



BIOMARCADORES MOLECULARES NA AVALIAÇÃO DE CARCINOMA COLORRETAL: GUIA DO COLÉGIO AMERICANO DE PATOLOGIA, ASSOCIAÇÃO DE PATOLOGIA MOLECULAR E DA SOCIEDADE AMERICANA DE ONCOLOGIA CLÍNICA.

(Texto baseado no artigo de Sepulveda AR et al. Arch Pathol Lab Med. 2017; 141: 625–657; doi: 10.5858/ arpa.2016-0554-CP)

Por: Dra. Luciana Regina Moreira e Dr^o José Vassallo.

Uma avalanche de informações provenientes de estudos científicos tem sido dada todos os anos sobre o carcinoma de cólon e reto (colorretal).

Agências reguladoras, entidades de especialistas e laboratórios tentam filtrar tais informações, selecionando aquelas que se mostram mais relevantes e viáveis na prática.

Testes moleculares são feitos há tempo e têm sido cada vez mais frequentemente incorporados na prática clínica, sendo responsáveis por direcionar esquemas terapêuticos em pacientes com carcinoma colorretal (CCR). Eles podem prever a resposta da doença frente à terapia específica.

Em maio deste ano, 2017, o Colégio Americano de Patologia publicou um artigo sobre biomarcadores moleculares na avaliação do CCR a fim de padronizar exames nesta neoplasia. Ressalta-se que todos estes exames podem ser feitos em tecido histológico incluído rotineiramente em parafina, desde que fixados adequadamente em formalina tamponada 10% e processados de forma ótima pelo laboratório de Patologia.

A seguir, resumimos os principais marcadores analisados pelo Colégio Americano de Patologia.

KRAS E NRAS

Aproximadamente 30-50% de tumores colorretais apresentam mutação do gene KRAS.

A família RAS (*Rat Sarcoma Virus*) é uma das reguladoras da proliferação celular.

Relação entre RAS e EGFR: O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR - *Epidermal Growth Factor Receptor*) é uma molécula importante envolvida na patogênese e na terapia do CCR. Ela é crucial para crescimento, sobrevivência e proliferação celular. Desordens no EGFR são comuns em CCR. O EGFR é mediado por duas vias: a do RAS-RAF e a da *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K).

CCR com mutação do RAS (KRAS e NRAS) não se beneficiam da terapia com anticorpos anti-EGFR. Sendo assim, é crucial a análise destas mutações em pacientes candidatos a esta terapia. O método de avaliação é por PCR (*polymerase chain reaction*).



Por ter valor preditivo de resposta à terapia, a pesquisa de mutação do RAS é recomendada em todos os casos candidatos à terapia com anticorpos anti-EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*).

“...Aberrant activation of EGFR signaling pathways in carcinoma colorretal is primarily associated with activating mutations of genes in the mitogen-activated protein kinase...”

“...Patients with CRC being considered for anti-EGFR therapy must receive RAS mutational testing...”

“...In summary, current evidence indicates that anti-EGFR monoclonal antibody therapy should only be prescribed for patients with metastatic CRCs that are nonmutated/wild type for all known RAS-activating mutations...”

[Sepulveda AR et al. Arch Pathol Lab Med. 2017; 141: 625–657]

Genes de reparo do DNA (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2)

Entre os testes moleculares citados no artigo, foi **FORTEMENTE** recomendada a avaliação dos genes de reparo do DNA (MLH1¹, MSH2², MSH6³ e PMS2) em CCR. Como teste prévio, de escrutínio para os testes moleculares, está indicada a pesquisa das correspondentes proteínas por imunistoquímica. Pacientes com CCR localizado e com alterações nos genes de reparo do DNA teriam melhor sobrevida.

A presença de alterações dos genes de reparo em pacientes no estágio II indica bom prognóstico e identifica aqueles pacientes cuja monoterapia adjuvante baseada no 5-fluorouracil não traz benefício.

Além de ter valor preditivo de resposta terapêutica, os dados sobre os genes de reparo do DNA possibilitam a avaliação de possibilidade de Síndrome de Lynch e abordagem de familiares.

¹MutL protein homolog 1; ²MutS protein homolog 2; ³MutS protein homolog 6

Assim é recomendada FORTEMENTE a avaliação por estudo imunistoquímico das proteínas relacionadas aos genes de reparo do DNA (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2) em carcinomas colorretais.

“...The presence of deficient MMR in stage II CRC indicates a good prognosis and identifies patients for whom adjuvant 5-fluorouracil monobased therapies have no significant benefit...” Dados recentes mostram que deficiência nos genes de reparo do DNA pode ter valor preditivo em alguns casos de doença avançada, quando considerada a terapia com o anti-PD-1/PDL-1. *“...Patients with localized colon cancer and dMMR have improved outcomes. Emerging data suggest that MMR status has predictive value in some settings, specifically in patients with advanced disease being considered for anti-PD-1/PD-L1 therapy...”*

[Sepulveda AR et al. Arch Pathol Lab Med. 2017; 141: 625–657]



BRAF (pV600)

B-Raf proto-oncogene (família de quinases RAF - *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*).

As mutações do gene BRAF ocorrem em aproximadamente 8% dos pacientes com neoplasia colorretal avançada e em aproximadamente 14% dos pacientes com estágio II ou III.

Há concordância sobre a pesquisa da mutação do BRAF para analisar tumores com deficiência dos genes de reparo do DNA (especificamente com perda do gene MLH1). Este procedimento diferencia a via patogênica esporádica da via da Síndrome de Lynch. A presença de mutação do BRAF favorece fortemente a via esporádica. A ausência de mutação do BRAF não exclui a Síndrome de Lynch, sendo necessária investigação mais aprofundada. O método mais comum de análise é por PCR (*polymerase chain reaction*).

"...BRAF p.V600 mutational analysis should be performed in dMMR tumors with loss of MLH1 to evaluate for Lynch syndrome risk. Presence of a BRAF mutation strongly favors a sporadic pathogenesis. The absence of BRAF mutation does not exclude risk of Lynch syndrome..."

[Sepulveda AR et al. Arch Pathol Lab Med. 2017; 141: 625–657]

As mutações na posição p. V600 no BRAF parecem ser associadas com pior prognóstico, especialmente, em pacientes com doença metastática. As respostas às terapias, incluindo Cetuximab e Panitumumab (Cetuximab e Panitumumab são anticorpos que bloqueiam via do EGFR) podem ser mais baixas em pacientes com mutação do BRAF p.V600. Entretanto, por permanecer ainda dúvida na literatura, não é recomendado o uso deste marcador como valor preditivo de resposta à terapia com anti-EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*).



Assim, a pesquisa da mutação do BRAF para analisar tumores com alterações dos genes de reparo do DNA (especificamente com perda do gene MLH1) é recomendado, pois ela é útil para diferenciar as vias patogênicas esporádica versus Síndrome de Lynch.

Já seu uso como biomarcador preditivo de resposta à terapia com anticorpos anti-EGFR ainda é controverso e os dados são insuficientes para recomendar a avaliação deste marcador para este propósito.

“...Mutations in position p.V600 in BRAF are associated with poor prognosis, especially in patients with metastatic disease. Response rates to chemotherapy regimens, including regimens with cetuximab and panitumumab, are lower in patients harboring BRAF p.V600 mutations. ...BRAF mutations are consistently associated with poor outcomes in patients with metastatic CRC, including those who relapse after adjuvant therapy...”

“...Meta-analyses of randomized studies of EGFR monoclonal antibodies have been completed to address the question of the predictive role of BRAF p.V600 mutations. A metaanalysis of 463 patients with KRAS wild-type and BRAF p.V600 mutated tumors did not provide sufficient evidence to exclude a magnitude of benefits seen in KRAS/BRAF wildtype tumors. Nor was there sufficient evidence to identify a statistically significant benefit to this treatment. A second meta-analysis showed that EGFR monoclonal antibody treatment in patients whose tumors contain a BRAF p.V600 mutation was not associated with significant OS (P¼ .43), although there was a trend for better PFS (P¼.07). This suggests insufficient evidence to recommend the use of BRAF p.V600 as a predictive marker for benefit of anti-EGFR monoclonal antibodies. More data are required to definitively determine the predictive value of BRAF mutations relative to anti-EGFR therapy...”

“...There is insufficient evidence to recommend BRAF c.1799 (p.V600) mutational status as a predictive molecular biomarker for response to anti-EGFR inhibitors...”

[Sepulveda AR et al. Arch Pathol Lab Med. 2017; 141: 625–657]



PTEN

O gene PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) funciona como supressor tumoral e sua mutação resulta em hiperativação de vias de crescimento celular. Mutações do PTEN ocorrem em cerca de 5-14% dos CCR.

Embora haja evidências que mutação do PTEN seja fator crucial no desenvolvimento do CCR, sua expressão e seu uso como valor preditivo/prognóstico permanecem controversos.

Há estudos que mostram associação com recorrência da doença, estágio e sobrevida livre de doença, enquanto outros estudos não conseguiram demonstrar esta correlação.

O mesmo ocorre quanto ao seu uso como valor preditivo de resposta às terapias com anti-EGFR: não há consenso nos achados na literatura em relação a este marcador.

Portanto, a pesquisa da expressão da proteína PTEN como valor preditivo ou prognóstico por estudo imunoistoquímico nos CCR não é recomendada atualmente.

“...Although there is evidence suggesting that PTEN is a critical factor in cancer development, the association between PTEN expression and predictive/prognostic value remains controversial, with several studies suggesting an association with poorer prognosis and others finding no association at all...”

“...Several studies have shown an association between PTEN loss and local recurrence, advanced TNM stage, lymph node metastasis, and a lower 5-year survival rate. However, several other studies have found no correlation between PTEN status and patient survival, tumor grade, TNM stage, lymphatic invasion, and liver metastasis...”

“...Several studies have shown an association with PTEN loss and lack of response to cetuximab and panitumumab. However, other published studies failed to demonstrate a clear correlation between loss of PTEN expression and response to antiEGFR therapy. Given the significant discordance in results, the role of PTEN as a prognostic or predictive biomarker in CRC is still largely unknown...”

[Sepulveda AR et al. Arch Pathol Lab Med. 2017; 141: 625–657]



VEJA A SEGUIR O RESUMO DAS RECOMENDAÇÕES PARA CARCINOMA COLORRETAL (TABELAS 1 A 3)

Tabela 1 – Recomendações da National Comprehensive Cancer Network, versão 2.2017 para carcinoma colorretal (CCR)

TESTE DE MUTAÇÃO KRAS, NRAS E BRAF

Todos os pacientes com CCR metastático deveriam ter tecido tumoral genotipado para pesquisar mutações de KRAS, NRAS e BRAF. Pacientes com qualquer mutação conhecida de KRAS (exon 2 ou não-exon 2) ou NRAS não deveriam ser tratados com cetuximab ou com panitumumab. Mutações de BRAF V600E torna resposta a panitumumab ou cetuximab altamente improvável.

O teste pode ser feito em tecido fixado em formalina e incluído em parafina. O teste pode ser feito em CCR primário e/ou metástase, uma vez que a literatura mostra que as mutações desses genes é semelhante em ambos os espécimes.

INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES (IMS) OU TESTE DE MISMATCH REPAIR (MMR)

Teste universal de IMS e MMR é recomendado para todos os pacientes com histórico de CCR. *

A presença de mutação de BRAF V600E no contexto de ausência de MLH1 desfavorece diagnóstico de síndrome de Lynch.

Pacientes com estágio II com IMS alto podem ter prognóstico favorável e não se beneficiam de terapia adjuvante com 5-fluorouracil.

* *NCCN Guidelines for Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal.*
https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp



Tabela 2 – Aplicação da pesquisa imunoistoquímica de enzimas de reparo do DNA (MMR: mismatch repair) para avaliação da instabilidade de microssatélites.

TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA

Realizada nos cortes de tecido fixado em formalina e incluído em parafina.

Pode-se utilizar o material de biopsia ou da peça cirúrgica.

Não há teste comercial em kit (*companion test*); podem ser utilizados marcadores de diversas empresas.

INTERPRETAÇÃO DO TESTE PELO PATOLOGISTA

Para cada marcador, deve-se buscar a positividade nuclear nítida.

Não está recomendada quantificação ou semiquantificação: o resultado para cada marcador é positivo ou negativo, independente da intensidade e porcentagem de células marcadas.

O controle da reação é interno ao tecido. As células colorretais normais e os linfócitos, assim como todas as células normais do organismo, expressam essas proteínas.

INFORMAÇÕES PARA CONSTAR NO LAUDO DE ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO*

Sem perda de expressão das enzimas de reparo do DNA (MMR, *mismatch repair*): baixa probabilidade de instabilidade de microssatélite significativa (MSI-H)

Perda de expressão nuclear de MLH1 e PMS2: teste para metilação do promotor de *MLH1* e/ou mutação de *BRAF* é indicada (a presença de mutação de *BRAF V600E* e/ou metilação de *MLH1* sugere que o tumor é esporádico e a avaliação da mutação germinativa provavelmente não é indicada; ausência de ambas as alterações sugere a possibilidade de síndrome de Lynch e o sequenciamento e/ou teste de grande deleção ou duplicação germinativa de *MLH1* pode ser indicada)

Perda da expressão nuclear de MSH2 e MSH6: alta probabilidade de síndrome de Lynch (sequenciamento e/ou teste de deleção ou duplicação grande germinativa de *MSH2* pode ser indicada e, se negativa, sequenciamento e/ou teste de grande deleção ou duplicação germinativa de *MSH6* pode ser indicada)

Perda da expressão nuclear apenas de MSH6: alta probabilidade de síndrome de Lynch (sequenciamento e/ou teste de grande deleção ou duplicação germinativa de *MSH6* pode ser indicada)

Perda da expressão nuclear apenas de PMS2: alta probabilidade de síndrome de Lynch (sequenciamento e/ou teste de grande deleção ou duplicação germinativa de *PMS2* pode ser indicada)

Observação a ser incluída em todos os laudos:

Há exceções para as interpretações dos resultados imunoistoquímicos acima. Os resultados não devem ser considerados isoladamente e correlação clínica com aconselhamento genético pode ser indicada para determinar a necessidade de teste de alterações germinativas.

*Recomendações do Colégio Americano de Patologistas, 2014; Colon Biomarkers 1.2.0.0



Tabela 3 – Graus de recomendações para carcinoma colorretal (CCR)

FORTEMENTE RECOMENDADOS

Os laboratórios devem usar métodos para testar mutações em CCR adequadamente validados e padronizados para tal; os procedimentos devem seguir os padrões de validação de todos os testes clínicos moleculares.

A realização dos testes moleculares de mutações em CCR devem ser validados de acordo com as melhores práticas laboratoriais.

Os laboratórios devem validar os procedimentos imunistoquímicos para CCR (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2) de acordo com as melhores práticas de laboratório.

RECOMENDADOS

Pacientes com CCR em consideração para terapia anti-EGFR devem ser pesquisados para mutação de RAS. As pesquisas devem ser feitas em KRAS e NRAS códons 12 e 13 do exon 2; 59 e 61 do exon 3; 117 e 146 do exon 4 (RAS expandido ou estendido).

A análise mutacional de BRAF p.V600 (BRAF c.1799[p.V600]) deve ser feita em pacientes com CCR para estratificação prognóstica.

A análise mutacional de BRAF p.V600 deve ser feita em pacientes com tumores com perda de MLH1 (imunistoquímica) para avaliar o risco de síndrome de Lynch. A presença da mutação favorece fortemente a patogênese esporádica do CCR. A ausência de mutação de BRAF não exclui o risco de síndrome de Lynch.

Os clínicos devem solicitar a pesquisa do status das enzimas de reparo do DNA (MMR) em CCR para identificação de pacientes com risco de síndrome de Lynch e/ou estratificação prognóstica.

RECOMENDAÇÃO BASEADA EM CONSENSO DE ESPECIALISTAS

Tecidos de metástase ou de recorrência de CCR devem ser preferidos para análise de mutações para decisão de terapia-alvo. Na ausência de material de qualidade disponível, pode-se utilizar tumor primário.

Tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina são aceitáveis para pesquisa de biomarcadores moleculares (processamento adequado!). Outros materiais, como citologia, devem ser validados, assim como qualquer alteração na técnica de pesquisa de tais mutações.

Os laboratórios devem fornecer os resultados em tempo clinicamente relevante e usar as amostras de tecido de modo a otimizar as técnicas a serem feitas, como uso de ensaios multiplex.

Os testes moleculares e imunistoquímicos em CCR devem ser feitos em sequência lógica, baseada no contexto clínico e de acordo com as práticas estabelecidas na instituição pela equipe médica.

Os laboratórios devem ter protocolos para assegurar a alocação eficiente de tecidos para testes moleculares, particularmente em pequenos espécimes.

Os membros da equipe médica, incluindo patologistas, devem dar início aos pedidos de testes moleculares em CCR de acordo com as práticas e protocolos aceitos na instituição.

Laboratórios que necessitam terceirizar a pesquisa molecular de biomarcadores em CCR devem fazê-lo em tempo o mais curto possível. Recomenda-se que 90% dos espécimes sejam enviados em 3 dias úteis.

Os patologistas devem avaliar espécimes candidatos aos testes moleculares, levando em conta quantidade relativa e qualidade de neoplasia viável. Estes dados devem constar do laudo do paciente.

Os laboratórios devem usar métodos moleculares que detectem mutações com no mínimo 5% de frequência de mutações de alelos. Deve-se calcular o limite de sensibilidade analítica e a possibilidade de enriquecer a amostra, por exemplo, com microdissecação. Por segurança, a quantidade de células neoplásicas a ser processada seja o dobro do calculado como limite.

O laudo das alterações moleculares do CCR deve ser imediatamente enviado à equipe médica para decisão diagnóstica. Recomenda-se que 90% dos laudos de patologia molecular estejam prontos em 10 dias úteis.

Os laudos moleculares devem incluir todas as informações e interpretações compreensíveis facilmente pelo oncologista e pelo patologista. Deve-se usar a nomenclatura apropriada do genoma humano, traduzindo, quando cabível, designações genéticas históricas.

SEM RECOMENDAÇÃO

Há evidências insuficientes para recomendar a pesquisa de mutação de BRAF c.1799p.V600 como biomarcador molecular preditivo de resposta a inibidores anti-EGFR.

Há evidências insuficientes para recomendar a pesquisa de mutação de PIK3CA para seleção de terapia do CCR fora estudos clínicos. Notar que estudos retrospectivos sugeriram sobrevida mais favorável com uso de aspirina pós-operatória em pacientes com CCR que apresentam mutações de PIK3CA.

Há evidências insuficientes para recomendar a pesquisa de mutação de PTEN (expressão imunistoquímica ou deleção por hibridização in situ) em tecido de CCR para seleção terapêutica de pacientes fora de estudos clínicos.

*Sepulveda AR et al. Arch Pathol Lab Med. 2017; 141: 625–657

Figura 1 – Adenocarcinoma colorretal: expressão e perda de expressão de enzimas de reparo do DNA.

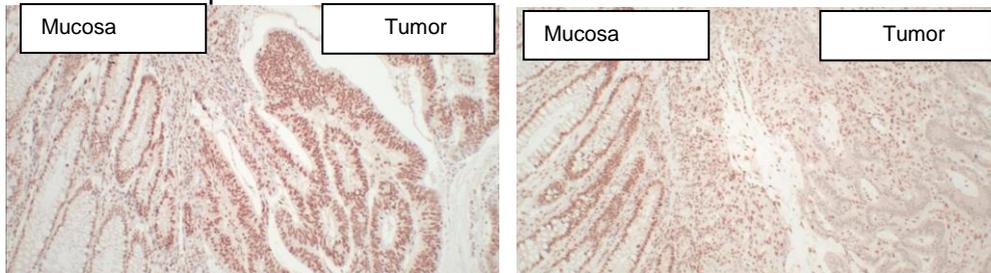


Figura 1a.

Figura 1b.

Figura 1a) Epitélio da mucosa normal e do tumor com núcleos positivos (expressão de enzima de reparo do DNA preservada) - marcador imunoistoquímico MLH1 – aumento 100x.

Figura 1b) Apenas epitélio da mucosa normal com núcleos positivos (expressão de enzima de reparo do DNA preservada apenas no epitélio da mucosa normal). Epitélio tumoral é negativo (perda da enzima). Linfócitos e epitélio de mucosa normal servem de controle (expressam a enzima de reparo do DNA) - marcador imunoistoquímico MLH1 – aumento 100x.

REFERÊNCIAS:

1- Sepulveda AR et al. Arch Pathol Lab Med. 2017; 141: 625–657

2- [National Comprehensive Cancer Network - NCCN. Clinical Practice Guidelines in Oncology.](#)

Disponível em:

https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp

3- College of American Pathologists (CAP). Template for Reporting Results of Biomarker Testing of Specimens From Patients With Carcinoma of the Colon and Rectum.

Disponível

em:

<http://www.cap.org/ShowProperty?nodePath=/UCMCon/Contribution%20Folders/WebContent/pdf/cp-colorectalbiomarker-14.pdf>