

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Dissertação de Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular

Caracterização histopatológica e diagnóstico molecular das mutações no gene *KRAS* em pacientes com carcinoma coloretal metastático: Importância para a definição da sensibilidade e especificidade de diferentes técnicas moleculares

Maria João Fernandes de Pina

Instituição de acolhimento:

Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP)

Orientador:

Professor Doutor José Carlos Machado

Co-orientador:

Mestre Luís Cirnes

Porto, 2013

**DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE
MESTRE EM MEDICINA E ONCOLOGIA
MOLECULAR APRESENTADA À FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO**

Agradecimentos

Ao longo deste percurso foram muitas as pessoas sem as quais seria impensável tornar possível este trabalho.

Em primeiro lugar queria agradecer a oportunidade de realização do Mestrado. À comissão organizadora e à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, o meu obrigado pela oportunidade e formação de excelência.

Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor José Carlos Machado, pela possibilidade de desenvolver este projeto, mas também pelo estímulo, conhecimento, disponibilidade, ajuda e apoio científico em todos os momentos que necessitei. Estou manifestamente grata!

Expresso a minha gratidão ao meu co-orientador, Mestre Luís Cirnes. Um obrigado muito especial por toda a ajuda e disponibilidade. Não só pelas partilhas de experiências e conhecimentos, como pelo otimismo, motivação e espírito crítico concedidos. Pela confiança depositada, por seres um amigo, um grande obrigado!

Agradeço à Doutora Fátima Carneiro e Hospital de São João, pela disponibilidade e acessibilidade às amostras, por todo o contributo que permitiu executar o presente trabalho.

Ao Doutor Renê Gerhard, agradeço toda a disponibilidade e contributo indispensáveis para a realização do presente trabalho.

Agradeço também à Doutora Catarina Eloy pela disponibilidade e ajuda.

A todos os elementos do laboratório de anatomia patológica do IPATIMUP, pela disponibilidade, apoio e contribuição sempre que necessário, um grande obrigado.

Um agradecimento há A.Menarini Diagnostics Portugal e à Transgenómica. Em especial agradeço à Daria Franceschi, pela transmissão de conhecimentos, por toda a ajuda e disponibilidade em esclarecer as minhas dúvidas sempre que precisei.

Ao Carlos Resende, pela disponibilidade para comigo, pela ajuda e conhecimentos transmitidos. Pela contribuição que também deste a este trabalho, um grande obrigado.

A todos os elementos do laboratório de diagnóstico genético do IPATIMUP agradeço a boa amizade, partilha de conhecimentos e boa disposição constantes. Em especial, agradeço à Cheila Ribeiro. Guardarei sempre com carinho a amizade partilhada. Por seres “o meu braço direito”, pelo auxílio, companhia, e disponibilidade sempre presentes, um grande obrigado! Agradeço ainda ao José Luís Costa e à Ana Justino em especial pela ajuda com o *Ion Torrent*. Não esquecendo todos aqueles que

passam e passaram pelo laboratório, agradeço a boa disposição e momentos partilhados. Um grande agradecimento à Sara Meireles por toda a disponibilidade e ajuda a qualquer momento, e à Rute Fernandes, por estar sempre disponível, amizade e incentivo.

Aos meus colegas de Mestrado com quem partilhei momentos inesquecíveis, pelo companheirismo, amizade e ajuda em todas as etapas deste percurso.

Ao Bruno Escudeiro, faltam-me as palavras para descrever o quão grata estou. Pela pessoa magnífica que és. Pelo constante apoio, compreensão, paciência, carinho e bondade. Por acreditares em mim e me dares força para continuar nos momentos mais difíceis. Por me acompanhares. Um grande obrigado por tudo!

Por fim, e não menos importante, mas antes pelo contrário, expresso a minha gratidão eterna à minha família, em especial aos meus pais e às minhas irmãs. Por acreditarem em mim e me acompanharem em mais uma etapa da minha vida. Por me apoiarem em tudo. Por todo o carinho e confiança que depositam em mim. A vós deixo o meu profundo agradecimento de uma forma muito especial.

A todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho deixo aqui um especial agradecimento.

Índice Geral

Agradecimentos.....	v
Abreviaturas	xi
Resumo	1
<i>Abstract</i>	2
1. Introdução.....	3
1.1. Carcinoma Coloretal	3
1.1.1. Carcinogénese do CCR	4
1.1.2. Tratamento do Carcinoma Coloretal metastático	5
1.2. O <i>KRAS</i> e suas vias de sinalização	7
1.3. Mutações no gene <i>KRAS</i> e o CCRm	9
1.4. Análise Mutacional do gene <i>KRAS</i>	10
1.4.1. Seleção e avaliação do material para análise molecular: o papel do patologista	11
1.4.2. Metodologias para deteção de mutações no gene <i>KRAS</i>	13
2. Objetivos.....	18
2.1. Objetivos gerais	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. Material e Métodos	19
3.1. Amostragem do estudo.....	19
3.2. Caracterização Histopatológica	19
3.3. Caracterização Molecular	20
3.3.1. Material Biológico para análise molecular	20
3.3.2. Análise Molecular	20
3.3.2. Sequenciação paralela massiva no <i>PGMTM</i>	23
3.4. Correlação do controlo morfológico com o diagnóstico molecular.....	25
3.5. Análise Estatística dos resultados	25
4. Resultados.....	26

4.1.	Determinação do limite de sensibilidade analítica dos métodos em estudo.....	26
4.2.	Caracterização molecular dos casos em estudo	28
4.2.1.	Frequência e distribuição mutacional do gene <i>KRAS</i>	28
4.2.2.	Comparação dos resultados da análise molecular entre as metodologias em estudo	29
4.2.3.	Correlação das metodologias em estudo com NGS: Classificação de casos não concordantes.....	31
4.3.	Correlação do controlo morfológico com a análise molecular.....	33
5.	Discussão	36
6.	Conclusão	43
7.	Referências bibliográficas	45

Índice de Figuras

Figura 1 - Incidência e Mortalidade do cancro a nível mundial por sexo no ano de 2008..	3
Figura 2- Sequência adenoma-carcinoma.	5
Figura 3 – Papel das mutações no gene <i>KRAS</i> na ativação oncogénica das vias de sinalização intracelulares.....	8
Figura 4 - Esquema representativo das principais etapas do processo de genotipagem do <i>KRAS</i> utilizando o <i>Surveyor Scan K-RAS Mutation Detection Kit</i> (à esquerda) e respetivo pormenor do modo de atuação da <i>Surveyor Nuclease</i> (à direita).....	15
Figura 5 – Representação esquemática do <i>workflow</i> de MPS no <i>PGMTM</i> ; a. Principais etapas do fluxo de trabalho para MPS no <i>Ion TorrentTM</i>	17
Figura 6 – Determinação do limite de deteção (sensibilidade analítica) do método de sequenciação direta de Sanger.	27
Figura 7 – Exemplos de resultados obtidos na análise dos codões 12 e 13 do gene <i>KRAS</i> por sequenciação direta e pelo método <i>Surveyor Scan kit</i>	28
Figura 8 – Imagens de cortes histológicos corados por H&E e respetiva avaliação morfológica do conteúdo em células tumorais.	33

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Tipo de mutações mais frequentemente observadas nos codões 12 e 13 do exão 2 do gene <i>KRAS</i>	10
Tabela 2 – Condições para a reação de PCR	22
Tabela 3 – Condições para a reação de sequenciação.	22
Tabela 4 – Frequência mutacional do gene <i>KRAS</i> segundo o método de sequenciação direta pelo método de Sanger para as 111 amostras em estudo;	29
Tabela 5 - Frequência mutacional do gene <i>KRAS</i> segundo o método <i>SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit</i> para as 103 amostras em estudo;	29
Tabela 6 – Correlação dos resultados obtidos entre o método de sequenciação direta e o <i>Surveyor Scan kit</i>	30
Tabela 7 - Comparação dos resultados obtidos por Sequenciação direta e <i>Surveyor Scan Kit</i> dos casos com resultados não concordantes e respetiva percentagem de células tumorais da avaliação microscópica;	30
Tabela 8 – Comparação dos resultados obtidos por Sequenciação direta, <i>Surveyor Scan Kit</i> e NGS dos casos com resultados não concordantes e respetiva percentagem de células tumorais da avaliação microscópica;	32
Tabela 9 - Comparação dos resultados obtidos por Sequenciação direta, <i>Surveyor Scan Kit</i> e NGS;	32
Tabela 10 - Comparação dos resultados obtidos por Sequenciação direta, <i>Surveyor Scan Kit</i> e NGS, com a exclusão dos casos com percentagem de células tumorais inferiores à sensibilidade analítica das metodologias em estudo;	34
Tabela 11 – Comparação dos valores de sensibilidade, especificidade e exatidão obtidos pelo método de Sequenciação direta e método <i>Surveyor Scan kit</i> antes e após considerar os resultados do controlo morfológico;	35

Abreviaturas

5-FU – 5-Fluorouracilo

ADN – **Á**cido **D**esoxirribonucleico

APC – *Adenomatous Polyposis Coli*

ASCO – Sociedade Americana de Oncologia Clínica (*American Society of Clinical Oncology*)

bp – pares de base (*base pairs*)

CAP – Colégio Americano de Patologistas (*College of American Pathologists*)

CE – *Communauté Européene*

CIMP – Fenótipos de ilhas CpG metiladas (*CpG island methylator phenotype*)

CIN – Instabilidade cromossômica (*Chromosome instability*)

CCR – Carcinoma coloretal

CCRM – Carcinoma coloretal metastático

emPCR – PCR de emulsão (*emulsion Polymerase Chain Reaction*)

EQA – *External Quality Assessment*

ESP – Sociedade Europeia de Patologia (*European Society of Pathology*)

EGFR – Recetor do fator de crescimento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

EMA – *European Medicines Agency*

FDA – *Food and Drug Administration*

GAP – Proteína ativadora de guanosina-trifosfato (*GTPase-Activating Protein*)

GDP – Guanosina difosfato (*Guanosine Diphosphate*)

GEF – Fator de troca de nucleótidos de guanina (*Guanine nucleotide Exchange Factor*)

GTP – Guanosina trifosfato (*Guanosine Triphosphate*)

GTPase – Guanosina-trifosfatase (*Guanosine Triphosphatase*)

H&E – Hematoxilina - Eosina

HMR1 – Hospital Militar Regional 1

HRAS – *Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue*

HSJ – Hospital de São João

ISP – *Ion Sphere Particle*

IVD – *In vitro diagnostics*

KRAS – *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue*

LV – Leucovorin

MLH1 – *MutL homolog 1*

MMR – *Mismatch repair genes*

MPS – Sequenciação paralela massiva (*Massive Parallel Sequencing*)

MSH2 – *MutS protein homolog 2*

MSI – Instabilidade de microssatélites (*Microsatellite instability*)

NCCN – *National Comprehensive Cancer Network*

NGS – Sequenciação de nova geração (*Next-generation Sequencing*)

NRAS – *Neuroblastoma Rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue*

PCR – Reação da polimerase em cadeia (*Polymerase Chain Reaction*)

PGM™ – *Ion Personal Genome Machine Sequencer™*

PI3K – *Phosphoinositide 3-kinase*

RAS – *Rat Sarcoma vírus*

RAS/MAPK – *Rat Sarcoma vírus/Mitogen-Activated Protein Kinase*

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorfism*

SMAD2 – *Mothers Against Decapentaplegic Homolog 2*

SMAD4 – *Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4*

SNP – Polimorfismo de nucleótido único (*Single Nucleotide Polymorphism*)

SSCP – *Single-Strand Conformation Polimorfism*

TP53 – *Tumor Protein p53*

VEGFR – Recetor do fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*)

WHO – *World Health Organization*

Resumo

A análise do estado mutacional do gene *KRAS* constitui um importante fator no encaminhamento terapêutico de pacientes com carcinoma coloretal metastático (CCRm). As mutações neste gene podem ser detetadas por várias metodologias, mas todas comportam limitações que devem ser consideradas. Até à data, não existe uma metodologia *standard* para a análise molecular do *KRAS*. A sequenciação direta pelo método de Sanger é considerada o método de referência para a análise de mutações somáticas em amostras processadas na rotina anatomopatológica. Possui contudo, uma sensibilidade limitada perante uma baixa percentagem de células tumorais. Existem vários sistemas comerciais que utilizam precisamente o argumento da maior sensibilidade para se implantarem no mercado. Para além da questão da sensibilidade, e dependendo do tecido em análise, a quantidade de área tumoral *versus* área não tumoral é variável e heterogénea. O patologista tem assim um papel crucial na seleção e avaliação do material mais adequado para a análise molecular e em assegurar que essa proporção de tumor (percentagem de células tumorais) esteja de acordo com os critérios mínimos da técnica selecionada (limite de deteção da metodologia). O presente trabalho pretende efetuar uma análise comparativa entre metodologias e avaliar a importância da avaliação histopatológica das amostras para análise molecular na definição da sensibilidade e especificidade de diferentes técnicas moleculares.

Um total de 111 amostras de CCRm foram caracterizadas molecularmente por sequenciação direta e 103 pelo *Surveyor Scan kit*. O limite de sensibilidade analítica determinado para sequenciação direta foi de 20% de células tumorais. O limite de sensibilidade analítica utilizado para o *Surveyor Scan kit* foi o referido pelo fabricante (de 5% de células tumorais). Da análise molecular resultou numa concordância entre as metodologias de 95,1% com 5 casos discrepantes (4,9%). Para resolução dos casos não concordantes recorreu-se à sequenciação paralela massiva. A sequenciação direta demonstrou uma sensibilidade menor (89,66%) quando comparada ao *Surveyor Scan kit* (94,55%).

Para verificar se a sensibilidade dos métodos é influenciada pela adequabilidade do material utilizado foi feito um estudo de caracterização morfológica no material utilizado. Efetuando uma reanálise dos resultados moleculares, tendo em conta a percentagem de células tumorais (excluindo casos com valores abaixo do limite de deteção para cada um dos métodos), a sequenciação direta surge agora com uma sensibilidade superior (96,15%) e idêntica à do *Surveyor Scan kit* (96,30%). Ambas as técnicas apresentaram uma especificidade de 100% antes e após controlo morfológico.

Em conclusão, os resultados da avaliação do estado mutacional do gene *KRAS* não devem estar dependentes apenas do método molecular, uma vez que todos eles podem fornecer resultados válidos. É evidente a real importância em aliar ao método selecionado a avaliação histopatológica das amostras em análise, devidamente selecionadas e avaliadas por um patologista, para a realização de um diagnóstico preciso.

Abstract

The mutational status analysis of the *KRAS* gene is an important factor in the therapeutic treatment of patients with metastatic colorectal carcinoma (mCRC). Mutations in this gene can be detected by several methods but all have limitations which should be considered. Until now there is no standard methodology for the molecular analysis of *KRAS*. The Sanger sequencing is considered to be the reference method for analysis of somatic mutations in formalin-fixed and paraffin-embedded clinical samples. It has, however, a limited sensitivity towards a lower level of tumor cells. There are commercial kits using precisely the argument of greater sensitivity to establish themselves in the market. Beyond the issue of sensitivity, and depending on the tissue for analysis, the amount of tumor area versus non-tumor area is variable and heterogeneous. This way pathologist have a crucial role in the selection and evaluation of the material most suitable for molecular analysis and ensure that the tumor proportion (percentage of tumor cells) is consistent with the minimum criteria of the selected technique (limit of detection of the method). The present study was designed to perform a comparative analysis between methodologies and assess the importance of histopathological evaluation of the samples for molecular analysis in the definition of sensitivity and specificity for different molecular techniques.

A total of 111 samples of mCRC were analyzed by direct sequencing and 103 samples by *Surveyor Scan kit*. The detection limit for direct sequencing was 20% of tumor cells. The detection limit for *Surveyor Scan kit* was the value determined by the manufacturer (5% of tumor cells). Molecular analysis resulted in an agreement between the methodologies of 95,1% with five discrepant cases (4,9%). For the resolution of non-concordant cases it was performed massive parallel sequencing. Direct sequencing showed a lower sensitivity (89,66%) compared to *Surveyor Scan kit* (94,55%).

To check if the sensitivity of the methods is influenced by the suitability of the material used was made a morphological study on the samples used. Performing a reanalysis of the molecular results, considering the percentage of tumor cells (excluding cases with values below the limit of detection of the methodologies), direct sequencing appears now with a higher sensitivity (96,15%) identical to *Surveyor Scan kit* (96,30%). Both methods showed a specificity of 100% before and after morphological control.

In conclusion, the molecular analysis results of the mutational status of *KRAS* gene should not only be dependent on the molecular method since all of them can provide valid results. It became clear the real importance of combining the selected molecular method with the histopathological evaluation of samples in analysis, properly selected and evaluated by a pathologist, is crucial to perform an accurate diagnosis.

1. Introdução

1.1. Carcinoma Colorectal

O carcinoma colorectal (CCR) constitui uma das principais causas de morte por cancro em países desenvolvidos. Responsável por cerca de 10% da incidência de todos os cancros, constitui uma das principais causas de morbilidade e mortalidade a nível mundial. Em 2008, segundo a *World Health Organization (WHO)*, estimaram-se, por ano, 1,2 milhões de novos casos diagnosticados com CCR e 609 000 mortes pela doença. No sexo masculino, o CCR é a terceira doença maligna mais comum a nível mundial, após o carcinoma do pulmão e da próstata, constituindo a quarta causa de morte por cancro logo após o carcinoma do pulmão, fígado e estômago. No sexo feminino, o CCR é a segunda doença maligna mais frequente após o cancro da mama e a terceira causa de morte mais comum por cancro, logo após, o carcinoma da mama e do pulmão (Figura 1) (1-4).

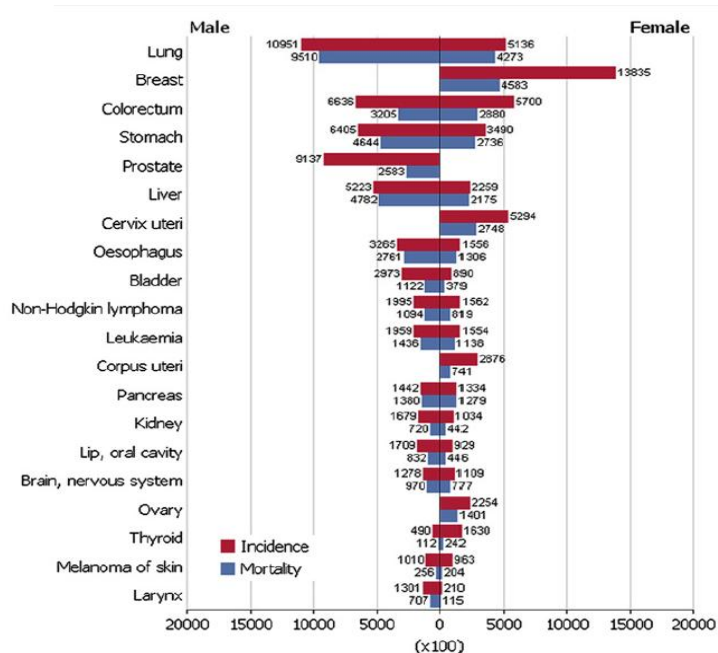


Figura 1 - Incidência e Mortalidade do cancro a nível mundial por sexo no ano de 2008. Números estimados segundo a localização do tumor. Números em centenas; (adaptado de *Karsa, L. et al. (2010) (4)*).

A maior causa da mortalidade em pacientes com CCR são as metástases à distância. Aproximadamente 50% dos pacientes poderá desenvolver doença metastática, que dependendo do estadio do tumor primário, ocorrem no fígado (em 20% a 70% dos

pacientes), e no pulmão (em 10% a 20% dos pacientes) (5). Os avanços ao nível do diagnóstico e tratamento têm vindo a aumentar o número de pacientes com cura da doença em fase precoce, através de cirurgia. Contrariamente, o prognóstico para formas avançadas da doença é baixo, com tratamento paliativo para a maioria dos pacientes (6).

A elevada incidência deste cancro, em conjunto com a alta taxa de mortalidade, se diagnosticado numa fase tardia da doença, demonstra a necessidade de desenvolvimento de novas formas de diagnóstico, prognóstico e de predição mais eficazes. O maior conhecimento ao nível molecular permitiram conhecer algumas das causas para a iniciação e progressão deste tipo de tumores, revelando também, a complexidade e heterogeneidade desta doença (7).

1.1.1. Carcinogénese do CCR

O CCR constitui uma doença cuja progressão neoplásica está associada com a acumulação de alterações, desde, anomalias cromossómicas, modificações epigenéticas e mutações genéticas, que envolvem genes que regulam por exemplo a proliferação, diferenciação, apoptose e angiogénese. A carcinogénese coloretal resulta da ativação de vias neoplásicas distintas e independentes, com características moleculares específicas, nomeadamente, as que conduzem à instabilidade cromossómica (CIN), instabilidade de microssatélites (MSI) ou a metilação aberrante de promotores de genes (especificamente das ilhas CpG¹), designados como fenótipos de ilhas CpG metiladas (CIMP) (8, 9).

Vogelstein and Fearon, no ano de 1990, propuseram o modelo da carcinogénese coloretal que correlaciona eventos genéticos específicos com a evolução patológica da morfologia do tecido. Em termos histológicos, ao nível das células epiteliais do intestino, as alterações genéticas conduzem, primeiramente, a uma hiperplasia da mucosa que acaba por progredir para adenoma, inicialmente, com baixo grau de displasia. A partir destes adenomas de menores dimensões, uma proporção pode avançar para adenomas com displasia de alto grau, a partir do qual um clone maligno é capaz de evoluir e iniciar a invasão da parede do intestino, como carcinoma (sequência adenoma-carcinoma) (8, 10-12). Estas alterações genéticas, necessárias para a iniciação e progressão do tumor no CCR, envolvem inúmeros genes, incluindo a inativação de genes supressores tumorais, como o gene *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) e *TP53* (*Tumor Protein p53*), e a ativação de oncogenes como o *KRAS* (*Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue*) (8, 9, 12, 13).

¹ Regiões ricas em dinucleótidos de Guanina-Citosina;

Mutações no gene *APC* são um evento precoce da tumorigênese coloretal e são observadas em cerca de 60 a 80% dos adenomas e carcinomas, em oposição ao gene *TP53*, mutado em aproximadamente 40 a 60% dos tumores, e que aparenta surgir numa fase mais tardia, aquando da transição para carcinoma. As mutações no gene *KRAS* são observadas em 40 a 50% dos adenomas e carcinomas, ocorrendo maioritariamente, durante os estadios iniciais de crescimento e progressão dos adenomas. Muitas outras alterações genéticas e epigenéticas podem ocorrer durante esta sequência, nomeadamente, ao nível dos genes de reparação do ADN, especificamente nos *mismatch repair* (MMR) *genes*, como a aquisição de hipermetilação do promotor do gene *MLH1* em 15% dos casos de CCR esporádico, e mutações hereditárias em 2 a 4% nos genes *MLH1* e *MSH2* no Síndrome de *Lynch*. A perda cromossômica (18q) contendo os genes *SMAD2* e *SMAD4*, é observada em cerca de 60% dos CCRs (Figura 2) (8).

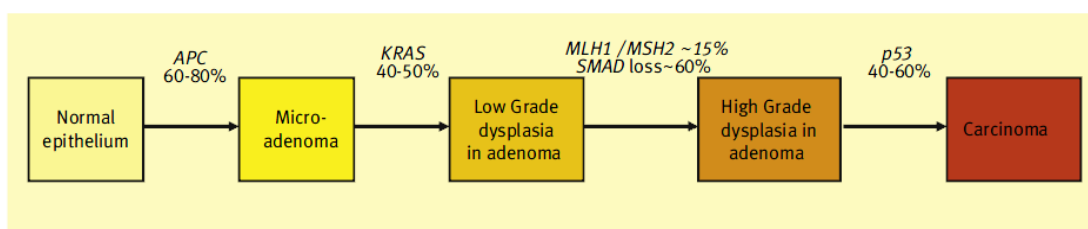


Figura 2- Sequência adenoma-carcinoma. A tumorigênese coloretal inicia-se com uma transformação do epitélio normal do intestino em adenomas, progredindo para displasias e subsequente evolução para carcinoma. No decorrer desta sequência há um acumular de alterações em inúmeros genes, desde mutações genéticas (gene *APC* – 60-80%, *TP53* – 40-60% e *KRAS* – 40-50%), perdas cromossômicas (perda do cromossoma 18q contendo os genes *SMAD*) e alterações epigenéticas (como a hipermetilação do promotor do *MLH1*); (adaptado de *Brahim, A. et al* (2012) (8)).

1.1.2. Tratamento do Carcinoma Coloretal metastático

O prognóstico para pacientes com CCR metastático (CCRm) que não realizam tratamento é desfavorável, com um tempo médio de sobrevivência de aproximadamente 6 meses (14). A resseção cirúrgica das metástases pode prolongar o tempo médio de sobrevivência destes pacientes, ou até mesmo curar alguns deles. Apesar dos benefícios da cirurgia, apenas 10 a 20% dos pacientes possuem metástases passíveis de resseção quando diagnosticadas (5, 14).

As opções de tratamento para pacientes com CCRm têm sofrido alterações ao longo dos últimos anos. Por várias décadas o tratamento quimioterápico com 5-fluorouracilo + leucovorin (5-FU/LV), constituía o tratamento de eleição destes pacientes, com uma taxa de resposta de 20% a 30% e uma sobrevivência global média de 11 a 12 meses. Posteriormente, desde os anos 90, pela introdução de novos agentes citostáticos,

tem ocorrido uma melhoria das opções terapêuticas para estes pacientes. Estes novos regimes de combinação do 5-FU com o oxaliplatino (FOLFOX) e irinotecano (FOLFIRI) demonstraram uma melhoria das taxas globais de resposta e do tempo de sobrevivência. Em regimes de primeira linha de quimioterapia incluindo o oxaliplatino ou o irinotecano é observada uma taxa de resposta superior, de 33% a 62% (2, 5, 14).

Mais recentemente, o melhor conhecimento e compreensão dos eventos genéticos que estão na base do desenvolvimento, progressão e metástase dos tumores, resultou num impacto significativo ao nível da investigação direcionada para o tratamento de pacientes com cancro. Em particular, o foco no desenvolvimento de terapias dirigidas e na utilização de técnicas moleculares para a identificação dos pacientes com maior probabilidade de resposta a essas mesmas terapias (15).

Novos agentes terapêuticos, direcionados para o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e recetor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), demonstraram melhorar o prognóstico dos pacientes com CCRm (14). A terapia com anticorpos monoclonais anti-EGFR, cetuximab (Erbix®) e panitumumab (Vectibix®), foram aprovados pela *European Medicines Agency* (EMA) na Europa e pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, para o tratamento de doentes com CCRm. Contudo, como a grande maioria dos tratamentos para cancro, a terapia com estes agentes está associada com a toxicidade grave, onde apenas uma pequena percentagem (de 10% a 20%) dos pacientes vai beneficiar do tratamento (16-21).

A via de sinalização do EGFR encontra-se frequentemente ativada no CCR, e por esse motivo, é extensivamente, investigada como alvo terapêutico em cancro. A sobreexpressão do EGFR, determinada por imunohistoquímica, constituiu inicialmente o critério de seleção para a terapia com inibidores do EGFR, pressupondo que a sensibilidade a estes agentes estava associada a um aumento da expressão da proteína. Contudo, evidências de pacientes com CCRm tratados com anticorpos monoclonais indicaram que este biomarcador pouco se associava com a resposta aos anticorpos anti-EGFR. Rapidamente observaram que pacientes com elevada, baixa ou sem a expressão do recetor, possuíam um benefício similar perante a terapia monoclonal, e que por isso, não se verificava correlação entre a expressão aumentada do EGFR no tumor e a resposta à terapia. Tal fato realçou a necessidade e a importância em identificar fatores específicos que permitissem clarificar a determinação dos pacientes que irão beneficiar da terapia (22).

Tendo em conta a via de sinalização do EGFR, moléculas efectoras a jusante deste recetor, começaram a ser estudadas como potenciais biomarcadores para a terapia com anticorpos monoclonais. A associação entre mutações específicas e resposta à terapia parece fornecer uma clara oportunidade para melhorar as taxas de resposta e redução do

tratamento de pacientes com pouca probabilidade de resposta a determinadas drogas (1).

O gene *KRAS* foi dos primeiros a ser estudado. Ensaio clínico onde a análise ao gene *KRAS* foi efetuada em amostras de tumor de pacientes com CCRm, tratados com cetuximab ou panitumumab, demonstraram que a eficácia da terapia anti-EGFR estava dependente do estado mutacional deste gene. Em pacientes com o *KRAS wild-type* (não mutado), verificaram que a adição da terapia monoclonal à quimioterapia com o 5-FU resultava numa melhoria significativa da sobrevivência global e tempo de progressão livre da doença, em comparação com a quimioterapia em isolado. Em contraste, a combinação da quimioterapia e a terapia monoclonal em pacientes com o *KRAS* mutado não demonstrou benefícios. Estudos posteriores demonstraram, independentemente da terapia, uma sobrevivência global menor em pacientes com o *KRAS* mutado, comparativamente, a pacientes com *KRAS wild-type* (13, 23).

A análise genética demonstrou assim que a presença de mutações no gene *KRAS* constitui um marcador preditivo negativo, da não resposta ao panitumumab ou cetuximab, em pacientes com CCRm. O estado mutacional do gene *KRAS* possui um impacto considerável em decisões terapêuticas em pacientes com CCRm, onde a presença de mutações neste gene, identificam pacientes que não irão beneficiar da terapia monoclonal anti-EGFR (2, 15, 17, 24).

1.2. O *KRAS* e suas vias de sinalização

O gene *KRAS* localizado no braço curto do cromossoma 12 (locus 12p12.1) codifica para o KRAS. Primeiramente, identificado como um homólogo celular de um gene de transformação do vírus de sarcoma de ratinho (*Kristen Rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue*), constitui um dos membros da família *RAS* (incluindo *KRAS*, *HRAS* e *NRAS*) de pequenas proteínas de ligação guanosina difosfato/guanosina trifosfato (GDP/GTP) que atuam como transdutores de sinal.

O *KRAS* constitui um componente chave na regulação de vias de sinalização intracelulares através de uma variedade de recetores, incluindo o EGFR. A sua atividade, e consequentemente, a sinalização a jusante, é regulada através de fatores de troca do nucleotídeo guanina (GEFs) e por proteínas ativadoras da guanosina trifosfatase (GAPs) (15, 17).

Todas as proteínas *RAS* são ativadas por ligação à GTP através de GEFs, cuja produção é estimulada pela ativação de recetores de fatores de crescimento,

nomeadamente, do EGFR. Quando ocorre a ligação, ou seja, ativação, as proteínas RAS possuem maior afinidade para moléculas efetoras específicas, a maioria das quais iniciam várias cascatas de vias de sinalização intracelular incluindo, a via do *Rat sarcoma vírus/Mitogen-activated protein kinase* (RAS/MAPK) e a via do *Phosphoinositide-3-kinase* (PI3K/AKT), vias de sinalização importantes na regulação da transcrição génica, proliferação celular, apoptose, angiogénese, invasão e migração. A inativação ocorre quando o RAS-GTP (forma ativa) é hidrolisado a RAS-GDP (forma inativa) por ação da GTPase intrínseca, cuja atividade encontra-se marcadamente aumentada pelas GAPs (15, 17).

Em condições fisiológicas normais, os níveis de RAS-GTP são mantidos constantes (pelo equilíbrio entre a atividade das GEFs e das GAPs), fundamental na sinalização do tecido normal no que se relaciona com a proliferação, diferenciação e senescência. A ocorrência de mutações ativantes no *KRAS* altera esse equilíbrio, o que resulta numa redução marcada da atividade intrínseca da GTPase, tornando-a resistente às GAPs. A ativação constitutiva da proteína conduz à permanente ativação das vias de sinalização a jusante, independentemente dos recetores a montante, como o EGFR, e assim induzir à transformação oncogénica (Figura 3) (15, 17).

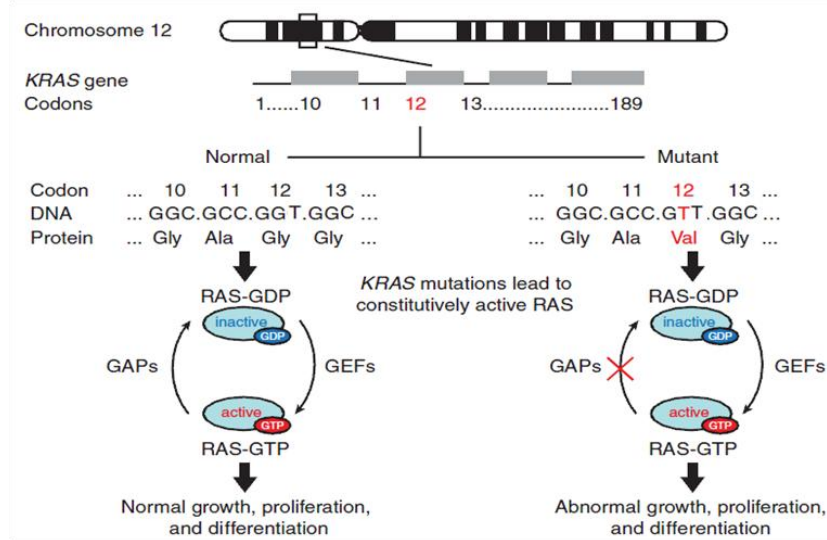


Figura 3 – Papel das mutações no gene *KRAS* na ativação oncogénica das vias de sinalização intracelulares. O gene humano *KRAS*, um dos membros da família *RAS*, codifica para proteínas de ligação guanosina difosfato/guanosina trifosfato (GDP/GTP) que atuam como transdutores de sinal de vias de sinalização importantes no desenvolvimento e função celular. A ocorrência de mutações somáticas *missense*, por exemplo, no codão 12 do gene *KRAS*, resulta em proteínas RAS constitutivamente ativas (RAS-GTP). Em consequência ocorre a ativação oncogénica das vias de sinalização a jusante e resultando num crescimento, proliferação e diferenciação celular anormal; (adaptado de Wang, H. *et al.* (2010) (15)).

1.3. Mutações no gene *KRAS* e o CCRm

De todas as neoplasias humanas, cerca de 15 a 20% contêm mutações nos genes da subfamília RAS. Mutações ativantes do gene *KRAS* têm sido observadas com uma frequência relativamente elevada numa variedade de tumores humanos, incluindo: o carcinoma coloretal (30-60%), pancreático (60%), do trato biliar (33%), do pulmão (18%), do ovário (17%) e endometrial (15%) (13, 15). Das mutações ativantes no gene *KRAS*, mais de 90% são detetadas nos codões 12 (82-87%) e 13 (13-18%) do exão 2. Estas mutações são, geralmente, do tipo pontual e observadas como mutações somáticas. Os padrões mais comuns encontram-se descritos na Tabela 1. Também documentadas, mas com uma menor frequência (em menos de 5% dos casos), mutações nos codões 61 (exão 3) e 146 (exão 4) podem ser observadas (1, 17, 19, 25-27)

Constituindo um dos genes mais frequentemente mutado na via de sinalização RAS/MAPK, as mutações no gene *KRAS* são, na maioria dos casos, um evento precoce do desenvolvimento e progressão dos carcinomas coloretais. Aproximadamente 35% a 45% dos pacientes com CCRm apresentam mutações neste gene, comparativamente à frequência de mutações nos genes *NRAS* e *HRAS*, muito menor neste tipo de tumores (1% a 3%) (1, 15, 28). As mutações no gene *KRAS* mais frequentemente observadas no CCR incluem as transições de guanina para adenina e transversões guanina para timidina (1, 19). No codão 12, as mutações p.Gly12Asp e p.Gly12Val, são as mais comuns, e, no codão 13 a substituição de uma glicina por um aspartato (p.Gly13Asp) constitui a mutação mais frequentemente observada (27, 29). Os codões 12 e 13 codificam para dois resíduos de glicina adjacentes localizados na proximidade do local catalítico da proteína RAS. Diferentes mutações resultam numa substituição de diferentes aminoácidos nesses locais catalíticos, e desta forma, resultam em diferentes níveis de redução da atividade intrínseca da GTPase. Como consequência, mutações diferentes no gene *KRAS*, podem ser responsáveis por diferentes alterações biológicas. Mutações no codão 12 estão frequentemente associadas a um fenótipo mucinoso do CCR, em contraste com as mutações no codão 13, geralmente, relacionadas com carcinoma não mucinoso, mas de maior agressividade e potencial metastático (1).

Tabela 1 - Tipo de mutações mais frequentemente observadas nos codões 12 e 13 do exão 2 do gene *KRAS*.

Codão	Nucleótido variante	Aminoácido variante	Frequência (em %) *	Cosmic ID
12	c.35G>A	p.Gly12Asp	31,4	521
	c.35G>T	p.Gly12Val	25,3	520
	c.34G>T	p.Gly12Cys	8,2	516
	c.34G>A	p.Gly12Ser	6,0	517
	c.35G>C	p.Gly12Ala	4,7	522
	c.34G>C	p.Gly12Arg	1,4	518
13	c.38G>A	p.Gly13Asp	21,2	532
	c.37G>T	p.Gly13Cys	0,6	527

* Adaptado de Vaughn, C. P., et al. (2011) (29);

O estado mutacional do gene *KRAS* possui um impacto considerável na decisão terapêutica de pacientes com CCRm. Desde o ano de 2009 que a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO – *American Society of Clinical Oncology*) recomenda que todos os pacientes com CCRm candidatos a terapia monoclonal anti-EGFR devem ser testados para a pesquisa de mutações nos codões 12 e 13 do gene *KRAS*. Como mencionado anteriormente, a presença de mutações neste gene, identifica pacientes que não irão beneficiar da terapia (21, 24, 30).

1.4. Análise Mutacional do gene *KRAS*

A análise do estado mutacional do gene *KRAS* constitui um importante fator no encaminhamento terapêutico de pacientes com CCRm. Por outro lado, mutações neste gene podem ser detetadas por inúmeras metodologias, mas todas comportam limitações e que devem ser consideradas. Até à data, não existe uma metodologia *standard* para a análise molecular do *KRAS*. É, por isso, urgente a necessidade de serem estabelecidas e implementadas *guidelines* tanto na prática clínica, como na validação de métodos e definição de procedimentos standardizados para a detecção de mutações neste gene (17, 18, 25, 31).

A Sociedade Europeia de Patologia (ESP - *European Society of Pathology*) e o Colégio Americano de Patologistas (CAP - *College of American Pathologists*) propuseram *guidelines* técnicas para a análise mutacional do gene *KRAS*. Estas enfatizam o papel do

patologista na seleção das amostras para a análise molecular, seleção da metodologia a utilizar e padronização do relatório de resultados (32). Por outro lado, fatores como a percentagem de células tumorais presentes na amostra e a qualidade geral do tecido colhido e respetivo ADN extraído incluem importantes implicações na precisão e sensibilidade do método utilizado para genotipagem do *KRAS* e que também devem ser considerados (20, 25).

A avaliação através de esquemas externos de avaliação da qualidade (*External Quality Assessment - EQA*) é um passo fundamental para a validação de testes para uso clínico. Laboratórios que realizem testes para estudo do gene *KRAS* (bem como outros testes moleculares preditivos com significado clínico) devem ser validados pelos programas de controlo de qualidade.

O *European Quality Assessment Program* para teste do *KRAS* (*KRAS EQA*), suportado pela ESP, tem como objetivo avaliar o desempenho do teste molecular, incluindo, a correta identificação da mutação no gene *KRAS*, a percentagem de células tumorais e a forma de apresentação dos resultados no relatório. Este programa efetua uma avaliação global da qualidade do teste, com o intuito de desenvolver estratégias e procedimentos estandardizados que ajudem a garantir a proficiência e assegurar um ótimo desempenho, interpretação e descrição da análise mutacional do *KRAS* (17, 25, 33-35).

Os testes disponíveis pelo CAP permitem a avaliação periódica do desempenho do laboratório e a promoção da proficiência dos exames efetuados. Testes de proficiência para o estudo mutacional do *KRAS* encontram-se disponíveis desde o ano de 2009 (36). A subscrição e participação nestes testes de proficiência são uma forma de controlo de qualidade e definição e monitorização de critérios para garantia da qualidade, relacionados com, o *turn-around time* dos exames, documentação das falhas em testes, tendências no volume de exames e seus resultados (37).

1.4.1. Seleção e avaliação do material para análise molecular: o papel do patologista

Os testes de diagnóstico para o estudo do estado mutacional do gene *KRAS* são realizados na rotina diagnóstica em material tumoral, geralmente, de tecidos fixados em formalina neutra tamponada e incluídos em parafina. A análise molecular pode ser também realizada em ADN extraído de tecidos a fresco em solução preservante (por exemplo *RNAlater* [*Qiagen, California*]) ou de tecidos criopreservados. Contudo, tendo em conta um ponto de vista mais prático, pela facilidade de obtenção e preservação por

longos períodos de tempo, os blocos de tecido incluídos em parafina constituem as amostras clínicas mais frequentemente utilizadas (20, 24, 25, 27, 38-40).

Conforme as *guidelines* estabelecidas pela *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* para carcinoma do cólon, a análise mutacional do *KRAS* pode ser realizada em amostras de tecido tumoral primário ou metastático. Nos casos de doença metastática em pacientes com recorrência, o consenso geral é de que a amostra inicial do tumor primário, obtida no momento da cirurgia de ressecção, é apropriada para fornecer resultados informativos e conclusivos. No caso de pacientes com diagnóstico inicial de doença metastática, a análise molecular pode ser efectuada em amostras de tecido metastático. Estas recomendações têm por base o facto de as mutações no gene *KRAS* ocorrerem numa fase precoce da tumorigénese coloretal, e portanto, ser expectável a sua estabilidade ao longo do desenvolvimento da doença e a concordância entre os tumores primários e metastáticos ser quase total (20, 25, 41, 42).

O principal requisito para uma genotipagem conclusiva do *KRAS* é a capacidade, da metodologia utilizada, em discriminar entre os diferentes alelos mutantes e *wild-type*. Dependendo do tecido em análise, a quantidade de células tumorais *versus* células não tumoral é variável e heterogénea. Como consequência a quantidade de ADN mutante relativamente ao ADN *wild-type* pode variar grandemente. O tecido alvo possuirá sempre células normais presentes no microambiente tumoral (como, linfócitos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos) (25, 43, 44). Por outro lado, o tumor por si só é, uma mistura heterogénea de células tumorais onde é possível que nem todas contenham a mesma mutação. Esta distribuição, não uniforme pode gerar, na análise mutacional de diferentes regiões do tumor, resultados distintos.

Dado que a fonte de material é, usualmente, tecido tumoral processado na rotina anatomopatológica, e muitas vezes, sujeito a macrodissecção para aumentar o número de células tumorais em relação ao número de células normais, as principais limitações destes métodos relacionam-se com o reduzido volume de células tumorais e o baixo rácio de células tumorais para células normais das amostras em teste (8, 44, 45). O mínimo de quantidade de células tumorais requeridas, em relação às não tumorais, depende do método utilizado, sendo por isso importante a avaliação pelo patologista, da proporção de tumor no bloco de tecido e em assegurar que esse valor esteja de acordo com os critérios mínimos da técnica selecionada (limite de deteção da metodologia) (17, 25, 37, 45).

O patologista possui um papel central na seleção do bloco de tecido mais adequado para o teste molecular. Este é responsável por verificar a presença de tumor no bloco selecionado para extração de ADN, bem como, assegurar que o mesmo possui quantidade suficiente de células tumorais para a análise molecular. A avaliação do conteúdo tumoral deve ser realizada num corte histológico do bloco selecionado corado

com hematoxilina – eosina (H&E) (17, 25). Segundo as recomendações do CAP, as amostras devem ser especificamente selecionadas por um patologista, de forma a incluir, predominantemente, células tumorais, excluindo a presença significativa de inflamação e/ou necrose (20, 24).

Um importante aspeto observado é a elevada variabilidade na determinação da percentagem de células tumorais em cortes histológicos. A avaliação do conteúdo tumoral constitui um procedimento subjetivo, dependente, da região da amostra selecionada para a análise, bem como, da determinação do rácio entre células tumorais e as células normais. Um estudo EQA envolvendo 13 laboratórios demonstrou existir diferenças com os valores estimados de percentagem de células tumorais entre os diferentes laboratórios. Por exemplo, para várias amostras, observaram-se laboratórios que estimaram 10% a 20% de células tumorais, enquanto outros estimavam para as mesmas amostras, 90% a 100% (uma diferença de 80%) (33). Excluindo a variabilidade na percentagem de células tumorais, em relação ao nível da secção do corte histológico, estas diferenças sugerem que a variabilidade na avaliação entre patologistas constitui o principal fator para estas discrepâncias. Este facto pode ser justificado quando a avaliação do conteúdo tumoral é realizada tendo por base, o cálculo da percentagem da área da amostra que é tumor, em vez, da percentagem de núcleos que estão no tumor, cuja avaliação microscópica é de maior dificuldade, mas esta sim, considerada a forma mais correta para determinação da percentagem de células tumorais (25, 33, 46).

1.4.2. Metodologias para deteção de mutações no gene *KRAS*

Uma grande variedade de métodos estão disponíveis para a deteção de mutações no gene *KRAS*. Contudo, ainda não é claro, que técnica fornece um melhor desempenho em termos de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade para a genotipagem do *KRAS* (16, 17, 33, 47, 48). Hoje em dia, a análise por sequenciação direta de ADN e metodologias com base em *Polimerase chain reaction* (PCR) constituem os métodos mais frequentemente utilizados para determinar o estado mutacional deste gene (15, 17).

A sequenciação direta pelo método de Sanger é descrita como o método *gold-standard* para a deteção de mutações somáticas em amostras tumorais. Capaz de identificar todas as mutações possíveis num exão (desde substituições de base, pequenas inserções e deleções) esta metodologia possui, no entanto, uma sensibilidade limitada perante um baixo número de células tumorais, particularmente, em amostras de tecido processadas na rotina anatomopatológica (15, 25, 49-51). Uma percentagem de

pelo menos 20% de células tumorais é necessária para uma detecção reprodutível dos alelos mutados (presentes em cerca de 10% se mutação estiver em heterozigotia) (1, 23, 26, 31, 52, 53).

Por sua vez, o PCR tornou-se uma das principais metodologias utilizadas no diagnóstico molecular, incluindo o diagnóstico molecular do gene *KRAS*. Atualmente, os métodos para estudo molecular de mutações são, quase exclusivamente baseados nesta tecnologia. Técnicas de *High Resolution Melting*, PCR em Tempo-real, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR – RFLP) e metodologias de discriminação alélico-específicas constituem alguns exemplos. Estas metodologias, geralmente de fácil automatização, tornaram-se as mais promissoras para uso em larga escala e com alto rendimento em testes de diagnóstico (1, 27, 49, 54). A sensibilidade de uma metodologia com base em PCR é dependente das condições físico-químicas da reação, da concentração e natureza do ADN alvo e dos *primers* e sondas selecionados. Pirosequenciação, *Single-Strand Conformation Polimorfism* (SSCP), discriminação alélica, e *High resolution Melting*, constituem metodologias cuja sensibilidade se enquadra num intervalo de 1,5% a 20% de células tumorais (55).

Existem vários métodos, na forma de kits comerciais para o estudo do gene *KRAS*. A utilização destes kits comerciais, constitui normalmente uma alternativa metodológica mais simples, com grande sensibilidade analítica e tendencialmente menos morosa comparativamente às metodologias desenvolvidas pelos próprios laboratórios. As principais limitações são os custos tipicamente mais elevados, e o fato de se encontrarem, geralmente, restritos à detecção apenas das principais mutações ativantes no gene *KRAS* (17, 25, 33).

O *Surveyor Scan K-RAS Mutation Detection Kit* (*Transgenomic Inc., Omaha*), constitui um exemplo de um kit comercial disponível para análise mutacional do gene *KRAS*. Este kit com marca *Communauté Européene* (*CE-mark*) e certificado clinicamente *in vitro diagnostic* (IVD), é capaz de detetar as mutações presentes no exão 2 deste gene. Esta tecnologia após a amplificação do ADN *wild-type* e mutante, com hibridação e formação de homoduplexos e heteroduplexos², utiliza uma endonuclease do ADN que cliva com alta sensibilidade no sentido 3', ambas as cadeias de ADN, nos locais de mutações pontuais, polimorfismos (SNPs) e inserções/deleções. A análise dos fragmentos é efetuada por separação eletroforética capilar em microchip num sistema dedicado (*WAVE MCE System*) (Figura 4). Com um limite de detecção estimado para a análise de amostras de tumor de tecidos fixados em formalina tamponada e impregnados em parafina de 5% a 10% de células tumorais (o que se correlaciona com cerca de 2,5%

² A formação de heteroduplexos ocorre quando uma sequência de ADN *wild-type* emparelha com uma sequência contendo mutação;

a 5% de alelos mutados para mutação em heterozigotia) este método possui, no entanto, a necessidade de sequenciação das amostras em estudo, caso haja a necessidade de confirmação e/ou genotipagem das mutações (25, 54, 56, 57).

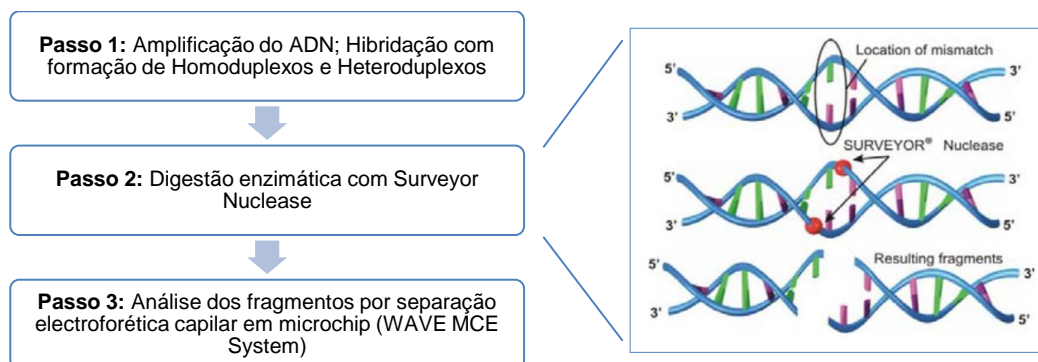


Figura 4 - Esquema representativo das principais etapas do processo de genotipagem do KRAS utilizando o Surveyor Scan K-RAS Mutation Detection Kit (à esquerda) e respetivo pormenor do modo de atuação da Surveyor Nuclease (à direita). Após amplificação e formação dos homoduplexos e heteroduplexos, ocorre digestão com a Surveyor Nuclease. Esta endonuclease do ADN reconhece os heteroduplexos, onde cliva no sentido 3' ambas as cadeias de ADN nos locais de *mismatch*. A análise dos fragmentos gerados é realizada por separação eletroforética capilar no WAVE MCE System. (adaptado de Transgenomic Inc. (2012)(57)).

Mais recentemente, avanços na tecnologia de sequenciação, através de tecnologias de sequenciação de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS), facilitaram o processo de análise do perfil de alterações genéticas em cancro. Com o emergir destas tecnologias, surge um grande potencial para aplicação da NGS na gestão de doenças e tratamento, aconselhamento genético e avaliação de risco. Numa perspetiva clínica, esta tecnologia pode ser utilizada não só no diagnóstico molecular de doenças genéticas, mas também, de doenças infecciosas, diagnóstico pré-natal, farmacogenómica e diagnóstico molecular de cancro (58).

Como mencionado, o cancro é uma doença heterogénea resultante da acumulação de alterações ao nível do ADN. A NGS tem sido implementada com sucesso na identificação de novas mutações numa variedade de cancros, como por exemplo, no cancro da bexiga, carcinoma de células renais, carcinoma do pulmão de pequenas células e carcinoma da próstata. Estas novas tecnologias incluem, por isso, um impacto significativo no diagnóstico, encaminhamento e tratamento em cancro. O futuro da medicina personalizada para o CCRm, irá, possivelmente, incluir o uso de NGS para

examinar centenas de alterações potencialmente relevantes clinicamente, em genes relacionados com o cancro, incluindo o *KRAS* (20, 58).

O *Ion Torrent Personal Genome Machine Sequencer (PGM™ - Ion Torrent Systems, Inc., Life Technologies)* introduziu uma nova abordagem de sequenciação, tendo por base a sequenciação iónica em semicondutores. A reacção decorre no *PGM™* no interior de um chip que contém inúmeras micro-janelas que serão preenchidas com micro-esferas revestidas por múltiplas cadeias de ADN iguais que resultaram de uma amplificação clonal prévia, por PCR de emulsão (*emPCR*), e que constituem, a *template* (moléculas de ADN molde a sequenciar). Segundo esta tecnologia *Ion Torrent™*, ocorre uma sequenciação por síntese, onde, na polimerização do ADN, aquando da incorporação de um nucleótido na cadeia de ADN, pela ADN polimerase, ocorre a libertação de um ião Hidrogénio (H^+). A libertação do protão H^+ conduz a uma variação local do pH, informação química, que é detetada pelos sensores do chip e convertida em informação digital (Figura 5) (59).

Esta tecnologia de sequenciação paralela massiva (*Massive Parallel Sequencing - MPS*), através de uma estratégia de *targeted resequencing*, permite a análise de múltiplos genes e múltiplas alterações genéticas (mutações pontuais, pequenas inserções/deleções e alterações de número de cópias) numa única experiência. Por outro lado, uma sensibilidade superior à convencional sequenciação direta pelo método de Sanger é facilmente obtida, através do aumento da cobertura geral dos *amplicons* em estudo. Esta metodologia é capaz de quantificar os alelos mutantes presentes num *background* de alelos *wild-type* de uma amostra tumoral, especialmente importante, para amostras onde a percentagem de células tumorais é reduzida (43, 60).

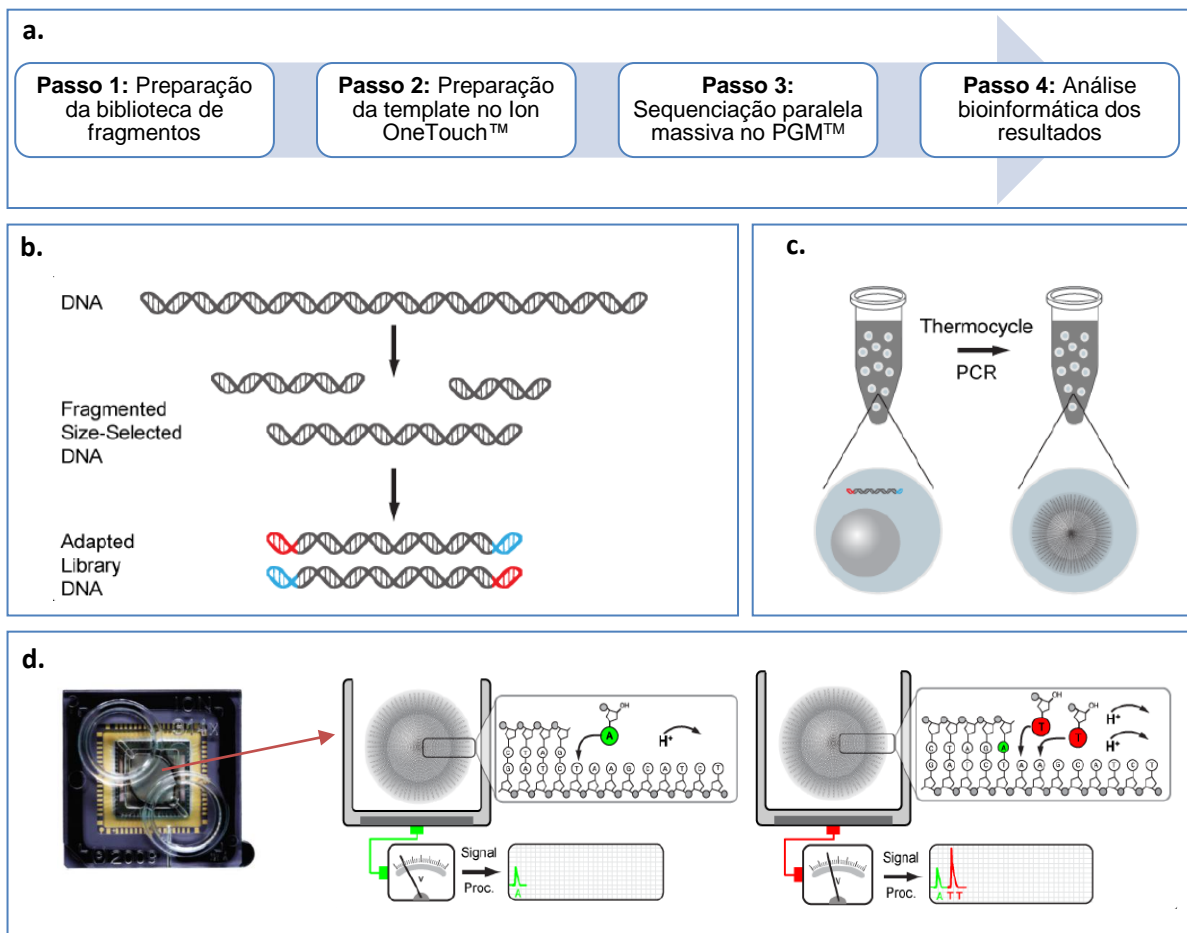


Figura 5 – Representação esquemática do workflow de MPS no PGM™; **a.** Principais etapas do fluxo de trabalho para MPS no *Ion Torrent™*; **b.** Preparação da biblioteca de fragmentos por fragmentação do ADN genómico ou seu enriquecimento seletivo e posterior ligação de adaptadores; **c.** Preparação da *template* por amplificação clonal da biblioteca de fragmentos em microesferas (*Ion Sphere™ Particles – ISPs*) e seu enriquecimento; **d.** Sequenciação no PGM™ em *Ion chip*, onde os quatro nucleótidos fluem ciclicamente, e por cada incorporação de um nucleótido, a variação de pH local é processada a informação digital no *Torrent Server*. (adaptado de Rothberg, J. M., et al. (2011) (59)).

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho tem como principal objetivo avaliar a importância da caracterização histopatológica na definição da sensibilidade e especificidade de diferentes técnicas moleculares no diagnóstico molecular das mutações no gene *KRAS* em pacientes com carcinoma colorretal metastático.

2.2. Objetivos específicos

Como objetivos específicos, pretende-se, através do presente trabalho efetuar a:

- Caracterização molecular das mutações no gene *KRAS* (codões 12 e 13) de pacientes com CCRm por diferentes metodologias e que representam níveis de sensibilidade diferentes: 1 - método de sequenciação direta segundo Sanger tipicamente descrito como necessitando de pelo menos 20% de células tumorais; 2 - método comercial *SURVEYOR® Scan KRAS Mutation Detection Kit*, descrito como capaz de detetar mutações em amostras com apenas 5% de células tumorais; 3 – método de sequenciação paralela massiva (NGS), com sensibilidade superior a 1% e usado neste trabalho como método de referência para a análise dos casos não concordantes.

- Comparação dos diferentes métodos relativamente ao estado mutacional do gene *KRAS* em termos de sensibilidade, especificidade e concordância.

- Correlação da análise histopatológica da percentagem de células tumorais com o diagnóstico molecular e definição de limites de sensibilidade analítica, no caso específico do método de sequenciação direta segundo Sanger.

3. Material e Métodos

3.1. Amostragem do estudo

O presente estudo foi constituído por uma amostragem de pacientes com diagnóstico clínico de CCRm com pedido para estudo molecular do gene *KRAS* (codão 12 e 13) ao serviço de diagnóstico genético do IPATIMUP Diagnósticos. O estudo foi composto por uma amostragem de 111 casos (englobando o ano de 2009 e de 2010) originários de duas instituições distintas: 53 casos provenientes do Hospital Militar Regional 1 (HMR1) e 58 casos oriundos do Hospital de São João, EPE (HSJ).

O estudo foi realizado segundo o Artigo 19.º da lei Portuguesa Nº 12/2005 de 26 de Janeiro³. Para todas as amostras em estudo foi atribuído um número de processo interno de forma a garantir o anonimato dos pacientes. Ao longo de todo o trabalho não foram publicadas informações que possibilitem a identificação dos pacientes envolvidos.

3.2. Caracterização Histopatológica

Do conjunto de amostras em estudo foi realizado o controlo morfológico em relação ao conteúdo de células tumorais, por parte de um patologista, num total de 61 amostras.

O controlo foi realizado para todos os casos provenientes do HMR1 (53 casos), cujo arquivo se encontra na instituição de realização do estudo. Para os casos do HSJ, o material biológico para análise é devolvido à instituição de origem, por esse motivo, apenas foi realizado controlo em casos onde foi possível aceder ao material biológico, incluindo no total 8 amostras.

A avaliação microscópica foi efectuada por visualização de um corte histológico (3 µm) do bloco em análise corado por H&E.

³ Artigo 19.º da lei Portuguesa Nº 12/2005 de 26 de Janeiro – “Informação genética pessoal e informação de saúde”, que refere que “No caso de uso retrospectivo de amostras ou em situações especiais em que o consentimento das pessoas envolvidas não possa ser obtido devido à quantidade de dados ou de sujeitos, à sua idade ou outra razão comparável, o material e os dados podem ser processados, mas apenas para fins de investigação científica ou obtenção de dados epidemiológicos ou estatísticos”;

3.3. Caracterização Molecular

3.3.1. Material Biológico para análise molecular

O estudo molecular foi realizado em amostras de ADN genómico, extraído a partir de cortes de 10µm de tecidos fixados em formalina tamponada e impregnados em parafina. Após secagem das lâminas em estufa, a 60°C e durante 30 minutos, realizou-se a sua desparafinação por passagem das lâminas em dois banhos sucessivos de xileno, seguida de duas passagens em etanol absoluto (15 minutos em cada um dos banhos). Posteriormente, foi efectuada a raspagem do material biológico contido na lâmina para um tubo *ependorf* estéril com ajuda de um bisturi (estéril). Seguiu-se a purificação e isolamento do ADN através do *Invisorb® Spin Tissue Mini kit (Invitex, Berlin)*, segundo as normas do fabricante. A concentração e grau de pureza do ADN foi avaliada por espectrofotometria de absorção no *NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington)*. Até ao momento de análise as amostras de ADN genómico foram armazenadas a -20°C.

Para 5 casos foi necessária uma nova extração de ADN a partir do bloco de tecido de origem. Para estes casos foi também realizado controlo morfológico.

Para nenhuma das amostras de todo o estudo foi efectuada macrodissecção no processo de extração.

3.3.2. Análise Molecular

A caracterização molecular dos codões 12 e 13 do gene *KRAS* das amostras em estudo foi efectuada segundo duas diferentes metodologias. Para todos os casos foi realizada a análise molecular por Sequenciação direta pelo método de Sanger e pelo método do *SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit, (Transgenomic, Inc., Omaha)*.

3.3.2.1. Determinação da sensibilidade analítica dos métodos em estudo

A determinação do limite de deteção (sensibilidade analítica) da sequenciação direta pelo método de Sanger foi realizada por análise de amostras celulares contendo percentagens distintas de células com o *KRAS wild-type* (linha celular GP202) e células

com o *KRAS* mutado (linha celular AGS), contendo a mutação c.35 G>A (p.Gly12Asp) em heterozigotia.

As linhas celulares GP202 e AGS foram mantidas em cultura em meio *RPMI* (*Life Technologies, Carlsbad*), suplementado com soro fetal bovino a 10% (*PAA, Austria*), 100 IU/mL de penicilina e 100 µg/ML de streptomicina (*Life Technologies, Carlsbad*), numa estufa com atmosfera controlada (5% de CO₂ e a 37°C). As células cresceram até um grau de confluência de 80 – 90%, e após tratamento com tripsina foi efectuada contagem de células em câmara de *Neubauer* para cada uma das linhas. De acordo com o número total de células de ambas as linhas celulares, foi efectuada a mistura de células tendo em conta um número final de um milhão de células. Foram feitas diferentes misturas, de forma a obter suspensões celulares contendo a mutação no gene *KRAS* (células da linha celular AGS) nas seguintes percentagens: 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 50% e 100%. Das suspensões celulares obtidas foram realizados *cell-blocks* utilizando *HistoGel*TM (*Richard Allan Scientific, Kalamazoo*), e posterior processamento histológico na rotina anatomopatológica. A partir deste momento, estas amostras foram processadas exatamente da mesma forma, que as amostras de rotina para análise de mutações no gene *KRAS*.

Após a sequenciação direta, a análise das sequências obtidas, foi efectuada através do software de análise *Mutation Surveyor 3.24* (*Softgenetics, Pennsylvania*) e o limite de deteção determinado.

Para o método *SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit*, foi utilizado como limite de sensibilidade analítica o referido pelo próprio fabricante.

3.3.2.2. Sequenciação direta pelo método de Sanger

A sequenciação automática pelo método de Sanger foi efectuada após reação de amplificação utilizando a *Qiagen® Multiplex PCR Kit* (*Qiagen, Hilden*). A amplificação dos codões 12 e 13 (exão 2) do gene *KRAS* foi efectuada utilizando o seguinte par de *primers*: *primer forward* 5' -GGTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG -3' e *primer reverse* 5' -TGGATCATATTCGTCCACAAAA-3', resultando num produto final de 197 pares de base (pb). Os *primers* foram desenhados com auxílio do programa informático *Primer3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). A reação decorreu no termociclador *MyCycler*TM *Thermal Cycler* (*BIO-RAD, Hercules*) e segundo as seguintes condições (Tabela 2):

Tabela 2 – Condições para a reação de PCR

Reagentes	Volume (µl)
2X Qiagen Multiplex PCR Master Mix	7,5
Distilled H ₂ O DNase/RNase free	3,5
5X Q-Solution	1
10X Primer Forward (10 µM)	1
10X Primer Reverse (10 µM)	1
ADN (50-100 ng/µl)	1
Volume final	15

Etapa	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação Inicial	95° C	15'	1
Desnaturação	95° C	30''	8
Annealing	65-60° C*	45''	
Extensão	72° C	1'	
Desnaturação	95° C	30''	35
Annealing	56° C	45''	
Extensão	72° C	1'	
Extensão Final	72° C	10'	1

*Touchdown – descida a cada ciclo de 1°C na temperatura de annealing

Todas as reações de amplificação incluíram um controlo negativo para controlo de contaminação por ADN exógeno. Após electroforese horizontal em gel de agarose das reações de PCR, para confirmação de amplificação, os produtos foram purificados utilizando uma mistura de enzimas, *FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase* e *Exonuclease I* (Thermo Scientific, Wilmington), seguindo as indicações do fabricante.

Para a reação de sequenciação, foi utilizado *BigDye® Terminator Cycle v3.1* (Applied Biosystems, Foster City). Para a reação de sequenciação utilizou-se *Bigdye* a 2,5x, tampão para uma concentração final a 1x e *primer* (*foward*) a 10 mM, para um volume final de 5µl. A reação decorreu segundo as condições descritas na seguinte tabela 3.

Tabela 3 – Condições para a reação de sequenciação.

Reagentes	Volume (µl)
Bigdye 2,5X	0,4
Distilled H ₂ O DNase/RNase free	2,2
Buffer Bigdye 1X	0,5
10X Primer Forward (10 µM)	0,4
Produto amplificado digerido	1,5
Volume final	5

Etapa	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação Inicial	95° C	2'	1
Desnaturação	95° C	15''	35
Annealing	55° C	20''	
Extensão	60° C	2'	
Extensão Final	60° C	10'	1

Sucedeu-se a purificação por Filtração em gel com *Sephadex® G-50 Fine* (GE Healthcare, Uppsala) e desnaturação em formamida dos produtos de sequenciação. A sequenciação direta foi realizada no *ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, e os electroferogramas obtidos foram analisados através do software de análise *Mutation Surveyor 3.24* (Softgenetics, Pennsylvania). Para os casos em que houve necessidade de repetição, por falha na sequenciação ou por dificuldade na interpretação, foi realizada sequenciação bidirecional.

3.3.2.3. *Surveyor® Scan Kras Mutation Detection Kit*

O *SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit*, (Transgenomic. Inc., Omaha) foi efetuado de acordo com as condições descritas pelo fabricante (57, 61). A análise mutacional do exão 2 do gene *KRAS* incluiu 3 passos principais:

1. Reação de amplificação do ADN mutante e ADN *wild-type*, e hibridização e formação de homoduplexos e heteroduplexos. Para cada reação são incluídos controlos positivos, de ADN de plasmídeo (controlo *wild-type* para exão 2, controlo mutado positivo para codão 12 e controlo mutado positivo para codão 13), de forma a assegurar que os reagentes se encontram nas condições adequadas para utilização. É também incluído, por cada reação um controlo negativo para exclusão de contaminação com ADN exógeno. Após a reação de amplificação, é avaliada a eficácia por electroforese horizontal em gel de agarose a 2% dos produtos amplificados.
2. Digestão enzimática da mistura de homoduplexos/heteroduplexos (produtos amplificados) com a *SURVEYOR Nuclease*. Os heteroduplexos sofrem digestão pela endonuclease, que reconhece os locais de *mismatch*, formando fragmentos de ADN.
3. Análise dos fragmentos de ADN no *WAVE MCE System* através do *WAVE MCE Control Software*. Por separação eletroforética capilar em microchip, os fragmentos de ADN formados por digestão, vão possuir diferentes tempos de migração, que correspondem ao tamanho desses fragmentos e, desta forma, à localização do(s) local(ais) de *mismatch*. A análise dos resultados obtidos, incluindo o eletroferograma e “gel virtual”, foi realizada através do *WAVE MCE Viewer Software*.

3.3.2. Sequenciação paralela massiva no *PGM™*

Para os casos discrepantes entre as duas metodologias anteriores, foi realizada MPS no *PGM™*. Foram incluídos 29 casos no total: 5 correspondentes a casos não concordantes entre as metodologias em comparação, 4 casos contendo a mutação e 20 casos com genótipo *wild-type* para o *KRAS* também por ambas as metodologias em estudo.

O fluxo de trabalho para MPS no *PGM™* foi realizado segundo as condições descritas pelo fabricante, incluindo, de forma sucinta, as seguintes etapas:

Preparação da biblioteca de fragmentos: A preparação da biblioteca iniciou-se com a amplificação do codão 12 e 13 do gene *KRAS* por PCR, segundo as mesmas condições descritas anteriormente para a realização de sequenciação direta pelo método de Sanger (ver tópico “3.3.2.1 – Sequenciação Direta pelo método de Sanger”). Posteriormente, foi realizado de acordo com o protocolo *Preparing Short Amplicon (<350bp) Libraries Using the Ion Plus Fragment Library Kit, PN MAN0006846, Rev.3.0 (Life Technologies, Carlsbad)*. Os produtos amplificados foram purificados utilizando *Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter IZASA, Carnaxide)* e após quantificação e normalização das suas concentrações para um valor equimolar foram sujeitas a uma digestão enzimática com enzimas de *end-repair*, utilizando o *Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit, PN 4471252 (Life Technologies, Carlsbad)*. De seguida, e para ser possível a junção de diferentes amostras num mesmo *chip* de sequenciação, a estratégia de *DNA Barcoding* foi utilizada (*Xpress™ Barcode Adapters 1–16, PN 4471250 e Xpress™ Barcode Adapters 17–32, PN 4474009 [Life Technologies, Carlsbad]*). Esta estratégia consiste na ligação de adaptadores específicos (pequenas sequências específicas de oligonucleótidos) aos fragmentos de cada amostra em análise. Após nova purificação e quantificação utilizando o *Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad)*, efetuou-se a junção das diferentes amostras em proporções equimolares numa mesma *pool*. Seguiu-se a amplificação da biblioteca e cálculo da molaridade da mesma para determinação do fator de diluição da biblioteca necessário para a preparação do *template*.

Preparação da template: De acordo com o fator de diluição determinado foi efetuada a diluição da biblioteca, e seguido o protocolo do *Ion PGM™ Template OT2 400 Kit, PN MAN0007218, Rev. 2.0 (Life Technologies, Carlsbad)*. Realização de uma amplificação clonal dos fragmentos de ADN através de PCR de emulsão (*emPCR*), no *Ion OneTouch 2*, do qual resultam micro-esferas (*Ion Sphere™ Particles – ISPs*) revestidas por fragmentos de ADN. Após *emPCR* efetuou-se o enriquecimento das *ISPs* positivas⁴ no *Ion OneTouch™ ES* utilizando *Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 (Life Technologies, Carlsbad)*.

MPS no PGM™ e análise bioinformática dos resultados: A sequenciação das *enriched-ISP* foi realizada no *PGM™ System*, utilizando um *Ion 314™ Chip v2* e segundo o protocolo *Ion PGM™ Sequencing 400 Kit PN MAN0007242, Rev. 2.0 (Life Technologies,*

⁴ *ISPs* positivas correspondem às *ISPs* que resultam de uma reação de *emPCR* bem sucedida, ou seja, as micro-esferas que após amplificação clonal ficam revestidas por cadeias de ADN *template*;

Carlsbad). Os resultados obtidos são transmitidos a partir do *PGM™ System* para o *Torrent Server* e a análise bioinformática dos dados efetuada utilizando os *plug-ins*: *Variant Caller* (para identificação das variantes presentes) e o *Amplicon Coverage* (quantificar o nível de cobertura dos *amplicons*). Os *settings* de análise utilizados foram os pré-definidos para a análise de alterações somáticas. Para a interpretação dos resultados só foram consideradas variantes para uma percentagem alélica superior a 1%.

3.4. Correlação do controlo morfológico com o diagnóstico molecular

A correlação entre a análise histopatológica efetuada pelo patologista e o resultado obtido na análise molecular foi realizada por comparação das percentagens do conteúdo de células tumorais estimadas pelo avaliador e o resultado molecular pelas diferentes metodologias.

Inicialmente, foi efetuado o cálculo das sensibilidades e especificidades dos métodos em estudo sem ter em conta o controlo morfológico. Numa segunda fase, tendo em consideração os limites de sensibilidade analítica das metodologias em estudo e a avaliação microscópica do conteúdo tumoral, foi realizado um novo cálculo das sensibilidades e especificidades dos métodos em estudo e analisadas as diferenças obtidas em relação aos cálculos realizados previamente.

3.5. Análise Estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados das diferenças nas frequências mutacionais e discrepâncias observadas entre as diferentes metodologias foi realizada através do software de análise *Statview 5.0* (*SAS Institute Inc., USA*). Para cálculo de sensibilidades e especificidades foi utilizada a folha de cálculo *Diagnostic Test Calculator* (http://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php).

4. Resultados

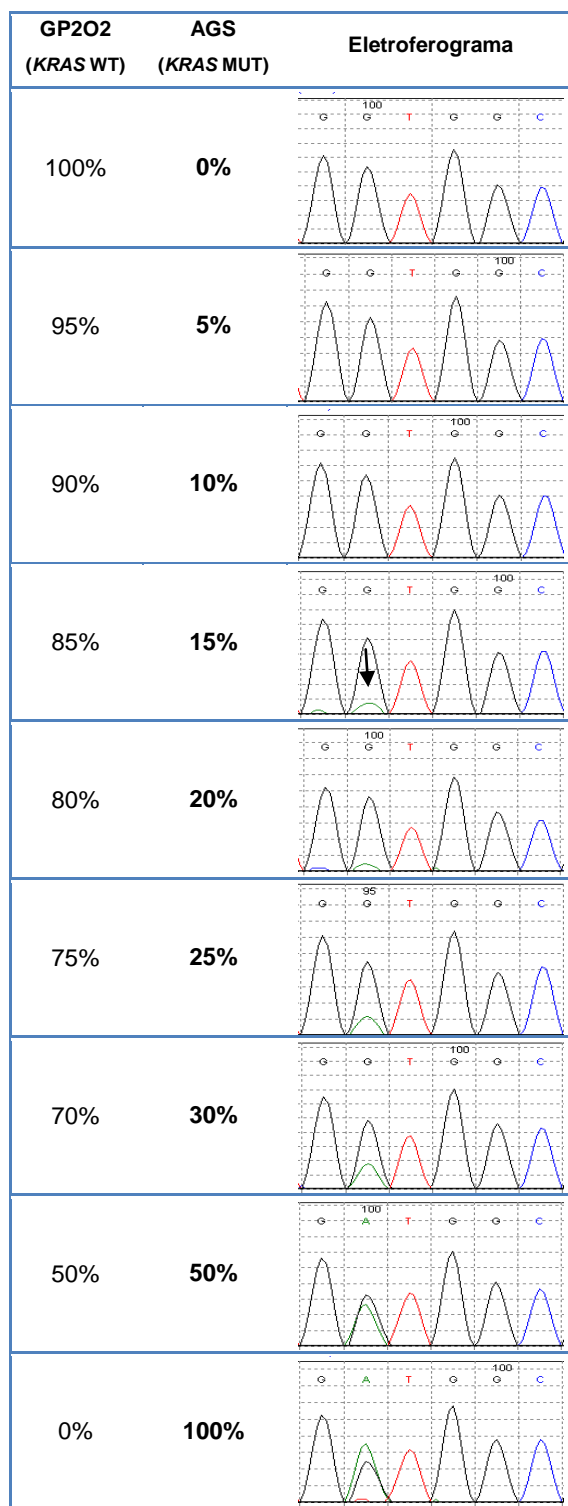
4.1. Determinação do limite de sensibilidade analítica dos métodos em estudo

A determinação da sensibilidade analítica (limite de detecção) foi apenas realizado para o método de sequenciação direta de Sanger. Para o método de *SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit* o limite de detecção utilizado foi o determinado pelo próprio fabricante (limite de detecção de 5% de células tumorais, o que corresponderá a cerca de 2,5% de alelos mutados em heterozigota).

A determinação do limite de detecção da sequenciação direta foi efetuado utilizando ADN extraído a partir de citoblocos contendo uma mistura de células da linhagem AGS, contendo a mutação c.35 G>A (p.Gly12Asp) em heterozigotia, e células *wild-type* da linha celular *GP202*, em percentagens celulares que variaram dos 5% aos 100%.

Com o método de sequenciação direta, a mutação no gene *KRAS* foi detetada a partir de uma percentagem de ADN mutado de 15% de células tumorais, onde um pequeno pico de fluorescência de baixa intensidade para a mutação é já visível. Abaixo deste valor (de 15% células tumorais) a mutação não é identificada. Por sua vez, para percentagens progressivamente superiores de células AGS mutadas, a mutação é também, conjuntamente, mais nítida (Figura 6).

De acordo com os eletroferogramas obtidos, foi definido como limite de detecção da metodologia a presença de pelo menos 20% de células tumorais, de forma a garantir, uma detecção reprodutível dos alelos mutados no *background* de alelos *wild-type* (corresponderá a uma capacidade de detecção de cerca de 10% de alelos mutados se mutação em heterozigotia).



WT – *wild-type*; MUT – mutado;

Figura 6 – Determinação do limite de detecção (sensibilidade analítica) do método de sequenciação direta de Sanger. Segundo os resultados obtidos da sequenciação das suspensões celulares contendo diferentes percentagens de células tumorais com a mutação no gene *KRAS* (p.Gly12Asp) é possível observar que a partir de uma percentagem de 15% de células tumorais a presença de um pico de fluorescência correspondente à mutação (seta). Para percentagens superiores de células AGS a mutação é progressivamente mais nítida. Para valores inferiores (0%, 5% e 10%), a mutação no gene *KRAS* não é detetada;

4.2. Caracterização molecular dos casos em estudo

A análise mutacional dos codões 12 e 13 do gene *KRAS* foi possível nas 111 amostras de tumor em estudo pelo método de sequenciação direta segundo Sanger. Em 8 casos não foi possível efetuar a análise molecular pelo método do *SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit* (103 casos no total). Exemplos dos resultados obtidos para ambas as metodologias em estudo estão apresentados na Figura 7.

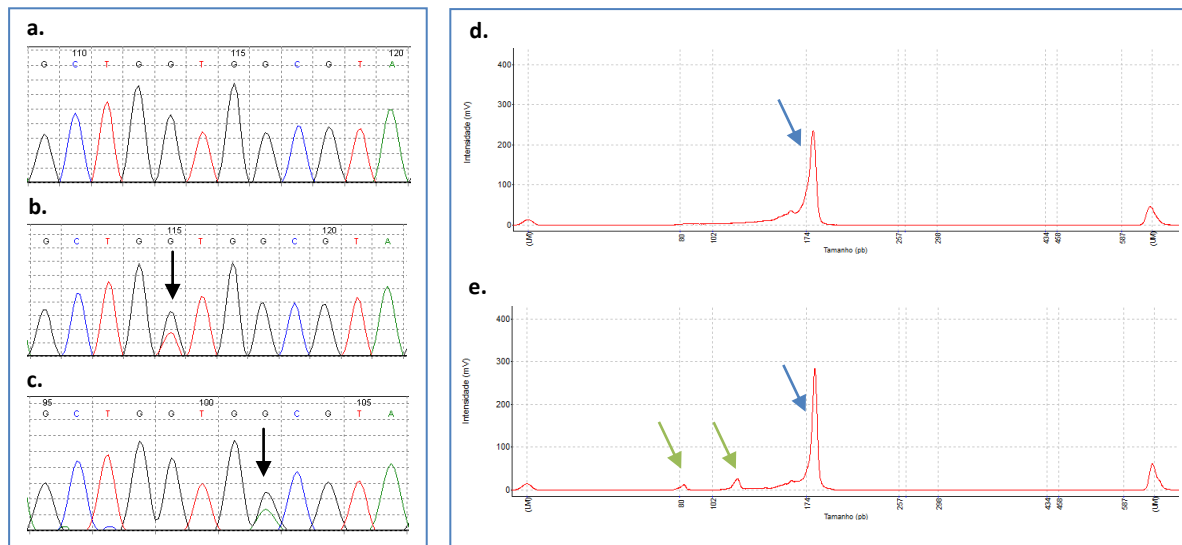


Figura 7 – Exemplos de resultados obtidos na análise dos codões 12 e 13 do gene *KRAS* por sequenciação direta e pelo método *Surveyor Scan kit*. À esquerda, eletroferogramas obtidos por sequenciação direta: (a.) sequência *wild-type* (sem mutação); (b.) sequência com a mutação p.Gly12Val no codão 12; (c.) sequência com a mutação p.Gly13Asp no codão 13. Locais de mutação indicados com seta preta; À direita, resultados da análise de fragmentos pelo *Surveyor Scan kit*. (d.) resultado negativo para mutação; (e.) resultado positivo para mutação. Setas azuis indicam fragmentos *wild-type* que não sofreram digestão e setas verdes correspondem ao produto de digestão dos fragmentos contendo mutação para o gene *KRAS*.

4.2.1. Frequência e distribuição mutacional do gene *KRAS*

Das 111 amostras analisadas por sequenciação direta, 59 casos (53,2%) foram consideradas *wild-type* e 52 (46,8%) mutados (Tabela 4). Através do *SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit*, foram identificados 51 casos *wild-type* (49,5%) e 52 (50,5%) reportados como positivos para a mutação neste gene (Tabela 5).

Para o método de sequenciação direta, do total das mutações observadas no exão 2 no gene *KRAS* foram mais frequentes as mutações no codão 12 que as mutações ao nível do codão 13 (80,8% versus 19,2%, respetivamente). As mutações p.Gly12Val e p.Gly12Asp foram as mais frequentes no codão 12 com 17,1% e 15,3%, respetivamente,

seguidas das mutações p.Gly12Ser (2,7%) e p.Gly12Cys (1,8%). No total de amostras analisadas, apenas um caso envolvendo o codão 12 com a mutação p.Gly12Ala (0,9%) foi reportado. A mutação p.Gly12Arg não foi encontrada em nenhum caso neste estudo por sequenciação direta. No codão 13, predominou a substituição p.Gly13Asp, observada em 9 casos (8,1%), com apenas um caso contendo a mutação p.Gly13Cys (Tabela 4).

Tabela 4 – Frequência mutacional do gene *KRAS* segundo o método de sequenciação direta segundo Sanger para as 111 amostras em estudo;

Estado mutacional do <i>KRAS</i>	Nº de Casos	%
Wild-type	59	53,2
Mutado	52	46,8
Mutação no codão 12		
p.Gly12Val	19	17,1
p.Gly12Asp	17	15,3
p.Gly12Ser	3	2,7
p.Gly12Cys	2	1,8
p.Gly12Ala	1	0,9
p.Gly12Arg	0	-
Mutação no codão 13		
p.Gly13Asp	9	8,1
p.Gly13Cys	1	0,9

Tabela 5 - Frequência mutacional do gene *KRAS* segundo o método *SURVEYOR Scan K-RAS Mutation Detection Kit* para as 103 amostras em estudo;

Estado mutacional do <i>KRAS</i>	Nº de Casos	%
Wild-type	51	49,5
Mutado	52	50,5

4.2.2. Comparação dos resultados da análise molecular entre as metodologias em estudo

Avaliando os resultados obtidos pelo método de sequenciação direta segundo Sanger e pelo kit comercial *Surveyor Scan*, foi obtida uma concordância de 95,1% (98/103) entre as metodologias e foram identificados 5 casos (4,9%) com resultados discrepantes (Tabela 6).

Tabela 6 – Correlação dos resultados obtidos entre o método de sequenciação direta e o *Surveyor Scan kit*.

Sequenciação direta	<i>Surveyor Scan kit</i>		
	MUT	WT	Total
MUT	48	1	49
WT	4	50	54
Total	52	51	103

WT – *Wild-type*, MUT – Mutado;

A análise dos resultados discrepantes encontra-se apresentada na tabela 7. Um dos casos foi positivo por sequenciação direta, e considerado *wild-type* para o gene *KRAS* pelo *Surveyor Scan kit*. Contrariamente, os restantes 4 casos discordantes, foram considerados negativos para a mutação no gene *KRAS* por sequenciação direta, mas positivos pelo *Surveyor Scan kit*.

Tendo em conta a avaliação microscópica da percentagem de células tumorais dos casos não concordantes verifica-se que, para o caso positivo para mutação por sequenciação direta (caso 1), a sua percentagem de células tumorais foi avaliada em 50%, estando assim, dentro do limite de deteção para ambas as metodologias em estudo. Para os casos negativos apenas pelo método de sequenciação direta, a percentagem de células tumorais demonstrou ser reduzida (10%) para dois dos casos (caso 2 e 3), encontrando-se por isso abaixo do limite de deteção da sequenciação direta, mas dentro do limite de sensibilidade analítica do método *Surveyor Scan kit*. Contrariamente, os casos 4 e 5, também negativos por sequenciação direta, foram avaliados com uma percentagem de células tumorais de 50% e 60%, respetivamente, encontrando-se dentro dos limites de deteção de ambos os métodos.

Tabela 7 - Comparação dos resultados obtidos por Sequenciação direta e *Surveyor Scan Kit* dos casos com resultados não concordantes e respetiva percentagem de células tumorais da avaliação microscópica;

Caso não concordante	Conteúdo tumoral (% de células tumorais)	Metodologia	
		Sequenciação direta (LDD – 20%)	<i>Surveyor Scan Kit</i> (LDD – 5%)
1	50	12 Asp	WT
2	10	WT	MUT
3	10	WT	MUT
4	50	WT	MUT
5	60	WT	MUT

LDD – Limite de deteção da metodologia em percentagem de células tumorais; WT – *Wild-type*, MUT – Mutado;

4.2.3. Correlação das metodologias em estudo com NGS: Classificação de casos não concordantes

Para os casos que apresentaram resultados discrepantes entre as técnicas moleculares em estudo foi realizada MPS no *PGM™*, constituindo este, o método de referência para a classificação dos casos não concordantes. Para além dos 5 casos discrepantes, foram ainda incluídos 24 casos com resultado concordante entre as duas metodologias em estudo (casos *wild-type* e casos positivos para mutação no codão 12 ou 13 do gene *KRAS*) como controlos negativos e positivos. Os casos analisados por NGS foram considerados positivos para mutação no gene *KRAS* sempre que as variantes detetadas se encontravam numa percentagem alélica superior a 1%.

Os resultados de NGS, para os 5 casos com resultados não concordantes entre ambas as metodologias (tabela 8), confirmaram para o método do *Surveyor Scan* a presença de mutação para 4 dos casos discrepantes e apenas um caso considerado *wild-type* por *Surveyor Scan kit* foi classificado como falso negativo. Para o método de sequenciação direta, os resultados de NGS indicam 4 casos como falsos negativos, confirmando apenas uma mutação (caso 1).

Dos resultados de NGS foram ainda identificados 2 casos classificados como *wild-type* por ambas as metodologias, e por isso, dados como falsos negativos. Para estes casos o controlo morfológico indicou uma percentagem de células tumorais diminuta, inferior a 5% no caso 6 e de 10% no caso 7, ambos abaixo do limite de sensibilidade do método de sequenciação direta e, para o método *Surveyor Scan kit*, abaixo do limite de deteção no caso 6 e dentro do limite de sensibilidade analítica no caso 7.

Os restantes 22 casos incluídos como controlos (75,9% dos casos) (com resultado prévio concordante) confirmaram o resultado obtido pelas metodologias em estudo.

Os sete casos identificados com resultado discrepante foram avaliados, independentemente, por dois patologistas em relação à percentagem de células tumorais.

Tabela 8 – Comparação dos resultados obtidos por Sequenciação direta, *Surveyor Scan Kit* e NGS dos casos com resultados não concordantes e respetiva percentagem de células tumorais da avaliação microscópica;

Caso	Conteúdo tumoral (% de células tumorais)	Metodologia		
		Sequenciação direta (LDD – 20%)	<i>Surveyor Scan Kit</i> (LDD – 5%)	NGS (<i>Cut-off</i> > 1% alelos mutados)*
1	50	12 Asp	WT	12 Asp (5,3%)
2	10	WT	MUT	12 Arg (3,4%)
3	10	WT	MUT	13 Asp (1,6%)
4	50	WT	MUT	12 Val (6,7%)
5	50	WT	MUT	12 Asp (7%)
6	< 5	WT	WT	12 Asp (2,5%)
7	< 10	WT	WT	13 Asp (2,5%)

LDD – Limite de deteção da metodologia em percentagem de células tumorais; **Cut-off* maior que 1% de alelos mutados para considerar positivo para mutação; WT – *Wild-type*, MUT – Mutado;

Uma análise combinada dos resultados obtidos pelas 3 diferentes metodologias encontra-se apresentada na tabela 9. A sensibilidade para o método de sequenciação direta de Sanger, tendo como referência a NGS, foi de 89,66% (95% CI [78,82% a 96,08%]) e a especificidade de 100% (95% CI [93,21% a 100,00%]). Para o método de *Surveyor Scan kit*, obteve-se um desempenho superior, com uma sensibilidade de 94,55% (95% CI [84,86% a 98,80%]) e especificidade de 100% (95% CI [92,53% a 100,00%]). Uma exatidão⁵ de 94,60% e de 97,10% foi obtida, para o método de sequenciação direta e *Surveyor Scan kit*, respetivamente.

Tabela 9 - Correlação dos resultados obtidos por Sequenciação direta e *Surveyor Scan Kit* com os resultados de NGS;

NGS	Sequenciação direta			<i>Surveyor Scan kit</i>		
	MUT	WT	Total	MUT	WT	Total
MUT	52	6	58	52	3	55
WT	0	53	53	0	48	48
Total	52	59	111	52	51	103

WT – *Wild-type*, MUT – Mutado;

⁵ Exatidão – capacidade da metodologia em análise ter resultados iguais ao método utilizado como referência;

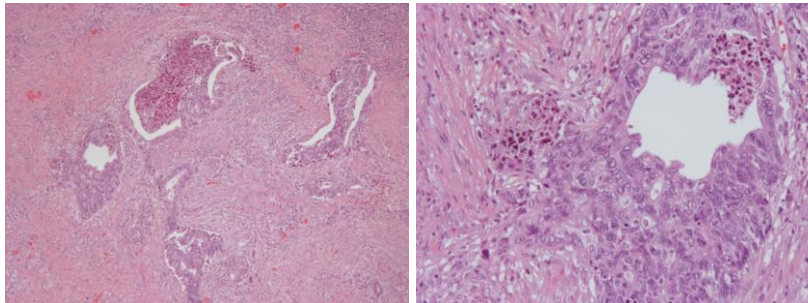
4.3. Correlação do controlo morfológico com a análise molecular

O controlo morfológico da percentagem de células tumorais foi efetuado para 61 do total de 111 casos em análise (em 55% dos casos). A mediana de percentagem de células tumorais foi de 60%, num intervalo de 5% a 95% (excluindo deste intervalo o caso 6 que foi avaliado com uma percentagem menor que 5%).

Na seguinte figura 8 encontram-se exemplificados algumas imagens histológicas dos casos em estudo. O primeiro exemplo corresponde a um dos casos com resultado discrepante entre a sequenciação direta e o *Surveyor Scan kit* (caso 2), avaliado com 10% de células tumorais. Na imagem apresentada (Figura 8A), são observados pequenos focos de tumor, envolvidos por células normais do estroma circundante, presente numa maior proporção que as células tumorais.

Por sua vez, para a Figura 8B verifica-se que a percentagem de células tumorais é superior. Nesta imagem histológica, representativa do caso 5 dos casos com resultados discrepantes, e avaliada com 60% de células tumorais, é evidente a maior proporção de células tumorais, mas que surgem mais dispersas no estroma normal envolvente, no qual se observa ainda algum infiltrado inflamatório e necrose.

(A) Avaliação morfológica de um caso com 10% de células tumorais (caso 2);



(B) Avaliação morfológica de um caso com 60% de células tumorais (caso 5);

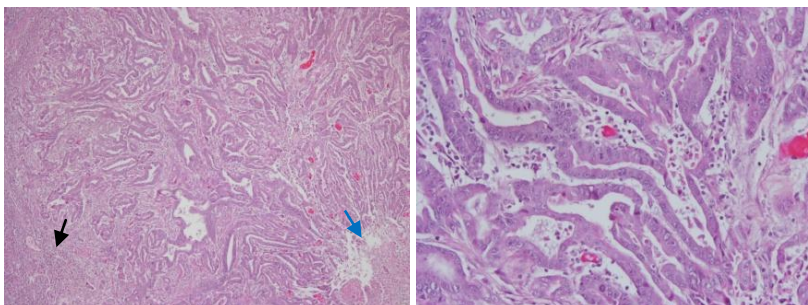


Figura 8 – Imagens de cortes histológicos corados por H&E e respetiva avaliação morfológica do conteúdo em células tumorais. (A) Caso avaliado com 10% de células tumorais (caso 2), onde se observam-se pequenos focos contendo células tumorais rodeadas de células normais do estroma, que se encontram numa proporção consideravelmente superior à de tumor; **(B)** Caso contendo 60% de células tumorais (caso 5). As células tumorais encontram-se mais dispersas no estroma normal circundante, e em proporções mais equivalentes com o estroma normal envolvente. Seta preta indica infiltrado inflamatório e seta azul, zona com necrose; Ampliação total de 50X e 200X, da esquerda para a direita, respetivamente.

A avaliação do controlo morfológico do conteúdo tumoral foi correlacionada com os resultados obtidos da análise molecular pelas diferentes metodologias em estudo. Do total de casos com controlo morfológico, apenas um dos casos avaliados se encontra abaixo do limite de deteção do método do *Surveyor Scan kit* (5% de células tumorais). Por sua vez, para o método de sequenciação direta de Sanger foram avaliados, abaixo do seu limite de deteção, 7 casos contendo menos de 20% de células tumorais, sendo os restantes casos classificados com uma percentagem igual ou superior.

Desta forma, tendo em conta o conteúdo tumoral da avaliação microscópica, efetuando uma reanálise dos resultados moleculares obtidos, e excluindo todos os casos que não cumprem os critérios morfológicos (ou seja, aqueles que contêm uma percentagem de células tumorais inferiores à sensibilidade analítica das metodologias em estudo), e considerando ainda que os casos onde não foi possível o controlo morfológico cumprem esses critérios morfológicos, são obtidos os resultados apresentados na seguinte tabela 10.

Tabela 10 - Correlação dos resultados obtidos por Sequenciação direta, *Surveyor Scan Kit* e NGS, com a exclusão dos casos com percentagem de células tumorais inferiores à sensibilidade analítica das metodologias em estudo;

NGS	Sequenciação direta			<i>Surveyor Scan kit</i>		
	MUT	WT	Total	MUT	WT	Total
MUT	50	2	52	52	2	54
WT	0	52	52	0	48	48
Total	50	54	104	52	50	102

WT – *Wild-type*, MUT – Mutado;

Com os resultados da reanálise obtém-se um aumento de sensibilidade para ambas as metodologias. O método de sequenciação de Sanger surge com um valor de 96,15% (95% CI [86,76% a 99,42%]) e mantendo a especificidade de 100% (95% CI [93,08% a 100,00%]). Por sua vez, para o método *Surveyor Scan kit*, apresenta uma sensibilidade de 96,30% (95% CI [87,23% a 99,42%]), mantendo de igual forma a especificidade nos 100% (95% CI [92,53% a 100,00%]). Em consequência, ambos os métodos surgem com uma exatidão idêntica, de aproximadamente 98% (98,10% para sequenciação direta e 98,04% para o método *Surveyor Scan kit*) (Tabela 11).

Tabela 11 – Comparação dos valores de sensibilidade, especificidade e exatidão obtidos pelo método de Sequenciação direta e método do *Surveyor Scan kit* antes e após considerar os resultados do controlo morfológico;

	Sequenciação direta		<i>Surveyor Scan kit</i>	
	Sem controlo morfológico	Com controlo morfológico	Sem controlo morfológico	Com controlo morfológico
Sensibilidade	89,66%	96,15%	94,55%	96,30%
Especificidade	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Exatidão	94,60%	98,10%	97,10%	98,04%

Uma análise molecular tendo em conta o conteúdo tumoral das amostras em análise, promoveu um aumento do desempenho global das metodologias em estudo para o estudo mutacional do gene *KRAS*.

5. Discussão

A detecção de mutações somáticas no gene *KRAS* tem atualmente um importante impacto a nível clínico pelo seu valor preditivo na terapia com anticorpos monoclonais anti-*EGFR* (Cetuximab e Panitumumab) em pacientes com CCRm. As mutações no *KRAS* podem ser detetadas por muitas metodologias, não existindo uma técnica *gold-standard* para a análise mutacional deste gene que se utilize como referência. É importante a realização de estudos de comparação sistemática da sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade de diferentes técnicas moleculares para a genotipagem do *KRAS*, bem como, conhecer e compreender o impacto que a amostra em estudo pode possuir na análise, nomeadamente, no que se relaciona com o seu conteúdo tumoral.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a importância da caracterização histopatológica na definição da sensibilidade e especificidade de diferentes técnicas moleculares no diagnóstico molecular das mutações no gene *KRAS* em pacientes com CCRm.

O estudo incluiu a análise molecular de 111 amostras de tumores coloretais metastáticos, para as quais foi efetuada a caracterização molecular por sequenciação direta pelo método de Sanger e através do método *Surveyor Scan KRAS Mutation detection kit*. Do total de amostras em estudo, não foi possível efetuar a análise molecular em 8 amostras pelo *Surveyor Scan kit*. Este fato pode ser justificado pelas amostras em questão possuírem ADN de menor qualidade. A possível fragmentação do ADN por fixação em formalina e/ou degradação desde o momento da extração (ano 2009 e 2010) pode reduzir as taxas de sucesso da reação de PCR. Por outro lado, segundo este kit comercial, é necessária uma concentração do produto amplificado igual ou superior a 20 ng/μl para gerar resultados possíveis de análise. Neste sentido, apesar de ser possível a amplificação na maioria das amostras, os produtos de amplificação apresentando concentrações inferiores aos 20 ng/μl, não são passíveis de análise pelo *Surveyor Scan kit*. Em contrapartida, para o método de sequenciação direta, a obtenção de produtos amplificados com concentrações menores são, em princípio, suficientes para a análise molecular por esta metodologia, sugerindo, por isso, ser um método menos dependente da qualidade geral do ADN extraído.

Do total de amostras analisadas no presente trabalho, as frequências mutacionais obtidas para o exão 2 do gene *KRAS* demonstraram encontrar-se um pouco acima dos valores descritos na literatura. Foi obtida uma percentagem de casos positivos de 46,8% pelo método de sequenciação direta segundo Sanger e de 50,5% pelo método *Surveyor*

Scan kit. Estudos envolvendo uma amostragem superior seriam necessários para uma aproximação aos valores descritos na literatura. Por outro lado, segundo o método de sequenciação direta, a presença de mutações no codão 12 (80,8%) demonstrou ser superior, que no codão 13 (19,2%) o que está em consonância com a literatura. As mutações p.Gly12Val, p.Gly12Asp e p.Gly13Asp foram, por sua vez, as mais frequentemente observadas, o que também está em concordância com o já descrito (1, 19).

No presente trabalho foi avaliada a sensibilidade analítica do método de sequenciação direta de Sanger, comparando o desempenho deste método com o kit comercial *Surveyor Scan*. A análise comparativa dos resultados entre as duas metodologias demonstrou uma concordância de 95,1% (98/103) com 4,9% de casos discrepantes (5/103). Em termos de sensibilidade, a sequenciação direta surge como o método menos sensível (sensibilidade de 89,66%) em comparação com o *Surveyor Scan kit* (sensibilidade de 94,55%), que demonstrou um desempenho relativamente superior à sequenciação direta (uma exatidão de 97,10% versus 94,60%, respetivamente). Ambas as metodologias apresentaram uma especificidade de 100%.

Tendo em conta as discrepâncias obtidas, de forma a classificar os casos com resultado não concordante, foi realizada MPS no *PGM™*. Os resultados obtidos confirmaram a mutação em 4 casos classificados como falsos negativos por sequenciação direta e um falso negativo por *Surveyor Scan kit*.

A presença de dois falsos negativos (caso 2 e 3) por sequenciação direta relaciona-se com a percentagem de células tumorais, abaixo do limite de deteção da metodologia (valores de 5% e 10% de células tumorais). Na verdade, a sequenciação direta pelo método de Sanger permanece como a metodologia *gold-standard* para a análise de mutações somáticas em amostras tumorais, mas que se caracteriza por uma sensibilidade inferior, especialmente, para amostras com baixo conteúdo tumoral. Um dos objetivos do presente estudo, incluiu a definição dos limites de sensibilidade analítica. Como apresentado na Figura 6 estabeleceu-se um limite de 20% de células tumorais como nível de sensibilidade analítica para a sequenciação direta de Sanger, capaz de detetar cerca de 10% de alelos mutados com mutação em heterozigotia, e cujo valor é corroborado pela literatura (1, 23, 26, 31, 52, 53).

Em oposição, os restantes dois casos classificados como falsos negativos por sequenciação direta segundo Sanger (caso 4 e 5), apresentaram uma percentagem de células tumorais elevada (50% e 60%, respetivamente), e por isso, dentro do limite de sensibilidade analítica do método. Os resultados obtidos por NGS demonstraram porém, que a mutação identificada encontra-se numa percentagem alélica baixa, de aproximadamente 7% para ambos os casos, um valor que está abaixo do limite de

deteção do método de sequenciação direta, mas dentro dos valores de sensibilidade analítica estabelecidos para o *Surveyor Scan kit*. É de realçar que a análise molecular de uma amostra tumoral é limitada não só pela heterogeneidade celular, mas também pela heterogeneidade molecular, ou seja, a existência de subclones contendo diferentes genótipos. A heterogeneidade entre as células tumorais (com e sem mutação), aliada ao fato de todas as amostras em estudo possuírem alguma percentagem de células do estroma normal, pode resultar numa relativamente baixa percentagem de alelos mutados em algumas das amostras em estudo, mascarando a deteção das mutações. A avaliação histopatológica é uma estimativa do conteúdo de células tumorais, mas não preditiva da frequência de alelos mutados (43). E o que pode justificar a diferença observada entre a percentagem de células tumorais estimada na avaliação microscópica e a percentagem alélica obtida por NGS, particularmente, evidenciada no caso 1, 4 e 5. Existem dois desafios importantes para uma análise concludente do gene *KRAS* em tecido coloretal: a heterogeneidade da amostra em estudo e as diferenças nos limites de deteção para mutações distintas (17, 54).

O método de *Surveyor Scan kit* apresentou, do total de 5 casos com resultado discrepante entre as duas metodologias em estudo, apenas um caso discordante com os resultados de NGS (caso 1). O único caso classificado como falso negativo por esta metodologia, positivo por sequenciação direta, e avaliado com 50% de células tumorais, confirmou por NGS a presença da mutação em causa com 5,3% de alelos mutados. Um fator importante, e já mencionado, é a importância da qualidade geral do ADN extraído, ao nível da precisão e sensibilidade do método utilizado para genotipagem do *KRAS* (20, 25). A qualidade do ADN da amostra em causa não era ótima. A sensibilidade de uma metodologia com base em PCR é dependente das condições físico-químicas da reação, da concentração e natureza do ADN alvo e dos *primers* selecionados. Uma justificação para a obtenção deste resultado falso negativo, inclui as diferenças na eficiência das reações de amplificação, que podem conduzir a um enviesamento, onde uma cadeia *wild-type*, que é copiada nos primeiros ciclos da reação de PCR, conduz a que a mesma seja, preferencialmente, amplificada, e conseqüentemente, “disfarçando” a mutação. Por outro lado, a análise microscópica avaliou este caso com uma percentagem de células tumorais, acima do limite de deteção de ambos os métodos. A necessidade de repetição e confirmação deste resultado pelo método comercial é um passo a seguir. Contudo, ainda não foi possível esclarecer até ao momento este resultado.

A análise por NGS demonstrou ainda a presença de dois casos com resultado *wild-type* por ambas as metodologias em estudo, e por isso dados como falsos negativos (caso 6 e 7). Segundo o controlo morfológico da percentagem de células tumorais, estes casos apresentam valores diminutos, de menos de 5% (caso 6) e 10% (caso 7) de

células tumorais. O caso 6 está abaixo do limite de detecção de ambas as metodologias, e o caso 7 encontra-se dentro do limite de detecção apenas para o método comercial *Surveyor Scan kit*. Por NGS as mutações foram observadas com uma percentagem alélica de 2,5% para ambos os casos. Neste sentido, é possível verificar que a presença destes dois falsos negativos ocorreu devido aos alelos mutados se encontrarem numa percentagem abaixo do nível de detecção do método de sequenciação direta e, por sua vez, no limite mínimo de detecção do método de *Surveyor Scan kit*, que falhou na sua detecção. Este ponto reforça que mesmo seguindo os critérios de seleção tendo em conta o controlo morfológico, e conciliando com a técnica molecular e o seu limite de sensibilidade analítica, existem casos que mesmo assim podem passar como falsos negativos. A utilização de NGS é um exemplo de uma metodologia capaz de detetar mutações em percentagens alélicas ínfimas e que quantifica os alelos mutantes presentes num *background* de alelos *wild-type*. Contudo, a sua aplicabilidade a nível diagnóstico na detecção de mutações somáticas carece de validação, crucial em laboratórios acreditados. Inúmeros desafios, particularmente, no que se relaciona com a análise e interpretação dos dados, têm que ser ultrapassados (58). Por outro lado, as mutações identificadas por NGS e cujas frequências são muito baixas não podem ser confirmadas com sequenciação direta segundo Sanger devido às limitações de sensibilidade (62). A presença de frequências tão baixas de alelos mutados no gene *KRAS* em tumores classificados como *KRAS wild-type* pelas técnicas de rotina, pode condicionar a resposta à terapia anti-EGFR. De fato, o tratamento pode favorecer a que um subclone contendo mutação no gene *KRAS* em reduzida percentagem alélica, possa ser selecionado positivamente, determinando a posterior resistência à terapia observada nestes pacientes (45, 53). Apesar da elevada sensibilidade das novas técnicas de sequenciação em detetar esses subclones latentes pode, por sua vez, haver a exclusão de pacientes que até iriam beneficiar da terapia. Seria por isso, importante avaliar a resposta destes pacientes, negativos por sequenciação direta, à terapia monoclonal anti-EGFR.

Por outro lado, numa rotina de diagnósticos, deve ser tido em conta, que para a detecção de mutações no gene *KRAS*, as amostras são, na maioria dos casos, tecidos processados na rotina anatomopatológica, e por isso, a quantidade de células normais mascara a componente tumoral do tecido em análise. O papel do patologista, na seleção da amostra tumoral e na avaliação da percentagem de células tumorais, é fundamental, para garantir que existem células tumorais suficientes para a análise molecular (dentro do limite de sensibilidade analítica da metodologia selecionada). Uma forma de promover um aumento da sensibilidade é através da macrodisseção, ou seja, aumentando o número de células tumorais em relação ao número de células circundantes do estroma normais no

ADN genómico extraído. O patologista surge mais uma vez, como um elemento fulcral na identificação das amostras que necessitam de macrodisseção, e assim, garantir que se encontram dentro do limite de deteção da técnica selecionada. A realização de macrodisseção para casos contendo uma baixa percentagem de células tumorais é hoje em dia um procedimento de rotina, promovendo um aumento do conteúdo tumoral no material em análise, e assim aumentar a capacidade de deteção da mutação se presente.

Um dos objetivos do presente trabalho, englobou a análise microscópica do conteúdo em células tumorais das amostras em estudo, e possível em 61 casos. Em nenhuma das amostras estudadas foi realizada macrodisseção aquando da extração. No exemplo apresentado na Figura 8A, de um caso avaliado com 10% de células tumorais (caso 2), as zonas de tumor surgem em focos isolados, de pequenas dimensões, rodeados de estroma com células normais. A macrodisseção manual neste caso teria promovido um aumento do ADN tumoral no total de ADN genómico extraído, podendo ter aumentado a capacidade de deteção da mutação pelo método de sequenciação direta (metodologia onde falhou a deteção). Contudo, a não realização deste procedimento conduziu a que no total de ADN genómico extraído, o ADN tumoral ficasse diluído no ADN normal das células do estroma envolvente, e que competem entre si na reação de amplificação (63, 64). A macrodisseção surge como um procedimento importante para diminuir esse efeito. Tal facto também se reproduz para o caso 5 (Figura 8B) mesmo tendo em conta a maior proporção de células tumorais versus células normais do estroma circundante, que segundo o controlo morfológico se encontram em proporções quase equivalentes.

É de referir ainda, apesar de incluir um ponto não aprofundado no presente trabalho, mas cuja importância é conhecida, a variabilidade que pode ocorrer na forma de avaliação entre diferentes patologistas, e o que revela as deficiências persistentes na padronização das avaliações anatomopatológicas. Apenas o CAP, estabeleceu recomendações gerais que contemplam que as amostras tumorais para análise molecular devem ser especificamente selecionadas por um patologista, incluindo, predominantemente, células tumorais, e excluindo a presença significativa de inflamação e/ou necrose (20, 24). Fatores estes que podem diminuir a sensibilidade da técnica molecular, mesmo quando metodologias com uma sensibilidade analítica superior são utilizadas. Por exemplo, na Figura 8B, é evidente a presença de um algum infiltrado inflamatório a rodear as zonas contendo tumor e alguma necrose. Para este caso específico (caso 5), e como já discutido, os resultados moleculares obtidos foram discordantes entre as metodologias em estudo, falhando a deteção da mutação por sequenciação direta. Angulo, B., *et al.* demonstraram que parâmetros morfológicos como a presença de infiltrado inflamatório e conteúdo mucinoso, afetam a deteção das

mutações por diferentes metodologias, com diferentes limites de sensibilidade analítica (incluindo a sequenciação direta segundo Sanger) (65). Neste sentido, a realização de estudos posteriores, avaliando o real impacto destes parâmetros histológicos ao nível dos resultados moleculares é importante, especialmente, no sentido de padronizar a forma de avaliação e seleção da amostra para estudo molecular.

Uma segunda fase do trabalho teve como objetivo a correlação dos resultados do controlo morfológico e os resultados moleculares obtidos. Tendo em conta os resultados da análise molecular e limites de sensibilidade analítica das metodologias em estudo, e correlacionando com os valores das percentagens do conteúdo de células tumorais estimadas pelo patologista, verifica-se que a mutação apenas é detetada de forma reprodutível caso a percentagem de células tumorais da amostra em análise esteja dentro dos limites de sensibilidade analítica do método molecular selecionado. Neste sentido, a realização de um controlo morfológico, numa fase inicial, poderia ter evitado a obtenção de alguns falsos negativos, nomeadamente, por sequenciação direta (método com menor sensibilidade) uma vez que foram consideradas amostras que não eram adequadas para a análise. Estes resultados foram evidentes quando se recalcularam as sensibilidades e especificidades das metodologias em estudo, excluindo todos os casos que não cumpriam os critérios morfológicos (percentagem de células tumorais abaixo do limite de sensibilidade da metodologia). Da reanálise as metodologias demonstraram um desempenho semelhante. Foi obtido um aumento da sensibilidade, para ambos os métodos que apresentaram um valor idêntico, de aproximadamente 96%, e mantendo a especificidade de 100% em ambos. Consequentemente, ambas as metodologias surgem com um exatidão também aumentada, de cerca de 98%.

Estes resultados demonstram que a sensibilidade do método de sequenciação direta, bem como, para o método do *Surveyor Scan Kit*, pode ser aumentada, desde que associado a uma caracterização histopatológica do conteúdo de células tumorais da amostra em análise. Na verdade, estes resultados realçam a importância da seleção e avaliação da amostra para o estudo molecular. É fundamental a sua adequação tendo em conta a metodologia utilizada e assim garantir que os resultados sejam corretamente interpretados e o diagnóstico molecular efetuado com o rigor exigido.

Cada laboratório deve por isso garantir o desempenho dos seus exames com a maior qualidade possível, validando os seus procedimentos e participando nos programas de controlo de qualidade, subscrevendo-se, por exemplo, em testes de proficiência fornecidos pelo CAP (20). A participação nestes testes de proficiência, por exemplo para o *KRAS*, permitem uma melhoria na validação dos procedimentos técnicos, minimizando, a ocorrência de erros que possam surgir numa qualquer fase do procedimento, e garantir assim, a qualidade dos seus serviços.

Foi verificado adicionalmente que, para o método de sequenciação direta, uma sequenciação bidirecional dos produtos de amplificação (sentido *foward* e *reverse*) demonstra resultados mais fidedignos, minimizando, enviesamentos por má interpretação das sequências devido à presença de ruído de fundo e atuando como uma dupla confirmação do resultado, especialmente se a mutação se encontra no limiar do limite de detecção. Por sua vez, o método comercial *Surveyor Scan kit*, demonstrou possuir a principal desvantagem de não fornecer informação acerca da mutação específica quando detetada. Existindo a necessidade de recorrer à sequenciação automática para genotipar a mutação.

6. Conclusão

Uma detecção precisa de mutações no gene *KRAS* é crucial no diagnóstico molecular pela importância na seleção do tratamento adequado de pacientes com CCRm. São diversas as metodologias que podem ser utilizadas para a genotipagem do *KRAS*, mas que carecem de estudos que validem o seu desempenho. A necessidade de validação de métodos e estabelecimento e implementação de *guidelines* na prática clínica para a detecção de mutações neste gene é visível.

No presente estudo, numa primeira fase, a metodologia *Surveyor Scan* demonstrou uma maior sensibilidade na detecção das mutações no gene *KRAS*, quando comparada com o método de sequenciação direta, e o que seria expectável. Numa segunda fase, tendo em conta os resultados obtidos de análise molecular, e aliando agora os limites de sensibilidade analítica das metodologias em estudo, e correlacionando com os valores das percentagens do conteúdo de células tumorais estimadas pelo patologista, houve a confirmação que existe uma correlação com a capacidade de detecção da mutação com uma percentagem de células tumorais da amostra em análise, e que se deve encontrar acima do limite de sensibilidade analítica do método molecular selecionado.

A escolha por que método usar, na medida em que não existe, até ao momento, nenhuma metodologia *standard* para o estudo mutacional do gene *KRAS*, deve incluir uma avaliação de inúmeros fatores, abrangendo, o limite de detecção da metodologia, a sensibilidade (falsos negativos) e especificidade (falsos positivos), reprodutibilidade, *turn-around time* e custos, tendo sempre por base, a experiência do laboratório, equipamentos disponíveis e facilidade na obtenção dos resultados.

Diferentes métodos podem ser utilizados para teste molecular do gene *KRAS* em amostras tumorais numa rotina de diagnósticos, cada um deles englobando vantagens e desvantagens. A maior experiência existe nos laboratórios utilizando a sequenciação direta após PCR, que sendo relativamente acessível em termos de custos, quando comparada aos kits comerciais, se associada a uma caracterização anatomopatológica da amostra em análise, demonstra ser tão sensível e fidedigna, na produção de resultados credíveis e em tempo útil, quando comparada com as restantes metodologias para estudo mutacional do gene *KRAS*.

Num teste de genotipagem do *KRAS*, é importante garantir a qualidade do processo na fase analítica e pós-analítica, mas não esquecer a fase pré-analítica, onde a necessidade de padronização é evidente. A qualidade do exame está dependente de

vários fatores, desde o momento de colheita do material, da preparação da amostra (sua fixação e processamento), bem como, da seleção e adequação para análise molecular em termos de conteúdo tumoral. O patologista possui por isso um importante papel em várias etapas do processo.

Em conclusão, os resultados da avaliação do estado mutacional do gene KRAS não devem estar dependentes apenas do método molecular a utilizar para genotipagem, uma vez que todos eles fornecem resultados válidos. O estudo permitiu demonstrar a real importância em aliar à metodologia selecionada para análise molecular, uma avaliação histopatológica das amostras em análise, devidamente selecionadas e avaliados por um patologista, fator crucial a se ter em conta aquando a análise dos resultados para a realização um diagnóstico preciso.

7. Referências bibliográficas

1. Custodio A, Feliu J. Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer: Beyond KRAS mutations. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2013 Jan;85(1):45-81. PubMed PMID: 22647972.
2. Tol J, Punt CJ. Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer: a review. *Clinical therapeutics*. 2010 Mar;32(3):437-53. PubMed PMID: 20399983.
3. Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk factors. *Clinics in colon and rectal surgery*. 2009 Nov;22(4):191-7. PubMed PMID: 21037809. Pubmed Central PMCID: 2796096.
4. Karsa LV, Lignini TA, Patnick J, Lambert R, Sauvaget C. The dimensions of the CRC problem. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2010 Aug;24(4):381-96. PubMed PMID: 20833343.
5. Alberts SR, Wagman LD. Chemotherapy for colorectal cancer liver metastases. *The oncologist*. 2008 Oct;13(10):1063-73. PubMed PMID: 18838438.
6. Rizzo S, Bronte G, Fanalea D, Corsinia L, Silvestris N, Santinic D, et al. Prognostic vs predictive molecular biomarkers in colorectal cancer: is KRAS and BRAF wild type status required for anti-EGFR therapy? *Cancer Treat Rev*. 2010:S56–S61.
7. Berg M, Soreide K. Genetic and epigenetic traits as biomarkers in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*. 2011;12(12):9426-39. PubMed PMID: 22272141. Pubmed Central PMCID: 3257138.
8. Ibrahim AEK, Arends MJ. Molecular typing of colorectal cancer: applications in diagnosis and treatment. *Diagnostic Histopathology*. 2012;18(2):70-80.
9. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointest Cancer Res*. 2012;5:19-27.
10. Morán A, Ortega P, Juan C, Fernández-Marcelo T, Frías C, Sánchez-Pernaute A, et al. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol*. 2010 March 15;2(3):151-8.
11. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: Road maps to cancer. *World J Gastroenterol*. 2007 July 28;;13(28):3784-91.
12. Fearon E, Vogelstein B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61:759-67.
13. Wicki A, Herrmann R, Christofori G. Kras in metastatic colorectal cancer. *Swiss medical weekly*. 2010;140:w13112. PubMed PMID: 21104470.

-
14. Wang-Gillam A, Lockhart A, Picus J. Advances in Management of Metastatic Colorectal Cancer. In: Lyden D, Welch D, Psaila B, editors. *Cancer Metastasis: Biologic Basis and Therapeutics*: Cambridge University Press; 2011. p. 356-68.
 15. Wang HL, Lopategui J, Amin M, Patterson SD. KRAS Mutation Testing in Human Cancers: The Pathologist's Role in the Era of Personalized Medicine. *Adv Anat Pathol*. 2010 Jan;17(1):23-32.
 16. Weichert W, Schewe C, Lehmann A, Sers C, Denkert C, Budczies J, et al. KRAS genotyping of paraffin-embedded colorectal cancer tissue in routine diagnostics: comparison of methods and impact of histology. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2010 Jan;12(1):35-42. PubMed PMID: 20007841. Pubmed Central PMCID: 2797716.
 17. van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, Carneiro F, Seruca R, Bosman FT, et al. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2008 Nov;453(5):417-31. PubMed PMID: 18802721.
 18. Laosinchai-Wolf W, Ye F, Tran V, Yang Z, White R, Bloom K, et al. Sensitive multiplex detection of KRAS codons 12 and 13 mutations in paraffin-embedded tissue specimens. *Journal of clinical pathology*. 2011 Jan;64(1):30-6. PubMed PMID: 21030527.
 19. Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, Jung A. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathology, research and practice*. 2009;205(12):858-62. PubMed PMID: 19679400.
 20. Ross JS. Clinical implementation of KRAS testing in metastatic colorectal carcinoma: the pathologist's perspective. *Arch Pathol Lab Med*. 2012 Oct;136(10):1298-307. PubMed PMID: 22272560.
 21. Pinto P, Rocha P, Veiga I, Guedes J, Pinheiro M, Peixoto A, et al. Comparison of methodologies for KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer. *Cancer Genetics*. 2011;204(8):439-46.
 22. Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009 Oct 7;101(19):1308-24. PubMed PMID: 19738166. Pubmed Central PMCID: 2758310.
 23. Herreros-Villanueva M, Aggarwal G. KRAS assay selection: sensitivity and accuracy in clinical application. *Molecular biology reports*. 2012 Mar;39(3):2467-70. PubMed PMID: 21656377.
 24. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009 Apr 20;27(12):2091-6. PubMed PMID: 19188670.
 25. Domagała P, Hybiak J, Sulżyc-Bielicka V, Cybulski C, Ryś J, Domagała W. KRAS mutation testing in colorectal cancer as an example of the pathologist's role in personalized targeted therapy: a practical approach. *Polish Journal of Pathology*. 2012;3:145-64.
 26. Jeong D, Jeong Y, Lee J, Baek M, Kim Y, Cho H, et al. Rapid and Sensitive Detection of KRAS Mutation by Peptide Nucleic Acid-based Real-time PCR Clamping: A Comparison with

Direct Sequencing between Fresh Tissue and Formalin-fixed and Paraffin Embedded Tissue of Colorectal Cancer. *The Korean Journal of Pathology*. 2011;45(2):151.

27. Tan C, Du X. KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2012 October 7;18(37):5171-80.

28. Brand T, Wheeler D. KRAS mutant colorectal tumors: Past and present. *Small GTPases*. 2012;3(1):34-9.

29. Vaughn CP, Zobell SD, Furtado LV, Baker CL, Samowitz WS. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes, chromosomes & cancer*. 2011 May;50(5):307-12. PubMed PMID: 21305640.

30. Bedeir A, Krasinskas AM. Molecular Diagnostics of Colorectal Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 May;135:578-87.

31. Molinari F, Felicioni L, Buscarino M, De Dosso S, Buttitta F, Malatesta S, et al. Increased detection sensitivity for KRAS mutations enhances the prediction of anti-EGFR monoclonal antibody resistance in metastatic colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011 Jul 15;17(14):4901-14. PubMed PMID: 21632860.

32. Lamy A, Blanchard F, Le Pessot F, Sesboue R, Di Fiore F, Bossut J, et al. Metastatic colorectal cancer KRAS genotyping in routine practice: results and pitfalls. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2011 Aug;24(8):1090-100. PubMed PMID: 21516079.

33. Bellon E, Ligtenberg MJ, Tejpar S, Cox K, de Hertogh G, de Stricker K, et al. External quality assessment for KRAS testing is needed: setup of a European program and report of the first joined regional quality assessment rounds. *The oncologist*. 2011;16(4):467-78. PubMed PMID: 21441573. Pubmed Central PMCID: 3228116.

34. Dijkstra JR, Heideman DA, Meijer GA, Boers JE, t Hart NA, Diebold J, et al. KRAS mutation analysis on low percentage of colon cancer cells: the importance of quality assurance. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2013 Jan;462(1):39-46. PubMed PMID: 23242173.

35. Dequeker E, Ligtenberg ML, Borght S, Krieken JM. Mutation analysis of KRAS prior to targeted therapy in colorectal cancer: development and evaluation of quality by a European external quality assessment scheme. *Virchows Archiv*. 2011 2011/08/01;459(2):155-60. English.

36. Monzon FA, Ogino S, Hammond ME, Halling KC, Bloom KC, Nikiforova MN. The Role of KRAS Mutation Testing in the Management of Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2009 Oct;133:1600-6.

37. Kamel-Reid S, Zhang T, Persons DL, Nikiforova MN, Halling KC. Validation of KRAS Testing for Anti-EGFR Therapeutic Decisions for Patients With Metastatic Colorectal Carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2012;136:26-32.

38. Kotoula V, Charalambous E, Biesmans B, Malousi A, Vrettou E, Fountzilas G, et al. Targeted KRAS mutation assessment on patient tumor histologic material in real time diagnostics. *PloS one*. 2009;4(11):e7746. PubMed PMID: 19888477. Pubmed Central PMCID: 2768905.

-
39. CAP. POET Report: Perspectives on emerging technology: Kras testing for colorectal cancer: College of American Pathologist; [cited 2013 29 July]. Available from: <http://www.cap.org/apps/docs/committees/technology/KRAS.pdf>.
40. Solassol J, Ramos J, Crapez E, Saifi M, Mange A, Vianes E, et al. KRAS Mutation Detection in Paired Frozen and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Colorectal Cancer Tissues. *International journal of molecular sciences*. 2011;12(5):3191-204. PubMed PMID: 21686179. Pubmed Central PMCID: 3116185.
41. Baas JM, Krens LL, Guchelaar HJ, Morreau H, Gelderblom H. Concordance of predictive markers for EGFR inhibitors in primary tumors and metastases in colorectal cancer: a review. *The oncologist*. 2011;16(9):1239-49. PubMed PMID: 21742964. Pubmed Central PMCID: 3228174.
42. Han CB, Li F, Ma JT, Zou HW. KRAS mutations in primary and metastatic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2013 2013/05/01;28(5):731-2.
43. Querings S, Altmuller J, Ansen S, Zander T, Seidel D, Gabler F, et al. Benchmarking of mutation diagnostics in clinical lung cancer specimens. *PloS one*. 2011;6(5):e19601. PubMed PMID: 21573178. Pubmed Central PMCID: 3088700.
44. Sundstrom M, Edlund K, Lindell M, Glimelius B, Birgisson H, Micke P, et al. KRAS analysis in colorectal carcinoma: analytical aspects of Pyrosequencing and allele-specific PCR in clinical practice. *BMC cancer*. 2010;10:660. PubMed PMID: 21122130. Pubmed Central PMCID: 3002357.
45. Dono M, Massucco C, Chiara S, Sonaglio C, Mora M, Truini A, et al. Low percentage of KRAS mutations revealed by locked nucleic acid polymerase chain reaction: implications for treatment of metastatic colorectal cancer. *Molecular medicine*. 2012;18:1519-26. PubMed PMID: 23255073. Pubmed Central PMCID: 3576474.
46. Thunnissen E, Bovee JV, Bruinsma H, van den Brule AJ, Dinjens W, Heideman DA, et al. EGFR and KRAS quality assurance schemes in pathology: generating normative data for molecular predictive marker analysis in targeted therapy. *Journal of clinical pathology*. 2011 Oct;64(10):884-92. PubMed PMID: 21947301.
47. Gonzalez de Castro D, Angulo B, Gomez B, Mair D, Martinez R, Suarez-Gauthier A, et al. A comparison of three methods for detecting KRAS mutations in formalin-fixed colorectal cancer specimens. *British journal of cancer*. 2012 Jul 10;107(2):345-51. PubMed PMID: 22713664. Pubmed Central PMCID: 3394984.
48. Lewandowska MA, Jozwicki W, Zurawski B. KRAS and BRAF Mutation Analysis in Colorectal Adenocarcinoma Specimens with a Low Percentage of Tumor Cells. *Molecular diagnosis & therapy*. 2013 Apr 20. PubMed PMID: 23606169.
49. Lee S, Brophy VH, Cao J, Velez M, Hoepfner C, Soviero S, et al. Analytical performance of a PCR assay for the detection of KRAS mutations (codons 12/13 and 61) in formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples of colorectal carcinoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2012 Feb;460(2):141-9. PubMed PMID: 22173329. Pubmed Central PMCID: 3303066.
50. Marzinotto S, Sessa F, Franzoni A, Anselmi A, Gastaldo LR, Mason S, et al. KRAS Codons 12 and 13 Mutation Analysis: A Comparative Study between Direct Sequencing and a New Sensitive Real-Time PCR Assay. *Sequencing*. 2011;2011:1-7.
-

-
51. Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, et al. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2010 Jul;12(4):425-32. PubMed PMID: 20431034. Pubmed Central PMCID: 2893626.
 52. Van Eijk R, Van Puijenbroek M, Chhatta AR, Gupta N, Vossen RH, Lips EH, et al. Sensitive and specific KRAS somatic mutation analysis on whole-genome amplified DNA from archival tissues. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2010 Jan;12(1):27-34. PubMed PMID: 19959798. Pubmed Central PMCID: 2797715.
 53. Tougeron D, Lecomte T, Pages JC, Villalva C, Collin C, Ferru A, et al. Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013 May;24(5):1267-73. PubMed PMID: 23293113.
 54. Perez K, Walsh R, Brilliant K, Noble L, Yakerivich E, Breese V, et al. Heterogeneity of colorectal cancer (CRC) in reference to KRAS proto-oncogene utilizing WAVE technology. *Experimental and molecular pathology*. 2013 Mar 22. PubMed PMID: 23528430.
 55. Miglio U, Mezzapelle R, Paganotti A, Allegrini S, Veggiani C, Antona J, et al. Mutation analysis of KRAS in primary colorectal cancer and matched metastases by means of highly sensitivity molecular assay. *Pathology, research and practice*. 2013 Apr;209(4):233-6. PubMed PMID: 23538047.
 56. Transgenomic. SURVEYOR® Scan KRAS Kit from Transgenomic with Comparison to DxS and TrimGen Mutation Detection Technologies. 2013:1-20.
 57. Transgenomic. User Guide for the SURVEYOR® Scan KRAS Mutation Detection Kit Exon 2 with the WAVE® MCE System. 2012. p. 1-35.
 58. Guan YF, Li GR, Wang RJ, Yi YT, Yang L, Jiang D, et al. Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer. *Chin J Cancer*. 2012;31(10):463-9.
 59. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011 Jul 21;475(7356):348-52. PubMed PMID: 21776081.
 60. Han SW, Kim HP, Shin JY, Jeong EG, Lee WC, Lee KH, et al. Targeted sequencing of cancer-related genes in colorectal cancer using next-generation sequencing. *PloS one*. 2013;8(5):e64271. PubMed PMID: 23700467. Pubmed Central PMCID: 3660257.
 61. Transgenomic. WAVE® MCE System: MicroChip Electrophoresis System for DNA Analysis - Instruction Manual. 2011.
 62. Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, Siu LL. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature*. 2013;501(7467):355-64.
 63. Franklin WA, Haney J, Sugita M, Bemis L, Jimeno A, Messersmith WA. KRAS mutation: comparison of testing methods and tissue sampling techniques in colon cancer. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2010 Jan;12(1):43-50. PubMed PMID: 20007845. Pubmed Central PMCID: 2797717.

64. Jimeno A, Messersmith WA, Hirsch FR, Franklin WA, Eckhardt SG. KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009 Mar 1;27(7):1130-6. PubMed PMID: 19124802.

65. Angulo B, Garcia-Garcia E, Martinez R, Suarez-Gauthier A, Conde E, Hidalgo M, et al. A commercial real-time PCR kit provides greater sensitivity than direct sequencing to detect KRAS mutations: a morphology-based approach in colorectal carcinoma. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2010 May;12(3):292-9. PubMed PMID: 20203003. Pubmed Central PMCID: 2860464.