



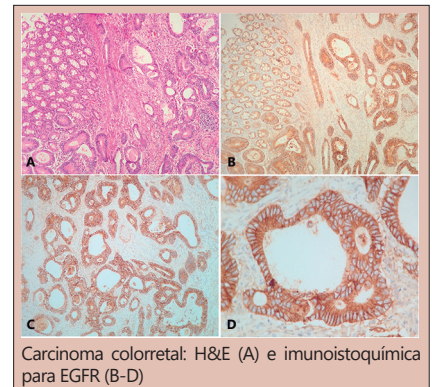
EGFR MEMBRANO-CITOPLASMÁTICO PREDIZ MUTAÇÃO RAS EXPANDIDA NO CARCINOMA COLORRETAL?

Cytoplasmic-membrane EGFR predicts expanded RAS mutation status in colorectal carcinomas?

Thiago David Alves PINTO¹, Thaís David das Neves ALVES¹, Sebastião Alves PINTO^{1,2}, Enio Chaves OLIVEIRA³

RESUMO - Racional: Inibidores do fator de crescimento epidermal (EGFR) representam opção de terapia efetiva para o câncer colorrectal metastático, na ausência de ativação de mutações KRAS e NRAS. Entretanto, a pesquisa de mutações é cara e pouco acessível. A expressão de EGFR por imuno-histoquímica predizendo o status mutacional do RAS expandido (KRAS e NRAS) poderia permitir o tratamento por método diagnóstico menos caro e mais acessível. **Objetivo:** Investigar a correlação entre os dados clinicopatológicos, a expressão de EGFR na membrana citoplasmática e o status mutacional do RAS expandido. **Método:** Estudo retrospectivo de acurácia envolvendo 139 pacientes com carcinoma colorretal. **Resultado:** A mutação do RAS expandido foi detectada em 78 (56,1%) casos. A expressão de EGFR foi estratificada em 23 (16,5%) casos "positivos", 49 (35,2%) casos "negativos" e 67 (48,2%) "duvidosos". Não houve correlação significativa entre o status mutacional do RAS e a expressão de EGFR em relação a idade, gênero, local do tumor, tipo histológico, grau histológico e estágio clínico. Em 23 casos "positivos", 21 (91,3%) mostraram gene RAS tipo selvagem, e em 49 "negativos", 41 (83,7%) apresentaram mutação, resultando em forte associação entre grupos EGFR "positivo" ou "negativo" e o status mutacional do RAS ($p < 0.001$), com 86,1% de acurácia. **Conclusão:** A análise da expressão de EGFR na membrana citoplasmática estratificada em "positivo", "negativo" e "duvidoso" prediz o status mutacional do RAS em 51,7% dos casos ($p < 0.001$), com 86,1% de acurácia.

DESCRITORES: Câncer colorretal. Genes RAS. Mutação. Receptor de fator de crescimento epidérmico.



Carcinoma colorretal: H&E (A) e imunoistoquímica para EGFR (B-D)

Mensagem central

Esse trabalho mostra que é possível analisar por imunoistoquímica o EGFR membrano-citoplasmático, baseada na regulação do receptor e classificá-lo em "positivo", "negativo" e "duvidoso". Isto foi capaz de prever o estado mutacional do RAS em 51,7% dos casos analisados, com 86,1% de acurácia ($p < 0,001$).

Perspectiva

A imunoistoquímica do EGFR da membrana citoplasmática com base na regulação do receptor classificada em "positivo", "negativo" ou "incerto" pode prever o estado mutacional do RAS com 86,1% de acurácia. A validação por outros estudos do escore ora proposto pode fazer triagem de subtipos de população de câncer colorretal sensíveis aos inibidores de EGFR e promover maior rapidez ao início do tratamento oncológico apropriado.

ABSTRACT - Background: Inhibitors of the epidermal growth factor (EGFR) represent an effective therapeutic option for patients with metastatic colorectal carcinoma, free of activating mutations in KRAS and NRAS. However, the research of mutations is of high cost and scarcely accessible. The expression of the EGFR by immunohistochemistry predicting the mutation status of the expanded RAS (KRAS and NRAS), may allow treatment by a diagnostic method less costly and more accessible. **Aim:** Investigate the correlation between the clinical-pathological data, the cytoplasmic-membrane expression of the EGFR and the mutational status of the expanded RAS. **Method:** A total of 139 patients with colorectal carcinoma from the archives of Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia were evaluated. **Results:** Mutation of the expanded RAS was detected in 78 (56.1%) cases. The EGFR expression was stratified in 23 (16.5%) "positive", 49 (35.2%) "negative" and 67 (48.2%) "uncertain". No significant correlation was found between the mutational status of the RAS and the EGFR expression in comparison to age, gender, location, histological type, histological grade and stage. From 23 "positive" cases, 21 (91.3%) showed wild-type RAS gene, and 49 "negative", 41 (83.7%) presented mutation, resulting in a strong association between EGFR "positive", "negative" groups and the mutational status of the RAS ($p < 0.001$), with 86.1% of accuracy. **Conclusions:** The cytoplasmic-membrane analysis of the EGFR expression stratified into "positive", "negative" and "uncertain" predicts mutational status of the RAS in 51.7% of the cases ($p < 0.001$), with 86.1% of accuracy.

HEADINGS - Colorectal cancer. Ras genes. Mutation. Epidermal growth factor receptor.



www.facebook.com/abcdrevista



www.instagram.com/abcdrevista



www.twitter.com/abcdrevista

Trabalho realizado no ¹Departamento de Patologia, Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia, Goiânia, GO, Brasil; ²Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil; ³Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás, GO, Goiás, Brasil

Como citar esse artigo: Pinto TDA, Alves TDN, Pinto SA, Oliveira EC. EGFR membrano-citoplasmático prediz mutação RAS expandida no carcinoma colorretal? ABCD Arq Bras Cir Dig. 2021;34(1):e1574. DOI: /10.1590/0102-672020210001e1574

Correspondência:

Enio Chaves Oliveira
E-mail: eco1.br@gmail.com

Fonte de financiamento: As reações de imunoistoquímica foram financiadas pelo Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia, utilizando insumos subsidiados pela DAKO do Brasil, diretamente para essa pesquisa.

Conflito de interesse: não há
Recebido para publicação: 09/06/2020
Aceito para publicação: 18/09/2020

INTRODUÇÃO

A primeira droga com ação comprovada no tratamento do carcinoma colorretal avançado foi o 5-fluorouracil. Posteriormente, a sua associação com leucovorin melhorou os desfechos. Alguns anos após, duas novas drogas foram adicionadas aos protocolos de tratamento: irinotecan e oxaliplatin. Recentemente, duas novas classes de agentes biológicos foram desenvolvidas para o tratamento do carcinoma colorretal tendo como alvo o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) e o Receptor do Fator de Crescimento Epitelial (EGFR)¹⁸. Muitos fatores associados à sobrevida (biomarcadores prognósticos) e fatores capazes de identificar pacientes com baixa ou alta probabilidade de se beneficiar de tratamentos personalizados (biomarcadores preditivos) demandam melhor entendimento. Esses biomarcadores são ferramentas auxiliares na seleção dos pacientes corretos para o protocolo quimioterápico adequado usando a associação com anti-VEGF ou anti-EGFR⁵.

Anticorpos monoclonais inibidores do receptor do fator de crescimento epidérmico (iEGFR) representam uma opção terapêutica com eficácia comprovada em pacientes com CCR metastático e genes KRAS e NRAS selvagens. Na presença de mutações, esses genes exibem ativação constitutiva da transdução de sinais a partir deles e as células tumorais se tornam resistentes aos iEGFR^{5,18}.

O teste por PCR e o sequenciamento gênico foram propostos para detectar as mutações ativadores dos códons 12 e 13 (éxon 2), 59 e 61 (éxon 3), 117 e 146 (éxon 4) dos genes KRAS e NRAS antes do início da terapia, devido ao alto custo dos inibidores e seus efeitos deletérios em pacientes com mutação². Entretanto, a pesquisa de mutação por PCR e por sequenciamento gênico é de alto custo, demandam tempo e são realizados apenas em grandes centros¹⁸.

A expressão do EGFR por imunistoquímica já foi investigada para o planejamento terapêutico desses pacientes; porém, os estudos prévios mostram resultados conflitantes em relação a expressão e a resposta ao tratamento²². Nesses estudos foi utilizado o anticorpo anti-EGFR clone 2-18C9 PharmDXTM 2,24 e considerada positiva somente a expressão em membrana. Contudo, a expressão e ativação do receptor ocorre através de alças de regulação precoces e tardias, que envolvem o RAS, a atenuação do sinal durante toda cascata e/ou internalização do receptor, possivelmente, resultando na defosforilação ou degradação do receptor, conferindo diferentes graus de marcação de membrana e citoplasma².

KRAS e NRAS mudados e construtivamente ativados podem ativar alças regulatórias, levando a internalização do EGFR e sua marcação citoplasmática, interferindo em seu padrão de expressão⁶ (Figura 2). Além do que, o uso do anticorpo monoclonal anti-EGFR selvagem (DAK-H1-WT) em CCR apresentou significativo ganho em sensibilidade em relação ao anticorpo utilizado em outros estudos (EGFR2-18C9 PharmDXTM)².

Portanto, a validação da expressão membrano-citoplasmática do EGFR por imunistoquímica, predizendo o estado mutacional do RAS expandido, pode permitir o início do tratamento por um método menos oneroso e mais acessível.

O objetivo desse estudo foi propor um método de análise da expressão do EGFR, utilizando o anticorpo monoclonal anti-EGFR DAK-H1-WT, considerando a marcação membrano-citoplasmática e sua correlação com o estado mutacional do RAS expandido.

MÉTODOS

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Alberto Rassi sob o parecer n° 961.174 - CEPHGG 775/150.

Seleção dos pacientes

O arquivo do Departamento de Patologia do Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia, Goiânia, GO, Brasil, foi pesquisado para a seleção de pacientes previamente submetidos a ressecção cirúrgica de CCR entre janeiro de 2014 e junho de 2015. Um total de 169 casos contendo material biológico de tumor fixado em formol e embocado em parafina (FFPE) foram selecionados. Trinta amostras com sinais de autólise, inadequadas para estudo molecular ou não testadas para mutações RAS foram excluídas.

Dados clínico-patológicos e o estado mutacional do RAS expandido, de cada paciente, foram obtidos de nossa base de dados. Tipo histológico, grau histológico, e localização foram determinados a partir dos critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (<http://www.tumourclassification.iarc.who.int>) e o estadiamento definido de acordo com a 7th edição do manual de estadiamento da American Joint Committee on Cancer (<http://www.cancerstaging.org>).

O tamanho amostras foi calculado baseado na estimativa de proporção populacional, considerando 0,05 de nível de confiança, poder do teste de 90% e que os pacientes com mutação RAS representaria 45% da população detentora de CCR.

Reações de PCR e sequenciamento gênico

Todos os casos selecionados foram testados, sem custo para o estudo ou para os pacientes, por demanda clínica, para mutações do RAS expandido, pelos programas "GENteorienta" (Merck, Darmstadt, Alemanha) e RASTREAR (AMGEN, Thousand Oaks, EUA), no laboratório associado certificado Progenética (Rio de Janeiro, Brasil). Para a extração do DNA dos blocos de parafina, áreas contendo pelo menos 50% de células tumorais foram delimitadas por um patologista em lâmina corada por H&E, para cada caso. Lâminas não coradas, correspondentes, eram imersas em xilol (Sigma, St Louis, EUA) e duas vezes em álcool 100% (Merck, Darmstadt, Alemanha), por 5 min cada. Áreas tumorais previamente delimitadas por comparação com as lâminas de H&E correspondentes, passaram por microdissecção e eram transferidas para tubo de microcentrifuga. O DNA foi isolado utilizando QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as orientações do fabricante. Por fim, o DNA foi quantificado por espectrometria pelo NanoDrop-1000[®] (NanoDrop Technologies, ThermoFisher, Waltham, EUA[®]).

Todas as amostras foram submetidas a sequenciamento de DNA. Os éxons 2 (códons 12 e 13) e 3 (códon 61) do KRAS foram testados por pirosequenciamento com o kit comercial KRAS Pyro Kit (QIAGEN). As reações e análises realizadas de acordo com as instruções do fabricante, utilizando o sistema PyroMark Q24 (QIAGEN).

O éxon 4 do KRAS e todos os éxons do NRAS foram testados por método Sanger automatizado, com análise de dupla fita (duplo sentido - 5' e 3') para avaliar a existência de alterações no DNA em ambas as fitas. Os pares de sondas iniciadoras para o estudo dos éxons 2, 3 e 4 do NRAS, e éxon 4 do KRAS foram desenhadas utilizando o programa primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

Para a análise de todos os éxons o DNA foi submetido à denaturação inicial, seguida de 35-40 ciclos de amplificação.

Antes do sequenciamento todos os produtos de amplificação foram purificados para remover sondas iniciadoras, sais, enzimas, e excessos de dNTP's das reações anteriores.

A reação de sequenciamento utilizou 1 µL do produto de cada amostra. Foram adicionados 0.5 µL de Big Dye[®] Terminator v1.1 sequencing Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Foster City, EUA), 3.4 µL de Big Dye[®] Terminator v1.1, v1.3 5x sequencing buffer (Applied Biosystems), 350 nM de uma das sondas iniciadoras (sentido duplo - 5' e 3') e 4.78 µL água estéril bidestilada (B. Braun, Melsungen, Alemanha), para volume total de 10 µL. A seguir, as amostras foram submetidas à denaturação inicial, seguida de 35 ciclos de síntese. Os

produtos do sequenciamento foram purificados utilizando Illustra Sephadex® G-50fine (GE Healthcare Life Sciences), adicionados a 12 µL of Hi-DiTM® Formalize (Applied Biosystems). Os produtos foram analisados no ABI PRISM™ 310® Genetic Analyzer (Applied Biosystems) ou no 3500® Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Eletroferogramas foram analisados pelo Sequencing Analysis Software v5.4 (Applied Biosystems). Todos foram lidos ao menos duas vezes e revisados manualmente com o Mutation Surveyor Software v4.0.8.

Reações de imunoistoquímica

As reações para a detecção da expressão do EGFR foram realizadas em todos os casos selecionados. Duas lâminas de cada amostra de FFPE com cortes de 4 µm de espessura foram obtidas. Uma das lâminas foi corada com H&E, para confirmação dos dados morfológicos, e a outra submetida à reação de imunoistoquímica pelo método automatizado Dako Link Autosteiner48® method (Dako, Glostrup, Dinamarca), utilizando Dako Flex kit. As amostras foram submetidas à recuperação antigênica por exposição a calor controlado em solução de pH alto utilizando PTLINK® (Dako), bloqueio da peroxidase endógena por peróxido, incubação com o anticorpo primário Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico - Clone DAK-H1-WT - Anti-Humano - Rato Monoclonal (Dako) na diluição de 1:1000, amplificação por LINKER (EnVision FLEX - Dako), reação com polímero (EnVision Flex/HRP) por 20 min, revelação por cromógeno por 5 min e contracoloração com hematoxilina (EnVision FLEX) por 5 min.

Análise das lâminas de imunoistoquímica

As lâminas da reação de imunoistoquímica de cada caso foram avaliadas por dois patologistas em consenso. Foi utilizado escore de classificação da marcação tanto de membrana quanto de citoplasma. Para marcação de membrana o escore variou de 0 a +3. A amostra deveria conter marcação de membrana forte e completa em mais de 50% das células neoplásicas para ser considerada +3 (Figura 2D). A marcação de membrana focal e fraca em qualquer quantidade de células foi considerada +1 (Figura 2A) e o restante dos casos considerados +2 (Figuras 2B e 2C). A marcação citoplasmática variou de 0 a -3, considerando desde a ausência de marcação (0) até a marcação forte e difusa (-3, Figura 2). Foram também considerados os casos com grandes áreas negativas, maiores que 30% da neoplasia, tanto de membrana quanto de citoplasma, independente do restante da marcação, atribuindo-se escore -1 para esses casos (Tabela 1).

Os casos foram agrupados quanto ao somatório dos escores em três classes: "positivos", "negativos" e "duvidosos". As amostras com escore 2 e 3 foram alocadas na classe positivo (Figura 1). Aquelas com escore 0 e 1 foram alocadas na classe "duvidosos". As com escores negativos foram alocadas na classe "negativos"

Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Para avaliar a significância estatística foi aplicado o teste do chi-quadrado considerando $p < 0,001$.

RESULTADOS

Correlações clinicopatológicas da mutação do RAS expandido e da expressão do EGFR.

A idade média dos 139 pacientes foi de 61,8 anos com desvio-padrão de 13,9, sendo 26 (19,5%) menores que 50 anos e 10 (7,5%) menores que 40 anos. Não houve disparidade de gênero sendo 52,9% de homens e 47,1% de mulheres (Tabela 2).

Não foi identificada associação significativa entre o estado mutacional do RAS expandido e da expressão do EGFR

em comparação a idade ($p=0,541$ e $0,652$ respectivamente); gênero ($p=0,348$ e $0,540$); localização ($p=0,393$ e $0,098$), tipo histológico ($p=0,199$ e $0,697$), grau histológico ($p=0,900$ e $0,182$) e estadió ($p=0,533$ e $0,053$, Tabela 2).

A mutação do RAS expandido foi detectada em 78 (56,1%) dos 139 casos com CCR testados por Sanger automatizado. Destes, 72 casos (51,79%) apresentaram mutações no gene KRAS, sendo 63 (45,3%) com mutações no codons 12 e 13 (éxon 2), quatro casos (2,8%) com mutações no códon 61 (éxon 3) e cinco (3,59%) com mutações no códon 146 (éxon 4). Não foram detectadas mutações nos codons 59 (éxon 3) e 117 (éxon 4) no gene KRAS.

A pesquisa do gene NRAS revelou mutações em seis casos (4,3%) nos codons 12 e 61 (éxons 2 e 3), não sendo detectadas mutações no códon 13 (éxon 2), no códon 59 (éxon 3) e nos codons 117 e 146 (éxon 4).

A análise das lâminas de IHQ revelaram marcação de membrana exclusiva em apenas quatro casos (2,8%) e de citoplasma exclusiva em outros quatro (2,8%). Todos casos com marcação exclusiva de membrana apresentaram RAS selvagem e todos casos com marcação citoplasmática exclusiva mostraram RAS mutado. O restante dos casos mostrou positividade tanto para membrana quanto para citoplasma em intensidades variáveis. Foram alocados na classe "positivo" (escores 2 e 3) 23 casos (16,5%). No grupo "negativo" (escores negativos) foram alocados 49 casos (35,2%) e no grupo "duvidoso" (escores 0 e 1) ficaram 67 casos (48,2%, Tabela 3).

A correlação direta da expressão do EGFR estratificada nas classes "positivo", "negativo" e "duvidoso" em comparação ao estado mutacional do RAS expandido mostrou forte associação entre os grupos ($p < 0,001$, Tabela 3). Dos 23 casos da classe "positivo" 21 (91,3%) mostraram gene RAS selvagem para as mutações pesquisadas. Dos 49 casos da classe "negativo" 41 (83,7%) apresentaram alguma mutação no painel RAS expandido. Os 67 casos alocados como "duvidoso" mostraram paridade nos achados com 32 casos (47,8%) RAS selvagem e 35 (52,2%) mutados.

O teste de validação da expressão membrano-citoplasmática do EGFR é mostrado na Tabela 4.

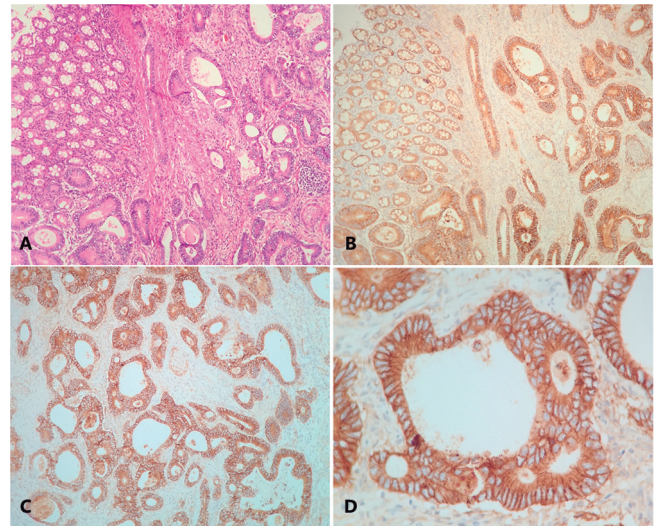


FIGURA 1 – A) CCR grau II com área de mucosa normal em canto superior esquerdo (H&E 40x); B) imunoistoquímica para EGFR mostrando marcação forte de membrana e fraca de citoplasma (M3C1) escore 2 (positivo), RAS selvagem; C and D) detalhes em outras áreas de mesmo caso mostrando padrão homogêneo da marcação M3C1.

TABELA 2 - Correlação clinicopatológica entre EGFR e RAS

| | EGFR (n/%) | | | p | RAS (n/%) | | p |
|-------------------------|------------|----------|----------|------|-----------|---------|------|
| | Positivo | Negativo | Duvidoso | | Selvagem | Mutado | |
| Idade | | | | | | | |
| <40 anos | 1/10,0 | 2/20,0 | 7/70,0 | 0,65 | 5/50,0 | 5/50,0 | 0,54 |
| 40 a 50 anos | 1/6,3 | 6/37,6 | 9/56,3 | | 5/31,36 | 11/68,8 | |
| >=50 anos | 20/18,7 | 38/35,5 | 49/45,8 | | 48/49,9 | 59/55,1 | |
| Gênero | | | | | | | |
| Masculino | 15/20,5 | 23/31,5 | 35/47,9 | 0,54 | 35/47,9 | 38/52,1 | 0,34 |
| Feminino | 8/12,3 | 26/40,0 | 31/47,7 | | 26/40,0 | 39/60,0 | |
| Localização | | | | | | | |
| Cólon Direito | 7/14,6 | 15/31,3 | 26/54,2 | 0,09 | 18/37,5 | 62,5/30 | 0,39 |
| Cólon Esquerdo | 5/17,9 | 9/32,2 | 14/50,0 | | 15/53,6 | 13/46,4 | |
| Retossigmoide | 11/17,5 | 25/39,7 | 27/42,9 | | 28/44,4 | 35/55,6 | |
| Tipo Histológico | | | | | | | |
| Tubular | 20/17,1 | 43/36,7 | 54/46,2 | 0,69 | 54/46,2 | 63/53,8 | 0,19 |
| Mucinoso | 2/25,0 | 1/12,5 | 5/62,5 | | 4/50,0 | 4/50,0 | |
| Tubulomucinoso | 1/7,1 | 5/35,7 | 8/57,1 | | 3/21,4 | 11/78,6 | |
| Grau histológico | | | | | | | |
| 1 | 1/14,3 | 2/28,6 | 6/24,0 | 0,18 | 3/42,9 | 4/57,1 | 0,90 |
| 2 | 16/15,0 | 41/38,3 | 6/24,0 | | 46/43,0 | 61/57,0 | |
| 3 | 6/24,0 | 50/46,7 | 13/52,0 | | 12/48,0 | 13/52,0 | |
| Estadio | | | | | | | |
| 0 | 0/0,0 | 2/11,0 | 6/9,0 | 0,05 | 4/6,6 | 4/5,1 | 0,53 |
| I | 1/4,3 | 6/33,1 | 9/13,4 | | 4/6,6 | 12/15,4 | |
| IIA | 8/34,8 | 14/54,7 | 16/23,9 | | 16/26,2 | 22/28,2 | |
| IIB | 0/0,0 | 1/2,7 | 5/7,5 | | 3/4,9 | 3/3,8 | |
| IIC | 3/13,0 | 1/2,7 | 0/0,0 | | 3/4,9 | 1/1,3 | |
| IIIA | 0/0,0 | 3/8,1 | 1/1,5 | | 3/4,9 | 1/1,3 | |
| IIIB | 5/21,7 | 15/40,5 | 22/32,8 | | 18/29,5 | 24/30,8 | |
| IIIC | 5/21,7 | 7/18,9 | 8/11,9 | | 9/14,8 | 11/14,1 | |
| IV | 1/4,3 | 0/0,0 | 0/0,0 | | 1/1,6 | 0/0,0 | |

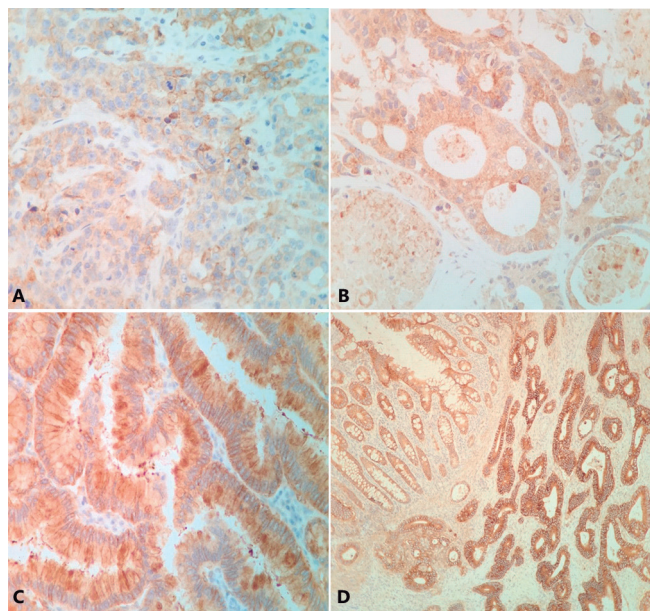


FIGURA 2 – A) Imunoistoquímica para EGFR mostrando marcação fraca de membrana e de citoplasma (M1C1) escore 0 (duvidoso) RAS selvagem; B) membrana negativa e citoplasma 2+ (M0C2) escore -2 (negativo) RAS mutado KG12A; C) membrana +1 e citoplasma +3 (M1C3) escore -2 (negativo) RAS mutado KG12V; D) membrana +3 e citoplasma +1 (M3C1) escore 2 (positivo) RAS do tipo selvagem. No canto superior esquerdo, mucosa normal com marcação tênue da membrana citoplasmática.

TABELA 1 - Escore proposto para a análise da expressão membrano-citoplasmática do EGFR por imunoistoquímica.

| Membrana (M) | Critério |
|----------------------|---|
| Escore 3+ | Forte e completa em mais de 50% das células |
| Escore 2+ | Intermediário em os escores 1+ e 3+ |
| Escore 1+ | Fraco e focal em qualquer quantidade de células |
| Escore 0 | Ausência de marcação de membrana |
| Citoplasma (C) | Critério |
| Escore 0 | Ausência de marcação citoplasmático |
| Escore 1- | Fraco em qualquer quantidade de células |
| Escore 2- | Intermediário em qualquer quantidade de células |
| Escore 3- | Forte em mais de 10% das células |
| Áreas negativas (An) | Critério |
| Escore 0 | Qualquer marcação em mais de 70% das células |
| Escore 1- | Ausência de marcação em mais de 30% das células |
| Resultado | Critério |
| Positivo | M + C + NA ≥ 2 |
| Negativo | M + C + NA ≤ 1- |
| Duvidoso | M + C + NA = 0 or 1. |

TABELA 3 - Correlação entre os grupos EGFR e o estado mutacional do RAS

| RAS | EGFR | | | | | | p* |
|----------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|--------|
| | Positivo | | Negativo | | Duvidoso | | |
| | n | % | n | % | n | % | |
| Selvagem | 21 | 91,3 | 8 | 16,3 | 32 | 47,8 | <0,001 |
| Mutado | 2 | 8,7 | 41 | 83,7 | 35 | 52,2 | |
| Total | 23 | 100,0 | 49 | 100,0 | 67 | 100,0 | |

* Teste qui-quadrado.

TABLE 4 - Teste de validação da expressão membrano-citoplasmática por imunistoquímica, considerando somente positivos e negativos

| EGFR | RAS | | Total |
|----------|----------|--------|-------|
| | Selvagem | Mutado | |
| Positivo | 21 | 2 | 23 |
| Negativo | 8 | 41 | 49 |
| Total | 29 | 43 | 72 |

Sensibilidade=72,4%; especificidade=95,3%; acurácia=86,1%; valor preditivo positivo=83,6%; valor preditivo negativo=86,1%

DISCUSSÃO

Relação entre EGFR e RAS

Nosso estudo revela que a análise membrano-citoplasmática do EGFR estratificada nas classes “positivo”, “negativo” e “duvidoso” baseada na regulação do receptor é capaz de prever o estado mutacional do RAS em 51,7% dos casos analisados ($p < 0,001$, Tabela 4).

O EGFR ativa a via da MAPK através do RAS, resultando na transcrição de diversos fatores de crescimento; entretanto, haverá também a produção de MIG-6, o qual atua ativando a internalização e degradação do receptor². Pesquisas averiguando a relação direta entre a amplificação e expressão do EGFR e o estado de mutação do KRAS, mostraram não haver relação entre estes dois componentes⁸. Contudo, foram realizados em séries pequenas, alguns analisaram apenas a amplificação⁸ e os outros estudaram a expressão por análise de alta e baixa afinidade de ligação do receptor¹⁹; não há estudos, como este, comparando a expressão imunistoquímica membrano-citoplasmática do EGFR utilizando o clone do anticorpo (DAK-H1-WT) e o estado mutacional do RAS expandido.

Gene e receptor EGFR

O EGFR é um receptor transmembrana que faz parte da família dos Erb's. Possui domínio extracelular que pode ser ativado seletivamente pelos fatores de crescimento epidérmicos (EGF) e fatores transformadores de crescimento-alfa (TGF- α), levando à dimerização e ativação do receptor. Uma vez ativado ele sofre autofosforilação do seu domínio tirosina-quinase intracitoplasmático desencadeando ativação em cascata do RAS/RAF/MEK/MAPK e por consequente de fatores de transcrição nucleares responsáveis por ativação e regulação de genes por replicação celular, angiogênese, diferenciação e etc. É expresso em tumores de pulmão, cólon, mama, cabeça e pescoço, ovário, pâncreas, bexiga e rim^{12,26}.

A expressão e ativação do receptor possui alças regulatórias precoces e tardias, atuando na atenuação do sinal em toda cascata e/ou na internalização do receptor. Como resultado ocorre sua desfosforilação ou degradação^{2,3,5,18}, permitindo detecção tanto em membrana quanto em citoplasma, justificando a análise conjunta membrano-citoplasmática na IHQ para determinação do escore de marcação¹⁴.

As mutações do gene EGFR são incomuns em cânceres colorretais, possibilitando a utilização do clone selvagem DAK-H1-WT para a pesquisa do receptor. Há estudos por IHQ que mostram expressão de EGFR em 60-80% dos carcinomas colorretais²⁵; entretanto, apenas 24% destes tumores apresentam amplificação do gene EGFR²³. Análises clínicas mostraram discordância entre a expressão do EGFR e a resposta terapêutica aos inibidores do receptor¹⁷. Há ainda o fato de até 25% dos tumores com expressão negativa para EGFR serem responsivos a cetuximab (iEGFR)⁴. Porém, a grande maioria desses estudos utilizou nas reações de IHQ o kit PharmDxTM com o anticorpo EGFR2.5 para detecção do EGFR, conflitando com o importante aumento de sensibilidade na pesquisa desse receptor utilizando o clone de anticorpo DAK-H1-WT que detecta somente receptores selvagens²⁶. Nosso estudo mostrou 97,2% de expressão de membrana do EGFR, confirmando o grande ganho em sensibilidade com este clone.

Enquanto alguns estudos mostraram relação entre a expressão e o grau do tumor ou a sobrevida dos pacientes^{7,20}, outros não têm tido resultados semelhantes²⁵, assim como em nossa análise em que não foi identificada associação significativa entre a expressão do EGFR em comparação a idade, gênero, localização, tipo histológico, grau histológico ou estadió.

Um estudo com 47 pacientes não mostrou significância da amplificação do gene na resposta terapêutica⁹. Outro mostrou que os 17% de pacientes do trabalho com KRAS selvagem e amplificação do gene EGFR tratados com cetuximab obtiveram resposta terapêutica¹³. Percentual semelhante ao escore membrano-citoplasmático “positivo” de nosso estudo, em que os 16,5% dos casos mostraram forte correlação com o RAS expandido selvagem, sugerindo poder haver uma correlação entre esse grupo do estudo e a amplificação do gene. Diferentemente do grupo “duvidoso” em que podem estar casos amplificados, porém não hiperexpressos devido à inibição pelas alças regulatórias do RAS mutado, constitutivamente ativado, ou casos em que não há amplificação e, portanto, expressão duvidosa do receptor. Novas análises correlacionando o escore membrano-citoplasmático à amplificação do gene EGFR e ao estado mutacional do RAS são necessárias para esclarecer estas questões.

Genes e proteínas KRAS e NRAS

KRAS e NRAS são membros da família de oncogenes RAS. São proteínas ligantes, iniciadoras da via de sinalização da MAPK após a ativação pelo EGFR e codificadas pelos proto-oncogenes RAS específicos. O HRAS, terceiro membro da família RAS, raramente encontra-se mutado em CCR⁶. Mutações somáticas destes genes são evento precoce na carcinogênese, estando presente em 40-45% dos CCR, e geralmente mutuamente excludentes^{15,21}. Este percentual é menor que o encontrado em nossa análise (56,1%), que considerou todos os éxons já recomendados em guidelines atualizados^{5,18}. Nosso estudo também mostrou mutação do NRAS em 4,3% dos casos, valor também maior que os 2% encontrado em estudo prévio¹⁸.

Uma vez mutadas estas proteínas estimulam a via EGFR/MAPK constitutivamente, portanto, levando a resistência ao tratamento com inibidores deste receptor (cetuximab e panitumumab)^{1,11,14,28}. Casos com KRAS selvagem apresentaram benefício clínico com uso de inibidores do EGFR isolado e em conjunto com quimioterapia^{16,27}. Entretanto, somente 13-17% dos tumores com KRAS selvagem apresentam resposta^{1,11}. Estudos clínicos randomizados fase 3 evidenciaram a ausência de resposta em pacientes portadores de mutações no KRAS ou NRAS²⁸. Mutações de BRAF, molécula também associada a vias de sinalização do RAS-EGFR, tem sido implicada em uma proporção destes pacientes irresponsivos^{21,27}. Estas mutações poderiam justificar casos do grupo “negativo” de nosso estudo em que a mutação RAS não foi detectada, uma vez que este gene também está ligado às alças de regulação do receptor, o que pode resultar em sua menor expressão.

Há, também, a via paralela do PTEN/PIK3CA/AKT - EGFR que inibe a apoptose de células neoplásicas, sendo que o PTEN (Phosfatase and Tensin Homologue Gene) inibe essa via ao utilizar o PIK3CA como substrato. Mutações na via levam a hiperfosforilação do AKT e inibição constitutiva da apoptose e consequentemente falha na resposta aos inibidores do EGFR¹⁰.

Esse estudo é pioneiro na análise da expressão do EGFR por IHQ, utilizando escore de marcação membrano-citoplasmático estratificado nas classes “positivo”, “negativo” e “duvidoso”, baseado na regulação deste receptor por alças de feedback, capaz de prever o estado mutacional do RAS em 51,7% dos casos analisados, com 86,1% de acurácia. Entretanto, novos estudos são necessários para determinar a razão de quase metade dos casos serem ainda duvidosos. Análises contemplando a amplificação do EGFR e mutações em outros genes da cascata EGFR/MAPK como BRAF e PIK3CA, podem possibilitar melhor estratificação desta população.

CONCLUSÕES

A análise da expressão membrano-citoplasmática do EGFR estratificada em “positivo”, “negativo” e “duvidoso” prediz o estado mutacional do RAS em 51,7% dos casos ($p < 0.001$), com 86,1% de acurácia.

REFERÊNCIAS

- Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(10):1626-1634.
- Avraham R, Yarden Y. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nature Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(2):104-117.
- Carethers JM, Jung BH. Genetics and genetic biomarkers in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1177-1190.e3.
- Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol*. 2005;23(9):1803-1810.
- Das V, Kalita J, Pal M. Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. *Biomed Pharmacother*. 2017;87:8-19.
- Fernández-Medarde A, Santos, E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer*. 2011;2(3):344-358.
- Goldstein NS, Amin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on cancer stage IV colon adenocarcinoma. *Cancer*. 2001;92(5):1331-1346.
- Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, Boeck S, Jung A. Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat Rev*. 2009;35(3):262-271.
- Italiano A, Follana P, Caroli FX, Badetti JL, Benchimol D, Garnier G, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors for which FISH analysis does not detect an increase in EGFR gene copy number. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(2):649-654.
- Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, Montagna C, Ling YH, Byun DS, et al. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res*. 2008;68(6):1953-1961.
- Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(17):1757-1765.
- Krasinskas AM. EGFR signaling in colorectal carcinoma. *Pathol Res Int*. 2011; Article ID 932932, 6 pages.
- Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, Buc E, Bachet JB, Lecomte T, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):5924-5930.
- Lee JW, Soung YH, Kim SY, Park WS, Nam SW, Lee JY, et al. Absence of EGFR mutation in the kinase domain in common human cancers besides non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2005;113(3):510-511.
- Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg*. 2002;89(7):845-860.
- Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2008;26(3):374-379.
- Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009;101(4):715-721.
- Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Dieste AP, Cerrada E, Yoldi MJR. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18:197.
- Milano G, Etienne-Grimaldi MC, Dahan L, Francoual M, Spano JP, Benchimol D, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status and K-Ras mutations in colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2008;19(12):2033-2038.
- Resnick MB, Routhier J, Konkin T, Sabo E, Pricolo VE. Epidermal growth factor receptor, c-MET, β -catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: a tissue microarray study. *Clin Cancer Res*. 2004;10(9):3069-3075.
- Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D, Dietrich D, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol*. 2010;28(3):466-474.
- Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol*. 2004;22(7):1201-1208.
- Shia J, Klimstra DS, Li AR, Qin J, Saltz L, Teruya-Feldstein J, et al. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Mod Pathol*. 2005;18(10):1350-1356.
- Shiogama K, Wongsiri T, Mizutani Y, Inada KI, Tsutsumi Y. High-sensitivity epidermal growth factor receptor immunostaining for colorectal carcinomas, compared with EGFR PharmDxTM: A study of diagnostic accuracy. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(1):24-30.
- Spano JP, Fagard R, Soria JC, Rixe O, Khayat D, Milano G. Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. *Ann Oncol*. 2005;16(2):189-194.
- Sullivan KM, Kozuch PS. Impact of KRAS mutations on management of colorectal carcinoma. *Pathol Res Int*. 2011; Article ID 219309, 11 pages.
- Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):2011-2019.
- Van Cutsem E, Lenz HJ, Köhne CH, Heinemann V, Tejpar S, Melezínek I, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(7):692-700.