



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

THIAGO DAVID ALVES PINTO

Expressão membrano-citoplasmática do EGFR e estado mutacional do RAS expandido em carcinomas colorretais: estudo de acurácia

Goiânia
2017

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Thiago David Alves Pinto

Título do trabalho: Expressão membrano-citoplasmática do EGFR e estado mutacional do RAS expandido em carcinomas colorretais: estudo de acurácia

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 04 / 06 / 2017.

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

THIAGO DAVID ALVES PINTO

Expressão membrano-citoplasmática do EGFR e estado mutacional do RAS expandido em carcinomas colorretais: estudo de acurácia

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção de Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Autor: Thiago David Alves Pinto

Orientador: Prof. Dr. Enio Chaves de Oliveira.

Goiânia
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

DAVID ALVES PINTO, THIAGO
[manuscrito] / THIAGO DAVID ALVES PINTO. - 2017.
LXXXII, 82 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. ENIO CHAVES DE OLIVEIRA.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás,
Faculdade de Medicina (FM), Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. EGFR. 2. RAS. 3. CARCINOMA. 4. COLORRETAL. I. CHAVES
DE OLIVEIRA, ENIO, orient. II. Título.

CDU 616

Ata de Defesa de Dissertação de Mestrado realizada por **Thiago David Alves Pinto**. Aos **dezenove dias do mês maio de 2017**, às **16:00 horas**, reuniu-se no **Auditório da Faculdade de Medicina/UFG**, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada **"Expressão membrano-citoplasmática do EGFR e o estado mutacional do RAS expandido em carcinomas colorretais: estudo de acurácia"**, como parte de requisitos necessários à obtenção do **título de Mestre**, área de concentração **Patologia, Clínica e Tratamento das Doenças Humanas**. O Presidente da Comissão julgadora, **Prof. Dr. Ênio Chaves de Oliveira**, iniciando os trabalhos concedeu a palavra ao candidato, para exposição em até **50 minutos** do seu trabalho. A seguir, o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir o candidato durante o prazo máximo de **30 minutos**, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato aprovado(a) ou reprovado(a).

Banca Examinadora

Aprovado(a)/Reprovado(a)

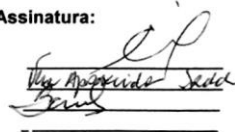
Prof. Dr. Ênio Chaves de Oliveira - Presidente
Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi - Membro
Prof. Dr. Maurício Barcelos Costa - Membro
Prof. Dr. Claudemiro Quireze Júnior - Suplente

APROVADO
APROVADO
APROVADO

Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o candidato **Thiago David Alves Pinto** ☒ **Habilitado** () **Não habilitado**. Nada mais havendo a tratar, eu, **Prof. Dr. Ênio Chaves de Oliveira**, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

Assinatura:

Prof. Dr. Ênio Chaves de Oliveira - Presidente
Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi - Membro
Prof. Dr. Maurício Barcelos Costa - Membro
Prof. Dr. Claudemiro Quireze Júnior - Suplente


Profa. Vera Aparecida Saddi
Prof. Dr. Maurício Barcelos Costa
Prof. Dr. Claudemiro Quireze Júnior

A banca examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:



Thiago David Alves Pinto

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Goiás**

**BANCA EXAMINADORA DA
DEFESA DE MESTRADO**

Aluno: Thiago David Alves Pinto

Orientador: Enio Chaves de Oliveira

Membros:

- 1. Enio Chaves de Oliveira.**
- 2. Vera Aparecida Saddi.**
- 3. Maurício Barcelos Costa.**
- 4. Claudemiro Quireze Júnior.**

Data: 19/05/2017.

DEDICATÓRIA

Dedico a minha esposa Andressa.

Dedico a meus filhos Maria Antônia, Luisa e Miguel.

O tempo não voltará. Horas e dias distantes não voltarão.

Vocês são o melhor de mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por dar vida e saúde a mim e a meus familiares.

Agradeço à Universidade Federal de Goiás e ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por propiciar esta oportunidade.

Agradeço a meu orientador Prof. Dr. Enio Chaves de Oliveira pela oportunidade e por ser tão assertivo em suas colocações.

Agradeço aos meus pais Antônio e Edlair pelo amor e esforço incondicional em oferecer boas condições de estudo, saúde e bem-estar.

Agradeço à minha esposa Andressa Oliveira Gobes Alves por ser minha principal consultora e pela compreensão.

Agradeço à minha irmã Thaís David das Neves Alves pelo grande auxílio na coleta de dados.

Agradeço ao Laboratório INGOH, especialmente a meu tio, padrinho, Chefe e Professor Sebastião Alves Pinto pela oportunidade de aprendizado e trabalho, por fazer parte da equipe deste trabalho, além de abrir as portas do departamento de Patologia desse Laboratório para esta pesquisa.

Agradeço à Dra. Vera Aparecida Saddi pelas orientações iniciais quanto aos aspectos moleculares.

Agradeço a todos os funcionários da Universidade Federal de Goiás e do Laboratório INGOH, especialmente a Valdecina, Juliana, Hayra e Igor, que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

Agradeço ao Laboratório PROGENÉTICA, especialmente ao Dr. Mariano Zalis, por fornecer os protocolos de reação de PCR e sequenciamento e por atender prontamente nossas solicitações.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	III
AGRADECIMENTOS	IV
SUMÁRIO.....	V
FIGURAS.....	VII
TABELAS	VIII
SIGLAS E ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO.....	XI
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Gene e receptor EGFR	6
1.2 Genes e proteínas KRAS e NRAS	8
1.3 Correlação entre EGFR e RAS expandido.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Aspectos éticos.....	12
3.2 Seleção dos pacientes	12
3.3 Coleta de dados.....	12
3.4 Cálculo amostral	12
3.5 Reações de PCR e sequenciamento.....	13
3.6 Reações de Imuno-histoquímica	15
3.7 Análise das lâminas de IHQ.....	16
3.8 Escore e grupos de classificação	17

3.9 Análise estatística.....	17
4. RESULTADOS.....	19
4.1 Article, authors and journal.....	19
4.2 Title Page.....	20
4.3 Abstract	21
4.4 Introduction	23
4.5 Materials and Methods.....	25
4.6 Results	31
4.7 Discussion.....	39
4.8 Conclusions	44
4.9 References.....	45
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
REFERÊNCIAS	52
ANEXO A - PARECER CEPHGG	59
ANEXO B - Normas de submissão - Diseases of the Colon & Rectum	67
ANEXO C - CERTIFICAÇÃO LABORATÓRIO PROGENÉTICA.....	79
ANEXO D - CERTIFICAÇÃO LABORATÓRIO INGOH	81
ANEXO E - NOTA FISCAL - BONIFICAÇÃO - DAKO.....	82

FIGURAS

Figura 1 - Conduta para pacientes com CCR metastático (ASCO 2015).....	3
Figura 2 - Alças regulatórias do EGFR	5
Figura 3 - Expressão membrano-citoplasmática do EGFR - Escore Positivo....	32-34
Figura 4 - Expressão membrano-citoplasmática do EGFR – Todos os Esco- res	34-36

TABELAS

Tabela 1 – Escore proposto para análise da Expressão Membrano-citoplasmática do EGFR por IHQ	18 e 30
Tabela 2 – Correlações clínico-patológicas com a expressão do EGFR e o estado mutacional do RAS expandido	38
Tabela 3 – Correlação direta entre a expressão membrano-citoplasmática do EGFR e o estado mutacional do RAS expandido	39
Tabela 4 – Validação do teste: Expressão membrano-citoplasmática do EGFR por IHQ, considerando apenas positivos e negativos.....	40

SIGLAS E ABREVIATURAS

DNA	<i>Deoxyribonucleic acid.</i>
AKT	Proteína de interação – pró-apoptótica.
BRAF	Gene <i>V-RAF Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1.</i>
CCR	Carcinoma colorretal.
CEP	Comitê de ética em pesquisa.
dNTP`s	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados.
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico.
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2.</i>
HRAS	Gene <i>V-HA-RAS Harveybrat sarcoma viral oncogene homolog.</i>
HRAS	Proteína - GTPase (segundo mensageiro).
H&E	Hematoxilina e Eosina.
iEGFR	Inibidor de receptor do fator de crescimento epidérmico.
IHQ	Imuno-histoquímica.
INGOH	Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia.
KRAS	Gene - <i>V-KI-RAS2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog.</i>
KRAS	Proteína - GTPase (segundo mensageiro).
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase.</i>
MIG-6	<i>Mitogen-inducible gene 6.</i>

NRAS	Gene – <i>Neuroblastoma ras viral oncogene homolog</i> .
NRAS	Proteína - GTPase (segundo mensageiro).
OMS	Organização Mundial da Saúde.
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> .
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit</i> .
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homologue gene</i> .
RAS	Superfamília dos genes ras (HRAS, KRAS E NRAS).
SPRY2	<i>Sprouty RTK signaling antagonist 2</i> .
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> .

RESUMO

Inibidores do receptor do fator de crescimento epidérmico representam uma opção terapêutica com eficácia comprovada para pacientes com carcinoma colorretal metastático. Porém, pacientes com mutações ativadoras em KRAS e NRAS não apresentam resposta. Atualmente, KRAS e NRAS selvagens são pré-requisito para esta terapêutica. Entretanto, a pesquisa de mutações é de alto custo e pouco acessível. A expressão do EGFR por imunohistoquímica predizendo a mutação expandida do RAS (KRAS e NRAS) pode permitir que o tratamento seja instituído através de um método diagnóstico menos oneroso e mais acessível. O objetivo desse estudo é testar a correlação entre a expressão do EGFR e o estado mutacional do RAS expandido em carcinomas colorretais. Foi realizada uma análise de acurácia em 139 pacientes com carcinoma colorretal selecionados dos arquivos do Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia. Foram pesquisados a correlação entre dados clínico-patológicos, estado mutacional do RAS expandido e padrão de expressão membrano-citoplasmática do EGFR. A mutação do RAS expandido foi detectada em 78 (56,1%) casos. A expressão do EGFR foi estratificada em 23 (16,5%) casos “Positivos”, 49 (35,2%) “Negativos” e 67 (48,2%) “Duvidosos”. Não foi identificada associação significativa em comparação a idade ($p=0,541$ e $0,652$), sexo ($p=0,348$ 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 $0,053$). A expressão do EGFR estratificada em “Positivos”, “Negativos” e “Duvidosos” em comparação ao estado mutacional do RAS expandido mostrou forte associação entre os grupos ($p<0,001$). Dos 23 casos “Positivos”, 21

(91,3%) mostraram gene RAS selvagem. Dos 49 casos “Negativos”, 41 (83,7%) apresentaram mutação no painel RAS expandido. Portanto, nosso estudo é pioneiro em revelar que a análise membrano-citoplasmática do EGFR estratificada em “Positivos”, “Negativos” e “Duvidosos” prediz o estado mutacional do RAS em 51,7% dos casos ($p < 0,001$), com 86,1% de acurácia. Entretanto, novos estudos são necessários para determinar a razão de quase metade dos casos ser ainda duvidosa. Análises mais completas, contemplando a amplificação do EGFR e mutações em outros genes da cascata EGFR/MAPK como BRAF e PIK3CA podem possibilitar uma melhor estratificação desta população.

ABSTRACT

Epidermal growth factor receptor inhibitors represent a treatment option with proven efficacy for patients with metastatic colorectal carcinoma. However, patients with activating mutations in KRAS and NRAS have no response. Currently, wild KRAS and NRAS are prerequisite for this therapy. Furthermore, mutation tests are expensive and not easily accessible. EGFR expression by immunohistochemistry predicting the expanded RAS mutation (KRAS and NRAS), may allow the treatment to be instituted through a less costly and more accessible diagnostic method. The objective of this study is to test the correlation between EGFR cytoplasmic-membrane expression and the mutational status of the expanded RAS in colorectal carcinomas. An accuracy analysis was performed on 139 patients with colorectal carcinoma selected from the archives of the Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia. The correlation between clinical-pathological data, the mutational state of the expanded RAS and the pattern of EGFR cytoplasmic-membrane expression were investigated. The expanded RAS mutation was detected in 78 (56.1%) cases. EGFR expression was stratified into 23 (16.5%) "Positives", 49 (35.2%) "Negatives" and 67 (48.2%) "Uncertain" cases. There was no significant association between age ($p = 0.541$ and 0.652), sex ($p = 0.388$ and 0.540), location ($p = 0.393$ and 0.098), histological type ($p = 0.199$ and 0.697), histological grade ($p = 0.900$ and 0.182) and stage ($p = 0.533$ and 0.053). The expression of EGFR stratified in "Positives", "Negatives" and "Uncertain" compared to the mutational status of the expanded RAS showed a strong association between the groups ($p < 0.001$). Of the 23 "Positive" cases, 21 (91.3%) showed wild RAS

gene. Of the 49 "Negative" cases, 41 (83.7%) presented mutation in the expanded RAS panel. Therefore, our study is pioneer in revealing that the EGFR cytoplasmic-membrane analysis, stratified in "Positives," "Negatives" and "Uncertain", predicts the mutational state of RAS in 51.7% of cases ($p < 0.001$), with 86.1% accuracy. However further studies are needed to determine why nearly half of the cases are still doubtful. More complete analyzes contemplating the amplification of EGFR and mutations in other EGFR / MAPK cascade genes such as BRAF and PIK3CA, could enable a better stratification of the population.

1. INTRODUÇÃO

Entre os milhares de pacientes diagnosticados com carcinoma colorrectal (CCR) todos os anos, um grupo importante de pacientes evolui para doença avançada ou já é diagnosticado em estágio avançado da doença (SIGEL et al. 2014). O CCR é o terceiro câncer mais frequente em homens e mulheres e a terceira causa de morte por câncer nos Estados Unidos (CDC, 2014). A estimativa para o Brasil em 2016 é de 34.280 novos casos, sendo 16.660 em homens e 17.620 em mulheres (INCA, 2015), sendo que em 2013 foram catalogadas 15.415 mortes por essa neoplasia (INCA, 2014).

O tratamento do CCR tem evoluído muito nas últimas décadas com a introdução de novas drogas quimioterápicas para os pacientes com doença avançada. O fígado é o órgão mais frequentemente afetado por metástases, ocorrendo em aproximadamente 30% dos pacientes e sendo o responsável por dois terços dos óbitos no CCR (ABDALLA et al., 2006). Novas técnicas operatórias empregadas na cirurgia para o tratamento das metástases hepáticas e abordagem multidisciplinar do paciente tornaram a ressecção hepática mais segura e factível (VAUTHEY & KOPETZ, 2013). Esta abordagem combinada de ressecção cirúrgica e quimioterapia no tratamento das metástases hepáticas do CCR tem-se mostrado como o tratamento mais efetivo (VAUTHEY et al., 2013; KOPETZ et al., 2009), principalmente com a incorporação de novas drogas.

Entre os pacientes com metástases hepáticas, o subgrupo de pacientes que pode ser beneficiado com o tratamento cirúrgico com um aumento na so-

brevidade ainda é um desafio. A identificação de mutações no gene KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) tem sido estudada como um marcador de prognóstico nos pacientes com metástase hepática por CCR (KARAGKOUNIS et al., 2013).

O 5-fluorouracil (5-FU) foi a primeira droga a demonstrar efetividade no tratamento do CCR avançado. Posteriormente, demonstrou-se que a adição de leucovorin melhorava os resultados. Nos últimos anos, foram incorporadas duas novas drogas aos protocolos de tratamento: irinotecan e a oxaliplatina. O irinotecan foi usado inicialmente nos pacientes resistentes ao 5-FU-leucovorin (CUNNINGHAM, GLIMELIUS, 1999; DOUILLARD et al., 2000). A oxaliplatina é um derivado da platina que apresenta pequeno efeito se usada isoladamente, porém com grande atividade anticancerígena se combinada com a fluoropirimidina (ANDRÉ et al. 2004).

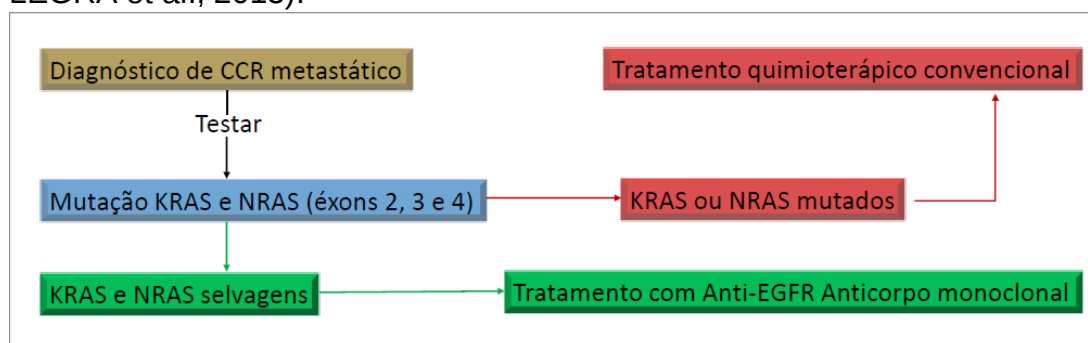
Mais recentemente, duas classes de agentes biológicos foram desenvolvidas para tratar o CCR sendo direcionadas ao Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF – *vascular endothelial growth factor*) e ao Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR – *epidermal growth factor receptor*).

Vários anticorpos têm ação sobre diferentes isoformas da VEGF circulante, inibindo a proliferação vascular, com atividade contra o CCR: Bevacizumabe, Ziv-aflibercept e Regorafenibe. O Cetuximabe é um anticorpo monoclonal recombinante que se liga ao EGFR e foi o primeiro agente com atividade nos pacientes com CCR refratários ao irinotecan e oxaliplatina. O Panitumumabe tem uma ação similar ao Cetuximabe (SEMRAD & KIM, 2016).

O uso destes novos tratamentos para o CCR avançado aumentou a sobrevida média em aproximadamente 30 meses nos ensaios clínicos mais recentes (HEINEMANN et al. 2014; VENOOK et al. 2014).

Vários fatores associados à sobrevida (biomarcadores de prognósticos) e fatores que possam identificar os pacientes com maior ou menor probabilidade de se beneficiarem de um tratamento específico (biomarcadores preditivos) necessitam de melhor compreensão. Esses biomarcadores são ferramentas que auxiliam na seleção de quais pacientes que se beneficiariam da quimioterapia ou da associação com agentes anti-EGFR ou anti-VEGF (Figura 1).

Figura 1 - Conduta para pacientes com CCR metastático (ASCO 2015) (ALLEGRA et al., 2015).



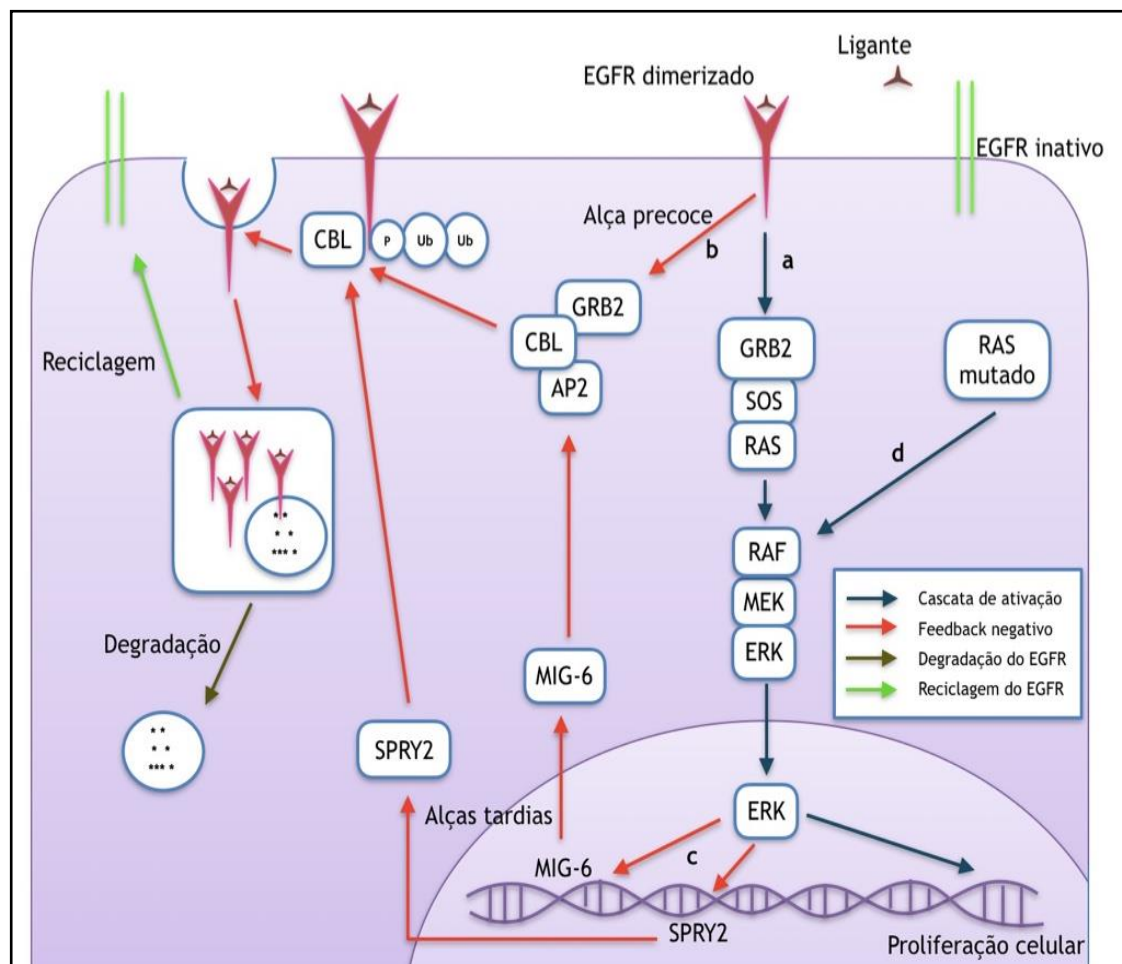
Os anticorpos monoclonais inibidores do receptor do fator de crescimento epidérmico (iEGFR) representam uma opção terapêutica com eficácia comprovada para pacientes com CCR metastático. Entretanto, apenas uma parcela destes apresenta resposta significativa. Quando há mutações dos genes codificantes das proteínas KRAS e NRAS, que resultam em uma ativação constitutiva dos sinais de transdução a partir dos mesmos, as células tumorais tornam-se insensíveis aos iEGFR (DOUILLARD et al., 2013; SORICH et al., 2015).

Inicialmente, acreditava-se que apenas as mutações nos códons 12 e 13 do KRAS seriam responsáveis pela resistência aos inibidores nesses pacientes. Entretanto, observou-se que tumores selvagens para estes códons e mutados em outros éxons do KRAS ou em éxons análogos do NRAS também cursavam com resistência ao tratamento. Frente a isso, tem sido preconizado o teste por PCR e sequenciamento para detectar mutações ativadoras nos 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 terapêutica, devido aos inibidores serem drogas de alto custo e com efeitos deletérios em pacientes portadores de mutação (IRAHARA et al., 2010, ALLEGRA et al., 2015). Entretanto, a pesquisa da mutação por PCR e sequenciamento é de alto custo, consome tempo, sendo realizada apenas em grandes centros (ALLEGRA et al., 2015).

A expressão do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) avaliada por Imuno-histoquímica (IHQ), um método mais difundido e já aplicado rotineiramente no manejo de pacientes oncológicos, já foi pesquisada com fins de guiar o tratamento destes pacientes, porém houve discordância entre a expressão do EGFR e a resposta terapêutica em estudos prévios (CUNNINGHAM et al., 2004; SALTZ et al., 2004). Nestes estudos, foi utilizado o anticorpo anti-EGFR clone 2-18C9 PharmDX™ e considerado como positividade apenas a expressão de membrana. Contudo, a expressão e ativação do receptor ocorrem por meio de alças regulatórias precoces e tardias, que envolvem o RAS, atenuando o sinal em toda cascata e/ou internalizando o receptor, podendo resultar em desfosforilação ou degradação do mesmo (MADSHUS, STANG, 2009; FROSI et al., 2010; AVRAHAM, YARDEN, 2011;

ZHANG, WOUDE, 2013), propiciando diferentes graus de marcação citoplasmática e de membrana (Figura 2).

Figura 2 – Alças regulatórias do EGFR.



2a. A interação do ligante com o EGFR leva a sua dimerização e autofosforilação. O mesmo é reconhecido pelo GRB2 que desencadeia a cascata de ativação RAS-RAF-MEK-ERK e a proliferação celular. 2b. Alça de regulação precoce - O GRB2 recruta uma ubiquitina ligase - CBL, que leva a endocitose de receptores fosforilados. 2c. Alça de regulação tardia - A ativação da cascata RAS-RAF-MEK-ERK ativa a transcrição de MIG-6 e SPRY2 que inibem a cascata em diversos pontos, sendo um deles a endocitose e degradação do receptor. 2d. O RAS mutado e constitutivamente ativado desencadeia a cascata RAF-MEK-ERK, culminando em proliferação celular e regulação negativa tardia (p.ex. endocitose) do EGFR.

Uma vez mutados e constitutivamente ativados, KRAS e NRAS podem ativar alças regulatórias tardias, levando à internalização do EGFR e à sua marcação citoplasmática, interferindo em seu padrão de expressão (MADSHUS, STANG, 2009; FROSI et al., 2010; AVRAHAM, YARDEN, 2011; ZHANG,

WOUDE, 2013) (Figura 2 - Alças Regulatórias do EGFR). Além disso, o uso de um anticorpo monoclonal anti-EGFR selvagem (DAK-H1-WT) em CCR mostrou importante ganho em sensibilidade em relação ao anticorpo utilizado em outros estudos (EGFR 2-18C9 PharmDX™) (SHIOGAMA et al., 2013).

1.1 Gene e receptor EGFR:

O EGFR é um receptor tirosina-quinase transmembrana que faz parte da família dos genes ErbB (HER1 - EGFR, HER2, HER3 e HER4). Possui um 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, o mesmo sofre autofosforilação do seu domínio tirosina-quinase intra-citoplasmático desencadeando ativação em cascata da via RAS/RAF/MEK/MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) e, por conseguinte, de fatores de transcrição nucleares responsáveis por ativação e regulação de genes responsáveis por replicação celular, angiogênese, diferenciação e etc. O mesmo é expresso em tumores de pulmão, cólon, mama, cabeça e pescoço, ovário, pâncreas, bexiga e rim (SULLIVAN, KOZUCH, 2011; KRASINSKAS, 2011).

A expressão e ativação do receptor possuem alças regulatórias precoces e tardias, atuando na atenuação do sinal em toda cascata e/ou na internalização do EGFR. Como resultado, há desfosforilação ou degradação do mesmo (MADSHUS, STANG, 2009; FROSI et al., 2010; AVRAHAM, YARDEN, 2011; ZHANG, WOUE, 2013), permitindo sua detecção tanto em membrana quanto em citoplasma. Uma vez ativado e fosforilado, o receptor é reconhecido pelo GRB2 que desencadeia a cascata de ativação RAS-RAF-MEK-ERK e a proliferação celular (Figura 2a). Na alça de regulação precoce,

o GRB2 recruta uma ubiquitina ligase - CBL, que desencadeia a endocitose de receptores fosforilados (Figura 2b). Já na alça de regulação tardia, a ativação da cascata RAS-RAF-MEK-ERK ativa a transcrição de MIG-6 e SPRY2 que inibem a cascata em diversos pontos, sendo um deles a endocitose e degradação do receptor (Figura 2c). O RAS, componente da cascata de ativação EGFR/ MAPK, quando mutado e ativado, desencadeia a cascata RAF-MEK-ERK constitutivamente, culminando em proliferação celular e ativação da alça de regulação negativa tardia do EGFR (p.ex. endocitose) (Figura 2d) (MADSHUS, STANG, 2009; FROSI et al., 2010; AVRAHAM, YARDEN, 2011; ZHANG, WOUDE, 2013).

As mutações do gene EGFR são incomuns em cânceres colorretais (LEE et al., 2005; DE ROOCK et al., 2010).

Há estudos por IHQ que mostram expressão de EGFR em 60 a 80% dos carcinomas colorretais (CCR) (SPANIO et al., 2005), entretanto apenas 24% destes tumores apresentam amplificação do gene EGFR (SHIA et al., 2005). Análises clínicas mostraram discordância entre este padrão de expressão do EGFR e a resposta terapêutica aos inibidores do EGFR (LOUPAKIS et al., 2009; VAN CUTSEM et al., 2009). Há ainda o fato de até 25% dos tumores com expressão negativa para EGFR, nestes trabalhos, serem responsivos a Cetuximab (iEGFR) (CHUNG et al., 2009). Porém, a grande maioria desses estudos utilizou nas reações de IHQ o kit PharmDx™ com o anticorpo EGFR 2-18C9 PharmDX™ para detecção do EGFR, contrapondo ao importante aumento de sensibilidade na pesquisa desse receptor utilizando o clone de anticorpo DAK-H1-WT que detecta somente receptores selvagens (SHIOGAMA et al., 2013).

Enquanto alguns estudos mostram relação entre a expressão e o grau do tumor com a sobrevida dos pacientes (GOLDSTEIN et al., 2001; RESNICK et al., 2004), outros não têm tido resultados semelhantes (SPANIO et al., 2005).

Um estudo com 47 pacientes não mostrou significância da amplificação do gene na resposta terapêutica (ITALIANO et al., 2008). Outro estudo mostrou que os 17% de pacientes com KRAS selvagem e amplificação do gene EGFR tratados com Cetuximab obtiveram resposta terapêutica, sugerindo que a detecção isolada da amplificação não teria valor preditivo sem a confirmação do estado selvagem do KRAS (LAURENT-PUIG et al., 2009).

1.2 Genes e Proteínas KRAS e NRAS:

KRAS e NRAS são membros da família de oncogenes RAS. Dão origem a 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 CCR (FERNÁNDEZ-MEDARDE, SANTOS, 2011). Mutações somáticas destes genes são um evento precoce na carcinogênese, estando presente em 40 a 45% dos CCR, sendo geralmente excludentes entre si (LESLIE et al., 2002; ROTH et al., 2010).

Uma vez mutadas, estas proteínas estimulam a via de segundos mensageiros sem a necessidade de ativação do EGFR, portanto levando a resistência ao tratamento com inibidores deste receptor (Cetuximab e Panitumumab) (AMADO et al., 2008; KARAPETIS et al., 2008; LIÈVRE et al., 2008; VAN CUTSEM et al., 2015). Casos com KRAS selvagem apresentaram bene-

fício clínico com uso de inibidores do EGFR isolado e em conjunto com quimioterapia (LIÈVRE et al., 2008; DE ROOCK et al., 2010; VAN CUTSEM, 2011). Entretanto, por volta de 40-60% dos pacientes sem esta mutação ainda falham na resposta aos inibidores (DI NICOLANTONIO, 2008). Estudos clínicos randomizados fase III evidenciaram a ausência de resposta em pacientes portadores de mutações tanto no KRAS, quanto no NRAS (VAN CUTSEM et al., 2015). Mutações do oncogene BRAF (p.V600E), molécula também associada a vias de sinalização do EGFR - RAS, têm sido implicadas em uma proporção destes pacientes não responsivos (DE ROOCK et al., 2010; ROTH et al., 2010; VAN CUTSEM, 2011,2015). Há também a via paralela do PTEN/PIK3CA/AKT - EGFR que inibe a apoptose de células neoplásicas, sendo que o PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue Gene) inibe essa via ao utilizar o PIK3CA como substrato. Uma vez com mutações na via, há hiperfosforilação do AKT e inibição constitutiva da apoptose e consequentemente falha na resposta aos inibidores do EGFR (JHAWER et al., 2008; DE ROOCK et al., 2010).

1.3 Correlação entre EGFR e RAS:

O EGFR ativa a via da proteino-quinase regulada por sinais extracelulares (MAPK) através do RAS. Essa ativação resultará na transcrição de diversos fatores de crescimento, entretanto haverá também a produção de MIG-6 e SPRY2, os quais atuam em alça regulatória negativa, ativando a internalização e degradação do receptor (MADSHUS, STANG, 2009; FROSI et al., 2010; AVRAHAM, YARDEN, 2011; ZHANG, WOUDE, 2013). Pesquisas para averiguar a relação direta entre a amplificação e expressão do EGFR e o es-

tado de mutação do KRAS mostraram não haver relação entre estes dois genes (HEINEMANN et al., 2009; MILANO et al., 2008). Entretanto, foram realizadas em séries pequenas, algumas analisaram apenas a amplificação (HEINEMANN et al., 2009) e outros estudam a expressão por análise de alta e baixa afinidade de ligação do receptor pelo método de Scatchard (MILANO et al., 2008; FRANCOUAL et al., 2006).

Não há estudos comparando a expressão membrano-citoplasmática por IHQ do EGFR. Dar ênfase na expressão membrano-citoplasmática e não somente na membrana leva em consideração o fato da expressão de membrana e citoplasma ser variável, dependendo de quão ativas estão as alças regulatórias. Não há também estudos, neste sentido, utilizando o clone mais sensível do anticorpo anti-EGFR (DAK-H1-WT), correlacionando com o estado mutacional do RAS expandido, analisando não só os éxons do KRAS, mas também os principais éxons do NRAS.

Portanto, a validação da expressão membrano-citoplasmática do EGFR por IHQ, utilizando o clone DAK-H1-WT, correlacionada ao estado mutacional do RAS expandido pode permitir que o tratamento seja instituído através de um método diagnóstico menos oneroso e mais acessível.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Investigar a possível correlação entre a expressão membrano-citoplasmática do EGFR por imuno-histoquímica e o estado mutacional do gene RAS expandido em pacientes com carcinoma colorretal.

2.2. Objetivos específicos:

Testar a expressão membrano-citoplasmática do EGFR por imuno-histoquímica em casos de carcinoma colorretal, utilizando o anticorpo monoclonal anti-EGFR DAK-H1-WT.

Propor um escore de classificação referente ao padrão membrano-citoplasmático de marcação do EGFR na imuno-histoquímica.

Avaliar a correlação entre os resultados das pesquisas da expressão do EGFR e o estado mutacional do RAS expandido.

Avaliar a correlação dos dados clínico-patológicos com os resultados do EGFR e do RAS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos:

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Alberto Rassi - HGG (Parecer nº 961.174 - CEPHGG 775/15 - Anexo A)

3.2 Seleção dos pacientes:

O arquivo do Departamento de Patologia do Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH) foi pesquisado para a seleção de pacientes submetidos a ressecção cirúrgica de CCR no período de janeiro de 2014 a junho de 2015. Um total de 169 casos que tinham os blocos de parafina com material biológico tumoral disponíveis foram selecionados.

Destes casos, 30 com sinais de autólise, inadequados para estudo molecular ou que não haviam sido testados para mutação do RAS foram excluídos do estudo.

3.3 Coleta de dados:

Dados clínico-patológicos e do estado mutacional do RAS expandido de cada paciente foram obtidos de nosso banco de dados. Tipo histológico, grau histológico e localização foram também analisados de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2010 (HAMILTON et al., 2010), e o estadiamento ocorreu de acordo com a 7ª Edição do manual de estadiamento da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC, 2009).

3.4 Cálculo amostral:

O cálculo amostral foi realizado tendo como objetivo um nível de significância (α) de 0,05 e poder do teste de 90%. Sabendo que a proporção de

pacientes com mutações RAS em estudos anteriores em população de portadores de CCR é por volta de 45% (IRAHARA et al., 2010), o cálculo amostral foi realizado com base na estimativa da proporção populacional utilizando a seguinte fórmula $n = Z_{\alpha/2}^2 \cdot p \cdot q / E^2$, em que n é o número de indivíduos na amostra, $Z_{\alpha/2}$ é valor crítico que corresponde ao nível de confiança desejado, p é a proporção populacional de indivíduos que pertence à categoria que estamos interessados em estudar (RAS mutado), “q” é a proporção populacional de indivíduos que não pertence à categoria que estamos interessados em estudar ($q = 1 - p$) e E representa o poder da amostra (MIOT, 2011). Assim, o cálculo feito foi:

$$n = 1,96^2 \times 0,45 \times 0,55 / 0,11^2 = 95,07.$$

Sendo encontrado um $n = 96$.

3.5 Reações de PCR e sequenciamento:

Todos casos selecionados foram testados, sem custos para o estudo ou para os pacientes, por demanda clínica para mutação do RAS expandido pelos programas GENTeorienta (Merck, Darmstadt, Alemanha) e RASTREAR (AMGEN, [Thousand Oaks](#), [California](#), EUA), no laboratório parceiro certificado (Anexo C) PROGENÉTICA (Rio de Janeiro, Brasil). Para extração do DNA dos blocos parafina, áreas contendo pelo menos 50% de células tumorais foram delimitadas, por um patologista, em lâmina corada com Hematoxilina e Eosina (HE), para cada caso. As lâminas não coradas correspondentes foram imersas em xylol (SIGMA, Saint Louis, Missouri, EUA) e duas vezes em álcool 100% (Merck) por 5 minutos cada. Áreas tumorais, que foram previamente delimitadas por comparação com as lâminas de HE correspondente, passaram por macrodissecção e foram transferidas para tubo de microcentrífuga. O

DNA foi isolado utilizando QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Venlo, Holanda), seguindo orientações do fabricante. Finalmente, o DNA foi quantificado por espectrometria com NanoDrop-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, EUA).

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

O éxon 4 do KRAS e todos os éxons do NRAS foram testados pelo método de Sanger automatizado em uma fita em sentido duplo (*“forward”* e *“reverse”*) em ordem para avaliar a presença/ausência de alterações do DNA em ambas as fitas. Os pares de primers deste estudo para NRAS éxons 2, 3 e 4 e KRAS éxons 4 foram todos desenhados utilizando o software primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

Na análise de todos os éxons, o DNA foi submetido a desnaturação inicial, seguida de 35-40 ciclos de amplificação. As condições de amplificação por PCR foram as mesmas para todos os éxons NRAS. A desnaturação inicial ocorreu a 95°C por 15 minutos, seguida de 35 ciclos de 10 segundos a 95°C, 20 segundos a 69°C e 30 segundos a 72°C. Já para o éxon 4 do KRAS a desnaturação inicial a 95°C durou 10 minutos, seguida de 35 ciclos de 20 segundos a 95°C, 20 segundos a 65°C e 20 segundos a 72°C, com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Antes do sequenciamento, todos os produtos de amplificação foram purificados para remover os excessos de primers, sais, enzimas e dNTP's da

reação prévia. Para isso, foi utilizado Illustra® GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido).

A reação de sequenciamento utilizou 1 µL de produto de cada amostra somado a 0,5 µL de Big Dye® Terminator v1.1 sequencing Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA), 3,4 µL de Big Dye® Terminator v1.1, v1.3 5x sequencing buffer (Applied Biosystems®), 350nM de um dos primers ("forward" e "reverse") e 4,78 µL de água estéril bidestilada (B. Braun, Melsungen, Alemanha), para um volume total de 10 µL. As amostras foram então submetidas a uma desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos a 95°C por 10 segundos, 50°C por 10 segundos e 60°C por 2 minutos, com uma extensão final a 60°C por 10 minutos. Os produtos de sequenciamento foram purificados utilizando Illustra Sephadex® G-50fine (GE Healthcare Life Sciences) e acrescidos de 12 µL de Hi-Di™ 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 com o Sequencing Analysis Software v5.4 (Applied Biosystems). Todos foram lidos pelo menos duas vezes, revisados manualmente e com o software Mutation Surveyor Software v4.0.8.

3.6 Reações de Imuno-histoquímica:

As reações de imuno-histoquímica para detecção da expressão do EGFR foram realizadas em todos os casos selecionados no Laboratório certificado (Anexo D) INGOH. Foram obtidas duas lâminas de cada amostra com cortes de tecido parafinado de 4 µ de espessura. Uma das lâminas foi corada

por HE, para confirmação de dados morfológicos, e a outra submetida a reação de IHQ pelo método automatizado DAKO Autosteiner Link48 (DAKO®, Glostrup, Denmark), 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 endógeno com 150 µL de peróxido por 5 minutos, incubação com 150 µL da diluição 1:1000 do anticorpo primário Epidermal Growth Factor Receptor - Clone DAK-H1-WT - Anti-Human - Monoclonal Mouse (DAKO) por 15 minutos, amplificação com 150 µL de LINKER (EnVision FLEX - DAKO) por 15 minutos, reação com 150 µL de polímero (EnVision Flex/HRP) por 20 minutos, revelação com 300 µL de cromógeno por 5 minutos e contracoloração com 300 µL de Hematoxilina (EnVision FLEX) por 5 minutos.

3.7 Análise das lâminas de IHQ:

As lâminas da reação de imuno-histoquímica de cada caso foram avaliadas por dois patologistas em consenso. Foi utilizado escore de classificação da marcação tanto de membrana, quanto de citoplasma (Tabela 1). 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 3). Marcação de membrana focal e fraca em qualquer quantidade de células foi considerada +1, e o restante dos casos considerados +2 (Figura 4). A marcação citoplasmática variou de 0 a -3, considerando desde a ausência de marcação 0 até a marcação forte e difusa -3 (Figura 3). Foram também considerados casos com grandes áreas

negativas (maiores que 30% das células) tanto de membrana quanto de citoplasma, independente do restante da marcação, atribuindo-se escore -1 para esses casos (Tabela 1).

3.8 Escore e Grupos de classificação:

Os casos foram agrupados quanto ao somatório dos escores em 3 grupos: "Positivos", "Negativos" e "Duvidosos". As amostras com resultado 2 e 3 foram alocadas no grupo "Positivos". Aquelas com resultado 0 e 1 foram alocadas no grupo "Duvidosos" (Figura 4a). As amostras com resultados negativos foram alocadas no grupo "Negativos".

3.9 Análise estatística:

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

Tabela 1 - Escore proposto para análise da expressão membrano-citoplasmática do EGFR por IHQ.

MEMBRANA (M)	CRITÉRIO
Escore 3+	Forte e completa em mais de 50% das células.
Escore 2+	Intermediária entre escore 1+ e 3+.
Escore 1+	Focal e fraca em qualquer quantidade de células.
Escore 0	Ausência de marcação de membrana.
CITOPLASMA (C)	CRITÉRIO
Escore 0	Ausência de marcação citoplasmática.
Escore 1-	Fraca em qualquer quantidade de células.
Escore 2-	Intermediária em mais de 10% das células.
Escore 3-	Forte em mais de 10% das células.
ÁREAS NEGATIVAS (AN)	CRITÉRIO
Escore 0	Qualquer marcação em mais 70% das células.
Escore 1-	Ausência de marcação em mais de 30% das células.
RESULTADO	CRITÉRIO
Positivo	$= \sum (M + C + AN \geq 2)$
Negativo	$= \sum (M + C + AN \leq 1-)$
Duvidoso	$= \sum (M + C + AN = 0 \text{ ou } 1).$

4. RESULTADOS

4.1 Article, authors and journal:

Article:

Cytoplasmic-membrane immunohistochemical EGFR expression predicts expanded RAS mutation status in colorectal carcinomas.

Authors:

Thiago David Alves Pinto, Pathologist Physician, Instituto Goiano of Oncologia e Hematologia/Department of Pathology, Goiânia, Goiás, Brazil.

Pedro Henrique Pinto, Physician, Resident in Pathology, Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia/Department of Pathology, Goiânia, Goiás, Brazil.

Thaís David das Neves Alves, Medical Student, Faculdade de Medicina de Petrópolis, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil.

Sebastião Alves Pinto, MsC, Pathologist Physician, Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia/Department of Pathology, Goiânia, Goiás, Brazil.

Enio Chaves de Oliveira, Phd, Clinical Surgery, School of Medicine, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

Journal: Diseases of the Colon & Rectum (Submitted).

4.2 Title Page:

CYTOPLASMIC-MEMBRANE IMMUNOHISTOCHEMICAL EGFR EXPRESSION PREDICTS EXPANDED RAS MUTATION STATUS IN COLORECTAL CARCINOMAS.

Running Head: EGFR EXPRESSION PREDICTS EXPANDED RAS STATUS

Thiago David Alves Pinto MD, Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia/Department of Pathology, Goiânia, Goiás, Brazil.

Pedro Henrique Pinto MD, Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia/Department of Pathology, Goiânia, Goiás, Brazil.

Thaís David das Neves Alves, Faculdade de Medicina de Petrópolis, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil.

Sebastian Alves Pinto, MsC, Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia/Department of Pathology, Goiânia, Goiás, Brazil.

Enio Chaves de Oliveira MD, PhD, Clinical Surgery, School of Medicine, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

Correspondence: Thiago David Alves Pinto, Rua T-48, número 559, Zip Code 74210-190, Goiânia, Goiás, Brasil. Telephone (5562)996882111 Email: thiagodap@hotmail.com.

Disclaimers: I declare that the contents of this contribution does not have anything that could be considered illegal, defamatory or which may cause any conflict of interest or which may interfere with the impartiality of the work presented.

Support: The realization of the immunohistochemistry reaction was funded by Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia, using subsided inputs directly to this research by DAKO do Brasil.

The manuscript hasn't been and won't be a podium or a poster meeting presentation.

Word count of the text: 3081.

Word count of the abstract: 296.

Contribution of the authors:

Study drawing, data collection, data analysis: Pinto TDA, Pinto PH, Alves TDN, Pinto SA, Oliveira EC.

Article revision and writing: Pinto TDA, Pinto PH, Alves TDN, Pinto SA, Oliveira EC.

Final approval of the version to be published: Pinto TDA, Pinto PH, Alves TDN, Pinto SA, Oliveira EC.

Category of the paper: a. Colorectal/Anal neoplasia.

4.3 Abstract:

Background: Inhibitors of the epidermal growth factor represent an effective therapeutic option for patients with metastatic colorectal carcinoma, free of activating mutations in expanded RAS. 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, may allow treatment by a diagnostic method less costly and more accessible.

Objective: To investigate the correlation between the cytoplasmic-membrane expression of the EGFR and the mutational status of the expanded RAS in colorectal carcinomas.

Design: Retrospective study of accuracy.

Settings: The study was conducted at one single institution.

Patients: We selected 139 patients with colorectal carcinoma from the archives of Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia.

Main Outcome Measures: We tested the correlation between the clinical-pathological data, the cytoplasmic-membrane expression of the EGFR and the mutational status of the expanded RAS.

Results: Mutation of the expanded RAS was detected in 78 (56.1%) cases. The EGFR expression was stratified in 23 (16.5%) "Positive" cases, 49 (35.2%) "Negative" and 67 (48.2%) "Uncertain". Of the 23 "positive" cases, 21 (91.3%) showed wild-type RAS gene, of the 49 "Negative" cases, 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.

Limitations: The study has a small sample. The analysis of the EGFR expression was performed by only two pathologists. The mutational status of the RAS was available during the expression analysis. The mutational status of the BRAF AND PIK3CA genes was not contemplated in the study.

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.

4.4. Introduction:

Monoclonal antibodies inhibitors of the epidermal growth factor receptor (iEGFR) represent a therapeutic option with proven efficacy for patients with metastatic colorectal Carcinoma (CCR) and wild-type KRAS and NRAS genes. When there are mutations of these genes there is a constitutive activation of the transduction signs from them and the tumor cells become insensitive to the iEGFR (1,2).

It has been proposed the test by PCR and gene sequencing to detect activating mutations at codons 12 and 13 (exon 2), 59 and 61 (exon 3), 117 and 146 (exon 4) of the KRAS and NRAS genes before the start of therapy, due to the inhibitors being high cost drugs and with deleterious effects in patients with mutation (3). However the mutation research by PCR and gene sequencing is of high cost, time-consuming, being performed only in large centers (4).

The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) expression by Immunohistochemistry (IHC) has already been investigated to guide the treatment of these patients, but there was disagreement between the expression and the therapeutic response in previous studies (5, 6). In these studies it was used the antibody anti-EGFR clone 2-18C9 PharmDX™ and considered as positivity only the membrane expression. However the expression and activation of the receptor occur through early and late regulatory loops, that involve the RAS, attenuating the signal across the whole cascade and/or internalizing the receptor, possibly resulting in dephosphorylation or degradation (7-10), providing different degrees of cytoplasmic and membrane marking.

Once mutated and constitutively activated KRAS and NRAS may activate the regulatory loops, leading to the internalization of the EGFR and its cytoplasmic marking, interfering in their expression pattern (7-10) (Fig.2). In addition, the use of a monoclonal anti-EGFR wild-type antibody (DAK-H1-WT) in CCR has presented significant gain in sensitivity in relation to the antibody used in other studies (EGFR 2-18C9 PharmDX™)(11).

Therefore, the validation of the cytoplasmic-membrane expression of the EGFR by IHC, predicting the mutational status of the expanded RAS, it may allow that the treatment to be established through a diagnostic method less costly and more accessible.

The objective of this study is to propose an analysis method of the EGFR expression, using the monoclonal anti-EGFR DAK-H1-WT antibody, considering membrane/cytoplasmic marking and evaluate its correlation with the mutational status of the expanded RAS.

4.5 Materials and methods:

This study was approved by Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Alberto Rassi - HGG (Public Opinion no. 961.174 - CEPHGG 775/15 - Annex A).

Selection of patients:

The archive of the Department of Pathology of Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH) was researched for the selection of patients who underwent surgical resection of CCR in the period from January 2014 to June 2015. A total of 169 cases with available tumor biological material paraffin block were selected.

Of these cases, 30 with signs of autolysis, unsuitable for molecular study or that had not been tested for mutation of the RAS were excluded from the study.

Clinical-pathological data and the mutational status of the expanded RAS in each patient were obtained from our database. Type, histological grade and location were also analyzed in accordance with the criteria established by the World Health Organization (WHO) in 2010 (12) and the staging defined in accordance with the 7th edition of the staging manual of the AJCC (13).

The sample size was calculated based on the population proportion estimate, considering 0.05 of confidence level, test power of 90% and that patients with RAS mutations represent 45% of the bearer population of CCR (14).

PCR reactions and gene sequencing:

All the selected cases were tested, without cost for the study or for the patients, on clinic demand, for the mutation of the expanded RAS by GENTe-orienta (Merck, Darmstadt, Germany) and RASTREAR (AMGEN, Thousand Oaks, USA) programs, in the certificated associated lab (Annex C) PROGE-NETICA (Rio de Janeiro, Brazil). For DNA extraction from paraffin blocks, areas containing at least 50% of tumor cells were delimited, by a pathologist, in stained slide with hematoxylin and Eosin (HE), for each case. The non-stained slides, corresponding, were immersed in xylol (SIGMA, St Louis, USA) and twice in alcohol 100% (Merck, Darmstadt, Germany), for 5 minutes each. Tumor areas, which were previously delimited by comparison with the corresponding slides of HE, went through microdissection and were transferred to a tube of microcentrifuge. The DNA was isolated using QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. Finally, the DNA was quantified by spectrometry with NanoDrop-1000® (NanoDrop Technologies, ThermoFisher, Waltham, USA®).

All samples were subjected to DNA sequencing. The exons 2 (codons 12 and 13) and 3 (codon 61) of the KRAS were tested by Pyrosequencing with the KRAS Pyro Kit (QIAGEN) commercial kit. The reactions and analysis were performed according to the manufacturer's instructions, using the PyroMark Q24 system (QIAGEN).

The exon 4 of the KRAS and all exons of the NRAS have been tested by the automated Sanger method in a two-sided tape (*forward* and *reverse*) in order to evaluate the existence of DNA changes in both the tapes. The primer pairs in this study for NRAS exons 2, 3 and 4, and KRAS exon 4 were all

designed using the software primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

In the analysis of all exons the DNA was subjected to initial denaturation, followed by 35-40 cycles of amplification.

Before the sequencing all amplification products were purified to remove primer, salts, enzymes and dNTP's excesses of the prior reaction.

The sequencing reaction used 1 µL of product of each sample added to 0.5 µL of Big Dye® Terminator v1.1 sequencing Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA), 3.4 µL of Big Dye® Terminator v1.1, v1.3 5x sequencing buffer (Applied Biosystems), 350nM of one of the primers ("forward" and "reverse") and 4.78 µL of double-distilled sterile water (B. Braun, Melsungen, Germany), for a total volume of 10 µL. The samples were then subjected to an initial denaturation, followed by 35 cycles of synthesis. The sequencing products were purified using Illustra Sephadex® G-50fine (GE Healthcare Life Sciences) and plus 12 µL of Hi-Di™ Formalize (Applied Biosystems). The products were analyzed in the ABI PRISMTM 310® Genetic Analyzer (Applied Biosystems) or in 3500® Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Electroferrograms were analyzed with the Sequencing Analysis Software v5.4 (Applied Biosystems). All of them have been read at least twice and reviewed manually and with the software Mutation Surveyor Software v4.0.8.

Reactions of Immunohistochemistry:

The reactions of immunohistochemistry for detection of the EGFR expression were performed in all the selected cases. Two slides of each FFPE sample with cuts of 4 µ of thickness were obtained. One of the slides were

stained with HE, for confirmation of morphological data, and the other submitted the reaction of IHC by automated DAKO Link Autostainer48® method (Dako, Glostrup, Denmark), using DAKO Flex Kit. The samples were subjected to antigen retrieval by controlled heat exposure in a solution of high pH using PTLINK® (Dako), endogenous blockade with peroxide, incubation with the primary antibody Epidermal Growth Factor Receptor - Clone DAK-H1-WT - Anti-Human - Monoclonal Mouse (Dako), for *in vitro use only*, at a dilution of 1:1000, amplification with LINKER (EnVision FLEX - DAKO), reaction with the polymer (EnVision Flex/HRP) for 20 minutes, revelation of chromogen for 5 minutes and counterstaining with hematoxylin (EnVision FLEX) for 5 minutes.

Analysis of the Immunohistochemistry slides:

The slides of the IHC reaction of each case were evaluated by two pathologists in consensus (S.A.P, T.D.A.P). We used a classification score of the membrane and cytoplasm marking (Table 1). For membrane marking the score ranged from 0 to +3. The sample should contain strong and complete membrane marking in more than 50% of neoplastic cells to be considered +3 (Fig. 2d). The focal and weak membrane marking in any quantity of cells was considered +1 (Fig. 2a) and the rest of the cases were considered +2 (Fig. 2b/2c). The cytoplasmic marking ranged from 0 to -3, whereas since the absence of marking (0) until the strong and diffuse marking (-3) (Fig. 2). The cases with large negative areas, larger than 30% of the neoplasia, both membrane and cytoplasm were also considered, independently of the marking, assigning score of -1 to these cases (Table 1).

The cases were grouped according to scores sum into 3 classes. "Positive", "Negative" and "Uncertain". The samples with results 2 and 3 were allocated in the "Positive" class (Fig. 3). Those with 0 and 1 results were assigned in the "Uncertain" class. Those with negative results were assigned in the "Negative" class.

Statistical analysis:

The statistical analysis was performed using the software SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). To evaluate the statistical significance, it was applied the chi-square test considering $p < 0.001$.

Table 1 - Score proposed for analysis of the cytoplasmic-membrane expression of the EGFR by IHC.

MEMBRANE (M)	CRITERIA
Score 3+	Strong and complete in more than 50% of the cells.
Score 2+	Intermediate between score 1+ and 3+
Score 1+	Focal and weak in any quantity of cells.
Score 0	Absence of membrane marking
CYTOPLASM (C)	CRITERIA
Score 0	Absence of cytoplasmic marking.
Score 1-	Weak in any quantity of cells.
Score 2-	Intermediate in more than 10% of the cells.
Score 3-	Strong in more than 10% of the cells.
NEGATIVE AREAS (NA)	CRITERIA
Score 0	Any marking in more than 70% of the cells.
Score 1-	Absence in making in more than 30% of the cells.
RESULT	CRITERIA
Positive	$= \sum (M + C + NA \geq 2)$
Negative	$= \sum (M + C + NA \leq 1-)$
Uncertain	$= \sum (M + C + NA = 0 \text{ or } 1).$

4.6 Results:

Clinical-pathological correlations of the mutation of the expanded RAS and of the EGFR Expression.

The average age of the 139 patients was 61.8 years with a standard deviation of 13.9 years, being 26 (19.5%) less than 50 years and 10 (7.5%) less than 40 years. There was no disparity of gender, being 52.9% of men and 47.1% of women.

The mutation of the expanded RAS was detected in 78 (56.1%) of the 139 cases with CCR tested by Pyrosequencing and by automatized Sanger method. Of these, 72 cases (51.79%) had mutations in the KRAS gene, with 63 cases (45.3%) with mutations in the codons 12 and 13 (exon 2), 4 cases (2.8%) with mutations in codon 61 (exon 3) and 5 cases (3.59%) with mutations in codon 146 (exon 4). No mutations were detected in codons 59 (exon 3) and 117 (exon 4) in the KRAS gene.

The research with the NRAS gene has revealed mutations in 6 cases (4.3%) in the codons 12 and 61 (exons 2 and 3), with no mutation being detected in the codon 13 (exon 2), in the codon 59 (exon 3) and in the codons 117 and 146 (exon 4).

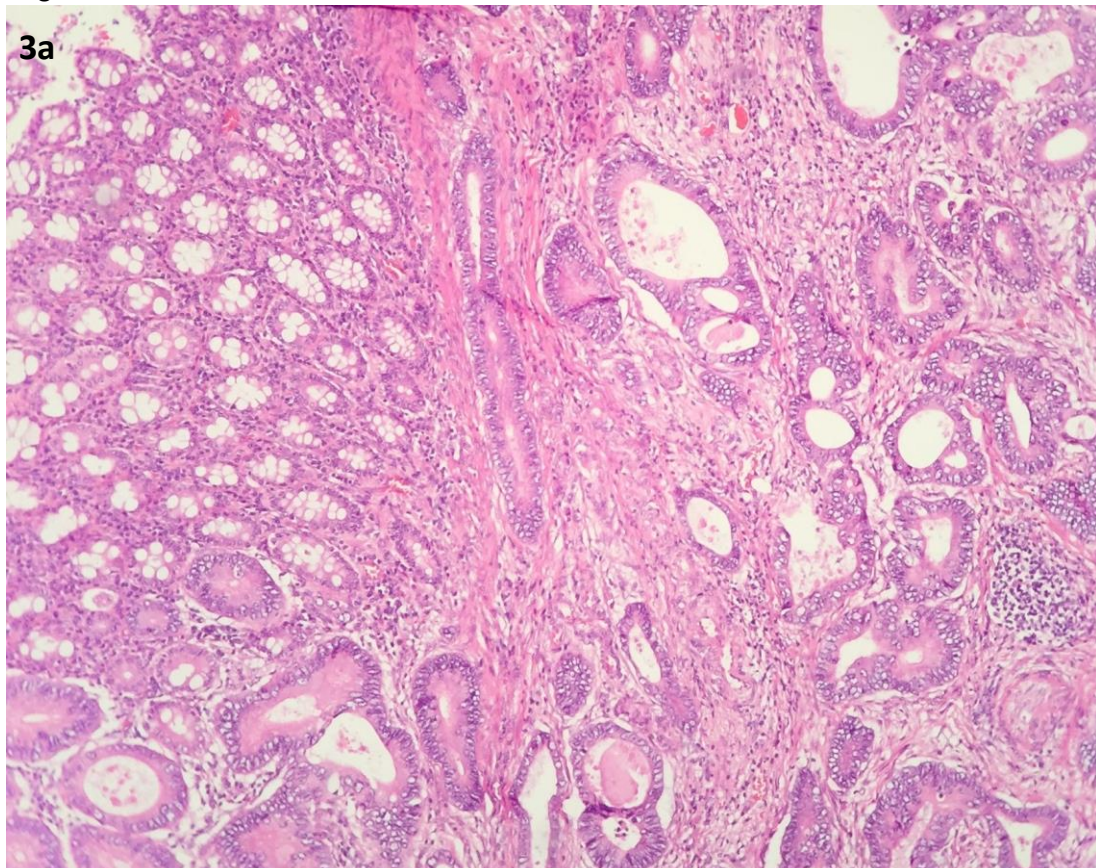
The IHC slides analysis revealed marking of exclusive membrane in only 4 cases (2.8%) and of exclusive cytoplasm, in other 4 cases (2.8%). All cases with exclusive marking of membranes showed wild-type RAS and all cases marked with unique cytoplasmic showed mutated RAS. The rest of the cases showed positivity for both membrane and cytoplasm at variable intensities. 23 cases (16.5%) were allocated in the "Positive" group (scores 2 and

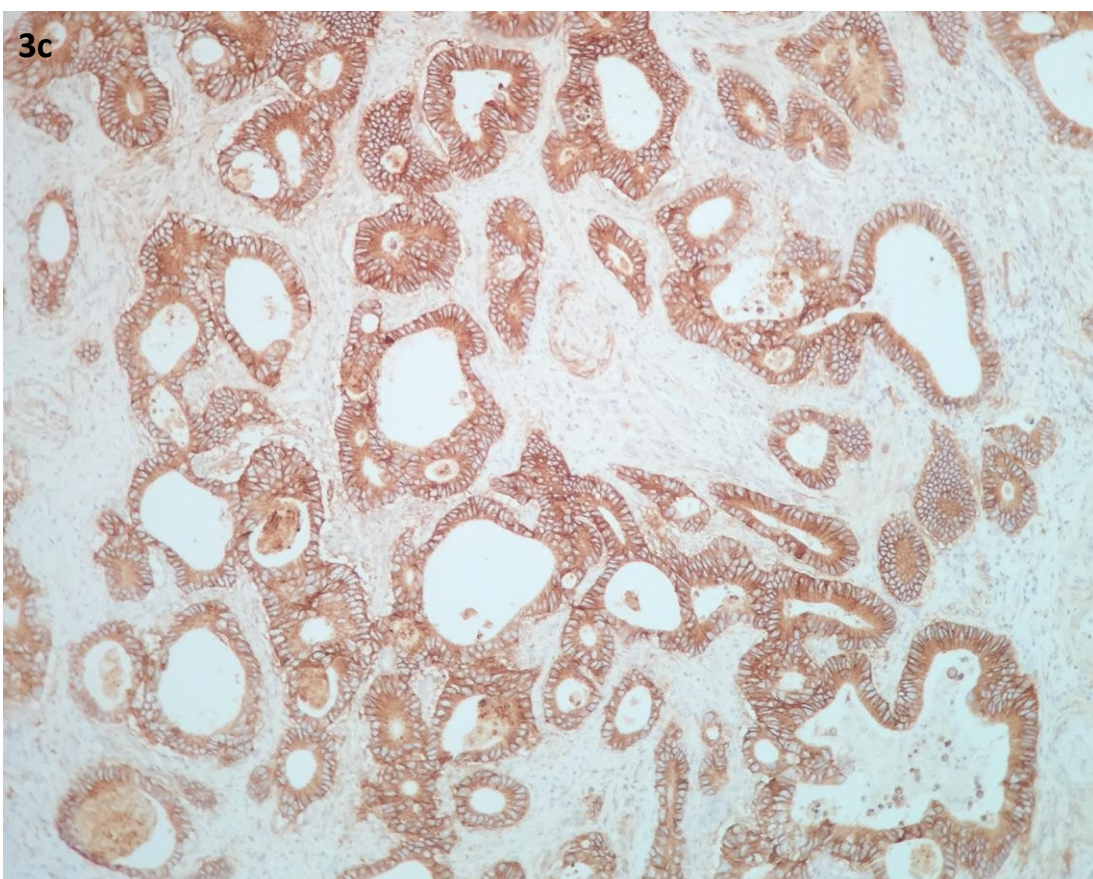
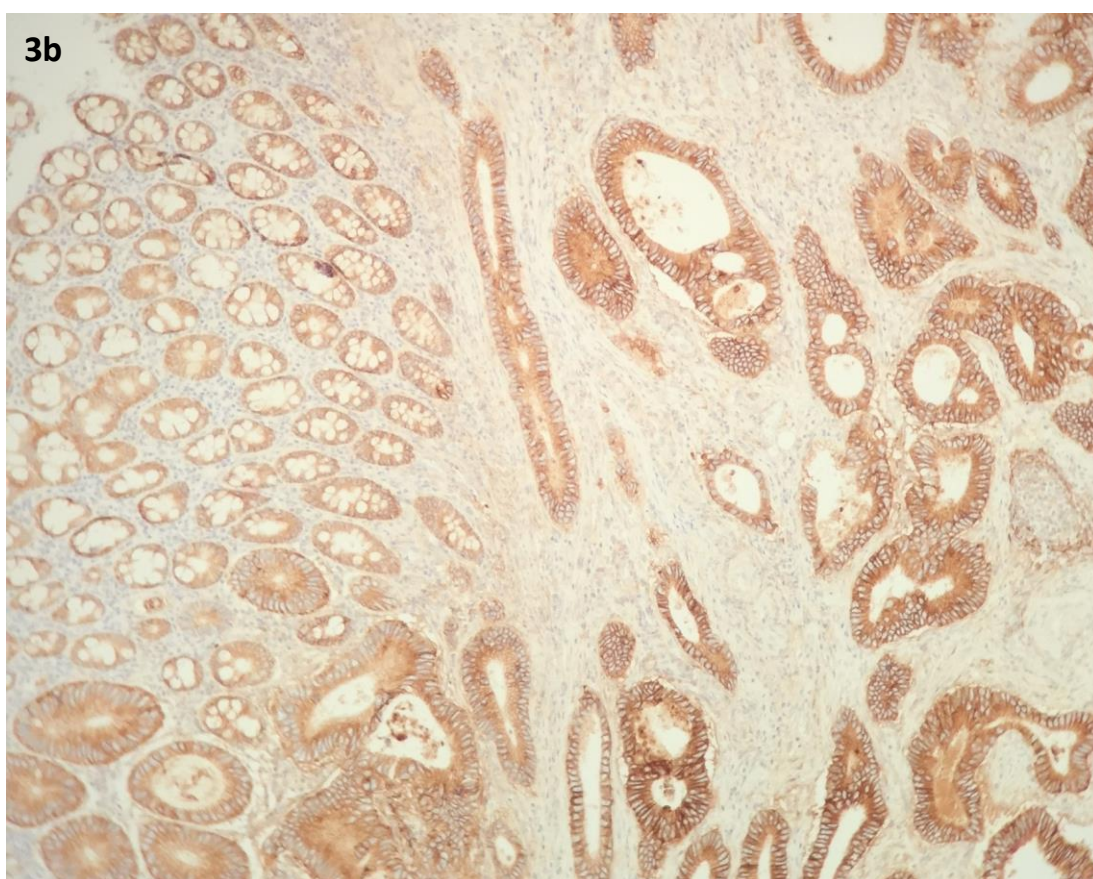
3). In the "Negative" group (negative scores) were allocated 49 cases (35.2%) and in the group "Uncertain" (scores 0 and 1) were allocated 67 cases (48.2%) (Figures 3 and 4).

Figure 3 - Fig. 3a. Grade II CCR with normal mucosa area on the upper left corner (H&E 40x) 3b. Immunohistochemistry for EGFR showing strong marking of the membrane and weak of the cytoplasm (M3C1) Score 2 (Positive) Wild-type RAS. 3c and 3d. Details in other areas of the same case showing homogeneous pattern of the M3C1 marking, considering the free edge of the cytoplasm to grade de cytoplasmic score.

Figure 4 - Fig. 4a. Immunohistochemistry for EGFR showing weak marking of membrane and cytoplasm (M1C1) Score 0 (Uncertain) Wild-type RAS. 4b. Negative membrane and cytoplasm 2+ (M0C2) Score -2 (Negative) mutated RAS KG12A. 4c. Membrane +1 and cytoplasm +3 (M1C3) Score -2 (Negative) mutated RAS KG12V. 4d. Membrane +3 and cytoplasm +1 (M3C1) Score 2 (Positive) wild-type RAS. On the upper left corner normal mucosa with tenuous cytoplasmic-membrane marking.

Figure 3





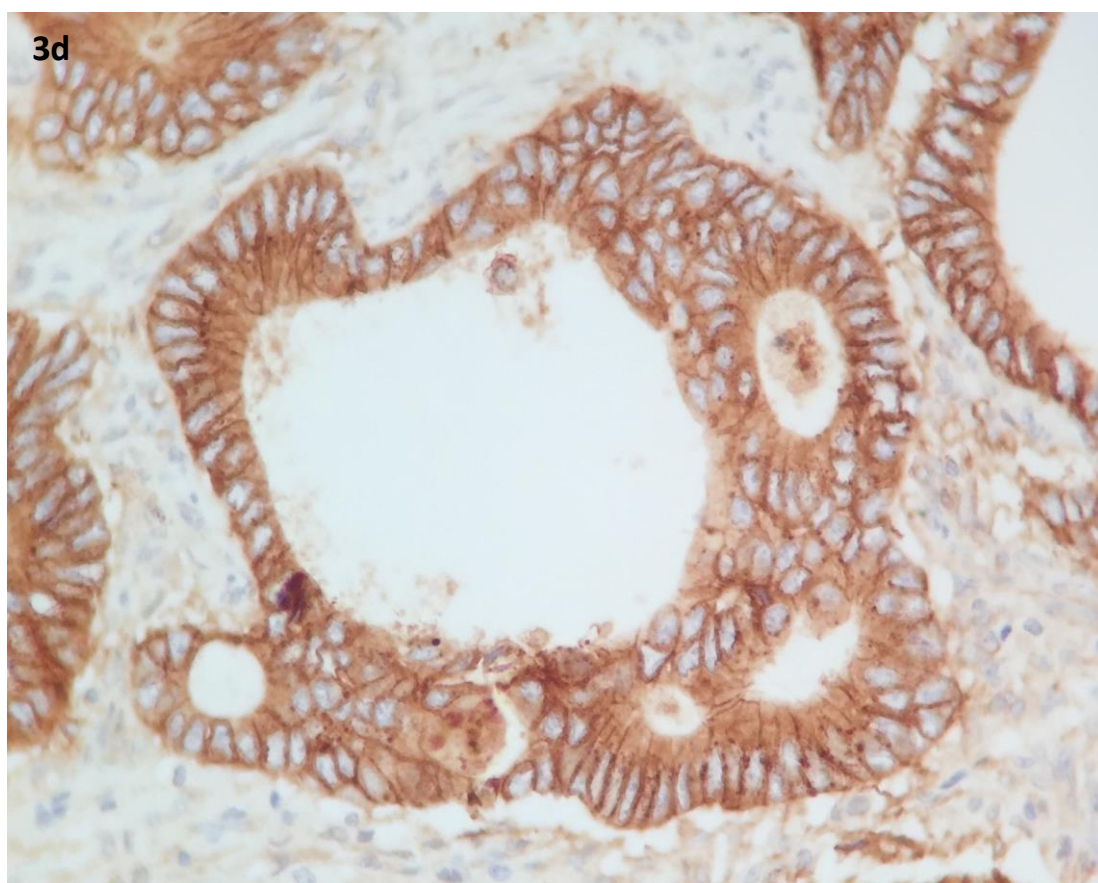
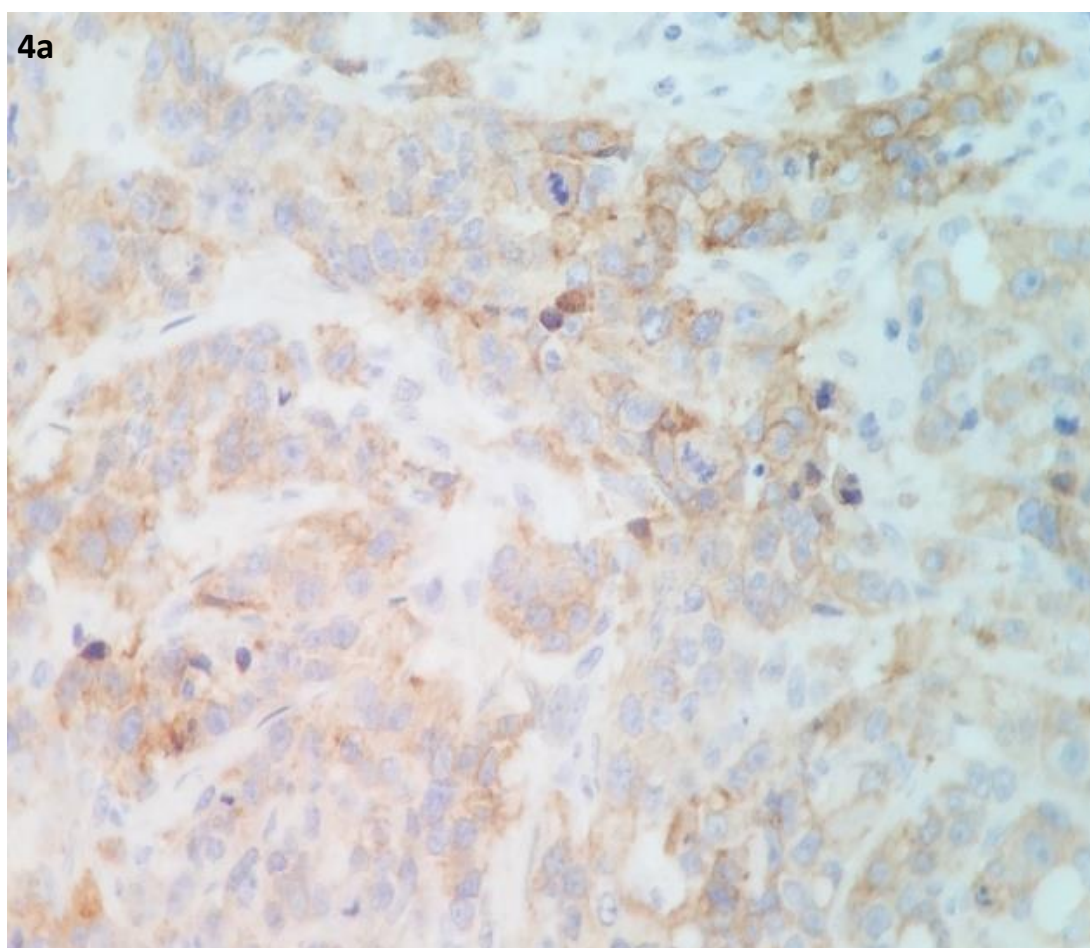
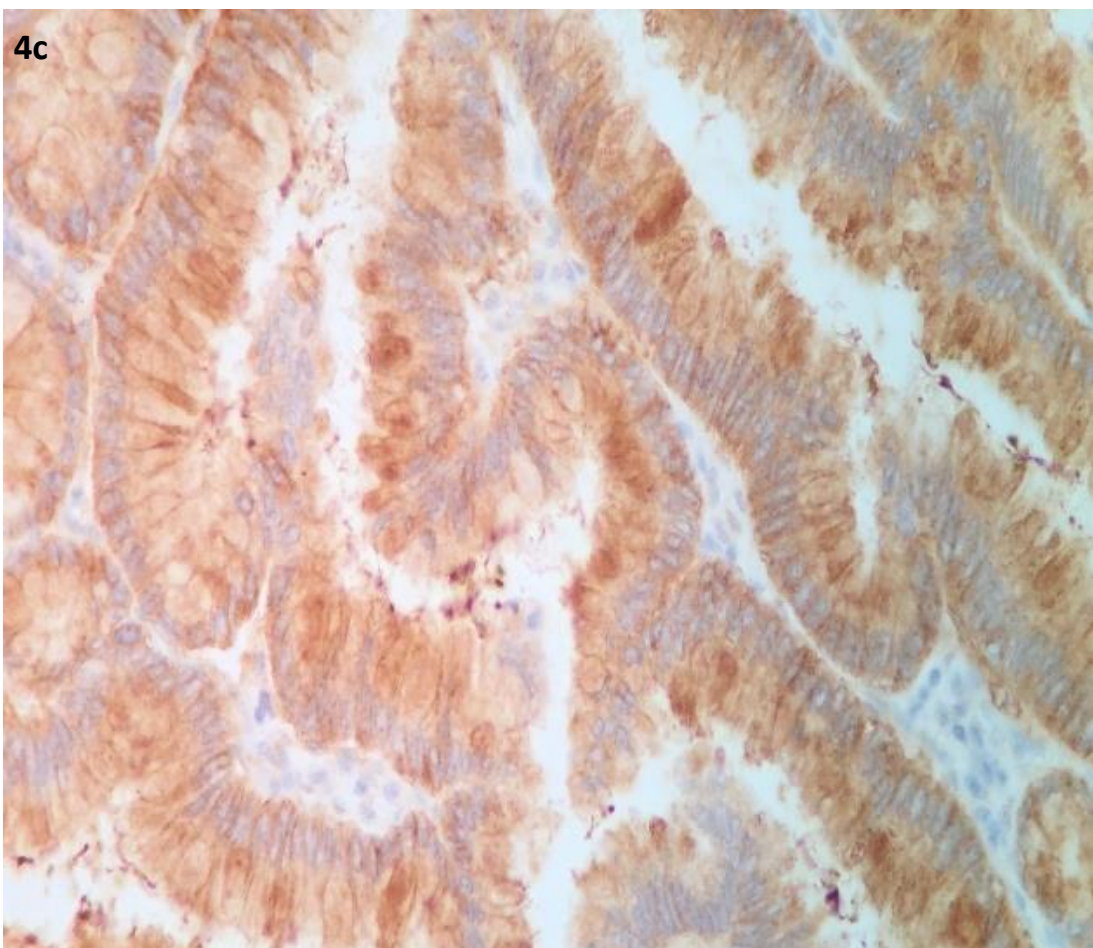
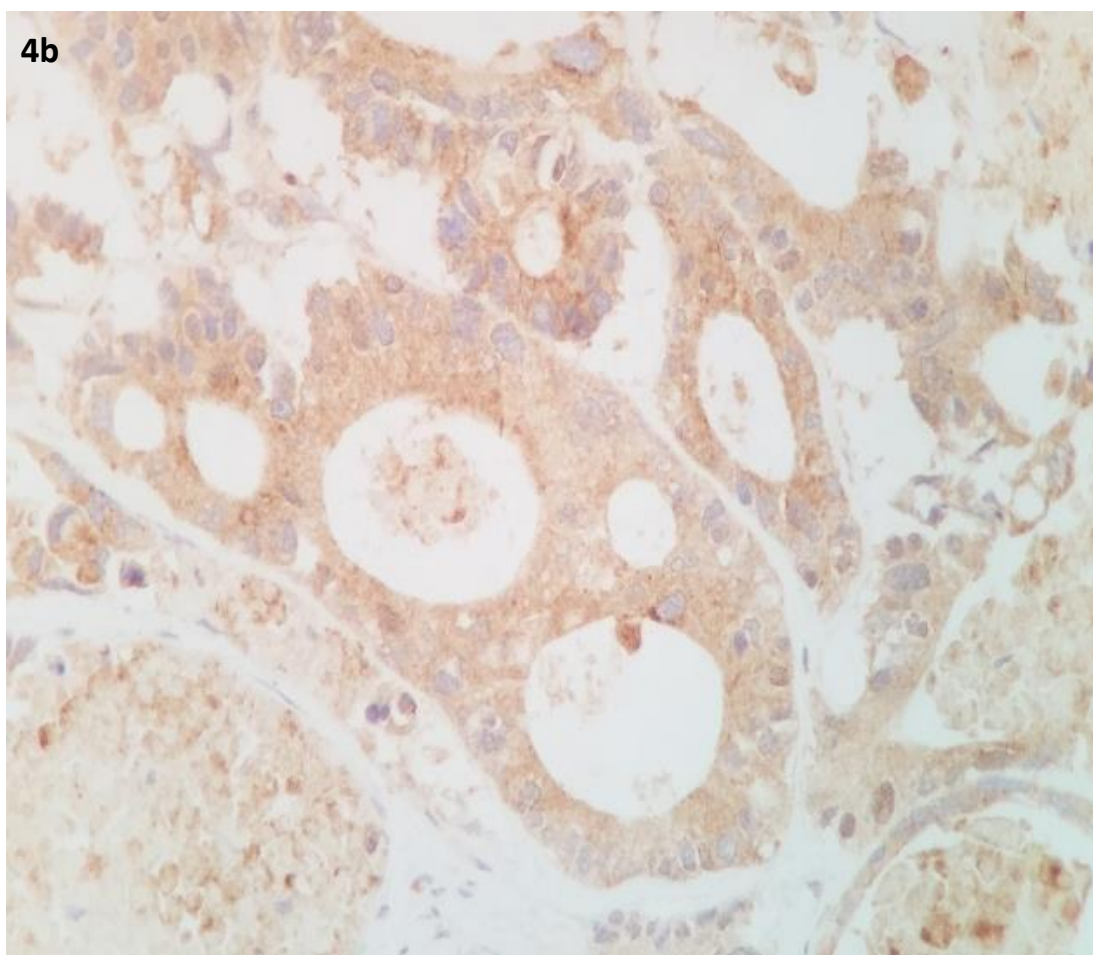
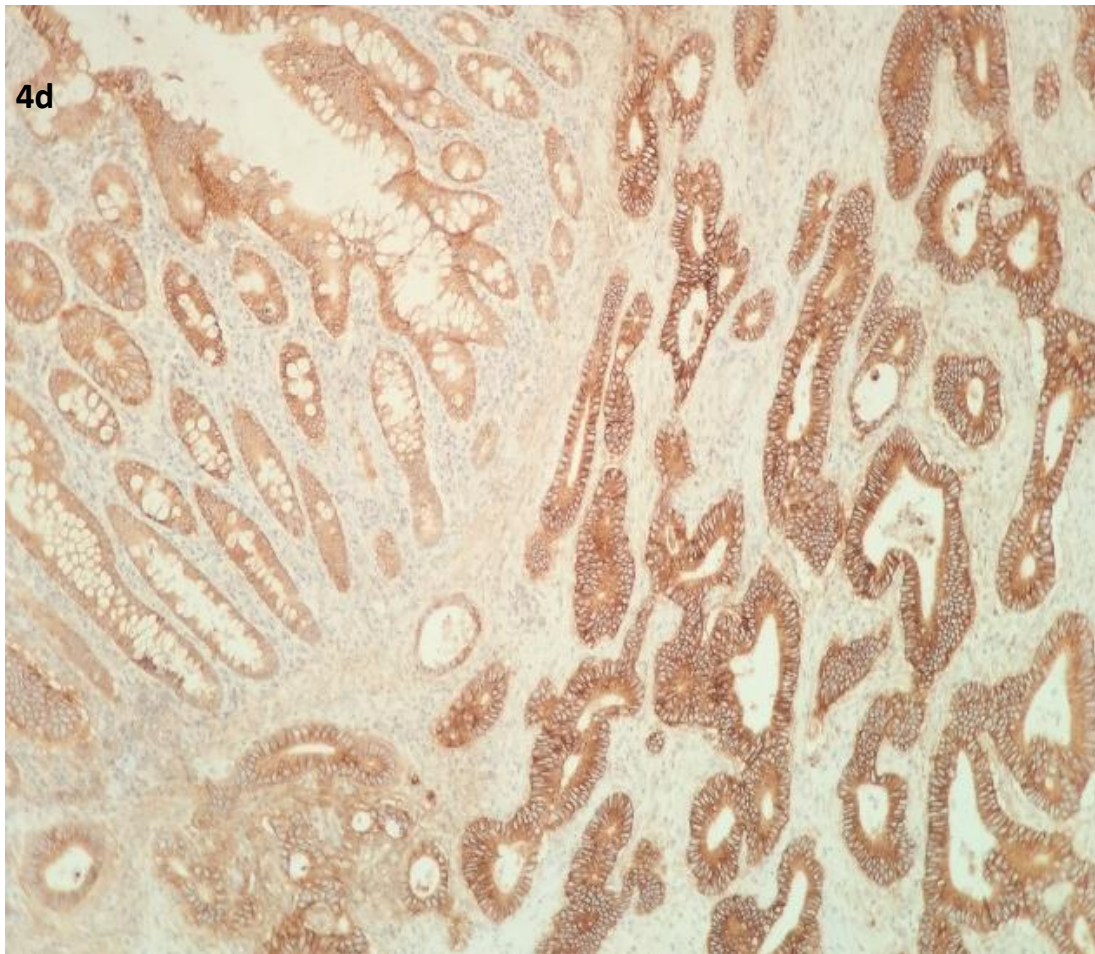


Figure 4







No significant correlation was found between the mutational status of the expanded RAS and the EGFR expression in comparison to age ($P = 0.541$ and 0.652 respectively), gender ($P = 0.348$ and 0.540), location ($P = 0.393$ and 0.098), histological type ($P = 0.199$ and 0.697), histological grade ($P = 0.900$ and 0.182) and stage ($P = 0.533$ and 0.053) (Table 2).

The direct correlation of the EGFR expression stratified into classes "Positive", "Negative" and "Uncertain" in comparison to the mutational status of the expanded RAS showed a strong association between groups ($p < 0.001$) (Table 3). Of the 23 cases of the "Positive" class, 21 (91.3%) showed the wild RAS gene for the researched mutations. Of the 49 cases of "Negative" class, 41 (83.7%) presented mutation in the expanded RAS panel. The 67 cases

allocated as "Uncertain" presented parity in the findings with 32 cases of (47.8%) RAS wild and 35 mutated cases (52.2%).

Table 2 - Clinical-pathological correlation between EGFR and RAS

	EGFR (n%)			P	RAS (n%)		P
	Positive	Negative	Uncertain		Wild	Mutated	
Age							
< 40 years	1/10.0	2/20.0	7/70.0	0.65	5/50.0	5/50.0	0.54
40 to 50 years	1/6.3	6/37.6	9/56.3		5/31.36	11/68.8	
>= 50 years	20/18.7	38/35.5	49/45.8		48/49.9	59/55.1	
Sex							
Male	15/20.5	23/31.5	35/47.9	0.54	35/47.9	38/52.1	0.34
Female	8/12.3	26/40.0	31/47.7		26/40.0	39/60.0	
Location							
Right Colon	7/14.6	15/31.3	26/54.2	0.09	18/37.5	62.5//30	0.39
Left Colon	5/17.9	9/32.2	14/50.0		15/53.6	13/46.4	
Recto-sigmoid	11/17.5	25/39.7	27/42.9		28/44.4	35/55.6	
Histological Type							
Tubular	20/17.1	43/36.7	54/46.2	0.69	54/46.2	63/53.8	0.19
Mucinous	2/25.0	1/12.5	5/62.5		4/50.0	4/50.0	
Tubular-mucinous	1/7.1	5/35.7	8/57.1		3/21.4	11/78.6	
Histological Grade							
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	
Stage							
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	

Table 3 - Correlation between the EGFR groups and the mutational condition of the RAS. * Chi-Squared Test.

RAS	EGFR						P*
	Positives		Negatives		Uncertain		
	n	%	n	%	N	%	
Wild	21	91.3	8	16.3	32	47.8	<0.001
Mutated	2	8.7	41	83.7	35	52.2	
Total	23	100.0	49	100.0	67	100.0	

4.7. Discussion:

Relation between EGRF and RAS:

Our study shows that the cytoplasmic-membrane analysis of the EGFR stratified into the classes "Positive", "Negative" and "Uncertain" based on the regulation of the receptor is able to predict the mutational status of the RAS in 51.7% of the analyzed cases, with 86.1% of accuracy ($p < 0.001$) (Table 4).

The EGFR activates the MAPK pathway through the RAS. The same will result in the transcription of various growth factors, however there is also the production of MIG-6 which acts by activating the internalization and degradation of the receptor (7-10). Studies investigating the direct relationship between EGFR amplification and expression and the mutation status of the KRAS, showed no relationship between these two components (15.16). However they were performed in small series, some analyzed only the amplification (15) and the others studied the expression by analysis of high and low affinity for binding to the receptor by the Scatchard method (16.17), and that there have been no studies, like ours, comparing the EGFR cytoplasmic-membrane

immunohistochemistry expression using the antibody clone (DAK-H1-WT) and the mutational status of the expanded RAS.

Table 4 - Test validation EGFR cytoplasmic-membrane expression by IHC considering only the positives and negatives.

EGFR	RAS		
	Wild	Mutated	Total
Positives	21 (a)	2 (b)	23 (a+b)
Negatives	8 (c)	41 (d)	49 (c+d)
Total	29 (a+c)	43 (b+d)	72 (a+b+c+d)
CALCULATIONS			
Sensibility	=	$a / a+c$	= 72,4%
Specificity	=	$d / b+d$	= 95,3%
Predictive value (+)	=	$a / a+b$	= 91,3%
Predictive value (-)	=	$d / c+d$	= 83,6%
Accuracy	=	$a+d / a+b+c+d$	= 86,1%

Gene and EGFR receptor:

EGFR is a transmembrane receptor, part of the Erb's family. Has an extracellular domain that can be selectively activated by epidermal growth factor (EGF) and alpha growth transforming factor (TGF- α), leading to dimerization and activation of the receptor. Once activated the receptor suffers auto

phosphorylation of its tyrosine-kinase intra-cytoplasmic domain there in cascade activate the RAS/RAF/MEK/MAPK and therefore the nuclear transcription factors by activation and regulation of genes responsible for cellular replication, angiogenesis, differentiation and etc. Expressed in lung, colon, breast, head and neck, ovarian cancer, pancreas, bladder and kidney tumors (18.19).

The expression and activation of the receptor have early and late regulatory loops, acting on signal attenuation across the cascade and/or in the internalization of the receptor. As a result there is desphosphorization or degradation of the EGFR (7-10), allowing its detection in both membrane and cytoplasm, justifying the cytoplasmic-membrane joint analysis in the IHC for determination of the marking score.

The mutations of the EGFR gene are uncommon in colorectal carcinomas (20; 21), enabling the use of the wild-type clone DAK-H1-WT for the research of the receptor. There are studies by IHC showing EGFR expression in 60 to 80% of the colorectal carcinomas (CCR) (22), however only 24% of these tumors presented amplification of the EGFR gene (23). Clinical studies showed a discrepancy between the EGFR expression and the therapeutic response to the receptor inhibitors (24.25), and that up to 25% of the tumors with negative expression for EGFR are responsive to Cetuximab (iEGFR) (26). But the vast majority of these studies used the kit PharmDx™ with the antibody EGFR2.5 in the IHC reactions for detection of EGFR, contrasting with the significant increase of sensitivity in these receptor using the clone of antibody DAK-H1-WT that detects only wild-type receptors (11). Our study showed 97.2% of EGFR membrane expression, confirming the great gain in sensitivity with this clone.

While some studies showed a relationship between the expression and the degree of the tumor or the survival of the patients (27,28), others have not had similar results (22), as well as in our analysis in which no significant correlation was found between the EGFR expression in comparison to age, gender, location, histological type, histological grade and stage.

A study with 47 patients showed no significant of amplification of the gene in the therapeutic response (29). Another showed that the 17% of the patients with wild KRAS and amplification of the EGFR gene treated with Cetuximab had therapeutic response (30). Similar percentage to the “Positive” cytoplasmic-membrane score of our study, in which 16.5% of the cases showed a strong correlation with the wild expanded RAS, suggesting that there may be a correlation between this study group and the amplification of the gene. Unlike the “Uncertain” group where the cases can be amplified but not hyperexpressed due to inhibition by the regulatory loops of the mutated RAS, constitutively activated, or cases in which there is no amplification and therefore doubtful expression of the receptor. Further analysis correlating the cytoplasmic-membrane to the amplification of the EGFR gene and the mutational status of the RAS are needed to clarify these issues.

Genes and KRAS and NRAS Proteins:

KRAS and NRAS are members of the family of RAS oncogenes. They are binder proteins, initiator of the MAPK pathway after activation by the EGFR and codified by specific RAS proto-oncogenes. The HRAS, third member of the RAS family, is rarely mutated in CCR (31). Somatic mutations of these genes are early event in carcinogenesis, present in 40% to 45% of CCR, usually being mutually exclusive (32, 33). This percentage is lower than one found

in our analysis (56.1%) that considered all the exons already recommended in current guidelines (4). Our study also showed a mutation of the NRAS in 4.3% of the cases, value also higher than the 2% found in a previous study (3).

Once mutated, these proteins stimulate the EGFR/MAPK pathway constitutively, therefore leading to resistance to treatment with inhibitors of this receptor (Cetuximab and Panitumumab) (34-37). Cases with wild KRAS presented a clinical benefit with the use of inhibitors of EGFR alone and in combination with chemotherapy (21, 36, 38). However only 13-17% of the tumors with wild KRAS responded (34, 35). Phase 3 randomized clinical studies showed the lack of response in patients with mutations in the KRAS or NRAS (37). BRAF mutations (p.V600E), molecule also associated with the signaling of RAS-EGFR has been implicated in a proportion of non-responsive patients (21, 33, 38, 39). These mutations could justify cases of the “Negative” group of our study in which the RAS mutation was not detected, since these genes are also linked to the receptor regulatory loops, which may decrease its expression.

There is also a parallel pathway of the PTEN/PIK3CA/AKT - EGFR that inhibits the apoptosis of neoplastic cells, being that the PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue Gene) inhibits this pathway when using the PIK3CA as substrate. Mutations in the pathway lead to hyper-phosphorylation of the AKT, constitutive inhibition of apoptosis and consequent failure in the response of the EGFR inhibitors. (21, 40).

The limitations of this study are: have a small sample; the analysis of the EGFR expression was performed by only two pathologists; the mutational

status of the RAS was available during the expression analysis; the mutational status of the BRAF and PIK3CA genes were not contemplated in the study.

4.8 Conclusions:

Our study is pioneer in reveal that the analysis of the EGFR expression by IHC, using a cytoplasmic-membrane marking score stratified into the classes "Positive", "Negative" and "Uncertain", based on the recycling of this receptor triggered by regulation loops, it is able to predict the mutational status of the RAS in 51.7% of the analyzed cases ($p < 0.001$), with 86.1% of accuracy. However, further studies are needed to determine the reason why almost half of the cases are still uncertain. Analyzes contemplating the EGFR amplification and mutations in other genes of the EGFR/MAPK cascade as BRAF and PIK3CA, may allow a better stratification of this population.

4.9 REFERENCES:

1. Sorich, M. J., Wiese, M. D., Rowland, A., Kichenadasse, G., McKinnon, R. A., & Karapetis, C. S.. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology/ESMO*, 2015;26:1-13.

2. Douillard, J. Y., Oliner, K. S., Siena, S. et al. Panitumumab–FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 2013;369(11): 1023-1034.

3. Irahara, N., Baba, Y., Noshio, K. et al. NRAS mutations are rare in colorectal cancer. *Diagnostic Molecular Pathology*, 2010;19(3), 157-163.

4. Allegra, C. J., Rumble, R. B., Hamilton, S. R. et al. Extended RAS gene mutation testing in metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy: American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion update 2015. *Journal of Clinical Oncology*, JCO, Epub October 5, 2015.

5. Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S. et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *New England journal of medicine*, 2004;351(4), 337-345.

6. Saltz, L. B., Meropol, N. J., Loehrer, P. J., Needle, M. N., Kopit, J., & Mayer, R. J.. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *Journal of Clinical Oncology*, 2004;22(7), 1201-1208.

7. Yu-Wen Zhang and George F. Vande Woude. MIG-6 and SPRY2 in the Regulation of Receptor Tyrosine Kinase Signaling: Balancing Act via Negative Feedback Loops. In: Dr. Yue Cheng ed., *Future Aspects of Tumor Suppressor Gene* (Ed.), ISBN: 978-953-51-1063-7, InTech, 2013;DOI: 10.5772/54393.

8. Frosi, Y., Anastasi, S., Ballarò, C. et al. A two-tiered mechanism of EGFR inhibition by RALT/MIG6 via kinase suppression and receptor degradation. *The Journal of cell biology*, 2010;189(3), 557-571.

9. Avraham, R., & Yarden, Y.. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2011;12(2), 104-117.

10. Madshus, I. H., & Stang, E.. Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. *Journal of cell science*, 2009;122(19), 3433-3439.

11. Shiogama, K., Wongsiri, T., Mizutani, Y., Inada, K. I., & 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.

12. Hamilton S.R., Tumors of the colon and rectum: Carcinoma. In: [The International Agency for Research on Cancer](#) (Autor), [F.T. Bosman](#), [F. Carneiro](#), [R.H. Hruban](#), [N.D. Theise](#) Eds. WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 4th Ed., Lyon, IARC WHO Classification of Tumours, 2010.

13. American Joint Committee on Cancer (AJCC), <http://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/documents/colonmedium.pdf> Colon and Rectum Cancer Staging Chicago, IL, 2009. Accessed October 11, 2015.

14. Miot, H. A.. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. *J Vasc Bras*, 2011;10(4), 275-8.

15. 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 treatment reviews*, 2009;35(3), 262-271.

16. Milano, G., Etienne-Grimaldi, M. C., Dahan, L. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status and K-Ras mutations in colorectal cancer. *Annals of oncology*, 2008;19(12), 2033-2038.

17. Francoual, M., Etienne-Grimaldi, M. C., Formento, J. L. et al. EGFR in colorectal cancer: more than a simple receptor. *Annals of oncology*, 2006;17(6), 962-967.

18. Sullivan, K. M., & Kozuch, P. S.. Impact of KRAS mutations on management of colorectal carcinoma. *Pathology research international*, 2011; Article ID 219309, 11 pages doi:10.4061/2011/219309.

19. Krasinskas, A. M.. EGFR signaling in colorectal carcinoma. *Pathology research international*, 2011; Article ID 932932, 6 pages doi:10.4061/2011/932932.

20. Lee, J. W., Soung, Y. H., Kim, S. Y. et al. Absence of EGFR mutation in the kinase domain in common human cancers besides non-small cell lung cancer. *International journal of cancer*, 2005;113(3), 510-511.

21. De Roock, W., Claes, B., Bernasconi, D. et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *The lancet oncology*, 2010;11(8), 753-762.

22. Spano, J. P., Fagard, R., Soria, J. C., Rixe, O., Khayat, D., & Milano, G.. Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. *Annals of Oncology*, 2005;16(2), 189-194.

23. Shia, J., Klimstra, D. S., Li, A. R. et al. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Modern Pathology*, 2005;18(10), 1350-1356.

24. Loupakis, F., Ruzzo, A., Cremolini, C. 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. *British journal of cancer*, 2009;101(4), 715-721.

25. Van Cutsem, E., Köhne, C. H., Hitre, E. et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 2009;360(14), 1408-1417.

26. Chung, K. Y., Shia, J., Kemeny, N. E. et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *Journal of Clinical Oncology*, 2005;23(9), 1803-1810.

27. Goldstein, N. S., & Armin, M.. Epidermal growth factor receptor immuno-histochemical reactivity in patients with American Joint Committee on cancer stage IV colon adenocarcinoma. *Cancer*, 2001;92(5), 1331-1346.

28. Resnick, M. B., Routhier, J., Konkin, T., Sabo, E., & Pricolo, V. E.. Epidermal Growth Factor Receptor, c-MET, β -Catenin, and p53 Expression as Prognostic Indicators in Stage II Colon Cancer A Tissue Microarray Study. *Clinical Cancer Research*, 2004;10(9), 3069-3075.

29. Italiano, A., Follana, P., Caroli, F. X. 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. *Annals of Surgical Oncology*, 2008;15(2), 649-654.

30. Laurent-Puig, P., Cayre, A., Manceau, G. et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2009;27(35), 5924-5930.

31. Fernández-Medarde, A., & Santos, E.. Ras in cancer and developmental diseases. 2011;*Genes & cancer*, 2(3), 344-358.

32. Leslie, A., Carey, F. A., Pratt, N. R., & Steele, R. J. C.. The colorectal adenoma–carcinoma sequence. *British Journal of Surgery*, 2002;89(7), 845-860.

33. Roth, A. D., Tejpar, S., Delorenzi, M. 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. *Journal of Clinical Oncology*, 2010;28(3), 466-474.

34. Amado, R. G., Wolf, M., Peeters, M. et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2008;26(10), 1626-1634.

35. Karapetis, C. S., Khambata-Ford, S., Jonker, D. J. et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 2008;359(17), 1757-1765.

36. Lièvre, A., Bachet, J. B., Boige, V. et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *Journal of Clinical Oncology*, 2008;26(3), 374-379.
37. Van Cutsem, E., Lenz, H. J., Köhne, C. H. et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2015;33(7), 692-700.
38. Van Cutsem, E., Köhne, C. H., Láng, I. 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. *Journal of Clinical Oncology*, 2011;29(15), 2011-2019.
39. Di Nicolantonio, F., Martini, M., Molinari, F. et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2008;26(35), 5705-5712.
40. Jhawer, M., Goel, S., Wilson, A. J. et al. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer research*, 2008;68(6), 1953-1961.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A expressão e ativação do EGFR possuem alças regulatórias precoces e tardias, permitindo sua detecção tanto em membrana quanto em citoplasma, justificando a análise conjunta membrano-citoplasmática na IHQ para determinação do escore de marcação.

Nosso estudo mostrou 97,2% de expressão de membrana do EGFR, confirmando o grande ganho em sensibilidade com o clone de anticorpo DAK-H1-WT.

Em nossa análise não foi identificada associação significativa entre a expressão do EGFR em comparação a idade ($p = 0,652$), sexo ($p = 0,540$), localização ($p = 0,098$), tipo histológico ($p = 0,697$), grau histológico ($p = 0,182$) e estadio ($p = 0,053$).

No escore membrano-citoplasmático “Positivo” de nosso estudo, os 16,5% dos casos mostraram forte correlação com o RAS expandido selvagem, podendo 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.

Nossa análise encontrou mutação RAS em 56,1% dos casos, considerando todos os éxons já recomendados em diretrizes atualizadas, valor maior que os 45% já evidenciados. Nosso estudo também mostrou mutação do NRAS em 4,3% dos casos, valor também maior que os 2% encontrados em estudo prévio (IRAHARA et al, 2010).

As mutações em BRAF poderiam justificar casos do grupo “Negativo” de nosso estudo em que a mutação RAS não foi detectada, uma vez que estes genes também estão ligados às alças de regulação negativa do receptor.

Não há estudos comparando a expressão membrano-citoplasmática por Imuno-histoquímica do EGFR utilizando o clone do anticorpo (DAK-H1-WT) e o estado mutacional do RAS expandido.

Portanto, nosso estudo é pioneiro em revelar que a análise da expressão do EGFR por IHQ, utilizando escore de marcação membrano-citoplasmático estratificado nas classes “Positivo”, “Negativo” e “Duvidoso”, baseado na endocitose desse receptor desencadeada por alças de regulação, é capaz de prever o estado mutacional do RAS em 51,7% dos casos analisados ($p < 0,001$), com 86,1% de acurácia. Entretanto, novos estudos são necessários para determinar a razão de quase metade dos casos serem ainda duvidosos. Análises mais completas, contemplando a amplificação do EGFR e mutações em outros genes da cascata EGFR/MAPK como BRAF e PIK3CA, podem possibilitar uma melhor estratificação desta população.

REFERÊNCIAS

1. SIEGEL R, et al. Cancer statistics, 2014. **CA Cancer Journal Clinical** v. 64, p. 9-29, jan. 2014.
2. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA) **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva** – Rio de Janeiro: INCA, 2015.
3. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo02/consultar.xhtml#panelResultado>. **Atlas on line de mortalidade** – Rio de Janeiro: INCA, 2014.
4. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. <http://www.cdc.gov/cancer/dcpc/data/women.htm> and <http://www.cdc.gov/cancer/dcpc/data/men.htm2014>. **Cancer statistics: Women and men**. Accessed November 06, 2016.
5. ABDALLA, Eddie K. et al. Improving resectability of hepatic colorectal metastases: expert consensus statement. **Annals of Surgical Oncology**, v. 13, n. 10, p. 1271-1280, 2006.
6. VAUTHEY, Jean-Nicolas; KOPETZ, Scott E. From multidisciplinary to personalized treatment of colorectal liver metastases: 4 reasons to consider RAS. **Cancer**, v. 119, n. 23, p. 4083-4085, 2013.
7. VAUTHEY, Jean-Nicolas et al. RAS mutation status predicts survival and patterns of recurrence in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastases. **Annals of Surgery**, v. 258, n. 4, 2013.
8. KOPETZ, Scott et al. Improved survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 22, p. 3677-3683, 2009.

9. KARAGKOUNIS, Georgios et al. Incidence and prognostic impact of KRAS and BRAF mutation in patients undergoing liver surgery for colorectal metastases. **Cancer**, v. 119, n. 23, p. 4137-4144, 2013.

10. CUNNINGHAM, David; GLIMELIUS, Bengt. A phase III study of irinotecan (CPT-11) versus best supportive care in patients with metastatic colorectal cancer who have failed 5-fluorouracil therapy. V301 Study Group. In: **Seminars in Oncology**. 1999. p. 6-12.

11. DOUILLARD, JYmf et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. **The Lancet**, v. 355, n. 9209, p. 1041-1047, 2000.

12. ANDRÉ, Thierry et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 23, p. 2343-2351, 2004.

13. SEMRAD, Thomas J.; KIM, Edward J. Molecular testing to optimize therapeutic decision making in advanced colorectal cancer. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 7, n. Suppl 1, p. S11, 2016.

14. HEINEMANN, Volker et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 10, p. 1065-1075, 2014.

15. VENOOK AP. et al., CALGB/SWOG 80405: Phase III trial of irinotecan/5-FU/ leucovorin (FOLFIRI) or oxaliplatin/5-FU/leucovorin (mFOLFOX6) with bevacizumab (BV) or cetuximab (CET) for patients (pts) with KRAS wild-type (wt) untreated metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum (MCRC). **Journal of Clinical Oncology**, v. 32:5s, abstr LBA3, 2014.

16. ALLEGRA, Carmen J. et al. Extended RAS Gene Mutation Testing in Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti–Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion Update 2015. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 2, p. 179-185, jan. 2016.

17. DOUILLARD, Jean-Yves et al. Panitumumab–FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 11, p. 1023-1034, set. 2013.

18. SORICH, M. J. et al. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. **Annals of Oncology**.v.26, n.1, p.1-13, jan. 2015.

19. IRAHARA, Natsumi et al. NRAS mutations are rare in colorectal cancer. **Diagnostic molecular pathology: the American journal of surgical pathology, part B**, v. 19, n. 3, p. 157, set. 2010.

20. CUNNINGHAM, David et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 4, p. 337-345, jul. 2004..

21. SALTZ, Leonard B. et al. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 7, p. 1201-1208, 2004.

22. MADSHUS, Inger Helene; STANG, Espen. Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 19, p. 3433-3439, 2009.

23. FROSI, Yuri et al. A two-tiered mechanism of EGFR inhibition by RALT/MIG6 via kinase suppression and receptor degradation. **The Journal of Cell Biology**, v. 189, n. 3, p. 557-571, 2010.

24. AVRAHAM, Roi; YARDEN, Yosef. Feedback regulation of EGFR signaling: decision making by early and delayed loops. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 2, p. 104-117, 2011.

25. ZHANG, Yu-Wen; VANDE WOUDE, George F. MIG-6 and SPRY2 in the Regulation of Receptor Tyrosine Kinase Signaling: Balancing Act via Negative Feedback Loops. In: CHENG, Yue (Ed.). **Future Aspects of Tumor Suppressor Gene**. InTech, 2013.

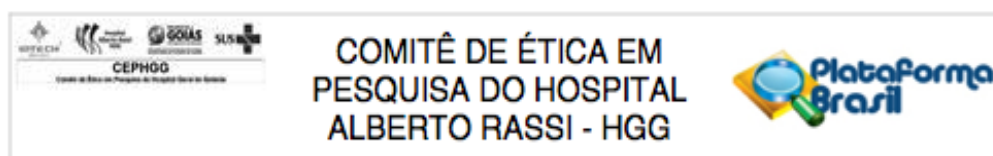
26. SHIOGAMA, Kazuya et al. High-sensitivity epidermal growth factor receptor immunostaining for colorectal carcinomas, compared with EGFR PharmDx™: a study of diagnostic accuracy. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 6, n. 1, p. 24-30, 2012.
27. SULLIVAN, Kevin M.; KOZUCH, Peter S. Impact of KRAS mutations on management of colorectal carcinoma. **Pathology Research International**, v. 2011, Article ID 219309, 11 páginas, mar. 2011.
28. KRASINSKAS, A. M. EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma. **Pathology Research International**, v. 2011, Article ID 932932, 6 páginas, fev. 2011.
29. LEE, Jong Woo et al. Absence of EGFR mutation in the kinase domain in common human cancers besides non-small cell lung cancer. **International Journal of Cancer**, v. 113, n. 3, p. 510-511, 2005.
30. DE ROOCK, Wendy et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 8, p. 753-762, 2010.
31. SPANO, J. P. et al. Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. **Annals of Oncology**, v. 16, n. 2, p. 189-194, 2005.
32. SHIA, Jinru et al. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. **Modern Pathology**, v. 18, n. 10, p. 1350-1356, 2005.
33. LOUPAKIS, F. 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. **British Journal of cancer**, v. 101, n. 4, p. 715-721, 2009.

34. VAN CUTSEM, Eric et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 14, p. 1408-1417, 2009.
35. CHUNG, Ki Young et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 9, p. 1803-1810, 2005.
36. GOLDSTEIN, Neal S.; ARMIN, Maryiam. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on cancer stage IV colon adenocarcinoma. **Cancer**, v. 92, n. 5, p. 1331-1346, 2001.
37. RESNICK, Murray B. et al. Epidermal Growth Factor Receptor, c-MET, β -Catenin, and p53 Expression as Prognostic Indicators in Stage II Colon Cancer A Tissue Microarray Study. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 9, p. 3069-3075, 2004.
38. ITALIANO, Antoine 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. **Annals of Surgical Oncology**, v. 15, n. 2, p. 649-654, 2008.
39. LAURENT-PUIG, Pierre et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 35, p. 5924-5930, 2009.
40. FERNÁNDEZ-MEDARDE, Alberto; SANTOS, Eugenio. Ras in cancer and developmental diseases. **Genes & cancer**, v. 2, n. 3, p. 344-358, 2011.
41. LESLIE, A. et al. The colorectal adenoma–carcinoma sequence. **British Journal of Surgery**, v. 89, n. 7, p. 845-860, 2002.
42. ROTH, Arnaud 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. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 3, p. 466-474, 2010.

43. AMADO, Rafael G. et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 10, p. 1626-1634, 2008.
44. KARAPETIS, Christos S. et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 17, p. 1757-1765, 2008.
45. LIÈVRE, Astrid et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 3, p. 374-379, 2008.
46. VAN CUTSEM, Eric et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 7, p. 692-700, 2015.
47. VAN CUTSEM, Eric 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. **Journal of Clinical Oncology** v. 29, n. 15, p. 2011-2019, mai. 2011.
48. DI NICOLANTONIO, Federica et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 35, p. 5705-5712, dez. 2008.
49. JHAWER, Minaxi et al. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. **Cancer Research**, v. 68, n. 6, p. 1953-1961, mar. 2008.
50. HEINEMANN, Volker et al. Clinical relevance of EGFR-and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. **Cancer Treatment Reviews**, v. 35, n. 3, p. 262-271, mai. 2009.
51. MILANO, G. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status and K-Ras mutations in colorectal cancer. **Annals of oncology**, v. 19, n. 12, p. 2033-2038, dez. 2008.

52. FRANCOUAL, M. et al. EGFR in colorectal cancer: more than a simple receptor. **Annals of oncology**, v. 17, n. 6, p. 962-967, jun. 2006.
53. HAMILTON Stanley R., Tumors of the colon and rectum: Carcinoma. In: [The International Agency for Research on Cancer](#) (Autor), Bosman, Fred T. et al Eds. **WHO Classification of Tumours of the Digestive System**, 4th Ed., Lyon, IARC WHO Classification of Tumours, 2010, cap 8.
54. AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER (AJCC), <http://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/documents/colonmedium.pdf> **Colon and Rectum Cancer Staging** Chicago, IL, 2009. Accessed October 11, 2015.
55. MIOT, Hélio Amante. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 10, n. 4, p. 275-8, 2011.

ANEXO A



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DO EGFR E ESTADO MUTACIONAL DO KRAS

Pesquisador: Thiago David Alves Pinto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 41087714.9.0000.0035

Instituição Proponente: INGOH - INSTITUTO GOIANO DE ONCOLOGIA E HEMATOLOGIA S/S LTDA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
INGOH - INSTITUTO GOIANO DE ONCOLOGIA E HEMATOLOGIA S/S LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 961.174

Data da Relatoria: 11/02/2015

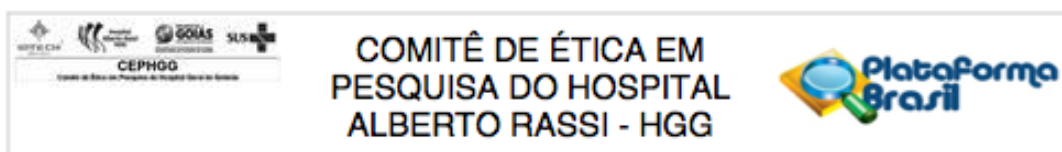
Apresentação do Projeto:

Nº DO PROTOCOLO NO CEPHGG: 775/15

Apresentação do projeto conforme informações do Pesquisador Responsável:

RESUMO: O avanço da medicina molecular tem tornado o manejo dos pacientes oncológicos muito mais individual, principalmente com o surgimento de moléculas alvo, como os inibidores do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) que representam uma opção terapêutica com eficácia comprovada para pacientes com Adenocarcinoma colônico metastático. Porém pacientes com mutações ativadoras do gene que codifica a proteína KRAS são insensíveis aos inibidores de EGFR. Atualmente o teste por PCR, para detectar mutações ativadoras do gene KRAS, é pré-requisito para início da terapêutica. Entretanto este é de alto custo e pouco acessível. A validação da expressão do EGFR por imunohistoquímica (IHQ) relacionada a mutação do KRAS, pode permitir que o tratamento seja instituído através de um método diagnóstico menos oneroso e mais acessível. Este é um estudo retrospectivo de acurácia que tem como objetivo correlacionar a expressão do EGFR por IHQ com o estado mutacional do KRAS por PCR em casos de Carcinoma Colorretal.

Endereço: Avenida Anhangüera nº 6.479 - 5º Andar
Bairro: Setor Oeste **CEP:** 74.110-010
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3209-9917 **Fax:** (62)3201-8281 **E-mail:** hgg.cep@idtech.org.br



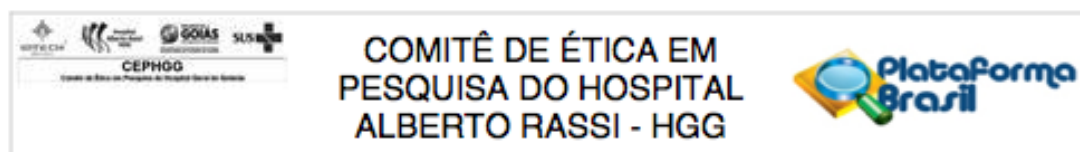
Continuação do Parecer: 961.174

DESENHO DO ESTUDO: Estudo retrospectivo de acurácia.

HIPÓTESE: A expressão do EGFR em casos de carcinomas colorretais possui relação direta com o padrão mutacional do KRAS.

METODOLOGIA PROPOSTA: Desenho do estudo: O trabalho será um estudo retrospectivo de acurácia, no qual o padrão ouro será o teste do gene KRAS por PCR e o teste a ser validado será a expressão do EGFR por IHQ. Os dados de IHQ e PCR serão extraídos de blocos de parafina provenientes de casos de CCR, do arquivo do Laboratório INGOH entre os anos de 2011 e 2013. O intuito dos testes é a elegibilidade quanto ao tratamento por inibidores do EGFR. Testes de IHQ: Serão realizadas reações de imunohistoquímica para detecção da expressão do EGFR pelo método automatizado (DAKO Autostainer Link48), utilizando DAKO Flex Kit, recuperação antigênica através de exposição a calor controlado em solução de PH alto, utilizando PTLINK DAKO, bloqueio endógeno com peroxidase (150 microlitros - 5 minutos), incubação com anticorpo primário (Epidermal Growth Factor Receptor - Clone DAK-H1-WT - Anti-Human - Monoclonal Mouse - DAKO)(diluição 1:100) (150 microlitros - 15 minutos), amplificação com LINKER (EnVision FLEX - DAKO)(150 microlitros - 15 minutos), reação com polímero (EnVision Flex/HRP) (150 microlitros - 20 minutos), revelação com cromógeno (300 microlitros - 5 minutos) e contracoloração com Hematoxilina (EnVision FLEX - 300 microlitros - 5 minutos). Testes de PCR: No mesmo material será realizada a pesquisa de mutação dos códons 12, 13 e 61 do gene KRAS, pela técnica de Sequenciamento Direto por PCR. Cortes de tecido de 5 micra serão feitos nos 150 blocos de parafina do estudo e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) para exame histopatológico. Para extração do DNA cinco cortes de 10 micra de cada bloco serão usados. O material será desparafinado, e guiado pela análise dos cortes em H&E, o tecido tumoral será separado de tecido colônico normal, por macrodissecção. DNA Genômico será extraído usando QIAamp DNA mini (Qiagen, Milan, Italy). Em seguida, cada exemplar será incubado em 180 L de ATL buffer (Incluído no kit) e 20L de proteinase K a 56 com homogeneização, durante toda noite (overnight) para garantir a lise completa. O fragmento a ser sequenciado será gerado através de "primers" específicos para o gene KRAS, em termociclador por 35 ciclos, e então purificado. Os fragmentos de PCR serão analisados por sequenciamento cíclico com o sistema BigDye Terminator (Applied Biosystems) usando primer de amplificação reversa. Os produtos da reação serão analisados com ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Casos da casuística do laboratório INGOH,

Endereço: Avenida Anhangüera nº 6.479 - 5º Andar
Bairro: Setor Oeste **CEP:** 74.110-010
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3209-8917 **Fax:** (62)3201-8281 **E-mail:** hgg.cep@idtech.org.br



Continuação do Parecer: 951.174

que por fins clínicos, já tenham sido testados para mutação do gene KRAS em laboratórios certificados e tenham seus laudos arquivados na instituição, serão poupados de novas análises e operações. Análise das lâminas de IHQ: As lâminas de IHQ serão analisadas pelo mestrando, médico Patologista, e por Patologista experiente da equipe do laboratório INGOH (Sebastião Alves Pinto). Ambos participam e possuem certificação de instituições de controle de qualidade nacionais e internacionais (CAP, UKNEQAS e PICQ) no âmbito de patologia. Os casos serão analisados quanto ao padrão de expressão do receptor: membrana, citoplasma ou ambos; além da intensidade da expressão (fraca, moderada ou forte), no intuito de estabelecer escore de classificação.

CRITÉRIO DE INCLUSÃO: Serão selecionados blocos de parafina de peças cirúrgicas (cólon e sítios metastáticos) contendo carcinoma colorretal da casuística do laboratório INGOH, entre os anos de 2011 e 2013. Este laboratório possui média anual de 55 casos de câncer colorretal. Espera-se uma amostra de 150 casos.

CRITÉRIO DE EXCLUSÃO: Casos com material (blocos de parafina) já retirado do laboratório pelo paciente e que não foram devolvidos. -Material de peça cirúrgica com apenas um bloco para estudo. Os casos selecionados devem ter ao menos dois blocos de parafina com material suficiente para estudos de imunohistoquímica e de PCR. Peças cirúrgicas geralmente possuem de três a quatro blocos de lesão arquivados. Sendo assim os blocos excedentes ficarão resguardados para estudos futuros de necessidade dos pacientes. Além disso há grande probabilidade de que o bloco estudado permaneça, ao final do estudo, com grande quantidade de material disponível para novas pesquisas. -Espécimes inadequados para estudo molecular e por IHQ. A adequabilidade de fixação é avaliada através de sinais de autólise e capacidade tintorial em análise das lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina (H&E) e por critérios específicos para PCR.

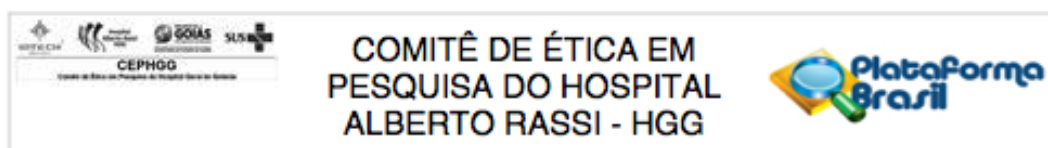
TAMANHO DA AMOSTRA: Espera-se uma amostra de 150 casos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos apresentados pelo Pesquisador Responsável:

OBJETIVO PRIMÁRIO: Correlacionar a expressão do EGFR por imunohistoquímica com o estado mutacional do gene KRAS por PCR em carcinomas colorretais.

Endereço: Avenida Anhanguera nº 6.479 - 5º Andar
 Bairro: Setor Oeste CEP: 74.110-010
 UF: GO Município: GOIANIA
 Telefone: (62)3209-9917 Fax: (62)3201-6281 E-mail: hgg.cep@idtech.org.br



Continuação do Parecer: 951.174

OBJETIVO SECUNDÁRIO: Pesquisar a expressão do EGFR nos casos selecionados de câncer colorretal por IHQ. Estabelecer escore de classificação referente ao padrão de marcação na IHQ. Pesquisar o estado mutacional do KRAS nos casos selecionados de câncer colorretal por RT-PCR. Correlacionar os resultados das pesquisas da expressão do EGFR e mutações do KRAS. Correlacionar os dados gerais com os resultados do EGFR e do KRAS.

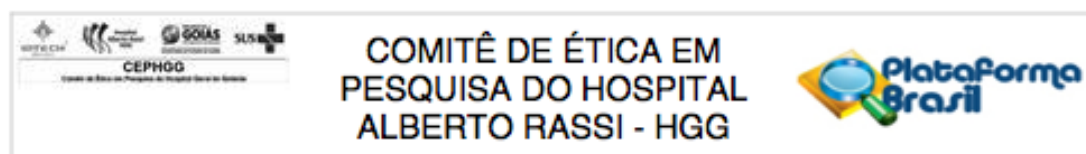
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Considerações apresentadas pelo Pesquisador Responsável acerca dos possíveis riscos e benefícios resultantes da participação na pesquisa:

RISCOS: Os princípios enunciados na Declaração de Helsinque 31 serão respeitados, mantendo-se em sigilo a identidade dos pacientes, cujos dados serão identificados apenas pelo número de registro no projeto. Os mesmos não serão submetidos a procedimento invasivos para obtenção de amostras uma vez que as mesmas são blocos de parafina arquivados no laboratório INGOH e são provenientes de procedimentos cirúrgicos prévios com indicação específica. Portanto não haverá custos para os pacientes e caso venham a surgir estarão garantidos pelo pesquisador responsável. As amostras serão utilizadas com parcimônia, resguardando os critérios de exclusão que visam proteger a reserva de material para estudos futuros de interesse do paciente. Pelo fato desta pesquisa constituir um estudo retrospectivo, ser isenta de risco aparente, além de não haver a possibilidade de contatar muitos dos pacientes diagnosticados, considerou-se que a assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido não seria aplicável a este projeto. O estudo será interrompido caso não se consiga amostra estatisticamente significativa ou existam imprevistos orçamentários incompatíveis com a condução do mesmo.

BENEFÍCIOS: Os resultados deste trabalho contribuirão com dados estatísticos da população local, trazendo benefícios inerentes a este aspecto, e caso haja relação entre os testes tanto os pacientes participantes do estudo, quanto toda população portadora de carcinoma colorretal serão beneficiados com a possibilidade de diagnóstico mais acessível, propiciando tratamento direcionado. Até o presente momento não há estudo semelhante em população de base brasileira. Em nossa revisão não foi identificado estudo que fizesse correlação direta da expressão por imunohistoquímica do EGFR com estado mutacional do KRAS, principalmente utilizando o clone DAK-H1-WT. Uma vez identificada relação estatisticamente significativa entre a expressão do EGFR

Endereço: Avenida Anhangüera nº 6.479 - 5º Andar
Bairro: Setor Oeste **CEP:** 74.110-010
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3209-9917 **Fax:** (62)3201-8281 **E-mail:** hgg.cep@idttech.org.br



Continuação do Parecer: 951.174

e o estado mutacional do KRAS, o teste de IHQ poderá ser realizado em um primeiro momento, ou até substituir o teste por PCR. Tendo em vista a maior acessibilidade e o menor custo do exame de IHQ o paciente teria diagnóstico do estado molecular a um custo menor e em tempo hábil para tratamento precoce, desta forma desonerando o sistema de saúde público e privado. Caso seja evidenciado que não há correlação entre os aspectos pesquisados, tendo em vista que o desenho do estudo visa ter validade interna absoluta e externa relativa, o trabalho, brasileiro, se juntará aos poucos estudos internacionais neste sentido, servindo de base para novas pesquisas e indagações.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Comentários e considerações do Comitê de Ética:

ÁREA TEMÁTICA: Trata-se de um protocolo nacional, retrospectivo, de acurácia, pertencente a Área Temática não especial, Área do Conhecimento Ciências da Saúde.

CONEP: Por se tratar de um estudo que não pertence a Área Temática Especial não necessita de apreciação/aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

O projeto em questão é um estudo local sem cooperação estrangeira, sendo o Brasil o País de origem.

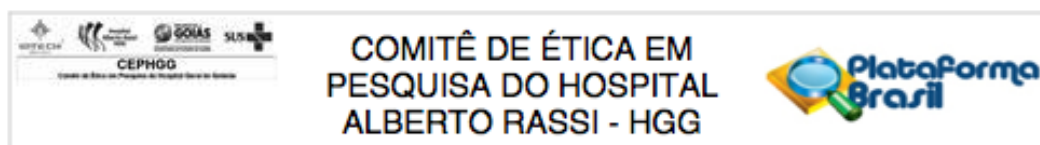
FOLHA DE ROSTO: A folha de rosto encontra-se corretamente preenchida e devidamente assinada pelo Pesquisador Responsável, Dr. Thiago David Alves Pinto, e pelo responsável Institucional, Dr. Yuri Vasconcelos Pinheiro, nos respectivos termos de compromisso.

PESQUISA REALIZADA NO INGOH- Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia S/S LTDA. Todas as autorizações foram devidamente anexadas: Carta de Autorização de acesso a arquivo, Declaração de Instituição Colaboradora, Declaração de Concordância da Chefia para realização de Pesquisa no setor de Patologia, Laboratório INGOH.

EQUIPE DE PESQUISA: A equipe de pesquisa foi devidamente listada, fazendo parte da mesma: Thiago David Alves Pinto, Enio Chaves de Oliveira, Sebastião Alves Pinto e Vera Aparecida Saddi.

NÚMERO DE PARTICIPANTES: Está prevista a participação de 150 participantes, dos quais serão utilizados apenas blocos de parafina de peças cirúrgicas, não havendo abordagem dos pacientes

Endereço: Avenida Anhangüera nº 6.479 - 5º Andar
Bairro: Setor Oeste **CEP:** 74.110-010
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3209-8917 **Fax:** (62)3201-8281 **E-mail:** hgg.cep@idtech.org.br



Continuação do Parecer: 951.174

pessoalmente.

FORMA DE RECRUTAMENTO: Não haverá abordagem de pacientes pessoalmente, sendo utilizados blocos de parafina de peças cirúrgicas (cólon e sítios metastáticos) contendo carcinoma colorretal da casuística do laboratório INGOH. Foi anexada "Justificativa para Isenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido", considerada satisfatória.

POPULAÇÃO DO ESTUDO: Serão selecionados blocos de parafina de peças cirúrgicas (cólon e sítios metastáticos) contendo carcinoma colorretal da casuística do laboratório INGOH, entre os anos de 2011 e 2013. Este laboratório possui média anual de 55 casos de câncer colorretal. Espera-se uma amostra de 150 casos.

OBJETIVOS: Estão claramente descritos.

METODOLOGIA: Está adequada ao que se pretende avaliar.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO: Os critérios de inclusão e exclusão estão claramente definidos e não apresentam restrições éticas.

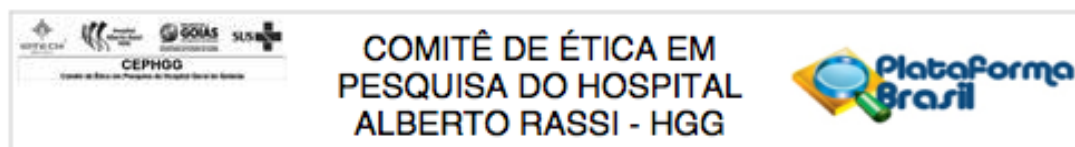
AValiação DOS RISCOS E BENEFÍCIOS: Estão claramente descritos sendo justificáveis pelos benefícios esperados com o desenvolvimento da pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO: Foi apresentada pelo pesquisador uma "Justificativa para Isenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido", visto que serão utilizados blocos de parafina de peças cirúrgicas, não havendo abordagem direta de pacientes nem acesso a prontuários médicos, resguardando-se a privacidade e sigilo da identidade dos pacientes e seus dados, sendo esta considerada aceitável.

CRONOGRAMA DO ESTUDO: O cronograma foi devidamente apresentado, deixando claro que o mesmo somente será executado após aprovação pelo CEP.

DURAÇÃO DO ESTUDO: Estima-se que o estudo dure de março de 2015 a a março de 2016.

Endereço: Avenida Anhangüera nº 6.479 - 5º Andar
Bairro: Setor Oeste **CEP:** 74.110-010
UF: GO **Município:** GOIÂNIA
Telefone: (62)3209-9917 **Fax:** (62)3201-8281 **E-mail:** hgg.cep@idtech.org.br



Continuação do Parecer: 951.174

ORÇAMENTO FINANCEIRO: O orçamento detalhado da pesquisa foi apresentado, indicando o custo total de R\$ 46.316,30, a cargo do pesquisador responsável, com apoio institucional secundário do INGOH – Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia S/S LTDA.

CURRÍCULO: O Currículo do Pesquisador responsável encontra-se disponível na Plataforma Lattes, e informa que o mesmo possui graduação em Medicina pela Escola Superior de Ciências da Saúde (2009). É médico residente em anatomia patológica pelo Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (2013). Tem experiência na área de Medicina, com ênfase em ANATOMIA PATOLÓGICA. Atualmente é médico patologista do corpo clínico do laboratório INGOH, tendo portanto, formação acadêmica adequada para a condução do estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

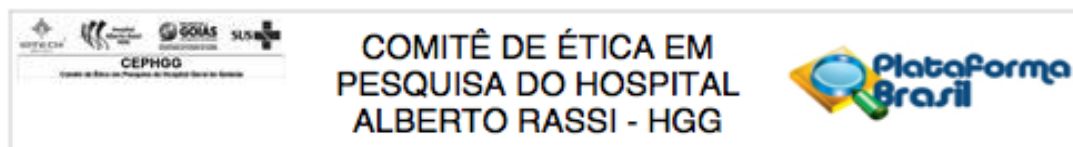
Constam no Protocolo os Documentos e Declarações pertinentes, em concordância com as normas vigentes, conforme listados abaixo:

- PB INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO_407395;
- Folha de Rosto;
- Projeto Detalhado v.2 – 14/12/2014;
- Termo de Anuência - INGOH 9 v1- 05/09/2104;
- Carta de autorização de Acesso a Arquivo v.1 - 29/10/2014;
- Declaração de Instituição Colaboradora- LOR-ACCG v. 1 - 05/11/2-14;
- Declaração de Compromisso do Pesquisador de cumprir a Resolução CNS 466/12 e suas complementares v.1- 02/12/2014;
- Declaração sobre o recrutamento dos participantes da Pesquisa v.1 - 02/12/2014;
- Declaração sobre o Vínculo do Pesquisador Responsável com a Instituição envolvida v.1 - 02/12/14;
- Justificativa para Isenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido v.1 - 02/12/2014;
- Declaração de Concordância da Chefia para a Realização de Pesquisa no Setor de Patologia - Laboratório INGOH v.1-02/12/2014;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações.

Recomendações:

Recomendamos que os procedimentos realizados assegurem sigilo, privacidade e anonimato dos pacientes.

Endereço: Avenida Anhangüera nº 6.479 - 5º Andar
Bairro: Setor Oeste **CEP:** 74.110-010
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3209-9917 **Fax:** (62)3201-8281 **E-mail:** hgg.cep@idtech.org.br



Continuação do Parecer: 951.174

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram encontradas inadequações ou pendências éticas.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Alberto Rassi - HGG, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional N° 001/2013 do CNS, S.M.J., manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa nos termos que está proposto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em acordo com a Resolução 466/12 CNS, Itens X.1.-3.b e XI.2.d, solicitamos ao pesquisador responsável que nos encaminhe os Relatórios Parciais semestralmente, contados a partir da data de aprovação, e o Relatório Final / Encerramento ou Relatório de Suspensão do Estudo. Solicitamos que nos envie possíveis Emendas, Adendos, novos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido ou qualquer modificação relevante e que notifique no prazo máximo de dez dias qualquer Evento Adverso Sério ocorrido no Centro juntamente com a avaliação e comentários do Investigador Principal para que possamos fazer o devido acompanhamento deste estudo.

O CEPHGG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 466/12 e suas complementares.

GOIANIA, 24 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
Andréa Inês Spadeto Aires
(Coordenador)

Endereço: Avenida Anhanguera nº 6.479 - 5º Andar
Bairro: Setor Oeste **CEP:** 74.110-010
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3209-9917 **Fax:** (62)3201-8281 **E-mail:** hgg.cep@idtech.org.br

ANEXO B

Diseases of the Colon & Rectum

Online Submission and Review System



SCOPE

Diseases of the Colon & Rectum is the Journal of The American Society of Colon and Rectal Surgeons. The mission of the Journal is to advance knowledge of disorders of the small intestine, colon, rectum, and anus. It publishes original articles, review papers, editorials, practice parameters, and letters to the editor. Major areas of interest include colorectal and anal cancer, inflammatory bowel disease, benign colonic conditions, anorectal disorders, and pelvic floor disorders. The Journal's main focus is on surgical issues, though other material directly related to these topics is also published. All submitted material is subject to a peer-review process.

[FORMS REQUIRED WITH SUBMISSION:](#)

[Copyright Transfer Statement](#)

[Disclosure Statement](#)

[MANUSCRIPT SUBMISSION GUIDELINES](#)

[MANUSCRIPT PREPARATION GUIDELINES](#)

[FIGURES](#)

[CONSENSUS STATEMENTS](#)

[LEGAL REQUIREMENTS](#)

FORMS REQUIRED WITH SUBMISSION

Copyright Transfer Statement: Each author must complete the Journal's copyright transfer agreement. A copy of the form is made available to the submitting author within the Editorial Manager submission process. Co-authors will automatically receive an Email with instructions on completing the form upon submission.

Disclosure Statement:

Conflicts of interest: Authors must state all possible conflicts of interest in the manuscript, including financial, consultant, institutional and other relationships that might lead to bias or a conflict of interest. If there is no conflict of interest, this should also be explicitly stated as none declared. All sources of funding should be acknowledged in the manuscript. All relevant conflicts of interest and sources of funding should be included on the title page of the manuscript with the heading "Conflicts of Interest and Source of Funding:". For example:

Conflicts of Interest and Source of Funding: A has received honoraria from Company Z. B is currently receiving a grant (#12345) from Organization Y, and is on the speaker's bureau for Organization X – the CME organizers for Company A. For the remaining authors none were declared.

Each author must complete and submit the journal's copyright transfer agreement, which includes a section on the disclosure of potential conflicts of interest based on the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors, "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (www.ic-mje.org/update.html).

A copy of the form is made available to the submitting author within the Editorial Manager submission process. Co-authors will automatically receive an Email with instructions on completing the form upon submission.

Open Access: LWW's hybrid open access option is offered to authors whose articles have been accep

ted for publication. With this choice, articles are made freely available online immediately upon publication. Authors may take advantage of the open access option at the point of acceptance to ensure that this choice has no influence on the peer review and acceptance process. These articles are subject to the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Authors of accepted peer-reviewed articles have the choice to pay a fee to allow perpetual unrestricted online access to their published article to readers globally, immediately upon publication. The article processing charge for *Diseases of the Colon & Rectum* is \$3,000. The article processing charge for authors funded by the Research Councils UK (RCUK) is \$3,800. The publication fee is charged on acceptance of the article and should be paid within 30 days by credit card by the author, funding agency or institution. Payment must be received in full for the article to be published open access.

1. *Authors retain copyright:* Authors retain their copyright for all articles they opt to publish open access. Authors grant LWW a license to publish the article and identify itself as the original publisher.
2. *Creative Commons license:* Articles opting for open access will be freely available to read, download and share from the time of publication. Articles are published under the terms of the Creative Commons License Attribution-NonCommerical No Derivative 4.0 which allows readers to disseminate and reuse the article, as well as share and reuse of the scientific material. It does not permit commercial exploitation or the creation of derivative works without

specific permission. To view a copy of this license visit: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>.

3. *Compliance with NIH, RCUK, Wellcome Trust and other research funding agency accessibility requirements:* A number of research funding agencies now require or request authors to submit the post-print (the article after peer review and acceptance but not the final published article) to a repository that is accessible online by all without charge. As a service to our authors, LWW identifies to the National Library of Medicine (NLM) articles that require deposit and transmits the post-print of an article based on research funded in whole or in part by the National Institutes of Health, Howard Hughes Medical Institute, or other funding agencies to PubMed Central. The revised Copyright Transfer Agreement provides the mechanism. LWW ensures that authors can fully comply with the public access requirements of major funding bodies worldwide. Additionally, all authors who choose the open access option will have their final published article deposited into PubMed Central. RCUK and Wellcome funded authors can choose to publish their paper as open access with the payment of an article process charge (gold route), or opt for their accepted manuscript to be deposited (green route) into PMC with an embargo.

With both the gold and green open access options, the author will continue to sign the Copyright Transfer Agreement (CTA) as it provides the mechanism for LWW to ensure that the author is fully compliant with the requirements. After signature of the CTA, the author will then sign a License to Publish where they will then own the copyright. Those authors who wish to publish their article via the gold route will be able to publish under the terms of the Attribution 4.0 (CCBY) License. To view of a copy of this license visit: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. Those authors who wish to publish their article via the green route will be able to publish under the rights of the Attribution Non-commercial 4.0 (CCBY NC) license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

It is the responsibility of the author to inform the Editorial Office and/or LWW that they have RCUK funding. LWW will not be held responsible for retroactive deposits to PMC if the author has not completed the proper forms.

4. *FAQ for open access:* <http://links.lww.com/LWW-ES/A48>

MANUSCRIPT SUBMISSION GUIDELINES

All manuscripts must be submitted on-line through the web site at <https://www.editorialmanager.com/dcr/>.

First-time users: Please click the Register button from the menu above and enter the requested information. On successful registration, you will be sent an e-mail indicating your user name and password. Once you have an assigned ID and password, you do not have to re-register, even if your status changes (that is, author, reviewer, or editor). **NOTE:** If you have received an e-mail from us with an assigned user ID and password, or if you are a repeat user, do not register again. Just log in. **Authors:** Please click the log-in button from the menu at the top of the page and log in to the system as an Author. Submit your manuscript according to the author instructions. You will be able to track the progress of your manuscript through the system. If

you experience any problems, please contact nantruax@gmail.com or poldenburg1@gmail.com.

SYSTEM REQUIREMENTS

System requirements can be found at <http://www.editorialmanager.com/homepage/faq.html#faq11>

ARTICLE TYPES

ORIGINAL CONTRIBUTIONS: This category includes original research including both clinical and basic science submissions. The work must be original and neither published, accepted, or submitted for publication elsewhere. Any related work, either SUBMITTED, in press, or published from any of the authors should be clearly cited and referenced.

All clinical trials must be registered in a public trials registry that is acceptable to the International Committee of Medical Journals Editors (ICMJE). Go to (<http://www.icmje.org/faq.html>). Authors of randomized controlled trials must adhere to the CONSORT guidelines, available at: www.consort-statement.org, and provide both a CONSORT checklist and flow diagram. We require that you choose the MS Word template at www.consort-statement.org for the flow chart and cite/upload it in the manuscript as a figure. In addition, submitted manuscripts must include the unique registration number in the Abstract as evidence of registration.

All authors are expected to abide by accepted ethical standards for human and animal investigation. In studies that involve human subjects or laboratory animals, authors must provide an explicit statement in Materials and Methods that the experimental protocol was approved by the appropriate institutional review committee and meets the guidelines of their responsible governmental agency. In the case of human subjects, informed consent, in addition to institutional review board approval, is required.

The Journal will consider and occasionally publishes ANIMAL STUDIES. However, as our focus is on clinical aspects of colorectal disease, these papers are of low priority and are generally limited to those that provide particular biological insight or have direct and usually near-term therapeutic implications. In studies that involve laboratory animals authors must adhere to the ARRIVE guidelines and provide an ARRIVE checklist. Cite and upload same in the manuscript as a figure. We refer you to the following links:

Article - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3043335/>

Guidelines with link to Checklist: <http://www.nc3rs.org.uk/ARRIVE>

Only a limited number of BASIC SCIENCE PAPERS are considered for publication. These are selected at the discretion of the editor(s) based upon novelty, relevance, and the quality of the research.

Original contributions comprising survey data of surgeon practice and attitudes are considered to be of low publication priority and their submission is discouraged.

HISTORICAL REVIEWS: The purpose of this section is to review the history and evolution of a topic of interest. Appropriate topics include, but are not limited to, surgical techniques/operations, diagnostic techniques, pathogenesis of disease, and biographical sketches of important figures in the history of colon and rectal surgery. Manuscripts will be selected based upon relevance and clarity of expression. Provide a nonstructured abstract that includes the background, a brief summary, and a statement of significance. Author limit: 3. Abstract word limit: 250. Manuscript word limit: 3000.

TECHNICAL NOTES AND VIDEO VIGNETTES: Technical notes are a brief communication describing a novel surgical technique. Both images and videos may be included with submissions. Text for technical notes should not be more than 1500 words. Abstracts for technical notes should adhere to the following format: *Introduction; Technique; Results; Conclusions*. While patient results may be included, individual case reports or case series should not be included in the text. The focus of the manuscript should be on the technique itself. Where videos are included with technical notes, the video may be either a single video up to 5 minutes in length, or up to 3 videos, with a total running time of up to 5 minutes.

Video vignettes are submissions where the video is the major component of the article. Text for video vignettes should not be more than 300 words. Text should be limited to that which provides a brief introduction to the video only and should NOT include case reports or results. The video may be either a single video up to 5 minutes in length, or up to 3 videos, with a total running time of up to 5 minutes. No structured abstract is required for Video Vignettes.

Videos for both technical notes and video vignettes MUST be narrated and in English. No accompanying music soundtrack should accompany the video(s). The content of the videos must be identical to that reviewed and accepted by the editors of Diseases of the Colon & Rectum.

For submission instructions of videos, go to <http://links.lww.com/a142>.

NOTE: For videos more than 10 MB up to 100 MB maximum, only .wmv, .swf, .flv, .mpg, .mpeg, and .mpg-2 are accepted.

CASE REPORTS:

Case reports are no longer being considered for publication.

CURRENT STATUS:

Submissions should review a topic of current interest. Two categories of reviews will be considered:

1. Meta-analyses of randomized controlled trials.
2. Systematic reviews: Both types of articles must adhere to the guidelines outlined in the PRISMA statement. For the most up-to-date information about these guidelines and access to future revisions, visit <http://www.prisma-statement.org>. Methods should provide a detailed literature search strategy and a description of the way in which the studies were reviewed and analyzed.

Total number of authors is limited to 5, and author contribution must be listed on the Title Page.

On occasion the Editors will solicit a clinical review addressing a specific topic of current interest. All review articles, including solicited reviews, are subject to the usual peer review process.

Advice regarding suitability of a topic is available from the Editorial Office.

INDUSTRY-SPONSORED REVIEWS

Diseases of the Colon & Rectum does not review submissions that are either authored or commissioned by industry.

NARRATIVE REVIEWS:

Narrative Reviews are no longer being considered for publication.

FOR DEBATE: The purpose of this section is to provide a forum for novel ideas, theories, or concepts with the goal of promoting discussion and research. These articles permit a greater degree of personal opinion than do original contributions. However, even submissions that are speculative must be based upon reasonable evidence. Articles are selected based upon novelty, relevance, persuasiveness and clarity of expression. Manuscripts should be no longer than 2500 words/20 references. Include a BRIEF abstract - 3 to 5 lines - with the submission. No structured abstract required for this For Debate section. The editors specifically reserve the right to solicit and publish companion articles that take an opposing or alternative viewpoint.

DYNAMIC ARTICLE: Dynamic articles are COMPLETE MANUSCRIPTS with video(s) included strictly as supplemental electronic material. Standard instructions for manuscript submission should be followed. The manuscript, with supplemental video(s), should include title page, structured abstract and classifications, manuscript text, and references. Up to 3 videos (included only as supplemental materials) and each up to one-minute in length maximum per manuscript submission will be considered. Be sure to note in your manuscript the placement of the video clip(s). Videos MUST be narrated and in English. The content of the files must be identical to that reviewed and accepted by the editors of *Diseases of the Colon & Rectum*. For submission instructions of videos, go to <http://links.lww.com/a142>. NOTE: For videos more than 10 MB up to 100 MB maximum, only .wmv, .swf, .flv, .mpg, .mpeg, and .mpg-2 are accepted.

LETTER TO EDITOR: We welcome Letters to the Editor, especially those about published DCR articles. Submissions should be no longer than 250 words and with no more than 10 references. We do not accept case reports in the form of a Letter to the Editor.

EDITORIAL: Editorials are exclusively solicited by the Editor. Editorials should express opinions and/or provide comments on papers published elsewhere in the same issue and should be approximately 1,000 words in length with up to 10 references. A single author is preferred. Editorial submissions are subject to review/request for revision, and editors retain the right to alter text style.

MANUSCRIPT PREPARATION GUIDELINES

GENERAL INSTRUCTIONS: Manuscripts are to be double-spaced with a 12-pt. font and written in colloquial, professional English. Authors are urged to aim for clarity, brevity, and accuracy of information and language. Authors whose first language is not English should have their papers checked for linguistic accuracy by a professional editor who is a native English speaker. Each manuscript page should be numbered.

Manuscripts are limited to no more than 3000 words (main text only, does not include abstract, references, tables, legends, and figures). References are limited to no more than 40, with the exception of review articles, systematic reviews, and meta-analyses.

The maximum number of authors on a manuscript is usually 8, but occasional exceptions are made. Requests for exception must be directed to the Editorial Office *by e-mail* PRIOR to manuscript submission. Include with your e-mail request the Title Page and Abstract of the manuscript. Please follow the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) recommendations for authorship criteria (<http://www.icmje.org/#author>). For those contributors who do not fulfill authorship criteria, we are happy to acknowledge them in a list at the end of the paper.

PROFESSIONAL EDITING SERVICES

Articles submitted to the Journal must be written with a solid basis of English language. We refer you to the Wolters Kluwer and Editage co-branded web site (<http://wkauthorservices.editage.com>).

Wolters Kluwer, in partnership with Editage, offers a unique range of editorial services to help you prepare a submission-ready manuscript:

1. Premium Editing: Intensive language and structural editing of academic papers to increase chances of journal acceptance.
2. Advanced Editing: A complete language, grammar, and terminology check to give you a publication-ready manuscript.
3. Translation with Editing: Write your paper in your native language and Wolters Kluwer Author Services will translate it into English, as well as edit it to ensure that it meets international publication standards.
4. Plagiarism Check: Helps ensure that your manuscript contains no instances of unintentional plagiarism.
5. Artwork Preparation: Save precious time and effort by ensuring that your artwork is viewed favorably by the journal without you having to incur the additional cost of purchasing special graphics software.

MANUSCRIPT FORMAT AND SEQUENCE

TITLE PAGE:

Title page should contain: 1. The title of the article; 2. A short running head of no more than 40 characters (count letters and spaces); 3. First name, middle initial, last name, highest academic degree, academic title, and institution/department for each author; 4. Name, address, telephone, fax, and current e-mail address of author responsible for correspondence about the manuscript; 5. Disclaimers; 6. Source(s) of support in the form of grants, equipment, drugs, or all of these, or state if there is no funding;

authors should explicitly list any relevant financial relationships (see Disclosure Statement) or state explicitly that there are none; 7. State if manuscript has been or will be a podium or poster meeting presentation and provide the name of the meeting, location (city, state and country if not U.S.), and include start AND end dates of the ENTIRE meeting; 8. State the word count for the text; 9. State the word count for the abstract; 10. List the contribution of each author/coauthor. Authorship credit should be based on a. Substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; b. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content; c. Final approval of the version to be published. Authors should meet all three of these conditions. Please note that while many activities (for example, supplying patients, maintaining a database, obtaining follow-up data, and providing criticism of a manuscript) are unquestionably important, none of these activities alone suffices for authorship. We are happy to acknowledge contributors who do not fulfill authorship criteria at the end of the paper. Our policy is based upon the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" statement of the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.ic-mje.org/#author>); 11. From the following list select an appropriate category for your paper: a. Colorectal/Anal neoplasia; b. Inflammatory Bowel Disease c. Benign colorectal disease; d. Anorectal disease; e. Pelvic floor; or f. Socioeconomic issues.

Trade names, as well as Trademark and Registered symbols, are not allowed in the title. When relevant, trade names may be used once in the body of the article preceded by a generic description (e.g., a drug or device name); the generic name should be used subsequently throughout the article.

STRUCTURED ABSTRACT: The structured abstract should not be more than 300 words. No abbreviations are allowed in the abstract. Do not provide any manufacturer information in the abstract. Randomized control trials must include in the Abstract the unique registration number as evidence of registration. Organize structured abstracts for the articles shown below.

Video Abstracts: Complete instructions for creating a Video Abstract to submit with your article can be found at the following two links:

[How To Create A Video Abstract \(Word\).](#)

[How To Create Audio For A Video \(PDF\).](#)

Original Contribution: Background, Objective, Design, Settings, Patients, Interventions(s) if any, Main Outcome Measures, Results, Limitations, Conclusions. **BE SURE TO USE THESE SPECIFIC HEADERS WHEN FORMATTING AND SUBMITTING THE ABSTRACT WITH YOUR PAPER.** If not done, the paper will be returned to authors for compliance prior to any review process.

Systematic Reviews, including Meta-analyses: Background, Objective, Data Sources, Study Selection, Intervention(s), Main Outcome Measures, Results, Limitations, Conclusions. **BE SURE TO USE THESE SPECIFIC HEADERS WHEN FORMATTING AND SUBMITTING THE ABSTRACT WITH YOUR PAPER.** If not done, the paper will be returned to authors for compliance prior to any review process.

Dynamic Articles: Use specific headers as outlined above for Original Contribution submissions.

(Cummings P, Rivara FR, Koepsell TD. Writing informative abstracts for journal articles. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2004;158:1086-1088.)

CLASSIFICATIONS:

Select up to 6 classifications from the list provided in Editorial Manager that will assist in cross-indexing your article and that may be published with the structured abstract.

TEXT:

Arrange in the following order:

1. Introduction: Clearly state the purpose of the article. Summarize the rationale for the study or observation. Give only strictly pertinent references, and do not review the subject extensively;
2. Materials and Methods: Describe your selection of the observational or experimental subjects clearly (patients or experimental animals, including controls). Provide an explicit statement that the experimental protocols were approved by the appropriate institutional review committee and meet the guidelines of the responsible governmental agency. In the case of human subjects, state explicitly those subjects have provided informed consent. Identify the methods, apparatus/product** (with manufacturer's name and address in parentheses), and procedures in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. Give references to established methods, including statistical methods; provide references and brief descriptions of methods that have been published but are not well known, describe substantially modified methods, including statistical methods, give reasons for using them, and evaluate their limitations;
3. Results: Please present your results in a logical sequence in the text, tables, and figures. Do not repeat in the text all the data in the tables and/or illustrations. Emphasize or summarize only important observations. Please provide confidence intervals of proportions.

If you report p values:

1. Use a zero to the left of the decimal point. For example: $p = 0.02$ (NOT $p = .02$).
1. p values should be expressed to 2 digits when:
 1. p is equal to or greater than 0.01, whether or not p is significant. For example:
 2. $p = 0.012$ would be $p = 0.01$, and $p = 0.703$ would be $p = 0.70$ (NOT $p = 0.7$).
1. p values should be expressed to 3 digits when:
 1. p is smaller than 0.01. For example: $p = 0.005$; or when rounding would make the p value nonsignificant. For example: do NOT round $p = 0.49$ to $p = 0.05$.
1. For p values smaller than 0.001, only one significant digit should be used. For example:
 1. $p = 0.00006$ (NOT 0.000058).

4. Discussion: The discussion should be formatted as follows:

- * Concise statement of principal findings;
- * Strengths and weaknesses of the study;
- * Strengths and weaknesses of the study in relation to other studies, discussing particularly any differences in results;
- * Meaning of the study: possible mechanisms and implications for clinicians or policymakers;
- * Unanswered questions and future research.

(Docherty M, Smith R. The case for structuring the discussion of scientific papers. *BMJ*. 1999;318:1224-1225.)

Please avoid restating the results of the study and avoid lengthy literature reviews.

****Product Information:** For apparatus/product(s), supply exact product name(s) and supply the manufacturer's name(s) and location(s) (including city, state, and country) for all products mentioned throughout the text. (NOTE: If no specific product name is mentioned, supplying the manufacturer information is optional.)

Acknowledgments: Only acknowledge persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Begin your text of the acknowledgment with, "The authors thank...".

References: The author is responsible for the accuracy of the references. Citations in the text should be identified by superscript Arabic numerals without parentheses, and the list of the references at the end of the paper should be numbered consecutively in the order they are first mentioned in the text. Authors should identify references in the text, tables, and legends. Only works referred to in the text and already accepted for publication can be included. For seven or more authors please list the first three authors followed by et al. Please use a maximum of 40 references for each manuscript submitted, with the exception of review articles and meta-analyses. [Click here](#) for limited examples. For very detailed instructions on citing references, refer to the AMA Manual of Style, 10th Edition beginning on page 39.

Tables: Each table should be numbered consecutively with Arabic numerals. Footnotes to tables should be indicated by lowercase superscript letters.

Legends: Legends must be brief, self-sufficient explanations of the figures and tables in no more than four or five lines. Remarks such as "For explanation, see text" should be avoided. The legends should be typed double-spaced on a separate page. When symbols, arrows, numbers or letters are used to identify parts of the illustration, identify and explain each one clearly.

FIGURES:

A) Creating Digital Artwork

1. Learn about the publication requirements for Digital Artwork:

<http://links.lww.com/ES/A42>

2. Create, Scan and Save your artwork and compare your final figure to the Digital Artwork Guideline Checklist (below).
3. Upload each figure to Editorial Manager in conjunction with your manuscript text and tables.

B) Digital Artwork Guideline Checklist

Here are the basics to have in place before submitting your digital art to *DCR*:

1. Artwork should be saved as TIFF, PDF, Word Doc, PPT, or EPS files.
2. Artwork is created as the actual size (or slightly larger) it will appear in the journal. (To get an idea of the size images should be when they print, study a copy of the journal to which you wish to submit. Measure the artwork typically shown and scale your image to match.)
3. Crop out any white or black space surrounding the image.
4. Diagrams, drawings, graphs, and other line art must be vector or saved at a resolution of at least 1200 dpi. If the art is created in an MS Office program, convert to a hi-res PDF. If the PDF creation process is unfamiliar then submit the MS Office doc.
5. Photographs, radiographs and other halftone images must be saved at a resolution of at least 300 dpi.
6. Photographs and radiographs with text must be saved as postscript or at a resolution of at least 600 dpi.
7. Each figure must be saved and submitted as a separate file. Figures should not be embedded in the manuscript text file.

Remember:

1. Cite figures consecutively in your manuscript.
2. Number figures in the figure legend in the order in which they are discussed.
3. Upload figures consecutively to the Editorial Manager web site and number figures consecutively in the Description box during upload.

Figures should be limited to those essential for the text. The same results should be presented as either the graph or tables, not as both.

NOTE: After following the instructions in the above link, and after all figures have been uploaded into Editorial Manager, you must click on the Artwork link in Editorial Manager to determine if each figure shows a designation of Pass. If a figure shows Fail, send an e-mail to nantruax@gmail.com or poldenburg1@gmail.com for additional assistance.

REVISED MANUSCRIPTS: Diseases of the Colon & Rectum reserves the right to request a statistical or other additional expert review of a paper at any time during the review process and not just during the initial review. A request for revisions does not guarantee acceptance of the revised manuscript.

CONSENSUS STATEMENTS: Diseases of the Colon & Rectum is a co-sponsor of the Surgical Journal Editors Group. Authors must be in compliance on authorship criteria and trial registration: Consensus statement on submission and publication of manuscripts. *Dis Colon Rectum*. 2001;44:767-768; Consensus statement on surgery journal authorship. *Dis Colon Rectum*. 2006;49:789-790.

LEGAL REQUIREMENTS: Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all coauthors, if any, as well as by the responsible authorities—tacitly or explicitly—at the institute where the work has been carried out. Neither the Publisher nor Society will be held legally responsible should there be any claims for compensation.

PERMISSIONS: Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

For permission and/or rights to use content for which the copyright holder is LWW or the society, please go to the journal's website and after clicking on the relevant article, click on the "Request Permissions" link under the "Article Tools" box that appears on the right side of the page. Alternatively, send an e-mail to customercare@copy-right.com.

For Translation Rights & Licensing queries, contact Silvia Serra, Translations Rights, Licensing & Permissions Manager, Wolters Kluwer Health (Medical Research) Ltd, 250 Waterloo Road, London SE1 8RD, UK. Phone: +44 (0) 207 981 0600. E-mail: silvia.serra@wolterskluwer.com

For Special Projects and Reprints (U.S./Canada), contact Alan Moore, Director of Sales, Lippincott Williams & Wilkins, Two Commerce Square, 2001 Market Street, Philadelphia, PA 19103. Phone: 215-521-8638. E-mail: alan.moore@wolterskluwer.com

For Special Projects and Reprints (non-U.S./Canada), contact Silvia Serra, Translations Rights, Licensing & Permissions Manager, Wolters Kluwer Health (Medical Research) Ltd, 250 Waterloo Road, London SE1 8RD, UK. Phone: +44 (0) 207 981 0600. E-mail: silvia.serra@wolterskluwer.com

CROSSCHECK: Diseases of the Colon & Rectum utilizes the online tool CrossCheck to randomly check submitted materials against published scholarly research papers and the open web for possible duplication of data.

ANEXO C

Document No.	UKNEQAS-F-082	Version No.	1.0
		Review date	01/10/2017

UK NEQAS
Molecular Genetics

UK NEQAS [Edinburgh]

www.ukneqas-molgen.org.uk

Director: Dr Sandi Deans

Individual Laboratory Score Report

EQA: **Colorectal cancer round 2 (15-16)** Year: **2015**

Lab Reference Number: **298**

CLINICAL CASE 6 - Sergio FUENTES (dob 15/09/1962)		
Category	Score	Comments
Genotyping	2.00	KRAS, NRAS and BRAF results correct. (-0 marks)
Interpretation	2.00	Interpretation correct. (-0 marks)
Clerical accuracy	2.00	No deductions

CLINICAL CASE 7 - Celine FALILAT (dob 25/05/1963)		
Category	Score	Comments
Genotyping	2.00	KRAS, NRAS and BRAF results correct. (-0 marks)
Interpretation	2.00	Interpretation correct. (-0 marks)
Clerical accuracy	2.00	No deductions

CLINICAL CASE 8 - Isabelle HILTON (dob 21/12/1940)		
Category	Score	Comments
Genotyping	2.00	KRAS, NRAS and BRAF results correct. (-0 marks)
Interpretation	1.00	No interpretation of the RAS results. (-0.5 marks) The statement regarding non-response to EGFR monoclonal antibody therapy is too strong. The current consensus is that BRAF is not a predictive marker for response to EGFR monoclonal antibody therapy. (-0.5 marks)
Clerical accuracy	1.00	Incorrect patient date of birth. (-1.0 marks)

CLINICAL CASE 9 - Thomas FLEESHMAN (dob 02/08/1940)		
Category	Score	Comments
Genotyping	2.00	KRAS, NRAS and BRAF results correct. (-0 marks)
Interpretation	2.00	Interpretation correct. (-0 marks)
Clerical accuracy	2.00	No deductions

UK NEQAS for Molecular Genetics, Department of Laboratory Medicine,
Royal Infirmary of Edinburgh, 51 Little France Crescent, Edinburgh EH16 4SA, UK

Scheme email: info@ukneqas-molgen.org.uk

Scheme telephone: +44 (0)131 242 6898 Scheme fax: +44 (0)131 242 6882

UK NATIONAL EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT SERVICES



Accredited EQA Scheme

Reference No: 051

These EQAs are provided by NHS Lothian operating UK NEQAS for Molecular Genetics

CONFIDENTIAL - Copyright © UK NEQAS for Molecular Genetics

Authority for Issue: Farrah Khawaja	Page 1 of 2
-------------------------------------	-------------

Document No.	UKNEQAS-F-082	Version No.	1.0
		Review date	01/10/2017

UK NEQAS

Molecular Genetics

UK NEQAS [Edinburgh]

www.ukneqas-molgen.org.uk

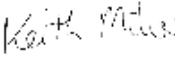
Director: Dr Sandi Deans

MEAN OVERALL SCORES	
Category	Score
Genotyping	2.00
Interpretation	1.75
Clerical accuracy	1.75
General Comments	

CONFIDENTIAL - Copyright © UK NEQAS for Molecular Genetics

Authority for Issue: Farrah Khawaja	Page 2 of 2
-------------------------------------	-------------

ANEXO D

UK NEQAS Immunocytochemistry & In-Situ Hybridisation	CPA Accredited EQA Scheme No: 044
Certificate of Participation	
This is to certify that	
Patologia, Ingoh, Setor Sul, 74093-300, Brazil	
Has participated in UK NEQAS ICC & ISH during the period April 2014 to March 2015 for the following Module/s:	
Breast HER2 ICC	
This certificate is not an indication of the overall performance of the participating laboratory, and as such is not an endorsement of the quality of staining produced	
 Mr Keith Miller (Director)	 Dr Merdol Ibrahim (Manager)
	

[illegible]