog Res Int.* 2012;2012:597497.

82. Ishimaru G, Adachi J, Shiseki M, Yamaguchi N, Muto T, Yokota J. Microsatellite instability in primary and metastatic colorectal cancers. *Int J Cancer*. 1995;64(3):153-7.
83. Chen WS, Chen JY, Liu JM, Lin WC, King KL, Whang-Peng J, et al. Microsatellite instability in sporadic-colon-cancer patients with and without liver metastases. *Int J Cancer*. 1997;74(4):470-4.
84. Yim KL. Microsatellite instability in metastatic colorectal cancer: a review of pathology, response to chemotherapy and clinical outcome. *Med Oncol*. 2012;29(3):1796-801.
85. Phipps AI, Lindor NM, Jenkins MA, Baron JA, Win AK, Gallinger S, et al. Colon and rectal cancer survival by tumor location and microsatellite instability: the Colon Cancer Family Registry. *Dis Colon Rectum*. 2013;56(8):937-44.
86. Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM. Toward a consensus in molecular diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(4):261-3.
87. Kang SY, Park CK, Chang DK, Kim JW, Son HJ, Cho YB, et al. Lynch-like syndrome: Characterization and comparison with EPCAM deletion carriers. *Int J Cancer*. 2014.
88. Rodriguez-Soler M, Perez-Carbonell L, Guarinos C, Zapater P, Castillejo A, Barbera VM, et al. Risk of cancer in cases of suspected lynch syndrome without germline mutation. *Gastroenterology*. 2013;144(5):926-32 e1; quiz e13-4.
89. Kim SH, Shin SJ, Lee KY, Kim H, Kim TI, Kang DR, et al. Prognostic value of mucinous histology depends on microsatellite instability status in patients with stage III colon cancer treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy: a retrospective cohort study. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(11):3407-13.
90. Lupinacci RM, Mello ES, Coelho FF, Kruger JA, Perini MV, Pinheiro RS, et al. Prognostic implication of mucinous histology in resected colorectal cancer liver metastases. *Surgery*. 2014;155(6):1062-8.
91. Verhulst J, Ferdinande L, Demetter P, Ceelen W. Mucinous subtype as prognostic factor in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Pathol*. 2012;65(5):381-8.

92. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007;50(1):113-30.
93. Strathdee G, Appleton K, Illand M, Millan DW, Sargent J, Paul J, et al. Primary ovarian carcinomas display multiple methylator phenotypes involving known tumor suppressor genes. *Am J Pathol*. 2001;158(3):1121-7.
94. Fallik D, Sabourin JC, Borrini F, Jacob S, Boige V, Praz F, et al. [Response of metastatic colorectal cancers to treatment with CPT11 (irinotecan): implications of the mismatched base repair system]. *Gastroenterol Clin Biol*. 2000;24(10):917-22.
95. Gavin PG, Colangelo LH, Fumagalli D, Tanaka N, Remillard MY, Yothers G, et al. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. *Clin Cancer Res*. 2012;18(23):6531-41.
96. Crosara Teixeira M, Marques DF, Ferrari AC, Alves MF, Alex AK, Sabbaga J, et al. The effects of palliative chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients with an ECOG performance status of 3 and 4. *Clin Colorectal Cancer*. 2015;14(1):52-7.
97. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol*. 2008;26(12):2013-9.
98. Singh PP, Sharma PK, Krishnan G, Lockhart AC. Immune checkpoints and immunotherapy for colorectal cancer. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2015;3(4):289-97.
99. Lau E. Mismatch repair deficiency predicts benefit of anti-PD-1 therapy. *Lancet Oncol*. 2015;16(7):e319.
100. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982;5(6):649-55.