



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Influência do *status* mutacional dos genes  
KRAS e NRAS na resposta terapêutica a  
anticorpos monoclonais observada em  
pacientes com cancro colo-retal, seguidos no  
Hospital Espírito Santo de Évora**

**Maria Eva Vaz Afonso**

Orientação: Dr. Rui Pedro Duarte Dinis

Professora Doutora Ana Rodrigues Costa

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

Évora, 2016





**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Influência do *status* mutacional dos genes  
KRAS e NRAS na resposta terapêutica a  
anticorpos monoclonais observada em  
pacientes com cancro colo-retal, seguidos no  
Hospital Espírito Santo de Évora**

**Maria Eva Vaz Afonso**

Orientação: Dr. Rui Pedro Duarte Dinis

Professora Doutora Ana Rodrigues Costa

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

Évora, 2016



## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Rui Dinis, Diretor do Serviço de Oncologia do Hospital Espírito Santo de Évora E.P.E., por ter facilitado a colaboração do serviço que dirige, pela orientação prestada, pelo incentivo, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Ana Costa, pela sua disponibilidade, pelo seu incentivo e otimismo, bem como por todo o apoio prestado na elaboração deste trabalho.

Ao Professor Doutor Paulo Infante, do Departamento de Matemática da Universidade de Évora que, generosamente, colaborou no tratamento estatístico deste projeto. Obrigada pelas inúmeras horas dedicadas e pela sua incansável paciência.

Ao Dr. Francisco Trinca, do Serviço de Oncologia do Hospital Espírito Santo de Évora E.P.E., pela sua colaboração na recolha dos dados dos processos clínicos.

Ao meu companheiro João Lopes, aos meus pais, aos meus irmãos, aos meus sobrinhos e à restante família. Obrigada pelo amor, confiança, força e apoio incondicional que me fazem superar as adversidades e alcançar todos os meus objetivos.

Aos meus amigos pela paciência, atenção e apoio durante a elaboração deste trabalho. Um agradecimento muito especial à Lina Pêra e à Mónica Azevedo pelo afeto, compreensão, dedicação, paciência e presença constante.

A todos os colaboradores do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Espírito Santo de Évora E.P.E. pelo apoio. Ao Diretor de Serviço, Dr. Carlos Quintana, pelo apoio e incentivo. Igualmente à Técnica Coordenadora Célia Rodrigues. Agradeço a ambos por terem facilitado a frequência deste Mestrado.

À Técnica Marta Barbosa por assegurar a realização das minhas funções durante as minhas ausências, pelo encorajamento e pelos conselhos sábios de quem já passou pelo mesmo. Às Técnicas Paula Marques, Ana Proença, Sandra Nunes e Daniela Leal pelas palavras de ânimo, pela boa disposição e alegria.

Ao Dr. Luís Gonçalves, ex Diretor do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Espírito Santo de Évora E.P.E., por me ter aberto as portas ao percurso profissional que efetuei até hoje e por me ter desafiado a ir mais além.

Aos meus colegas de turma do Mestrado em Bioquímica 2014/2016 que me marcaram positivamente pelo seu companheirismo e pelo espírito de entre-ajuda. Um especial agradecimento à Sofia de Jesus, colega de grupo e amiga incansável que sempre me encorajou.



## RESUMO

### **Influência do *status* mutacional dos genes KRAS e NRAS na resposta terapêutica a anticorpos monoclonais observada em pacientes com cancro colo-retal, seguidos no Hospital de Évora**

O cancro colo-retal é uma importante causa de morbilidade e mortalidade. A fase metastática desta patologia atinge aproximadamente 40% dos pacientes e o seu tratamento é um desafio. A adição de cetuximab e de bevacizumab à terapêutica contribuiu para uma significativa melhoria da sobrevivência. Contudo, a eficácia do cetuximab parece estar limitada a tumores sem mutações nos genes KRAS e NRAS. A escolha do tratamento mais apropriado para obtenção do máximo benefício terapêutico é complexa e suscita muitas questões.

O objetivo deste estudo é descrever as mutações RAS em tumores colo-retais e avaliar a resposta terapêutica em pacientes com doença metastática e tratados com cetuximab e bevacizumab, a fim de avaliar a terapêutica mais eficaz.

Dos tumores testados, 42% apresentaram mutação no exão 2 do gene KRAS. Os tempos de sobrevivência global foram, de uma forma geral, superiores a 24 meses, destacando-se positivamente o esquema cetuximab/FOLFIRI com 33,8 meses.

**Palavras-chave:** cancro colo-retal, cancro colo-retal metastático, gene KRAS; gene NRAS; análise RAS, anticorpos monoclonais, cetuximab, bevacizumab, esquema terapêutico, sobrevivência global, sobrevivência livre de progressão

## ABSTRACT

### **Influence of the mutational status of KRAS and NRAS genes on the therapeutic response of colorectal cancer – evaluation in patients treated with monoclonal antibodies in Hospital Espírito Santo de Évora**

Colorectal cancer is one of the most important causes of morbidity and mortality worldwide. The metastatic stage of this disease will affect around 40% of patients and its treatment is a challenge. Addition of cetuximab and bevacizumab to therapeutic has significantly improved survival. However, cetuximab efficacy seems to be limited to tumours with no mutation in KRAS and NRAS genes. Choosing the most appropriated treatment to obtain the maximum therapeutic benefit is a complex issue, with numerous questions.

This study aim is to describe RAS mutations in colorectal tumours and to assess the therapeutic response in patients with metastatic disease and treated with cetuximab and bevacizumab in order to identify the most efficient therapy.

From all the tumours tested, 42% had mutations in exon 2 of KRAS. Generally, the overall survival was superior to 24 months, with special attention to the therapeutic scheme cetuximab/FOLFIRI, which achieved 33,8 months.

**Keywords:** colorectal cancer, metastatic colorectal cancer, KRAS gene, NRAS gene, RAS analysis, monoclonal antibodies, cetuximab, bevacizumab, therapeutic scheme, overall survival, progression-free survival

# ÍNDICE

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Intestino grosso: anatomia e histologia .....	1
1.2. Carcinoma colo-retal.....	3
1.2.1. Epidemiologia e fatores de risco .....	3
1.2.2. Diagnóstico e estadiamento.....	5
1.2.3. Desenvolvimento e progressão do CCR.....	8
1.3. Patogênese molecular do CCR.....	11
1.3.1. A via tradicional ou supressora .....	11
1.3.2. Via da instabilidade de microssatélites .....	13
1.3.3. Via metiladora.....	14
1.4. Tratamento do CCR.....	15
1.5. Anticorpos monoclonais anti-Egfr .....	16
1.5.1. A importância do Egfr no CCR.....	16
1.5.2. A via Ras/Raf/Mek/Erk.....	18
1.5.3. Biomarcadores preditivos de resposta à terapêutica anti-Egfr .....	19
1.5.4. Mutações dos genes KRAS e NRAS .....	20
1.5.5. Metodologias para pesquisa de mutações RAS.....	22
1.5.6. O papel do cetuximab no tratamento do CCRm.....	24
1.5.7. Propriedades farmacológicas do cetuximab .....	26
1.5.7.1. Estrutura e características físico-químicas.....	26
1.5.7.2. Mecanismo de ação.....	27
1.5.7.3. Reações adversas e toxicidade .....	28
1.6. Anticorpos monoclonais anti-Vegf.....	29
1.6.1. A importância do Vegf no CCR.....	29
1.6.2. Biomarcadores preditivos de resposta às terapêuticas anti-Vegf.....	33
1.6.3. O papel do bevacizumab no tratamento do CCRm.....	34
1.6.4. Propriedades farmacológicas do bevacizumab.....	36
1.6.4.1. Estrutura e características físico-químicas.....	36
1.6.4.2. Mecanismo de ação.....	37
1.6.4.3. Reações adversas e toxicidade .....	38
1.7. Comparação da eficácia do cetuximab e do bevacizumab.....	39
<b>2. OBJETIVOS DO ESTUDO</b> .....	41
2.1. Gerais.....	41
2.2. Específicos .....	41

<b>3. METODOLOGIA</b> .....	43
3.1. Desenho do estudo e critérios de inclusão .....	43
3.2. Análise mutacional RAS .....	43
3.2.1. Extração de ADN .....	44
3.2.2. Quantificação e avaliação da pureza do ADN genómico .....	45
3.2.3. Amplificação de ADN .....	46
3.2.4. Eletroforese de ácidos nucleicos .....	47
3.2.5. Purificação dos produtos de PCR .....	48
3.2.6. Sequenciação do ADN .....	49
3.3. Análise Estatística .....	51
<b>4. RESULTADOS</b> .....	55
4.1. Caracterização da amostra .....	55
4.2. Tipo e distribuição das mutações nos genes KRAS e NRAS .....	58
4.3. Resposta terapêutica aos AcMs cetuximab e bevacizumab .....	60
4.3.1. Caracterização da amostra tratada com AcMs .....	60
4.3.2. Tempo de sobrevivência global .....	62
4.3.3. Efeito da linha terapêutica de início de tratamento com AcMs na OS ....	63
4.3.4. Efeito dos esquemas terapêuticos com AcMs na OS .....	64
4.3.5. Tempo de sobrevivência livre de progressão de doença .....	66
4.3.5.1. Efeito dos esquemas terapêuticos com AcMs na PFS da 1 <sup>a</sup> e 2 <sup>a</sup> linhas terapêuticas .....	66
4.4. <i>Rash</i> cutâneo na terapêutica com cetuximab .....	70
4.4.1.1. Efeito do aparecimento de rash cutâneo na PFS .....	70
4.5. Resseção de metástases .....	72
4.6. Efeitos adversos .....	74
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	77
5.1. Análise do <i>status</i> mutacional dos genes KRAS e NRAS .....	77
5.2. Resposta terapêutica aos AcMs cetuximab e bevacizumab .....	79
5.3. Cetuximab versus Bevacizumab .....	83
5.4. <i>Rash</i> cutâneo e terapêutica com cetuximab .....	85
5.5. Efeitos Adversos .....	85
5.6. Perspetivas futuras .....	86
5.7. Limitações do estudo .....	88
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	89
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Anatomia do intestino grosso.....	1
<b>Figura 2</b> - Secção histológica representativa da parede do cólon.....	2
<b>Figura 3</b> - Representação ilustrativa dos diferentes estadios do CCR.....	7
<b>Figura 4</b> - Focos de criptas aberrantes.....	8
<b>Figura 5</b> - Imagens endoscópicas de mucosa normal do cólon e pólipos e imagem histológica de pólipos..	9
<b>Figura 6</b> - Sequência adenoma-carcinoma.....	12
<b>Figura 7</b> - O papel do Egfr na apoptose e na proliferação celular.....	17
<b>Figura 8</b> - Percentagem de mutações que ocorrem nos diferentes exões dos genes KRAS e NRAS, em CCR. ....	22
<b>Figura 9</b> - Mecanismos de ação do cetuximab. ....	27
<b>Figura 10</b> - Efeitos adversos relacionados com a terapêutica com cetuximab.....	28
<b>Figura 11</b> - A família Vegf: fatores de crescimento e respetivos recetores. ....	30
<b>Figura 12</b> - Via de sinalização do Vegf-A. ....	32
<b>Figura 13</b> - Mecanismo de ação do bevacizumab..	37
<b>Figura 14</b> - Seleção de amostras para análise RAS.....	44
<b>Figura 15</b> - Visualização dos produtos de PCR em gel de agarose a 2%.....	48
<b>Figura 16</b> – Exemplo de eletroforetogramas onde se pode observar a mutação c.35G>A: p.Gly12Asp no exão 2 do gene KRAS. ....	50
<b>Figura 17</b> - Distribuição da idade no momento do diagnóstico em função do género da amostra de pacientes com CCR. ....	55
<b>Figura 18</b> - Distribuição dos tumores colo-retais da amostra, de acordo com a sua localização anatómica.....	56
<b>Figura 19</b> - Estadio patológico à data do diagnóstico. ....	57
<b>Figura 20</b> - Locais de metastização à distância, à data do diagnóstico. ....	58
<b>Figura 21</b> - Distribuição das mutações detetadas no exão 2 do gene KRAS, nos CCRs em estudo.....	59
<b>Figura 22</b> - Distribuição das mutações detetadas nos exões 3 e 4 do gene KRAS e dos exões 2, 3 e 4 do gene NRAS, nos CCRs testados. ....	59
<b>Figura 23</b> – Distribuição dos pacientes tratados em 1ª linha terapêutica, por esquema terapêutico.....	61
<b>Figura 24</b> – Distribuição dos pacientes tratados em 2ª linha terapêutica, por esquema terapêutico.....	61
<b>Figura 25</b> - Sobrevivência global estimada na amostra de pacientes tratados com AcMs. ....	62

<b>Figura 26</b> - Sobrevida global estimada na amostra de pacientes tratados com AcMs, por grupo de tratamento..	63
<b>Figura 27</b> - Sobrevida global estimada de acordo com a linha terapêutica de início do tratamento com AcMs.	64
<b>Figura 28</b> - Efeito dos esquemas terapêuticos na OS, em 1ª linha terapêutica, na amostra de pacientes tratados com AcMs.	65
<b>Figura 29</b> - Efeito dos esquemas terapêuticos na PFS, em 1ª linha terapêutica, na amostra de pacientes tratados com AcMs.	68
<b>Figura 30</b> - Efeito dos esquemas terapêuticos na PFS em 2ª linha terapêutica, na amostra de pacientes tratados com AcMs.	69
<b>Figura 31</b> - Número de eventos de rash ocorridos, por categoria de grau, nos pacientes tratados com cetuximab.	70
<b>Figura 32</b> - O efeito do aparecimento de rash na PFS, nos pacientes tratados com cetuximab.	71
<b>Figura 33</b> - O efeito do grau de rash no tempo de PFS, nos pacientes tratados com cetuximab.	72
<b>Figura 34</b> - Locais de metastização à distância na amostra de pacientes tratados com AcM.	73

# ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Sistema de estadiamento para carcinomas do cólon e do reto.....	6
<b>Tabela 2</b> - Grupos de estadiamento para CCR.....	7
<b>Tabela 3</b> - Frequências estimadas da ocorrência de mutações nos genes KRAS e NRAS, por exão e codão, em CCR.....	21
<b>Tabela 4</b> - Técnicas mais frequentemente utilizadas no estudo de mutações.....	23
<b>Tabela 5</b> - Principais ensaios clínicos efetuados com cetuximab em combinação com quimioterapia à base de irinotecano, em 1ª linha terapêutica. ....	24
<b>Tabela 6</b> - Principais ensaios efetuados com cetuximab em combinação com quimioterapia à base de oxaliplatina, clínicos em 1ª linha terapêutica. ....	25
<b>Tabela 7</b> - Principais ensaios clínicos efetuados com bevacizumab em combinação com quimioterapia, em 1ª linha terapêutica. ....	35
<b>Tabela 8</b> - Resultados dos ensaios clínicos comparativos da eficácia dos AcM cetuximab e bevacizumab.....	39
<b>Tabela 9</b> - Componentes da reação de mistura de PCR.....	46
<b>Tabela 10</b> - Pares de primers específicos utilizados para amplificação dos exões 2, 3 e 4 dos genes KRAS e NRAS.....	47
<b>Tabela 11</b> - Componentes da mistura da reação de sequenciação .....	49
<b>Tabela 12</b> - Diagnóstico anátomo-patológico dos carcinomas colo-retais.....	56
<b>Tabela 13</b> - Grau histológico dos carcinomas colo-retais.....	57
<b>Tabela 14</b> - Tempos medianos de OS estimados para os diferentes esquemas terapêuticos, tendo como referência a 1ª linha terapêutica.....	65
<b>Tabela 15</b> - Tempo mediano de PFS estimado para a 1ª linha terapêutica, por esquema terapêutico.....	67
<b>Tabela 16</b> - Tempo mediano de PFS estimado para a 2ª linha terapêutica, por esquema terapêutico.....	69
<b>Tabela 17</b> - Efeitos adversos registados durante o tratamento com o AcM bevacizumab. ....	74
<b>Tabela 18</b> - Efeitos adversos registados durante o tratamento com o AcM cetuximab. ....	75



## LISTA DE ABREVIATURAS

**5-FU** – 5-fluorouracilo

**A** – adenina

**AcM** – anticorpo monoclonal

**ADN** – ácido desoxirribonucleico

**Akt** – proteína cinase B, codificada pelo gene homólogo ao oncogene viral do timoma murino, do inglês “*V-akt murine thymoma viral oncogene homolog*”

**APC** – gene associado à polipose adenomatosa familiar, do inglês “*Adenomatous poliposis coli*”

**ARMS** – sistema de amplificação refratário à mutação, do inglês “*Amplification Refractory Mutation System*”

**B-RAF** – gene homólogo B1 ao oncogene viral de sarcoma murino do inglês “*V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*”

**C** – citosina

**CAST-PCR** – ensaio de PCR alelo específico Taqman®, do inglês “*Competitive Allele-Specific TaqMan® Polymerase Chain Reaction*”

**CCR** – cancro colo-retal

**CCRm** – cancro colo-retal metastático

**Cdk2** – proteína cinase dependente de ciclina 2, do inglês “*Cyclin-dependent kinase 2*”

**COLD-PCR** – PCR com coamplificação a baixa temperatura de desnaturação, do inglês “*Coamplification at lower denaturation Polymerase Chain Reaction*”

**COSMIC** – catálogo de mutações somáticas no cancro, do inglês “*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*”

**DCC** – gene apagado no cancro colo-retal, do inglês “*Deleted in colorectal cancer*”

**ddNTP** – di-desoxirribonucleótidos trifosfato, do inglês “*Dideoxyribonucleotide triphosphate*”

**d-HPLC** – cromatografia líquida de alta pressão desnaturante, do inglês “*denaturing High Pressure Chromatography*”

**dNMPs** – desoxirribonucleótidos monofostato, do inglês “*Deoxyribonucleotide monophosphate*”

**dNTP** – desoxirribonucleótidos trifosfato, do inglês “*Deoxyribonucleotide triphosphate*”

**Egfr** – recetor do fator de crescimento epidérmico, do inglês “*Epidermal growth factor*”

**EMA** – Agência Europeia do Medicamento, do inglês “*European Medicines Agency*”

**Erk** – proteína tirosina cinase relacionada com a *Elk*, do inglês “*Elk-related tyrosine kinase*”

**FCA** – focos de criptas aberrantes

**FDA** – do inglês “*Food and Drugs Administration*”

**FLOX** – associação terapêutica constituída por 5-fluorouracilo (F), leucovorina (L) e oxaliplatina (OX)

**FOL** – ácido folínico

**FOLFIRI** – associação terapêutica constituída por ácido folínico (FOL), 5-fluorouracilo (F) e irinotecano (IRI)

**FOLFOX** – associação terapêutica constituída por ácido folínico (FOL), 5-fluorouracilo (F) e oxaliplatina (OX)

**FOLFOXIRI** – associação terapêutica constituída por ácido folínico (FOL), 5-fluorouracilo (F), oxaliplatina (OX) e irinotecano (IRI)

**G** – guanina

**GDP** – guanosina difosfato, do inglês “*Guanosine diphosphate*”

**Grb2** – proteína 2 ligada a recetores do fator de crescimento, do inglês “*Growth factor receptor-bound protein 2*”

**GTP** – guanosina trifosfato, do inglês “*Guanosine Triphosphate*”

**hMLH1** – gene homólogo 1 humano de mutL, do inglês “*human mutL homolog 1*”

**hMLH3** – gene homólogo 2 humano de mutL, do inglês “*human mutL homolog 3*”

**hMSH2** – gene homólogo 2 humano de mutS, do inglês “*human mutS homolog 2*”

**hMSH3** – gene homólogo 3 humano de mutS, do inglês “*human mutS homolog 3*”

**hMSH6** – gene homólogo 6 humano de mutS do inglês “*human mutS homolog 6*”

**hPMS1** – gene de segregação pós-meiótica aumentada 1, do inglês “*human postmeiotic segregation increased 1*”

**hPMS2** – gene de segregação pós-meiótica aumentada 2, do inglês “*human postmeiotic segregation increased 2*”

**HRAS** – gene homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato de *Harvey*, do inglês “*Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*”

**IFL** – associação terapêutica constituída por ácido folínico, 5-fluorouracilo e irinotecano

**Ig** – imunoglobulina

**KRAS** – gene homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato *Kirsten*, do inglês “*Kirsten rat sarcoma-2 viral oncogene*”

**Mek** – proteínas cinases ativadas por mitógenos, do inglês “*Mitogen-activated protein kinase*”

**MSI** – instabilidade de microssatélites, do inglês “*Microsatellite Instability*”

**mTor** – proteína alvo da rapamicina, do inglês “*mechanistic Target of Rapamycin*”

**NRAS** – gene homólogo do neuroblastoma viral RAS, do inglês “*neuroblastoma RAS viral*”

**OS** – sobrevivência global, do inglês “*Overall Survival*”

**PAF** – polipose adenomatosa familiar

**PCR** – reação em cadeia da polimerase, do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”

**PCR-RFLP** – análise de polimorfismos dos fragmentos de restrição por PCR, do inglês “*Polymerase Chain Reaction-restriction Fragment Length Polymorphism*”

**PFS** – sobrevivência livre de progressão, do inglês “*Progression-Free Survival*”

**Pi3k** – enzima fosfatidilinositol-3-cinase, do inglês “*Phosphoinositide-3-kinase*”

**PIK3CA** – subunidade catalítica alfa da proteína fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3 cinase, do inglês “*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*”

**PNA-LNA** – análogo sintético do ADN de natureza peptídica – ácido nucleico bloqueado, do inglês “*Peptidic Nucleic Acid-Locked Nucleic Acid*”

**Pten** – proteína fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3 fosfatase e fosfatase dual-específica, do inglês “*Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase*”

**RAF** – fibrossarcoma de crescimento acelerado, do inglês “*Rapidly accelerated fibrosarcoma*”

**RAS** – sarcoma de rato, do inglês “*Rat sarcoma*”

**Shc** – proteínas cinase com domínio 2 homólogo ao *Src*, do inglês “*Src homology 2 domain containing*”

**SMAD 2** – gene que codifica o membro 2 da família *SMAD*, do inglês “*SMAD family member 2*”

**SMAD 4** – gene que codifica o membro 4 da família *SMAD*, do inglês “*SMAD family member 4*”

**Sos** – proteína SOS, do inglês “*Son of Sevenless*”

**T** – timina

**TMN** – sistema de estadiamento de CCR que avalia o tumor (T), os gânglios linfáticos regionais (N) e a presença de metástases à distância (M), do inglês *Tumour-Node-Metastasis*

**Tgf-β** – fator de transformação do crescimento beta, do inglês “*Transforming Growth Factor β*”

**UFT** – associação terapêutica constituída por uracilo e tegafur

**Vegf** – fator de crescimento vascular endotelial, do inglês “*Vascular endothelial growth factor*”

**VegfR** – recetor do fator de crescimento do endotélio vascular, do inglês “*Vascular endothelial growth factor receptor*”

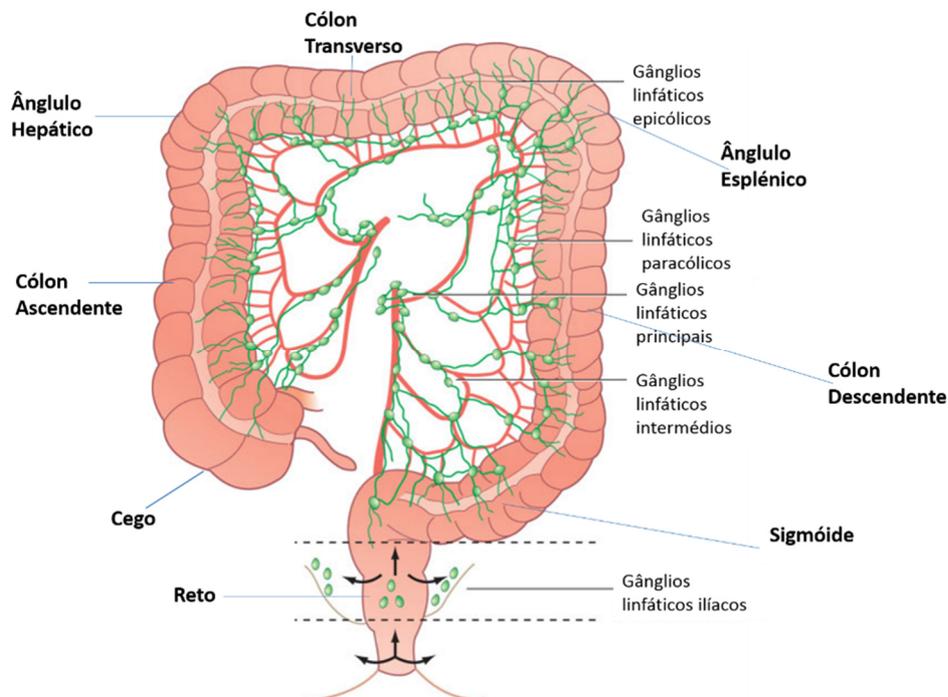
**XELOX** – associação terapêutica constituída por capecitabina (Xeloda<sup>®</sup>) e oxaliplatina (OX)



# 1 – INTRODUÇÃO

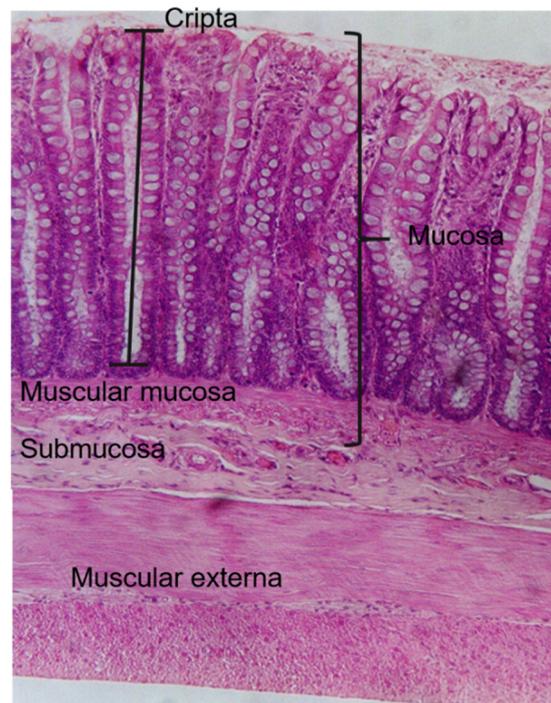
## 1.1. Intestino grosso: anatomia e histologia

O intestino grosso constitui a porção terminal do sistema digestivo, mede cerca de 1 a 1,5 metros e podem nele identificar-se diferentes zonas: cego, cólon ascendente ou direito, cólon transverso, cólon descendente ou esquerdo, cólon sigmóide e reto. O ângulo hepático é a junção entre o cólon ascendente e o cólon transverso e o ângulo esplênico localiza-se na junção do cólon transverso e descendente. A porção mais distal do cólon é o reto que mede cerca de 8 a 15 centímetros e está localizado na pélvis, terminando no canal anal (Rosai, 2004) (**Figura 1**). A principal função do intestino grosso é transformar o quimo, produzido nas fases anteriores da digestão, em fezes que são armazenadas até à sua eliminação. Durante este processo ocorre reabsorção de água e sais solúveis, secreção de muco e grande atividade bacteriana (Seeley, Stephens & Tate, 2001). O intestino grosso é irrigado por ramificações da artéria mesentérica superior (do cego até ao ângulo esplênico) e da artéria mesentérica inferior (do ângulo esplênico até ao reto) (Rosai, 2004). A drenagem linfática acompanha a irrigação arterial e envolve uma rede de gânglios linfáticos divididos em intrínsecos e extrínsecos (**Figura 1**). Os intrínsecos localizam-se na parede do cólon e do reto e a rede extrínseca acompanha os principais vasos vasculares (Rosai, 2004).



**Figura 1 - Anatomia do intestino grosso.** Representação esquemática da totalidade do intestino grosso e da sua divisão anatômica. Na imagem pode ainda observar-se os principais vasos arteriais, os gânglios linfáticos e a rede de vasos linfáticos. Adaptado de: Santos, 2012.

A parede do intestino grosso é constituída por quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular externa e serosa ou camada de tecido perimuscular, no reto. A mucosa é constituída por três camadas: epitélio, lâmina própria e muscular mucosa. A superfície da mucosa não apresenta vilosidades e é constituída por uma camada simples de epitélio de aspeto colunar a cuboidal contendo criptas de *LieberKühn* que apresentam um aspeto tubular (**Figura 2**) (Rosai, 2004, Stevens &Lowe, 2001).



**Figura 2 - Secção histológica representativa da parede do cólon.** Secção histológica de cólon, corada com Hematoxilina e Eosina e observada ao microscópio ótico na amplificação de 20x. Podem observar-se as principais camadas constituintes da parede do cólon, sendo a mais externa a dupla camada muscular e a mais interna a mucosa. Na mucosa podem observar-se estruturas tubulares, as criptas de *LieberKühn* que se localizam na região interior do órgão (lúmen) e contêm as células de componente epitelial. Adaptado de: Histology World, n.d.

A componente epitelial é composta por células absorptivas que contêm microvilosidades curtas e irregulares, células caliciformes responsáveis pela secreção de mucinas, células estaminais e células endócrinas. As células absorptivas e caliciformes distribuem-se mais à superfície das criptas, enquanto as células estaminais e endócrinas se localizam predominantemente na sua base. Durante o processo de maturação as células migram da base da cripta para a superfície do epitélio, onde sofrem apoptose. A lâmina própria é uma camada localizada abaixo da membrana basal do epitélio e predominantemente constituída por colagénio, reticulina e fibroblastos, vasos sanguíneos capilares, vasos linfáticos e algumas células do sistema imunitário. A muscular mucosa é constituída por uma fina camada de fibras musculares lisas. A submucosa é composta por tecido conjuntivo pouco denso com constituintes celulares semelhantes aos da lâmina própria, contendo ainda o plexo nervoso de Meissner. A muscular externa tem duas camadas de músculo liso, uma circular e interna e outra longitudinal e externa, contendo entre as duas o plexo nervoso de *Auerbach*,

responsável pelas contrações da parede muscular. A serosa é constituída por uma camada única de células mesoteliais sobre uma fina camada de tecido conjuntivo (Rosai, 2004, Stevens & Lowe, 2001).

## **1.2. Carcinoma colo-retal**

### **1.2.1. Epidemiologia e fatores de risco**

O carcinoma colo-retal ou cancro colo-retal (CCR) é o terceiro mais prevalente em todo o mundo, tendo sido diagnosticados mais de 1,3 novos milhões de casos em 2012. A maioria dos casos de CCR (cerca de 55%) ocorre nas regiões mais desenvolvidas e a sua incidência varia com a área geográfica (Ferlay et al., 2015). Em 2012, a incidência total estimada na Europa era de 471.000 casos com uma previsão a 5 anos de aproximadamente 1,3 milhões de novos casos (Ferlay et al., 2013), sendo o segundo cancro mais frequente nesta região. Em Portugal, a evolução das taxas de incidência revela um aumento progressivo e gradual do CCR. Em 2009, este foi o terceiro tumor maligno mais diagnosticado com uma incidência de 47,94 e de 23,73 por cada 100.000 habitantes no cólon e no reto, respetivamente (Direção Geral da Saúde, 2014). Segundo o relatório do Projeto GLOBOCAN, no ano de 2012, previa-se uma incidência estimada de 7127 novos casos, com uma prevalência estimada a 5 anos de 19613 casos (Ferlay et al., 2013).

É o terceiro cancro com maior incidência no género masculino, representando 10% do total de cancros diagnosticados e o segundo mais frequente no género feminino num total de 9,2%. Apesar de variarem com a idade as taxas de incidência são superiores em indivíduos do género masculino, cerca de 20% e 50% para carcinoma do cólon e reto, respetivamente, quando comparadas com a taxa de incidência nas mulheres (Bosman, Carneiro, Hruban & Theise, 2010). A incidência desta patologia aumenta com a idade e ocorre, sobretudo, após os 40 anos com aumento significativo da incidência até aos 50 anos, exceto em indivíduos com predisposição genética ou familiar para a doença, que podem ser diagnosticados em idades mais jovens (Bosman et al., 2010; Cabal, 2011). A idade standardizada na Europa é de 59 anos para o género masculino e 36,1 anos para o género feminino. Em Portugal a idade standardizada é 61,4 anos no género masculino e 33,9 anos no feminino (Ferlay et al., 2013).

O carcinoma do cólon é o primeiro mais diagnosticado na Região Alentejo e o do reto o quinto mais frequente (Plano Regional de Oncologia do Alentejo, 2013). No distrito de Évora registou-se, em 2009, uma taxa de incidência anual por cada 100.000 habitantes de 96 tumores no cólon e de 51 no reto (Registo Oncológico Nacional Sul, 2014). Cerca de 20 a 25% dos doentes diagnosticados necessitam de intervenção cirúrgica de urgência e 25% dos doentes apresentam doença metastática à data do diagnóstico (Plano Regional de Oncologia do Alentejo, 2013).

A mortalidade global atribuída ao CCR é cerca de metade da sua taxa de incidência tendo ocorrido, mundialmente, 694.000 mortes no ano de 2012. Nas últimas duas décadas tem-se verificado uma tendência de diminuição da mortalidade (menos 2,8% entre os anos 2003-2012) o que, provavelmente, se deve ao aumento da deteção da doença em estadios mais precoces (Bosman et al., 2010; Cabal, 2011; National Cancer

Institute, 2016a). A distribuição geográfica da mortalidade é heterogénea e está relacionada com os tratamentos disponíveis, pelo que as maiores taxas de mortalidade são registadas nos países menos desenvolvidos (Bosman et al., 2010).

Na Europa, o CCR é a segunda causa de morte em ambos os géneros (Ferlay et al., 2013). Em Portugal, no ano de 2012, registou-se uma taxa de mortalidade de 26,1 em tumores malignos do cólon e de 8,8 em tumores malignos do reto, por cada 100.000 habitantes. Em 2012, na região do Alentejo, a taxa de mortalidade padronizada por 100.000 habitantes foi 20,8 para os tumores malignos do cólon e de 7,7 para os do reto, em indivíduos do género masculino e 11,4 e 5,5 no género feminino, respetivamente (Direção Geral da Saúde, 2014).

De acordo com Ouakrim et al. (2015), em Portugal, entre os anos 1989 e 2001 a média de mortalidade aumentou 1,3% para os indivíduos do género masculino (média de mortalidade estandardizada de 23,8 por cada 100.000 indivíduos no período de 1989 a 1991 e de 30,4 no período de 2009 a 2011) e manteve-se estável nos indivíduos do género feminino (média de mortalidade estandardizada de 15,6 por cada 100.000 indivíduos no período de 1989 a 1991 e de 15,3 no período de 2009 a 2011).

A taxa de sobrevivência global (OS, do inglês “*Overall Survival*”) a cinco anos não varia significativamente entre os géneros e é superior a 90% quando esta patologia é detetada num estadio precoce (Cabal, 2011; Siegel, Desantis & Jemal, 2014). A última análise estatística efetuada pelo *National Cancer Institute* nos Estados Unidos (2016a) indica que 64,9% dos indivíduos sobrevivem cinco ou mais anos após terem sido diagnosticados com CCR. No entanto, o estadio da doença influencia as opções de tratamento e o tempo de sobrevivência. Numa análise detalhada este programa concluiu que a taxa de sobrevivência relativa a 5 anos aumenta até 90,1% quando, à data do diagnóstico, a doença está limitada ao local primário, diminuindo para 70,8% quando existe envolvimento dos gânglios regionais e sendo apenas 13,1% nos doentes com metástases à distância (National Cancer Institute, 2016).

O CCR é uma doença muito heterogénea e complexa e no seu aparecimento estão envolvidos muitos fatores etiológicos. O risco de desenvolvimento de CCR aumenta com a idade e a presença de lesões como os pólipos adenomatosos e a doença inflamatória do intestino (doença de Crohn e colite ulcerosa). O risco genético familiar associado a síndromes hereditários (como a polipose adenomatosa familiar (PAF) e o síndrome de *Lynch*) e a história familiar de CCR constituem também fatores de risco elevado para o desenvolvimento desta patologia (Amersi et al., 2005; Sack & Rothman, 2000; Thélín & Sikka, 2015). Existem ainda fatores ambientais que parecem também contribuir para o aumento do risco do seu desenvolvimento. Entre estes incluem-se a dieta alimentar, nomeadamente uma alimentação rica em gordura, carnes vermelhas, alimentos processados e pobre em fibra, um estilo de vida sedentário, obesidade e síndrome metabólico, consumo excessivo álcool e tabagismo (Boyle & Leon, 2002; Hagggar & Boushey, 2009; Potter, 1999; Thélín & Sikka, 2015).

## 1.2.2. Diagnóstico e estadiamento

O CCR pode ser diagnosticado após o aparecimento de sintomatologia associada à doença (hemorragia retal, sangue nas fezes, alterações nos hábitos intestinais, *etc.*), no entanto, a maioria dos sintomas não são específicos e muitos indivíduos são assintomáticos (Sack & Rothman, 2000). As técnicas de rastreio mais comuns são a pesquisa de sangue oculto nas fezes e a endoscopia (Ayoola, Abdulla, Brady, Sherid & Sifuentes, 2015). A maioria dos CCRs surgem no cólon sigmóide e no reto, havendo uma tendência para aumento de carcinomas localizados na porção proximal (cego, cólon ascendente e transversal) com o aumento de idade dos indivíduos (Bosman et al., 2010).

De todas as neoplasias malignas, o adenocarcinoma é a mais frequente (90%). Dentro destes, histologicamente, 90 a 95% dos casos são adenocarcinomas mas existem outras variantes histopatológicas. A segunda variante mais frequente é o adenocarcinoma mucinoso (Bosman et al., 2010; Fleming, Ravula, Tatishchev & Wang, 2012). Os adenocarcinomas derivam das células epiteliais da mucosa colo-retal e caracterizam-se por formações glandulares que são a base para o estabelecimento do grau histológico da doença (Fleming et al., 2012). A gradação histológica aplica-se apenas aos adenocarcinomas convencionais, baseia-se em critérios morfológicos e os critérios atualmente utilizados são (Bosman et al., 2010):

- Adenocarcinoma bem diferenciado: mais de 95% do tumor apresenta formação glandular (baixo grau).
- Adenocarcinoma moderadamente diferenciado: o tumor apresenta formação glandular em 50 a 95% das células (baixo grau).
- Adenocarcinoma mal diferenciado: o tumor apresenta formação glandular em 0 a 49% das células (alto grau).

Na altura do diagnóstico aproximadamente 70% dos adenocarcinomas são classificados como moderadamente diferenciados, 10% bem diferenciados e 20% mal diferenciados (Fleming et al., 2012). Não existem evidências consistentes de que o grau histológico possa ser um fator prognóstico em doentes com CCR, uma vez que nos estudos estatísticos de análise multivariada a associação não foi provada (Coget, Borrini, Susman & Sabourin, 2014; De Leon & Di Gregorio, 2001).

O estadiamento é um procedimento importante para estabelecer o prognóstico dos pacientes com CCR. O método de estadiamento mais utilizado é o sistema de gradação internacional da *American Joint Committee on Cancer*, o sistema *Tumour-Node-Metastasis* - TNM, onde: T - representa o tamanho e/ou extensão do tumor, N - disseminação para os gânglios linfáticos regionais e M - presença de metástases à distância (**Tabela 1**) (American Joint Committee on Cancer, 2010).

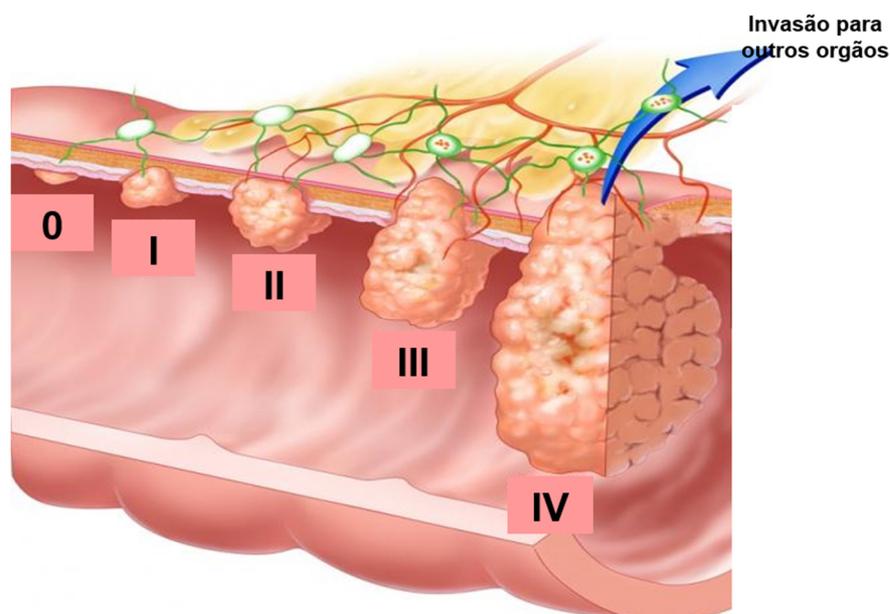
**Tabela 1 - Sistema de estadiamento para carcinomas do cólon e do reto.** De acordo com a classificação do *American Joint Committee on Cancer*. Adaptado de American Joint Committee on Cancer, 2010.

<b>Tumor primário (T)</b>	
<b>TX</b>	Não pode ser avaliado
<b>T0</b>	Não existe evidência de tumor primário
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i>
<b>T1</b>	Tumor invade submucosa
<b>T2</b>	Tumor invade a muscular própria
<b>T3</b>	Tumor invade a muscular própria até aos tecidos peri-coloretais
<b>T4a</b>	Tumor penetra na superfície do peritoneu visceral
<b>T4b</b>	Tumor invade diretamente ou está aderente a outros órgãos ou estruturas
<b>Gânglios linfáticos regionais (N)</b>	
<b>NX</b>	Não pode ser avaliado
<b>N0</b>	Sem metástases em gânglios linfáticos regionais
<b>N1</b>	Metástases em 1 a 3 gânglios linfáticos regionais
<b>N1a</b>	Metástases em 1 gânglio linfático regional
<b>N1b</b>	Metástases em 2 a 3 gânglios linfáticos regionais
<b>N1c</b>	Depósitos de tumor na serosa, mesentério, tecidos peri-cólicos ou peri-rectais sem metástases nos gânglios linfáticos regionais
<b>N2</b>	Metástases em 4 ou mais gânglios linfáticos regionais
<b>N2a</b>	Metástases em 4 a 6 gânglios linfáticos regionais
<b>N2b</b>	Metástases em 7 ou mais gânglios linfáticos regionais
<b>Metástases à distância (M)</b>	
<b>M0</b>	Não existem metástases à distância
<b>M1</b>	Existem metástases à distância
<b>M1a</b>	Existem metástases à distância num órgão ou estrutura
<b>M1b</b>	Existem metástases à distância em mais do que um órgão ou estrutura ou no peritoneu

Com base nas categorias TNM os casos com prognósticos semelhantes são agrupados em grupos de estadiamento (**Tabela 2**) que variam entre 0 e IV (**Figura 3**), onde o estadio IV representa a doença metastática e tem pior prognóstico (American Joint Committee on Cancer, 2010):

**Tabela 2 - Grupos de estadiamento para CCR.** De acordo com a classificação do *American Joint Committee on Cancer*. Adaptado de *American Joint Committee on Cancer*, 2010. Legenda: **T**- Tumor primário; **N**- gânglios linfáticos regionais e **M**- metástases à distância.

	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>Estadio 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Estadio I</b>	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
<b>Estadio IIA</b>	T3	N0	M0
<b>Estadio IIB</b>	T4a	N0	M0
<b>Estadio IIC</b>	T4b	N0	M0
<b>Estadio IIIA</b>	T1-T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
<b>Estadio IIIB</b>	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
<b>Estadio IIIC</b>	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
<b>Estadio IVA</b>	Qualquer	Qualquer	M1a
<b>Estadio IVB</b>	Qualquer	Qualquer	M1b



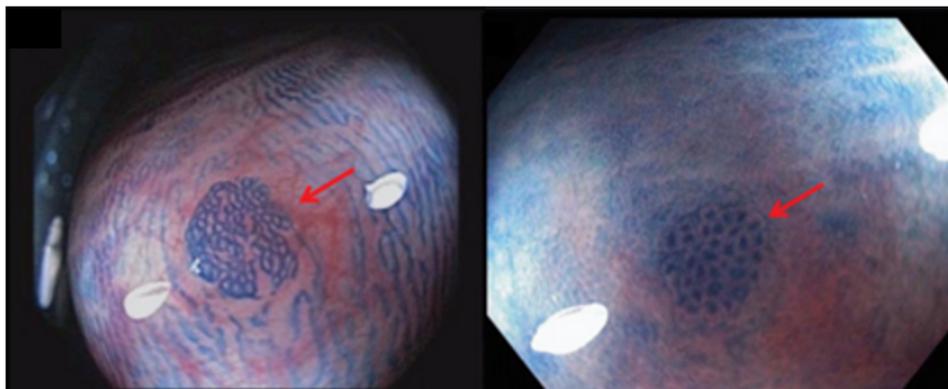
**Figura 3 - Representação ilustrativa dos diferentes estádios do CCR.** Para cada um dos estádios pode observar-se a extensão da lesão ao nível da parede do cólon, do envolvimento dos gânglios linfáticos regionais e da existência de metástases à distância. Adaptado de: *Bowel Cancer Austrália*, 2014.

No momento do diagnóstico, a metastização para os gânglios linfáticos regionais pode ser detetada em cerca de 30 a 50% dos pacientes (De Leon & Di Gregorio, 2001). Durante o seu crescimento estes tumores malignos crescem lateralmente e em profundidade. A nível de extensão local os tumores podem invadir outros segmentos do cólon ou do intestino delgado, bem como infiltrar para locais adjacentes como o peritoneu, bexiga, próstata, vagina, útero, músculos e ossos pélvicos. Apesar dos carcinomas do cólon e do reto poderem metastizar para qualquer órgão, o fígado e o pulmão são os locais de metastização mais frequentes (De Leon & Di Gregorio, 2001; American Joint Committee on Cancer, 2010).

### 1.2.3. Desenvolvimento e progressão do CCR

Cerca de 90 a 95% dos novos casos de adenocarcinoma desenvolvem-se a partir lesões precursoras e apenas cerca de 5% se desenvolvem diretamente a partir do epitélio da mucosa colo-retal (Bosman et al., 2010; Manne, Shanmugam, Katkooi, Bumpers & Grizzle, 2010). As lesões precursoras incluem os focos de criptas aberrantes (FCA), os pólipos e algumas síndromes.

Os FCA consistem em grupos de criptas anormais que podem ser identificadas na superfície da mucosa colo-retal após a sua coloração com azul-de-metileno (**Figura 4**). Microscopicamente estas criptas apresentam características que as distinguem das criptas normais, como hiperplasia, aumento de tamanho e displasia. A displasia é um termo histológico utilizado para descrever alterações estruturais e morfológicas em células epiteliais e é um marcador de risco aumentado para a progressão para cancro (Bosman et al., 2010; De Leon & Di Gregorio, 2001).



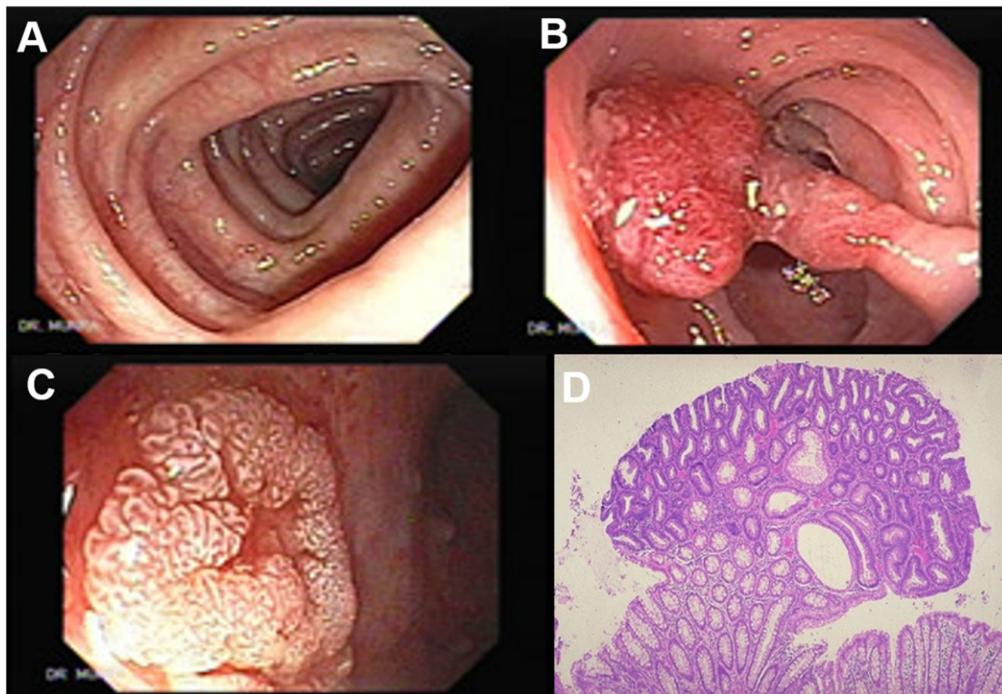
**Figura 4 - Focos de criptas aberrantes.** Na imagem estão representadas imagens endoscópicas de mucosa de cólon corada com azul-de-metileno onde se observam alterações denominadas por focos de criptas aberrantes (indicadas pelas setas). Adaptado de: Anderson et al., 2010.

Existe evidência de que os FCA displásicos representam as lesões mais precoces no desenvolvimento do CCR, havendo vários estudos que relatam uma tendência de aumento progressivo do número de FCA da mucosa normal (**Figura 5A**) para a mucosa colo-retal com lesões adenomatosas ou cancro e a existência de correlação entre o número de FCA e o número de adenomas desenvolvidos (León & Sáenz, 2010; Perše

& Cerar, 2014; Rosai, 2004; Takayama et al., 1998). No entanto, a importância clínica destas alterações ainda não está totalmente esclarecida e a sua utilização como potencial biomarcador de risco para CCR encontra-se em estudo (León & Sáenz, 2010; Bosman et al., 2010; Perše & Cerar, 2014).

Um pólipó pode ser também uma lesão precursora e consiste numa massa em protusão no lúmen de um órgão oco (**Figura 5B e 5C**). Os pólipos coloretais podem ser histologicamente classificados como não neoplásicos ou neoplásicos (Shussman & Wexner, 2014). Os pólipos neoplásicos são denominados de pólipos adenomatosos ou adenomas e são tumores benignos de tamanho variável originados a partir das células epiteliais da mucosa do cólon e do reto e com presença de displasia, cujo grau pode variar entre o baixo e o alto grau (De Leon & Di Gregorio, 2001; Bosman et al., 2010). A displasia de alto grau é a mais severa e está relacionada com um risco aumentado para o desenvolvimento de cancro (Bosman et al., 2010; De Leon & Di Gregorio, 2001; Shussman & Wexner, 2014). Apesar de macroscopicamente a maioria dos adenomas serem pólipos, há uma minoria que pode apresentar forma achatada ou em depressão (**Figura 5C**) (Bosman et al., 2010; Shussman & Wexner, 2014).

Histologicamente os adenomas são classificados em subtipos de acordo com a sua arquitetura: tubulares (contêm 0 a 25% de componente viloso) (**Figura 5D**), túbulo-vilosos (contêm 25 a 75% de componente viloso) e vilosos (contêm 75 a 100% de componente viloso) (Fleming et al., 2012).



**Figura 5 - Imagens endoscópicas de mucosa normal do cólon e pólipos e imagem histológica de pólipó. A, B e C:** Imagens endoscópicas de: **A** - mucosa normal do cólon; **B** - pólipó com pedículo; **C** - pólipó achatado. **D:** Imagem histológica a baixa ampliação de adenoma tubular. Adaptado de: A, B e C: Saca, 2015; D: University of Utah, 2016.

Os adenomas são muito comuns nos países ocidentalizados e, nos Estados Unidos, ocorrem em cerca de 20 a 40% dos indivíduos com idade superior a 50 anos com uma taxa de incidência maior nos homens do que nas mulheres (Diamond et al., 2011). Atualmente considera-se que o potencial maligno de um adenoma está correlacionado com o subtipo histológico, com o tamanho e com o grau de displasia. Assim, a presença de displasia de alto grau, uma maior percentagem de componente viloso e tamanho superior a um centímetro estão relacionados com um risco aumentado de desenvolvimento de cancro (Bosman et al., 2010; Colussi, Brandi, Bazzoli, & Ricciardiello, 2013; De Leon & Di Gregorio, 2001; Shussman & Wexner, 2014).

Contrariamente aos adenomatosos, os pólipos hiperplásicos não têm potencial maligno, no entanto, alguns podem conter focos de displasia epitelial e constituir um risco para o desenvolvimento de CCR (Manne et al., 2010; Rosai, 2004).

Os pólipos serrados são um grupo heterogêneo de lesões caracterizadas morfologicamente pela presença de criptas com características semelhantes a dentes de serra (Bosman et al., 2010). Apresentam um grande potencial maligno e têm maior tendência a desenvolver-se no cólon direito e com maior frequência no género feminino (De Leon & Di Gregorio, 2001; Shussman & Wexner, 2014).

Os pólipos hamartrosos são lesões polipoides pouco comuns e estão sobretudo presentes em vários síndromes, dos quais de destacam a polipose intestinal juvenil e a síndrome de *Peutz-Jeghers*. Estas síndromes são raras e estão relacionadas com um risco aumentado de desenvolvimento de CCR (Bosman et al., 2010; De Leon & Di Gregorio, 2001; Kheirleisid, Miller, & Kerin, 2013).

Alguns CCRs desenvolvem-se a partir de síndromes pré-existentes. A PAF é caracterizada pelo aparecimento de numerosos pólipos (mais de 100, normalmente) adenomatosos no cólon e no reto (Kheirleisid et al., 2013; Sack & Rothman, 2000). Os adenomas aparecem na segunda ou terceira década de vida e, quando a doença não é tratada, o CCR desenvolve-se entre a terceira e a quinta década de vida do indivíduo (De Leon & Di Gregorio, 2001). Esta síndrome é herdada de forma autossómica dominante e é causada por uma mutação germinativa no gene APC (do inglês "*Adenomatous polyposis coli*"). Contribui para cerca de 0,5 a 1% de todos os CCRs (Fearnhead, Wilding, & Bodmer, 2002; Kheirleisid et al., 2013).

O cancro colo-retal hereditário não polipoide ou Síndrome de *Lynch* é a forma mais comum de CCR hereditário. É transmitido de forma autossómica dominante e resulta de mutações nos genes do sistema de reparação de bases de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Fearnhead et al., 2002; Kheirleisid et al., 2013). Caracteriza-se pelo aparecimento de CCR em idade jovem (frequentemente antes dos 40 anos), com tumores localizados preferencialmente no cólon direito, pela elevada frequência de CCRs múltiplos e ainda pelo desenvolvimento de tumores noutros órgãos. Apesar do nome sugerir que não há o envolvimento de adenomas nesta doença, eles ocorrem, com tendência a surgir numa idade jovem, com maior componente viloso e maior grau de displasia do que os adenomas que ocorrem na população normal (Bosman et al., 2010; De Leon & Di Gregorio, 2001). Esta síndrome contribui para cerca de 5 a 10% de todos os CCRs (Sack & Rothman, 2000).

A doença intestinal inflamatória é também um fator de risco para o desenvolvimento de displasia e carcinoma. O risco aumenta com a duração da patologia e com a extensão de intestino afetada (Fleming et al., 2012; León & Sáenz, 2010).

### 1.3. Patogênese molecular do CCR

O CCR resulta dos efeitos cumulativos de múltiplas alterações genéticas sequenciais. Estas alterações podem ser adquiridas, no caso do CCR esporádico ou herdadas como, por exemplo, nas síndromes de PAF e de *Lynch*. Cerca de 70 a 80% dos tumores coloretais têm origem esporádica (Arnold, Goel, Blum, & Boland, 2005; Morán et al., 2010). O CCR desenvolve-se, geralmente, a partir da mucosa normal, começando por um processo benigno, os pólipos que por sua vez podem progredir para doença invasiva. Em 1990, Fearon & Vogelstein, propuseram o primeiro modelo genético para a tumorigênese colo-retal, denominado por sequência adenoma-carcinoma. Este modelo postula: **1)** o aparecimento da neoplasia depende da ativação de oncogenes juntamente com a inativação de genes supressores de tumores; **2)** para que a transformação seja maligna é necessária a presença de mutações em, pelo menos, quatro a cinco genes e **3)** o número total de alterações é mais importante do que a sua ordem de aparecimento (Fearon & Vogelstein, 1990).

Nas últimas décadas o conhecimento sobre a tumorigênese do CCR aumentou substancialmente e veio suportar o conceito da sequência adenoma-carcinoma. No entanto, é também reconhecido que apenas uma pequena porção de adenomas progridem para carcinoma invasivo e que a história natural dos adenomas, pólipos hiperplásicos e carcinomas é extremamente variável (Leslie, Carey, Pratt & Steele, 2002; Morán et al., 2010).

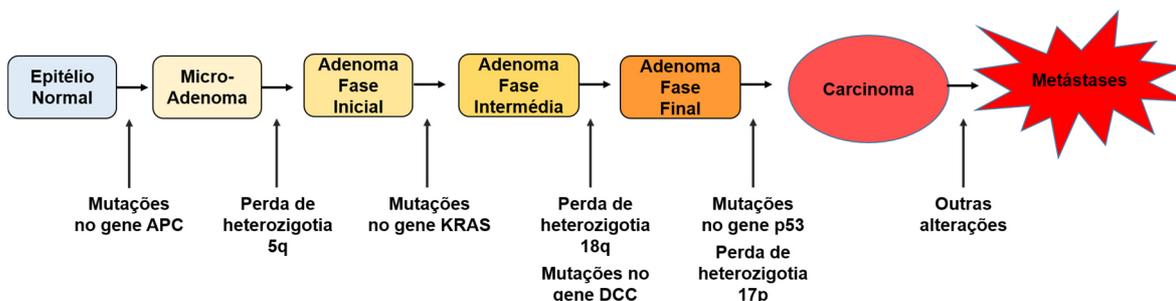
Atualmente são aceites três principais vias que levam ao desenvolvimento do CCR: a via tradicional (sequência adenoma-carcinoma) ou supressora que envolve instabilidade cromossômica, a via mutadora ou da instabilidade de microsatélites (MSI, do inglês "*Microsatellite Instability*") e a via metiladora que envolve eventos epigenéticos (Bosman & Yan, 2014; Leslie et al., 2002; Worthley & Leggett, 2010).

#### 1.3.1. A via tradicional ou supressora

Esta via está envolvida no desenvolvimento de cerca de 80% dos CCRs e foi a primeira a ser elucidada a partir do conceito da sequência adenoma-carcinoma, tendo como base a ocorrência de alterações que levam ao aparecimento de instabilidade cromossômica. Os carcinomas originados por esta via são geralmente aneuploides e apresentam variações ao nível do número de cópias dos genes (Bosman & Yan, 2014). A lesão precursora mais precoce identificada neste modelo são os FCA (Orlando et al., 2008). Neste modelo (**Figura 6**), o processo de carcinogénese ocorre devido a mutações ou perda de função do gene APC, mutações no gene KRAS (do inglês "*Kirsten rat sarcoma-2 viral oncogene*"), perda do 18q (genes DCC e SMAD4, do inglês "*Deleted in colorectal cancer*" e "*SMAD family member 4*", respetivamente) e deleções no 17p (gene p53). Apenas uma pequena minoria de CCRs derivados por esta via apresentam todas estas alterações, o que sugere que existem outros fatores e moléculas envolvidas no processo de carcinogénese (Worthley & Leggett, 2010).

O gene APC é um gene extremamente importante nesta via. Codifica uma proteína supressora de tumores com múltiplos domínios funcionais que tem um papel fundamental na via de sinalização Wnt onde é parte de um complexo multiproteico que se liga à  $\beta$ -catenina. A via de sinalização Wnt intervém ao nível da regulação do

crescimento e da diferenciação celular, da apoptose e da manutenção das células estaminais dos tecidos. Mutações do gene APC nas células germinativas resultam em PAF e em 100% de risco de desenvolvimento de CCR. Cerca de 60% dos casos de CCR esporádico também apresentam mutações somáticas neste gene (Bosman & Yan, 2014; Jass, Whitehall, Young & Leggett, 2002). A via de sinalização Apc/ Wnt/  $\beta$ -catenina tem um papel importante na carcinogênese dos CCRs hereditários e familiares. As mutações no gene APC surgem em fases precoces da tumorigênese e interferem com a normal degradação da  $\beta$ -catenina, resultando na ativação constitutiva da via de sinalização Wnt e, conseqüentemente, no aumento de fatores de transcrição que promovem a proliferação celular (Aoki & Taketo, 2007; Bosman & Yan, 2014; Fearhead, Britton & Bodmer, 2001; Morán et al., 2010; Worthley, Whitehall, Spring & Leggett, 2007). A taxa de mutações no gene APC em adenomas pode atingir os 80%, dependendo do tipo histopatológico e cerca de 40% a 80% nos casos de CCR (Jass et al., 2002; Leslie et al., 2002). Outras alterações genéticas envolvidas na regulação da  $\beta$ -catenina incluem mutações que provocam ganho de função do gene que a codifica (gene catenina beta 1). Esta alteração ocorre em cerca de 50% dos tumores que não apresentam mutações no gene APC (Colussi et al., 2013; Worthley et al., 2007).



**Figura 6 - Sequência adenoma-carcinoma.** Neste modelo o desenvolvimento de CCR inicia-se, geralmente, a partir da mucosa normal começando por um processo benigno, os pólipos que por sua vez podem progredir para doença invasiva. Na origem da transição para as diferentes lesões estão a mutação e/ou inativação de genes, sendo os principais envolvidos os genes APC, KRAS e p53. Adaptado de Morán et al., 2010.

O KRAS é um oncogene, também importante na via tradicional e pensa-se que a sua mutação seja um evento que ocorre cedo na sequência adenoma-carcinoma (Leslie et al., 2002). Codifica uma proteína GTPase que, quando mutada, ativa constitutivamente a cascata Ras-Raf-Mek-Erk e que está envolvida na proliferação e diferenciação celular (Leslie et al., 2002; Worthley & Leggett, 2010). As mutações no gene KRAS ocorrem em cerca de 35 a 42% dos CCRs e são também observadas em adenomas de maiores dimensões (Leslie et al., 2002; Worthley et al., 2007). Mutações neste gene foram ainda descritas em FCA (León & Sáenz, 2010; Orlando et al., 2008).

Na via tradicional ocorre ainda a inativação do gene supressor tumoral p53, fenómeno que é considerado o marco na transição de uma lesão pré-invasiva para invasiva, ou seja, na fase final da transição de adenoma para carcinoma. A proteína funcional do gene p53 é um fator de transcrição que responde a diversas fontes de *stress* celular, regulando a expressão de outros genes e induzindo a regulação do ciclo celular, apoptose, senescência, reparação de danos de ADN ou alterações no metabolismo celular (NCBI, 2016a). A inativação do gene costuma ocorrer por

combinação de uma mutação que inativa a atividade de transcrição e por perda de heterozigotia (Bosman & Yan, 2014; Worthley et al., 2007). Foram descritas mutações no gene p53 em cerca de 4 a 26% dos adenomas, 50% dos adenomas com focos invasivos e em 50 a 75% dos CCRs (Leslie et al., 2002).

Em cerca de 60% dos CCRs observa-se, ainda, perda de heterozigotia da região 18q21 (Vogelsein et al., citado por Worthley et al., 2007). Os genes DCC, SMAD2 (do inglês “*SMAD family member 2*”) e SMAD4 estão localizados nesta região do cromossoma 18 e estão envolvidos na via de sinalização do fator de transformação do crescimento beta (Tgf- $\beta$ , do inglês “*Transforming Growth Factor  $\beta$* ”) que tem um papel importante na regulação da proliferação e crescimento celular e da apoptose (Armaghany, Wilson, Chu, & Mills, 2012; Morán et al., 2010; Worthley & Leggett, 2010). A perda de heterozigotia nesta região é observada em cerca de 10 a 60% dos adenomas (Leslie et al., 2002).

### 1.3.2. Via da instabilidade de microssatélites

Os microssatélites são sequências repetitivas de nucleótidos espalhadas por todo o genoma e são especialmente suscetíveis à acumulação de mutações relacionadas com a atividade intrínseca da ADN polimerase. A aquisição de mutações nestas sequências requer a inativação dos genes do sistema de reparação de ADN (*hMLH1*, *hMLH3*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1*, *hPMS2*, do inglês “*human mutL homolog*” 1 e 3, “*human mutS homolog*” 2, 3 e 6 e “*human postmeiotic segregation increased*” 1 e 2, respetivamente), que é o responsável pela correção dos erros não detetados pela ADN polimerase durante a síntese do ADN (Boland & Goel, 2010; Vilar & Gruber, 2010). Em mais de 90% dos casos os genes mutados são o *hMSH2* e o *hMLH1* (Colussi et al., 2013; Morán et al., 2010). A carcinogénese pela via da instabilidade de microssatélites está presente em mais de 95% dos portadores de Síndrome de *Lynch* e em aproximadamente 15 a 20% dos casos de CCR esporádicos (Armaghany et al., 2012; Morán et al., 2010). No CCR esporádico a MSI ocorre devido ao silenciamento epigenético do promotor do gene *hMLH1*, enquanto no CCR hereditário está relacionada com mutações dos genes de reparação de ADN nas células germinativas (Colussi et al., 2013; Worthley & Leggett, 2010). Quando comparados com os que não apresentam instabilidade, os carcinomas com instabilidade tendem a localizar-se no lado direito do cólon e a apresentar alto grau histológico e fenótipo mucinoso (Vilar & Gruber, 2010).

A instabilidade de microssatélites divide-se em alto e baixo grau, sendo este grau determinado laboratorialmente através do estudo de tecido normal e tumoral do paciente utilizando um painel de 5 marcadores que incluem mono- e di-nucleótidos. Quando dois ou mais marcadores são instáveis o carcinoma apresenta instabilidade de alto grau, tratando-se de instabilidade de baixo grau quando apenas um dos marcadores apresenta alterações (Jass et al., 2002; Worthley & Leggett, 2010).

A presença de MSI aumenta o número de erros genéticos nos microssatélites dos genes relacionados com a carcinogénese colo-retal. De facto, muito dos genes que possuem microssatélites encontram-se mutados em CCR com MSI. O gene mais frequentemente afetado por esta via é o gene do recetor de tipo II do Tgf- $\beta$ . Mutações neste gene são encontradas nos adenomas com displasia de alto grau e em adenocarcinomas em progressão. Existem outros genes que podem ser afetados pela

presença de MSI, entre eles, genes reguladores da proliferação celular, do ciclo celular e da apoptose (Boland & Goel, 2010; Colussi et al., 2013; Kheirleiseid et al., 2013). Os tumores com MSI apresentam baixa frequência de anomalias citogenéticas e de alterações nos genes tipicamente afetados na via tradicional (Jass et al., 2002; Morán et al., 2010).

O fenótipo de instabilidade tem ainda aplicação no âmbito clínico, sendo de utilidade prognóstica e de predição da resposta ao tratamento com alguns agentes quimioterapêuticos (Armaghany et al., 2012; Vilar & Gruber, 2010).

### 1.3.3. Via metiladora

A expressão do ADN é regulada por múltiplos mecanismos que não alteram a sua sequência, conhecidos por mecanismos epigenéticos. Embora existam outros mecanismos epigenéticos envolvidos, um dos principais responsáveis pela inativação de genes supressores de tumores durante o desenvolvimento do CCR é a metilação inadequada de regiões promotoras destes genes. Este mecanismo representa a segunda via mais comum na carcinogénese dos CCRs esporádicos, num total de cerca de 20 a 30% de todos os casos (Armaghany et al., 2012; Worthley & Leggett, 2010).

A hipermetilação envolve a ligação covalente de grupos metilo na posição C5 de citosinas quando na sequência nucleotídica surge uma guanina, na direção 5' → 3'. Esta sequência linear é designada por CpG, uma vez que linearmente na cadeia nucleotídica a citosina e a guanina estão unidas por um grupo fosfato (5'—C—fosfato—G—3'). Quando estas sequências surgem em grande número, designa-se essa zona do genoma por ilha CpG. Nas células normais, as ilhas CpG dos promotores dos genes são geralmente mantidas num estado não metilado, condição na qual o gene pode ser transcrito normalmente. A hipermetilação contribui para a inativação de genes e instabilidade genómica afetando a reparação do ADN e o controlo do ciclo celular (Bardhan & Liu, 2013; Handy, Castro & Loscalzo, 2011). Os CCRs com hipermetilação estão associados a uma idade mais avançada, ao género feminino, história familiar da patologia, localização proximal no cólon e fenótipo mucinoso. Com base no número de marcadores metilados, o grau de metilação pode ser baixo ou elevado (Bardhan & Liu, 2013; Worthley et al., 2007).

Como anteriormente referido, os eventos moleculares nesta via incluem a metilação dos promotores de vários genes, especialmente do promotor do gene *hMLH1*, tendo como resultado a sua inativação. Esta inativação é responsável por deficiências no funcionamento do sistema de reparação do ADN e conseqüentemente, pela presença de MSI. Existem outros eventos relacionados, como mutações no gene B-RAF (do inglês "*V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog*"), caracteristicamente a mutação V600E e no gene KRAS (Bosman & Yan, 2014; Colucci, 2003; Worthley et al., 2007). As mutações destes dois genes são mutuamente exclusivas e os tumores com um elevado grau de metilação estão relacionados com a mutação V600E, metilação do gene *hMLH1* e MSI, enquanto na metilação de baixo grau as mutações apenas tendem a ocorrer no gene KRAS (Worthley & Leggett, 2010; Yamagishi, Kuroda, Imai & Hiraishi, 2016). Ao contrário do que acontece nas outras vias, nas quais o CCR se desenvolve a partir de pólipos adenomatosos, na via metiladora as lesões precursoras são os pólipos serrados (Colussi et al., 2013; Worthley & Leggett, 2010).

## 1.4. Tratamento do CCR

Atualmente são utilizados quatro tipos de intervenção terapêutica para o CCR: cirurgia, quimioterapia, radioterapia e agentes quimioterapêuticos dirigidos. O tratamento cirúrgico, com excisão total do tumor, é o principal utilizado na doença localizada (estádios 0 a III). Adicionalmente à cirurgia, as *guidelines* recomendam a utilização de terapêutica adjuvante para doentes em estádio II com critérios de alto risco e para todos os doentes com tumores em estádio III. A radioterapia pode ser aplicada para complementar alguns tratamentos (Aran, Victorino, Thuler, & Ferreira, 2015; Hagan, Orr, & Doyle, 2013; Schmoll et al., 2012).

Aproximadamente 25% dos doentes apresentam-se em estádio IV à data do diagnóstico e cerca de 50% dos novos doentes diagnosticados desenvolverão metástases, fator que contribui para as elevadas taxas de mortalidade do cancro colorretal metastático (CCRm) (Van Cutsem, Cervantes, Nordlinger, & Arnold, 2014). Embora a maioria das metástases não sejam operáveis, em alguns doentes é possível efetuar tratamento cirúrgico com potencial curativo, administrando previamente terapêuticas sistêmicas para diminuir o tamanho das metástases tornando, assim, possível a sua ressecção cirúrgica. Nos doentes em que as metástases não são operáveis, o principal objetivo é efetuar uma terapêutica paliativa de forma a prolongar a sobrevivência, aliviar ou eliminar sintomas relacionados com o tumor e impedir ou atrasar a progressão da doença, mantendo a qualidade de vida (Edwards, Chadda, Zhao, Barber, & Sykes, 2012; Sotelo, García-Paredes, Aguado, Sastre, & Díaz-Rubio, 2014; Van Cutsem et al., 2014).

Os tratamentos oncológicos à base de fármacos são aplicados em linhas terapêuticas. Por linha terapêutica compreende-se um regime terapêutico administrado durante um determinado período de tempo, sendo a 1ª linha o primeiro regime aplicado a um carcinoma num determinado estádio. A descontinuação seguida da alteração de um regime terapêutico dá início a uma nova linha terapêutica (National Cancer Institute, 2016b).

Durante cerca de 40 anos, o 5-fluorouracilo (5-FU), um anti-metabolito, antagonista da pirimidina que impossibilita a replicação e a reparação do ADN, inibindo a divisão celular foi a terapêutica *standard* para o tratamento do CCRm (Infarmed, 2010; Zuckerman & Clark, 2008). O 5-FU é normalmente administrado em combinação com ácido folínico (FOL) ou leucovorina, que atua como um agente sinérgico. O tempo mediano de sobrevivência global para os doentes tratados com este medicamento é cerca de 10 a 14 meses e a qualidade de vida é geralmente baixa (Douillard et al., 2000).

Atualmente, para além do 5-FU estão disponíveis outros agentes quimioterapêuticos: a oxaliplatina, o irinotecano e fluoropirimidinas orais (a capecitabina e a combinação tegafur-uracilo (UFT), que são pró-fármacos do 5-FU). Vários ensaios clínicos de fase III demonstraram que a utilização de regimes que combinem estes agentes são mais ativos do que regimes em monoterapia. A associação terapêutica consiste na combinação de fluoropirimidinas orais (capecitabina e UFT) ou endovenosas (5FU+FOL) combinadas com os outros agentes quimioterapêuticos, sendo de especial importância para este trabalho as associações 5FU+FOL em combinação com oxaliplatina, denominada por FOLFOX e 5FU+FOL em associação com irinotecano, denominada por FOLFIRI (Sotelo et al., 2014; Stintzing, 2014; Van Cutsem et al., 2014).

Os avanços recentes na compreensão da patologia molecular do cancro têm permitido o desenvolvimento de novas classes de agentes terapêuticos, nomeadamente

agentes biológicos cujos mecanismos de ação se baseiam na interferência com moléculas biológicas específicas que intervêm na carcinogénese.

Para o tratamento do CCRm estão disponíveis o bevacizumab e o aflibercept que têm como alvo terapêutico o fator de crescimento vascular endotelial (Vegf, do inglês "*Vascular endothelial growth factor*") e o cetuximab e o panitumumab que atuam sobre o recetor do fator de crescimento epidérmico (Egfr, do inglês "*Epidermal growth factor*") (Hagan et al., 2013; Sotelo et al., 2014; Zuckerman & Clark, 2008). O bevacizumab, o cetuximab e o panitumumab são anticorpos monoclonais (AcMs) e o aflibercept uma proteína de fusão. A administração destes medicamentos é, regra geral, realizada em combinação com as associações quimioterapêuticas anteriormente referidas (Van Cutsem et al., 2014). Neste trabalho, a associação de um AcM com outros agentes quimioterapêuticos é denominada de esquema terapêutico. A terapêutica de associação aumentou substancialmente o tempo de sobrevivência global que, de acordo com os principais ensaios clínicos, ultrapassa os 24 meses (Sotelo et al., 2014; Van Cutsem et al., 2014).

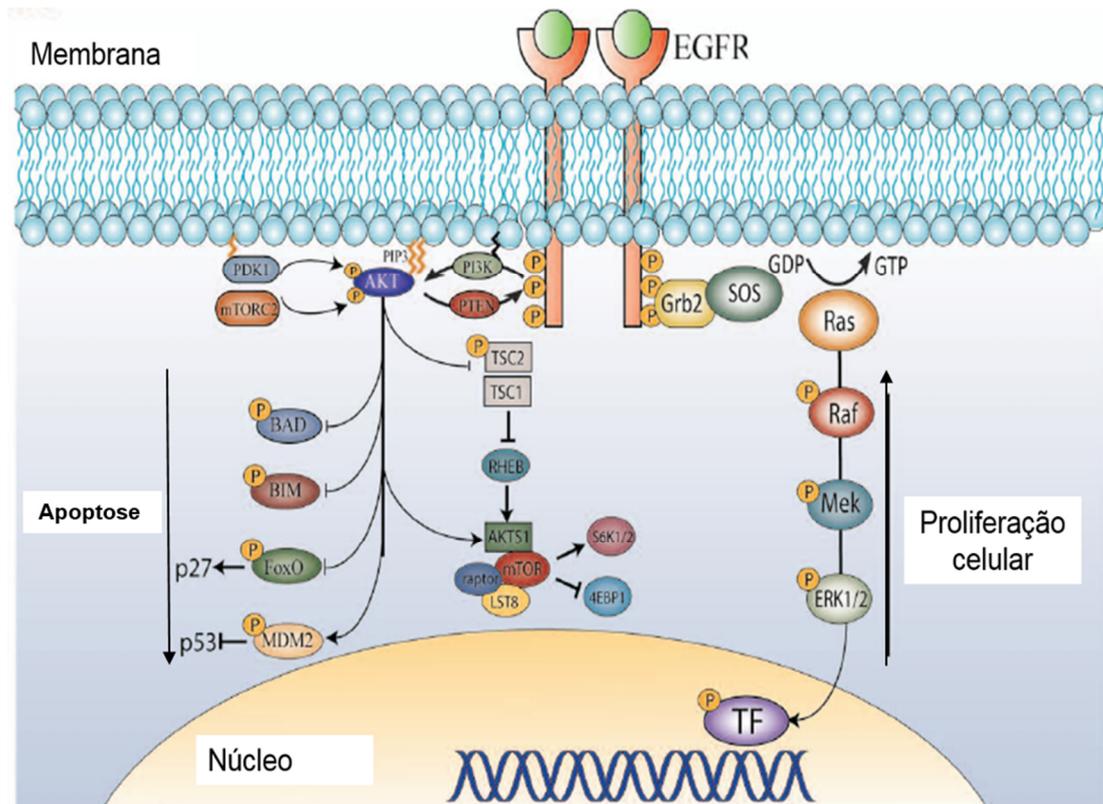
Nesta revisão serão abordados os agentes biológicos pertencentes à classe dos anticorpos monoclonais (AcMs), mais especificamente o cetuximab e o bevacizumab.

## 1.5. Anticorpos monoclonais anti-Egfr

### 1.5.1. A importância do Egfr no CCR

A sobre-expressão da proteína Egfr, a presença de mutações constitutivas e a amplificação do gene EGFR, bem como a estimulação autócrina são mecanismos que levam à sobre-função e que estão presentes em vários carcinomas humanos. Estas alterações induzem a proliferação de células tumorais, o crescimento, a invasão, a capacidade metastática, a formação de novos vasos sanguíneos (angiogénese) tumorais e inibem a apoptose. Assim, as vias de sinalização ativadas pelo Egfr (**Figura 7**) são um dos mecanismos de maior importância na oncogénese colo-retal e a sua antagonização é atualmente considerada uma via para o tratamento e controlo da doença (Brand, Lida, & Wheeler, 2011; Marshall, 2006). No CCR, as alterações neste recetor incluem a sobre-expressão da proteína que ocorre em cerca de 80% dos carcinomas e o aumento do número de cópias do gene que, dependendo dos estudos e da metodologia utilizada, poderá estar presente em cerca de 6,9 a 50% dos casos (Krasinskas, 2011; Yang et al., 2012). As mutações no gene EGFR parecem ser bastante raras, encontrando-se descritas numa taxa inferior a 1% (Barber, Vogelstein, Kinzler, & Velculescu, 2004; Krasinskas, 2011).

O Egfr (Erb B1/Her1) pertence à família de recetores de membrana de tipo I de ErbB que é constituída por quatro membros relacionados entre si: Erb B1/Her1, Her2/neu/Erb B2, Her-3/Erb B3 e Her-4/Erb B4. É uma glicoproteína transmembranar de 170 kDa constituída por um domínio extracelular para ligação dos ligandos, num domínio transmembranar e num domínio citoplasmático com o local catalítico tirosina-cinase e um terminal carboxílico com resíduos de tirosina e elementos reguladores do recetor (Marshall, 2006; Scaltriti & Baselga, 2006; Brand, Lida, & Wheeler, 2011).



**Figura 7 - O papel do Egfr na apoptose e na proliferação celular.** A ativação do Egfr induz o aumento da proliferação celular através da via de sinalização Ras/Raf/Mek/Erk e a diminuição da apoptose através da ativação da via Pi3k/Akt/mTor. A ativação destes mecanismos celulares permite a proliferação e sobrevivência das células tumorais. Adaptado de Brand, Lida, & Wheeler, 2011.

Os ligandos específicos do Egfr são o fator de crescimento epidérmico e outros péptidos incluindo o fator de crescimento tumoral  $\alpha$ , que estimulam os eventos moleculares necessários para o desencadeamento da divisão celular. A ligação dos ligandos ao domínio extracelular do recetor Egfr produz a sua dimerização com outro recetor da família ErbB (homo ou heterodimerização) e induz a fosforilação de tirosinas específicas da porção citoplasmática do recetor com a consequente ativação da sua atividade intrínseca tirosina-cinase. As tirosinas fosforiladas recrutam moléculas efetoras específicas que, por seu lado, recrutam e induzem várias vias de sinalização celular. A primeira é a via Ras/Raf/Mek/Erk responsável pela ativação da transcrição génica, iniciação do ciclo celular e aumento da proliferação celular. A segunda via ativada é a via Pi3k/Akt/mTor (**Figura 7**) implicada na sobrevivência celular mediante a inibição da apoptose (Marshall, 2006; Scaltriti & Baselga, 2006). Neste estudo, salienta-se a via Ras/Raf/Mek/Erk, pelo seu papel no tratamento desta patologia com AcMs anti-Egfr.

### 1.5.2. A via Ras/Raf/Mek/Erk

A via de sinalização Ras/Raf/Mek/Erk integra sinais desde recetores extracelulares até recetores de transcrição que regulam a expressão genética. Dependendo do estímulo e do tipo de célula esta via transmite sinais que regulam a apoptose, a progressão do ciclo celular e a diferenciação celular. Uma ampla variedade de estímulos como hormonas, fatores de crescimento e de diferenciação e substâncias promotoras da carcinogénese ativam esta via através da interação com os recetores tirosina cinase existentes na superfície da célula, como o Egfr (Kolch, 2000; Mccubrey et al., 2007).

A ativação do Egfr, por dimerização e autofosforilação induz a ativação das proteínas Ras (do inglês "*Rat sarcoma*") que são GTPases de baixa massa molecular localizadas na superfície membranar celular interna (**Figura 7**). Estas proteínas fazem a mediação entre o sinal induzido pelos fatores de crescimento ligados ao Egfr e a restante via de sinalização apresentando-se no seu estado inativo quando estão unidas a moléculas de guanosina difosfato (GDP) e ativas quando ligadas a moléculas de guanosina trifosfato (GTP) (Boguski & McCormick, 1993; Rajalingam, Schreck, Rapp, & Albert, 2007). São codificadas por três genes humanos RAS que dão origem a quatro proteínas homólogas de 21kDa: Ha-Ras (Hras, do inglês "*Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*"), Ki-Ras 4A e 4B (esta última é a variante mais frequente e será referida como Kras) e Nras (do inglês "*neuroblastoma RAS viral*") (Chang, Gonda, Ellis, Scolnick, & Lowy, 1982). Estas proteínas diferem na capacidade de ativação da via Ras/Raf/Mek/Erk, sendo as Kras as suas indutoras mais fortes (Mccubrey et al., 2007; Mitin, Rossman, & Der, 2005).

Após a estimulação do recetor tirosina cinase dá-se a ativação do complexo Shc/Grb2/Sos que converte as proteínas Ras no estado ativo (ligadas a GTP). A ativação de proteínas Ras desencadeia uma cascata de eventos de fosforilação, que se iniciam na família de proteínas cinases Raf (do inglês "*Rapidly accelerated fibrosarcoma*") mobilizando-as para a membrana celular, onde são ativadas. A fosforilação da cinase Raf (A-Raf, B-Raf ou C-Raf) leva à ativação das proteínas Mek1 e 2 (do inglês "*Mitogen-activated protein kinase*" 1 e 2) que, por sua vez, fosforilam e ativam outras proteínas cinases ativadas por mitogéneos (Erk1 e Erk2, do inglês "*Elk related tyrosine kinase*"). A ativação destas últimas provoca a sua translocação para o interior do núcleo, onde regulam a produção de fatores de transcrição que induzem o aumento da transcrição de genes envolvidos na proliferação celular, como a ciclina D1 (**Figura 7**) (Brand et al., 2011; Mccubrey et al., 2007; Roberts & Der, 2007; Zenonos & Kyprianou, 2013).

A desregulação desta via de sinalização é frequentemente descrita nos tumores humanos tendo, por isso, um papel importante na carcinogénese e é o resultado de alterações no recetor Egfr ou no gene que o codifica ou de mutações pontuais nos genes da família RAS e B-RAF. As mutações RAS têm um papel essencial na terapêutica do CCRm com AcMs anti-Egfr, sendo marcadores preditivos de resposta terapêutica (Roberts & Der, 2007; Santarpià, Lippman, & El-Naggar, 2012).

### 1.5.3. Biomarcadores preditivos de resposta à terapêutica anti-Egfr

Um marcador preditivo de resposta terapêutica indica a probabilidade de resposta ou de resistência a um determinado tratamento (Asghar, Hawkes, & Cunningham, 2010). Existindo doentes resistentes às terapêuticas anti-Egfr, nomeadamente ao cetuximab, um dos maiores desafios tem sido perceber quais as características moleculares dos tumores que estão relacionadas com a ausência de resposta terapêutica (Van Krieken et al., 2008). Os primeiros estudos focaram-se nos tumores com expressão de Egfr, determinada por meios imunohistoquímicos, que não se veio a confirmar como um marcador preditivo (Van Cutsem et al., 2014).

Mais tarde, vários estudos demonstraram que o *status* mutacional do exão 2 (codões 12 e 13) do gene KRAS confere resistência ao tratamento com agentes anti-Egfr (Bokemeyer et al., 2009; Van Cutsem et al., 2009; Karapetis et al., 2008; Lièvre et al., 2006; Van Cutsem et al., 2011). Um destes estudos foi o ensaio clínico de fase III CRYSTAL em que os doentes foram aleatoriamente selecionados para tratamento com FOLFIRI e FOLFIRI/cetuximab e onde se demonstrou que, contrariamente ao observado em doentes com tumores sem mutação no exão 2 do gene KRAS, nos doentes com tumores mutados para este exão a adição de cetuximab a FOLFIRI em tratamento de primeira linha não conferia benefícios significativos em termos de sobrevivência livre de progressão (PFS, do inglês "*Progression Free-Survival*") - PFS mediana de 7,4 vs 7,7 meses; *Hazard Ratio* (HR): 1,171, valor  $p=0,260$  e de sobrevivência global - OS mediana de 16,2 vs 16,7 meses, HR:1,035 e valor  $p=0,75$  (Van Cutsem et al., 2011). Em 2009 a *Food and Drugs Administration* (FDA) restringiu a administração de AcMs anti-Egfr a pacientes com tumores negativos para mutações no exão 2 do gene KRAS (Atreya, Diller, Corcoran, & Kopetz, 2015).

Mais recentemente foi ainda demonstrado que, para além das mutações no exão 2 (codões 12 e 13) do gene KRAS, também as mutações nos exões 3 (codões 59 e 61) e 4 (codões 117 e 146) deste gene, bem como as dos exões 2 (codões 12 e 13), 3 (codões 59 e 61) e 4 (codões 117 e 146) do gene NRAS, são marcadores de ausência de resposta à terapêutica anti-Egfr (Bokemeyer et al., 2015; De Roock et al., 2010; Douillard et al., 2013; Stinzinger, 2013; Van Cutsem et al., 2014). Numa análise mutacional alargada do ensaio clínico PRIME, nos quais pacientes com CCRm foram selecionados aleatoriamente em dois grupos para terapêutica com FOLFOX-4 com ou sem a associação do AcM panitumumab (anti-Egfr), as amostras classificadas como não mutadas para o exão 2 do gene KRAS (codões 12 e 13) foram retestadas para os exões 3 (codões 59 e 61) e 4 (codões 117 e 146) deste gene e 2 (codões 12 e 13), 3 (codões 59 e 61) e 4 (codões 117 e 146) do gene NRAS. Neste novo teste, foram identificadas mutações nos outros locais de interesse em 17,4% dos pacientes com tumores não mutados para o exão 2 do gene KRAS. Os pacientes sem mutações RAS (genes KRAS e NRAS) apresentaram maior PFS (tempo mediano: 10,1 vs 7,9 meses, HR:0,72, IC 95%: 0,58-0,9, valor  $p=0,004$ ) e maior OS (tempo mediano: 25,8 vs 20,2 meses, HR:0,77, IC 95%: 0.64-0.94, valor  $p=0,009$ ) quando o panitumumab foi adicionado ao tratamento. Para os doentes deste grupo terapêutico, a presença de mutações RAS foi ainda relacionada com tempos de PFS e de OS inferiores (Douillard et al., 2013).

De forma semelhante, foi efetuada a reanálise do ensaio clínico CRYSTAL e os

tumores que não apresentavam mutações no exão 2 do gene KRAS foram testados para os restantes exões deste gene e para os exões 2, 3 e 4 do gene NRAS. Neste estudo foram encontradas mutações em 14,7% dos tumores não mutados para o exão 2 do gene KRAS. Verificou-se que os pacientes com mutações RAS não beneficiavam da terapêutica com cetuximab em termos de PFS nem de OS. Por outro lado, verificou-se um benefício significativo para doentes com tumores não mutados para RAS e tratados com FOLFIRI/cetuximab em termos de sobrevivência livre de progressão (tempo mediano: 11,4 vs 8,4 meses; valor  $p < 0,05$ ) e em termos de sobrevivência global (tempo mediano de 28,4 vs 20,2 meses; valor  $p < 0,05$ ) (Van Cutsem et al., 2015).

Atualmente, e com base nos dados dos estudos, a Sociedade Europeia de Oncologia Médica considera que a pesquisa de mutações nos exões 2 (codões 12 e 13), 3 (codões 59 e 61) e 4 (codões 117 e 146) dos genes KRAS e NRAS é um pré-requisito para a utilização de AcMs anti-Egfr e a Agência Europeia do Medicamento (EMA, do inglês “*European Medicines Agency*”) contra-indica a utilização do medicamento em doentes com mutações RAS (exões 2, 3 e 4 dos genes KRAS e NRAS) ou com *status* mutacional desconhecido (Allegra et al., 2016; Schmoll et al., 2012).

Para além de mutações RAS (exões 2, 3 e 4 dos genes KRAS e NRAS), os estudos indicam ainda como potenciais biomarcadores de alteração da via de sinalização do Egfr as mutações nos genes B-RAF e PIK3CA (do inglês “*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*”), bem como a perda de expressão da proteína Pten (do inglês “*Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase*”) (Van Cutsem et al., 2014).

#### 1.5.4. Mutações dos genes KRAS e NRAS

Tipicamente, as mutações dos genes KRAS e NRAS são mutuamente exclusivas (Atreya et al., 2015; Irahara et al., 2010). Numa análise à base de dados *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (COSMIC), Prior, Lewis, & Mattos (2012) descrevem que em vários tipos de cancro humano, a isoforma Kras é a mais frequentemente mutada (22%) e que apenas 8% das mutações ocorrem na Nras.

A maioria das proteínas Ras mutantes apresentam substituições de aminoácidos que alteram a sua atividade intrínseca e as torna insensíveis à ação das proteínas ativadoras de GTPases. Consequentemente, as proteínas Ras mutantes permanecem na sua forma ativa, havendo ativação persistente da via Ras/Raf/Mek/Erk o que faz com que a inibição do recetor Egfr pelo anticorpo monoclonal seja ineficaz (Roberts & Der, 2007; Santarpia et al., 2012; Vakiani & Solit, 2011). De todas as mutações detetadas no exão 2, cerca de 97% ocorrem nos codões 12 ou 13, sendo as mutações pontuais no codão 12 as mais frequentes (Andreyev et al., 1998; Arrington et al., 2012; Prior et al., 2012; Roberts & Der, 2007). A alteração mais comum no codão 12 é a transição de uma guanina para adenina (GGT→GAT), o que leva à mudança do aminoácido glicina para aspartato, sendo a segunda mais frequente a transição de uma glicina para valina (GGT→GTT). A transição de uma glicina para aspartato (GGC→GAC), ocorre no codão 13 e é a terceira mutação mais detetada. Transições que ocorrem com menor frequência incluem as transições guanina para citosina e alterações na primeira base dos codões 12 e 13 (Andreyev et al., 1998; Arrington et al., 2012; Capella, Cronauer-Mitra, Peinado, & Perucho, 1991; Prior et al., 2012).

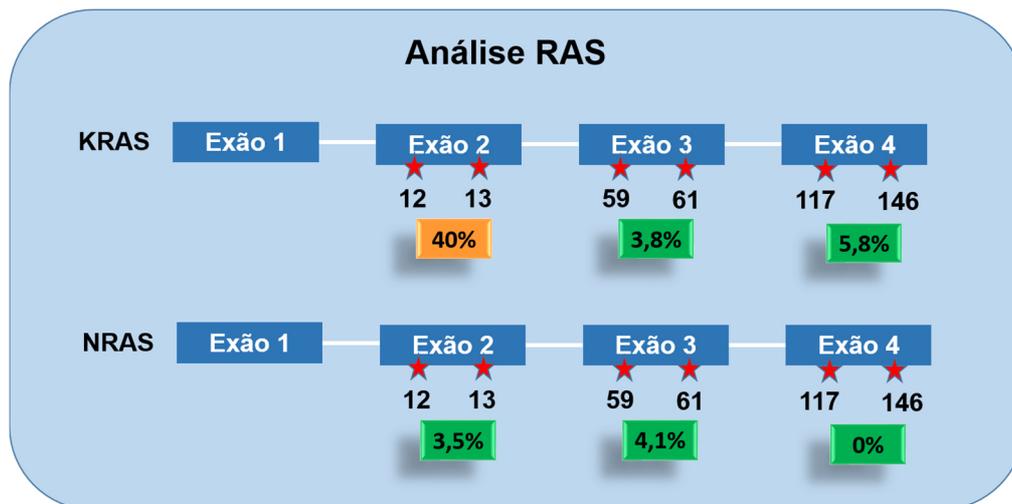
Contrariamente ao gene KRAS, no NRAS a maioria das mutações (aproximadamente 60%) ocorrem no codão 61 do exão 3, onde a mutação mais comum é a transição de uma citosina para uma adenina (CAA→AAA). Cerca de 35% ocorrem no codão 12 do exão 2, caracterizando-se por transições de guanina para adenina (GGT→GAT). A transição GGT→GAT é também a mutação mais frequente que ocorre no codão 13 do exão 2 deste gene (Irahara et al., 2010; Prior et al., 2012).

Na **Tabela 3** e na **Figura 8** estão representadas as mutações RAS mais frequentes que ocorrem no CCR (COSMIC, 2016a, 2016b; Douillard et al., 2013).

**Tabela 3 - Frequências estimadas da ocorrência de mutações nos genes KRAS e NRAS, por exão e codão, em CCR.** De acordo com a base de dados COSMIC (2016a,2016b).

Mutação Somática	Frequência Estimada (%)	
	Gene KRAS	Gene NRAS
<b>Exão 2</b>		
c.35G>A: p.Gly12Asp (p.G12D)	34,8	17,3
c.35G>T: p.Gly12Val (p.G12V)	22,1	3,2
c.38G>A: p.Gly13Asp (p.G13D)	18,9	3,2
c.34G>T: p.Gly12Cys (p.G12C)	7,9	10,4
c.34G>A: p.Gly12Ser (p.G12S)	5,8	1,45
c.35G>C: p.Gly12Ala (p.G12A)	6,0	<1
c.34G>C: p.Gly12Arg (p.G12R)	1,2	<1
Outras G12 e G13	<1	1,7
<b>Exão 3</b>		
<b>Codão 59</b>	<1	0
c.181C>A: p.Gln61Lys (p.Q61K)	<1	29,5
c.182A>T:p.Gln61Leu (p.Q61L)	<1	8,38
c.182A>C: p.Gln61Pro (p.Q61P)	<1	0
c.182A>G:p.Gln61Arg (p.Q61R)	<1	14,2
c.183A>C p.Gln61His (p.Q61H)	<1	1,5
c.183A>T:p.Gln61His (p.Q61H)	<1	0
Outras Q61	<1	1,5
<b>Exão 4</b>		
c.351A>C: p.Lys117Asn (p.K117N)	<1	0
c.351A>T p.Lys117Asn (p. K117N)	<1	0
c.436G>C p.Ala146Pro (p.A146P)	<1	0
c.436G>A: p.Ala146Thr (p.A146T)	<1	0
c.437C>T:p.Ala146Val (p.A146V)	<1	0

No CCR estima-se que as mutações RAS ocorram em cerca de 50% de todos os casos (Douillard et al., 2013; Roberts & Der, 2007). As mutações no exão 2 (codões 12 e 13) do gene KRAS ocorrem em cerca de 40% de todos os carcinomas colo-retais estimando-se que as mutações nos restantes exões do gene KRAS (codões 3 e 4) e no gene NRAS (codões 2, 3 e 4) ocorram em cerca de 10 a 15% (Andreyev et al., 1998; Bokemeyer et al., 2011; Capella et al., 1991; Van Cutsem et al., 2009).



**Figura 8 - Percentagem de mutações que ocorrem nos diferentes exões dos genes KRAS e NRAS, em CCR.** Adaptado de Douillard et al., 2013.

De todas as mutações que ocorrem no exão 2 do gene KRAS a mais frequentemente descrita é a alteração A>T na posição 35 do codão 12 (p.Gly12Asp). No estudo PRIME as segundas mutações mais detetadas localizam-se no exão 4 deste gene. De uma forma geral, as mutações no gene NRAS são pouco frequentes, sendo as do codão 61 do exão 3 as mais detetadas, particularmente a transição C>A na posição 181 (p.Gln61Lys). Até à data, não foram descritas mutações no exão 4 deste gene (Douillard et al., 2013).

### 1.5.5. Metodologias para pesquisa de mutações RAS

Em qualquer das metodologias, o estudo da presença de mutações RAS é efetuado a partir de uma amostra de tecido tumoral que, regra geral, deve ser constituída por um mínimo de 70% de células tumorais (Bronte et al., 2015; Van Krieken et al., 2008). Se a percentagem de tecido tumoral for inferior deve proceder-se ao enriquecimento tumoral da amostra através de macro ou microdissecção, descartando o tecido normal ou necrótico que possa interferir na análise (Domagal et al., 2012).

Na **Tabela 4** são apresentadas as técnicas mais frequentemente utilizadas no estudo de mutações. Todas as técnicas se baseiam na extração e na amplificação de ADN mediante técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”). A deteção de mutações mediante sequenciação direta (ou sequenciação de *Sanger*) é considerada a técnica *gold-standard* e baseia-se na incorporação de dideoxinucleótidos marcados com fluorocromos, na região a analisar, que foi previamente amplificada por PCR (EGAPP Working Group, 2013). A principal vantagem desta técnica é que deteta todas as mutações possíveis nas regiões analisadas, mas apresenta algumas limitações como a baixa sensibilidade (requer a presença mínima de 20% de população tumoral mutada) e o elevado tempo necessário para completar a análise (Bronte et al., 2015; Domagal et al., 2012). Outro tipo de sequenciação é a pirosequenciação que se baseia na incorporação sequencial de nucleótidos, detetando-se os grupos pirofosfato que se libertam de cada vez que um

nucleótido é incorporado na sequência. Permite, também, detetar qualquer tipo de mutação que ocorra na zona analisada e tem uma sensibilidade de 5%, bastante superior à da sequenciação de *Sanger* (Bronte et al., 2015).

**Tabela 4 - Técnicas mais frequentemente utilizadas no estudo de mutações.**

**Legenda:** **ARMS:** Sistema de amplificação refratário à mutação, do inglês “*Amplification Refractory Mutation System*”; **PNA-LNA:** Ácido nucleico peptídico – ácido nucleico bloqueado, do inglês “*Peptidic Nucleic Acid-Locked Nucleic Acid*”; **COLD-PCR:** PCR com coamplificação a baixa temperatura de desnaturação, do inglês “*Coamplification at Lower Denaturation Polymerase Chain Reaction*”; **CAST-PCR:** ensaio de PCR alelo específico *Taqman*<sup>®</sup>, do inglês “*Competitive Allele-Specific TaqMan<sup>®</sup> Polymerase Chain Reaction*”; **d-HPLC:** cromatografia líquida de alta pressão desnaturante, do inglês “*denaturing High Pressure Liquid Chromatography*”; **PCR-RFLP:** análise de polimorfismos dos fragmentos de restrição por PCR, do inglês “*Polymerase Chain Reaction-restriction Fragment Length Polymorphism*”.

Técnica	Sensibilidade (%)	Mutações detetadas
<b>Sequenciação</b>		
Sequenciação de <i>Sanger</i>	20	Conhecidas + Novas
Pirosequenciação	5	Conhecidas + Novas
<b>PCR em tempo real alelo-específica</b>		
<b>ARMS</b>	3	Conhecidas
<b>TaqMan<sup>®</sup></b>	0,01	Conhecidas
<b>Técnicas de enriquecimento de alelo mutado</b>		
<b>PNA-LNA</b>	1	Conhecidas
<b>Digestão por enzimas de restrição</b>	02	Conhecidas
<b>COLD-PCR</b>	1-10	Conhecidas + Novas
<b>CAST-PCR</b>	0,01	Conhecidas
<b>d-HPLC</b>	0,1-1	Conhecidas + Novas
<b>PCR-RFLP</b>	5-10	Conhecidas

As técnicas de PCR em tempo real são também utilizadas devido à sua elevada sensibilidade e rapidez na resposta. A PCR alelo-específica utiliza sequências de oligonucleótidos específicos (*primers*) para pesquisa de mutações concretas podendo alcançar uma sensibilidade de 1%, quando realizada num equipamento de PCR em tempo real utilizando sondas fluorescentes (*TaqMan*<sup>®</sup>). Outras técnicas de PCR em tempo real utilizam a estratégia de amplificar com maior eficiência a sequência mutada do que a não mutada e designam-se por técnicas de enriquecimento de alelo mutado. Baseiam-se na utilização de sequências de oligonucleótidos específicas que se unem ao alelo não mutado impedindo a sua amplificação pela enzima ADN polimerase (CAST-PCR) ou na realização da PCR a temperaturas mais baixas do que o habitual, o que favorece a desnaturação das cadeias que contêm nucleótidos mutados e, conseqüentemente, aumenta a sua amplificação (COLD-PCR) (Bolton, Reiman, Lucas, Timms, & Cree, 2015; Bronte et al., 2015; Milbury, Li, Liu, & Makrigiorgos, 2011).

### 1.5.6. O papel do cetuximab no tratamento do CCRm

A eficácia do AcM cetuximab no tratamento de CCRm foi demonstrada em diversos estudos, tanto em regime de monoterapia como em associação com vários agentes quimioterapêuticos, tendo sido verificado que os seus benefícios terapêuticos estão limitados a pacientes cujos tumores não possuem mutações RAS. É, por isso, de salientar que embora muitos dos ensaios clínicos que vão ser citados, se baseiem em pacientes com tumores não mutados para o exão 2 do gene KRAS, as recomendações atuais aprovam a utilização do cetuximab apenas em tumores não mutados para os exões 2, 3 e 4 dos genes KRAS e NRAS (Van Cutsem et al., 2015).

A maioria dos ensaios clínicos de fase II e III demonstraram a relevância da utilização deste agente em 1ª linha terapêutica em combinação com outros agentes quimioterapêuticos. Os dados dos primeiros estudos sugeriram que a adição de cetuximab ao irinotecano tem a capacidade de reverter a resistência do tumor ao irinotecano e de obter resposta terapêutica em doentes que progrediram durante o tratamento com este agente (**Tabela 5**) (Cunningham et al., 2004; Folprecht et al., 2006; Raoul et al., 2009; Saltz et al., 2004; Sobrero et al., 2008; Van Cutsem et al., 2011).

**Tabela 5 - Principais ensaios clínicos efetuados com cetuximab em combinação com quimioterapia à base de irinotecano, em 1ª linha terapêutica.**

**Legenda: FOLFIRI:** regime terapêutico de associação de 5-FU/FOL/IRINOTECANO.

Ensaio Clínico	Fase	Análise KRAS	Tratamento	Taxa de resposta (%)	Ressecção R0 (%)	PFS (meses)	OS (meses)
Folprecht et al.	I/II	Não	Cetuximab/FOLFIRI	67	19	9,9	33
Raoul et al.	I/II	Não	Cetuximab/FOLFIRI	48	19,2	8,6	22,4
<b>CRYSTAL</b>	III	Sim	Cetuximab/FOLFIRI vs FOLFIRI	57,3 vs 39,7 (OR=2,069 valor p<0,01)	5,1 vs 2,1 (OR= 2,650, valor p=0,0265)	9,9 vs 8,4 (HR=0,69 valor p=0,0012)	23,5 vs 20 (HR=0,796 valor p=0,0093)

Com base nestes estudos, o primeiro grande e robusto ensaio clínico de fase III efetuado foi o CRYSTAL (**Tabela 5**), que avaliou a eficácia da combinação terapêutica de cetuximab com FOLFIRI em comparação com apenas FOLFIRI, em tratamento de 1ª linha terapêutica. Um total de 1198 pacientes com CCRm com expressão imunohistoquímica de Egfr foram aleatoriamente divididos entre os dois grupos (599 indivíduos em cada grupo). Posteriormente, e com base na análise retrospectiva do *status* mutacional do exão 2 do gene KRAS, este estudo concluiu que a adição de cetuximab a FOLFIRI aumenta significativamente a taxa de resposta (57,3% vs 39,7%), a PFS (tempo mediano de 9,9 vs 8,4 meses) e a OS (tempo mediano de 23,5 vs 20 meses) no grupo de pacientes com tumores não mutados para o exão 2 do gene KRAS. Neste grupo verificou-se também um aumento significativo da taxa de ressecção completa de metástases (R0) em pacientes tratados com a associação cetuximab/FOLFIRI (5,1% vs 2,1%) (**Tabela 5**) (Van Cutsem et al., 2011). Com base nos resultados deste estudo, a EMA aprovou a utilização de cetuximab para tratamento de CCRm em 1ª linha terapêutica (Feng et al., 2014).

Nos doentes em que o tumor progrediu, durante ou após o tratamento com

quimioterapia à base de irinotecano, a combinação de cetuximab com irinotecano é mais ativa do que a utilização de cetuximab em monoterapia (Cunningham et al., 2004).

O cetuximab também pode ser utilizado em associação com regimes de quimioterapia à base de oxaliplatina. Embora os estudos que comparam estes regimes com os de irinotecano, em tratamento de 1ª linha, indiquem que ambas as combinações são equivalentes em termos de eficácia, há dados que sugerem que os regimes à base de oxaliplatina são mais eficazes na redução das lesões metastáticas, aumentando as hipóteses de cirurgia curativa (**Tabela 6**) (Sotelo et al., 2014).

**Tabela 6 - Principais ensaios clínicos efetuados com cetuximab em combinação com quimioterapia à base de oxaliplatina, em 1ª linha terapêutica.**

**Legenda:** FOLFOX e NORDIC FLOX: regimes terapêuticos de associação de 5-FU/FOL/OXALIPLATINA; XELOX: regime terapêutico de associação de CAPECITABINA/OXALIPLATINA. Os esquemas FOLFOX/FOLFOX4/FOLFOX6 e NORDIC FLOX diferem entre si na forma de administração.

Ensaio Clínico	Fase	Análise KRAS	Tratamento	Taxa de resposta (%)	Ressecção R0 (%)	PFS (meses)	OS (meses)
Arnold et al.	Ib/II	Não	Cetuximab/FOLFOX	57	4	8,1	28,2
Taberero et al.	II	Não	Cetuximab/FOLFOX4	72	21	12,3	30
OPUS	II	Sim	Cetuximab/FOLFOX4 vs FOLFOX4	57 vs 34 (OR=2,55 valor p=0,0027)	12 vs 3 (valor p=0,0242)	8,3 vs 7,2 (HR=0,567 valor p=0,0064)	22,8 vs 18,5 (HR= 0,855 valor p=0,39)
COIN	III	Sim	Cetuximab/mFOLFOX6 vs mFOLFOX6 XELOX	64 vs 57 (OR=1,35, valor p=0,049)	15 vs 13 (valor p=0,74)	8,6 vs 8,6 (HR=0,96 valor p=0,6)	17 vs 17,9 (HR= 1,04 valor p=0,67)
NORDIC-VII	III	Sim	Cetuximab/NORDIC FLOX vs NORDIC FLOX	46 vs 47 (OR=0,96 valor p=0,89)	13,4 vs 14,4	7,9 vs 8,7 (HR=1,07 valor p=0,66)	20,1 vs 22 (HR= 1,14 valor p=0,48)

De entre os vários ensaios clínicos realizados (**Tabela 6**), salienta-se o OPUS que avaliou a eficácia do cetuximab em associação com FOLFOX4 como tratamento de 1ª linha terapêutica em CCRm (Bokemeyer et al., 2009, 2011). Este estudo incluiu 337 pacientes que foram aleatoriamente divididos para terapêutica com FOLFOX4 e FOLFOX4 em associação com cetuximab. Os pacientes com tumores não mutados para o exão 2 do gene KRAS e tratados com FOLFOX4/cetuximab, quando comparados com os pacientes com tumores não mutados para o exão 2 do gene KRAS tratados com FOLFOX4, apresentaram um aumento significativo na taxa de resposta terapêutica (57% vs 34%), no tempo mediano de PFS (8,3 vs 7,2 meses) e na taxa de ressecção completa de metástases (RO) (12% vs 3%). A OS foi maior no ramo FOLFOX4/cetuximab, mas esta diferença não se revelou estatisticamente significativa (tempo mediano de 22,8 vs 18,5 meses) (**Tabela 6**) (Bokemeyer et al., 2011).

A eficácia do cetuximab em associação com regimes de oxaliplatina foi colocada em questão por dois estudos clínicos mais recentes. No ensaio COIN (**Tabela 6**), a adição de cetuximab a mFOLFOX6 e XELOX (capecitabina + oxaliplatina) não resultou em benefícios significativos em termos de OS ou de PFS, tendo-se verificado o mesmo no ensaio clínico NORDIC-VII (**Tabela 6**) para o regime de quimioterapia FLOX (5-fluorouracilo, ácido folínico e oxaliplatina) (Maughan et al., 2011; Tveit et al., 2012).

Para terapêutica em 2ª linha foi realizado o ensaio EPIC, onde foi investigada a eficácia da terapêutica de cetuximab em combinação com irinotecano em comparação com terapêutica com apenas irinotecano, em pacientes cujos tumores progrediram ou foram intolerantes a tratamento de 1ª linha com regimes à base de oxaliplatina. Foi demonstrado um aumento da taxa de resposta e de PFS para a combinação cetuximab/irinotecano (16,36% vs 4,15% e 3,98 vs 2,56 meses, respectivamente; valor  $p < 0,0001$ ). No entanto, não se verificaram diferenças significativas em termos de OS, em parte, devido à grande quantidade de doentes do grupo controlo que receberam cetuximab após progressão (Sobrero et al., 2008).

O uso de cetuximab em monoterapia em 3ª linha terapêutica foi também considerado apropriado por um ensaio clínico que avaliou a utilização de cetuximab em doentes resistentes a todos os outros esquemas terapêuticos (Karapetis et al., 2008).

Conclui-se que o cetuximab é um agente terapêutico ativo e eficaz em diferentes linhas terapêuticas, sobretudo quando administrado em combinação com outros agentes, tendo a capacidade de induzir resposta em doentes com resistência aos esquemas habitualmente utilizados. A combinação terapêutica de cetuximab com irinotecano ou com o regime FOLFOX demonstrou benefícios significativos em termos de taxa de resposta terapêutica, de PFS, de taxa de ressecção completa de metástases e de tempo de OS, esta última com tempos consistentemente acima dos 20 meses. No entanto, isto não foi verificado na combinação de cetuximab com outros regimes à base de oxaliplatina, como o FLOX ou XELOX.

### **1.5.7. Propriedades farmacológicas do cetuximab**

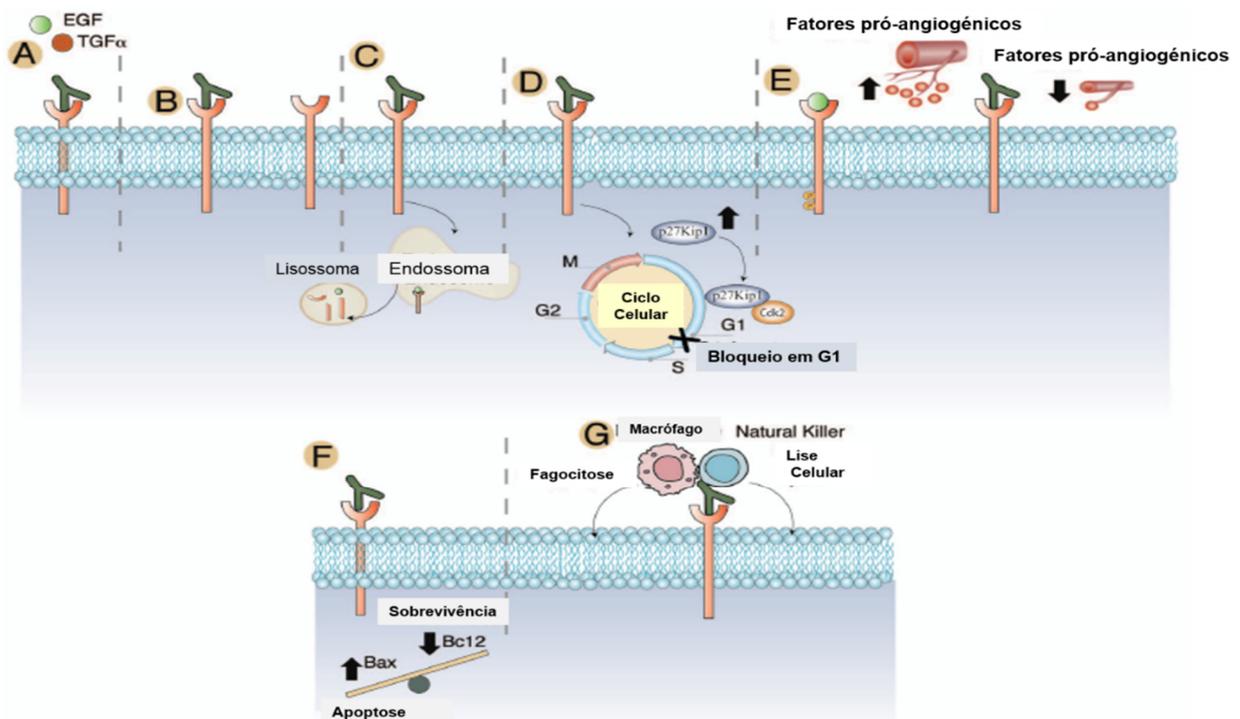
#### **1.5.7.1. Estrutura e características físico-químicas**

O cetuximab é um AcM recombinante quimérico (humano/ratinho). É constituído por duas cadeias pesadas de Imunoglobulina (Ig) G1 humana (de isótopo lambda) idênticas, cada uma com 449 aminoácidos e duas cadeias leves (de isótopo kappa) também idênticas e constituídas por 214 aminoácidos. A região variável é composta pelas sequências da região variável do clone 225 de anticorpo monoclonal de ratinho (isótopo IgG1), específico contra a porção terminal N do recetor Egfr. As quatro cadeias mantêm-se ligadas entre si por uma combinação de ligações covalentes e não covalentes. As subunidades das cadeias leves e pesadas contêm, respetivamente, um e dois locais de N-glicosilação. O seu peso molecular é de aproximadamente 152 kDa, incluindo os resíduos glucídicos (Galizia et al., 2007; Lobo, Hansen, & Balthasar, 2004; Nolting, Fox, & Kovar, 2006).

### 1.5.7.2. Mecanismo de ação

O mecanismo de ação direta do cetuximab é através do bloqueio da ligação dos ligandos do Egfr, provocando a inibição deste recetor. O anticorpo liga-se ao recetor com uma afinidade 5 a 10 vezes superior à dos ligandos endógenos (**Figura 9A**) podendo ainda ligar-se a outros membros da família Her (**Figura 9B**). A sua ligação promove a internalização e a degradação do recetor Egfr (**Figura 9C**) (Brand et al., 2011; EMA, 2010a; Zhuang et al., 2011).

São ainda reconhecidos outros mecanismos de ação deste agente anti-neoplásico. O cetuximab bloqueia o ciclo celular na fase G1 devido ao aumento de expressão da proteína p27, o que leva à formação de complexos p27/Cdk2 (do inglês “*Cyclin-dependent kinase 2*”) e impede as células de saírem da fase G1 (**Figura 9D**). Os tumores que expressam Egfr apresentam um aumento nos fatores pró-angiogénicos, cuja expressão é diminuída pelo tratamento com cetuximab. O cetuximab diminui ainda a capacidade de invasão das células tumorais (**Figura 9E**). Atua também ao nível da apoptose e sobrevivência celular através do aumento da expressão das proteínas Bax e Bcl2, respetivamente (**Figura 9F**).



**Figura 9 - Mecanismos de ação do cetuximab.** **A** - o cetuximab liga-se especificamente ao recetor Egfr, impedindo a ligação dos seus ligandos naturais; **B** - Para além do Egfr, o cetuximab pode ligar-se a outros recetores da família Her; **C** - A ligação do cetuximab ao recetor Egfr promove a sua internalização, com posterior degradação; **D** - A ação do cetuximab inclui a inibição da divisão celular, através do bloqueio do ciclo celular na fase G1; **E** - O cetuximab diminui a produção de fatores pró-angiogénicos nos tumores e **F** - diminui a taxa de sobrevivência celular ao mesmo tempo que induz a apoptose; **G** - A morte de células tumorais, através da estimulação de citotoxicidade celular é outro mecanismo estimulado pela ação do cetuximab. Adaptado de Brand et al., 2011.

Este fármaco apresenta ainda um outro mecanismo de ação, característico dos AcMs. As Igs, sobretudo a IgG1 têm a capacidade de despoletar um processo imunitário celular designado por citotoxicidade celular mediada por anticorpos (**Figura 9G**). Nesta resposta imunitária ocorre a ativação de macrófagos, neutrófilos, e de células *natural killer* e a secreção de interferão, opsoninas, fator de necrose tumoral- $\alpha$  e citocinas que recrutam e estimulam a resposta inflamatória. A ativação da resposta imunitária auxilia na diminuição da proliferação celular e na inibição da angiogénese e induz a morte das células tumorais mediada pelos linfócitos (Brand et al., 2011; EMA, 2010a; Zhuang et al., 2011). Foi ainda demonstrado que o cetuximab inibe a expressão de várias metaloproteínases responsáveis pela adesão celular, diminuindo a capacidade de invasão das células (Brand et al., 2011).

### 1.5.7.3. Reações adversas e toxicidade

As reações adversas mais frequentes decorrentes da terapêutica com cetuximab consistem em reações cutâneas. O bloqueio do recetor Egfr na pele e anexos leva ao aparecimento de variadas reações em mais de 50% dos pacientes (Giovannini et al., 2009). Na pele, o Egfr tem um papel importante estimulando o crescimento epidérmico, inibindo a diferenciação e a inflamação e aumentando a capacidade de cicatrização. O Egfr é expresso pelos queratinócitos que estão localizados nas camadas basal e supra-basal da epiderme e nos folículos dos pêlos. A sua inibição resulta na desregulação do crescimento, diferenciação e migração dos queratinócitos, despoletando uma reação inflamatória. Estas alterações manifestam-se através de sintomas que incluem: erupções papulopustulares (efeito adverso conhecido por *rash* cutâneo – **Figura 10A**), lesões nas unhas e nos tecidos periféricos da unha (paroníquia – **Figura 10B**), alterações no crescimento normal dos pêlos (alopécia, tricomegália – **Figura 10C** e hipertricose), pele seca (xerose), dilatação dos vasos sanguíneos capilares e hiperpigmentação (telangiectasia). Outros efeitos adversos cutâneos menos frequentes incluem prurido, fissuras, *rash* na palma das mãos e na sola dos pés, espessamento da camada superficial da epiderme (hiperqueratose) e mucosite (inflamação das mucosas internas da boca e garganta) (EMA, 2010a; Fakhri & Vincent, 2010; Giovannini et al., 2009; Melosky et al., 2009).



**Figura 10 - Efeitos adversos relacionados com a terapêutica com cetuximab. A:** erupção papulopustular (*rash* cutâneo); **B:** Paroníquia; **C:** Tricomegália. Adaptado de Lilly USA, 2016.

O efeito adverso cutâneo mais comum em doentes com CCRm é o aparecimento de *rash* cutâneo, que costuma afetar as áreas da pele mais expostas ao sol. O seu desenvolvimento tende a ocorrer cedo, geralmente no período de seis semanas de tratamento (Fakih & Vincent, 2010). De acordo com a sua severidade o *rash* é classificado em 4 graus: **grau 1**: corresponde ao grau menos severo e está limitado a uma superfície corporal pequena (<10%), apresentando poucos ou nenhuns sintomas; **grau 2** ou moderado: cobre 10 a 30% da superfície corporal e está associado a sintomas também moderados; e **graus 3** (>30%) e **4** (qualquer superfície corporal e associado a infeções cutâneas extensas que colocam a vida do paciente em risco) que correspondem a *rash* severo (National Cancer Institute, 2010).

Os dados de alguns dos ensaios clínicos efetuados com AcMs anti-Egfr sugerem uma correlação positiva entre o aparecimento de *rash* e a OS de pacientes com CCRm. Nesta correlação, uma maior severidade do grau de *rash* está relacionada com uma maior eficácia do cetuximab. No entanto, até à data, as *guidelines* não incluem a utilização do *rash* como um marcador da eficácia da terapêutica com cetuximab (Fakih & Vincent, 2010; Giovannini et al., 2009; Horie et al., 2015; Melosky et al., 2009; Orditura et al., 2009).

Outras reações frequentes incluem toxicidade ocular como conjuntivite e blefarite (processo inflamatório das pálpebras) e, ainda, perturbações eletrolíticas. Podem ocorrer ainda, frequentemente, reações graves relacionadas com a perfusão, incluindo reações anafiláticas graves, cuja ocorrência requer a suspensão imediata e permanente da terapêutica. Reações descritas como pouco frequentes incluem doenças respiratórias e cardiovasculares, neutropenia e diarreia, mas podem ocorrer com maior frequência quando o cetuximab é combinado com outros agentes quimioterápicos (EMA, 2010a; Fakih & Vincent, 2010).

## 1.6. Anticorpos monoclonais anti-Vegf

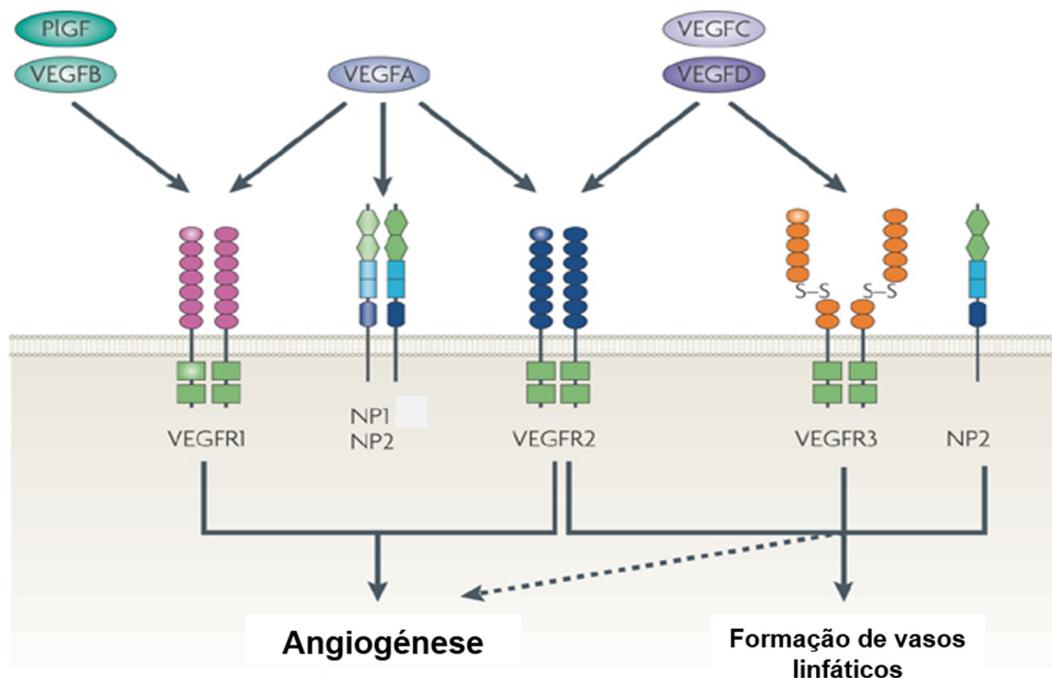
### 1.6.1. A importância do Vegf no CCR

Os capilares sanguíneos são necessários em todos os órgãos e estruturas para a difusão de nutrientes e metabolitos. O processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, conhecido por angiogénese, é essencial para o crescimento e invasão tumoral constituindo um ponto importante no controlo da progressão tumoral (Adair & Montani, 2010; Folkman, 2002). Os tumores podem absorver oxigénio e nutrientes suficientes por difusão até atingirem cerca de 3 a 4 milímetros, tamanho a partir do qual necessitam de uma rede vascular para continuar o crescimento e não entrarem em processos de apoptose e necrose (Folkman, Merler, Abernathy, & Williams, 1971).

A angiogénese é um processo complexo que requer a atividade coordenada de uma variedade de componentes vasculares: a divisão das células endoteliais, a degradação da membrana basal vascular e da matriz extracelular e a migração de células endoteliais. O controlo do complexo e dinâmico processo de angiogénese envolve a interação entre múltiplos sinais pró-angiogénicos e anti-angiogénicos, incluindo fatores de crescimento, angiopietinas, moléculas juncionais, moléculas sensoras de oxigénio

e da ação endotelial, entre outras (Adair & Montani, 2010; Hoff & Machado, 2012). De entre estes, os fatores de crescimento do endotélio vascular são reconhecidos como fatores chave na angiogénese tumoral. Desta família fazem parte os fatores de crescimento Vegf-A, Vegf-B, Vegf-C, Vegf-D e o fator de crescimento placentário que apresentam graus variados de homologia e diferem na especificidade de ligação aos recetores, nas suas funções específicas ou na potência da sua ação (Ferrara, 2004a; Takahashi & Shibuya, 2005).

A ação destes fatores de crescimento é mediada pela sua ligação a recetores tirosina-cinase, os recetores dos fatores de crescimento do endotélio vascular (VegfR, do inglês "*Vascular endothelial growth factor receptor*"), o VegfR-1, o VegfR-2 e o VegfR-3 que são componentes essenciais de vias de sinalização responsáveis pela proliferação, diferenciação, migração e metabolismo celular (**Figura 11**). A ativação destes recetores dá-se pela ligação dos Vegfs, o que provoca a sua dimerização e a autofosforilação dos resíduos de tirosina na porção citoplasmática, seguindo-se a fosforilação de proteínas envolvidas na regulação das vias de sinalização (Adair & Montani, 2010; Ferrara, 2004a; Hoff & Machado, 2012; McMahon, 2000; Takahashi & Shibuya, 2005).



**Figura 11 - A família Vegf: fatores de crescimento e respetivos recetores.** A ligação do fator de crescimento ao recetor induz a sua ativação e a iniciação dos processos de angiogénese e de formação de vasos linfáticos. Adaptado de: Ellis & Hicklin, 2008.

O Vegf-A é uma glicoproteína homodimérica e é o principal iniciador da angiogénese, sendo um mitogéneo potente para as células endoteliais e um fator estimulador de todos os eventos que são necessários à angiogénese. Tem como principais atividades biológicas a capacidade de estimular a proliferação das células endoteliais, aumentar a permeabilidade vascular e promover a sobrevivência e a migração das células

endoteliais (Adair & Montani, 2010; Conn et al., 1990; Takahashi & Shibuya, 2005). O Vegf-A humano tem, pelo menos, nove isómeros, gerados por *splicing* alternativo do gene que o codifica, sendo a isoforma constituída por 165 aminoácidos a mais predominante. É produzido em células endoteliais, macrófagos, linfócitos T ativos e noutras células e encontra-se sobre-expresso na maioria dos tumores malignos humanos, incluindo nos adenocarcinomas do trato gastrointestinal e a sua expressão está relacionada com a progressão e invasão tumoral (Brown et al., 1993; Ellis, 2000; Takahashi & Shibuya, 2005).

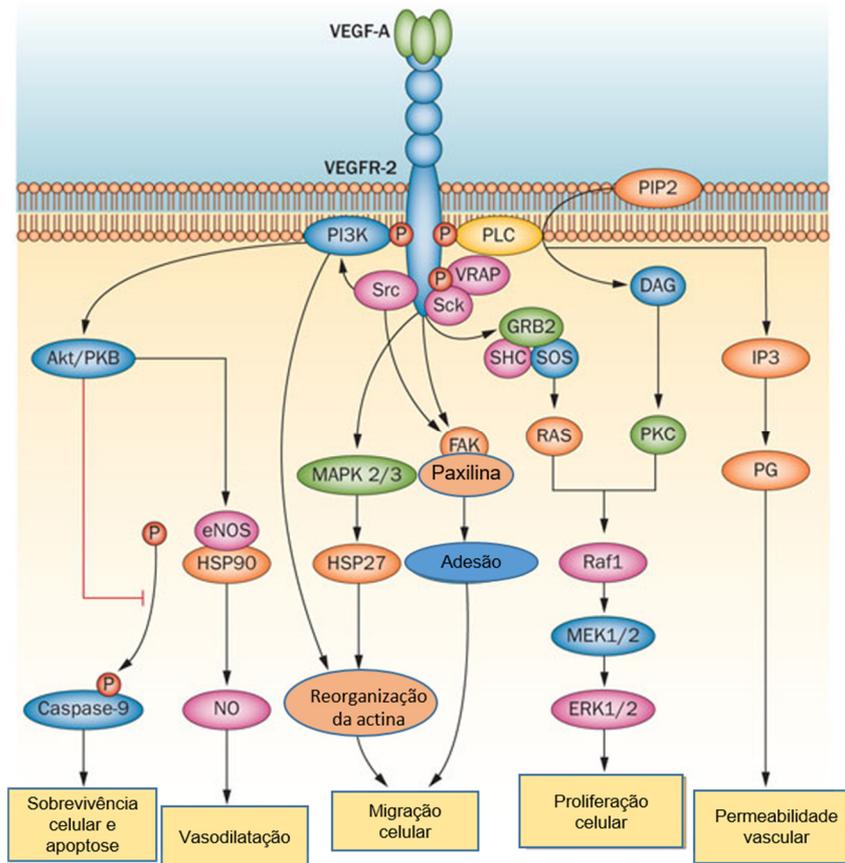
Contrariamente à angiogénese fisiológica normal, a tumoral não é controlada e a vasculatura formada é distinta havendo, principalmente, formação de micro vasos dilatados, tortuosos e hiper-permeáveis, constituídos por células endoteliais desorganizadas que não são capazes de manter a função de barreira do endotélio (Gerber & Ferrara, 2005; Thornton, Ravn, Winslet, & Chester, 2006). Estas anomalias provocam alterações no fluxo sanguíneo, aumento da pressão dos fluidos intra-tumorais e diminuição da oxigenação, o que aumenta a capacidade de crescimento e de metastização do tumor, ao mesmo tempo que diminui a sua sensibilidade aos agentes quimioterapêuticos (Goel, Wong, & Jain, 2012).

A regulação da expressão de Vegf-A é regulada por vários estímulos como hipóxia, fatores de crescimento, mutações no gene p53, hormonas, promotores tumorais e óxido nítrico (Ferrara, 2004a; Neufeld, Cohen, Gengrinovitch, & Poltorak, 1999; Takahashi & Shibuya, 2005). De entre estes, no microambiente tumoral, a hipóxia é de particular interesse. À medida que o tumor cresce, as células dentro da massa tumoral ficam frequentemente privadas de oxigénio, o que resulta na geração de zonas de hipóxia. Em condições de baixas concentrações de oxigénio, a expressão do fator indutor de hipóxia  $1\alpha$  aumenta e liga-se à região promotora do gene Vegf, induzindo assim a transcrição e a expressão de Vegf-A (Ziello, Jovin, & Huang, 2007). Para além da indução da transcrição, a hipóxia promove a estabilidade de Vegf-A através da ligação de proteínas ao ácido ribonucleico mensageiro (Neufeld et al., 1999; Takahashi & Shibuya, 2005).

A ação do Vegf-A é mediada pelos recetores tirosina-cinase VegfR-1 e VegfR-2 que se localizam, predominantemente, na superfície das células endoteliais. Apesar da afinidade de ligação com o VegfR-1 ser aproximadamente dez vezes superior à do VegfR-2, a sua atividade cinase é muito fraca, contrariamente à atividade do VegfR-2, que é considerado o maior mediador dos efeitos do Vegf-A (Goel & Mercurio, 2013; Koch & Claesson-Welsh, 2012). A ligação do Vegf-A ao Vegf-2 conduz à ativação de proteínas de adesão (integrinas) pela via de sinalização Pi3k/Akt e à estimulação do crescimento endotelial através da via Raf/Mek/Erk (**Figura 12**).

A atividade do Vegf-A induz também a expressão de proteínas apoptóticas como a Bcl-2 e a A1 (Ferrara, 2004b; Koch & Claesson-Welsh, 2012).

Na angiogénese fisiológica normal, a atividade do Vegf-A é inibida pelo ligando *Delta-Like 4* que, através da via de sinalização *Notch* diminui a atividade da via Vegf/VegfR (Hoff & Machado, 2012).



**Figura 12 - Via de sinalização do Vegf-A.** A ligação do Vegf-A ao recetor VegfR-2 ativa várias vias de sinalização, incluindo a via Raf/Mek/Erk, responsável pela indução da proliferação celular e a via Pi3k/Akt que estimula os mecanismos de sobrevivência celular e apoptose, vasodilatação e migração celular. O Vegf-A tem ainda capacidade de aumentar a permeabilidade vascular. Adaptado de: Taimeh, Loughran, Birks & Bolli, 2013.

Com base na sobre-expressão de Vegf-A nos tumores humanos e no papel da angiogénese na progressão e na invasão tumoral, foram desenvolvidas terapêuticas dirigidas que bloqueiam a via de sinalização Vegf/VegfR. Uma das terapêuticas dirigidas anti-Vegf aprovada para uso em CCRm é o bevacizumab, um AcM que se liga especificamente ao fator Vegf-A (Vasudev & Reynolds, 2014).

### 1.6.2. Biomarcadores preditivos de resposta às terapêuticas anti-Vegf

Atualmente não existem biomarcadores que permitam prever a resposta terapêutica ao bevacizumab (Duda, 2012; Jain, Duda, Clark, & Loeffler, 2006; Lambrechts, Lenz, De Haas, Carmeliet, & Scherer, 2013). A identificação de biomarcadores preditivos de resposta a este AcM é pertinente uma vez que: **1)** existem doentes que não respondem à terapêutica; **2)** em alguns doentes o tumor adquire resistência à terapêutica; **3)** os efeitos adversos destas terapêuticas são significativos e **4)** o custo do tratamento com estes agentes é elevado (Duda, 2012).

Foram efetuados numerosos estudos em vários tipos de tumores, na tentativa de identificar uma molécula biológica capaz de avaliar a resposta ao bevacizumab, no entanto, os resultados não foram consistentes. A procura de um biomarcador para esta terapêutica é um desafio difícil devido à complexidade do processo de angiogénese. Apesar do papel predominante do Vegf-A, existem muitos outros fatores que podem assumir funções essenciais durante a angiogénese como o fator de crescimento placentário, fatores de crescimento fibroblásticos, fatores de crescimento derivados das plaquetas, angiopoietinas e várias citocinas (Lambrechts et al., 2013). Os estudos clínicos focaram-se em estudar diversas moléculas biológicas, entre elas marcadores angiogénicos circulantes presentes no plasma, como o Vegf-A e os seus recetores e biomarcadores presentes no tecido tumoral, como o Cd31 e polimorfismos de um único nucleótido (Duda, 2012; Jain et al., 2006; Lambrechts et al., 2013; Maru, Venook, & Ellis, 2013).

No CCRm as mutações nos genes B-RAF, p53 e KRAS não parecem estar relacionadas com a resposta terapêutica à associação de bevacizumab com quimioterapia (Bencsikova et al., 2015; Ince et al., 2005).

Relativamente à expressão de Vegf-A, os resultados obtidos pelos diferentes estudos têm sido inconsistentes. Vários chegaram à conclusão de que o aumento de Vegf-A plasmático ou tumoral é um indicativo de mau prognóstico, mas não existe consenso quanto ao seu valor preditivo (Duda, 2012; Lambrechts et al., 2013; Maru et al., 2013). As razões para esta inconsistência poderão estar relacionadas com o desenho dos estudos, com as isoformas de Vegf-A avaliadas e com as técnicas de quantificação utilizadas.

Num dos estudos mais impactantes foi efetuada uma análise retrospectiva de um ensaio clínico efetuado em cancro gástrico avançado, com o objetivo de identificar um marcador preditivo à resposta terapêutica do AcM bevacizumab. Os marcadores avaliados incluíram todas as isoformas plasmáticas de Vegf-A e a expressão tumoral de Vegf-A, VegfR-1 e 2 e neuropilina-1 (um coreceptor do Vegf-A). O estudo concluiu que os níveis plasmáticos basais de Vegf-A e tumorais basais de neuropilina-1 poderão ser biomarcadores preditivos em doentes com carcinoma gástrico avançado, sendo que os doentes tratados com bevacizumab e com elevados níveis plasmáticos de Vegf-A e baixos níveis de expressão tumoral de neuropilina-1 tinham mais benefícios em termos de sobrevivência global, quando comparados com o grupo de controlo (Van Cutsem et al., 2012a). No entanto, este estudo não permitiu a validação do uso destas moléculas como preditivas de tratamento, uma vez que o seu desenho e objetivo principais não foram orientados para a avaliação de biomarcadores, mas sim da eficácia terapêutica.

Em resumo, a identificação de biomarcadores preditivos de resposta ao bevacizumab tem grande relevância científica, sendo os principais potenciais biomarcadores os níveis plasmáticos de Vegf-A e os seus recetores e/ou coreceptores. No entanto, o uso destas moléculas como marcadores de resposta terapêutica está dependente de estudos prospetivos de validação.

### 1.6.3. O papel do bevacizumab no tratamento do CCRm

Vários ensaios clínicos demonstraram a eficácia do bevacizumab no tratamento de CCRm quando este é combinado com quimioterapia.

A adição de bevacizumab a quimioterapia de 1ª linha terapêutica demonstrou uma melhoria em vários parâmetros. O ensaio clínico de fase III AVF2107g, que levou à aprovação inicial do fármaco pela FDA, comparou o regime de quimioterapia IFL (irinotecano, bólus de 5-FU e ácido folínico) com e sem a adição de bevacizumab em doentes com CCRm. No grupo tratado com o bevacizumab/IFL, foi observado um benefício estatisticamente significativo em termos de OS (20,3 vs 15,6 meses) e de PFS (10,6 vs 6,2 meses). A taxa de resposta também foi superior no grupo tratado com bevacizumab/IFL (44,8% vs 34,8) (Hurwitz et al., 2004) (**Tabela 7**).

O ensaio de fase III BICC-C comparou o regime IFL-bevacizumab com o regime FOLFIRI-bevacizumab (**Tabela 7**). Os pacientes que foram tratados com FOLFIRI-bevacizumab apresentaram maior tempo mediano de OS (28 vs 19,2 meses) e de PFS (7,6 vs 5,9 meses) (Fuchs et al., 2007, 2008).

No tratamento em 1ª linha terapêutica, a associação de bevacizumab a quimioterapia à base de oxaliplatina é controversa. No ensaio clínico NO16966 (**Tabela 7**), 1401 doentes foram aleatoriamente selecionados para receber capecitabina e oxaliplatina (XELOX) ou oxaliplatina e 5-FU (FOLFOX4) associados a bevacizumab ou a placebo. A adição de bevacizumab à quimioterapia resultou num maior tempo mediano de OS, no entanto a diferença não foi estatisticamente significativa (21,3 vs 19,9 meses). Relativamente à PFS verificou-se um ligeiro aumento que se revelou estatisticamente significativo (9,4 vs 8,0 meses). A taxa de resposta não foi influenciada pela adição de bevacizumab aos regimes de oxaliplatina. Na análise de subgrupos verificou-se, ainda, que o ligeiro benefício em termos de PFS só é significativo para o subgrupo de doentes tratados com XELOX (Saltz et al., 2008).

**Tabela 7 - Principais ensaios clínicos efetuados com bevacizumab em combinação com quimioterapia, em 1ª linha terapêutica.**

**Legenda:** IFL e FOLFIRI: regimes terapêuticos de associação de 5-FU/FOL/IRINOTECANO; FOLFOX: regime terapêutico de associação de 5-FU/FOL/OXALIPLATINA; XELOX: regime terapêutico de associação de CAPECITABINA/OXALIPLATINA. Os esquemas IFL, FOLFIRI e mIFL diferem entre si na forma de administração.

Ensaio Clínico	Fase	Tratamento	Taxa de resposta (%)	PFS mediana (meses)	OS mediana (meses)
AVF2107g	III	IFL/bevacizumab vs IFL	45 vs 35 (valor p= 0,001)	10,6 vs 6,2 (HR:0,54 valor p<0,001)	20,3 vs 15,6 (HR:0,66 valor p<0,001)
BICC-C	III	FOLFIRI/bevacizumab vs mIFL/bevacizumab	58 vs 53	7,6 vs 5,9 (valor p=0,04)	28 meses vs 19,2 (HR=1,79 valor p=0,037)
NO16966	III	FOLFOX4/XELOX4/ bevacizumab vs FOLFOX4/XELOX	38 vs 38 valor p=0,99	9,4 vs 8,0 (HR:0,83 valor p=0,0023)	21,3 vs 19,9 (HR:0,89 valor p=0,077)

Numa meta análise que incluiu seis ensaios clínicos num total de 3060 pacientes verificou-se que, em 1ª linha terapêutica, a adição de bevacizumab a quimioterapia resulta em benefícios significativos em termos de OS e de PFS, no entanto, este benefício está limitado a regimes à base de irinotecano (Loupakis et al., 2015; Macedo, da Costa Lima, & Sasse, 2012).

Avanços recentes na terapia oncológica incluem a utilização de regimes de tratamentos compostos por três agentes quimioterapêuticos diferentes. No ensaio clínico TRIBE, a combinação de FOLFOXIRI (5-FU/ácido folínico, oxaliplatina e irinotecano) com bevacizumab, em terapia de 1ª linha, reportou a maior OS estimada para estes doentes. O grupo de doentes tratado com a combinação FOLFOXIRI mais bevacizumab apresentou uma OS de 29,8 meses, tendo-se registado um tempo mediano de 25,8 meses (IC 95%: 22,5 – 29,1) no grupo de doentes tratados com a combinação FOLFIRI/bevacizumab. Esta diferença revelou-se estatisticamente significativa (valor p=0,03) (Cremoli et al., 2013). Apesar de parecer que há benefícios em utilizar quimioterapia tripla, espera-se que o resultado de ensaios clínicos que estão a decorrer venham esclarecer melhor a sua aplicabilidade, benefícios e toxicidade (Loupakis et al., 2015).

Em 2ª linha terapêutica, são dois os principais ensaios clínicos que suportam a utilização deste agente anti-angiogénico. O ensaio clínico E3200 de fase III foi o responsável pela aprovação do bevacizumab pela FDA nesta linha terapêutica. Neste ensaio, pacientes com CCRm cujos tumores progrediram em 1ª linha terapêutica com regimes terapêuticos à base de fluoropirimidinas/irinotecano e sem exposição prévia ao bevacizumab foram aleatoriamente distribuídos em três grupos para receber bevacizumab associado a FOLFOX4, bevacizumab em monoterapia ou apenas FOLFOX4. As diferenças significativas foram encontradas entre os grupos tratados com bevacizumab/FOLFOX4 e FOLFOX4. No grupo bevacizumab/FOLFOX4 verificou-se uma melhoria significativa em termos de OS (12,9 vs 10,8 meses, HR: 0,75; valor p=0,011), de PFS (7,3 vs 4,7 meses, HR: 0,61, valor p<0,0001) e de taxa de resposta (22,7% vs 8,6, valor p<0,0001) (Giantonio et al., 2007). No entanto, na prática clínica, a maioria dos doentes iniciam o tratamento com bevacizumab na 1ª linha terapêutica. Neste sentido, o ensaio clínico ML18147, estudou a continuação da terapêutica com o

AcM bevacizumab. Pacientes com CCRm que progrediram nos 3 meses seguintes após terem descontinuado o tratamento de 1ª linha em regime de quimioterapia associado a bevacizumab foram aleatoriamente divididos para receber a 2ª linha terapêutica em dois grupos: terapêutica com apenas quimioterapia (411 pacientes) e terapêutica com quimioterapia em associação com bevacizumab (409 pacientes). A escolha de regimes à base de oxaliplatina ou de irinotecano dependeu do tratamento recebido em 1ª linha. Este estudo concluiu que a continuação da terapêutica com bevacizumab na 2ª linha terapêutica melhora significativamente o tempo mediano de OS (11,2 vs 9,8 meses, HR:0,81, IC 95%: 0,69-0,94, teste de log rank não estratificado, valor  $p=0,0062$ ) e de PFS (5,7 vs 4,1 meses, HR:0,68, valor  $p<0,0001$ ), mas não detetou diferenças estatisticamente significativas a nível da taxa de resposta terapêutica (Grothey et al., 2008).

Atualmente não existem dados relativamente à continuação de bevacizumab em 3ª linha terapêutica em doentes com CCRm. Nos pacientes que progrediram em todos os regimes quimioterapêuticos anteriores, o tratamento mais apropriado é a combinação de anticorpos monoclonais anti-EGFR em monoterapia ou em combinação com irinotecano (Fakih, 2015).

Com base nos resultados obtidos nos ensaios de 1ª linha para o indicador taxa de resposta, alguns investigadores consideram ainda que o bevacizumab não é indicado para diminuição do tamanho de metástases hepáticas com o objetivo de efetuar a sua resseção cirúrgica (Feng et al., 2014).

### **1.6.4. Propriedades farmacológicas do bevacizumab**

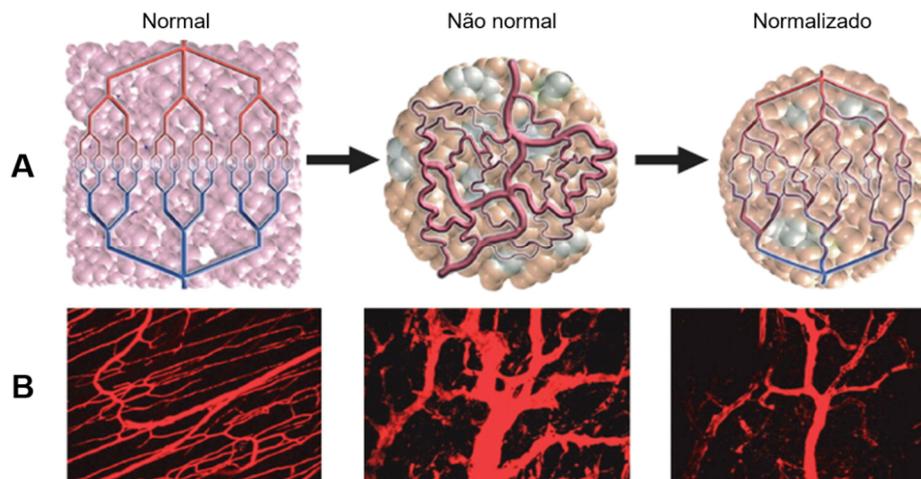
#### **1.6.4.1. Estrutura e características físico-químicas**

O bevacizumab é um AcM recombinante humanizado, cujas sequências são 93% de origem humana e 7% de ratinho. É constituído pelo isótopo kappa da IgG1 humana e consiste em duas cadeias leves idênticas, cada uma com 214 aminoácidos e duas cadeias pesadas, também idênticas constituídas por 453 aminoácidos, com um peso molecular total de 149 kDa. As quatro cadeias mantêm-se ligadas entre si por uma combinação de ligações covalentes e não covalentes e as cadeias pesadas contêm um local de N-glicosilação (no aminoácido 303). A região determinante de complementaridade, na região variável, é constituída por sequências do clone A4.6.1 de anticorpo monoclonal de ratinho (isótopo IgG1) que se ligam especificamente ao Vegf, sendo o aminoácido glicina da posição 88 da sequência proteica deste fator essencial para o estabelecimento da ligação (EMEA, 2005; Ferrara, Hillan, Gerber, & Novotny, 2004; Gerber & Ferrara, 2005; Newton, 2009). A ligação do bevacizumab ao Vegf não induz alterações estruturais no ligando, o que sugere que o AcM exerce um efeito estéreo incapacitando-o de interagir com os seus recetores (Wiesmann et al., 1997).

### 1.6.4.2. Mecanismo de ação

Os mecanismos através dos quais o bevacizumab exerce os seus benefícios clínicos ainda não estão completamente entendidos.

O bevacizumab liga-se ao Vegf-A e impede a sua ligação aos recetores na superfície das células endoteliais causando redução do crescimento vascular e inibindo a progressão tumoral metastática (Genentech, 2015). A inibição de crescimento do tumor por falta de nutrientes e oxigénio através da redução da microvasculatura é o principal mecanismo de ação atribuído a este AcM (**Figura 13**) (Folkman, citado por Von Baumgarten et al., 2011). No entanto, os ensaios clínicos em tumores sólidos efetuados com bevacizumab em monoterapia obtiveram resultados desapontantes, com a terapia anti-angiogénica a falhar na melhoria da taxa de resposta ou do tempo de sobrevivência, tendo-se verificado que estes benefícios são obtidos apenas quando o bevacizumab é aplicado em combinação com quimioterapia (Goel et al., 2012; Jain, Duda, Clark, & Loeffler, 2006). Apesar de se esperar que este anti-angiogénico fosse antagonista da ação dos agentes de quimioterapia devido à diminuição do número de vasos sanguíneos e à consequente diminuição da entrega de fármacos no tumor, estes resultados sugeriram que o bevacizumab poderia ter a capacidade de aumentar a sua eficácia. Em 2001, Jain et al. propuseram que a terapêutica anti-Vegf pode normalizar a vasculatura sanguínea dos tumores, diminuindo o desequilíbrio entre os fatores pró e anti-angiogénicos (Jain et al. citado por Jain et al., 2006). Como resultado, a estrutura e função dos vasos sanguíneos tende a normalizar (**Figura 13A**).



**Figura 13 - Mecanismo de ação do bevacizumab.** **A:** Contrariamente à vasculatura normal, a tumoral é estruturalmente e funcionalmente anormal, não sendo eficiente para a distribuição dos citotóxicos. A terapêutica com bevacizumab parece normalizar a estrutura dos vasos sanguíneos tumoral, aumentando a eficácia dos agentes quimioterapêuticos. **B:** à esquerda imagem de vasculatura normal em tecido esquelético; no meio imagem de vasculatura de tumor do cólon em rato e à direita imagem do mesmo tumor, 3 dias após administração de bevacizumab, onde se pode verificar diminuição do número de vasos sanguíneos. Adaptado de: Jain et al, 2005.

Embora esta normalização possa conduzir a um aumento da proliferação tumoral, estas alterações provocam também a diminuição da pressão do fluido intersticial do tumor e da hipóxia, a melhoria da perfusão sanguínea e da velocidade do fluxo sanguíneo, permitindo que a entrega da quimioterapia no tumor aconteça de forma mais eficaz e que as células tumorais sejam mais sensíveis aos seus efeitos (Jain et al., 2006; Von Baumgarten et al., 2011; Willett et al., 2004).

O bevacizumab poderá, ainda, exercer efeitos citotóxicos sobre células que expressem os recetores de Vegf e dependam do Vegf-A para sobreviver. Num estudo de fase I em carcinoma retal, a taxa de apoptose em células tumorais aumentou significativamente após o tratamento com o bevacizumab, no entanto, não se sabe se este efeito resulta de uma ação direta do fármaco ou indireta devido à redução dos vasos sanguíneos (Willett et al., 2004).

### **1.6.4.3. Reações adversas e toxicidade**

De acordo com os estudos efetuados para o perfil global de segurança do bevacizumab as reações adversas mais graves foram: perfuração gastrointestinal, hemorragias e tromboembolismo arterial (EMA, 2010b). Dentro das reações adversas muito frequentes encontram-se: doenças do sangue e do sistema linfático como a leucopenia e neutropenia; neuropatia periférica sensorial, hipertensão, diarreia, náuseas, vômitos, dor abdominal, astenia e fadiga. As reações frequentes são muito variadas e incluem, entre outras, infeções diversas, anemia, linfopenia, acidente vascular cerebral, cardiopatias, vasculopatias (tromboembolismos arterial e venoso, hemorragias), doenças respiratórias e torácicas (embolia pulmonar, epistaxe), doenças gastrointestinais (perfuração intestinal, obstrução intestinal, fístulas, proctalgia); afeções dos tecidos cutâneos e subcutâneos (dificuldade de cicatrização) e músculo-esqueléticos (mialgia, artralgia, fraqueza muscular); proteinúria e dor pélvica. Algumas reações adversas como hemorragia retal, perfuração gastrointestinal, perfuração do septo nasal e reações de hipersensibilidade à perfusão ocorrem com frequência desconhecida (EMA, 2010b; Genentech, 2015).

Nos ensaios de fase III/IV, em CCRm, as reações adversas mais frequentemente descritas são hipertensão (18%), proteinúria (2%), dificuldade na cicatrização de feridas (1%), perfuração gastrointestinal (2%), tromboembolismo arterial (1 a 2%) e hemorragias (1 a 6%). Uma vez que o bevacizumab é utilizado em associação com outros agentes pode ser difícil distinguir as suas reações adversas específicas (Saif, 2015).

Os mecanismos que justificam a ocorrência das reações adversas são diversos e alguns são ainda desconhecidos. A ocorrência de hipertensão parece estar relacionada com a diminuição dos níveis de um agente vasodilatador dos vasos sanguíneos (o óxido nítrico), que acontece aquando da inibição do Vegf-A. Outros efeitos adversos como dificuldade de cicatrização, hemorragias e tromboes estão relacionados com a importância do Vegf-A na manutenção da homeostasia do sistema vascular, nomeadamente ao nível da neovascularização, da reparação de tecidos e da manutenção da integridade dos vasos sanguíneos (Kamba & McDonald, 2007).

## 1.7. Comparação da eficácia do cetuximab e do bevacizumab

Como já é conhecido, a existência de mutações RAS é um biomarcador preditivo de resistência à terapêutica com cetuximab pelo que, dos dois AcMs abordados nesta revisão, apenas o bevacizumab pode ser utilizado para o tratamento de tumores RAS mutados. No entanto, quando os tumores não apresentam mutações RAS ambos os agentes podem ser utilizados, o que tem levantado importantes questões a nível da comparação da sua eficácia. Até à data são conhecidos os resultados de dois ensaios clínicos (**Tabela 8**), efetuados em terapêutica de 1ª linha. Os resultados foram reportados com base nos pacientes com tumores não mutados para RAS. Os ensaios clínicos FIRE-3 (Heinemann et al., 2014) e CALGB 80405 (Lenz, 2014) confirmaram a existência de uma melhor taxa de resposta nos pacientes tratados com o cetuximab. Em ambos os ensaios não foi encontrada diferença significativa entre os dois medicamentos a nível da PFS.

**Tabela 8 - Resultados dos ensaios clínicos comparativos da eficácia dos AcMs cetuximab e bevacizumab.** Os resultados apresentados dizem respeito à população com CCRm não mutado para os genes KRAS e NRAS.

**Legenda:** FOLFIRI: regime terapêutico de associação de 5-FU/FOL/IRINOTECANO; FOLFOX: regime terapêutico de associação de 5-FU/FOL/OXALIPLATINA.

Ensaio Clínico	Fase	Tratamento	Taxa de resposta (%)	PFS (meses)	OS (meses)
FIRE-3	III	FOLFIRI/cetuximab vs FOLFIRI/bevacizumab	72 vs 56 (valor p=0,003)	10,3 vs 10,2 (HR:0,97; valor p=0,77)	33,1 vs 25 (HR:0,7; valor p=0,0059)
CALGB 80405	III	FOLFOX ou FOLFIRI / bevacizumab vs FOLFOX ou FOLFIRI / cetuximab	68,6 vs 53,6% (valor p<0,001)	10,9 vs 11,4 (HR:1,1; valor p=0,31)	31,2 vs 32 (HR:0,9; valor p=0,4)

Em termos de tempo de tempo mediano de OS, o ensaio CALGB 80405 não mostrou diferenças significativas entre o bevacizumab e o cetuximab (em combinação com FOLFIRI ou FOLFOX), mas no estudo FIRE-3 o grupo dos doentes tratados com cetuximab apresentou um tempo mediano de OS de 33,1 meses, bastante superior ao verificado no ramo dos doentes tratados com bevacizumab, que foi de 25 meses (**Tabela 8**) (Lenz, 2014; Heinemann et al., 2014). A razão para a diferença verificada em termos de sobrevivência global não está esclarecida mas poderá dever-se a variações no desenho experimental (Fakih, 2015).

Pese embora os numerosos ensaios clínicos efetuados continuam a persistir algumas dúvidas na utilização destes AcMs nomeadamente, sobre qual o que traz mais benefícios terapêuticos, qual o melhor agente quimioterapêutico de associação de forma a maximizar os benefícios terapêuticos e a diminuir os efeitos adversos, qual a melhor janela temporal e qual a melhor sequência de utilização ao longo das diversas linhas terapêuticas.



## 2. OBJETIVOS DO ESTUDO

### 2.1. Gerais

- Caracterizar o *status* mutacional dos exões 2, 3 e 4 dos genes KRAS e NRAS, em amostras de CCR, de pacientes provenientes do Hospital Espírito Santo de Évora E.P.E, analisadas entre os anos 2009 e 2014.
- Estudar a resposta terapêutica de pacientes com CCRm, com *status* mutacional do exão 2 do gene KRAS conhecido e que iniciaram tratamento com AcMs anti-Egfr e anti-Vegf entre os anos 2009 e 2012.

### 2.2. Específicos

- Caracterizar a amostra de pacientes que efetuou pesquisa de mutações nos exões 2, 3 e 4 dos genes KRAS e NRAS no período de tempo definido;
- Determinar a prevalência das mutações nos oncogenes KRAS e NRAS no período de tempo definido;
- Dos pacientes que iniciaram tratamento com os AcMs cetuximab e bevacizumab no período de tempo estipulado:
  - a. Caracterizar a amostra;
  - b. Estimar o tempo de sobrevivência global;
  - c. Estimar a sobrevivência livre de progressão da doença;
  - d. Estimar a taxa de resseção de metástases;
  - e. Descrever os efeitos adversos das terapêuticas;
  - f. Estabelecer a associação entre o aparecimento de *rash* cutâneo e o tempo de sobrevivência global em doentes tratados com o anticorpo monoclonal cetuximab.



### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Desenho do estudo e critérios de inclusão

Este é um estudo retrospectivo, baseado na recolha da informação, a partir dos processos clínicos de pacientes diagnosticados com CCR e seguidos no Hospital Espírito Santo de Évora E.P.E.

O trabalho integra uma componente de análise laboratorial, que correspondeu à avaliação mutacional dos genes KRAS e NRAS nos tumores dos pacientes constituintes da amostra e uma componente de análise de informação relativa à terapêutica com cetuximab e bevacizumab, nomeadamente ao nível do tempo de sobrevivência global e de sobrevivência livre de progressão, *rash* cutâneo, resseção cirúrgica de metástases e efeitos adversos.

A amostra foi selecionada de acordo com os seguintes critérios de inclusão:

- i. Pacientes com diagnóstico anátomo-patológico de CCR e com tumores onde foi efetuada a pesquisa mutacional RAS entre 01 de Janeiro de 2009 e 31 de Dezembro de 2014.
- ii. Pacientes em estadio IV e com *status* mutacional do exão 2 do gene KRAS conhecido e que efetuaram terapêutica com os AcMs bevacizumab e cetuximab, no período de tempo compreendido entre 01 de Janeiro de 2008 a 31 de Dezembro de 2012.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Espírito Santo de Évora E.P.E. e a confidencialidade dos dados recolhidos foi assegurada, de acordo com o estabelecido no Decreto-lei nº 67/98- Lei da Proteção de Dados Pessoais.

#### 3.2. Análise mutacional RAS

Foi efetuada a pesquisa mutacional em tumores colo-retais de 325 pacientes, num total de 331 tumores. Destes, a análise mutacional RAS completa foi apenas efetuada em 30 amostras. Esta diferença deve-se à modificação das recomendações para a terapêutica anti-Egfr. Durante algum tempo apenas a análise do exão 2 do gene KRAS era necessária para a sua administração, sendo que a partir de 21/11/2013 a análise foi alargada aos exões 3 e 4 do gene KRAS e 2, 3 e 4 do gene NRAS.

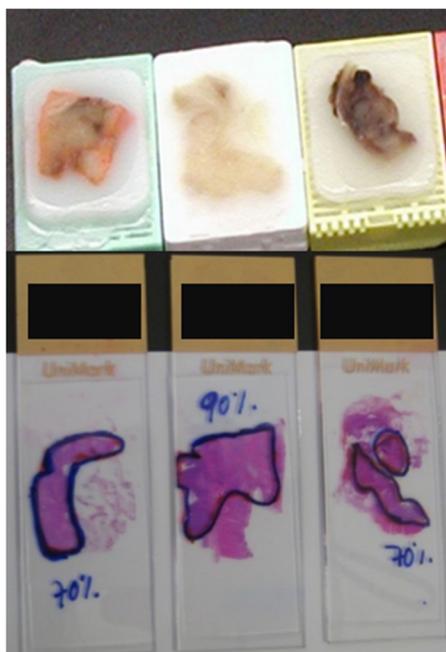
Uma vez que as mutações RAS são mutuamente exclusivas a análise foi efetuada em duas fases: numa primeira fase efetuou-se sequenciação do exão 2 do gene KRAS

e, numa segunda fase, apenas as amostras não mutadas para este exão foram testadas para os exões 3 e 4 do gene KRAS e 2, 3 e 4 do gene NRAS.

Neste estudo, o ADN para a análise mutacional foi extraído a partir de blocos de parafina com amostras de tecido tumoral arquivados no Serviço de Anatomia Patológica da instituição em estudo. Uma vez que a parafina é um agente inibidor da PCR (McPherson, 2006), foi necessário efetuar a desparafinação das amostras e aplicar um protocolo de extração e de purificação com procedimentos apropriados à manutenção da integridade do ADN. Descreve-se, em seguida, o protocolo detalhado.

### 3.2.1. Extração de ADN

As amostras de tecido de CCR para extração de ADN foram obtidas a partir de biópsias ou de peças cirúrgicas de pacientes e os tecidos foram fixados em formaldeído a 10% tamponado, submetidos a processamento histológico e impregnados em parafina. As preparações histológicas das amostras foram revistas por um patologista que delimitou a área do tecido relevante para a análise (tumor) e, dos blocos de parafina, foram retirados 2 a 8 cortes seriados de 10µm (**Figura 14**). As amostras passíveis de efetuar enriquecimento tumoral por macrodisseção foram recolhidas para lâminas de vidro e as restantes para microtubos de 1,7mL.



**Figura 14 - Seleção de amostras para análise RAS.** É selecionado um bloco de parafina representante do tumor e a respetiva preparação histológica, corada com Hematoxilina e Eosina, é revista por um anátomo-patologista que delimita a área de tecido relevante para análise.

A desparafinação das amostras foi efetuada com lavagens sucessivas em xilol (2 lavagens durante 5 minutos) e etanol absoluto (2 lavagens durante 5 minutos), por imersão das lâminas nos solventes ou por adição de 1mL de solvente e centrifugação a 5000g, para as amostras em microtubos. Procedeu-se à secagem das amostras à temperatura ambiente e, de seguida, as amostras recolhidas em lâminas de vidro foram hidratadas com solução de tampão fosfato salino pH 7,4 (referência 7011-036, *Life Technologies*, EUA). Para efetuar o enriquecimento tumoral, a área de tecido relevante para a análise foi raspada com uma lâmina de bisturi e o tecido foi transferido para um microtubo de 1,7mL.

Procedeu-se, seguidamente, à extração do ADN. Para isso, adicionou-se tampão de lise celular (*Buffer ATL*, referência 1063369, *Qiagen*, Alemanha) e proteinase K (*Qiagen Proteinase Stock Solution*, referência 1014023, *Qiagen*, Alemanha) às amostras que, seguidamente, foram incubadas *overnight* a 56°C. Este passo tem o objetivo efetuar a lise e a digestão dos componentes celulares. Os passos subsequentes (lise adicional, purificação e eluição) foram efetuados de acordo com as indicações do manual de instruções do *QIAamp® DNA FFPE Tissue* (referência 56404, *Qiagen*, Alemanha) que utiliza a técnica de cromatografia de afinidade em coluna. Este método permite a obtenção de ADN com um elevado grau de pureza. O ADN, com carga negativa, liga-se com elevada afinidade às partículas de sílica da fase estacionária que têm carga positiva e, de seguida, efetuam-se lavagens consecutivas com eluentes que removem os contaminantes. No final as moléculas de ADN ligadas à membrana de sílica são removidas com uma solução de pH superior a 7 (Tan & Yap, 2009). Obtiveram-se eluídos de 50 a 100µL de ADN genómico que foram armazenados a 4°C, até à sua utilização.

### 3.2.2. Quantificação e avaliação da pureza do ADN genómico

A pureza e a quantidade do ADN extraído foram avaliados por espectrofotometria. O princípio desta técnica baseia-se nas diferentes absorvâncias dos compostos. Os anéis heterocíclicos dos ácidos nucleicos absorvem luz ultravioleta, com absorção máxima a cerca de 260nm, sendo possível calcular a concentração de ácidos nucleicos através da lei de *Lambert-Beer*. As proteínas apresentam absorção máxima a 280nm e a maioria dos compostos químicos entre os 220 e os 230nm. O grau de contaminação do ADN é dado pela razão entre as absorvâncias 260/280 e 260/230. Um valor 260/280 de 1,8 e um valor de 260/230 entre 2,0 a 2,2 são a referência para ADN “puro” (Thermo Fisher Scientific, 2011).

Foi utilizado o equipamento NanoDrop 2000c (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, EUA). As absorvâncias foram mediadas a 260nm, 230 e 280nm. Foram verificados os valores relativos à concentração do ADN e as razões A260/280 e A260/230 foram utilizadas para determinar o seu grau de pureza.

### 3.2.3. Amplificação de ADN

Os exões alvo dos genes a estudar foram amplificados por PCR. Este método permite a amplificação a partir de pequenas amostras de ADN de forma a obter quantidades que permitam a sua análise. A síntese das cadeias de ADN a partir de uma amostra alvo ocorre no sentido 5'→3', através da adição de desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs), que é efetuada pela enzima ADN polimerase. Uma vez que esta enzima apenas tem a capacidade de adicionar nucleótidos a grupos OH da extremidade 3' da cadeia de ADN, para que a reação ocorra, é necessário utilizar pequenas cadeias de oligonucleótidos complementares à cadeia alvo, denominados por *primers*.

A reação ocorre em ciclos térmicos de 3 passos: desnaturação, emparelhamento e extensão. Na desnaturação, através do recurso a altas temperaturas as cadeias duplas de ADN alvo são separadas em cadeias simples; no passo seguinte, os *primers* ligam-se de forma complementar às cadeias simples do ADN alvo e, por último, na fase de extensão ocorre a síntese do ADN pela ADN polimerase através da adição de desoxiribonucleótidos trifosfato à cadeia de *primer* anteriormente emparelhada com o ADN alvo (McPherson, 2006).

Na **Tabela 9** estão representados os reagentes e as respetivas quantidades utilizadas para a preparação da mistura de reação.

**Tabela 9 - Componentes da reação de mistura de PCR.**

Componente da Reação	Quantidade
H <sub>2</sub> O ultra-pura	Até 15 µL
*Tampão de reação 10x	1,5 µL
*MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,5 µL
<i>Primer Forward</i> 20mM	0,5 µL
<i>Primer Reverse</i> 20mM	0,5 µL
**dNTP 10mM	1,2 µL
***Soro de Albumina Bovina 1x	1 µL
* Taq ADN polimerase 5U/µl	0,3 µL
ADN	20-100ng

\**Amplitaq Gold*® ADN Polymerase with gold Buffer & MgCl<sub>2</sub>, referência 4311814, Applied Biosystems, EUA; \*\* referência 362275, Applied Biosystems, EUA; \*\*\*referência A2153, Sigma-Aldrich, EUA

Foram utilizados pares de primers específicos para as regiões alvo, cujas sequências *forward* (F) e *reverse* (R) estão representadas na **Tabela 10**.

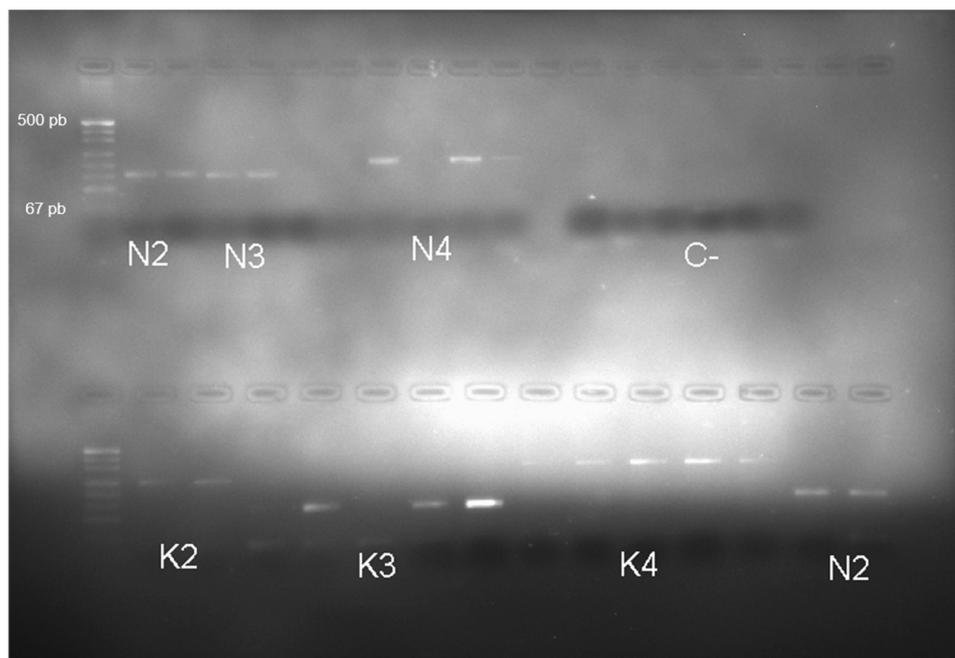
Tabela 10 - Pares de *primers* específicos utilizados para amplificação dos exões 2, 3 e 4 dos genes KRAS e NRAS.

Exão	Primers	Tamanho do ADN amplificado (pares de bases)
<b>KRAS - exão 2</b>	F: 5' - GGT GGA GTA TTT GAT AGT GTA-3' R: 5' - GGT CCT GCA CCA GTA ATA TGC A- 3'	220
<b>KRAS - exão 3</b>	F: 5' - TTC CTA CAG GAA GCA AGT AG - 3' R: 5' - AAT TAC TCC TTA ATG TCA GC - 3'	221
<b>KRAS - exão 4</b>	F: 5' - GAC AAA AGT TGT GGA CAG GT - 3' R: 5' - TAG CAT AAT TGA GAG AAA AAC TG -3'	380
<b>NRAS - exão 2</b>	F: 5'3- CTT GCA CAA ATG CTG AAA GC -3' R: 5' - CAC TGG GCC TCA CCT CTA TG - 3	183
<b>NRAS - exão 3</b>	F: 5' - CAC CCC CAG GAT TCT TAC AG - 3' R: 5' - TGG CAA ATA CAC AGA GGA AGC - 3'	247
<b>NRAS - exão 4</b>	F: 5' - CCC GTT TTT AGG GAG CAG AT - 3' R: 5' - CTT GCA CAA ATG CTG AAA GC - 3'	286

A amplificação do ADN extraído foi efetuada em termociclador (*MyCycler™ Thermal Cycler System, Bio-Rad Laboratories Inc., EUA*) com as seguintes condições: 12 minutos a 95°C; 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C, seguidos de 10 minutos a 72°C. No final as amostras foram mantidas a 4°C.

### 3.2.4. Eletroforese de ácidos nucleicos

A eletroforese é frequentemente utilizada para verificar a pureza e a integridade do ADN e baseia-se na separação de moléculas numa matriz durante a aplicação de um campo elétrico. O ADN possui carga negativa em valores de pH neutro ou alcalino e, quando aplicado na matriz de gel submetida a um campo elétrico, migra em direção ao ânodo. A velocidade de migração da molécula de ADN é condicionada pelo seu tamanho e a sua velocidade eletroforética diminui com o aumento de tamanho. A matriz utilizada neste estudo foi o gel de agarose (**Figura 15**) que é indicado para a separação de fragmentos de ADN com tamanho compreendido entre os 100 pares de base (pb) e 25 quilobases (Wilson & Walker, 2010).



**Figura 15 - Visualização dos produtos de PCR em gel de agarose a 2%.** Legenda: **K2, K3 e K4:** exões 2, 3 e 4 do gene KRAS; **N2, N3 e N4:** exões 2, 3 e 4 o gene NRAS; **C-:** controlo negativo.

Foi efetuada eletroforese em gel de agarose a 2% (referência MB05202, *Nzytech*, Portugal) que foi corado com brometo de etídio (referência 15585-011, *Invitrogen*, EUA), em tampão Tris/Borato/EDTA (referência 15581-044, *Life Technologies*, EUA). Em cada poço do gel foi aplicado uma mistura de 2,5  $\mu\text{L}$  de amostra de ADN amplificado e de 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão de carga (referência 10816-015, *Invitrogen*, EUA). A migração foi efetuada durante 30 minutos a 130 V. O gel foi visualizado (**Figura 15**) no sistema de imagem *Gel Doc™ XR+ System and Quantity One® 1-D Analysis Software* (*Bio-Rad Laboratories Inc.*, EUA) e os tamanhos dos fragmentos foram calculados, tendo como referência o marcador de peso molecular puc19/ HpaII (referência MAD-00398914, *Master Diagnostica*, Espanha).

### 3.2.5. Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados com um método enzimático (*Illustra™ ExoProStar™ 1-step*, referência US77705, *GE Healthcare Life Sciences*, Reino Unido). A purificação de produtos PCR permite eliminar os *primers* e os dNTPs que não foram utilizados na reação de PCR. Esta metodologia é rápida e consiste na utilização de uma mistura das enzimas exonuclease I, que digere as cadeias simples de nucleótidos no sentido 5'→3', libertando desoxirribonucleótidos 5' monofostato (dNMPs) e fosfatase alcalina que catalisa a desfosforilação dos nucleótidos não incorporados e dos dNMPs libertados. A reação dá-se a 37°C e no final a temperatura é elevada para os 80°C de modo a desnaturar as enzimas (*GE Healthcare Life Sciences*, 2013).

Foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de reagente de purificação a 12,5  $\mu\text{L}$  de produto PCR. As amostras foram purificadas no termociclador (*MyCycler™ Thermal Cycler System, Bio-Rad Laboratories Inc.*, EUA), com as seguintes condições: 15 minutos a 37°C e 15 minutos a 80°C. Até à sua utilização, os produtos foram mantidos a 4°C.

### 3.2.6. Sequenciação do ADN

Para efetuar a reação de sequenciação do ADN previamente amplificado foi utilizado o kit *GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit* (referência 608120, *Beckman Coulter, EUA*), desenvolvido para aplicação do método de Sanger por eletroforese capilar. Esta técnica inicia-se com uma reação de sequenciação que se baseia no princípio da PCR tradicional, com algumas diferenças. Para além dos reagentes necessários para a PCR tradicional são ainda utilizados di-desoxirribonucleótidos (ddNTPs) marcados com fluorocromos distintos. Durante o processo de síntese, a ADN polimerase adiciona os dNTPs ou os ddNTPs, dependendo da concentração relativa de cada molécula. No entanto, por cada vez que um ddNTP é adicionado a extensão da cadeia termina e no final da reação são obtidas cadeias de ADN completas não marcadas com fluorocromos e inúmeros fragmentos de tamanho distinto, marcados com fluorocromos (Thermo Fisher Scientific, 2009).

Os componentes da mistura de reação apresentam-se na **Tabela 11**. A amplificação dos produtos foi efetuada em termociclador (*MyCycler™ Thermal Cycler System, Bio-Rad Laboratories Inc.*, EUA), durante 30 ciclos: 20 segundos a 96°C; 20 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C. Até à sua utilização, os produtos foram mantidos a 4°C.

**Tabela 11 - Componentes da mistura da reação de sequenciação**

Componente da Reação	Quantidade ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O ultra-pura	7,6
**Tampão de reação 10x	0,4
**DTCS mix	4
Primer F ou R 3mM	2
ADN (produto de PCR)	6

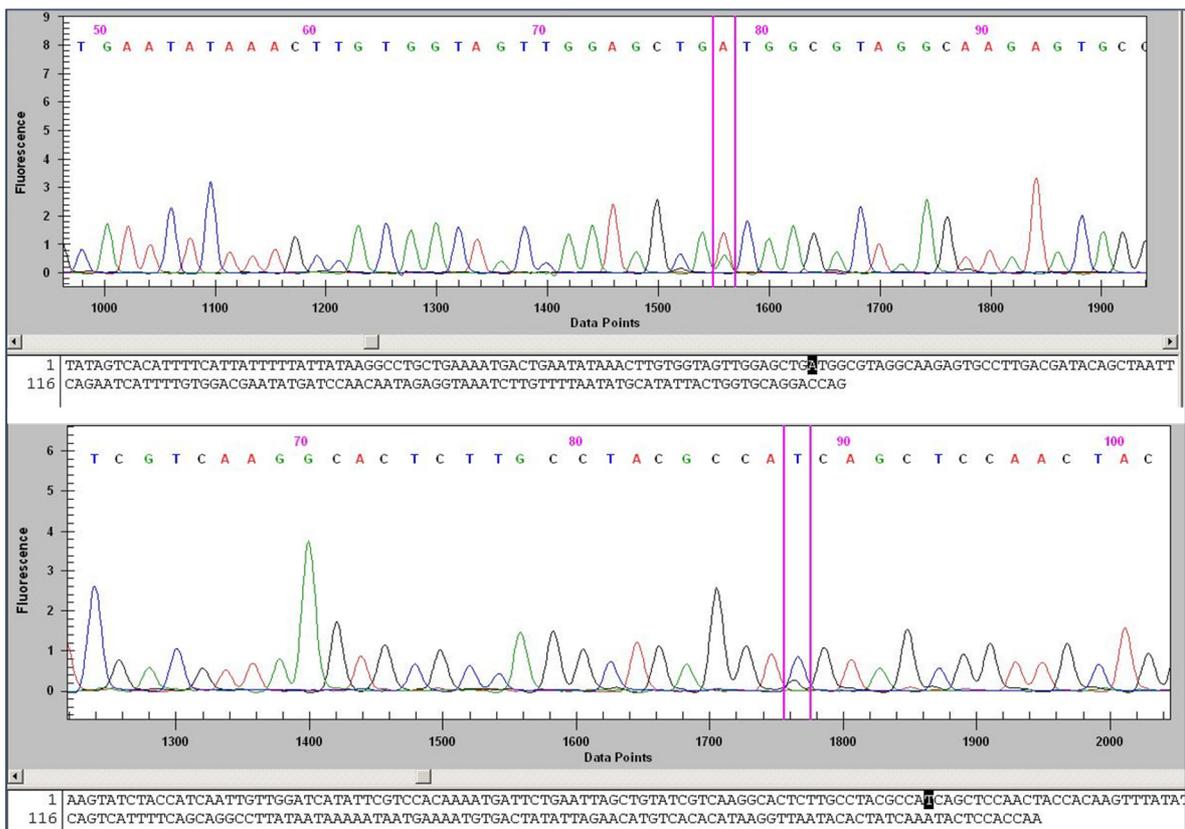
\*\*DTCS Quick Start KIT, *Beckman Coulter*, EUA

De seguida efetuou-se a precipitação etanólica dos produtos da reação de sequenciação. A precipitação etanólica permite purificar e concentrar os ácidos nucleicos e é efetuada através da adição de sais catiónicos e etanol. Na presença de sais, o etanol induz uma transição estrutural nas moléculas do ADN, originando um precipitado que pode ser posteriormente utilizado em aplicações diversas (Thermo Fisher Scientific, 2009).

Para o efeito, as amostras foram incubadas a -20°C com 65  $\mu\text{L}$  de solução de precipitação (acetato de sódio a 3M, EDTA a 125mM, glicogénio a 20mg/mL e etanol absoluto) durante 20 min. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 4149g à temperatura de 4°C durante 30 minutos. No final da centrifugação o excesso de

sobrenadante foi removido e os *pellets* foram lavados com 200  $\mu$ L de etanol a 70% em duas centrifugações sucessivas, com a duração de 10 minutos, a 4149g e à temperatura de 4°C. Os *pellets* de ADN secaram à temperatura ambiente e protegidos da exposição à luz e no final foram diluídos em 30  $\mu$ L de formamida pura (referência 608022, *Beckman Coulter, EUA*).

Por último as amostras foram colocadas no sequenciador *GenomeLab™ GeXP* (*Beckman Coulter, EUA*) onde se efetuou eletroforese capilar. Na eletroforese capilar, os fragmentos, marcados com fluorocromos são separados por tamanho e, durante este processo, passam pelo feixe de um laser emitindo fluorescência que é detetada por um sistema ótico do sequenciador. Este sinal é posteriormente convertido em dados digitais, conhecidos por eletroforetogramas (**Figura 16**) (*Thermo Fisher Scientific, 2009*).



**Figura 16 – Exemplo de eletroforetogramas onde se pode observar a mutação c.35G>A: p.Gly12Asp no exão 2 do gene KRAS.** Na imagem, pode observar-se as sequências *forward* (em cima) e *reverse* (em baixo) do exão 2 do gene KRAS. A alteração na base de ADN que leva à mutação encontra-se assinalada entre riscas verticais.

Os eletroforetogramas obtidos (**Figura 16**) foram analisados com o programa *GenomeLab™ Sequence Analysis Software* (*Beckman Coulter, EUA*) versão 10.0, tendo como referência as sequências NG\_007524.1 (KRAS) (NCBI, 2016b) e NG\_007572.1 (NRAS) (NCBI, 2016c).

### 3.3. Análise Estatística

Para o estudo da OS e da PFS recorreu-se à análise de sobrevivência. A análise de sobrevivência permite estimar o risco de ocorrência de um evento (o óbito e a progressão da doença, no caso deste estudo em concreto) ao longo do tempo sendo, assim, possível estimar a função de sobrevivência que é dada pela probabilidade de que o evento ocorra depois de um determinado instante. Esta ferramenta estatística também permite comparar estatisticamente curvas de sobrevivência de grupos de indivíduos ou avaliar o efeito que determinados fatores têm no tempo até ocorrência do evento. A aplicação da análise de sobrevivência justifica-se porque uma das características deste tipo de estudos é a presença de censura, que se refere à perda de informação decorrente de não se ter observado o evento até ao final do estudo (Carvalho et al., 2011).

Foram incluídos no estudo 325 indivíduos diagnosticados com CCR e, dos quais, 89 com CCRm foram tratados com AcMs.

A análise estatística foi efetuada através do *R Project (R Foundation for Statistical Computing, EUA)*, versão 3.3.0.3. Foi utilizado como nível de significância de referência  $\alpha=5\%$  e as estimativas intervalares foram obtidas para um nível de confiança de 95% (IC 95%).

Na prática clínica, os pacientes são tratados em linhas terapêuticas. Neste estudo, define-se linha terapêutica como o tempo decorrido entre o tratamento com esquemas terapêuticos diferentes. Considerou-se o início da 1ª linha terapêutica na data da primeira administração do primeiro esquema terapêutico, imediatamente após a identificação da doença em estadió IV, iniciando-se a 2ª linha terapêutica na data em que, para o mesmo indivíduo, foi iniciado um esquema terapêutico distinto do anterior e assim consecutivamente. Foi efetuado o levantamento da informação relativa às variáveis em estudo para todas as linhas terapêuticas aplicadas a cada paciente da amostra tratado com AcMs. A distribuição dos pacientes ao longo das linhas terapêuticas é heterogénea e, portanto, as amostras relativas a cada linha terapêutica apresentam dimensões muito diferentes.

Dada a complexidade e heterogeneidade do número de linhas terapêuticas, assumindo a 1ª linha terapêutica como determinante na terapêutica e comum a toda a amostra, em algumas análises foram consideradas duas categorias para esta variável: **1ª linha terapêutica** e **outra linha terapêutica** (que inclui todas as restantes linhas terapêuticas).

O critério utilizado para contabilização do tempo OS foi o tempo decorrido entre a data de identificação da doença em estadió IV e a data de óbito, uma vez que os tratamentos em estudo apenas podem ser administrados neste estadió patológico. A terapêutica efetuada em 1ª linha foi utilizada como referência na análise do tempo de OS em função dos esquemas terapêuticos. Considerou-se a ocorrência do evento apenas nos pacientes com data de óbito confirmada no sistema, censurando-se os restantes indivíduos.

Para a PFS considerou-se o tempo decorrido entre a data de início do esquema terapêutico e a data do controlo imagiológico onde se registou a primeira progressão da doença ou a data de óbito (o que tiver ocorrido primeiro), em cada linha terapêutica. Todos os doentes em que não se verificou progressão imagiológica ou óbito (o que tiver ocorrido primeiro) foram censurados. A influência dos esquemas terapêuticos utilizados na PFS foi estudada apenas para a 1ª e 2ª linhas terapêuticas.

A amostra de pacientes que efetuou terapêutica com AcMs foi dividida em 3 grupos de tratamento, de acordo com a terapêutica administrada:

- **Grupo cetuximab:** pacientes que efetuaram terapêutica apenas com o AcM cetuximab, em pelo menos uma das linhas terapêuticas;
- **Grupo bevacizumab:** pacientes que efetuaram terapêutica apenas com o AcM bevacizumab, em pelo menos uma das linhas terapêuticas;
- **Grupo cetuximab e bevacizumab:** pacientes que efetuaram terapêutica com ambos os anticorpos monoclonais, administrados em linhas terapêuticas distintas.

Foram consideradas as seguintes categorias para a variável “esquemas terapêuticos”: **AcM em associação com FOLFIRI**; **AcM em associação com FOLFOX** e **AcM em associação com outros que não FOLFOX e FOLFIRI** ou **AcM em monoterapia**.

Dos 89 pacientes que efetuaram terapêutica com AcMs e para todas análises relativas às variáveis OS, PFS e *rash* cutâneo foram excluídos 4 pacientes devido a:

- Em 2008 e 2009, 3 pacientes foram tratados com cetuximab, mas de acordo com as indicações atuais não eram elegíveis para este tratamento por apresentarem uma mutação do exão 2 do gene KRAS;
- 1 paciente do grupo cetuximab suspendeu o tratamento imediatamente a seguir à primeira administração, por desenvolvimento de reação alérgica.

Para a análise da variável *rash*, foram ainda excluídos os pacientes do grupo bevacizumab e o grau de *rash* utilizado foi o registado no processo clínico do paciente, de acordo com o *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (National Cancer Institute U.S., 2010). Devido à multiplicidade de linhas terapêuticas não foi possível relacionar o *rash* com o tempo de OS, tendo-se optado por avaliar o seu efeito na PFS da linha terapêutica correspondente. Para o efeito, efetuaram-se duas abordagens, que diferem na forma como os doentes foram categorizados:

- **Abordagem 1:** os indivíduos foram divididos em dois grupos: com aparecimento de *rash* e sem aparecimento de *rash*.
- **Abordagem 2:** os indivíduos foram divididos em dois grupos: pacientes sem aparecimento de *rash* ou com *rash* de grau 1 e pacientes com *rash* de grau  $\geq 2$ .

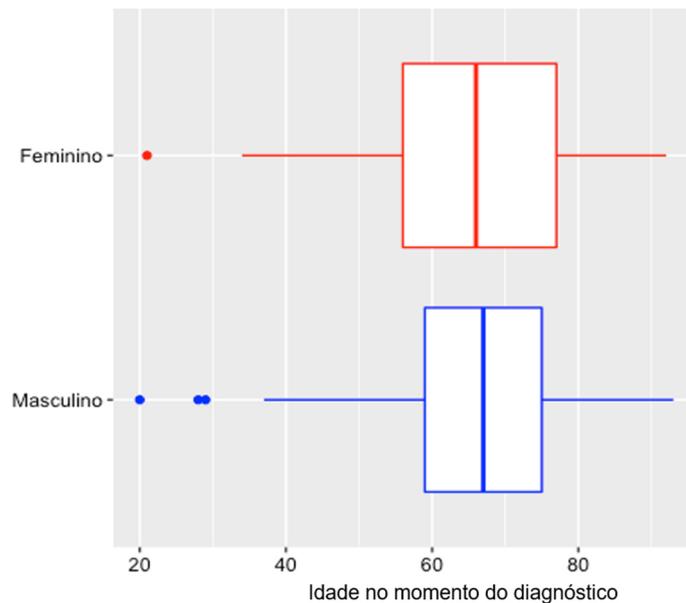
As curvas de sobrevivência foram estimadas por Kaplan-Meier e os grupos foram comparados pelo teste Log-Rank ou pelo teste de Peto & Peto, conforme o mais adequado para cada caso (Carvalho et. al, 2011). Para testes de comparações múltiplas de curvas de sobrevivência considerou-se o valor p ajustado por Bonferroni. Sempre que foi necessário avaliar o efeito de uma variável ajustando para outras sem haver independência entre as observações da amostra optou-se por ajustar modelos de Cox com componente de fragilidade Gaussiana, reduzindo-se estes aos modelos de Cox usuais caso a fragilidade não se mostrasse significativa (Carvalho et. al, 2011).



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caraterização da amostra

A amostra foi constituída por 325 indivíduos diagnosticados com CCR. Destes, 65,5% (213 pacientes) pertenciam ao género masculino e 34,5% (112 pacientes) ao género feminino. Os indivíduos da amostra tinham idade compreendida entre os 20 e os 92 anos. A idade média dos indivíduos do género masculino foi de 66,1 anos ( $\pm 11,8$ ) com uma mediana de 67 anos, para um intervalo de idade compreendido entre os 20 e os 93 anos. Relativamente aos indivíduos do género feminino a idade média situou-se nos 66 anos ( $\pm 13,3$ ) e a mediana foi de 66 anos para um intervalo de idades compreendido entre os 21 e os 93 anos. A distribuição da idade em função do género está representada na **Figura 17**.



**Figura 17- Distribuição da idade no momento do diagnóstico em função do género, da amostra de pacientes com CCR.**

No momento do diagnóstico, alguns dos pacientes apresentavam mais do que um tumor, num total de 331 tumores. A localização dos tumores (**Figura 18**) mais frequente foi: reto (29,9%), cólon sigmóide (25,4%) e cólon ascendente (10,6%). No total, a incidência de tumores no cólon (66,5%) foi muito superior à de tumores no reto (29,9%).

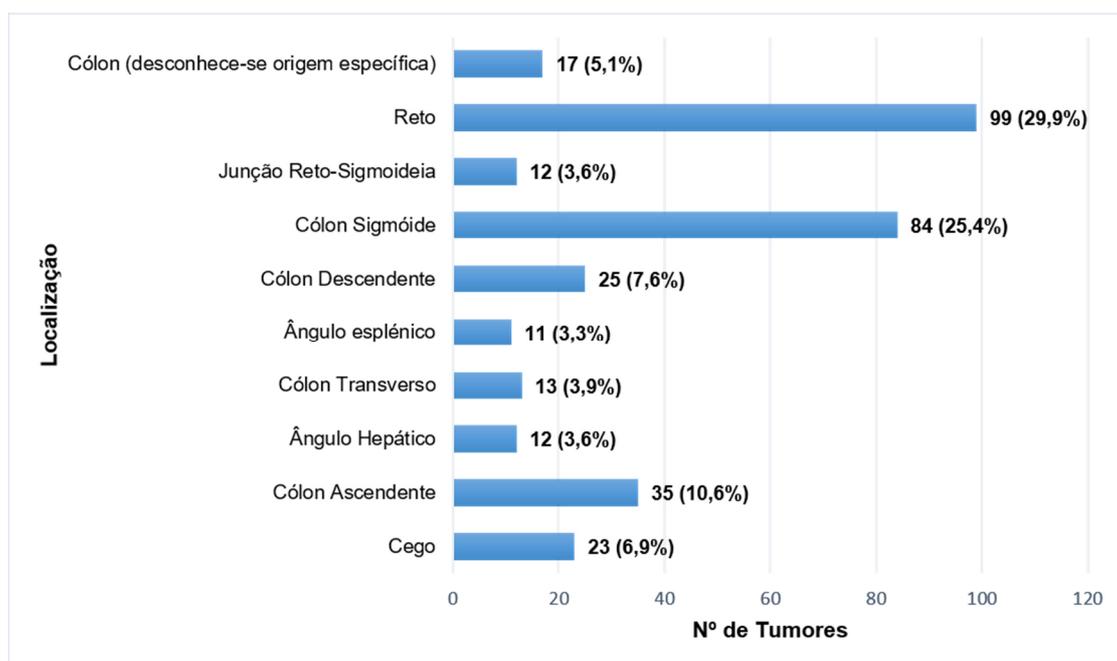


Figura 18 - Distribuição dos tumores colo-retais da amostra, de acordo com a sua localização anatômica.

Histologicamente, 89,7% dos tumores foram classificados como adenocarcinoma e 5,4% como adenocarcinomas mucinosos. Outras classificações foram atribuídas com menor frequência (**Tabela 12**).

Tabela 12 - Diagnóstico anátomo-patológico dos carcinomas colo-retais.

Diagnóstico Anátomo-Patológico	Nº de tumores	% de tumores
Adenocarcinoma	297	89,7
Adenocarcinoma <i>not otherwise specified</i>	13	3,9
Adenocarcinoma mucinoso	18	5,4
Carcinoma mucinoso em pólipos	1	0,3
Adenocarcinoma de células em anel de sinete	2	0,6

Relativamente ao grau histológico das amostras, à maioria (60,4%) foi atribuído o grau moderadamente diferenciado, a 29% o grau bem diferenciado, sendo os restantes, em menor número, de grau desconhecido, mal diferenciado, indiferenciado ou não avaliável (**Tabela 13**).

Tabela 13 - Grau histológico dos carcinomas colo-retais.

Grau Histológico	Nº de tumores	% de tumores
Desconhecido	9	2,7
Bem diferenciado	96	29,0
Moderadamente Diferenciado	200	60,4
Mal diferenciado	13	3,9
Indiferenciado	2	0,6
Não avaliável	11	3,3

À data do diagnóstico, para a maioria dos pacientes (45,5%) a patologia foi classificada em estadio IV. Dos restantes pacientes, em 40,9% a patologia foi classificada no estadio III, sendo que a maioria dos tumores foram diagnosticados no estadio IIIB (28,3%). Apenas em 12,3% dos pacientes a patologia foi diagnosticada em estadios mais precoces, mais concretamente nos estadios I (0,9%), IIA (11,4%) e IIB (1,2%) (Figura 19).

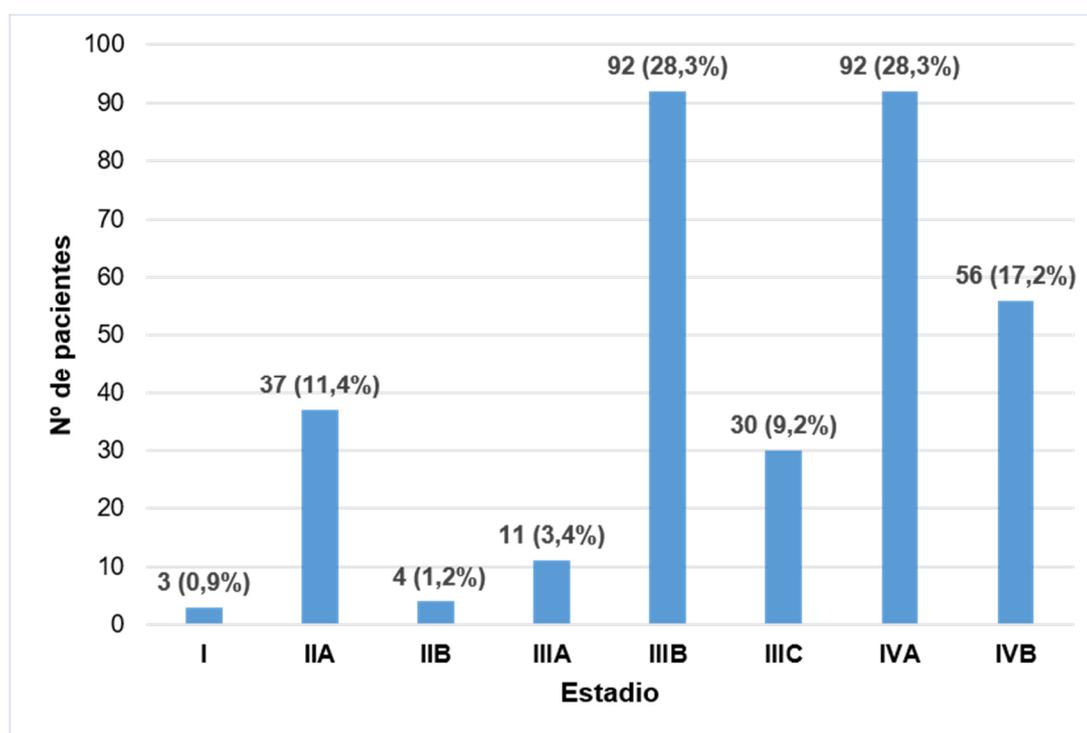


Figura 19 - Estadio patológico à data do diagnóstico.

Na Figura 20 encontram-se representados os locais de metastização à distância, à data do diagnóstico.

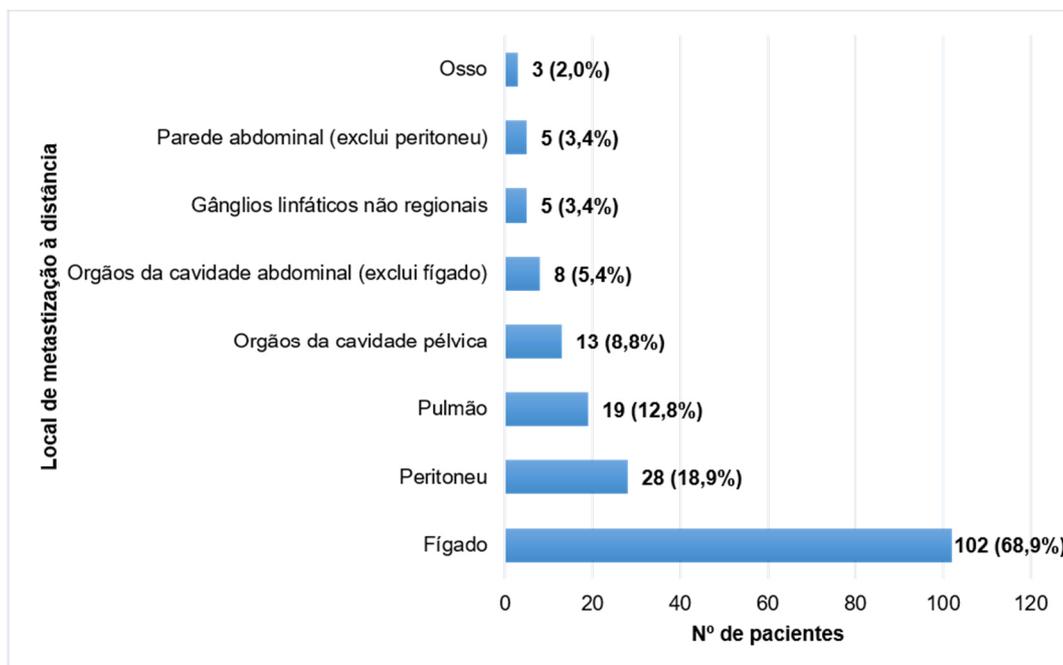


Figura 20 - Locais de metastização à distância, à data do diagnóstico.

Os locais de metastização à distância mais frequentes foram: fígado (68,9%), peritoneu (18,9%) e pulmão (12,8%). Verificou-se localização menos frequente para outras localizações como osso (2%), parede abdominal (3,4%) e gânglios linfáticos não regionais (3,4%) (Figura 20).

## 4.2. Tipo e distribuição das mutações nos genes KRAS e NRAS

Os 331 tumores foram testados para o exão 2 do gene KRAS. Em 42% (139 amostras) foram detetadas mutações no exão 2 deste gene.

O codão 12 foi o local onde foram identificadas mais mutações neste gene (82,7%). As mutações mais frequentemente detetadas foram a p.Gly12Asp (36,7%), a p.Gly12Val (23,7%) e a p.Gly13Asp (17,3%). As restantes mutações detetadas foram a p.Gly12Cys, a p.Gly12Ser e a p.Gly12Ala, com frequência de ocorrência muito semelhante (Figura 21).

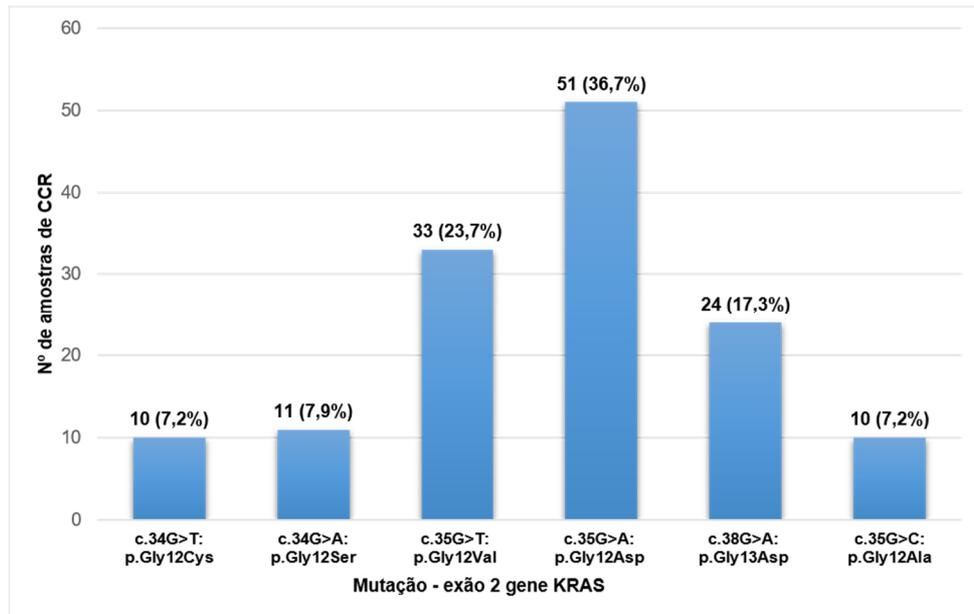


Figura 21 - Distribuição das mutações detetadas no exão 2 do gene KRAS, nos CCRs em estudo.

Das 192 amostras não mutadas para o exão 2 do gene KRAS (58%), o *status* mutacional dos exões 3 e 4 deste gene e dos exões 2, 3 e 4 do gene NRAS é conhecido em, apenas, 30 amostras (15,7%). Destas, apenas em 6 amostras (20%) foram identificadas mutações. Na **Figura 22** são apresentados os resultados referentes às amostras mutadas, por exão e gene.

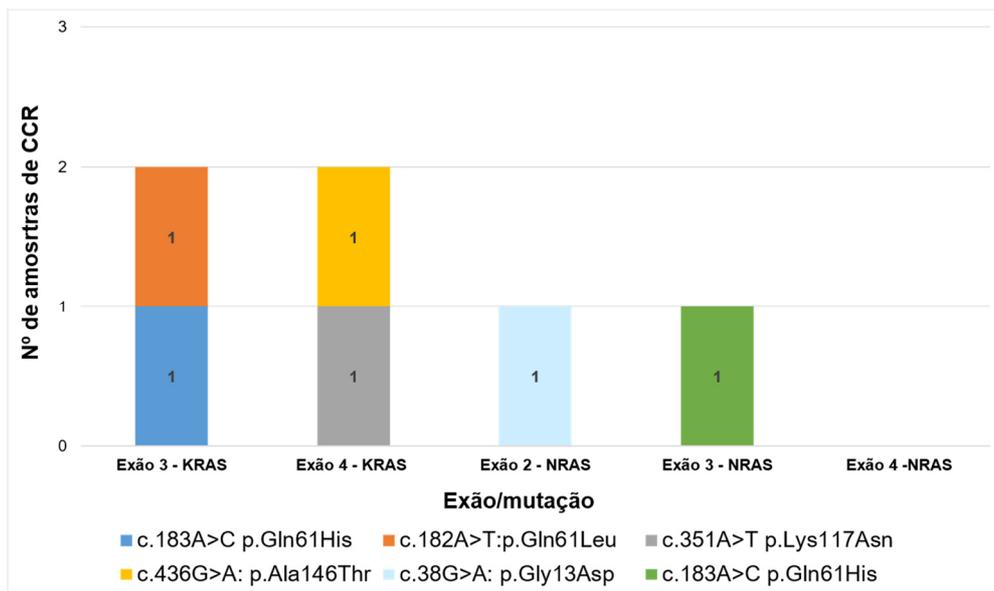


Figura 22 - Distribuição das mutações detetadas nos exões 3 e 4 do gene KRAS e dos exões 2, 3 e 4 do gene NRAS, nos CCRs testados.

Das 6 amostras mutadas, 4 apresentaram mutações no codão 61 do exão 3 (2 amostras) e nos codões 117 (1 amostra) e 146 do exão 4 (1 amostra) do gene KRAS. Foram ainda detetadas 1 mutação no codão 13 do exão 2 e 1 mutação no codão 61 do exão 3 do gene NRAS. Não se observou a existência de mutações no exão 4 do gene NRAS.

### 4.3. Resposta terapêutica aos AcMs cetuximab e bevacizumab

#### 4.3.1. Caraterização da amostra tratada com AcMs

No período de tempo decorrido entre 2008 e 2012 e, dos 325 indivíduos diagnosticados com CCR, 89 com CCR em estadio IV foram tratados com AcMs.

Dos indivíduos tratados com AcMs 70,8% (63 indivíduos) pertenciam ao género masculino e 29,2% (26 indivíduos) ao feminino.

No total, 39 (43,8%) pacientes efetuaram terapêutica com apenas cetuximab, 32 (40,0%) com apenas bevacizumab e 18 (20,2%) com ambos os AcMs (em linhas terapêuticas distintas).

Foram 55 (61,8%) os pacientes que não apresentaram tumores com mutações no exão 2 do gene KRAS e destes, o *status* mutacional dos restantes exões deste gene e dos exões 2, 3 e 4 do gene NRAS era apenas conhecido em 2 deles. À exceção de 1 paciente, que foi tratado com bevacizumab, todos os restantes (54 pacientes) com tumores não mutados no exão 2 do gene KRAS foram tratados com cetuximab ou com cetuximab e bevacizumab. Dos 34 pacientes com tumores mutados, a 3 deles foi administrado o AcM cetuximab. Os restantes (31 pacientes), cujos tumores apresentaram mutações, foram tratados com bevacizumab.

Relativamente a outros tratamentos, 21 (23,6%) pacientes efetuaram tratamento neoadjuvante, 43,8% (39 pacientes) efetuaram tratamento adjuvante e em 74,2% (66 pacientes) o tumor primário foi cirurgicamente removido.

A partir do momento do diagnóstico da patologia em estadio IV, os pacientes foram tratados em várias linhas terapêuticas, num máximo de 7 linhas terapêuticas para um pequeno número de indivíduos (2 pacientes). Cerca de metade (50,6%) dos pacientes efetuaram tratamentos até à 3ª linha terapêutica e 23,6 % foram, ainda, tratados em 4ª linha terapêutica.

Em 1ª linha terapêutica, 63 (70,8%) pacientes efetuaram tratamento com AcMs. Os esquemas terapêuticos (**Figura 23**) mais utilizados foram cetuximab em associação com FOLFIRI (28,1%) e bevacizumab em associação com FOLFIRI (22,5%). Outros esquemas utilizados incluíram a combinação dos AcMs com oxaliplatina e ainda cetuximab ou bevacizumab em associação com outros ou em monoterapia.

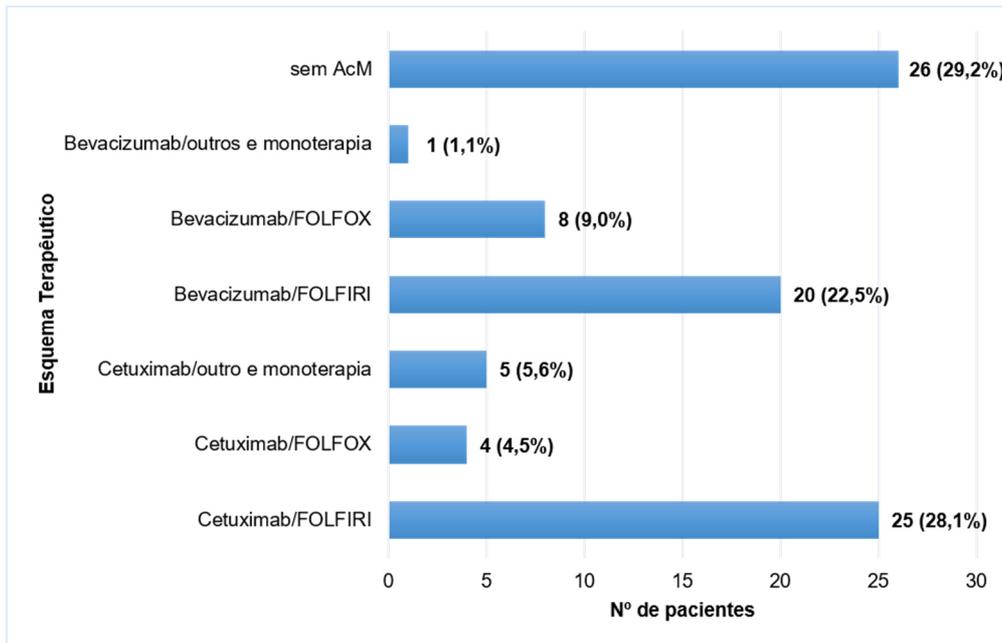


Figura 23 – Distribuição dos pacientes tratados em 1ª linha terapêutica, por esquema terapêutico.

Em 2ª linha terapêutica (**Figura 24**), foram tratados 74 pacientes, dos quais 57 (77%) com AcMs. Foram mais utilizadas as associações terapêuticas cetuximab/FOLFIRI (20,3%) e bevacizumab/FOLFOX (16,2%). As associações cetuximab/FOLFOX e bevacizumab/FOLFIRI foram, também, bastante utilizadas.

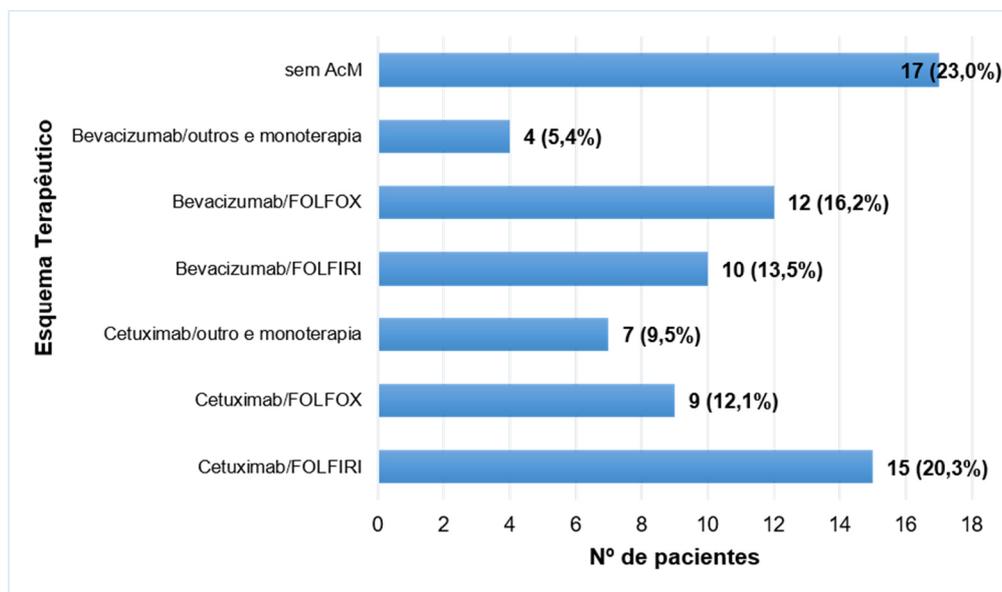
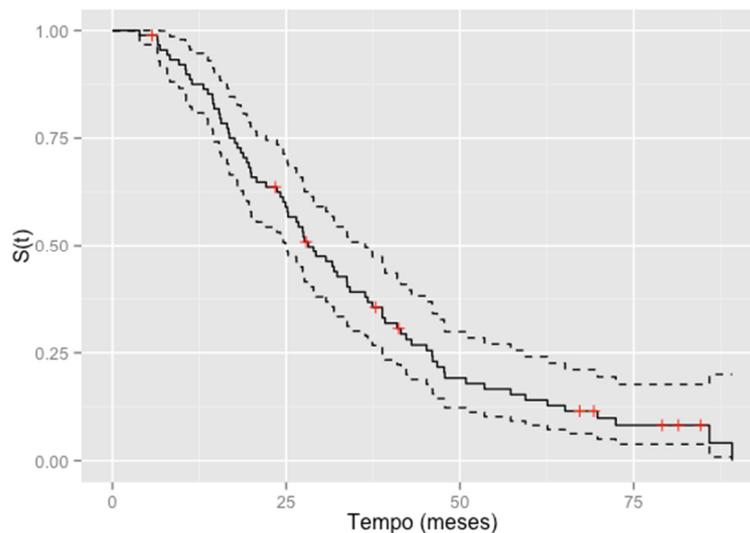


Figura 24 – Distribuição dos pacientes tratados em 2ª linha terapêutica, por esquema terapêutico.

### 4.3.2. Tempo de sobrevivência global

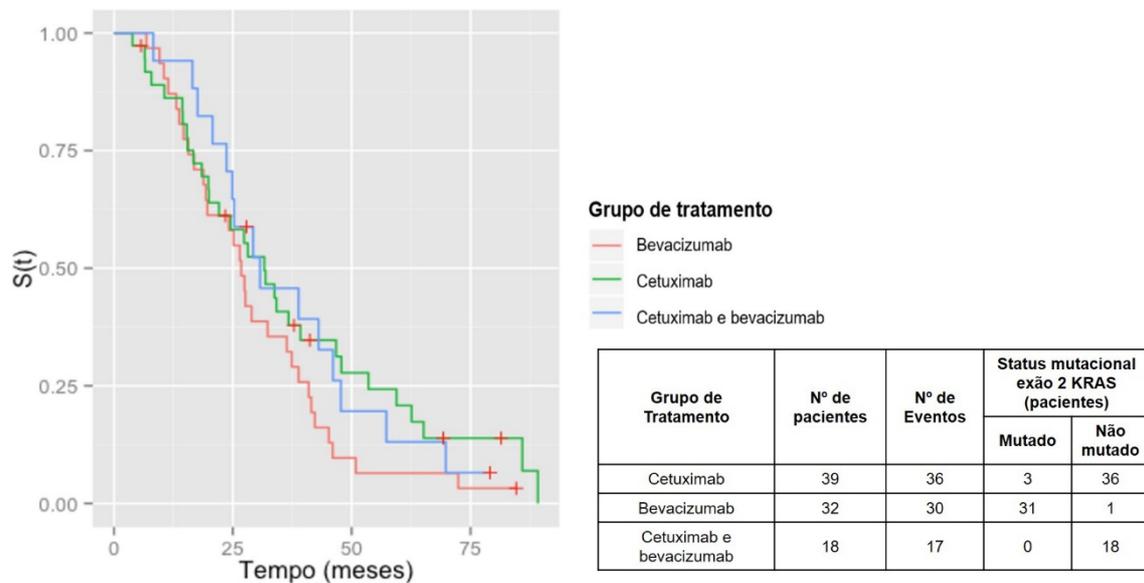
Na amostra, o tempo mediano de OS estimado é de 28,2 meses (IC 95%: 24,9 – 36,4 meses). Na **Figura 25** pode observar-se que o período de maior risco de óbito ocorre até cerca dos 50 meses (4 anos). A taxa de sobrevivência global estimada a 3 e 5 anos é 38,1% e 13,8%, respetivamente.



**Figura 25 - Sobrevivência global estimada na amostra de pacientes tratados com AcMs.** Estimativa de Kaplan-Meier e respetivas bandas de confiança a 95% para o período de tempo decorrido entre as datas de diagnóstico do estadio IV e de óbito.

O tempo mediano de OS estimado, por grupo de tratamento, é de 31,6 meses para o grupo cetuximab (IC 95%: 22,1 - 47,8 meses); 26,8 meses para o grupo bevacizumab (IC 95%: 19,3 - 38,8 meses) e 30,7 meses para indivíduos que receberam cetuximab e bevacizumab (IC 95%: 24,9 – 57,3 meses). Ocorreram 36 óbitos no grupo cetuximab, 30 no grupo bevacizumab e 17 no grupo cetuximab e bevacizumab.

Na **Figura 26** podem observar-se comportamentos semelhantes das curvas de sobrevivência global para os três grupos de tratamento.

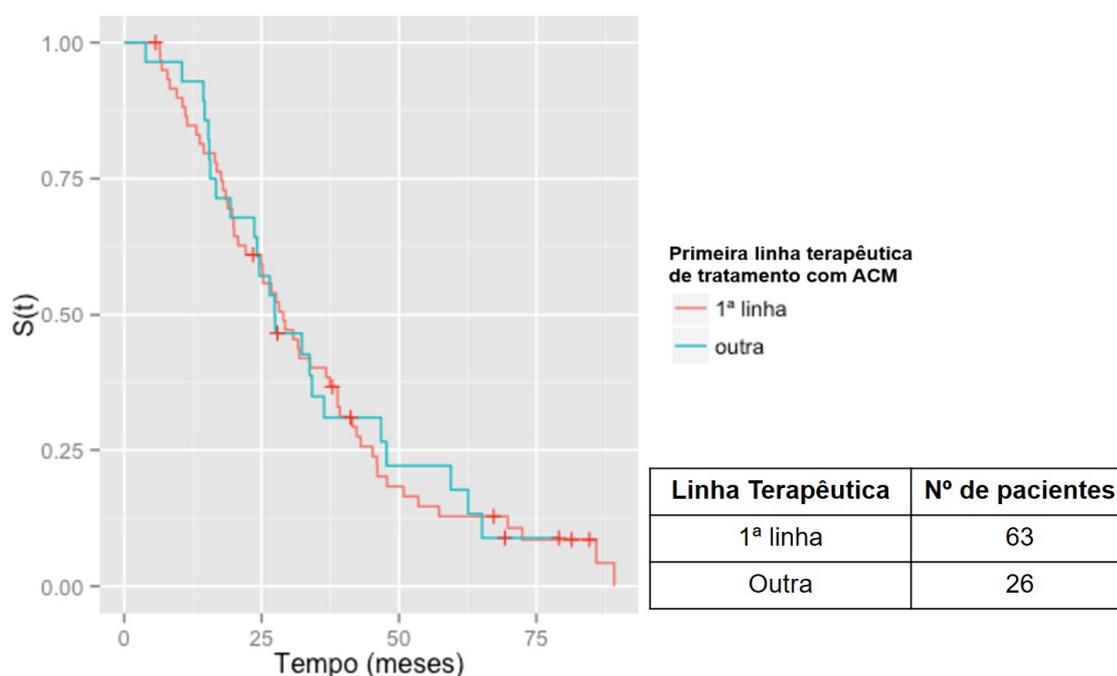


**Figura 26 - Sobrevivência global estimada na amostra de pacientes tratados com AcMs, por grupo de tratamento.** Estimativa de Kaplan-Meier para o período de tempo decorrido entre as datas de diagnóstico do estadio IV e de óbito, por grupo de tratamento.

Pode notar-se que, no período até aos 2 anos, a sobrevivência é ligeiramente superior no grupo dos indivíduos tratados com cetuximab e bevacizumab. Observa-se ainda, na **Figura 26**, que a partir dos 2 anos, a OS dos pacientes tratados com bevacizumab parece ser inferior às restantes. Foi efetuado o teste de Peto para determinar se existem diferenças na OS entre os grupos terapêuticos. As diferenças observadas não se revelaram estatisticamente significativas (Teste de Peto: qui-quadrado ( $\chi^2$ ) = 1,7; 2 graus de liberdade (gl); valor p=0,429).

#### 4.3.3. Efeito da linha terapêutica de início de tratamento com AcMs na OS

O tempo mediano de OS estimado em pacientes que iniciam AcMs em 1ª linha terapêutica é igual a 28,9 meses (IC 95%: 22,1 – 38,8 meses). Para os pacientes que iniciam noutra linha terapêutica estima-se um tempo mediano de OS igual a 27,4 meses (IC 95%: 23,7 – 47,7 meses). As curvas de OS estimadas (**Figura 27**) apresentam um comportamento muito semelhante não se tendo registado diferenças estatisticamente significativas (Teste de Peto:  $\chi^2$ =0,03; 1 gl; valor p=0,903).



**Figura 27 - Sobrevivência global estimada de acordo com a linha terapêutica de início do tratamento com AcMs.** Estimativas de Kaplan-Meier para o tempo decorrido entre as datas de diagnóstico do estadiu IV e de óbito, com início do tratamento com AcM em 1ª linha terapêutica ou noutra.

Foi também avaliado o efeito da linha onde se iniciou a terapêutica (em 1ª linha ou outra) com AcMs ajustando para o grupo de tratamento, através do modelo de Cox, tendo-se verificado que também aqui não existem diferenças estatisticamente significativas (valor  $p=0,867$ ), a nível de OS.

#### 4.3.4. Efeito dos esquemas terapêuticos com AcMs na OS

Para analisar o efeito do esquema terapêutico na OS, truncou-se a amostra, tendo sido apenas considerada a 1ª linha terapêutica e não foi incluído o esquema terapêutico bevacizumab em associação com outros ou bevacizumab em monoterapia, por existir apenas um único evento para esta terapêutica.

O tempo mediano de OS estimado é de 33,8 meses (IC 95% 25,3 – 47,8 meses) para indivíduos tratados com cetuximab em associação com FOLFIRI e de 17,6 meses para a associação cetuximab/FOLFOX, sendo o seu valor mínimo igual a 6,5 meses, com uma confiança de 95%.

Para indivíduos tratados com cetuximab em associação com outros ou com cetuximab em monoterapia, estima-se um tempo mediano de 53,5 meses, com um valor mínimo igual a 10,6 meses e uma confiança de 95%.

No caso dos esquemas terapêuticos com bevacizumab em 1ª linha terapêutica, o tempo mediano de OS estimado é de 27,2 meses (IC 95%: 18,8-41,0 meses) para a

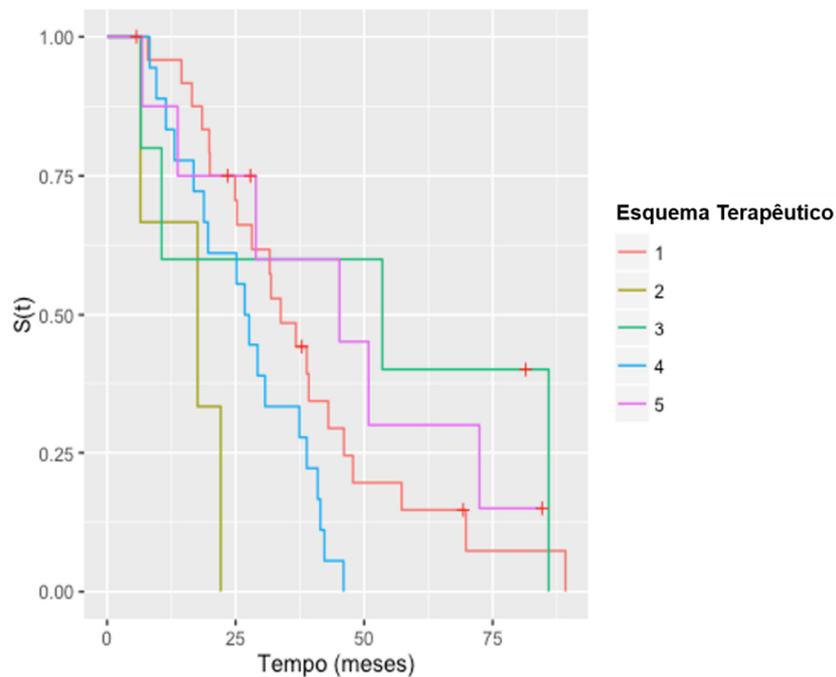
associação de bevacizumab com FOLFIRI e de 45,2 meses para a associação com FOLFOX, sendo o seu valor mínimo igual a 28,9 meses, com uma confiança de 95%.

Os resultados encontram-se resumidos na **Tabela 14**.

**Tabela 14 - Tempos medianos de OS estimados para os diferentes esquemas terapêuticos, tendo como referência a 1ª linha terapêutica. Legenda: \*\*Não foi possível estimar o limite do IC a 95%.**

Esquema terapêutico	Nº de pacientes	OS (meses)	IC 95% (meses)
Cetuximab/FOLFIRI	25	33,8	25,3 – 47,8
Cetuximab/FOLFOX	4	17,6	6,5 – **
Cetuximab/outro ou cetuximab em monoterapia	5	53,5	10,6 – **
Bevacizumab/FOLFIRI	20	27,2	18,8 – 41,0
Bevacizumab/FOLFOLX	8	45,2	28,9 – **

Na **Figura 28** podem observar-se comportamentos muito semelhantes das curvas de OS associadas aos esquemas terapêuticos cetuximab/FOLFIRI (curva 1) e bevacizumab/FOLFIRI (curva 4), indiciando um maior risco nos pacientes que são tratados com bevacizumab/FOLFIRI.



**Figura 28 - Efeito dos esquemas terapêuticos na OS, em 1ª linha terapêutica, na amostra de pacientes tratados com AcMs.** Estimativas de Kaplan-Meier do tempo decorrido entre as datas de estadiamento IV e de óbito, por esquema terapêutico aplicado em 1ª linha terapêutica. **Legenda:** 1 – cetuximab/FOLFIRI; 2- cetuximab/FOLFOX; 3- cetuximab em associação com outros ou cetuximab em monoterapia; 4- bevacizumab/FOLFIRI e 5- bevacizumab/FOLFOX.

Em 1ª linha terapêutica, os outros três esquemas terapêuticos têm comportamentos um pouco distintos dos anteriores, mas têm associados poucos eventos (óbitos): 6 ao esquema bevacizumab/FOLFOX (curva 5), 4 à combinação cetuximab/FOLFOX (curva 2) e 3 ao esquema cetuximab em associação com outros ou cetuximab em monoterapia (curva 3). Até aos 2 anos parece haver um maior risco de falecer nos pacientes com esquema cetuximab/FOLFOX (curva 2) e a partir de cerca dos 3 anos os dois esquemas que parecem ter associado um menor risco são o cetuximab em associação com outros ou cetuximab em monoterapia e o bevacizumab/FOLFOX.

Estatisticamente foram registadas diferenças significativas entre os tempos de OS associados aos 5 esquemas terapêuticos (Teste de Peto:  $\chi^2=10,6$ ; 4 gl; valor  $p=0,0315$ ). Comparando os esquemas terapêuticos 2 a 2 e aplicando a correção de *Bonferroni* ao valor  $p$ , conclui-se que apenas diferem os esquemas cetuximab/FOLFIRI (curva 1) e cetuximab/FOLFOX (curva 2) (valor  $p<0,003$ ), sendo que ao esquema cetuximab/FOLFOX está associado um maior risco de falecimento.

### 4.3.5. Tempo de sobrevivência livre de progressão de doença

O tempo mediano estimado de PFS em 1ª linha terapêutica é igual a 8,9 meses (IC 95%: 5,8 – 15,9 meses). Estimou-se um valor de PFS de 4,0 meses (IC 95%: 3,4 meses – 6,9 meses) na 2ª linha terapêutica. Para as restantes estimou-se um tempo mediano de PFS de 3,9 meses para a 3ª linha terapêutica (IC 95%: 3,2 meses – 6,1 meses), 5,0 meses na 4ª linha terapêutica (sendo o seu valor mínimo igual a 3,5 meses, para uma confiança de 95%), 7,4 meses na 5ª linha terapêutica (com um valor mínimo de 3,4 meses, para uma confiança de 95%) e 7,3 meses na 6ª linha terapêutica (não foi possível estimar o IC a 95%).

Aquando do ajustamento dos modelos de Cox com fragilidade, observou-se, ainda, que a linha terapêutica é uma variável altamente significativa para a PFS (valor  $p<0,001$ ). O risco de progressão da doença noutra linha terapêutica que não a 1ª é 2,6 vezes maior (IC 95%: 1,7 – 4,2 vezes).

#### 4.3.5.1. Efeito dos esquemas terapêuticos com AcMs na PFS da 1ª e 2ª linhas terapêuticas

Para analisar o efeito do esquema terapêutico na PFS, truncou-se a amostra para a 1ª e 2ª linha terapêuticas, efetuando-se análises individuais para cada uma das linhas. Para a análise da 1ª linha terapêutica não foi considerado o esquema bevacizumab em associação com outros ou bevacizumab em monoterapia, tendo sido considerados todos os esquemas para a 2ª linha terapêutica.

Em 1ª linha terapêutica (**Tabela 15**), o tempo mediano de PFS estimado em pacientes com o esquema terapêutico cetuximab/FOLFIRI é igual a 14,3 meses (IC 95% 7,2 – 21,2 meses); 7,4 meses para o esquema cetuximab/FOLFOX, sendo o seu valor mínimo igual a 5,8 meses, com uma confiança de 95% e 16,0 meses para o esquema

terapêutico cetuximab em associação com outros ou cetuximab em monoterapia, sendo que com uma confiança de 95% se estima que o tempo mediano PFS mínimo destes pacientes seja de 2,2 meses.

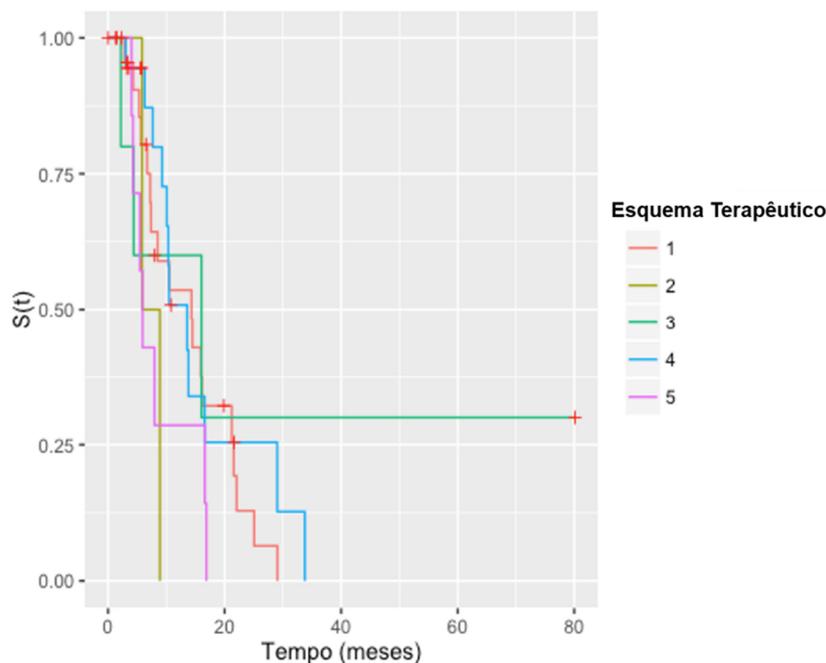
De notar que as estimativas dos esquemas terapêuticos cetuximab/FOLFOX e cetuximab em associação com outros ou cetuximab em monoterapia foram obtidas apenas com base em 4 e 5 pacientes, respetivamente.

Relativamente ao AcM bevacizumab, nos pacientes tratados com o esquema terapêutico bevacizumab/FOLFIRI, estima-se um tempo mediano de PFS igual a 13,6 meses (IC 95% 7,7 – 29,0 meses), enquanto para o esquema bevacizumab/FOLFOX, o tempo mediano estimado é de 5,9 meses, (IC 95% 4,3 – 16,0 meses).

**Tabela 15 - Tempo mediano de PFS estimado para a 1ª linha terapêutica, por esquema terapêutico. Legenda: \*\*Não foi possível estimar o limite do IC a 95%.**

Esquema terapêutico	Nº de pacientes	PFS (meses)	IC 95% (meses)
Cetuximab/FOLFIRI	25	14,3	7,2 – 21,2
Cetuximab/FOLFOX	4	7,4	5,8 – **
Cetuximab/outro ou cetuximab em monoterapia	5	16,0	2,2 – **
Bevacizumab/FOLFIRI	20	13,6	7,7 – 29,0
Bevacizumab/FOLFOX	8	5,9	4,3 – 16,6

Na **Figura 29** podem observar-se comportamentos muito semelhantes das curvas em 1ª linha terapêutica, embora estas sugiram que aos esquemas cetuximab/FOLFOX (curva 2) e bevacizumab/FOLFOX (curva 5) esteja associado um maior risco de progressão. Estatisticamente, não foram observadas diferenças significativas entre os tempos medianos de PFS associados aos esquemas terapêuticos, em 1ª linha terapêutica (Teste de Peto:  $\chi^2=4,9$ ; 3 gl; valor  $p=0,298$ ).



**Figura 29 - Efeito dos esquemas terapêuticos na PFS, em 1ª linha terapêutica, na amostra de pacientes tratados com AcMs.** Estimativas de Kaplan-Meier para a PFS, por esquema terapêutico, aplicado na 1ª linha terapêutica. **Legenda:** 1- cetuximab/FOLFIRI; 2- cetuximab/FOLFOX; 3- cetuximab em associação com outro ou cetuximab em monoterapia; 4 – bevacizumab/FOLFIRI; 5 – bevacizumab/FOLFOX.

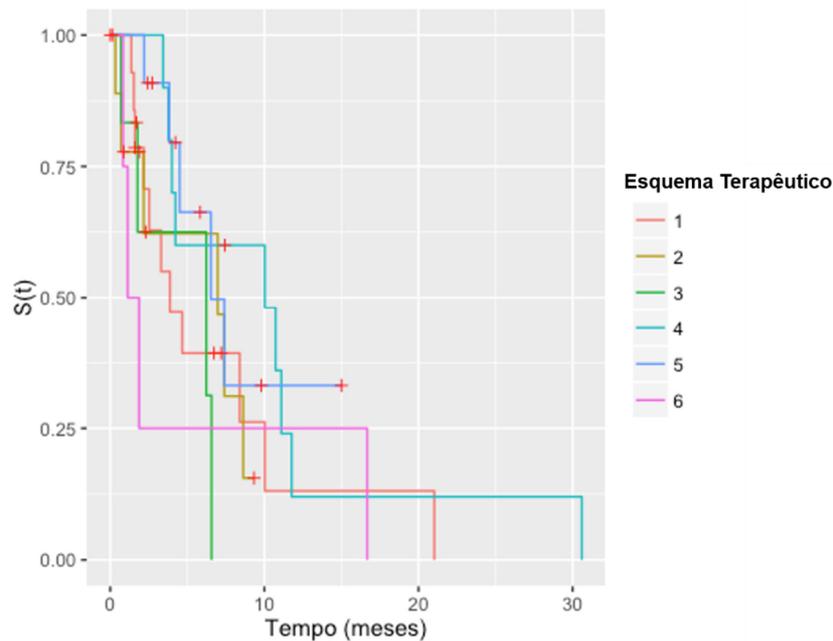
Em 2ª linha terapêutica, o tempo mediano de PFS estimado para o esquema terapêutico cetuximab/FOLFIRI é igual a 3,9 meses (IC 95%: 1,6 meses – 10,0 meses). Para o esquema com cetuximab/FOLFOX estima-se um tempo mediano igual a 7,0 meses (IC 95%: 0,3 meses – 8,6 meses). Para o esquema cetuximab em associação com outro ou cetuximab em monoterapia o tempo mediano estimado é igual a 6,2 meses, sendo que com uma confiança de 95% se estima que o tempo mediano mínimo destes pacientes seja de 0,7 meses.

Na terapêutica com bevacizumab, para o esquema terapêutico bevacizumab/FOLFIRI, estima-se um tempo mediano igual a 10,0 meses (IC 95%: 3,4 meses – 11,8 meses) e um tempo mediano igual a 6,5 meses, com um valor mínimo de 3,8 meses a uma confiança de 95% para o esquema bevacizumab/FOLFOX. Finalmente, para os pacientes tratados com bevacizumab em associação com outro ou bevacizumab em monoterapia, estima-se um tempo mediano igual a 1,5 meses, sendo o seu valor mínimo igual a 0,8 meses, com uma confiança de 95%. De notar que a estimativas deste último esquema foram obtidas apenas com base em 4 indivíduos. Os resultados encontram-se resumidos na **Tabela 16**.

**Tabela 16 - Tempo mediano de PFS estimado para a 2ª linha terapêutica, por esquema terapêutico. Legenda: \*\*Não foi possível estimar o limite do IC a 95%.**

Esquema terapêutico	Nº de pacientes	PFS (meses)	IC 95% (meses)
Cetuximab/FOLFIRI	15	3,9	1,6 – 10,0
Cetuximab/FOLFOX	9	7,0	0,3 – 8,6
Cetuximab/outro ou cetuximab em monoterapia	7	6,2	0,7 – **
Bevacizumab/FOLFIRI	10	10,0	3,4 – 11,8
Bevacizumab/FOLFOX	12	6,5	3,8 – **
Bevacizumab/outro ou bevacizumab em monoterapia	4	1,5	0,8 – **

Em 2ª linha terapêutica, na **Figura 30** podem observar-se comportamentos muito semelhantes das curvas associadas aos esquemas terapêuticos, embora indiquem que aos esquemas bevacizumab/FOLFIRI (curva 4) e bevacizumab/FOLFOX (curva 5) esteja associado um menor risco de progressão no primeiro ano. Não foram observadas diferenças significativas entre os tempos de PFS estimados para os esquemas terapêuticos, em 2ª linha terapêutica (Teste de Peto:  $\chi^2=8,0$ ; 5 gl; valor  $p=0,156$ ).



**Figura 30 - Efeito dos esquemas terapêuticos na PFS em 2ª linha terapêutica, na amostra de pacientes tratados com AcMs.** Estimativas de Kaplan-Meier para o tempo mediano de PFS, por esquema terapêutico aplicado na 2ª linha terapêutica. **Legenda:** **1** - cetuximab/FOLFIRI; **2** - cetuximab/FOLFOX; **3** – cetuximab em associação com outro ou cetuximab em monoterapia; **4** – bevacizumab/FOLFIRI; **5** - bevacizumab/FOLFOX; **6** - bevacizumab/outro ou bevacizumab em monoterapia.

#### 4.4. Rash cutâneo na terapêutica com cetuximab

Dos 57 pacientes dos grupos de tratamento cetuximab e cetuximab e bevacizumab, o efeito adverso *rash* cutâneo foi registado no processo clínico de 27 indivíduos (47,4%). Como este efeito adverso pode aparecer em mais do que uma linha terapêutica, em 2 pacientes surgiu em duas linhas terapêuticas distintas e, por isso, foram registados 29 eventos. Destes, o *rash* cutâneo de grau 3 ocorreu mais vezes (44,8%) e o de grau 2 foi o segundo mais frequente (37,9%) (**Figura 31**).

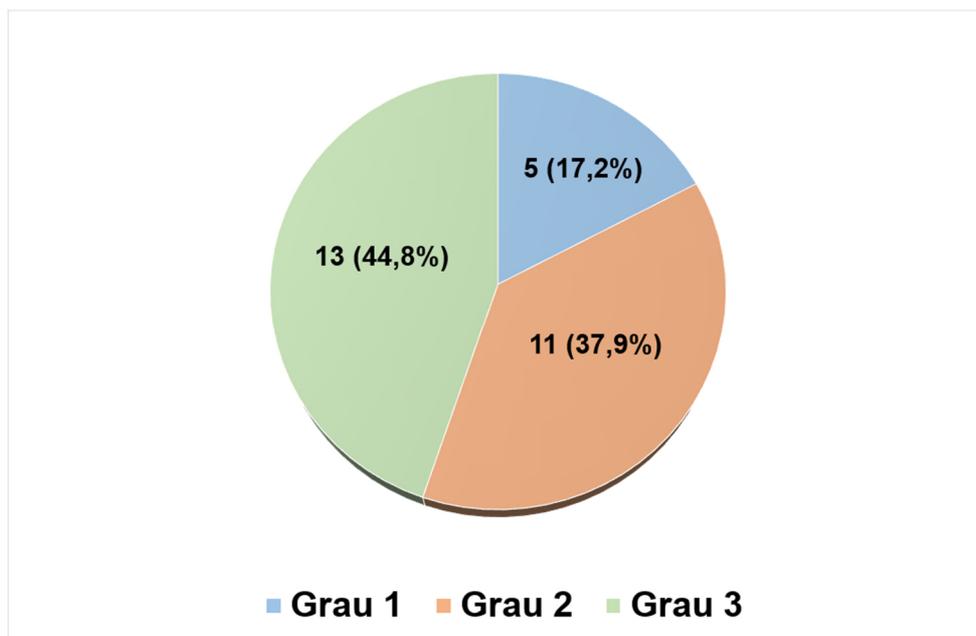


Figura 31 - Número de eventos de *rash* ocorridos, por categoria de grau, nos pacientes tratados com cetuximab.

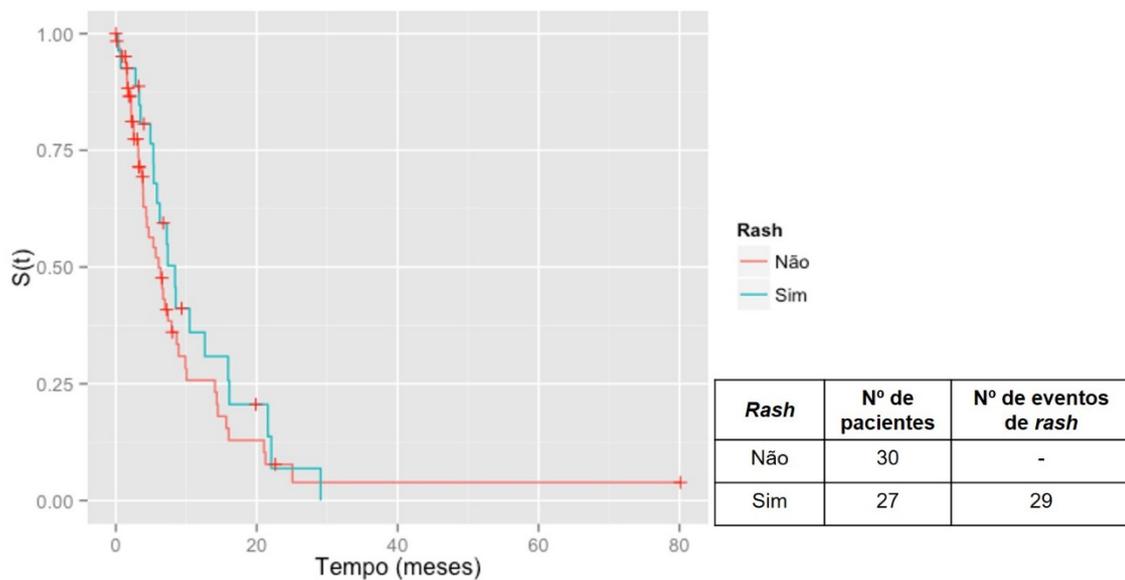
##### 4.4.1.1. Efeito do aparecimento de *rash* cutâneo na PFS

Para este objetivo, foram considerados os tempos de PFS associados a cada linha terapêutica onde foi efetuado o tratamento com o AcM cetuximab e ajustaram-se modelos de Cox com componente de fragilidade, dada pela identificação do paciente (uma vez que o *rash* pode aparecer em mais do que uma linha terapêutica).

Consideraram-se duas abordagens. Na **abordagem 1**, os indivíduos foram divididos em 2 grupos: com aparecimento de *rash* e sem aparecimento de *rash*; e na **abordagem 2** os indivíduos foram divididos nos grupos: sem aparecimento de *rash* ou com *rash* de grau 1 e com grau de *rash*  $\geq 2$ . Nos modelos de fragilidade utilizados para a análise a componente de fragilidade não se mostrou significativa (valor  $p > 0,40$ ).

O efeito do *rash* no PFS não se mostrou estatisticamente significativo em nenhuma das abordagens (valor  $p = 0,27$  e valor  $p = 0,67$ , nas **abordagens 1 e 2**, respetivamente).

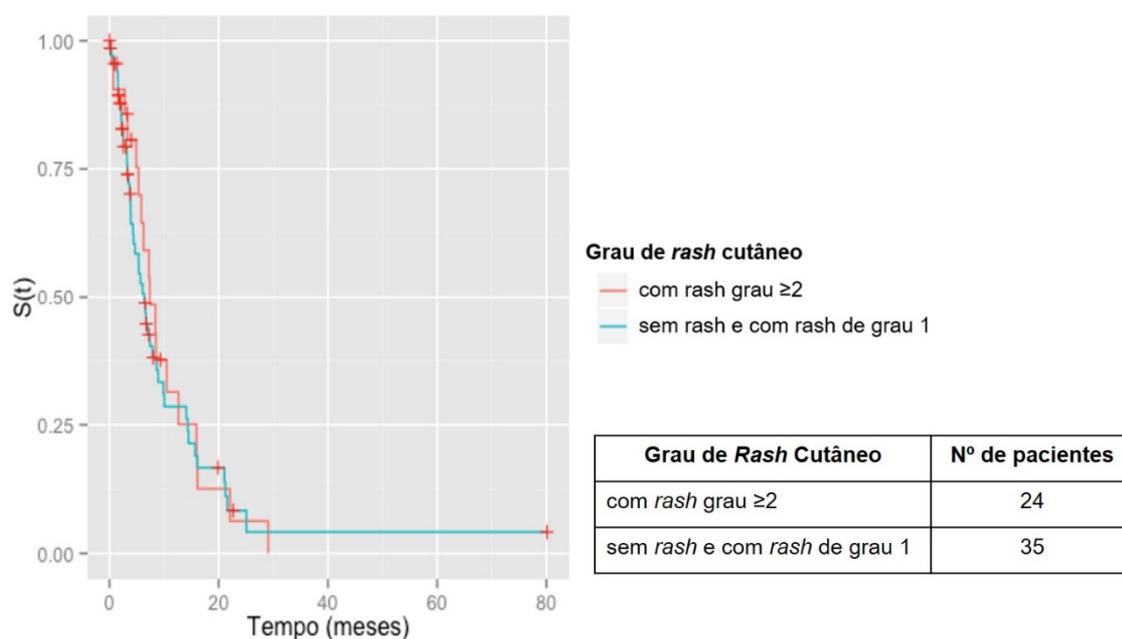
Na **Figura 32** podem observar-se comportamentos muito semelhantes das curvas de PFS, verificando-se que a curva associada às linhas terapêuticas em que os pacientes não desenvolveram *rash* está sempre abaixo até aos 20 meses (o que parece estar relacionado com um maior risco de progressão da doença, embora, esta diferença não se tenha revelado significativa). Destaca-se também uma observação censurada com um tempo muito elevado para um paciente que não desenvolveu *rash* numa linha terapêutica.



**Figura 32 - O efeito do aparecimento de *rash* na PFS, nos pacientes tratados com cetuximab.** Estimativas de Kaplan-Meier relativamente à PFS, em função de desenvolver ou não desenvolver *rash*.

O tempo mediano PFS estimado para pacientes que não desenvolveram Rash é igual a 6,1 meses (IC a 95%: 4,3 - 8,9 meses). Para os pacientes que desenvolveram Rash estima-se um tempo mediano igual a 8,4 meses (IC a 95% 5,8 - 16,1 meses).

Na **Figura 33** estão representadas as estimativas de Estimativas de Kaplan-Meier relativamente à PFS, em função do grau de *rash*.



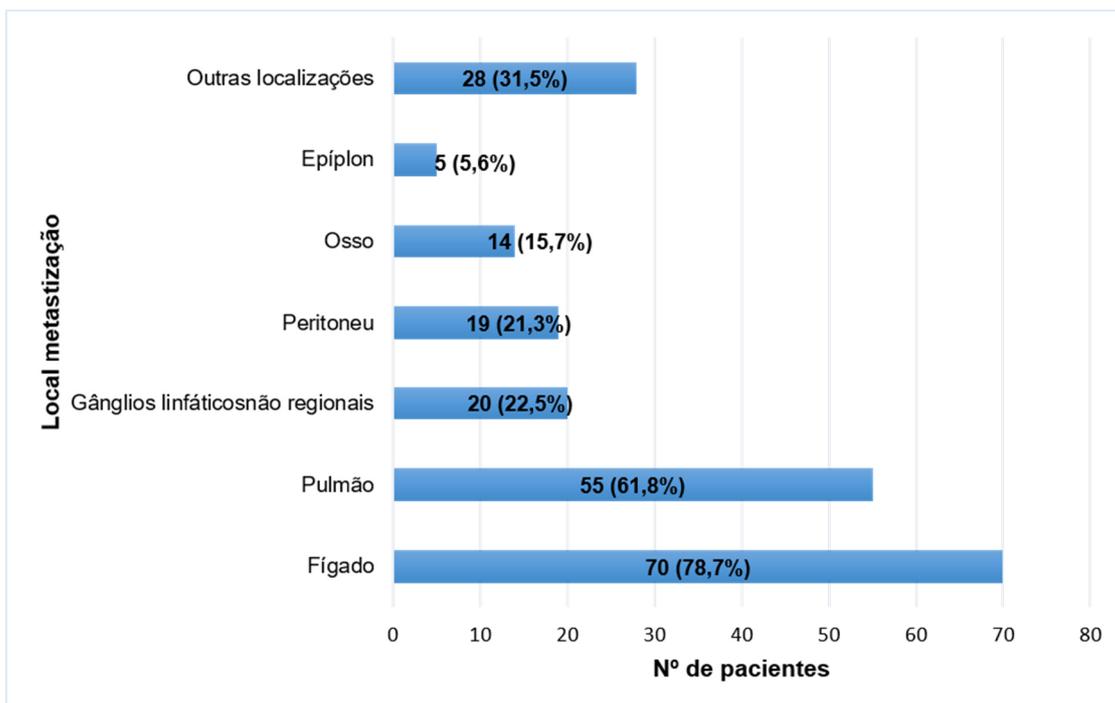
**Figura 33 - O efeito do grau de *rash* no tempo de PFS, nos pacientes tratados com cetuximab.** Estimativas de Kaplan-Meier relativamente à PFS, em função do grau de *rash* (sem aparecimento de *rash* e com *rash* de grau 1 vs *rash* de grau  $\geq 2$ ).

Tendo em consideração o grau de *rash*, podem observar-se também comportamentos muito semelhantes das curvas de sobrevivência. Destaca-se novamente a observação censurada com um tempo muito elevado para um paciente que não desenvolveu *rash* numa linha terapêutica (**Figura 33**). O tempo mediano de PFS estimado para pacientes que não desenvolveram *rash* ou que desenvolveram *rash* de grau 1 é igual a 6,4 meses (IC 95%: 4,4 – 8,9 meses). Para os pacientes que desenvolveram *rash* de grau 2 e 3 estima-se um tempo mediano igual a 7,4 meses (IC 95%: 5,8 - 16,1 meses).

Aquando do ajustamento dos modelos de Cox com fragilidade avaliou-se também o efeito do *rash* corrigindo para a variável linha terapêutica, sendo que a influência desta variável também não se mostrou estatisticamente significativa (valor  $p=0,79$ ).

#### 4.5. Ressecção de metástases

Os locais de metastização mais frequentes na amostra de pacientes tratados com AcMs (**Figura 34**) foram o fígado e o pulmão (70 e 55 pacientes, respetivamente). Com menor frequência registou-se metastização à distância em gânglios linfáticos não regionais, no peritoneu e no osso. Verificou-se ainda metastização em locais diversos que incluem órgãos como ovários, cérebro, bexiga e supra-renal.



**Figura 34 - Locais de metastização à distância na amostra de pacientes tratados com AcM.**

Dos pacientes tratados com AcMs, 28 (31,5%) efetuaram resseção cirúrgica de metástases. No entanto, é de salientar, que apenas 19 pacientes (21,3%) efetuaram a resseção de metástases na sequência do tratamento com AcMs. Destes, 9 (47,4%) indivíduos pertenciam ao grupo de tratamento cetuximab, 4 (21,1%) ao grupo bevacizumab e 6 (31,6%) ao grupo cetuximab e bevacizumab. Em 18 pacientes foram cirurgicamente removidas metástases hepáticas e em 2 pacientes foi efetuada resseção de metástases pulmonares.

#### 4.6. Efeitos adversos

Tromboembolismos venosos (16,0 %), náuseas (12%) e vômitos (8,0%) foram as reações mais frequentemente descritas para os doentes tratados com bevacizumab, mas é de notar que, de todos os indivíduos tratados com este AcM (50 pacientes), apenas 30 (60%) pacientes apresentavam registo de efeitos adversos no processo clínico (**Tabela 17**).

**Tabela 17 - Efeitos adversos registados durante o tratamento com o AcM bevacizumab.**

<b>Efeitos adversos - Bevacizumab n=50 pacientes</b>	<b>Nº de pacientes</b>	<b>% de pacientes</b>
<b>Sem EA registados</b>	20	40,0
<b>Tromboembolismo venoso</b>	8	16,0
<b>Náuseas</b>	6	12,0
<b>Vômitos</b>	4	8,0
<b>Neutropénia</b>	3	6,0
<b>Astenia</b>	2	4,0
<b>Epistáxis</b>	2	4,0
<b>Hemorragia do reto</b>	2	4,0
<b>Bicitopénia</b>	1	2,0
<b>Diarreia</b>	1	2,0
<b>Disfonia</b>	1	2,0
<b>Dor abdominal</b>	1	2,0
<b>Dor pélvica</b>	1	2,0
<b>Dorsalgia</b>	1	2,0
<b>Fístula perianal</b>	1	2,0
<b>Hipertensão</b>	1	2,0
<b>Infeção do trato urinário</b>	1	2,0
<b>Mialgia Intensa</b>	1	2,0
<b>Obstipação</b>	1	2,0
<b>Obstrução intestinal</b>	1	2,0
<b>Perfuração do septo nasal</b>	1	2,0
<b>Proctalgia</b>	1	2,0
<b>Prolapso do reto</b>	1	2,0
<b>Septicémia</b>	1	2,0
<b>Tromboembolismo arterial</b>	1	2,0

Relativamente aos indivíduos tratados com cetuximab (57 pacientes), no processo clínico de 18 deles (31,6%) não havia qualquer referência a efeitos adversos relacionados com a terapêutica com este AcM.

Dos registos existentes, o efeito adverso mais registado foi o *rash* cutâneo, que ocorreu em 47,4% dos pacientes. A paroníquia foi o segundo mais registado (14%) e os restantes ocorreram numa frequência bastante baixa (entre 1 a 3 pacientes, dependendo do efeito adverso) (**Tabela 18**). Em três doentes, ocorreu reação alérgica, um dos quais na primeira administração, o que levou à suspensão imediata e definitiva da administração do fármaco.

**Tabela 18 - Efeitos adversos registados durante o tratamento com o AcM cetuximab.**

<b>Efeitos adversos cetuximab n=57 pacientes</b>	<b>Nº de pacientes</b>	<b>% de pacientes</b>
<b>Sem EA registados</b>	18	31,6
<b>Rash Cutâneo</b>	27	47,4
<b>Paroníquia</b>	8	14,0
<b>Diarreia</b>	3	5,3
<b>Mucosite</b>	3	5,3
<b>Reação Alérgica</b>	3	5,3
<b>Vómitos</b>	3	5,3
<b>Anorexia</b>	2	3,5
<b>Conjuntivite</b>	2	3,5
<b>Edema generalizado</b>	2	3,5
<b>Edema localizado</b>	2	3,5
<b>Tromboembolismo venoso</b>	2	3,5
<b>Astenia</b>	1	1,8
<b>Blefarite</b>	1	1,8
<b>Hipertricose</b>	1	1,8
<b>Infeção da pele</b>	1	1,8
<b>Infeções múltiplas</b>	1	1,8
<b>Neutropénia</b>	1	1,8
<b>Tromboembolismo arterial</b>	1	1,8



## 5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos verificaram-se progressos significativos no que diz respeito ao tratamento do CCRm, com a introdução de agentes biológicos como os AcMs que aumentaram a sobrevivência dos pacientes. Os progressos não se limitaram ao desenvolvimento de novas terapêuticas verificando-se, ainda, uma mudança de paradigma na sua aplicação em consequência da descoberta de biomarcadores preditivos de tratamento. A introdução destes novos conhecimentos permite que o tratamento deixe de ser efetuado com base na informação geral da patologia e da mesma forma para todos os indivíduos com a mesma patologia e, passe a ser orientado por características específicas, no que atualmente se denomina por Medicina Personalizada. O objetivo da Medicina Personalizada é identificar o tratamento mais adequado a cada paciente, com base em biomarcadores que permitem estratificar os subgrupos de pacientes que mais poderão beneficiar de determinada terapêutica (FDA, 2013).

Neste estudo, à data do diagnóstico, quase todos os doentes apresentavam a doença em estadio III (40,9%) ou estadio IV (45,5%) o que evidencia a importância de aplicar métodos de rastreio que permitam a deteção mais precoce da patologia. Há, no entanto, que ter em consideração que esta amostra incluiu indivíduos com CCR com a intenção de efetuar tratamento com AcMs e não representa a totalidade dos CCRs diagnosticados na instituição em estudo para o período de tempo definido. Neste sentido, as amostras a estudar foram, sobretudo, os tumores com estadio avançado da doença que apresentavam grande probabilidade de metastização à distância ou em tumores já metastizados. Como anteriormente referido, no distrito de Évora, cerca de 25% dos doentes apresentam doença metastática à data do diagnóstico.

A patologia foi mais incidente no género masculino, com uma idade mediana superior a 50 anos, sendo o adenocarcinoma moderadamente diferenciado o mais frequente, com a grande maioria dos tumores localizada no cólon, o que vai de encontro ao descrito na literatura. A taxa de sobrevivência a 5 anos desta amostra é de 13,7%, o que reflete a elevada mortalidade descrita para pacientes com tumores em estadio IV.

### 5.1. Análise do *status* mutacional dos genes KRAS e NRAS

Foi efetuada a pesquisa mutacional numa amostra com um tamanho considerável (331 tumores), utilizando o método de sequenciação de Sanger. Embora seja considerada a técnica *gold-standard* para a pesquisa de mutações, verificou-se que é bastante morosa (cerca de 3 a 5 dias úteis para sequenciação do exão 2 do gene KRAS e 5 a 10 dias úteis para a análise dos restantes exões).

As amostras fixadas em formol tamponado a 10% e impregnadas em parafina são um importante recurso para o estudo de biomarcadores clínicos e, para além de serem as amostras rotineiramente utilizadas para o diagnóstico, são frequentemente o único material disponível para estudos retrospectivos. A preservação dos tecidos pelo formol ocorre através do estabelecimento de ligações cruzadas entre o formaldeído e as

proteínas e a sua ação tem um efeito desnaturante e oxidante nos ácidos nucleicos (Srinivasan, Sedmak, & Jewell, 2002). Dependendo da concentração do fixador utilizado, do tempo decorrido entre a remoção cirúrgica do tecido em estudo e a fixação e ainda do tempo de fixação, os ácidos nucleicos isolados destas amostras podem sofrer degradação encontrando-se, normalmente, segmentados em fragmentos com tamanho inferior a 300 pares de bases (Bereczki, Kis, Bagdi, & Krenacs, 2007; Dietrich et al., 2013). Dependendo do nível de degradação do ADN, estas amostras podem apresentar vários desafios na sua análise como inibições de PCR e dificuldade na amplificação de fragmentos de maior tamanho, o que na análise RAS ocorre com alguma frequência ao nível do exão 4 dos genes KRAS e NRAS (380 e 286 pares de bases, respetivamente).

Neste estudo, foi possível determinar o *status* mutacional de todas as amostras embora, para além do exão 2 do gene KRAS, a análise dos exões 3 e 4 deste gene e dos exões 2, 3 e 4 do gene NRAS tenha sido efetuada num pequeno número de amostras. O sucesso destes resultados deve-se ao rigoroso controlo da fase pré-analítica, nomeadamente do tempo de fixação e do processamento histológico.

A presença de mutações no exão 2 do gene KRAS foi detetada em 42% dos casos, com a grande maioria (82,7%) a ocorrer no codão 12. A mutação mais frequentemente detetada (36,7%) foi a substituição de uma glicina por um aspartato (p.Gly12Asp), o que vai de encontro ao descrito noutros estudos com séries de CCR (Douillard et al., 2013; Van Cutsem et al., 2011).

Devido às diferentes *guidelines* em vigor ao longo do tempo, a informação relativa ao *status* mutacional dos exões 3 e 4 do gene KRAS e dos exões 2, 3 e 4 dos genes NRAS é limitada a apenas 30 das 192 amostras não mutadas para o exão 2 do gene KRAS. Destas, 20% apresentaram mutações, localizando-se a maioria nos exões 3 e 4 do gene KRAS. Embora o número de amostras analisadas seja muito pequeno, parece confirmar-se a menor tendência para o aparecimento de mutações nestes exões. De forma semelhante à literatura existente, não foi encontrada nenhuma mutação no exão 4 do gene NRAS e salienta-se a deteção de uma mutação pouco frequente no codão 13 do exão 2 do gene NRAS: c.38G>A:p.Gly13Asp, numa amostra.

Todas as mutações ocorreram nos codões 12, 13, 61, 117 e 146, não tendo sido encontradas mutações noutros codões, o que está de acordo com o descrito (COSMIC, 2016a, 2016b; Douillard et al., 2013). A alteração da função Ras ocorre mais frequentemente devido a mutações nos codões 12 (o que se verificou neste estudo para o gene KRAS), 13 e 61 (COSMIC 2016a, 2016b; Fernández-Medarde & Santos, 2011; Prior, Lewis, & Mattos, 2012; Rajalingam, Schreck, Rapp, & Albert, 2007). Destaca-se, ainda, outro padrão na assinatura mutacional dos genes KRAS e NRAS: enquanto cerca de 80% das mutações do gene KRAS ocorrem no codão 12, sendo observadas poucas mutações no exão 61, no gene NRAS 60% das mutações localizam-se no codão 61 e apenas 35% no codão 12 (Prior et al., 2012).

Poderão ser várias as justificações para a prevalência de mutações das proteínas Kras no CCR. Uma vez que tumores diferentes apresentam padrões de mutação nas proteínas da família Ras também diferentes, parece lógico que as taxas de mutações estejam relacionadas com os níveis de expressão destas proteínas nos diferentes tecidos. Esta justificação não parece ser suficiente, uma vez que tanto as isoformas Kras, Nras e Hras são expressas em células de cólon de rato (Haigis et al., 2008; Schuhmacher et al., 2008).

Como outras possíveis justificações colocam-se: **1)** a capacidade carcinogénica das diferentes proteínas Ras em cada tipo de tecido: em modelos de tumores de cólon de rato com expressão condicional do gene APC, a mutação KRAS p.G12D promoveu a progressão tumoral, não se tendo verificado este efeito com a mesma mutação no gene NRAS (Haigis et al., 2008); **2)** o sistema de reparação de ADN de cada tecido poderá favorecer a ativação mutacional de tipos específicos do gene RAS e a sensibilidade mutagénica dos tecidos poderá estar mais relacionada com a alteração do gene do que com a ativação constitutiva das proteínas: em modelos de rato, o aparecimento de papilomas cutâneos correu a uma taxa seis vezes superior na presença da mutação HRAS p.Q61L, em comparação com as mutações KRAS G12, G13 e G61 em modelos sem expressão de Hras (Ise et al., 2000); **3)** o envolvimento predominante do gene KRAS parece ainda estar relacionado com a sua relevância fisiológica predominante: em estudos com modelos de rato com genes RAS silenciados, a presença da expressão do gene KRAS mostrou-se essencial para o desenvolvimento normal dos modelos, enquanto os genes HRAS e NRAS foram dispensáveis (Esteban et al., 2001; Johnson et al., 1997).

Alguns estudos sugeriram, ainda, que o tipo de mutação no gene KRAS poderá ter influência no prognóstico da doença. Entre eles, no estudo RASCAL (Andreyev et al., 1998), a OS foi negativamente afetada pela substituição de uma glicina por uma valina no codão 12 (p.Gly12Val), dado também suportado mais recentemente pelo estudo de Imamura et al. (2012). Outro estudo associou as mutações do exão 4 do gene KRAS com um prognóstico mais favorável (Janakiraman et al., 2011) e a mutação Gly13Asp foi associada a um maior tempo de sobrevivência quando comparada com as restantes mutações, tendo sido hipotetizado que doentes com esta mutação poderiam responder à terapêutica anti-Egfr (De Roock, et al., 2010). No entanto, contrariamente aos estudos que comprovaram o valor preditivo, os resultados destes estudos não são consensuais e o valor prognóstico destas mutações não está bem esclarecido.

## 5.2. Resposta terapêutica aos AcMs cetuximab e bevacizumab

Atualmente o tratamento do CCRm é complexo e personalizado, tendo em conta as características da patologia e dos pacientes. Embora a presença de mutações dos genes KRAS e NRAS estejam estabelecidas como marcador preditivo de resistência, excluindo a resposta ao tratamento com AcMs anti-Egfr, a escolha do fármaco a utilizar depende, não só da análise RAS, mas de outros fatores, como o *performance status* (escala que quantifica o bem-estar geral dos pacientes), a apresentação clínica do tumor (sintomas, locais de metastização), os tratamentos e linhas terapêuticas prévias, a presença de MSI e de mutações no gene B-RAF (Schmoll et al., 2012) e não se restringe à escolha entre cetuximab e bevacizumab, existindo outras terapêuticas dirigidas disponíveis.

Nesta amostra, o *status* mutacional do exão 2 do gene KRAS mostrou-se importante para a seleção da terapêutica a utilizar, e salvo raras exceções, na primeira utilização terapêutica de AcMs os tumores não mutados foram tratados com cetuximab e os mutados com bevacizumab.

Em 1ª linha terapêutica, a maioria dos pacientes foi tratado com AcMs em associação com agentes quimioterapêuticos, o que está de acordo com a noção de que os AcMs são mais eficazes quando combinados com quimioterapia (Sotelo et al., 2014, Van Cutsem et al., 2014). O agente mais utilizado para associação foi o FOLFIRI, em 28,1% da amostra em combinação com cetuximab e em 22,5% com bevacizumab.

Uma percentagem importante de doentes (29,2%) não efetuou tratamento com AcMs nesta linha terapêutica.

O benefício da associação cetuximab/FOLFIRI, ao invés da utilização de apenas FOLFIRI no tratamento de CCRm com RAS não mutado, foi robustamente comprovada no estudo CRYSTAL (Van Cutsem et al., 2009, 2011, 2015), onde a adição de cetuximab a este agente quimioterapêutico conferiu uma melhoria significativa de 8,2 meses no tempo mediano de OS, num total de 28,4 meses para o grupo de pacientes sem mutações RAS. No presente estudo, a OS estimada para a combinação cetuximab/FOLFIRI, em 1ª linha terapêutica foi de 33,8 meses um tempo superior ao do estudo CRYSTAL e mais concordante com os 33,1 meses de OS atingidos no ensaio clínico FIRE-3 (Heinemann, Weikersthal, et al., 2014). No entanto, e tendo em conta que a amostra deste estudo se baseia essencialmente no *status* mutacional do exão 2 do gene KRAS, o contraste com o estudo CRYSTAL é ainda maior. Tendo como referência unicamente o *status* do exão 2 do gene KRAS, no CRYSTAL (Van Cutsem et al., 2011) estimou-se uma OS de 23,5 meses para o grupo cetuximab/FOLFIRI, o que representa um acentuado contraste de 10,3 meses.

Em termos de PFS, o tempo estimado no presente estudo, em 1ª linha, para o esquema cetuximab/FOLFIRI foi de 14,3 meses, valor também tendencialmente superior quando comparado com os principais ensaios clínicos que homogeneamente apresentam uma PFS mediana de cerca de 10 meses (Lenz, 2014; Heinemann et al., 2014; Eric Van Cutsem et al., 2011, 2015).

Para a associação bevacizumab/FOLFIRI estimou-se uma OS mediana de 27,2 meses, um tempo 6,6 meses inferior ao esquema cetuximab/FOLFIRI, embora a diferença não se tenha revelado estatisticamente significativa. O resultado obtido no presente estudo é muito aproximado ao do ensaio clínico BICC-C, onde se estimou uma OS de 28 meses para o grupo bevacizumab/FOLFIRI (Fuchs et al., 2007, 2008). Relativamente à PFS estimou-se um tempo mediano igual a 13,6 meses, valor que se revela superior ao registado noutros estudos: 7,6 meses (Fuchs et al., 2007, 2008) e 10,6 meses (Hurwitz et al., 2004).

Tendo em conta os resultados dos ensaios clínicos efetuados e os do presente estudo e considerando que a OS mediana estimada para a terapêutica com apenas FOLFIRI é de, aproximadamente 20 meses (Douillard et al., 2000; Van Cutsem et al., 2014), a adição de AcMs à terapêutica de CCRm confere, indubitavelmente, uma melhoria deste parâmetro.

Ainda em 1ª linha terapêutica, foi utilizado o FOLFOX em combinação com cetuximab (em 4,5% da amostra) ou bevacizumab (em 9% da amostra). Para o esquema cetuximab/FOLFOX estimou-se um tempo mediano de OS de 17,6 meses, o que se situa um pouco abaixo dos valores estimados em alguns dos ensaios clínicos já referenciados, mas que vai de encontro aos do estudo COIN (onde se estimou 17 meses de OS), o maior ensaio clínico realizado com terapêutica à base de oxaliplatina e cetuximab (Maughan et al., 2011). O tempo mediano de PFS estimado foi de 7,4 meses

um valor inferior, ao estimado em ensaios como o OPUS e o COIN (8,3 e 8,6 meses, respectivamente) (Bokemeyer et al., 2009, 2011; Maughan et al., 2011).

Para a combinação bevacizumab/FOLFOX, estimou-se uma OS de 45,2 meses, um tempo anormalmente longo (quando comparado com os ensaios clínicos) e justificado pela pequena dimensão da amostra. O tempo mediano de OS em pacientes com CCRm e tratados com bevacizumab em associação com FOLFOX nos ensaios clínicos varia entre os 20,3 e 24,5 meses (Temraz, Mukherji, & Shamseddine, 2014). Relativamente à PFS, no presente estudo, o tempo mediano estimado é de 5,9 meses, um valor bastante inferior ao dos principais ensaios clínicos (10,3 a 11,4 meses) (Loupakis et al., 2015; Macedo, da Costa Lima, & Sasse, 2012; Saltz et al., 2008).

Em 1ª linha terapêutica, e relativamente aos indicadores OS e PFS, não se podem retirar conclusões relativamente ao tratamento com oxaliplatina, uma vez que o número de pacientes tratados com os esquemas cetuximab/FOLFOX (4 pacientes) e bevacizumab/FOLFOX (8 pacientes) é demasiado pequeno. O mesmo se aplica aos esquemas terapêuticos cetuximab/bevacizumab em monoterapia ou em combinação com outros agentes quimioterapêuticos.

De uma maneira geral, na literatura consultada parece observar-se uma maior consistência nos resultados dos ensaios clínicos efetuados com terapêutica à base de irinotecano e o benefício da sua utilização em associação com cetuximab ou com bevacizumab parece ser consensual para a comunidade científica (Loupakis et al., 2015; Macedo, da Costa Lima, & Sasse, 2012). Para a terapêutica com AcMs em associação com irinotecano, os resultados do presente estudo vão de encontro a alguns dos ensaios clínicos efetuados, sobretudo em termos de OS.

Os ensaios clínicos realizados com terapêutica à base de oxaliplatina são contraditórios, sobretudo na terapêutica com cetuximab (Bokemeyer et al., 2009, 2011; Maughan et al., 2011; Tveit et al., 2012). Esta poderá ser a principal razão que leva a uma maior utilização de terapêutica à base de irinotecano, sobretudo de FOLFIRI, em detrimento de regimes à base de oxaliplatina.

No presente estudo, em 1ª linha terapêutica, não foram detetadas diferenças, ao nível do tempo mediano de PFS entre os vários esquemas terapêuticos, embora as curvas de progressão sugiram que aos esquemas cetuximab/FOLFOX e bevacizumab/FOLFOX esteja associado um maior risco de progressão. Relativamente aos tempos estimados de OS, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os esquemas terapêuticos cetuximab/FOLFIRI e cetuximab/FOLFOLX, sendo que os pacientes tratados com o último apresentaram um maior risco de falecer no decurso do tempo. Embora não possam ser tomados como definitivos (devido ao pequeno número de pacientes), os resultados relativos aos esquemas com FOLFOX parecem ir de encontro à importância da necessidade do esclarecimento dos resultados dos principais ensaios clínicos sobre o papel da oxaliplatina em associação com AcMs, no tratamento do CCRm.

A terapêutica nas linhas subsequentes (2ª linha terapêutica e restantes) varia em função de variados aspetos, nomeadamente a terapêutica que foi aplicada em 1ª linha, dados clínicos e evidências clínicas sobre a utilização dos fármacos. É frequente que mesmo após progressão da doença e o início de uma nova linha terapêutica se mantenha o mesmo AcM utilizado na linha terapêutica anterior, modificando-se apenas o agente quimioterapêutico de associação (O'Neil & Venook, 2015).

Neste estudo, em 2ª linha terapêutica, os esquemas terapêuticos mais utilizados foram o cetuximab/FOLFIRI (20,3%) e o bevacizumab/FOLFOX (16,2%). O indicador avaliado foi a PFS e, nesta linha terapêutica, o esquema terapêutico não se revelou significativo para o tempo mediano de PFS.

A maioria dos ensaios clínicos baseia-se na terapêutica em 1ª linha e alguns indicam que a escolha da terapêutica utilizada nesta linha poderá influir na sobrevivência dos pacientes com CCRm. No entanto, parece não haver evidências suficientes e definitivas que permitam sustentar inequivocamente esta relação, sendo possível que os esquemas subsequentes tenham também um papel determinante na OS (O'Neil & Venook, 2015).

Num ensaio de continuação do ensaio clínico FIRE-3 (FOLFIRI/cetuximab vs FOLFIRI/bevacizumab em 1ª linha terapêutica), Modest et al. (2015) investigaram o efeito das terapêuticas subsequentes à 1ª linha terapêutica, com ênfase na 2ª linha terapêutica, com um total de 4 grupos terapêuticos: FOLFIRI/cetuximab, FOLFIRI/bevacizumab; FOLFOX/cetuximab e FOLFOX/bevacizumab. Na população RAS não mutada, parece não haver vantagem na mudança de AcM da 1ª para a 2ª linha terapêutica: OS mediana estimada de 32,9 meses (IC 95%: 22,6 a 43,2 meses) para o grupo que manteve terapêutica com o mesmo AcM e 28,1 meses (IC 95%: 25,2 a 31,0 meses) para os que trocaram o AcM da 1ª para a 2ª linha terapêuticas (valor  $p=0,176$ ). Os resultados deste ensaio clínico sugerem ainda que, na população RAS não mutada, a utilização de AcMs anti-Egfr em 1ª linha terapêutica, seguido de AcMs anti-Vegf para a segunda linha terapêutica permite obter resultados mais favoráveis do que a sequência inversa (Modest et al. 2015).

No presente estudo investigou-se o efeito da linha terapêutica de início do tratamento com AcMs (1ª vs outra) no tempo mediano de OS. A linha de início da terapêutica com AcMs não se demonstrou estatisticamente significativa ao nível do tempo mediano de OS, tendo-se estimado um tempo mediano de 28,9 meses quando o tratamento com AcMs é iniciado na 1ª linha terapêutica e de 27,4 meses quando é iniciado noutra linha terapêutica.

É de salientar que, embora os ensaios clínicos sejam utilizados como referência comparativa para os resultados deste estudo, as conclusões devem ser interpretadas com precaução. Em contraposição aos ensaios clínicos que aplicam uma metodologia homogénea, rigorosa e controlada, o presente estudo é retrospectivo, efetuado no âmbito de uma Instituição Hospitalar, ao longo de vários anos e com diversas metodologias terapêuticas e de seguimento dos pacientes (ao nível dos controlos de progressão, por exemplo). Por exemplo, em 1ª linha terapêutica verificou-se alguma falta de homogeneidade, ao nível dos agentes terapêuticos utilizados: dos 89 pacientes apenas 74 foram tratados com AcMs e em variados esquemas terapêuticos. Consequentemente a amostra elegível para cada uma das análises efetuadas é bastante pequena, sendo muito reduzida em alguns casos, o que é um factor bastante limitante para a retirada de conclusões definitivas.

A análise da progressão da doença neste estudo foi efetuada com base nos registos dos exames imagiológicos utilizados para o efeito. Esta análise é efetuada periodicamente e, num contexto de ensaio clínico, o período de tempo entre o começo da terapêutica e a análise da progressão é rigorosamente controlado e semelhante para todos os participantes do estudo. Sendo este um estudo baseado na realidade clínica,

os critérios utilizados para efetuar a análise de progressão estão relacionados com as manifestações clínicas do paciente e com a decisão do médico oncologista, o que provavelmente, contribuiu para as discrepâncias de alguns dos tempos de PFS estimados, quando comparados com os estimados pelos ensaios clínicos.

### 5.3. Cetuximab versus Bevacizumab

Embora a terapêutica de pacientes com mutações nos genes KRAS e NRAS esteja restringida ao AcM bevacizumab, ambos os AcMs estão disponíveis para o tratamento do subgrupo de pacientes com tumores não mutados. Assim sendo, qual a terapêutica mais eficaz, para a população com tumores RAS não mutados?

No presente estudo, o maior tempo mediano de OS foi estimado para o grupo de tratamento cetuximab com um tempo mediano de 31,6 meses. Este valor diminuiu cerca de um mês para o grupo cetuximab/bevacizumab (30,7 meses) e 4,8 meses para o grupo bevacizumab (26,8 meses). Verificou-se, ainda, que até aos 24 meses a sobrevivência do grupo cetuximab/bevacizumab parece ser superior e a partir desta altura, os pacientes do grupo bevacizumab parecem estar em maior risco de óbito. No entanto, estatisticamente as diferenças entre os grupos de tratamento não se revelaram significativas.

Em 1ª linha terapêutica, salienta-se, também, o comportamento das curvas de sobrevivência dos esquemas terapêuticos cetuximab/FOLFIRI e bevacizumab/FOLFIRI para as quais, embora com comportamento semelhante e sem diferenças estatisticamente significativas entre elas, se observou que a curva bevacizumab/FOLFIRI se mantém sempre abaixo, sugerindo um maior risco de óbito para os pacientes tratados com este esquema.

O facto de estas diferenças não serem significativas poderá estar relacionado com a pequena dimensão da amostra e com a análise mutacional RAS não estar completa mas, à luz de ensaios clínicos recentemente efetuados (Heinemann et al., 2014; Schwartzberg et al., 2014) merece ser tida em consideração.

Em 1ª linha terapêutica, a utilização de AcMs anti-Egfr, pode apresentar uma vantagem de 7,5 a 12 meses na OS quando comparada com os agentes anti-Vegf em pacientes com tumores sem mutações RAS (Heinemann et al., 2014; Schwartzberg et al., 2014). Após a apresentação dos resultados do FIRE-3, que demonstrou tempos medianos de OS significativamente superiores para pacientes tratados com cetuximab, sem detetar diferenças estatisticamente significativas em termos de PFS, os resultados do ensaio CALGB 80405 eram esperados com expectativa. No entanto, os resultados do CALGB 80405 falharam na confirmação da existência de vantagem em termos de OS e PFS por parte do cetuximab (Lenz., 2014). O contraste dos resultados entre estes dois ensaios clínicos criou um intenso debate, no entanto, as comparações devem ser efetuadas com precaução uma vez que os resultados podem variar devido a critérios como o desenho e a metodologia dos estudos, as características dos tumores dos pacientes selecionados (volume do tumor e prognóstico, por exemplo), as metodologias terapêuticas e os protocolos de seguimento dos diferentes centros participantes, entre outros. Tratando-se de 1ª linha terapêutica os protocolos das terapêuticas utilizadas no tratamento subsequente destes pacientes poderão, também, estar de alguma forma relacionadas com os diferentes resultados obtidos.

Não obstante as inconsistências detetadas, à luz dos conhecimentos atuais, parece consensual entre os vários autores que os pacientes com tumores sem mutações RAS beneficiam particularmente de regimes anti-Egfr em 1ª linha terapêutica (Formica & Roselli, 2015; Leichsenring, Koppelle, & Reinacher-Schick, 2015; Stein & Bokemeyer, 2014; Temraz et al., 2014). No presente estudo parece também haver uma tendência para um maior benefício na OS em pacientes cuja terapêutica incluiu o cetuximab.

Uma das justificações para o maior benefício terapêutico do cetuximab poderá estar relacionada com a taxa de ressecção cirúrgica completa de metástases hepáticas (R0), que são muito comuns em pacientes de CCRm. São uma importante causa de mortalidade e, quando não se procede ao seu tratamento, estima-se que a sobrevivência aos 5 anos seja cerca inferior a 1%. A ressecção cirúrgica é o tratamento mais eficaz para aumentar a OS de pacientes em estadio IV e oferecer a possibilidade de cura (OS > 5 anos) a estes pacientes mas nem todas as metástases são inicialmente operáveis na altura da sua deteção (Fakih, 2015; Gallinger et al., 2013). O valor do cetuximab na diminuição de metástases inicialmente inoperáveis foi suportado por alguns estudos que demonstraram que, nos pacientes tratados com combinações de agentes quimioterapêuticos em associação com cetuximab, a taxa de ressecção R0 é superior à dos pacientes tratados com apenas agentes quimioterapêuticos (Folprecht et al., 2010; Eric Van Cutsem et al., 2011; Ye et al., 2013)

Não foram efetuados ensaios clínicos neste contexto para o bevacizumab, pelo que não se pode concluir sobre o seu papel na ressecção de metástases potencialmente ressecáveis.

Uma atualização do estudo CALGB 80405 reportou uma maior taxa de ressecção R0 no grupo tratado com cetuximab em comparação com o grupo tratado com bevacizumab (62 vs 32%), mas não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas em termos de OS entre os dois grupos após a ressecção cirúrgica das metástases (Venook et al., 2014).

No presente estudo, o local de metastização mais frequente foi o fígado, o que está de acordo com o descrito para esta patologia e verificou-se uma maior taxa de ressecção de metástases hepáticas nos grupos de pacientes onde a terapêutica incluiu o AcM cetuximab.

De acordo com a literatura consultada e, dado que na maioria dos pacientes não é possível efetuar a conversão das metástases, ambos os AcMs poderão ser utilizados em pacientes que apresentam metástases hepáticas não ressecáveis, tendo em conta os seus efeitos positivos em termos de PFS e OS. No entanto, para o subgrupo de pacientes com tumores não mutados para RAS, o tratamento com cetuximab será uma escolha preferencial devido à sua capacidade de induzir maior taxa de resposta e, consequentemente, maior capacidade de diminuição do tamanho das metástases hepáticas (Fakih, 2015).

#### 5.4. **Rash cutâneo e terapêutica com cetuximab**

Neste estudo o *rash* cutâneo não demonstrou ter efeito no tempo mediano de PFS, em pacientes tratados com cetuximab.

O *rash* cutâneo é o efeito adverso observado com maior frequência na terapêutica com AcMs anti-Egfr, surge em 80 a 95% dos pacientes sendo, na maioria das vezes, pouco grave (grau 1) a moderado (grau 2) (Fakih & Vincent, 2010; Leporini, 2011; Peeters, Price, & Van Laethem, 2009). No presente estudo, verificou-se uma maior frequência de um grau de *rash* 3 (severo), seguido do grau 2 (moderado) mas existia informação relativa a este efeito adverso em menos de 50% dos processos clínicos. A maior incidência do *rash* de grau 3 poderá estar relacionada com uma maior tendência para o registo de efeitos adversos com um maior grau de severidade e que necessitam de abordagem terapêutica, tendo-se desconsiderado o registo de efeitos adversos leves.

No estudo CRYSTAL, o aumento do grau do *rash* cutâneo foi correlacionado com um maior tempo de PFS no grupo dos pacientes tratados com cetuximab e a mesma correlação foi verificada noutros estudos (Horie et al., 2015; Orditura et al., 2009; Van Cutsem et al., 2011). Embora as diferenças não sejam estatisticamente significativas, no presente estudo observou-se que, até aos 20 meses, o risco de progressão da doença em pacientes que desenvolveram *rash* é inferior quando comparado com os que não desenvolveram *rash*. A capacidade de prever a eficácia do cetuximab, utilizando o *rash* cutâneo poderia constituir um critério muito útil, no entanto, muitas vezes este efeito adverso é classificado de forma diferente entre os vários estudos e o momento ideal para a sua avaliação ainda não foi bem esclarecido.

#### 5.5. **Efeitos Adversos**

Os efeitos adversos registados nos processos clínicos são consistentes com os descritos no resumo de características de cada um dos fármacos. Embora com alguns efeitos adversos que podem ser graves, em monoterapia, os AcMs são considerados seguros e bem tolerados. Contudo, em terapêutica de associação a gestão dos efeitos adversos é mais complicada sendo, por vezes, difícil determinar qual o agente responsável pelo seu aparecimento (Wen & Li, 2016). Os mecanismos de toxicidade podem ser divididos em duas categorias: toxicidade relacionada com o efeito no alvo terapêutico e toxicidade resultante da interação cruzada com outras moléculas ou vias biológicas. A primeira não pode ser evitada e a segunda pode depender de mecanismos intrínsecos ao indivíduo, como processos de farmacodinâmica, processos imunológicos e características genéticas, entre as quais polimorfismos no citocromo P450 e transportadores ABC (Lee & Kavanaugh, 2005).

No atual estudo, a maioria dos efeitos adversos registados com o AcM cetuximab foram o *rash* cutâneo (47,4%) e a paroníquia (14%). São efeitos adversos específicos deste agente e os mais frequentemente descritos nos ensaios clínicos (EMA, 2010a; Fakih & Vincent, 2010; Giovannini et al., 2009, Melosky et al., 2009). Estão relacionados com a inibição do recetor Egfr na pele e anexos e ocorrem com a mesma frequência na terapêutica em monoterapia ou de associação, tendo um impacto importante na qualidade dos pacientes podendo mesmo afetar a sua adesão ao tratamento (Fakih &

Vincent, 2010). Os outros efeitos adversos ocorreram com baixa frequência e foram bastante diversos. É de salientar a ocorrência de reação alérgica em 3 pacientes, que determinou a suspensão imediata e definitiva da terapêutica com cetuximab. Este efeito adverso parece estar relacionado com a imunidade mediada por IgE específicas para a galactose- $\alpha$ -1-3-galactose expressa na fração de ligação ao antígeno do cetuximab (Chung et al., 2011).

Relativamente aos pacientes tratados com bevacizumab, verificou-se uma grande variedade de efeitos adversos, tendo a maioria ocorrido com baixa frequência. O tromboembolismo venoso, que pode ser fatal, foi o mais registado (16%), seguindo-se as náuseas (12%) e vómitos (8%). Nos ensaios clínicos, em CCRm efeitos adversos relacionados com o sistema vascular são os mais frequentes, devido à sua ação sobre o Vegf-A (EMA, 2010b; Saif, 2015, Kamba & McDonald, 2007). A hipertensão arterial é o efeito adverso mais frequente (EMA, 2010b) mas, neste estudo, apenas foi registado para um paciente. Também com muito baixa incidência verificaram-se alguns efeitos adversos considerados raros como hemorragia retal e perfuração do septo nasal. Mais uma vez, parece haver uma tendência de registo dos efeitos adversos que apresentaram maior grau de severidade.

A gestão dos efeitos adversos é efetuada de diversas formas, entre elas a prescrição de terapêutica para o seu controlo e a diminuição da dose ou da frequência da administração do fármaco (Saif, 2015; Wen & Li, 2016). Devido ao impacto na qualidade de vida do paciente, o conhecimento e a compreensão da toxicidade associada aos AcMs, bem como as estratégias de prevenção e de tratamento são muito importantes.

Verificou-se que o registo de efeitos adversos não é efetuado consistentemente nos processos clínicos dos pacientes da instituição em estudo, sendo mesmo ausente numa grande parte, pelo que o perfil de toxicidade destes agentes nesta amostra poderá encontrar-se enviesado.

### **5.6. Perspetivas futuras**

O CCR continua a ser uma patologia com elevada morbidade e mortalidade. Esta realidade é ainda mais dramática tendo em conta que alguns CCRs podem ser prevenidos através da modificação de estilos de vida ou de rastreios e que a deteção da doença em estadios precoces apresenta uma taxa de sobrevivência de cerca de 90%.

As principais medidas preventivas incluem educação nutricional, promoção da atividade física e combate ao alcoolismo e tabagismo (Organização Mundial de Saúde, 2016). Como já anteriormente referido, cerca de 90 a 95% dos casos de CCR desenvolvem-se a partir de lesões precursoras, nomeadamente os adenomas. Os programas de rastreio permitem diagnosticar e tratar os adenomas, constituindo uma importante medida preventiva e de deteção precoce. Desde 2011, no Alentejo encontra-se em vigor o rastreio do Cancro do Cólon e do Reto, através da pesquisa de sangue oculto nas fezes. O rastreio é dirigido a indivíduos entre os 50 e 74 anos e que estejam inscritos nos Centros de Saúde da região (Administração Regional de Saúde do Alentejo, 2016). Até 2013, em Évora, dos 16.006 pacientes elegíveis para a realização do rastreio, 50,57% participaram (Administração Regional de Saúde do Alentejo, 2014). Embora com taxas de participação dentro dos níveis considerados aceitáveis pela União

Europeia (União Europeia, 2010) parece evidente a necessidade de maior sensibilização desta população, uma vez que a deteção precoce é o método mais eficaz para diminuir os elevados números de incidência e mortalidade associados ao CCR.

A nível do tratamento, um dos desafios é a identificação de biomarcadores que permitam efetuar uma estratificação mais eficaz dos tumores e utilizar os melhores algoritmos terapêuticos.

Logo após a descoberta de influência das mutações do exão 2 do gene KRAS na resistência ao tratamento com AcMs anti-Egfr, imediatamente se percebeu que a taxa de resposta nestes doentes era muito limitada e que outros fatores estariam envolvidos na resistência à terapêutica (Sartore-Bianchi et al., 2009). Mesmo após o posterior estabelecimento das mutações RAS como biomarcador preditivo existe uma quantidade significativa de pacientes que continua a não responder à terapêutica anti-Egfr (De Roock et al., 2010).

Outras alterações oncogénicas moleculares, como mutações no gene B-RAF e no gene PIK3CA e a perda de expressão da fosfatase Pten são apontadas como indicadores de resistência à terapêutica anti-Egfr. A proteína B-raf é a principal efetora a jusante da Kras na via Ras-Raf-Mapk e o gene que a codifica encontra-se mutado em cerca de 4 a 15% dos CCRm. Na via de sinalização Pik3-Pten-Akt, as mutações no gene PTEN ocorrem em aproximadamente 10 a 18% e a perda de expressão Pten em 19 a 42% dos CCRm (De Roock et al., 2010; Di Nicolantonio et al., 2008; Frattini et al., 2007; Van Cutsem et al., 2011).

A mutação p.Val600Glu (V600E) é a mais frequentemente observada no gene B-RAF. É consensual que as mutações B-RAF são um biomarcador negativo de prognóstico, independentemente da terapêutica efetuada (Di Nicolantonio et al., 2008; Richman et al., 2009; Van Cutsem et al., 2011) e atualmente as recomendações aconselham a sua utilização neste contexto (Schmoll et al., 2012). Em alguns estudos, as mutações B-RAF parecem conferir também resistência ao tratamento com AcMs anti-Egfr (De Roock et al., 2010; Modest et al., 2012; Van Cutsem et al., 2011), enquanto noutros tal correlação não foi identificada (Douillard et al., 2013; Stintzing et al., 2014). Assim, a sua aplicação com a finalidade de biomarcador preditivo ainda está em debate.

Relativamente às mutações no gene PIK3CA, estas ocorrem maioritariamente nos exões 9 e 20 e, dos vários estudos que sugeriram o seu valor preditivo, destaca-se uma análise retrospectiva que demonstrou que as mutações do exão 20 mas não as do exão 9 estão significativamente relacionadas com uma menor taxa de resposta, PFS e OS na terapêutica com cetuximab (De Roock et al., 2010). As evidências existentes não são suficientes e aguarda-se que estudos prospetivos venham clarificar esta questão.

Até à data, os estudos existentes sobre o valor preditivo da perda de expressão da proteína Pten são discordantes e inconclusivos (Laurent-Puig et al., 2009; Loupakis et al., 2009).

Os autores de uma metanálise concluíram que apesar da perda de expressão de Pten estar significativamente correlacionada com a falta de benefício da terapêutica anti-Egfr, o valor preditivo dos genes B-RAF e PIK3CA é mais forte, mas não se pode excluir que pacientes com apenas uma destas alterações possam retirar benefício desta terapêutica (Yang et al., 2013). As mutações no gene PIK3CA podem coexistir com mutações B-RAF e KRAS mas as mutações KRAS e B-RAF são mutuamente exclusivas (Berg et al., 2010; De Roock et al., 2010; Di Nicolantonio et al., 2008; Frattini et al., 2007; Vakiani & Solit, 2011; Yang et al., 2013).

Como já referido, atualmente não existem biomarcadores que permitam prever a resposta terapêutica ao bevacizumab, pelo que, não há possibilidade de estratificar os pacientes para tratamento com este AcM de maneira a que o maior benefício terapêutico seja retirado.

Para além de novos biomarcadores para o CCR, aguardam-se novas abordagens terapêuticas. O projeto *Cancer Genome Network Atlas* (2012) efetuou a análise molecular mais detalhada e completa em CCR, tendo identificado potenciais alvos terapêuticos, como os ligandos do Egfr, as proteínas Her-2 e Her-3, Mek, Akt e mTor.

Os conhecimentos adquiridos na investigação básica estão a ser rapidamente aplicados no desenvolvimento de novas terapêuticas e prevê-se que, num futuro próximo, os avanços nas técnicas de genotipagem e de sequenciação modifiquem o paradigma “um teste - uma terapêutica dirigida” para um “modelo terapêutico genomicamente estratificado”.

### **5.7. Limitações do estudo**

A principal limitação deste estudo é tratar-se de um estudo retrospectivo efetuado com base em registos existentes nos processos clínicos informatizados da instituição onde foi efetuado. Não se pode, por isso, descartar a ocorrência de viés de informação e a existência de variáveis de confusão por falta de registo da informação sobre as variáveis em estudo.

A pequena dimensão da amostra é também uma limitação deste estudo. Algumas das tendências de comportamento observadas em algumas variáveis poderiam ser mais evidentes, ou até significativas numa amostra mais alargada.

## 6. CONCLUSÃO

A eficácia e os riscos de utilização dos AcMs cetuximab e bevacizumab em pacientes com CCRm, no contexto da prática de rotina de uma instituição hospitalar, foram avaliados e comparados com o descrito nos principais ensaios clínicos. Estudos deste tipo são importantes para que as instituições de saúde avaliem se os seus resultados vão de encontro às expectativas de eficácia e toxicidade dos agentes terapêuticos e identifiquem eventuais falhas ou pontos de melhoria.

A introdução do *status* mutacional do exão 2 do gene KRAS como marcador preditivo da terapêutica anti-Egfr representou um marco na Medicina Personalizada para o tratamento do CCRm. A determinação de mutações nos genes KRAS e NRAS é atualmente um critério essencial para a decisão terapêutica e é utilizada de forma rotineira no Hospital Espírito Santo de Évora E.P.E.. Neste estudo, as mutações no exão 2 do gene KRAS foram detetadas em 42% dos CCRs testados e a mutação mais prevalente foi a p.Gly12Asp. Dos AcMs em estudo, o cetuximab foi preferencialmente utilizado para tratamento dos pacientes com CCRm sem mutações no exão 2 do gene KRAS.

O tempo mediano de OS estimado para doentes com CCRm foi de 28,2 meses e, embora a OS estimada tenha sido superior nos grupos de tratamento cetuximab e cetuximab/bevacizumab, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos de tratamento. Ainda em termos de OS, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para os tempos medianos estimados entre os esquemas terapêuticos cetuximab/FOLFIRI e cetuximab/FOLFOX, sendo que ao último está associado um maior risco de falecimento. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas, para a OS estimada, entre os pacientes que iniciaram o AcM em 1ª linha terapêutica e os que iniciaram noutra. Para a variável PFS, tanto em 1ª como em 2ª linha terapêutica, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tempos estimados para os diferentes esquemas terapêuticos considerados. Na terapêutica com cetuximab, não se observaram diferenças estatisticamente significativas, ao nível da PFS, relacionadas com o aparecimento e com o grau do *rash* cutâneo.

Conclui-se que, em contexto clínico, os AcMs são eficazes para o tratamento de CCRm, com OS estimadas que podem ultrapassar os 24 meses, um tempo superior ao descrito para outras terapêuticas. No presente estudo, em pacientes que efetuaram terapêutica com esquemas que incluíram irinotecano, o tempo mediano de OS atingiu os 27,2 meses quando este agente foi combinado com bevacizumab e 33,8 meses na associação com cetuximab. Como anteriormente referido, estas conclusões encontram-se limitadas pela pequena dimensão da amostra, mas evidenciam a relevância deste tipo de estudo.

As novas terapêuticas, nomeadamente os AcMs cetuximab e bevacizumab, trouxeram melhorias consistentes para o tratamento dos pacientes com CCRm mas a maximização dos benefícios das terapêuticas disponíveis continua a ser uma prioridade devido às elevadas incidência, morbidade e mortalidade associadas a esta patologia.

No futuro, espera-se que o melhor conhecimento molecular das vias de ativação e de proliferação tumoral, dos mecanismos de resistência aos medicamentos e dos biomarcadores preditivos de resposta terapêutica possa levar ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, à melhor utilização dos já existentes e à seleção da melhor sequência terapêutica paciente a paciente, de modo a controlar eficazmente a patologia e a prolongar a sobrevivência dos pacientes.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Adair, T. H., & Montani, J. . (2010). Overview of Angiogenesis. *Morgan & Claypool Life Sciences*. Acedido em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53242/>
- Administração Regional de Saúde do Alentejo. (2014). Rastreio do Cancro do Colon e Recto no Centro de Saúde de Évora - Resultados 2013, 2014. Acedido em 6 de Setembro de 2016, a partir de <http://www.arsalentejo.min-saude.pt/utentes/Rastreios/rccr/Documents/Resultados%20do%20Rastreio%20do%20Cancro%20do%20Colon%20e%20Reto%202014.pdf>
- Administração Regional de Saúde do Alentejo. (2016).Rastreio do Cancro do Cólon e Recto no Alentejo. Acedido em 6 de Setembro de 2016, a partir de <http://www.arsalentejo.min-saude.pt/utentes/Rastreios/rccr/Paginas/rccr.aspx>
- Allegra, C. J., Rumble, R. B., Hamilton, S. R., Mangu, P. B., Roach, N., Hantel, A., & Schilsky, R. L. (2016). Extended RAS Gene Mutation Testing in Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion Update 2015. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34(2), 179–85. <http://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.9674>
- American Joint Committee on Cancer (2010). AJCC Cancer Staging Handbook from the AJCC Cancer Staging Manual. Colon and Rectum (pp. 173-206). Nova Iorque, EUA: Springer.
- Amersi, F., Agustin, M., & Ko, C. Y. (2005). Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and health services. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 18(3), 133–140. <http://doi.org/10.1055/s-2005-916274>
- Anderson, J.C., Pleau D.C., Rajan, T.V., Protiva, P., Swede H., ...Rosenberg D.W. (2010). Increased Frequency of Serrated Aberrant Crypt Foci Among Smokers (Figure 2). Acedido em 15 de Abril de 2016 a partir de [http://www.nature.com/ajg/journal/v105/n7/fig\\_tab/ajg2010109f2.html](http://www.nature.com/ajg/journal/v105/n7/fig_tab/ajg2010109f2.html)
- Andreyev, H. J. N., Norman, A. R., Cunningham, D., Oates, J., Dix, B. R., Lacopetta, B. J., ... Urosevic, N. (1998). Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter “RASCAL II” study. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(9), 675–684. <http://doi.org/10.1093/jnci/90.9.675>
- Aoki, K., & Taketo, M. M. (2007). Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *Journal of Cell Science*, 120(19), 3327–3335. <http://doi.org/10.1242/jcs.03485>
- Aran, V., Victorino, A. P., Thuler, L. C., & Ferreira, C. G. (2015). Colorectal Cancer: Epidemiology, Disease Mechanisms and Interventions to Reduce Onset and Mortality. *Clinical Colorectal Cancer*, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.02.008>
- Armaghany, T., Wilson, J. D., Chu, Q., & Mills, G. (2012). Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointestinal Cancer Research*. 5(1), 19–27. Acedido em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24603996>
- Arnold, C. N., Goel, A., Blum, H. E., & Boland, C. R. (2005). Molecular pathogenesis of colorectal cancer. Implications for Molecular Diagnosis. *Cancer*, 104(10), 2035–47. [http://doi.org/10.1016/S0889-8588\(05\)70453-6](http://doi.org/10.1016/S0889-8588(05)70453-6)
- Arnold, D., Hohler, T., Dittrich, C., Lordick, F., Seufferlein, T., Riemann, J., ... Schmoll, H. J. (2008). Cetuximab in combination with weekly 5-fluorouracil/folinic acid and oxaliplatin (FUFOX) in untreated patients with advanced colorectal cancer: A phase Ib/II study of the AIO GI Group. *Annals of Oncology*, 19(8), 1442–1449. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdn150>

- Arrington, A. K., Heinrich, E. L., Lee, W., Duldulao, M., Patel, S., Sanchez, J., ... Kim, J. (2012). Prognostic and predictive roles of KRAS mutation in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(10), 12153–12168. <http://doi.org/10.3390/ijms131012153>
- Asghar, U., Hawkes, E., & Cunningham, D. (2010). Predictive and prognostic biomarkers for targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 9(5), 274–81. <http://doi.org/10.3816/CCC.2010.n.040>
- Atreya, C. E., Diller, H., Corcoran, R. B., & Kopetz, S. (2015). Expanded RAS: Refining the patient population. *Journal of Clinical Oncology*, 33(7). <http://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.9325>
- Ayoola, R. R., Abdulla, H., Brady, E. K., Sherid, M., & Sifuentes, H. (2015). Chapter 2: Screening and Surveillance Colonoscopy. In “*Screening for Colorectal Cancer with Colonoscopy*”. Acedido em <http://www.intechopen.com/books/screening-for-colorectal-cancer-with-colonoscopy>
- Barber, T. D., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., & Velculescu, V. E. (2004). Somatic mutations of EGFR in colorectal cancers and glioblastomas. *The New England Journal of Medicine*, 351, 2883. <http://doi.org/10.1056/NEJM200412303512724>
- Bardhan, K., & Liu, K. (2013). Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis. *Cancers*, 5(2), 676–713. <http://doi.org/10.3390/cancers5020676>
- Bencsikova, B., Bortlicek, Z., Halamkova, J., Ostrizkova, L., Kiss, I., Melichar, B., ... Zdrzilova-Dubská, L. (2015). Efficacy of bevacizumab and chemotherapy in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer: broadening KRAS-focused clinical view. *BMC Gastroenterology*, 15(1), 37. <http://doi.org/10.1186/s12876-015-0266-6>
- Bereczki, L., Kis, G., Bagdi, E., & Krenacs, L. (2007). Optimization of PCR amplification for B- and T-cell clonality analysis on formalin-fixed and paraffin-embedded samples. *Pathology Oncology Research*. 13(3), 209–214. <http://doi.org/10.1007/BF02893501>
- Berg, M., Danielsen, S. A., Ahlquist, T., Merok, M. A., Ågesen, T. H., Vatn, M. H., ... Lothe, R. A. (2010). DNA sequence profiles of the colorectal cancer critical gene set KRAS-B-RAF-PIK3CA-PTEN-TP53 related to age at disease onset. *PloS One*, 5(11), e13978. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0013978>
- Boguski, M. S., & McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*, 366(6456), 643–654. <http://doi.org/10.1038/366643a0>
- Bokemeyer, C., Bondarenko, I., Hartmann, J. T., de Braud, F., Schuch, G., Zubel, A., ... Koralewski, P. (2011). Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: The OPUS study. *Annals of Oncology*, 22(7), 1535–1546. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdq632>
- Bokemeyer, C., Bondarenko, I., Makhson, A., Hartmann, J. T., Aparicio, J., De Braud, F., ... Koralewski, P. (2009). Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(5), 663–671. <http://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.8397>
- Bokemeyer, C., Köhne, C. H., Ciardiello, F., Lenz, H. J., Heinemann, V., Klinkhardt, U., ... Tejpar, S. (2015). FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 51(10), 1243–1252. <http://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.04.007>
- Boland, R. C., & Goel, A. (2010). Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2073–2087. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.064>
- Bolton, L., Reiman, A., Lucas, K., Timms, J., & Cree, I. A. (2015). KRAS mutation analysis by PCR: A comparison of two methods. *PLoS ONE*, 10(1), 1–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0115672>
- Bosman, F.T., Carneiro, F., Hruban, R.H. & Theise, N.D. (Eds). Carcinoma of the colon and rectum. In *WHO Classification of Tumours of the Digestive System* (pp.134-193), IARC: Lyon 2010.

- Bosman, F., & Yan, P. (2014). Molecular pathology of colorectal cancer. *Pol J Pathol*, 65(4), 257–266. <http://doi.org/10.5114/pjp.2014.48094>
- Bowel Cancer Australia (2014). Cancer staging - Size of the bowel cancer tumour, its position and whether it has spread. Acedido em 10 de Abril de 2016 a partir de <https://www.bowelcanceraustralia.org/bowel-cancer-staging>
- Boyle, P., & Leon, M. E. (2002). Epidemiology of colorectal cancer. *British Medical Bulletin*, 64(1), 1–25. <http://doi.org/10.1093/bmb/64.1.1>
- Brand, T. M., Lida, M., & Wheeler, D. L. (2011). Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biology and Therapy*, 11(9), 777–792. <http://doi.org/10.4161/cbt.11.9.15050>
- Bronte, G., Silvestris, N., Castiglia, M., Galvano, A., Passiglia, F., Sortino, G., ... Russo, A. (2015). New findings on primary and acquired resistance to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer: do all roads lead to RAS? *Oncotarget*, 6(28), 24780–96. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.4959>
- Brown, L. F., Berse, B., Jackman, R. W., Tognazzi, K., Manseau, E. J., Senger, D. R., & Dvorak, H. F. (1993). Expression of Vascular Permeability Factor (Vascular Endothelial Growth Factor) and Its Receptors in Adenocarcinomas of the Gastrointestinal Tract. *Cancer Research*, 53(19), 4727–4735. Acedido em <http://cancerres.aacrjournals.org/content/53/19/4727>
- Cabal, M.L. (2011). 1 . Colorectal cancer epidemiology . Assessing and managing risk . Prevention. In Esther Uña Cidon (Ed.), *The challenge of colorectal cancer: A review Book*. (pp. 1-33). Retirado de [http://www.trnres.com/ebook/uploads/estheruna/T\\_13210890661%20Esther%20U%20na%20.pdf](http://www.trnres.com/ebook/uploads/estheruna/T_13210890661%20Esther%20U%20na%20.pdf)
- Capella, G., Cronauer-Mitra, S., Peinado, M. A., & Perucho, M. (1991). Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environmental Health Perspectives*, 93, 125–131. <http://doi.org/10.1289/ehp.9193125>
- Carvalho, M.S., Androzzi, V.L., Codeço, C.T., Campos, D.P., Barbosa, M.T. & Shimakura, S.E. (2011). *Análise de sobrevivência: teoria e aplicações em saúde*, 2ª Edição, Editora FioCruz.
- Chang, E. H., Gonda, M. A., Ellis, R. W., Scolnick, E. M., & Lowy, D. R. (1982). Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(16), 4848–52. <http://doi.org/10.1073/pnas.79.16.4848>
- Chung, C. (2011). Cetuximab-Induced Anaphylaxis and IgE Specific for Galactose-  $\alpha$ -1,3-Galactose. *N Engl J Med*. 358(11), 1109–1117. Acedido em <https://www.researchgate.net/publication/5513931>
- Coget, J., Borrini, F., Susman, S., & Sabourin, J. C. (2014). Colorectal carcinomas in 2014: The search for powerful prognostic markers is still on the go! *Cancer Biomarkers*, 14(2-3), 145–150. <http://doi.org/10.3233/CBM-130378>
- Colucci. (2003). Colorectal Polyps. *Clinical Medicine & Research*, 261–262. <http://doi.org.3121/cmr.1.3.261>
- Colussi, D., Brandi, G., Bazzoli, F., & Ricciardiello, L. (2013). Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 16365–16385. <http://doi.org/10.3390/ijms140816365>
- Conn, G., Bayne, M. L., Soderman, D. D., Kwok, P. W., Sullivan, K. a, Palisi, T. M., ... Thomas, K. a. (1990). Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(7), 2628–2632.

- Cosmic. (2016a). Cosmic Mutation Details KRAS. Acedido a 22 de Maio de 2016., a partir de [http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/samples?coords=AA%3AAA&src=gene&r=&hn=carcinoma&end=189&ln=KRAS&gd=&ss=NS&all\\_data=&sn=large\\_intestine&sh=adenocarcinoma&id=4&seqlen=189&start=1#complete](http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/samples?coords=AA%3AAA&src=gene&r=&hn=carcinoma&end=189&ln=KRAS&gd=&ss=NS&all_data=&sn=large_intestine&sh=adenocarcinoma&id=4&seqlen=189&start=1#complete)
- Cosmic. (2016b). Cosmic Mutation Details NRAS. Acedido a 22 de Maio de 2016., a partir de [http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?coords=AA%3AAA&dr=&end=190&ln=NRAS&gd=&sn=large\\_intestine&all\\_data=&seqlen=190&id=5&start=1#ts](http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?coords=AA%3AAA&dr=&end=190&ln=NRAS&gd=&sn=large_intestine&all_data=&seqlen=190&id=5&start=1#ts)
- Cremoli, C., Loupakis, F., Masi, G., Lonardi, S., Zagonel, V., Salvatore, L., ... Falcone, A. (2013). FOLFOXIRI/bevacizumab versus FOLFIRI/ bevacizumab as First-line Treatment in Unresectable Metastatic Colorectal Cancer: Results of Phase III Tribe Trial by Gono Group. *Annals of Oncology*. Abstract. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdt201>
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., ... Van Cutsem, E. (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 351(4), 337–345. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa033025>
- De Leon, M., & Di Gregorio, C. (2001). Pathology of colorectal cancer. *Digest Liver Disease*, 33, 372–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11432519>
- De Roock, W., Claes, B., Bernasconi, D., De Schutter, J., Biesmans, B., Fountzilias, G., ... Kotoula, V. (2010). Effects of KRAS, B-RAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *The Lancet Oncology*, 11(8), Abstract. Acedido em [http://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(10\)70130-3/abstract](http://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(10)70130-3/abstract)
- De Roock, W., Jonker, D. J., Di Nicolantonio, F., Sartore-bianchi, A., & Simes, J. (2010). Association of KRAS p . G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Journal of the American Medical Association*, 304(16), 1812–1820. <http://doi.org/10.1001/jama.2010.1535>
- Di Nicolantonio, F., Martini, M., Molinari, F., Sartore-Bianchi, A., Arena, S., Saletti, P., ... Bardelli, A. (2008). Wild-type B-RAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(35), 5705–5712. <http://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.0786>
- Diamond, S. J., Enestvedt, B. K., Jiang, Z., Holub, J., Gupta, M., Lieberman, D. A., & Eisen, G. M. (2011). Adenoma detection rate increases with each decade of life after 50 years of age. *Gastrointestinal Endoscopy*, 74(1). <http://doi.org/doi:10.1016/j.gie.2011.03.1178>
- Dietrich, D., Uhl, B., Sailer, V., Holmes, E. E., Jung, M., Meller, S., & Kristiansen, G. (2013). Improved PCR Performance Using Template DNA from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues by Overcoming PCR Inhibition. *PLoS ONE*, 8(10), 1–10. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0077771>
- Direção Geral da Saúde. (2014). *Doenças Oncológicas em números – 2014*. Ministério da Saúde - Direção-Geral de Saúde. Acedido em <https://www.dgs.pt/estatisticas-de-saude/estatisticas-de-saude/publicacoes/portugal-doencas-oncologicas-em-numeros-2014.aspx>
- Domagal, P., Hybiak, J., Sulzyc-Bielicka, V., Cybulski, C., Rys, J., & Domagala, W. (2012). Mutation Testing in Colorectal Cancer As an Example of the Pathologist ' S Role in Personalized Targeted Therapy : a Practical Approach. *Poland Journal of Pathology*, 3, 145–164. Acedido em <http://www.termedia.pl/-KRAS-mutation-testing-in-colorectal-cancer-as-an-example-of-the-pathologist-s-role-in-personalized-targeted-therapy-a-practical-approach,55,19665,1,1.html>

- Douillard, J.-Y., Cunningham, D., Roth, A., Navarro, M., James, R., Karasek, P., ... Rougier, P. (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *The Lancet*, 355(9209), 1041–1047. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02034-1](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02034-1)
- Douillard, J.-Y., Oliner, K. S., Siena, S., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., ... Patterson, S. D. (2013). Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 369(11), 1023–34. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1305275>
- Duda, D. G. (2012). Molecular Biomarkers of Response to Antiangiogenic Therapy for Cancer. *ISRN Cell Biology*, 2012, 1–11. <http://doi.org/10.5402/2012/587259>
- Edwards, M. S., Chadda, S. D., Zhao, Z., Barber, B. L., & Sykes, D. P. (2012). A systematic review of treatment guidelines for metastatic colorectal cancer. *Colorectal Disease*, 14(2), 31–47. <http://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2011.02765.x>
- EGAPP Working Group. (2013). Recommendations from the EGAPP Working Group: can testing of tumor tissue for mutations in EGFR pathway downstream effector genes in patients with metastatic colorectal cancer improve health outcomes by guiding decisions regarding anti-EGFR therapy? *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 15(7), 517–27. <http://doi.org/10.1038/gim.2012.184>
- Ellis, L. M. (2000). Vascular Endothelial Growth Factor in Human Colon Cancer: Biology and Therapeutic Implications. *The Oncologist*, 5(90001), 11–15. [http://doi.org/10.1634/theoncologist.5-suppl\\_1-11](http://doi.org/10.1634/theoncologist.5-suppl_1-11)
- Ellis, L.M & Hicklin, D.J. (2008). Vascular endotelial growth factor (VEGF) and his receptors (Figure 1). Acedido em 10 de Maio de 2016 a partir de [http://www.nature.com/nrc/journal/v8/n8/fig\\_tab/nrc2403\\_F1.html](http://www.nature.com/nrc/journal/v8/n8/fig_tab/nrc2403_F1.html)
- EMA. (2010a). *Resumo das Características do Medicamento - Erbitux*. [http://www.ema.europa.eu/docs/pt\\_PT/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000558/WC500029119.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000558/WC500029119.pdf)
- EMA. (2010b). *Resumo das Características do Medicamento- Avastin*, 1–29. <http://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00188.x>
- EMA. (2005). *Avastin: EPAR Scientific discussion*. Acedido em [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Discussion/human/000582/WC500029262.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000582/WC500029262.pdf)
- Esteban, L. M., Vicario-abejón, C., Fernández-Medarde, A., Yienger, K., Lopez, E., Malumbres, M., ... Kay, R. (2001). Targeted Genomic Disruption of H- ras and N- ras , Individually or in Combination , Reveals the Dispensability of Both Loci for Mouse Growth and Development. *Molecular and Cellular Biology*, 21(5), 1444–1452. <http://doi.org/10.1128/MCB.21.5.1444>
- European Society for Medical Oncology. (2014). ESMO 2014 : Results From the CALGB / SWOG 80405 and FIRE-3 ( AID KRK-0306 ) Studies In All RAS Wild Type Population Optimal treatment strategy with anti-EGFR or anti-VEGF treatments. Acedido em <http://www.esmo.org/Conferences/Past-Conferences/ESMO-2014-Congress/News-Articles/Results-From-the-CALGB-SWOG-80405-and-FIRE-3-AIO-KRK-0306-Studies-In-All-RAS-Wild-Type-Population>
- Fakih, M. (2015). Biologic Therapies in Colorectal Cancer: Indications and Contraindications. *Asco Educational Book*, 197–206. Acedido em <http://meetinglibrary.asco.org/sites/meetinglibrary.asco.org/files/edbook/156/pdf/EdBookAM201535e197.pdf>
- Fakih, M., & Vincent, M. (2010). Adverse events associated with anti-EGFR therapies for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Current Oncology*, 17 Suppl 1, S18–S30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2901793/>
- Fearnhead, N. S., Britton, M. P., & Bodmer, W. F. (2001). The ABC of APC. *Human Molecular Genetics*, 10(7), 721–33. <http://doi.org/10.1093/hmg/10.7.721>

- Fearnhead, N. S., Wilding, J. L., & Bodmer, W. F. (2002). Genetics of colorectal cancer: Hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *British Medical Bulletin*, 64, 27–43. <http://doi.org/10.1093/bmb/64.1.27>
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-l](http://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-l)
- Feng, Q. Y., Wei, Y., Chen, J. W., Chang, W. J., Ye, L. C., Zhu, D. X., & Xu, J. M. (2014). Anti-EGFR and anti-VEGF agents: Important targeted therapies of colorectal liver metastases. *World Journal of Gastroenterology*, 20(15), 4263–4275. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i15.4263>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136, E359–E386. <http://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., ... Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*, 49(6), 1374–1403. <http://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.12.027>
- Fernández-Medarde, A., & Santos, E. (2011). Ras in cancer and developmental diseases. *Genes & Cancer*, 2(3), 344–58. <http://doi.org/10.1177/1947601911411084>
- Ferrara, N. (2004a). Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *The Oncologist*, 9 Suppl 1(suppl 1), 2–10. [http://doi.org/10.1634/theoncologist.9-suppl\\_1-2](http://doi.org/10.1634/theoncologist.9-suppl_1-2)
- Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H.-P., & Novotny, W. (2004b). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3(5), 391–400. <http://doi.org/10.1038/nrd1381>
- Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., & Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 3(3), 153–73. <http://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030>
- Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in Oncology*, 29(6 Suppl 16), 15–18. <http://doi.org/10.1053/sonc.2002.37263>
- Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C., & Williams, G. (1971). Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, 133(2), 275–88. <http://doi.org/10.1084/jem.133.2.275>
- Folprecht, G., Gruenberger T., O Bechstein, W., Raab, H.R., Lordick, F, Hartmann, J.,...Kohne, C.H. (2016). Tumour response and secondary resectability of colorectal liver metastases following neoadjuvant chemotherapy with cetuximab: the CELIM randomised phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. Abstract. Acedido em [http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanonc/PIIS1470-2045\(09\)70330-4](http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanonc/PIIS1470-2045(09)70330-4).
- Folprecht, G., Lutz, M. P., Schoffski, P., Seufferlein, T., Nolting, A., Pollert, P., & Kohne, C. H. (2006). Cetuximab and irinotecan/5-fluorouracil/folinic acid is a safe combination for the first-line treatment of patients with epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal carcinoma. *Annals of Oncology*, 17(3), 450–456. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdj084>
- Formica, V., & Roselli, M. (2015). Targeted therapy in first line treatment of RAS wild type colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 21(10), 2871–2874. <http://doi.org/10.3748/wjg.v21.i10.2871>
- Frattini, M., Saletti, P., Romagnani, E., Martin, V., Molinari, F., Ghisletta, M., ... Mazzucchelli, L. (2007). PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer*, 97(8), 1139–45. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604009>

- Fuchs, C. S., Marshall, J., Mitchell, E., Wierzbicki, R., Ganju, V., Jeffery, M., ... Barrueco, J. (2007). 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. *Journal of Clinical Oncology*, 25(30), 4779–4786. <http://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.3357>
- Fuchs, C. S., Marshall, J., Mitchell, E., Wierzbicki, R., Ganju, V., Jeffery, M., ... Barrueco, J. (2008). Randomized, Controlled Trial of Irinotecan Plus Infusional, Bolus, or Oral Fluoropyrimidines in First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: Updated Results From the BICC-C Study. *Journal of Clinical Oncology*, 26(4), 688–689. <http://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.0714>
- Galizia, G., Lieto, E., De Vita, F., Orditura, M., Castellano, P., Troiani, T., ... Ciardiello, F. (2007). Cetuximab, a chimeric human mouse anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in the treatment of human colorectal cancer. *Oncogene*, 26(25), 3654–3660. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1210381>
- Gallinger, S., Biagi, J. J., Fletcher, G. G., Nhan, C., Ruo, L., & McLeod, R. S. (2013). Liver resection for colorectal cancer metastases. *Curr Oncol*, 20(3), e255–65. <http://doi.org/10.3747/co.20.1341>
- GE Healthcare LifeSciences. (2013). Illustra™ ExoProStar™ 1-Step. Acedido em 8 de Setembro de 2016 a partir de [https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1326706518989/litdoc29010724\\_20130129211715.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1326706518989/litdoc29010724_20130129211715.pdf)
- Genentech. (2015). *Avastin Prescribing Information*. Acedido em [http://www.gene.com/download/pdf/avastin\\_prescribing.pdf](http://www.gene.com/download/pdf/avastin_prescribing.pdf)
- Gerber, H., & Ferrara, N. (2005). Pharmacology and Pharmacodynamics of Bevacizumab as Monotherapy or in Combination with Cytotoxic Therapy in Preclinical Studies. *Cancer Research*, 65(3), 671–680. Acedido em <http://cancerres.aacrjournals.org/content/65/3/671.long>
- Giantonio, B. J., Catalano, P. J., Meropol, N. J., O'Dwyer, P. J., Mitchell, E. P., Alberts, S. R., ... Benson, A. B. (2007). Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: Results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *Journal of Clinical Oncology*, 25(12), 1539–1544. <http://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.6305>
- Giovannini, M., Gregorc, V., Belli, C., Roca, E., Lazzari, C., Viganó, M. G., ... Villa, E. (2009). Clinical significance of skin toxicity due to EGFR-targeted Therapies. *Journal of Oncology*, 2009. <http://doi.org/10.1155/2009/849051>
- GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Acedido em 30 de Janeiro de 2016, a partir de [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx).
- Goel, H. L., & Mercurio, A. M. (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nature Reviews. Cancer*, 13(12), 871–82. <http://doi.org/10.1038/nrc3627>
- Goel, S., Wong, A. H., & Jain, R. K. (2012). Vascular Normalization as a Therapeutic Strategy. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2, 1–24. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a006486>
- Grothey, A., Sugrue, M. M., Purdie, D. M., Dong, W., Sargent, D., Hedrick, E., & Kozloff, M. (2008). Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall survival in metastatic colorectal cancer: Results from a large observational cohort study (BRiTE). *Journal of Clinical Oncology*, 26(33), 5326–5334. <http://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.3212>
- Hagan, S., Orr, M. C. M., & Doyle, B. (2013). Targeted therapies in colorectal cancer-an integrative view by PPPM. *The EPMA Journal*, 4(1), 3. <http://doi.org/10.1186/1878-5085-4-3>

- Haggar, F. A., & Boushey, R. P. (2009). Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 22(4), 191–197. <http://doi.org/10.1055/s-0029-1242458>.
- Haigis, K. M., Kendall, K. R., Wang, Y., Cheung, A., Haigis, M. C., Glickman, J. N., ... Jacks, T. (2008). Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nature Genetics*, 40(5), 600–8. <http://doi.org/10.1038/ng.115>
- Handy, D., Castro, R., & Loscalzo, J. (2011). Epigenetic Modifications Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease. *Circulation*, 123(19), 2145–2156. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839>. Epigenetic
- Heinemann, V., Weikersthal, L. F., Decker, T., Kiani, A., Vehling-kaiser, U., Scholz, M., ... Jena, U. (2014). FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): A randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 15(10), 1065–1075. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70330-4](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70330-4)
- Histology World (n.d.), Large intestine histology slide. Acedido em 10 de Abril de 2016 a partir de [http://www.histologyworld.com/photoalbum/displayimage.php?album=5&pid=1040#top\\_display\\_media](http://www.histologyworld.com/photoalbum/displayimage.php?album=5&pid=1040#top_display_media)
- Hoff, P. M., & Machado, K. K. (2012). Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 38(7), 825–833. <http://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.04.006>
- Horie, Y., Yamazaki, K., Funakoshi, T., Hamauchi, S., Taniguchi, H., Tsushima, T., ... Boku, N. (2015). Predictability of antitumor efficacy of cetuximab plus irinotecan based on skin rash severity according to observation period in patients with metastatic colorectal cancer following failure of fluorouracil, irinotecan and oxaliplatin. *Molecular and Clinical Oncology*, 3, 1029–1034. <http://doi.org/10.3892/mco.2015.586>
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., ... Kabbinavar, F. (2004). Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 350(23), 2235–42. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa032691>
- Imamura, Y., Morikawa, T., Liao, X., Lochhead, P., Kuchiba, A., Yamauchi, M., ... Ogino, S. (2012). Specific mutations in KRAS codons 12 and 13, and patient prognosis in 1075 B-RAF wild-type colorectal cancers. *Clinical Cancer Research*, 18(17), 4753–4763. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3210>
- Ince, W. L., Jubb, A. M., Holden, S. N., Holmgren, E. B., Tobin, P., Sridhar, M., ... Koeppen, H. (2005). Association of k-ras, b-raf, and p53 status with the treatment effect of bevacizumab. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(13), 981–989. <http://doi.org/10.1093/jnci/dji174>
- Infarmed. (2010). *Fluorouracilo Sandoz (RCM)*. [http://www.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=47560&tipo\\_doc=rcm](http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=47560&tipo_doc=rcm)
- Irahara, N., Baba, Y., Noshio, K., Shima, K., Yan, L., Dias-Santagata, D., ... Ogino, S. (2010). NRAS mutations are rare in colorectal cancer. *Diagnostic Molecular Pathology: The American Journal of Surgical Pathology, Part B*, 19(3), 157–63. <http://doi.org/10.1097/PDM.0b013e3181c93fd1>
- Ise, K., Nakamura, K., Nakao, K., Shimizu, S., Harada, H., Ichise, T., ... Katsuki, M. (2000). Targeted deletion of the H-ras gene decreases tumor formation in mouse skin carcinogenesis. *Oncogene*, 19(26), 2951–2956. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1203600>
- Jain, R. K., Duda, D. G., Clark, J. W., & Loeffler, J. S. (2006). Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*, 3(1), 24–40. <http://doi.org/10.1038/ncponc0403>

- Janakiraman, M., Vakiani, E., Zeng, Z., Pratilas, C., Taylor, B., Chitale, D., ... Solit, D. (2011). Genomic and biological characterization of exon 4 KRAS mutations in human cancer. *Cancer Research* 70(14), 5901–5911. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0192>.
- Jass, J. R., Walsh, M. D., Barker, M., Simms, L. A., Young, J., & Leggett, B. A. (2002). Distinction between familial and sporadic forms of colorectal cancer showing DNA microsatellite instability. *European Journal of Cancer*, 38(7), 858–866. [http://doi.org/10.1016/S0959-8049\(02\)00041-2](http://doi.org/10.1016/S0959-8049(02)00041-2)
- Jass, J. R., Whitehall, V. L. J., Young, J., & Leggett, B. A. (2002). Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology*, 123(3), 862–876. <http://doi.org/10.1053/gast.2002.35392>
- Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., ... Jacks, T. (1997). K- ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N- ras. *Genes and Development*, 11, 2468–2481. <http://doi.org/10.1101/gad.11.19.2468>
- Kamba, T., & McDonald, D. M. (2007). Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *British Journal of Cancer*, 96, 1788–1795. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603813>
- Karapetis, C. S., Khambata-Ford, S., Jonker, D. J., O'Callaghan, C. J., Tu, D., Tebbutt, N. C., ... Shapiro, J. D. (2008). K-ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. *New England Journal*. 1317–1329. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1404304>
- Kheirelseid, E.H., Miller, N., & Kerin, M. J. (2013). Molecular biology of colorectal cancer : Review of the literature. *American Journal of Molecular Biology*, 3, 72–80. <http://doi.org/10.4236/ajmb.2013.32010>
- Koch, S., & Claesson-Welsh, L. (2012). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), 1–21. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a006502>
- Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, 351 Pt 2, 289–305. <http://doi.org/10.1042/0264-6021:3510289>
- Krasinskas, A. M. (2011). EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma. *Pathology Research International*, 2011, 932932. <http://doi.org/10.4061/2011/932932>
- Lambrechts, D., Lenz, H. J., De Haas, S., Carmeliet, P., & Scherer, S. J. (2013). Markers of response for the antiangiogenic agent bevacizumab. *Journal of Clinical Oncology*, 31(9), 1219–1230. <http://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.2762>
- Laurent-Puig, P., Cayre, A., Manceau, G., Buc, E., Bachet, J. B., Lecomte, T., ... Penault-Llorca, F. (2009). Analysis of PTEN, B-RAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(35), 5924–5930. <http://doi.org/10.1200/JCO.2008.21.6796>
- Lee, S. J., & Kavanaugh, A. (2005). Adverse reactions to biologic agents: Focus on autoimmune disease therapies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(4), 900–905. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.03.028>
- Leichsenring, J., Koppelle, A., & Reinacher-Schick, A. (2015). Colorectal Cancer: Personalized Therapy. *Gastrointestinal Tumors*, 1(4), 209–220. <http://doi.org/10.1159/000380790>
- Lenz, H. (2014). ESMO 2014 : Results From the CALGB / SWOG 80405 and FIRE-3 ( AID KRK-0306 ) Studies In All RAS Wild Type Population Optimal treatment strategy with anti-EGFR or anti-VEGF treatments. Acedido em <http://www.esmo.org/Conferences/Past-Conferences/ESMO-2014-Congress/News-Articles/Results-From-the-CALGB-SWOG-80405-and-FIRE-3-AIO-KRK-0306-Studies-In-All-RAS-Wild-Type-Population>

- León, V. M., & Sáenz, R. (2010). Focos de criptas aberrantes. El comienzo de la historia... *Gastrenterologia Latinoamericana*, 18(4), 383–389. Acedido em [http://sociedadgastro.cl/wp-content/uploads/2013/08/vol18\\_4\\_2007.pdf](http://sociedadgastro.cl/wp-content/uploads/2013/08/vol18_4_2007.pdf)
- Leporini, C. (2011). Management of dermatologic toxicities associated with monoclonal antibody epidermal growth factor receptor inhibitors: A case review. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 1(1), 35–39. <http://doi.org/10.4103/0976>
- Leslie, A., Carey, F. A., Pratt, N. R., & Steele, R. J. C. (2002). The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *British Journal of Surgery*, 89(7), 845–860. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2168.2002.02120.x>
- Lièvre, A., Bachet, J. B., Le Corre, D., Boige, V., Landi, B., Emile, J. F., ... Laurent-Puig, P. (2006). KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Research*, 66(8), 3992–3995. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0191>
- Lilly USA (2016). Erbitux – Cetuximab. Know at to expect. Acedido em 20 de Maio de 2016 a partir de <http://www.erbitux.com/know-what-to-expect.html>
- Lobo, E. D., Hansen, R. J., & Balthasar, J. P. (2004). Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(11), 2645–2668. <http://doi.org/10.1002/jps.20178>
- Loupakis, F., Pollina, L., Stasi, I., Ruzzo, A., Scartozzi, M., Santini, D., ... Falcone, A. (2009). PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(16), 2622–2629. <http://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.2796>
- Loupakis, F., Stein, A., Ychou, M., Hermann, F., Salud, A., & Österlund, P. (2015). A Review of Clinical Studies and Practical Guide for the Administration of Triplet Chemotherapy Regimens with Bevacizumab in First-line Metastatic Colorectal Cancer. *Targeted Oncology*, 1–16. <http://doi.org/10.1007/s11523-015-0400-y>
- Macedo, L. T., da Costa Lima, A. B., & Sasse, A. D. (2012). Addition of bevacizumab to first-line chemotherapy in advanced colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis, with emphasis on chemotherapy subgroups. *BMC Cancer*, 12(1), 89. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-12-89>
- Manne, U., Shanmugam, C., Katkoori, V. R., Bumpers, H. L., & Grizzle, W. E. (2010). Development and progression of colorectal neoplasia. *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers*, 9(1-6), 235–65. <http://doi.org/10.3233/CBM-2011-0160>
- Marshall, J. (2006). Clinical implications of the mechanism of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer*, 107(6), 1207–1218. <http://doi.org/10.1002/cncr.22133>
- Maru, D., Venook, A. P., & Ellis, L. M. (2013). Predictive biomarkers for bevacizumab: Are we there yet? *Clinical Cancer Research*, 19(11), 2824–2827. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3409>
- Maughan, T. S., Adams, R. A., Smith, C. G., Meade, A. M., Seymour, M. T., Wilson, R. H., ... Cheadle, J. P. (2011). Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: Results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *The Lancet*, 377(9783), 2103–2114. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60613-2](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60613-2)
- Mccubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, W. T., Chang, F., ... Elena, R. (2007). Roles Of The RAS/MEK/ERK pathway in Cell Growth, Malignant Transformation and Drug Resistance. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1263–1284. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.001.ROLES>
- McMahon, G. (2000). VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *The Oncologist*, 5 Suppl 1(suppl 1), 3–10. [http://doi.org/10.1634/theoncologist.5-suppl\\_1-3](http://doi.org/10.1634/theoncologist.5-suppl_1-3)
- McPherson, M. & Moller, S. (2006). PCR (The Basics) (2nd Edition). USA, New York: Taylor & Francis Group.

- Melosky, B., Burkes, R., Rayson, D., Alcindor, T., Shear, N., & Lacouture, M. (2009). *Management of skin rash during EGFR-targeted monoclonal antibody treatment for gastrointestinal malignancies: Canadian recommendations. Current Oncology* (Vol. 16). Acedido em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2644628/>
- Milbury, C. ., Li, J., Liu, P., & Makrigiorgos, G. M. (2011). COLD-PCR: improving the sensivity of molecular assays. *Expert Review Molecular Diagnosis*, 11(2), 159–169. <http://doi.org/10.1586/erm.10.115.COLD-PCR>
- Mitin, N., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2005). Signaling interplay in ras superfamily function. *Current Biology*, 15(14), 563–574. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.010>
- Modest, D. P., Jung, A., Moosmann, N., Laubender, R. P., Giessen, C., Schulz, C., ... Stintzing, S. (2012). The influence of KRAS and B-RAF mutations on the efficacy of cetuximab-based first-line therapy of metastatic colorectal cancer: An analysis of the AIO KRK-0104-trial. *International Journal of Cancer*, 131(4), 980–986. <http://doi.org/10.1002/ijc.26467>
- Modest, D. P., Stintzing, S., Von Weikersthal, L. F., Decker, T., Kiani, A., Vehling-Kaiser, U., ... Heinemann, V. (2015). Impact of subsequent therapies on outcome of the FIRE-3/AIO KRK0306 trial: First-line therapy with FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab in patients with KRAS wild-type tumors in metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 33(32), 3718–3726. <http://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.2887>
- Morán, A., Ortega, P., de Juan, C., Fernández-Marcelo, T., Frías, C., Sánchez-Pernaute, A., ... Benito, M. (2010). Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 2(3), 151–8. <http://doi.org/10.4251/wjgo.v2.i3.151>
- National Cancer Institute. (2016b). Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute. Acedido em <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=346494>
- National Cancer Institute U.S. (2010). *Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), Version 4.03*. Acedido em [http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE\\_4.03\\_2010-06-14\\_QuickReference\\_5x7.pdf](http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_5x7.pdf)
- National Cancer Institute. (2016a). *SEER Stat Fact Sheets: Colum and Rectum Cancer*. Acedido em 30-01-2016 a partir de <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>.
- NCBI. (2016b). Homo Sapiens KRAS proto-oncogene, GTPase (KRAS), RefSeqGene on chromosome 12. Acedido em 13 de Junho de 2016, a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/176866166>
- NCBI. (2016c). Homo Sapiens neuroblastoma RAS viral oncogene homolog (NRAS), RefSeqGene (LRG\_92) on chromosome 1. Acedido em 13 de Junho de 2016, a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/187423895>
- NCBI. (2016a). TP53 tumor protein 53 [Homo sapiens (Human)]. Acedido em 18 de Abril de 2016, a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., & Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(1), 9–22. <http://doi.org/Doi 10.1210/Er.2003-0027>
- Newton, H. B. (2009). Bevacizumab: Review of Development, Pharmacology, and Application to Brain Tumors. *Clinical Medicine: Therapeutics*, 1, 1577–1597. Acedido em [http://www.la-press.com/article.php?article\\_id=1730](http://www.la-press.com/article.php?article_id=1730)
- Nolting, A., Fox, F. E., & Kovar, A. (2006). Clinical Drug Development of Cetuximab, a Monoclonal Antibody. In B. Meibohm (Ed.), *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Biotech Drugs* (pp. 353–370). Wiley-VCH. <http://doi.org/10.1002/9783527609628>

- O'Neil, B. H., & Venook, A. P. (2015). Trying to understand differing results of FIRE-3 and 80405: Does the first treatment matter more than others? *Journal of Clinical Oncology*, 33(32), 3686–3688. <http://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.8495>
- Organização Mundial de Saúde. (2016). Cancer prevention. Acedido em 5 de Setembro de 2016, a partir de <http://www.who.int/cancer/prevention/en/>
- Orditura, M., De Vita, F., Galizia, G., Lieto, E., Vecchione, L., Vitiello, F., ... Ciardiello, F. (2009). Correlation between efficacy and skin rash occurrence following treatment with the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab: A single institution retrospective analysis. *Oncology Reports*, 21, 1023–1028. <http://doi.org/10.3892/or>
- Orlando, F. A., Tan, D., Baltodano, J. D., Khoury, T., Gibbs, J. F., Hassid, V. J., ... Alrawi, S. J. (2008). Aberrant crypt foci as precursors in colorectal cancer progression. *Journal of Surgical Oncology*, 98(3), 207–213. <http://doi.org/10.1002/jso.21106>
- Ouakrim, A., Pizot, C., Boniol, M., Malvezzi, M., Boniol, M., Negri, E., ... Autier, P. (2015). Trends in colorectal cancer mortality in Europe: retrospective analysis of the WHO mortality database. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 351(oct06\_4), h4970. <http://doi.org/10.1136/bmj.h4970>
- Peeters, M., Price, T., & Van Laethem, J.-L. (2009). Anti-epidermal growth factor receptor monotherapy in the treatment of metastatic colorectal cancer: where are we today? *The Oncologist*, 14(1), 29–39. <http://doi.org/10.1634/theoncologist.2008-0167>
- Perše, M., & Cerar, A. (2014). The Role, Significance and Applicability of Aberrant Crypt Foci in Clinical Practice. <http://doi.org/10.5772/57474>
- Plano Regional de Oncologia do Alentejo - PROA. (2013). Retirado de [http://www.arsalentejo.min-saude.pt/arsalentejo/PlaneamentoEstrategico/Documents/Plano\\_Regional\\_de\\_Oncologia.pdf](http://www.arsalentejo.min-saude.pt/arsalentejo/PlaneamentoEstrategico/Documents/Plano_Regional_de_Oncologia.pdf)
- Potter, J. D. (1999). Colorectal Cancer: Molecules and Populations, 91(11). *Journal of the National Cancer Institute* 91(11); 916-932. <http://jnci.oxfordjournals.org/content/91/11/916.full>
- Prior, I. a, Lewis, P. D., & Mattos, C. (2012). A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Research*, 72(10), 2457–2467. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2612.A>
- Prior, I. A., Lewis, P. D., & Mattos, C. (2012). A comprehensive survey of ras mutations in cancer. *Cancer Research*, 72(10), 2457–2467. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2612>
- Rajalingam, K., Schreck, R., Rapp, U. R., & Albert, Š. (2007). Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1177–1195. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.01.012>
- Raoul, J.-L., Van Laethem, J.-L., Peeters, M., Brezault, C., Hussein, F., Cals, L., ... Rougier, P. (2009). Cetuximab in combination with irinotecan/5-fluorouracil/folinic acid (FOLFIRI) in the initial treatment of metastatic colorectal cancer: a multicentre two-part phase I/II study. *BMC Cancer*, 9, 112. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-9-112>
- Registo Oncológico Regional Sul. (2014). Incidência, Sobrevivência e Mortalidade de todos os tumores na população portuguesa adulta na região sul de Portugal - ISM 2008-2009. Registo Oncológico Regional Sul, Lisboa 2014. Acedido em <http://www.ror-sul.org.pt/>
- Richman, S. D., Seymour, M. T., Chambers, P., Elliott, F., Daly, C. L., Meade, A. M., ... Quirke, P. (2009). KRAS and B-RAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial. *Journal of Clinical Oncology*, 27(35), 5931–5937. <http://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.4295>
- Roberts, P., & Der, C. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 26, 3291–3310. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1210422>

- Rosai, J. (2004). *Rosai and Ackerman's surgical pathology – Volume I* (9ª Edição). pp.776-855. Mosby.
- Saca, J.A. (2015). Polyps. Acedido em 3 de Maio de 2016 a partir de <http://www.murrasaca.com/english/polyps.html>
- Sack, J., & Rothman, J. (2000). Colorectal Cancer : Natural history and management. *Hospital Physician*, 64–73. Acedido em [http://www.turner-white.com/pdf/hp\\_oct00\\_colorectal.pdf](http://www.turner-white.com/pdf/hp_oct00_colorectal.pdf)
- Saif, M. W. (2015). Managing Bevacizumab-Related Toxicities. *Supportive Oncology*, 7(6), 245-251. Acedido em <https://www.researchgate.net/publication/43097362>
- Saltz, L. B., Clarke, S., Díaz-Rubio, E., Scheithauer, W., Figer, A., Wong, R., ... Cassidy, J. (2008). Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: A randomized phase III study. *Journal of Clinical Oncology*, 26(12), 2013–2019. <http://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.9930>
- Saltz, L. B., Meropol, N. J., Loehrer, P. J., Needle, M. N., Kopit, J., & Mayer, R. J. (2004). Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *Journal of Clinical Oncology*, 22(7), 1201–1208. <http://doi.org/10.1200/JCO.2004.10.182>
- Santarpia, L. L., Lippman, S., & El-Naggar, A. (2012). Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase RAS-RAF Signaling Pathway in Cancer Therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 16(1), 103–119. <http://doi.org/10.1517/14728222.2011.645805>
- Sartore-Bianchi, A., Di Nicolantonio, F., Nichelatti, M., Molinari, F., De Dosso, S., Saletti, P., ... Siena, S. (2009). Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to EGFR-targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer. *PLoS ONE*, 4(10), 1–9. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0007287>
- Santos, D. (2012). Câncer Colorretal. Acedido em 22 de Abril de 2016 a partir de <http://derival.com.br/doencas/doencas-do-colon/cancer-colorretal> em
- Scaltriti, M., & Baselga, J. (2006). The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway : A Model for Targeted Therapy. *Clin Cancer Res*, 12(18), 5268–5272. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1554>
- Schmoll, H. J., Van cutsem, E., Stein, A., Valentini, V., Glimelius, B., Haustermans, K., ... Cervantes, A. (2012). Esmo consensus guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. *Annals of Oncology*, 23(10), 2479–2516. <http://doi.org/10.1093/annonc/mds236>
- Schuhmacher, A. J., Guerra, C., Sauzeau, V., Cañamero, M., Bustelo, X. R., & Barbacid, M. (2008). A mouse model for Costello syndrome reveals an Ang II-mediated hypertensive condition. *Journal of Clinical Investigation*, 118(6), 2169–2179. <http://doi.org/10.1172/JCI34385>
- Schwartzberg, L. S., Rivera, F., Karthaus, M., Fasola, G., Canon, J. L., Hecht, J. R., ... Go, W. Y. (2014). PEAK: A randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal . *Journal of Clinical Oncology*, 32(21), 2240–2247. <http://doi.org/10.1200/JCO.2013.53.2473>
- Seeley, R.R., Stephens, T.D. & Tate P. (2001). *Anatomia & Fisiologia* (3ª Edição). pp. 862-864. Lisboa: Lusodidacta.
- Shussman, N., & Wexner, S. D. (2014). Colorectal polyps and polyposis syndromes. *Gastroenterology Oxford Journals*, 2, 1–15. <http://doi.org/10.1093/gastro/got041>
- Siegel, R., Desantis, C., & Jemal, A. (2014). Colorectal Cancer Statistics, 2014. *CA: Cancer Journal for Clinicians*, 64(1), 104–17. <http://doi.org/10.3322/caac.21220>
- Sobrero, A. F., Maurel, J., Fehrenbacher, L., Scheithauer, W., Abubakr, Y. A., Lutz, M. P., ... Burris, H. A. (2008). EPIC: Phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(14), 2311–2319. <http://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.1193>

- Sotelo, M. J., García-Paredes, B., Aguado, C., Sastre, J., & Díaz-Rubio, E. (2014). Role of cetuximab in first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*: WJG, 20(15), 4208–4219. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i15.4208>
- Srinivasan, M., Sedmak, D., & Jewell, S. (2002). Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am.J.Pathol.*, 161(0002-9440 (Print)), 1961–1971. [http://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64472-0](http://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64472-0)
- Stein, A., & Bokemeyer, C. (2014). How to select the optimal treatment for first line metastatic colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20(4), 899–907. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i4.899>
- Stevens, A. & Lowe, J. (2001). *Human Histology* (2ª Edição). pp. 208-213. Mosby
- Stintzing, S. (2014). Management of colorectal cancer. *F1000Prime Reports*, 6(108), 1–12. <http://doi.org/10.12703/P6-108>
- Stintzing, S., Jung, A., Rossius, L., Modest, D. P., Weikersthal, L. F. Von, Decker, T., & Kiani, A. M. (2014). Analysis of KRAS/NRAS AND B-RAF mutations in FIRE 3: a randomized phase III study of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab as first-line treatment for wild-type KRAS (exon 2) metastatic colorectal cancer patients. Acedido em [http://www.aio-portal.de/tl\\_files/aio/stellungnahmen/fire3\\_esmo\\_2013.pdf](http://www.aio-portal.de/tl_files/aio/stellungnahmen/fire3_esmo_2013.pdf)
- Stinzing, S. (2013). ESMO @ ECC 2013: Phase III FIRE-3 Trial Data Show Most Patients with Wild-Type RAS Metastatic Colorectal Cancer Benefit from First-Line FOLFIRI Plus Cetuximab Treatment. Acedido em <http://www.esmo.org/Conferences/Past-Conferences/European-Cancer-Congress-2013/News/Expended-Mutational-Analysis-of-Phase-III-FIRE-3-Trial-Data-Shows-Most-Patients-with-Wild-Type-RAS-Metastatic-Colorectal-Cancer-Benefit-from-First-Line-FOLFIRI-Plus-Cetuximab-Treatment>
- Tabernero, J., Van Cutsem, E., Díaz-Rubio, E., Cervantes, A., Humblet, Y., Andrés, T., ... De Gramont, A. (2007). Phase II trial of cetuximab in combination with fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25(33), 5225–5232. <http://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.2183>
- Taimeh Z., Loughran J., Birks E. & Bolli R. Vascular endothelial growth in heart failure. Acedido em 5 de Junho de 2016 a partir de <http://www.nature.com/nrcardio/journal/v10/n9/images/nrcardio.2013.94-f3.jpg>
- Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009. <http://doi.org/10.1155/2009/574398>
- Takahashi, H., & Shibuya, M. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 109(3), 227–241. <http://doi.org/10.1042/CS20040370>
- Takayama, T., Katsuki, S., Takahashi, Y., Ohi, M., Nojiri, S., Sakamaki, S., ... Niitsu, Y. (1998). Aberrant Crypt Foci of the Colon as Precursors of Adenoma Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 339(18), 1277–1284. <http://doi.org/10.1056/NEJM199810293391803>
- Temraz, S., Mukherji, D., & Shamseddine, A. (2014). Sequencing of treatment in metastatic colorectal cancer: Where to fit the target? *World Journal of Gastroenterology*, 20(8), 1993–2004. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i8.1993>
- The Cancer Genome Network Atlas. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487(7407), 330–337. <http://doi.org/10.1038/nature11252>.
- Thélin, C., & Sikka, S. (2015). Epidemiology of Colorectal Cancer — Incidence , Lifetime Risk Factors Statistics and Temporal Trends. In “*Screening for Colorectal Cancer with Colonoscopy.*” <http://dx.doi.org/10.5772/61945>

- ThermoScientific. (2011). NanoDrop: Assessment of Nucleic Acid Purity. *Protocols and Product Manuals*, 1–2. Acedido a 8 de Setembro de 2016 a partir de <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>
- Thermo Fisher Scientific (2009). DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis - chemistry guide (3rd Edition). <http://doi.org/10.1002/elps.200900218.DNA>
- Thornton, A. D., Ravn, P., Winslet, M., & Chester, K. (2006). Angiogenesis inhibition with bevacizumab and the surgical management of colorectal cancer. *British Journal of Surgery*, 93(12), 1456–1463. <http://doi.org/10.1002/bjs.5624>
- Tveit, K. M., Guren, T., Glimelius, B., Pfeiffer, P., Sorbye, H., Pyrhonen, S., ... Christoffersen, T. (2012). Phase III trial of cetuximab with continuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX) versus FLOX alone in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: The NORDIC-VII study. *Journal of Clinical Oncology*, 30(15), 1755–1762. <http://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.0915>
- University of Utah. (2016). Web Pathology – Gastrointestinal Pathology. Acedido em 3 de Maio de 2016 a partir de <http://library.med.utah.edu/WebPath/GIHTML/GI115.html>
- U.S. Food and Drug Administration. (2013). Paving the Way for Personalized Medicine Paving the Way for Personalized Medicine. *Personalized Medicine*, Acedido em <http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/SpecialTopics/PersonalizedMedicine/UCM372421.pdf>
- União Europeia. (2010). *European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis*. Acedido em <http://www.kolorektum.cz/res/file/guidelines/CRC-screening-guidelines-EC-2011-02-03.pdf>
- Vakiani, E., & Solit, D. B. (2011). KRAS and B-RAF: drug targets and predictive biomarkers. *Journal of Pathology*, 223, 219–229. <http://doi.org/10.1002/path.2796>
- Van Cutsem, E., Cervantes, A., Nordlinger, B., & Arnold, D. (2014). *Metastatic colorectal cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Annals of Oncology* (Vol. 25). <http://doi.org/10.1093/annonc/mdu260>
- Van Cutsem, E., de Haas, S., Kang, Y.-K., Ohtsu, a., Tebbutt, N. C., Ming Xu, J., ... Shah, M. a. (2012). Bevacizumab in Combination With Chemotherapy As First-Line Therapy in Advanced Gastric Cancer: A Biomarker Evaluation From the AVAGAST Randomized Phase III Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 30(17), 2119–2127. <http://doi.org/10.1200/JCO.2011.39.9824>
- Van Cutsem, E., Köhne, C., Hitre, E., Zaluski, J., Chien, C. C., Makhson, A., & D'Haens, G. (2009). Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* (360), 1408–17. Acedido em <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa0805019>
- Van Cutsem, E., Köhne, C.-H., Láng, I., Folprecht, G., Nowacki, M. P., Cascinu, S., ... Ciardiello, F. (2011). Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and B-RAF mutation status. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(15), 2011–2019. <http://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.5091>
- Van Cutsem, E., Lenz, H.-J., Köhne, C.-H., Heinemann, V., Tejpar, S., Melezínek, I., ... Ciardiello, F. (2015). Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Plus Cetuximab Treatment and Ras Mutations in Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(7), 692–700. <http://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4812>
- Van Cutsem, E., de Haas, S., Kang, Y.-K., Ohtsu, A., Tebbutt, N. C., Ming Xu, J., ... Shah, M. A. (2012a). Bevacizumab in Combination With Chemotherapy As First-Line Therapy in Advanced Gastric Cancer: A Biomarker Evaluation From the AVAGAST Randomized Phase III Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 30(17), 2119–2127. <http://doi.org/10.1200/JCO.2011.39.9824>

- Van Cutsem, E., Tejpar, S., Vanbeckevoort, D., Peeters, M., Humblet, Y., Gelderblom, H., ... Ciardiello, F. (2012b). Inpatient cetuximab dose escalation in metastatic colorectal cancer according to the grade of early skin reactions: The randomized EVEREST study. *Journal of Clinical Oncology*, 30(23), 2861–2868. <http://doi.org/10.1200/JCO.2011.40.9243>
- Van Krieken, J. H. J. M., Jung, A., Kirchner, T., Carneiro, F., Seruca, R., Bosman, F. T., ... Ensari, A. (2008). KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: Proposal for an European quality assurance program. *Virchows Archiv*, 453(5), 417–431. <http://doi.org/10.1007/s00428-008-0665-y>
- Vasudev, N. S., & Reynolds, A. R. (2014). Anti-angiogenic therapy for cancer: Current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis*, 17(3), 471–494. <http://doi.org/10.1007/s10456-014-9420-y>
- Venook, A., Niedzwiecki, D., Lenz, H., Mahoney, M., Innocenti, F., O'Neil, B., ... Blanke, C. (2014). CALGB/SWOG 80405: Analysis of patients undergoing surgery as part of treatment strategy. *Annals of Oncology*, 25(suppl 4), LBA10. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdu438.8>
- Vilar, E., & Gruber, S. B. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer—the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol*, 7(3), 153–62. <http://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.237>
- Von Baumgarten, L., Brucker, D., Tirniceru, A., Kienast, Y., Grau, S., Burgold, S., ... Winkler, F. (2011). Bevacizumab has differential and dose-dependent effects on glioma blood vessels and tumor cells. *Clinical Cancer Research*, 17(19), 6192–6205. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1868>
- Wen, F., & Li, Q. (2016). Treatment dilemmas of cetuximab combined with chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(23), 5332–41. <http://doi.org/10.3748/wjg.v22.i23.5332>
- Wiesmann, C., Fuh, G., Christinger, H. W., Eigenbrot, C., Wells, J. A., & de Vos, A. M. (1997). Crystal Structure at 1.7 Å Resolution of VEGF in Complex with Domain 2 of the Flt-1 Receptor. *Cell*, 91(5), 695–704. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80456-0](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80456-0)
- Willett, C. G., Boucher, Y., Tomaso, E., Duda, D. G., Munn, L. L., Tong, R. T., ... Jain, R. K. (2004). Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med.*, 10(2), 145–147. <http://doi.org/10.1038/nm988.Direct>
- Wilson, K., Walker, J. (2010). *Enzymes. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology* (7th Edition). USA: New York, Cambridge University Press.
- Worthley, D. L., & Leggett, B. A. (2010). Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *The Clinical Biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*, 31(2), 31–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2874430/>
- Worthley, D. L., Whitehall, V. L., Spring, K. J., & Leggett, B. A. (2007). Colorectal carcinogenesis: Road maps to cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 13(28), 3784–3791. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4611209/>
- Yamagishi, H., Kuroda, H., Imai, Y., & Hiraishi, H. (2016). Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chinese Journal of Cancer*, 35(1), 4. <http://doi.org/10.1186/s40880-015-0066-y>
- Yang, Z.-Y., Shen, W.-X., Hu, X.-F., Zheng, D.-Y., Wu, X.-Y., Huang, Y.-F., ... Tang, J.-L. (2012). EGFR gene copy number as a predictive biomarker for the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR monoclonal antibodies: a meta-analysis. *Journal of Hematology & Oncology*, 5, 52. <http://doi.org/10.1186/1756-8722-5-52>

- Yang, Z.-Y., Wu, X.-Y., Huang, Y.-F., Di, M.-Y., Zheng, D.-Y., Chen, J.-Z., ... Tang, J.-L. (2013). Promising biomarkers for predicting the outcomes of patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies: a systematic review with meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 133(8), 1914–25. <http://doi.org/10.1002/ijc.28153>
- Ye, L. C., Liu, T. S., Ren, L., Wei, Y., Zhu, D. X., Zai, S. Y., ... Xu, J. (2013). Randomized controlled trial of cetuximab plus chemotherapy for patients with KRAS wild-type unresectable colorectal liver-limited metastases. *Journal of Clinical Oncology*, 31(16), 1931–1938. <http://doi.org/10.1200/JCO.2012.44.8308>
- Zenonos, K., & Kyprianou, K. (2013). RAS signaling pathways, mutations and their role in colorectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 5(5), 97–101. <http://doi.org/10.4251/wjgo.v5.i5.97>
- Zhuang, H., Xue, Z., Wang, L., Li, X., Zhang, N., & Zhang, R. (2011). Efficacy and immune mechanisms of cetuximab for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Clinical Oncology and Cancer Research*, 8(4), 207–214. <http://doi.org/10.1007/s11805-011-0582-8>
- Ziello, J. E., Jovin, I. S., & Huang, Y. (2007). Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 80(2), 51–60. Acedido em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2140184/>
- Zuckerman, D. S., & Clark, J. W. (2008). Systemic therapy for metastatic colorectal cancer: Current questions. *Cancer*, 112(9), 1879–1891. <http://doi.org/10.1002/cncr.23409>