

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

BRUNO MENDONÇA PROTÁSIO DA SILVA

Impacto prognóstico da localização do tumor primário no câncer colorretal ressecado estágio III e sua associação com o *status* das enzimas de reparo de DNA e mutações K-RAS, N-RAS e BRAF

**São Paulo
2023**

BRUNO MENDONÇA PROTÁSIO DA SILVA

Impacto prognóstico da localização do tumor primário no câncer colorretal ressecado estágio III e sua associação com o *status* das enzimas de reparo de DNA e mutações K-RAS, N-RAS e BRAF

Versão Corrigida

(Resolução CoPGr 6018/11 de 01 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Bruno Mendonça Protásio da
Impacto prognóstico da localização do tumor
primário no câncer colorretal ressecado estágio III
e sua associação com o status das enzimas de reparo
de DNA e mutações K-RAS, N-RAS e BRAF / Bruno
Mendonça Protásio da Silva. -- São Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientador: Roger Chammas.

Descritores: 1.Neoplasias colorretais 2.Colo
ascendente 3.Colo descendente 4.Biomarcadores
tumoriais 5.Instabilidade de microssatélites 6.Imuno-
histoquímica 7.Resultado do tratamento

USP/FM/DBD-173/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

**Dedico este trabalho a Deus e a toda minha querida família,
especialmente a minha saudosa avó Didiça (*in memoriam*),
meus pais, irmãos, minha esposa e minha filhinha Bruna.
Vocês são as minhas maiores referências!**

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes, funcionários, colaboradores e assistentes do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) pela contribuição direta ou indireta para realização deste projeto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roger Chammas, pelo exemplo de disponibilidade, generosidade e excelência profissional.

Ao Dr. Jorge Sabbaga pela co-orientação, além de servir como espelho de simplicidade e conhecimento técnico-científico.

Aos colegas e amigos oncologistas Dr. Daniel Saragiotto e Dr. Thiago Biachi pelas contribuições com sugestões e críticas para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos colegas do Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO) do ICESP, Dr. Renato Natalino e Dra. Flavia R. Mangone pela paciência e colaboração nas análises de imuno-histoquímica e biologia molecular, respectivamente.

Aos colegas e amigos contemporâneos da residência de oncologia clínica do ICESP pela amizade, convívio e experiências que levaremos por toda a vida.

RESUMO

Silva BMP. *Impacto prognóstico da localização do tumor primário no câncer colorretal ressecado estágio III e sua associação com o status das enzimas de reparo de DNA e mutações K-RAS, N-RAS e BRAF* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Introdução: Lateralidade do tumor primário (LTP) tem se mostrado um fator prognóstico independente para pacientes com câncer colorretal (CCR) metastático, com pior prognóstico para pacientes com tumores do lado direito. **Objetivos:** O principal objetivo deste estudo foi analisar o impacto prognóstico da LTP em pacientes com CCR estágio III. **Métodos:** Foi realizado um estudo de coorte retrospectivo e uni-institucional em um centro de referência em São Paulo-SP, Brasil. Foram incluídos todos os pacientes consecutivos com CCR estágio III ressecados e tratados com regime de quimioterapia adjuvante baseado em 5-fluorouracil e oxaliplatina (regime mFLOX) de outubro de 2007 até fevereiro de 2013. O desfecho primário foi a probabilidade de sobrevida global (SG) em 5 anos estratificada segundo a LTP. Os desfechos secundários foram probabilidade de sobrevida livre de recidiva (SLR) em 5 anos estratificada pela LTP, além da análise do papel prognóstico dos biomarcadores clínicos e moleculares. Foram criadas curvas de Kaplan Meier e fatores prognósticos associados a SG e SLR foram avaliados por modelos Cox. **Resultados:** Foram incluídos 265 pacientes. Tumores do cólon transverso, multicêntricos e de primário indeterminado foram posteriormente excluídos, totalizando 234 pacientes que foram classificados segundo a LTP: 95 do lado direito (40,6%) e 139 do esquerdo (59,4%). Idade mediana foi de 58 e 59 anos para tumores do lado direito e esquerdo, respectivamente. Para ambos os grupos, cerca de 67% tinham estadiamento IIIB. O tempo de seguimento mediano foi de 66 meses (amplitude: 0-149). As probabilidades de SG em 5 anos para os tumores do lado direito e do lado esquerdo foram de 67% [Intervalo de Confiança de 95% (IC 95%): 58%- 77%] e 82% (IC 95%: 75%- 89%), respectivamente [*Hazard Ratio* (HR)=2,02; IC 95%: 1,18 – 3,46; p=0,010]. As probabilidades de SLR em 5 anos para tumores do lado direito e do lado esquerdo foram de 58% (IC 95%: 49%- 69%) e 65% (IC 95%: 58%- 74%), respectivamente. (HR= 1,29; IC 95%: 0,84 – 1,97; p=0,248). Dentre os 234 pacientes, 61 pacientes (26%) tiveram as amostras teciduais disponíveis para realização do sequenciamento de DNA por NGS e análises de imuno-histoquímica. Destes, quatro pacientes foram excluídos do sequenciamento de DNA devido a baixa qualidade das amostras teciduais. Ao todo, 36 pacientes (63,2%) tiveram mutação RAS, 2 pacientes (3,5%) apresentaram a mutação de BRAF (V600E) e 6 pacientes (9,8%) apresentaram deficiência de enzimas de reparo de DNA (dMMR). Não foi identificada nenhuma diferença estatisticamente significativa na probabilidade de SG e na probabilidade de SLR em 5 anos quando os pacientes com tumores do lado direito e do lado esquerdo foram estratificados pelos status das mutações RAS e status MMR. Dentre os pacientes com tumores do lado direito, a presença de idade >70 anos (HR=4,11; IC 95%: 1,67- 10,1; p=0,002), pN2 (HR=2,52; IC 95%: 1,23- 5,17; p=0,012) e estágio III de alto risco segundo consórcio IDEA (HR=2,95; IC 95%: 1,35- 6,44; p=0,002) foram preditores de pior SG em 5 anos. Já dentre pacientes com tumores do lado esquerdo, a presença de histologia pouco diferenciada (HR=3,93; IC 95%: 1,44-

10,7; $p=0,007$) e invasão angiolinfática ($HR=5,23$; IC 95%: 1,54- 17,8; $p=0,008$) foram preditores de pior SG em 5 anos. **Conclusões:** Dados apontam para um pior prognóstico (SG inferior em 5 anos) para pacientes com CCR estágio III ressecados do lado direito.

Descritores: Neoplasias colorretais; Colo ascendente; Colo descendente; Biomarcadores tumorais; Instabilidade de microssatélites; Imuno-histoquímica; Resultado do tratamento.

ABSTRACT

Silva BMP. *Prognostic impact of primary tumor sidedness in resected stage III colorectal cancer and its association with DNA mismatch repair status and K-RAS, N-RAS and BRAF mutations* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Background: Primary tumor sidedness (PTS) has been shown to be an independent prognostic factor for patients with metastatic colorectal cancer (CRC), with worse prognosis for right-sided tumors. **Objective:** The main objective of this study was to analyze the prognostic impact of PTS in stage III CRC. **Methods:** A retrospective and uni-institutional cohort study was performed in a reference center in São Paulo-SP, Brazil. All consecutive patients with resected stage III CRC and treated with a 5-fluorouracil and oxaliplatin-based chemotherapy regimen (mFLOX regimen) from October 2007 to February 2013 were included. The primary outcome was probability of overall survival (OS) at 5 years stratified by PTS. Secondary outcomes were probability of disease-free survival (DFS) at 5 years stratified by PTS, and analysis of the prognostic impact of clinical and molecular biomarkers. The time-to-event variables were reported by the Kaplan Meier estimation method and prognostic factors associated with OS and DFS were assessed by Cox models. **Results:** 265 patients were included. Transverse colon tumors, multicentric tumors and undetermined primary subsite were later excluded, totaling 234 patients who were classified according to PTS: 95 on the right side (40.6%) and 139 on the left side (59.4%). Median age was 58 and 59 years for right- and left-sided tumors, respectively. For both groups, approximately 67% had stage IIIB. The median follow-up time was 66 months (range: 0-149). The 5-year OS probabilities for right-sided and left-sided tumors were 67% [95% Confidence Interval (95% CI): 58%-77%] and 82% (75%-89%), respectively [Hazard ratio (HR)=2.02; 95% CI: 1.18–3.46; p=0.010]. The 5-year probability of DFS for right-sided and left-sided tumors were 58% (49%-69%) and 65% (58%-74%), respectively (HR=1.29; 0.84-1.97; p=0.248). Of the 234 patients, 61 patients (26%) had tissue samples available for DNA sequencing by NGS and immunohistochemical analysis. Of these, four patients were excluded from DNA sequencing due to poor quality of the tissue samples. Overall, thirty-six patients (63.2%) had RAS mutation, two patients (3.5%) had BRAF mutation (V600E) and six patients (9.8%) had DNA mismatch repair deficiency (dMMR). No statistically significant difference was identified in the probability of OS and DFS at 5 years when comparing patients with right-sided and left-sided tumors when stratified by RAS mutation status and MMR status. Among patients with right-sided tumors, age >70 years (HR=4.11; 95% CI: 1.67-10.1; p=0.002), pN2 (HR=2.52; 95% CI: 1.23-5.17; p=0.012) and high-risk stage III according to the IDEA consortium (HR=2.95; 95% CI: 1.35-6.44; p=0.002) were predictors of worse OS at 5 years. Among patients with left-sided tumors, poorly differentiated histology (HR=3.93; 95% CI: 1.44-10.7; p=0.007)

and angiolymphatic invasion (HR=5.23; 95% CI: 1.54-17.8; p=0.008) were predictors of worse OS in 5 years. **Conclusions:** Data indicate a worse prognosis (inferior OS at 5 years) for resected right-sided stage III CRC.

Descriptors: Colorectal neoplasms; Ascending colon; Descending colon; Tumor biomarkers; Microsatellite instability; Immunohistochemistry; Treatment result.

LISTAS

FIGURAS

Figura 1 -	Fluxo dos pacientes	38
Figura 2 -	Curva de Kaplan–Meier de estimativa de sobrevida global estratificada pela lateralidade	43
Figura 3 -	Curva de Kaplan–Meier de estimativa de sobrevida livre de recidiva estratificada pela lateralidade	44

TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas e demográficas estratificadas pela lateralidade.....	39
Tabela 2 - Status das enzimas de reparo de DNA e das mutações K-RAS, N-RAS e BRAF estratificados pela lateralidade.....	40
Tabela 3 - Sobrevida global e sobrevida livre de recidiva estratificados pela lateralidade.....	43
Tabela 4 - Regressão logística para predição de sobrevida global e sobrevida livre de recidiva- Subsítio do tumor primário, <i>status</i> MMR e <i>status</i> RAS	45
Tabela 5 - Regressão logística para predição de sobrevida global e sobrevida livre de recidiva- Tumores do lado direito- características clínicas e biomarcadores moleculares	46
Tabela 6 - Regressão logística para predição de sobrevida global e sobrevida livre de recidiva- Tumores do lado esquerdo- características clínicas e biomarcadores moleculares.....	48
Tabela 7 - Eventos adversos clínicos e hematológicos \geq G3 estratificados pela lateralidade.....	49

SÍMBOLOS

%	por cento
=	igual
+	mais
>	maior
≥	maior ou igual
<	menor
±	mais ou menos (com ou sem)
mg/m²	miligramas por metro quadrado

SIGLAS E ABREVIATURAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
BRAF v	<i>Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
C1	primeiro ciclo de quimioterapia
CALGB/SWOG	<i>Cancer and Leukemia Group B/Southwest Oncology Group</i>
CAP	Colégio Americano de Patologia
CCR	Câncer colorretal
CEA	<i>Carcinoembryonic Antigen</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CI 95%	<i>Confidence interval 95%</i>
CMS	<i>Consensus Molecular Subtype</i>
CTCAE	<i>Common Terminology Criteria for Adverse Events</i>
CTO	Centro de Investigação Translacional em Oncologia do ICESP
D1	Primeiro dia da quimioterapia adjuvante
dMMR	<i>Deficient Mismatch Repair</i> (deficiência nas proteínas reparadoras do DNA)
ECOG-PS	<i>Eastern Cooperative Oncology Group Scale of Performance Status</i>
EV	Endovenoso
FFPE	<i>Formalin-fixed paraffin-embedded</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FU	5-fluoruracil
G3	grau 3 (escala de toxicidade)
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HR	<i>Hazard Ratio</i> (razão de risco)
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IDEA	<i>The International Duration Evaluation of Adjuvant Chemotherapy</i>
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
K-RAS v	<i>Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LTP	Lateralidade do tumor primário
LV	<i>Leucovorin</i>

MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
mFLOX	FLOX modificado
MMR	<i>Mismatch Repair</i> (enzimas reparadoras do DNA)
MOSAIC	<i>Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer</i> . Ensaio clínico randomizado de fase 3 que comparou a adição de oxaliplatina ao regime com 5-FU e leucovorin no câncer colorretal estágio III.
MSI	<i>Microsatellite Instability</i> (instabilidade de microssatélites)
MSI-H	<i>Microsatellite Instability-high</i> (alta instabilidade de microssatélites)
MSI-L	<i>Microsatellite Instability-low</i> (baixa instabilidade de microssatélites)
MSS	<i>Microsatellite Stable</i> (estabilidade de microssatélites)
N	Número de pacientes
NCCTG	<i>the North Central Cancer Treatment Group</i>
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
NO16968	Ensaio clínico randomizado de fase 3 que comparou a adição de oxaliplatina ao regime com capecitabina no câncer colorretal estágio III.
N-RAS	<i>Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>
NS	Não significativo estatisticamente
NSABP C07	<i>National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project</i> . Ensaio clínico randomizado de fase 3 que comparou a adição de oxaliplatina ao regime com 5-FU e leucovorin no câncer colorretal estágio III.
PETACC	<i>The Pan-European Trials in Alimentary traCt Cancer</i>
pMMR	<i>Proficient Mismatch Repair</i> (proficiência nas proteínas reparadoras do DNA)
QT	Quimioterapia
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology End Results Reports</i>
SG	Sobrevida global
SGM	Sobrevida global mediana
SLR	Sobrevida livre de recidiva
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNM	<i>Tumor, nodes, metastasis</i>
USP	Universidade de São Paulo
Vs	Versus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Epidemiologia do câncer colorretal (CCR).....	17
1.2 Tratamento padrão para CCR estágio III ressecado.....	17
1.3 Aspectos moleculares do CCR.....	19
1.3.1 Via de sinalização RAS e RAF	19
1.3.2 Deficiência nas enzimas de reparo de DNA/ Instabilidade de microsatélites	20
1.4 Variáveis prognósticas além do TNM.....	22
1.4.1 Lateralidade.....	22
1.4.2 Biomarcadores moleculares no CCR	23
1.4.3 Relação lateralidade Vs fatores genéticos, epigenéticos e ambientais.....	24
1.5 Racional do estudo	26
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo primário	28
2.2 Objetivos secundários	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Desenho do estudo	30
3.2 População elegível	30
3.3 Critérios de inclusão.....	30
3.4 Critérios de exclusão	31
3.5 Variáveis do estudo	31
3.5.1 Lateralidade do tumor primário	31
3.5.2 Variáveis clínico-patológicas e moleculares.....	31
3.5.2.1 <i>Status</i> das mutações K-RAS, N-RAS e BRAF.....	31
3.5.2.2 <i>Status</i> das enzimas de reparo de DNA	32
3.5.2.3 Características clínicas e laboratoriais dos pacientes	33
3.5.2.4 Características relativas ao procedimento cirúrgico.....	33
3.5.2.5 Características relativas ao produto da peça cirúrgica	33
3.5.2.6 Características relativas ao tratamento complementar quimioterápico.....	34
3.6 Seguimento.....	34

3.7 Tamanho da amostra	35
3.8 Plano de análise	35
3.8.1 Desfecho primário.....	35
3.8.2 Desfechos secundários	35
3.8.3 Considerações estatísticas	36
3.9 Aspectos éticos.....	36
3.10 Custos.....	36
4. RESULTADOS	37
4.1 População	38
4.2 Sobrevida global (SG): desfecho primário.....	42
4.3 Sobrevida livre de recidiva (SLR).....	44
4.4 Preditores clínico-patológicos e moleculares de pior SG e SLR	45
4.5 Toxicidades \geq Grau 3 (G3)	49
5 DISCUSSÃO	51
5.1 Discussão dos resultados.....	52
5.2 Vantagens e limitações do presente estudo.....	56
6 CONCLUSÕES	58
7 ANEXOS	60
7.1 Anexo 1- Parecer consubstanciado do CEP da FMUSP	61
7.2 Anexo 2- Ciência do serviço de oncologia clínica do ICESP- HC-FMUSP	64
7.3 Anexo 3- Ciência do serviço de patologia do ICESP- HC-FMUSP	65
7.4 Anexo 4- Estudo apresentado em parte sob a forma de <i>Abstract</i> eletrônico no Congresso Anual da Sociedade Americana de Oncologia Clínica em 2023.....	66
8 REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER COLORRETAL (CCR)

O CCR representa no Brasil e no mundo um importante problema de saúde pública. Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) projetados para o ano de 2023 estimam mais de 45 mil casos novos de CCR em ambos os sexos. Isso representará o segundo lugar em incidência entre homens e mulheres, excetuando-se os cânceres de pele não melanoma ⁽¹⁾.

Segundo dados de incidência e de mortalidade projetados pelos bancos de dados americanos *The North American Association of Central Cancer Registries* (NAACCR) e *National Center for Health Statistics* (NCHS), estima-se para o ano de 2023 o surgimento nos EUA de mais de 153 mil casos novos de CCR em ambos os sexos no mundo com aproximadamente 52 mil óbitos. Isso representará cerca de 106 mil casos novos de câncer de cólon e 46 mil casos novos de câncer de reto em ambos os sexos, deixando o CCR no terceiro lugar dentre os dez cânceres mais incidentes [excetuando-se os tumores de pele não melanoma e os carcinomas *in situ* (com a exceção dos carcinomas *in situ* uroteliais de bexiga)] ⁽²⁾.

1.2 TRATAMENTO PADRÃO PARA CCR ESTÁGIO III RESSECADO

Sabe-se que o tratamento padrão, com intenção curativa, para o câncer de cólon localizado passa, invariavelmente, pela ressecção primária da lesão. O tratamento complementar, porém, baseado em terapia sistêmica com quimioterapia é dependente do estadiamento anátomo-patológico.

O estadiamento anátomo-patológico, por sua vez, é definido através da classificação TNM (do inglês *Tumor, Nodes, Metastasis*) proposta pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). Esta classificação TNM é atualizada periodicamente e a sua última atualização (oitava edição) ocorreu em 2017. De acordo com esta última atualização, são considerados pacientes com CCR estágio III aqueles portadores de qualquer estadiamento patológico “T” (ou seja: portadores de pT1-4), e que também

apresentem linfonodos patológicos positivos (ou seja: pN1 ou pN2) e não apresentem evidência clínica de doença metastática (ou seja: M0) ⁽³⁾.

Para pacientes com indicação de receber quimioterapia adjuvante baseada em fluoropirimidinas (5-fluorouracil ou capecitabina), há benefício clínico da adição de oxaliplatina por 6 meses documentado para o estágio III, baseado nos resultados dos estudos de fase 3 MOSAIC (*Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer*), NSABP-C07 (*National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*) e NO16968 ⁽⁴⁻⁸⁾. Posteriormente, ocorreu uma mudança opcional no tempo total de quimioterapia adjuvante após a publicação dos dados do consórcio IDEA (*the International Duration Evaluation of Adjuvant Therapy*), que compilou dados de 6 estudos randomizados de fase 3 concomitantes dedicados a avaliar o tempo total de quimioterapia adjuvante no CCR estágio III. Nesse estudo, os autores propuseram uma nova classificação clínico-patológica do estágio III que pode influenciar na decisão do tempo total da quimioterapia adjuvante a ser administrada. Os pacientes do consórcio IDEA foram classificados como estágio III de baixo risco quando apresentavam estadiamento patológico pT1-T3pN1 e estágio III de alto risco quando apresentavam estadiamento patológico pT4 ou pN2. Ao final do estudo, ficou demonstrada a não inferioridade do tempo de quimioterapia por 3 meses (Vs 6 meses) para pacientes com estágio III de baixo risco e tratados com o regime CAPOX (capecitabina e oxaliplatina). Além disso, dados demonstraram que os pacientes tratados por 3 meses tiveram uma redução na incidência de eventos adversos associados a quimioterapia, em especial da neuropatia periférica ^(9,10).

Entretanto, mesmo com o uso do melhor regime de tratamento quimioterápico adjuvante sabe-se que cerca de 25-30% dos pacientes com câncer de cólon estágio III apresentarão recidiva da doença ao final de 5 anos, levando os pacientes a óbito na maioria dos casos ⁽⁴⁻⁸⁾.

1.3 ASPECTOS MOLECULARES DO CCR

1.3.1 Via de sinalização RAS e RAF

O câncer, do ponto de vista biológico, pode ser causado por alterações nos oncogenes, por alterações nos genes supressores de tumor e por alterações nos genes de reparo de DNA. Geralmente estas alterações ocorrem nas células somáticas, embora mutações germinativas também possam ocorrer. Oncogenes são genes que codificam moléculas responsáveis pelo controle da proliferação celular, pelo controle da apoptose ou de ambas.

Os oncogenes da família RAS (K-RAS, N-RAS e H-RAS) são exemplos de oncogenes que codificam proteínas com atividade de ligação ao nucleotídeo guanosina e atividade intrínseca guanosina trifosfatase. Quando expostos a carcinógenos ambientais, os oncogenes RAS podem sofrer mutações, geralmente acometendo os códons 12, 13 ou 61. Isso leva a codificação de proteínas que permanecem no estado ativado continuamente traduzindo sinais ligados a proteínas tirosino quinases pertencentes a via de sinalização intracelular. A consequência desse estímulo continuado é a indução de crescimento celular contínuo, predispondo ao câncer. Isso é particularmente comum nos carcinomas de pulmão e colorretais ⁽¹¹⁾.

Mutações pontuais do gene BRAF, por sua vez, ocorrem mais comumente nos melanomas e nos carcinomas colorretais. A alteração mais comum ocorre no domínio quinase da proteína BRAF e leva a um estado constitutivamente ativado desta proteína, gerando um estímulo descontrolado na via da cascata das proteínas quinases ativadas por mitógenos (do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases* ou MAPK). A consequência desse estímulo desordenado resulta em desregulação de proteínas envolvidas na proliferação celular, diferenciação e sobrevivência ⁽¹¹⁾. Embora existam mais de 40 mutações diferentes descritas no gene BRAF, em cerca de 90% dos tumores que apresentam mutação nesse gene essa mutação é a V600E. Essa mutação é produto de uma substituição de uma adenina por uma timina na posição 1.799 localizada no éxon 15. A resultante desta mutação é a alteração no resíduo 600 que substitui a glutamina por valina (V600E) ⁽¹²⁾. Além disso, é descrito que a mutação de BRAF é bastante associada ao fenótipo de metilação das ilhas CpG (do inglês *CpG island methylation phenotype* ou CIMP), que por sua vez é caracterizado por metilação do gene MLH1 e

associação a instabilidade de microssatélites (do inglês *Microsatellite Instability* ou MSI)⁽¹²⁾.

1.3.2 Deficiência nas enzimas de reparo de DNA/ Instabilidade de microssatélites

Microssatélites são trechos de sequência de DNA onde existem repetições de nucleotídeos no genoma. Normalmente ocorre a repetição de um único nucleotídeo (mononucleotídeos) ou a repetição de dois ou mais nucleotídeos^(13,14). Em condições normais, é esperado que o número de repetições contidas em qualquer microssatélite seja o mesmo em todas as células do corpo. Chamamos de instabilidade de microssatélites (MSI) quando algumas células exibem um ou dois alelos com diferentes números de repetições. Para que isso seja detectável (ou seja, presente em células suficientes para serem identificadas pelos métodos de detecção usuais), as células aberrantes devem ser clonais. Assim, a presença de MSI é tipicamente vista em tumores que são quase sempre monoclonais ou oligoclonais⁽¹⁴⁾.

A forma clássica utilizada para detecção de MSI é através de teste de biologia molecular pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR). Após um consenso realizado na cidade norte americana de Bethesda- Maryland, padronizou-se o uso de um painel molecular contendo cinco marcadores: dois contendo repetições de mononucleotídeos (BAT26 e BAT25) e três contendo repetições de dinucleotídeos (D2S123, D5S346 e D17S250). Foi proposto que pacientes que tivessem pelo menos 2 dos 5 marcadores positivos (isto é pelo menos 40% dos marcadores testados positivos em um painel de 5 marcadores) seriam chamados de portadores de MSI-H (do inglês *Microsatellite Instability-high*). Pacientes com apenas 1 marcador positivo (isto é, com menos de 40% dos marcadores testados) seriam chamados de MSI-L (do inglês *Microsatellite Instability-low*) e pacientes com todos os cinco marcadores negativos seriam chamados de MSS (do inglês *Microsatellite Stable*). Estudos posteriores tem colocado em dúvida a relevância clínica de se realizar a diferenciação entre o MSI-L e o MSS⁽¹⁴⁾.

Estudos prévios identificaram ainda que a presença de MSI está associada a defeitos no sistema de reparo de incompatibilidade no pareamento de bases de DNA (do inglês *defective DNA-mismatch repair- dMMR*). Incompatibilidades de nucleotídeos podem ocorrer de forma natural durante a fase de replicação entre duas fitas de DNA.

Entretanto, eventuais erros de pareamento dos nucleotídeos normalmente são prontamente corrigidos por um mecanismo de revisão molecular fisiológico. Estudos em pacientes portadores de tumores colorretais hereditários não associados a polipose (HNPCC ou síndrome de Lynch) revelaram a presença de mutações nos genes MSH2 e MLH1, que são responsáveis por codificar proteínas que participam do sistema de reparo de pareamento de DNA. Posteriormente, notou-se que defeitos no sistema de reparo de DNA são causados por falhas em pelo menos um de quatro seguintes genes: MSH2, MLH1, MSH6 e PMS2.

Sabe-se ainda que existem 2 tipos de falhas no sistema de reparo de pareamento de DNA: a) falha causada por uma mutação germinativa em um alelo, seguida pela inativação somática do alelo selvagem nas células da mucosa colônica. Estes indivíduos desenvolvem a síndrome de câncer colorretal hereditário não associada a polipose (HNPCC) ou síndrome de Lynch; e b) falha causada por inativação somática de ambos os alelos. Estes indivíduos respondem por cerca de 10-15% de todos os CCR. Frequentemente estes casos decorrem de uma alteração epigenética provocada pela metilação bialélica de sequências do promotor do gene MLH1, gerando o silenciamento do gene MLH1^(13,14). Consequentemente, os defeitos no sistema de reparo de DNA presumivelmente facilitam a carcinogênese por permitirem o acúmulo rápido de mutações que inativam genes que normalmente têm funções vitais na célula. Além disso, também é conhecido que pacientes portadores de mutações nos genes de reparo de DNA que predisõem ao CCR hereditário também estão sob maior risco de desenvolverem outros cânceres, tais como os cânceres de endométrio, ovário e próstata⁽¹³⁾.

O perfil mais característico de pacientes com dMMR inclui aqueles com a presença do tumor primário colorretal do lado direito, histologia pouco diferenciada e componente mucinoso. Além disso, a presença de dMMR costuma conferir melhor prognóstico após ajuste por estadiamento⁽¹³⁾. Por fim, a presença de dMMR pode ser detectada tanto através de testes de biologia molecular (PCR para pesquisa de MSI, conforme descrito acima) quanto por testes de imuno-histoquímica (IHQ), através da perda de coloração nuclear nas células neoplásicas de pelo menos uma das quatro proteínas de reparo de DNA: MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2⁽¹⁴⁾.

Importante destacar que a classificação baseada no padrão de coloração nuclear pela IHQ pode estar sujeita a falhas. Em 2019 Dasgupta S et al descreveram uma “armadilha” na classificação de alguns pacientes com CCR que foram inicialmente classificados como portadores de deficiência de expressão isolada de PMS2 na IHQ. Posteriormente se identificou que casos apresentavam a presença de coloração nuclear granular (do inglês *granular dot-like*) do MLH1 através da coloração pelo clone M1. Após repetição do teste de IHQ com um diferente clone (clone ES05) se verificou que os casos na verdade também eram MLH1 negativos e apresentavam metilação do promotor do gene MLH1 por testagem molecular. Autores concluíram que o padrão nuclear granular inicialmente apresentado pelo MLH1 representava um artefato associado ao clone usado (clone M1) na testagem inicial ⁽¹⁵⁾.

Um estudo no cenário do CCR demonstrou que o uso da testagem por IHQ (quando comparada com o PCR para MSI) se mostrou um método sensível (92,3%), específico (100%) e custo efetivo para *screening* de dMMR ⁽¹⁶⁾.

1.4 VARIÁVEIS PROGNÓSTICAS ALÉM DO TNM

Estudos recentes sugerem que outras variáveis clinico-patológicas e moleculares podem acrescentar informações prognósticas independentes do estadiamento TNM (AJCC) nos pacientes com CCR.

1.4.1 Lateralidade

Ao longo de décadas, sabe-se que os segmentos proximal e distal do intestino grosso apresentam origens embriológicas distintas, ocorrendo a transição entre eles ao nível do cólon transversal. Ao passo que os tumores do ceco, cólon ascendente e 2/3 proximais do cólon transversal são originados a partir do *midgut*, os tumores localizados do 1/3 distal do cólon transversal até o reto são formados a partir do *hindgut* ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

Baseados nos dados do estudo CALGB/SWOG (*Cancer and Leukemia Group B/Southwest Oncology Group*) 80405, a lateralidade do tumor primário (lado direito vs lado esquerdo) ganhou destaque como fator prognóstico independente para pacientes com CCR metastático. Neste estudo, os pacientes com CCR situados do ceco até a flexura hepática foram classificados como tumores do lado direito ao passo que os

pacientes com tumores localizados a partir da flexura esplênica até o reto foram classificados como tumores do lado esquerdo. Foram, portanto, excluídos dessa análise os pacientes com tumores do cólon transversal^(20,21).

O papel prognóstico da lateralidade para pacientes com CCR localizados, entretanto, tem sido motivo de investigação mais recentemente. Um estudo de base populacional baseado no banco de dados americano SEER (*The Surveillance Epidemiology and Results Program*) incluiu 16.755 pacientes com CCR estadio clínico (EC) IV e 25.887 pacientes com EC III. Neste estudo, ter um tumor do lado direito, quando comparado com o tumor do lado esquerdo, foi relacionado a uma pior sobrevida em 3 anos tanto para tumores metastáticos [*Hazard ratio* (HR): 1,20; Intervalo de confiança de 95% (IC 95%): 1,15-1,25], quanto para tumores EC III (HR: 1,17; IC 95%: 1,17-1,23)⁽²²⁾.

1.4.2 Biomarcadores moleculares no CCR

Dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) publicados em 2012 a partir da análise de 276 amostras somáticas de 224 pacientes com CCR colaboraram para melhor caracterização do perfil molecular dos CCR. Pesquisadores demonstraram neste estudo a presença de 2 grupos distintos dos tumores colorretais do ponto de vista molecular⁽²³⁾:

- a) Subgrupo dos CCR não-hipermutados, representando 84% do total. Nesse subgrupo se destacaram como genes mais comumente mutados: APC (81% mutados), TP53 (60% mutados), K-RAS (43% mutados), PIK3CA (18% mutados), FBXW7 (11% mutados), SMAD4 (10% mutados), TCF7L2 (9% mutados) e N-RAS (9% mutados). Para os genes K-RAS e N-RAS os códons mais frequentemente mutados neste estudo foram os códons 12, 13 e 61⁽²³⁾.
- b) Subgrupo dos CCR hipermutados (definido como aqueles com >12 por 10^6 bases), representando 16% do total. Nesse subgrupo, destacaram-se como genes mais comumente mutados: ACVR2A (63% mutados), APC (51% mutados), TGFBR2 (51% mutados), BRAF (46% mutados, principalmente a mutação V600E), MSH3 (40% mutados), MSH6 (40% mutados) e TCF7L2 (31% mutados). Além disso, no subgrupo CCR hipermutados em N=23/30 tumores (77%) se identificou a presença de MSI-H. Dentre esses pacientes com MSI-H, em 75% casos foi identificada uma

hipermetilação silenciadora do gene MLH1 (alteração epigenética) e nos 25% restantes foram encontradas mutações somáticas nos genes de reparo do DNA ⁽²³⁾.

O papel prognóstico das mutações K-RAS, N-RAS, BRAF e dMMR/MSI-H no CCR localizado foi estudado a partir da análise *post hoc* combinada de dois estudos de fase 3: *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project* (NSABP)- C07 e NSABP-C08. Nesse estudo, que incluiu a análise de mais de 2 mil pacientes com CCR estadios II e III, autores identificaram pior prognóstico em sobrevida global (SG) para mutação BRAF (HR: 1,46; IC 95%: 1,20-1,79; $p \leq 0,0002$) e melhor prognóstico para dMMR/MSI-H (HR para SG: 0,64; IC 95%: 0,46- 0,89; $p=0,0084$). Nesse estudo, não foi demonstrado impacto prognóstico da presença de mutações em K-RAS e N-RAS ⁽²⁴⁾.

1.4.3 Relação lateralidade Vs fatores genéticos, epigenéticos e ambientais

Sabe-se que fatores genéticos, epigenéticos e ambientais não se distribuem de maneira uniforme ao longo do intestino grosso, apresentando diferenças significativas quando analisadas de forma estratificada pela lateralidade. ⁽²⁵⁾.

Dentre os diversos fatores epigenéticos implicados na carcinogênese do CCR destaca-se a metilação aberrante de DNA ⁽²⁶⁾. Yamauchi M et al em 2012 analisaram dados de 1443 pacientes com diagnóstico de CCR a partir de duas coortes prospectivas. Autores estudaram a distribuição do fenótipo de metilação das ilhas CpG (CIMP) através de método de PCR em oito promotores: CACNA1G, CDKN2A (p16), CRABP1, IGF2, MLH1, NEUROG1, RUNX3 e SOCS1. Foi classificado como CIMP-alto (do inglês *CIMP-high*) quando identificada a presença de pelo menos 6 dos 8 promotores metilados. Autores demonstraram uma proporção maior de pacientes com fenótipo *CIMP-high* para pacientes com CCR com subsítios primários localizados do lado direito do intestino, quando comparados com os tumores do lado esquerdo ⁽²⁷⁾. Em 2021, Devall et al analisaram o perfil de metilação do DNA de 128 indivíduos saudáveis e identificaram disparidades quanto a raça e lateralidade do segmento do intestino. Autores identificaram que no subgrupo de pacientes afro-americanos as biópsias extraídas do cólon direito apresentaram um envelhecimento epigenético mais acelerado quando comparadas com as biópsias do cólon esquerdo correspondente ($p=0,001$) ⁽²⁶⁾.

Dentre os fatores ambientais a microbiota intestinal tem ganhado cada vez mais importância pelo seu papel implicado na carcinogênese do CCR⁽²⁸⁻³¹⁾. Microbiota é o nome dado ao conjunto de todos os micro-organismos que habitam um determinado local do corpo, incluindo os patógenos⁽²⁹⁾. Sabe-se que estes micro-organismos interagem de forma próxima com as células intestinais e podem interferir com o metabolismo e a resposta imune do hospedeiro⁽²⁸⁻³¹⁾. A microbiota intestinal é composta por uma grande população de micro-organismos tendo destaque as bactérias, tais como: *Fusobacterium nucleatum*, *Escherichia coli* e *Bacteroides fragilis*, dentre outras⁽²⁸⁻³¹⁾. Estudos clínicos têm demonstrado uma diferença na proporção dos micro-organismos presentes no intestino de pacientes saudáveis quando comparados com o intestino de pacientes com CCR^(28,32). Estudos apontam que a microbiota associada ao CCR apresenta uma menor proporção de táxons potencialmente protetores (Ex.: *Roseburia*) e um aumento na proporção de táxons procarcinogênicos (Ex.: *Bacteroides*, *Escherichia*, *Fusobacterium* e *Porphyromonas*)⁽²⁸⁾. Além disso, também são descritas diferenças na microbiota quanto a lateralidade do tumor primário colorretal. Em 2015 Gao Z et al demonstraram que nos indivíduos portadores de CCR do lado direito foi identificada uma maior proporção de *Prevotella*, *Pyramido-bacterium*, *Selenomonas* e *Peptostreptococcus* ao passo que nos portadores de CCR do lado esquerdo foi demonstrada uma maior prevalência de *Fusobacterium*, *Escherichia-Shigella* e *Leptotrichia*⁽³²⁾.

Do ponto de vista genético, estudos prévios também descreveram uma distribuição variável das mutações RAS, BRAF e dMMR/MSI-H ao longo dos subsítios primários do intestino grosso, gerando aumento na proporção de pacientes com dMMR/MSI-H e mutações BRAF nos subsítios primários situados do lado direito^(25,27,33). Posteriormente em 2015, Guinney J et al desenvolveram uma nova classificação molecular do CCR, listando os chamados 04 subtipos do consenso moleculares (do inglês *Consensus Molecular Subtype* ou CMS), a saber: CMS1 (imune), CMS2 (canônico), CMS2 (metabólico) e CMS4 (mesenquimal). Autores demonstraram que o subtipo molecular CMS4 foi associado a piores desfechos de sobrevida global e sobrevida livre de recidiva, enquanto o subtipo CMS1 apresentou pior sobrevida após recidiva. Embora a prevalência na amostra total do subtipo CMS1 tenha sido de 14%, houve uma maior prevalência deste subtipo dentre os tumores do

lado direito (31% Vs 7% Vs 3% para tumores do cólon direito, cólon esquerdo e reto, respectivamente) ⁽³⁴⁾. Mais recentemente, Loree JM et al analisaram a prevalência de biomarcadores moleculares e dos subtipos do consenso moleculares de 1.876 pacientes com CCR metastáticos. Neste estudo, pacientes foram estratificados pela lateralidade e pelos subsítios do tumor primário. Achados apontaram para um espectro contínuo de alterações moleculares ao longo do intestino grosso. Ao final do estudo, autores sinalizaram para o fato de que a classificação sob a forma do subsítio do tumor primário poderia fornecer mais informações prognósticas sobre a biologia dos tumores colorretais do que a estratificação apenas pela lateralidade (lado direito Vs lado esquerdo) ⁽³⁵⁾.

1.5 RACIONAL DO ESTUDO

Até o presente momento, existem poucos dados avaliando o papel prognóstico da lateralidade do tumor primário de pacientes portadores de CCR não metastático. Os dados são ainda mais escassos quando se pretende avaliar as relações entre a lateralidade do tumor primário e biomarcadores como *status* das enzimas de reparo de DNA, e mutações K-RAS, N-RAS e BRAF. Especificamente para a população brasileira, estes dados são desconhecidos.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 PRIMÁRIO

O objetivo primário deste trabalho é analisar o papel prognóstico da lateralidade do tumor primário em uma população de pacientes com CCR ressecado estadio III tratados com regime de quimioterapia adjuvante mFLOX no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). Para isso correlacionamos a taxa de sobrevida global (SG) com a lateralidade (lado direito Vs lado esquerdo).

2.2 SECUNDÁRIOS

- Correlacionar a taxa de sobrevida livre de recidiva (SLR) com a lateralidade (lado direito Vs lado esquerdo);
- Correlacionar as taxas de SG e SLR estratificadas pela lateralidade (lado direito Vs lado esquerdo) e pelo *status* das enzimas de reparo de DNA;
- Correlacionar as taxas de SG e SLR estratificadas pela lateralidade (lado direito Vs lado esquerdo) e pelo *status* das mutações K-RAS, N-RAS e BRAF.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo de coorte-retrospectiva e uni-institucional realizado a partir de dados de prontuário médico.

3.2 POPULAÇÃO ELEGÍVEL

Foram elegíveis para inclusão no presente estudo todos os pacientes consecutivos portadores de CCR EC III tratados com quimioterapia adjuvante baseada em um regime modificado de 5-fluorouracil com oxaliplatina (regime mFLOX) de Outubro de 2007 até Fevereiro de 2013. Dados preliminares destes pacientes com ênfase na eficácia e segurança do regime mFLOX resultaram na publicação da série institucional do ICESP em 2017⁽³⁶⁾. Os critérios de inclusão e de exclusão foram:

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Todos os pacientes consecutivos que preencheram os seguintes critérios:

- Portadores de idade ≥ 18 anos;
- Portadores de câncer colorretal localizado histologicamente comprovado;
- Portadores de tumores completamente ressecados com margens livres;
- Portadores de estadiamento patológico III segundo AJCC- 8ª Edição, 2017⁽³⁾;
- Pacientes que receberam quimioterapia adjuvante com pelo menos 1 aplicação completa (pelo menos o primeiro dia do primeiro ciclo- D1C1) baseada em fluorouracil com oxaliplatina no ICESP (Protocolo mFLOX: Oxaliplatina 85mg/m² EV em 2h nas semanas 1, 3 e 5; 5-Fluorouracil 500mg/m² + Leucovorin 20mg/m² EV bolus nas semanas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 conforme protocolo institucional).

3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes com tumores de reto e que receberam quimio-radioterapia.
- Pacientes com tumores do cólon transverso, multicêntricos e de primário indeterminado foram posteriormente excluídos das análises estratificadas pela lateralidade (lado direito Vs lado esquerdo).
- Pacientes cujos blocos de anatomia patológica não estavam disponíveis foram posteriormente excluídos das análises de sequenciamento de DNA e de imuno-histoquímica.

3.5 VARIÁVEIS DO ESTUDO

3.5.1 Lateralidade do tumor primário

A lateralidade do tumor primário foi definida através dos exame endoscópico (colonoscopia ou retossigmoidoscopia) e segundo classificação adotada pelo estudo CALGB/SWOG 80405; isto é: foram definidos como tumores do lado direito: aqueles compreendidos do ceco até a flexura hepática e foram chamados tumores do lado esquerdo aqueles compreendidos da flexura esplênica até o reto ⁽²¹⁾.

3.5.2 Variáveis clínico-patológicas e moleculares

3.5.2.1 *Status* das mutações K-RAS, N-RAS e BRAF

Amostras de DNA tumoral foram extraídas de espécimes de tecido obtidos a partir de biópsia do tumor, impregnadas em parafina e fixadas em formaldeído. Foi utilizada a técnica de sequenciamento de DNA de segunda geração (do inglês NGS- *Next-Generation Sequencing*) ^(37,38). As análises dos *status* das mutações *hotspot* em K-RAS, N-RAS e BRAF (V600E) foram realizadas em colaboração com o Núcleo de Sequenciamento localizado no Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO) do ICESP. As análises foram feitas para os tumores do cólon direito e para os tumores do cólon esquerdo, sendo portanto excluídas destas análises os tumores do cólon transverso, assim como os tumores multicêntricos e de primário indeterminado.

Extração de DNA de amostras FFPE: a obtenção do DNA genômico do tecido tumoral fixado em formol e embebido em parafina (FFPE) foi realizada a partir de 4

fatias de 10um de tecido contendo pelo menos 20% de células tumorais. A extração do DNA foi realizada usando *QIAamp DNA FFPE Advanced UNG Kit* (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. A análise de qualidade do DNA foi realizada por PCR em Tempo Real utilizando o kit *QIAseq DNA QuantiMIZE Assay Kit* (Qiagen), que determina a quantidade de partida de DNA para o preparo das bibliotecas de NGS com base no índice de controle de qualidade.

Sequenciamento de nova geração: o NGS foi realizado com painel customizado *QIAseq Targeted DNA Custom Panel* (Qiagen) usando um conjunto de *primers* cobrindo toda a região codificadora de K-RAS (gene ID: 3845), N-RAS (gene ID: 4893) e BRAF (gene ID: 673) e até 5 bases da região íntrônica. A síntese da biblioteca foi feita de acordo com as instruções dos fabricantes e a quantidade de partida de DNA variou de 100 a 250ng de acordo com a verificação de qualidade do DNA. O sequenciamento foi realizado em um instrumento *Illumina Miseq* usando o *miSeq Micro Kit V2* (300 ciclos). Os dados brutos foram analisados usando o *GeneGlobe Data Analysis Center* (geneglobe.qiagen.com) e os dados das variantes de K-RAS e N-RAS nos exon 2 (códon 12 e 13) e exon 3 (códon 61) e de BRAF exon 15 (códon 600) foram anotados. Casos com baixa cobertura em K-RAS (códon 12 e 13) foram reanalisados através de pirosequenciamento (*KRAS Pyro Kit, Qiagen*).

3.5.2.2- *Status* das enzimas de reparo de DNA

As análises dos *status* das enzimas de reparo de DNA (do inglês *mismatch repair*- MMR) foram realizadas de forma centralizada por um único patologista do CTO do ICESP para os tumores do lado direito e para os tumores do lado esquerdo. Foram, portanto, excluídas destas análises os tumores do cólon transversal, assim como os tumores multicêntricos e de primário indeterminado.

As análises dos *status* das enzimas de reparo de DNA foram realizadas a partir de espécimes de tecido obtidos a partir da biópsia do tumor, impregnadas em parafina e fixadas em formaldeído. A expressão das enzimas de reparo de DNA foi analisada por exame de imunohistoquímica (IHQ) através da técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais- do inglês *Tissue MicroArray* (TMA) ⁽³⁹⁾. Foram utilizados em média 3 *spots* para cada paciente, tendo cada *spot* o diâmetro de 1mm e espaçamento de 0,3mm. Foi confeccionado um painel que incluiu a expressão dos seguintes anticorpos monoclonais

murinos: anti-MLH-1 humano (clone: ES05, código: IR07961-2, fabricante: Dako, diluição: pronto para uso), anti-MSH-2 humano (Clone: FE11, código: IR08561-2, fabricante: Dako, diluição: pronto para uso), anti-MSH-6 humano (clone: EP49, código: IR08661-2, fabricante: Dako, diluição: pronto para uso) e anti-PMS-2 humano (clone: EP51, código: IR08761-2, fabricante: Dako, diluição: pronto para uso).

Os pacientes foram classificados como deficientes (dMMR) quando identificado ausência de coloração nuclear nas células neoplásicas com a presença de coloração nuclear nos linfócitos e células normais no epitélio colônico adjacente em pelo menos um dos 4 marcadores analisados: MLH-1, MSH-2, MSH-6 e PMS-2. O pacientes que apresentaram coloração nuclear nas células neoplásicas dos 4 marcadores foram classificados como proficientes (pMMR) ⁽⁴⁰⁾.

3.5.2.3 Características clínicas e laboratoriais dos pacientes:

Idade ao diagnóstico (definida como idade apresentada a época da primeira biópsia), sítio primário anatômico do tumor (definidos por: ceco, cólon ascendente, flexura hepática, cólon transverso, flexura esplênica, cólon descendente, cólon sigmóide, transição retossigmóide e reto), sexo e data do diagnóstico (definida como a data da primeira biópsia ou data da cirurgia do tumor primário, o que ocorresse primeiro), presença de comorbidades prévias (definidas segundo o Índice de Charlson como qualquer condição que necessite de medicação). Foram coletados valores do antígeno carcinoembrionário (CEA) sérico pré-operatório (definido como aquele medido até 6 meses antes da cirurgia) e pós operatório (definido como aquele medido até 6 meses após a cirurgia).

3.5.2.4 Características relativas ao procedimento cirúrgico

As cirurgias do tumor primário foram estratificadas em cirurgia de urgência Vs cirurgia eletiva.

3.5.2.5 Características relativas ao produto da peça cirúrgica

O produto anátomo-patológico resultante da ressecção do tumor primário foi clasificado segundo estadiamento TNM anátomo patológico de acordo com a 8ª edição da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). Foram coletados os número de

linfonodos ressecados e número de linfonodos comprometidos durante cirurgia. Foram coletados dados referentes a diferenciação histológica, presença de invasão angiolinfática ou invasão perineural de acordo com critérios do Colégio Americano de Patologia (CAP) e AJCC. Os pacientes foram classificados de acordo com a classificação do estadio III patológico proposta pelo consórcio IDEA^(9,10), istoé: os pacientes com estadio patológico: pT1-3pN1 foram classificados como estadio III de baixo risco e os pacientes com estadio patológico: pT4 ou pN2 foram classificados como estadio III de alto risco.

3.5.2.6 Características relativas ao tratamento complementar quimioterápico

Foram coletados a data do início da quimioterapia (definida como primeiro dia do primeiro ciclo da quimioterapia ou C1D1). Foram coletados também o número de ciclos e data do primeiro e do último dia da quimioterapia adjuvante. Além disso, também foram colhidos dados relacionados a eficácia do tratamento (taxa de sobrevida global em 5 anos e taxa de sobrevida livre de recidiva em 5 anos), além de dados sobre as toxicidades clínicas e hematológicas graves relacionadas ao tratamento segundo escala do *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE), versão 5.0. e dados sobre necessidade de interrupção de dose, atrasos e internações durante o tratamento quimioterápico adjuvante.

3.6 SEGUIMENTO

A data limite para análise do tempo de seguimento foi dia 25 de março de 2022. A duração do seguimento foi definida como o tempo (em meses) compreendido entre o primeiro dia do primeiro ciclo da quimioterapia adjuvante (D1C1) até a data do último registro em prontuário médico verificada no dia 25 de março de 2022. Recidiva foi determinada através de exames radiológicos e/ou endoscópicos e uma biópsia confirmatória foi realizada, quando necessário, conforme decisão da equipe médica assistente. Um valor de CEA elevado não foi aceito isoladamente como evidência de recidiva de doença oncológica.

Após finalização da quimioterapia adjuvante, os pacientes foram acompanhados conforme protocolo institucional do ICESP. Nos primeiros 2 anos após término da

quimioterapia: pacientes foram submetidos a exame clínico a cada 3 meses com dosagem de CEA. Exames de tomografia de tórax e abdome total foram realizados a cada 6 meses. Do 3º ao 5º ano após término da quimioterapia: pacientes foram submetidos a exame clínico com dosagem de CEA a cada 6 meses e exames de imagem (tomografia de tórax e abdome total) anualmente. A colonoscopia foi recomendada a ser realizada após 1 ano do término da quimioterapia e em seguida a depender dos achados.

3.7 TAMANHO DA AMOSTRA

O presente estudo foi realizado a partir de uma amostra de conveniência e factibilidade utilizando-se como base toda a população pertencente a série institucional do ICESP publicada em 2017 ⁽³⁶⁾.

3.8 PLANO DE ANÁLISE

Para avaliação do valor prognóstico da lateralidade, utilizamos como desfechos clínicos:

3.8.1 Desfecho primário

3.8.1.1 Taxa de sobrevida global em 5 anos estratificada pela lateralidade (lado direito Vs lado esquerdo); Sobrevida global foi calculada a partir da data do primeiro dia da aplicação da quimioterapia adjuvante (C1D1) até a data da morte por qualquer causa.

3.8.2 Desfechos secundários

3.8.2.1- Taxa de sobrevida livre de recidiva (SLR) em 5 anos estratificada pela lateralidade (lado direito Vs lado esquerdo); Sobrevida livre de recidiva foi calculada a partir da data do primeiro dia da aplicação da quimioterapia adjuvante (C1D1) até a data da recidiva local ou recidiva metastática ou óbito, o que ocorresse primeiro.

3.8.2.2- Taxa de prevalência de mutações K-RAS, N-RAS e BRAF estratificadas pela lateralidade (lado direito Vs lado esquerdo).

3.8.2.3- Taxa de prevalência de deficiência nas enzimas de reparo de DNA (dMMR) estratificada pela lateralidade (lado direito Vs lado esquerdo).

3.8.3 Considerações estatísticas

Frequências foram comparadas pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, segundo apropriado. Para variáveis contínuas, foram calculadas as medidas de tendência central (média e mediana), medidas de dispersão e variabilidade (amplitude e desvio-padrão).

Curvas de sobrevida global e sobrevida livre de recidiva foram construídas de acordo com o método estimativo de Kaplan Meier. *Hazard Ratios* (HR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram calculados a partir dos modelos de *hazard* proporcional de Cox. Um valor de p unicaudado $<0,05$ foi considerado para significância estatística. Foi utilizado o *software* R (versão 4.2.2, *R Core Team*, 2022).

3.9 ASPECTOS ÉTICOS

Por se tratar de estudo retrospectivo, foi solicitado e aceito pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) a dispensa da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Todos os dados são confidenciais e os resultados serão publicados. O estudo foi aprovado pelo CEP da Faculdade de Medicina da USP- FMUSP no dia 14 de dezembro de 2018- parecer de número: 3.084.419. Os serviços de oncologia clínica e de anatomia patológica do ICESP foram informados e concordaram em participar do presente estudo.

3.10 CUSTOS

Os custos deste estudo foram arcados pelos autores e também de forma institucional pelo Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO) do ICESP.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 POPULAÇÃO

Entre outubro de 2007 e fevereiro de 2013, um total de 265 pacientes foram incluídos. Dois pacientes foram excluídos da coorte inicial publicada em 2017 ⁽³⁶⁾: um paciente foi reclassificado para primário de intestino delgado e o outro foi submetido posteriormente a tratamento radioterápico adjuvante em pelve.

Para estratificação da lateralidade segundo critério do estudo CALGB/SWOG 80405 ⁽²¹⁾, foram excluídos os pacientes com tumores de cólon transverso, os pacientes com tumores multicêntricos e aqueles com subsítio primário indeterminado, totalizando 234 pacientes. Destes, restaram 95 pacientes com tumores do lado direito (40,6%) e 139 pacientes com tumores do lado esquerdo (59,4%). **Figura 1.**

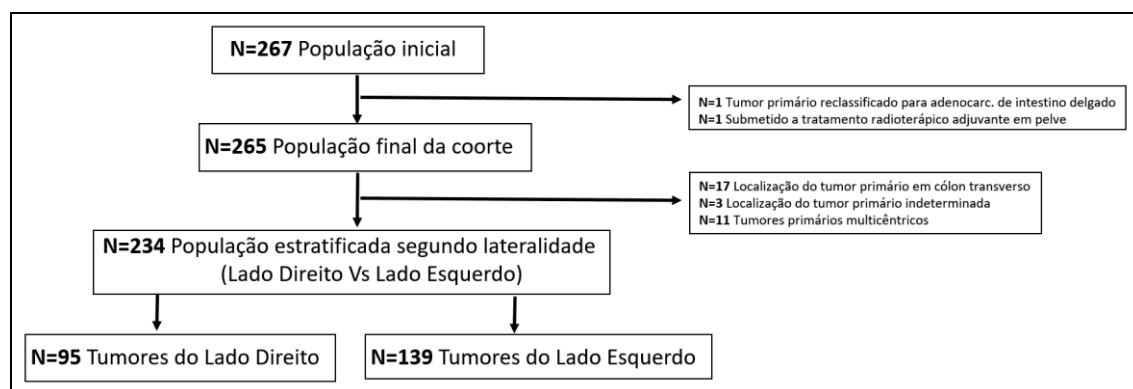


Figura 1 - Fluxo dos pacientes

As características clínicas e demográficas da linha de base foram similares entre os dois grupos. **Tabela 1.**

Tabela 1- Características clínicas e demográficas estratificadas pela lateralidade

	População geral (N=265)	Lado Direito (N=95)	Lado Esquerdo (N=139)	p-Value ¹
Idade (Anos)				
Mediana (amplitude)	58 (17-85)	58 (17-84)	59 (20-85)	0,971
Idade < 60 anos- No. (%)	144 (54,3%)	55 (57,9%)	72 (51,8%)	0,358
Idade 60-69 anos - No. (%)	92 (34,7%)	30 (31,6%)	51 (36,7%)	0,420
Idade ≥ 70 anos - No. (%)	29 (10,9%)	10 (10,5%)	16 (11,5%)	0,814
Sexo				
Masculino	141 (53,2%)	48 (50,5%)	65 (46,8%)	0,572
Feminino	124 (46,8%)	47 (49,5%)	74 (53,2%)	
Localização do tumor primário (subsítio)				
Ceco- No. (%)	26 (9,8%)	26 (27,4%)	-	
Cólon ascendente- No. (%)	67 (25,3%)	67 (70,5%)	-	
Flexura hepática- No. (%)	2 (0,8%)	2 (2,1%)	-	
Cólon transverso- No. (%)	17 (6,4%)	-	-	
Flexura esplênica- No. (%)	3 (1,1%)	-	3 (2,2%)	
Cólon descendente- No. (%)	44 (16,6%)	-	44 (31,7%)	
Cólon sigmóide- No. (%)	63 (23,8%)	-	63 (45,3%)	
Retossigmóide- No. (%)	23 (8,7%)	-	23 (16,5%)	
Reto- No. (%)	6 (2,3%)	-	6 (4,3%)	
Tumores multicêntricos- No. (%)	11 (4,2%)	-	-	
Sem o dado- No. (%)	3 (1,1%)	-	-	
ECOG- PS (Prévio a quimioterapia)				
ECOG 0- No. (%)	187 (70,6%)	67 (70,5%)	98 (70,5%)	0,341
ECOG 1- No. (%)	67 (25,3%)	26 (27,4%)	35 (25,2%)	
ECOG 2- No. (%)	5 (1,9%)	0 (0%)	3 (2,2%)	
ECOG 3- No. (%)	1 (0,4%)	1 (1,1%)	0 (0%)	
Sem o dado- No. (%)	5 (1,9%)	1 (1,1%)	3 (2,2%)	
Comorbidades				
Hipertensão arterial sistêmica- No. (%)	114 (43,0%)	43 (45,3%)	57 (41,0%)	0,474
Diabetes mellitus- No. (%)	49 (18,5%)	18 (18,9%)	26 (18,7%)	0,932
Dislipidemia- No. (%)	30 (11,3%)	14 (14,7%)	12 (8,6%)	0,134
Coronariopatia- No. (%)	10 (3,8%)	8 (8,4%)	1 (0,7%)	0,003
Estadiamento patológico (AJCC 8^a Ed.)				
IIIA- No. (%)	10 (3,8%)	5 (5,3%)	4 (2,9%)	0,642
IIIB- No. (%)	181 (68,3%)	64 (67,4%)	94 (67,6%)	
IIIC- No. (%)	74 (27,9%)	26 (27,4%)	41 (29,5%)	
Estadio "T"				
pT1- No. (%)	1 (0,4%)	0 (0%)	0 (0%)	0,541
pT2- No. (%)	14 (5,3%)	6 (6,3%)	7 (5,0%)	
pT3- No. (%)	192 (72,5%)	65 (68,4%)	104 (74,8%)	
pT4- No. (%)	58 (21,9%)	24 (25,3%)	28 (20,1%)	
Estadio "N"				
pN1- No. (%)	186 (70,2%)	68 (71,6%)	95 (68,3%)	0,597
pN2- No. (%)	79 (29,8%)	27 (28,4%)	44 (31,7%)	
Estadiamento patológico (de acordo com estudo IDEA)				
EC III de baixo risco (pT1-3pN1)- No. (%)	141 (53,2%)	50 (52,6%)	73 (52,5%)	0,986
EC III de alto risco (pT4 ou pN2)- No. (%)	124 (46,8%)	45 (47,4%)	66 (47,5%)	
Cirurgia do tumor primário				
Eletiva- No. (%)	178 (67,2%)	67 (70,5%)	90 (64,7%)	0,559
Urgência- No. (%)	56 (21,1%)	19 (20,0%)	31 (22,3%)	
Sem o dado- No. (%)	31 (11,7%)	9 (9,5%)	18 (12,9%)	
Linfonodos ressecados				
Mediana (amplitude)	21 (1- 119)	20 (1- 96)	20 (3- 57)	0,668
< 13 Linfonodos - No. (%)	46 (17,4%)	17 (17,9%)	26 (18,7%)	0,894
≥ 13 Linfonodos - No. (%)	215 (81,1%)	76 (80,0%)	111 (79,9%)	0,894
Sem o dado- No. (%)	4 (1,5%)	2 (2,1%)	2 (1,4%)	
Diferenciação histológica				
Bem ou moderadamente diferenciado- No. (%)	217 (81,9%)	69 (72,6%)	120 (86,3%)	0,009
Pouco diferenciado- No. (%)	32 (12,1%)	19 (20,0%)	12 (8,6%)	
Sem o dado- No. (%)	16 (6,0%)	7 (7,4%)	7 (5,0%)	
Invasão angiolinfática				
Presente- No. (%)	130 (49,1%)	45 (47,4%)	69 (49,6%)	0,692
Ausente- No. (%)	102 (38,5%)	38 (40,0%)	52 (37,4%)	
Sem o dado- No. (%)	31 (11,7%)	12 (12,6%)	18 (12,9%)	
Invasão perineural				
Presente- No. (%)	74 (27,9%)	25 (26,3%)	38 (27,3%)	0,801
Ausente- No. (%)	139 (52,5%)	52 (54,7%)	73 (52,5%)	
Sem o dado- No. (%)	52 (19,6%)	18 (18,9%)	28 (20,1%)	
Tempo da cirurgia até início da quimioterapia (Dias)				
Mediana (amplitude)	64 (10-192)	62 (29- 192)	68 (18-154)	0,304

1-Wilcoxon rank sum test; Pearson's Chi-squared test; Fisher's exact test

Idade mediana foi de 58 e 59 anos para tumores do lado direito e esquerdo, respectivamente. Para ambos os grupos, cerca de 67% apresentaram estadiamento IIIB. Antecedente de coronariopatia e histologia pouco diferenciada foram mais prevalentes nos tumores do lado direito quando comparados com os do lado esquerdo (8,4% Vs 0,7%; $p=0,003$ e 20,0% Vs 8,6%; $p=0,009$, respectivamente).

Dentre os 234 pacientes, 81 apresentaram registro de alguma amostra tecidual no setor de anatomia patológica do ICESP. Ao todo, 61 pacientes (75%) tiveram as amostras teciduais disponíveis para realização do sequenciamento de DNA e análises de imuno-histoquímica, o que representou 26% da população geral. Destes, quatro pacientes foram posteriormente excluídos das análises de sequenciamento de DNA devido a baixa qualidade dos espécimes teciduais. Ao todo, 23 casos com baixa cobertura de K-RAS (códon 12 e 13) foram reanalisados através de pirosequenciamento. **Tabela 2.**

Tabela 2 - Status das enzimas de reparo de DNA e das mutações K-RAS, N-RAS e BRAF estratificados pela lateralidade

	População geral*	Lado Direito	Lado Esquerdo	p-Value ¹
Sequenciamento de DNA	(N=57)	(N=25)	(N=32)	
K-RAS				
Mutado - No. (%)	32 (56,1%)	15 (60,0%)	16 (50,0%)	0.568
Não-mutado - No. (%)	25 (43,9%)	10 (40,0%)	16 (50,0%)	
N-RAS				
Mutado - No. (%)	9 (15,8%)	3 (12,0%)	6 (18,8%)	>0.999
Não-mutado - No. (%)	48 (84,2%)	22 (88,0%)	26 (81,3%)	
K-RAS ou N-RAS				
Mutado - No. (%)**	36 (63,2%)	16 (64,0%)	20 (62,5%)	0.681
Duplo selvagem (K-RAS e N-RAS)- No. (%)	21 (36,8%)	9 (36,0%)	12 (37,5%)	
BRAF (V600E)				
Mutado - No. (%)***	2 (3,5%)	0 (0%)	2 (6,3%)	0.499
Não-mutado - No. (%)	55 (96,5%)	25 (100%)	30 (93,8%)	
Análises de imuno-histoquímica				
Enzimas de Reparo de DNA (MMR)				
Deficiente (dMMR)- No. (%)	6 (9,8%)	4 (16,0%)	2 (5,6%)	0.202
Proficiente (pMMR)- No. (%)	46 (75,4%)	16 (64,0%)	30 (83,3%)	
Sem o dado- No. (%)	9 (14,8%)	5 (20,0%)	4 (11,1%)	

1-Fisher's exact test

* Todos os pacientes que foram submetidos ao sequenciamento de DNA por NGS e a pesquisa de imuno-histoquímica;

** N=4 pacientes tiveram mutação sincrônica K-RAS e N-RAS (N=2 com tumores do lado direito e N=2 com tumores do lado esquerdo).

*** N=1 paciente com tumor do lado esquerdo apresentou mutação sincrônica K-RAS e BRAF.

Desses, 36 pacientes (63,2%) tiveram identificação de mutação RAS e 2 pacientes (3,5%) apresentaram a mutação de BRAF (V600E) identificada. Quatro pacientes apresentaram mutação sincrônica K-RAS e N-RAS, sendo dois pacientes com tumores do lado direito e dois com tumores do lado esquerdo. São eles:

a) uma paciente de 53 anos do sexo feminino portadora de tumor em ceco (K-RAS mutado éxon 2- HGVS.c: c.38G>A; HGVS.p: p.Gly13Asp; frequência: 46% e N-RAS mutado éxon 2- HGVS.c: c.37G>A; HGVS.p: p.Gly13Ser; frequência: 4%);

b) um paciente de 54 anos do sexo masculino portador de tumor em cólon direito (K-RAS mutado éxon 2- HGVS.c: c.34G>C; HGVS.p: p.Gly12Arg; frequência: 9,8% e N-RAS mutado éxon 2- HGVS.c: c.35G>A; HGVS.p: p.Gly12Asp; frequência: 20%);

c) uma paciente de 64 anos do sexo feminino portadora de tumor em cólon sigmóide (K-RAS mutado éxon 2- HGVS.c: c.38G>A; HGVS.p: p.Gly13Asp; frequência: 50,3% e N-RAS mutado éxon 3- HGVS.c: c.181C>T; HGVS.p: p.Gln61Ter; frequência: 21%);

d) um paciente de 61 anos do sexo masculino portadora de tumor em cólon sigmóide (K-RAS mutado éxon 2- HGVS.c: c.35G>T; HGVS.p: p.Gly12Val; frequência: 20,2% e N-RAS mutado éxon 2- HGVS.c: c.37G>A; HGVS.p: p.Gly13Ser; frequência: 10%).

Além disso, um paciente de 71 anos do sexo masculino e portador de tumor em retossigmóide apresentou mutação sincrônica K-RAS e BRAF (K-RAS mutado éxon 2- HGVS.c: c.35G>T; HGVS.p: p.Gly12Val; frequência: 29% e BRAF mutado éxon 15- HGVS.c: c.1799T>C; HGVS.p: p.Val600Ala; frequência: 3%).

Dos 32 pacientes com mutação K-RAS, 31 pacientes tiveram a mutação identificada no éxon 2, enquanto 1 paciente apresentou mutação no éxon 3. Dos 9 pacientes com mutação N-RAS, 6 pacientes tiveram a mutação identificada no éxon 2, ao passo que 3 pacientes apresentaram mutação no éxon 3. Ao todo 6 pacientes (9,8%) tiveram identificação de deficiência de enzimas de reparo de DNA (dMMR). Tumores com *status* dMMR foram quase 3 vezes mais prevalentes nos pacientes com tumores do lado direito quando comparados com os do lado esquerdo (16% Vs 5,6%; p=0,202). Dos 6 pacientes com dMMR, em 5 pacientes foi identificada a perda da expressão da proteína MLH1 de forma isolada e em um paciente foi identificada a perda da expressão da proteína MSH6 também de forma isolada. Dos 6 pacientes com dMMR, quatro

também apresentaram mutação de RAS (K-RAS mutado no éxon 2). Destes, um paciente também apresentou a mutação sincrônica N-RAS (caso já descrito na letra “d” acima). **Tabela 2 (vide acima).**

O tempo mediano para início da quimioterapia adjuvante após a cirurgia do tumor primário foi de 62 dias (amplitude: 29- 192) para tumores do lado direito e 68 dias (amplitude: 18-154) para tumores do lado esquerdo. O número mediano de ciclos de quimioterapia adjuvante recebidos foi de 3 ciclos para ambos os grupos. O tempo de seguimento mediano foi de 66 meses (amplitude: 0-149). Ao final do estudo, 21 pacientes (7,9%) apresentaram perda de seguimento.

4.2 SOBREVIDA GLOBAL (SG): DESFECHO PRIMÁRIO

Ao tempo da análise, 35 pacientes (36,8%) tinham evoluído para óbito dentre os tumores do lado direito e 37 (26,6%) dentre os pacientes do lado esquerdo. A probabilidade de SG em 5 anos para população geral foi de 76% (IC 95%: 71%- 81%). Quando analisadas de forma estratificada pela lateralidade, as probabilidades de SG em 5 anos para os tumores do lado direito e do lado esquerdo foram de 67% (IC 95%: 58%- 77%) e 82% (IC 95%: 75%- 89%), respectivamente (HR para SG para lado direito: 2,02; IC 95%: 1,18 – 3,46; p=0,010). **Tabela 3 e Figura 2.**

Tabela 3 - Sobrevida global (SG) e sobrevida livre de recidiva (SLR) estratificados pela lateralidade

	População geral (N=265)	Lado Direito (N=95)	Lado Esquerdo (N=139)	Hazard Ratio e p-Value
Sobrevida global (SG)				
SG em 5 anos - % (IC 95%)	76 (71-81)	67 (58-77)	82 (75-89)	HR: 2,02 (IC 95%: 1,18- 3,46) p=0,010
Sobrevida livre de recidiva (SLR)				
SLR em 5 anos - % (IC 95%)	62 (56-68)	58 (49-69)	65 (58-74)	HR: 1,29 (IC 95%: 0,84- 1,97) p=0,248

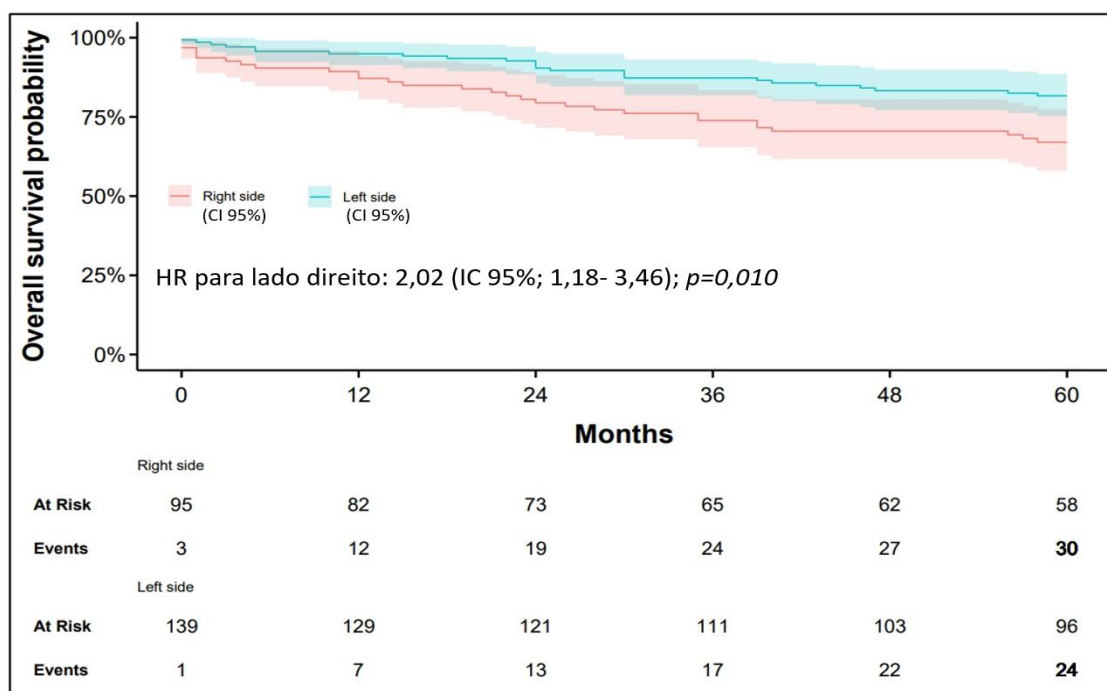


Figura 2 - Curvas de Kaplan–Meier de estimativa de sobrevida global (SG) estratificada pela lateralidade

4.3 SOBREVIDA LIVRE DE RECIDIVA (SLR)

A probabilidade de SLR em 5 anos para população geral foi de 62% (IC 95%: 56%-68%). Quando analisadas de forma estratificada pela lateralidade, as probabilidades de SLR em 5 anos para tumores do lado direito e do lado esquerdo foram de 58% (IC 95%: 49%- 69%) e 65% (IC 95%: 58%- 74%), respectivamente (HR para SLR para lado direito: 1,29; IC 95%: 0,84 – 1,97; $p=0,248$). **Tabela 3 (vide acima) e Figura 3.**

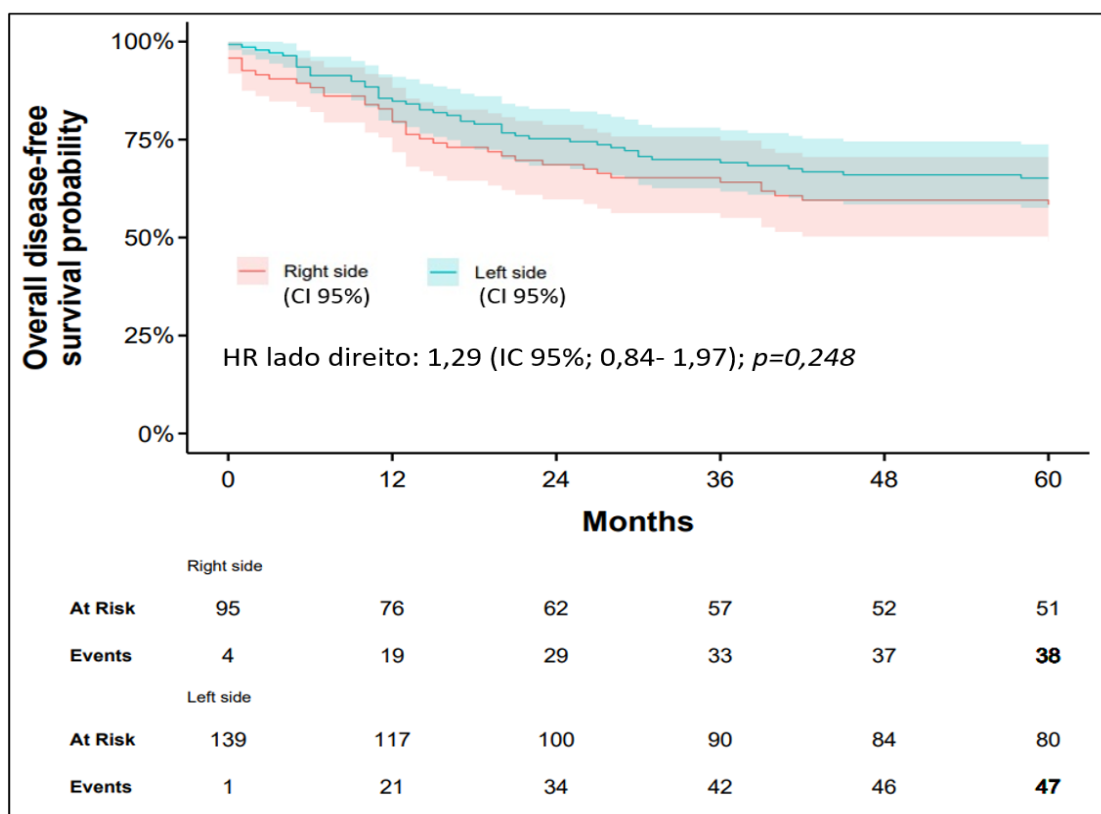


Figura 3 - Curvas de Kaplan–Meier de estimativa de sobrevida livre de recidiva (SLR) estratificada pela lateralidade

4.4 PREDITORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS E MOLECULARES DE PIOR SG E SLR

Não foi identificada nenhuma diferença estatisticamente significativa na probabilidade de SG e na probabilidade de SLR em 5 anos quando comparados os pacientes com tumores do lado direito e do lado esquerdo nos seguintes cenários: a) *status* duplo selvagem (RAS e BRAF), b) *status* RAS mutado (K-RAS ou N-RAS), c) *status* pMMR e d) *status* dMMR. **Tabela 4.**

Tabela 4 - Regressão logística para predição de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de recidiva (SLR)- Subsítio do tumor primário, *status* MMR e *status* RAS

	Sobrevida global				Sobrevida livre de recidiva			
	Pacientes, N.	Eventos, N.	HR (IC de 95%)	p-Value	Pacientes, N.	Eventos, N.	HR (IC de 95%)	p-Value
Lateralidade do tumor								
Lado direito	95	30	Referência = 1	-	95	38	Referência = 1	-
Lado esquerdo	139	24	0,49 (0,29- 0,85)	0,010	139	47	0,78 (0,51- 1,19)	0,248
Subsítio do tumor primário								
Ceco	26	6	Referência = 1	-	26	7	Referência = 1	-
Cólon ascendente	67	23	1,53 (0,62- 3,76)	0,353	67	30	1,75 (0,77- 3,98)	0,183
Flexura hepática	2	1	2,40 (0,29- 19,9)	0,419	2	1	1,98 (0,24- 16,1)	0,523
Flexura esplênica	3	1	1,31 (0,16- 10,9)	0,803	3	1	1,01 (0,12- 8,19)	0,994
Cólon descendente	44	6	0,57 (0,18- 1,77)	0,331	44	13	1,07 (0,43- 2,69)	0,880
Cólon sigmóide	63	11	0,69 (0,25- 1,86)	0,459	63	21	1,16 (0,50- 2,74)	0,727
Retosigmóide	23	4	0,69 (0,19- 2,44)	0,565	23	10	1,54 (0,59- 4,05)	0,380
Reto	6	2	1,29 (0,26- 6,39)	0,755	6	2	1,20 (0,25- 5,76)	0,823
Lado Direito Vs Lado Esquerdo								
Lado Esquerdo e RAS Não mutado*	12	2	Referência = 1	-	12	7	Referência = 1	-
Lado Direito e RAS Não mutado	8	3	2,16 (0,36- 12,9)	0,399	8	5	0,97 (0,31- 3,06)	0,959
Lado Esquerdo e RAS Mutado**	19	5	Referência = 1	-	19	13	Referência = 1	-
Lado Direito e RAS Mutado**	16	4	1,11 (0,30- 4,14)	0,877	16	8	0,79 (0,33- 1,91)	0,600
Lado Esquerdo e pMMR	28	5	Referência = 1	-	28	18	Referência = 1	-
Lado Direito e pMMR	16	6	2,46 (0,75- 8,07)	0,139	16	11	1,33 (0,63- 2,84)	0,455
Lado Esquerdo e dMMR	2	1	Referência = 1	-	2	1	Referência = 1	-
Lado Direito e dMMR	4	0	***	>0,999	4	0	***	>0,999

* K-RAS e N-RAS não mutados

** K-RAS mutado ou N-RAS mutado

***Impossibilidade de cálculo de *Hazard Ratio* pois não houve eventos em um dos grupos usados na comparação.

Dentre os pacientes com tumores do lado direito, a presença das variáveis idade >70 anos (Vs Idade ≤ 70 anos), pN2 (Vs pN1) e estágio III de alto risco segundo critérios do estudo IDEA (Vs estágio III de baixo risco) foram associadas de forma estatisticamente a piores desfechos de SG e SLR. **Tabela 5.**

Tabela 5 - Regressão logística para predição de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de recidiva (SLR)- Tumores do lado direito- características clínicas e biomarcadores moleculares

	Sobrevida global				Sobrevida livre de recidiva			
	Pacientes, N.	Eventos, N.	HR (IC de 95%)	p-Value	Pacientes, N.	Eventos, N.	HR (IC de 95%)	P-Value
Tumores do Lado Direito								
Características clínicas								
Idade- Anos								
Idade ≤ 70 anos	86	24	Referência = 1	-	86	32	Referência = 1	-
Idade >70 anos	9	6	4,11 (1,67- 10,1)	0,002	9	6	2,94 (1,23- 7,05)	0,016
Sexo								
Masculino	47	18	Referência = 1	-	47	21	Referência = 1	-
Feminino	48	12	0,60 (0,29- 1,25)	0,171	48	17	0,71 (0,37- 1,34)	0,291
ECOG- PS (Prévio a quimioterapia)								
ECOG 0-1	93	30	Referência = 1	-	93	37	Referência = 1	-
ECOG ≥ 2	1	0	***	0,997	1	0	***	0,997
Estadiamento patológico (AJCC 8a Ed.)								
IIIA	5	0	Referência = 1	-	4	2	Referência = 1	-
IIIB-IIIC	90	30	***	0,998	135	45	0,80 (0,319- 3,28)	0,752
Estadio "T"								
pT1-T2	6	0	Referência = 1	-	6	0	Referência = 1	-
pT3-T4	89	30	***	0,997	89	38	***	0,997
Estadio "N"								
pN1	68	16	Referência = 1	-	68	22	Referência = 1	-
pN2	27	14	2,52 (1,23- 5,17)	0,012	27	16	2,23 (1,17- 4,25)	0,015
Estadiamento - segundo consórcio IDEA								
EC III de baixo risco (pT1-3pN1)	50	9	Referência = 1	-	50	12	Referência = 1	-
EC III de alto risco (pT4 ou pN2)	45	21	2,95 (1,35- 6,44)	0,007	45	26	2,90 (1,46- 5,76)	0,002
Cirurgia do tumor primário								
Eletiva	67	19	Referência = 1	-	67	25	Referência = 1	-
Urgência	19	7	1,45 (0,61- 3,46)	0,398	19	9	1,39 (0,65- 2,99)	0,393
Diferenciação histológica								
Bem ou moderadamente diferenciado	69	24	Referência = 1	-	38	15	Referência = 1	-
Pouco diferenciado	19	5	0,79 (0,30- 2,07)	0,629	45	19	1,21 (0,61- 2,37)	0,589
Invasão angiolinfática								
Ausente	38	9	Referência = 1	-	38	15	Referência = 1	-
Presente	45	19	2,11 (0,95- 4,67)	0,065	45	19	1,20 (0,61- 2,37)	0,589
Invasão perineural								
Ausente	52	16	Referência = 1	-	52	21	Referência = 1	-
Presente	25	9	1,26 (0,56- 2,86)	0,575	25	10	1,08 (0,51- 2,30)	0,836
Biomarcadores moleculares								
K-RAS								
K-RAS -Não mutado	9	3	Referência = 1	-	9	5	Referência = 1	-
K-RAS -Mutado	15	4	0,84 (0,19- 3,77)	0,824	15	8	1,09 (0,36- 3,34)	0,881
N-RAS								
N-RAS - Não mutado	21	7	Referência = 1	-	21	12	Referência = 1	-
N-RAS -Mutado	3	0	***	0,998	3	1	0,65 (0,08- 5,00)	0,677
KRAS e NRAS								
Duplo Selvagem*	8	3	Referência = 1	-	8	5	Referência = 1	-
RAS Mutado**	16	4	0,84 (0,19- 3,77)	0,824	16	8	0,95 (0,31- 2,92)	0,931
Enzimas de Reparo de DNA (MMR)								
pMMR	16	6	Referência = 1	-	16	11	Referência = 1	-
dMMR	4	0	***	0,999	4	0	***	0,998
MMR e KRAS e NRAS								
pMMR e Duplo Selvagem*	14	2	Referência = 1	-	10	7	Referência = 1	-
pMMR e RAS mutado**	16	4	1,71 (0,31- 9,35)	0,535	11	6	0,90 (0,30- 2,70)	0,850

* K-RAS e N-RAS não mutados

** K-RAS mutado ou N-RAS mutado

***Impossibilidade de cálculo de *Hazard Ratio* pois não houve eventos em um dos grupos usados na comparação.

Já dentre pacientes com tumores do lado esquerdo, a presença de histologia pouco diferenciada (Vs histologia bem diferenciada ou moderadamente diferenciada) e invasão angiolinfática (Vs ausência de invasão angiolinfática) foram associados de forma estatisticamente significativa a piores desfechos de SG e SLR em 5 anos. Além disso, a realização de cirurgia do tumor primário em caráter de urgência (Vs cirurgia eletiva) também foi associada a pior desfecho de SLR nos tumores do lado esquerdo, mas sem impacto estatisticamente significativo em piora de SG. **Tabela 6.**

Tabela 6 - Regressão logística para predição de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de recidiva (SLR)- Tumores do lado esquerdo- características clínicas e biomarcadores moleculares

	Sobrevida global				Sobrevida livre de recidiva			
	Pacientes, N.	Eventos, N.	HR (IC de 95%)	p-Value	Pacientes, N.	Eventos, N.	HR (IC de 95%)	p-Value
Tumores do Lado Esquerdo								
Características clínicas								
Idade- Anos								
Idade ≤ 70 anos	126	21	Referência = 1	-	126	43	Referência = 1	-
Idade >70 anos	13	3	1,39 (0,42- 4,68)	0,590	13	4	0,88 (0,32- 2,47)	0,815
Sexo								
Masculino	74	10	Referência = 1	-	74	22	Referência = 1	-
Feminino	65	14	1,77 (0,78- 3,98)	0,169	65	25	1,49 (0,84- 2,65)	0,172
ECOG- PS (Prévio a quimioterapia)								
ECOG 0-1	133	23	Referência = 1	-	133	44	Referência = 1	-
ECOG ≥ 2	3	0	***	0,998	3	0	***	0,997
Estadiamento patológico (AJCC 8a Ed.)								
IIIA	5	0	Referência = 1	-	4	2	Referência = 1	-
IIIB-IIIC	90	30	***	0,998	135	45	0,80 (0,19- 3,28)	0,997
Estadio "T"								
pT1-T2	7	0	Referência = 1	-	7	3	Referência = 1	-
pT3-T4	132	24	***	0,997	132	44	0,92 (0,28- 2,95)	0,884
Estadio "N"								
pN1	95	17	Referência = 1	-	95	33	Referência = 1	-
pN2	44	7	0,88 (0,37- 2,13)	0,783	44	14	0,90 (0,48- 1,68)	0,742
Estadiamento - segundo consórcio IDEA								
EC III de baixo risco (pT1-3pN1)	73	11	Referência = 1	-	73	23	Referência = 1	-
EC III de alto risco (pT4 ou pN2)	66	13	1,44 (0,65- 3,22)	0,372	66	24	1,20 (0,68- 2,13)	0,527
Cirurgia do tumor primário								
Eletiva	90	12	Referência = 1	-	90	25	Referência = 1	-
Urgência	31	8	2,26 (0,92- 5,55)	0,075	31	15	2,02 (1,06- 3,84)	0,032
Diferenciação histológica								
Bem ou moderadamente diferenciado	120	17	Referência = 1	-	120	36	Referência = 1	-
Pouco diferenciado	12	5	3,93 (1,44- 10,7)	0,007	12	7	2,80 (1,24- 6,31)	0,013
Invasão angiolinfática								
Ausente	52	3	Referência = 1	-	52	12	Referência = 1	-
Presente	69	18	5,23 (1,54- 17,8)	0,008	69	29	2,14 (1,09- 4,20)	0,027
Invasão perineural								
Ausente	73	11	Referência = 1	-	73	23	Referência = 1	-
Presente	38	6	1,01 (0,37- 2,72)	0,989	38	12	0,96 (0,48- 1,92)	0,904
Biomarcadores moleculares								
K-RAS								
K-RAS -Não mutado	14	3	Referência = 1	-	14	8	Referência = 1	-
K-RAS -Mutado	17	4	1,06 (0,24- 4,74)	0,939	17	12	1,14 (0,47- 2,79)	0,776
N-RAS								
N-RAS -Não mutado	26	6	Referência = 1	-	26	18	Referência = 1	-
N-RAS -Mutado	5	1	0,81 (0,10- 6,75)	0,847	5	2	0,45 (0,10- 1,95)	0,286
KRAS e NRAS								
Duplo Selvagem*	17	4	Referência = 1	-	12	7	Referência = 1	-
RAS Mutado**	14	3	0,89 (0,20- 3,96)	0,874	19	13	1,08 (0,43- 2,71)	0,866
Enzimas de Reparo de DNA (MMR)								
pMMR	28	5	Referência = 1	-	28	18	Referência = 1	-
dMMR	2	1	3,51 (0,41- 30,5)	0,254	2	1	0,96 (0,13- 7,19)	0,965
MMR e KRAS e NRAS								
pMMR e Duplo Selvagem*	18	4	Referência = 1	-	14	9	Referência = 1	-
pMMR e RAS mutado**	16	4	1,71 (0,31- 9,35)	0,535	16	11	1,10 (0,46- 2,66)	0,829

* K-RAS e N-RAS não mutados

** K-RAS mutado ou N-RAS mutado

***Impossibilidade de cálculo de Hazard Ratio pois não houve eventos em um dos grupos usados na comparação.

4.5 TOXICIDADES \geq GRAU 3 (G3)

Diarreia, neutropenia e vômito foram os eventos adversos \geq G3 mais incidentes na população geral- **Tabela 7**.

Tabela 7 - Eventos adversos clínicos e hematológicos \geq G3 estratificados pela lateralidade

	População geral	Lado Direito	Lado Esquerdo	p-Value ¹
	(N=265)	(N=95)	(N=139)	
	Grau \geq 3	Grau \geq 3	Grau \geq 3	
Eventos clínicos				
Todos os eventos - No. (%)	73 (27,5%)	30 (31,6%)	35 (25,2%)	0,212
Náusea- No. (%)	8 (3,0%)	4 (4,2%)	4 (2,9%)	0,718
Vômito- No. (%)	11 (4,2%)	4 (4,2%)	6 (4,3%)	>0,999
Diarreia- No. (%)	43 (16,2%)	15 (15,8%)	24 (17,3%)	0,766
Astenia- No. (%)	7 (2,6%)	2 (2,1%)	3 (2,2%)	>0,999
Neuropatia periférica - No. (%)	5 (1,9%)	5 (5,3%)	0 (0%)	0,010
Eventos hematológicos				
Todos os eventos - No. (%)	58 (21,9%)	19 (20,0%)	22(15,8%)	0,410
Anemia- No. (%)	5 (1,9%)	4 (2,9%)	1 (0,7%)	0,077
Neutropenia- No. (%)	38 (14,3%)	15 (10,8%)	16 (11,5%)	0,260
Plaquetopenia- No. (%)	15 (5,7%)	6 (4,3%)	8 (5,8%)	0,759

1-Pearson's Chi-squared test; Fisher's exact test

Não houve, entretanto, diferenças estatisticamente significativas em relação a incidência de diarreia, neutropenia e vômito quando analisados de forma estratificada pela lateralidade. Neuropatia periférica, entretanto, foi incidente somente entre os pacientes com tumores do lado direito quando comparados com os do lado esquerdo (5,3% Vs 0%; $p=0,010$).

Na população geral, 9 pacientes (3,4%) evoluíram para óbito durante os primeiros 60 dias após início da quimioterapia adjuvante. Destes, 6 óbitos (6,3%) ocorreram em pacientes com tumores do lado direito e 2 óbitos (1,4%) em pacientes com tumores do lado esquerdo. Dentre esses óbitos descritos para o lado direito: um paciente faleceu em decorrência de diarreia e insuficiência renal, 3 pacientes faleceram em decorrência de infecção/sepsis e em 2 pacientes não foi possível a identificação da

causa do óbito. Todos os 2 óbitos ocorridos em pacientes com tumores do lado esquerdo ocorreram em decorrência de infecção/sepsse.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os dados do presente estudo apontam para um pior prognóstico (pior SG em 5 anos) para pacientes com CCR estágio III do lado direito quando comparados com os pacientes do lado esquerdo (HR: 2,02; $p=0,010$). Não houve, entretanto, impacto estatisticamente significativo para o desfecho sobrevida livre de recidiva (HR: 1,29; $p=0,248$).

Pesquisadores do estudo de fase 3 CALGB/SWOG 80405 analisaram 1.137 pacientes com CCR metastático K-RAS selvagem (códon 12 e 13) que foram tratados com quimioterapia paliativa de 1ª linha a critério do investigador (a quimioterapia poderia ser FOLFIRI- regime baseado nas drogas irinotecano, 5-FU e leucovorin- ou FOLFOX modificado -regime baseado nas drogas oxaliplatina, 5-FU e leucovorin). Os autores deste estudo randomizaram os pacientes para a adição de bevacizumabe ou cetuximabe a quimioterapia de 1ª linha. Ao final do estudo, não houve diferenças em relação a SLR ou SG entre os 2 braços ⁽²⁰⁾. Posteriormente, em uma análise retrospectiva do estudo publicada em 2016, os autores identificaram uma associação prognóstica entre lateralidade do tumor primário e SG, mostrando um pior prognóstico para pacientes com tumores do lado direito. Neste último estudo, pacientes com tumores do lado direito tiveram uma SG mediana de 19,4 meses (IC 95%: 16,7-23,6), enquanto que os pacientes com tumores do lado esquerdo tiveram uma SG mediana de 34,2 meses (IC 95%: 31,4-35,7), representando um risco relativo de óbito superior a 50% para aqueles pacientes com tumores do lado direito (HR: 1,56; IC 95%: 1,32-1,84; $p<0,0001$) ⁽²¹⁾.

Outros dois estudos de fase 3, entretanto, dedicaram-se a estudar o impacto da lateralidade no contexto do CCR estágio III: o estudo PETACC-8 ^(41,42) e o NCCTG N0147-Alliance ^(43,44). Taieb J et al conduziram o estudo de fase 3 chamado PETACC-8, que randomizou pacientes com CCR EC III K-RAS selvagem exon 2 para receberem quimioterapia adjuvante com FOLFOX4 associados ou não a cetuximabe. Este estudo não demonstrou benefício em redução de recidiva para pacientes que receberam a

adição de cetuximabe ⁽⁴¹⁾. Posteriormente, em uma análise *post-hoc* que incluiu 1.869 pacientes, os autores encontraram que ter um tumor do lado direito, quando comparado com o do lado esquerdo, foi associado a pior SG (HR para lado direito: 1,25; IC 95%: 1,02-1,54; p=0,03). Não houve, porém, efeito prognóstico estatisticamente significativo da lateralidade no risco de SLR ⁽⁴²⁾.

Alberts SR et al conduziram na clínica Mayo um outro estudo de fase 3 chamado NCCTG N0147-Alliance. Este estudo randomizou pacientes com CCR EC III K-RAS selvagem (códon 12 e 13) para receberem quimioterapia adjuvante com mFOLFOX6 associados ou não a cetuximabe e também não demonstrou benefício em redução de recidiva para os que receberam a adição de cetuximabe ⁽⁴³⁾. Posteriormente, em uma análise *post-hoc* que incluiu 3.018 pacientes, os autores encontraram que ter um tumor do lado direito, quando comparado com o do lado esquerdo, foi associado a pior SG (HR para lado esquerdo: 0,72; IC 95%: 0,60- 0,86; p=0,0004) e pior SLR (HR para lado esquerdo: 0,84; IC 95%: 0,73- 0,98; p=0,026) ⁽⁴⁴⁾.

Nossos resultados em sobrevida global estão em concordância com os achados dos principais estudos prévios. Entretanto a magnitude do efeito foi maior no presente estudo. No presente estudo, diferentemente dos demais, a população incluída foi composta exclusivamente por pacientes tratados em um centro acadêmico fora de um ensaio clínico. Chama a atenção, no nosso estudo, a maior prevalência de pacientes coronariopatas no grupo de tumores do lado direito (8,4% Vs 0,7%; p=0,003). Nós hipotizamos que isso pode ter colaborado para uma menor tolerância a quimioterapia neste subgrupo e possível menor sobrevida global neste subgrupo devido a mortes por outras causas.

O presente estudo também encontrou uma maior prevalência de histologia pouco diferenciada nos tumores do lado direito, quando comparado com os tumores do lado esquerdo (20% e 8,6%, respectivamente; p=0,009). Achados apontaram para prevalências menores de mutações BRAF (0% e 6,2% para lado direito e esquerdo, respectivamente), destacavelmente para os tumores do lado direito. Nós também não encontramos um efeito prognóstico do *status* dMMR e do *status* das mutações K-RAS, N-RAS e BRAF na SG ou SLR na população estratificada pela lateralidade.

Pesquisadores do estudo CALGB/SWOG 80405 publicaram em 2019 uma análise do perfil mutacional de 843 pacientes. Neste estudo, foram descritas as seguintes

taxas de prevalência dos biomarcadores na população geral: mutação K-RAS (28,2%), mutação N-RAS (3,4%), mutação BRAF (12%) e *status* dMMR/MSI-H (6%). Autores, porém não reportaram as prevalências dos biomarcadores estratificadas segundo a lateralidade ⁽⁴⁵⁾.

Os autores da análise *post-hoc* do NCCTG N0147-Alliance encontraram uma maior prevalência de histologia pouco diferenciada nos pacientes com tumores do lado direito (32% Vs 17%; $p < 0,001$). Além disso foram descritas as seguintes taxas de prevalência dos biomarcadores nos tumores dos lados direito e esquerdo respectivamente: mutação K-RAS (41% Vs 30%; $< 0,001$), mutação BRAF (20% vs 4%; $p < 0,001$), e *status* dMMR/MSI-H (20% Vs 3%; $p < 0,001$). Os autores demonstraram ainda que, na população geral, a presença de grau histológico pouco diferenciado (Vs bem diferenciado), pT3 (Vs pT1-2), pT4 (Vs pT1-2), pN2 (Vs pN1), mutação de K-RAS e mutação de BRAF foram associados a piores desfechos de SG de forma estatisticamente significativa. Autores não identificaram impacto do *status* dMMR/MSI-H na SG ou na SLR na população geral. Entretanto, quando analisados de forma estratificada pela lateralidade, autores identificaram que nos tumores do lado direito, a presença do *status* dMMR conferiu melhor SG (HR para dMMR lado direito: 0,71; IC 95%: 0,53-0,97; $p = 0,029$), efeito que não foi demonstrado nos tumores do lado esquerdo e dMMR (HR para dMMR lado esquerdo HR: 1,85; 0,99-3,46; $p = 0,054$). Olhando em particular para as mutações RAS, autores encontraram que nos tumores do lado esquerdo a presença de mutação K-RAS conferiu piora da SG (HR para lado esquerdo e RAS mutado: 1,98; IC 95%: 1,49-2,63; $p < 0,0001$), efeito que não foi demonstrado nos tumores do lado direito RAS mutados. Em contrapartida, a presença de mutação BRAF conferiu piora da SG apenas para os tumores do lado direito (HR para lado direito e BRAF mutados: 1,58; IC 95%: 1,17-2,12; $p = 0,003$) ⁽⁴⁴⁾.

Os autores da análise *post-hoc* do PETACC-8 encontraram as seguintes taxas de prevalência dos biomarcadores moleculares nos pacientes com tumores dos lados direito e esquerdo respectivamente: mutação K-RAS (56,5% e 46,2%; valor de p não reportado), mutação BRAF (19,7% e 5,6%; valor de p não reportado), e dMMR (17,3% e 2,9%; valor de p não reportado). Autores também avaliaram o valor prognóstico da lateralidade do tumor primário com o *status* das mutações RAS, BRAF e da presença de instabilidade de microssatélites (dMMR/ MSI-H). Quando a lateralidade foi analisada

em conjunto com os biomarcadores moleculares, autores identificaram que os pacientes com tumores do lado direito e mutação RAS tiveram menor risco de recidiva quando comparados com os RAS mutados do lado esquerdo (HR para lado direito e RAS mutado: 0,80; IC 95%: 0,64-1,00; $p=0,046$). Em contrapartida, para pacientes com perfil duplo selvagem (sem mutação RAS e sem mutação BRAF), houve um maior risco de recidiva de doença para os pacientes do lado direito, quando comparados com os duplo selvagens do lado esquerdo (HR para lado direito e duplo selvagem: 1,39; IC 95%: 1,01-1,92; $p=0,04$)⁽⁴²⁾.

Um estudo retrospectivo conduzido por Dienstmann R et al reuniu dados de cinco coortes retrospectivas, totalizando 8.904 pacientes com CCR não metastático. Neste estudo, os autores avaliaram a papel prognóstico da adição de marcadores moleculares (mutações K-RAS códons 12 e 13, BRAF V600E e *status* MSI) na capacidade de predição da SG em 5 anos, quando comparados com modelos clínico-patológicos usuais. Ao final, os autores demonstraram efeito prognóstico do sítio primário (lado direito conferindo pior prognóstico que o lado esquerdo) e pior prognóstico para o subgrupo molecular de pacientes com *status* BRAF mutado e MSS ou MSI-L (Coorte Train: HR para MSS/MSI-L BRAF mutado: 3,01; IC 95%: 2,36-4,07; $p<0,001$)⁽⁴⁶⁾.

Em 2017, os autores do CALGB/SWOG 80405 apresentaram na ASCO 2017 uma nova subanálise, que avaliou 729 pacientes com CCR metastático classificados segundo biomarcadores moleculares (*status* K-RAS, N-RAS, BRAF e MSI), e subtipos do consenso molecular. Neste estudo foi demonstrando que a lateralidade tinha sido um fator prognóstico independente do *status* das mutações RAS, BRAF e da presença de MSI-H (SG mediana para lado direito: 32,9 meses Vs 19,6 meses; HR ajustado: 1,39; IC 95%: 1,03-1,88; $p<0,0001$)⁽⁴⁷⁾.

Nossos achados de maior prevalência de histologia pouco diferenciada do lado direito estão em concordância com a literatura prévia. Nosso estudo, porém, encontrou uma prevalência mais baixa de mutações BRAF, particularmente nos tumores do lado direito. Também houve discordância no que se refere a ausência de impacto prognóstico dos marcadores moleculares no nosso estudo. Nós hipotetizamos que o baixo número de pacientes submetidos as análises de sequenciamento NGS no presente estudo (22% da população total ou 24% da população classificada segundo a lateralidade) possa

justificar em parte a menor prevalência de mutações BRAF encontradas na nossa amostra. Consequentemente isso gerou subgrupos menores de pacientes portadores das alterações moleculares o que pode ter influenciado nas análises subsequentes.

Por fim, o presente estudo não encontrou diferenças estatisticamente significativas nas incidências das principais toxicidades clínicas e hematológicas \geq G3, quando estratificadas pela lateralidade. A única exceção foi a neuropatia periférica, que apresentou uma incidência na população geral de 1,9% e foi incidente apenas dentre pacientes com tumores do lado direito (5,3% Vs 0%; $p=0,010$).

Os principais ECR de fase III que avaliaram o papel da inclusão da oxaliplatina no contexto do CCR estágio III foram o MOSAIC, o NBSAPB C-07 e o NO16968. Nestes estudos a incidência de neuropatia periférica \geq G3 variou de 8,2-12,5% na população geral durante o tratamento adjuvante. Para nosso conhecimento, porém, nenhum desses 3 estudos reportou a incidência da neuropatia periférica estratificada pela lateralidade do tumor ^(4-8, 48). Nós hipotetizamos que nossos achados de baixa incidência global de neuropatia periférica na população geral podem ter sido em parte consequência de subnotificação, uma vez que a coleta deste sinal ou sintoma não foi feita de forma estruturada e sistemática pelos médicos assistentes. Nós hipotetizamos ainda que isso pode ter contribuído, ao menos em parte, para ausência de incidência de neuropatia periférica nos pacientes com tumores do lado esquerdo.

5.2- VANTAGENS E LIMITAÇÕES DO PRESENTE ESTUDO

Nosso estudo apresenta alguns pontos que merecem ser destacados. Nós obtivemos uma baixa taxa de perda de seguimento (7,9%) ao final do estudo. Além disso, a população do estudo foi tratada e acompanhada de forma homogênea conforme o protocolo institucional do ICESP.

Nosso estudo apresenta também algumas limitações. Trata-se de uma coorte retrospectiva e de centro único. Com relação as análises dos desfechos secundários, por indisponibilidade de acesso ao material biológico anatomopatológico, houve um número limitado de pacientes submetidos a pesquisa dos biomarcadores moleculares. Vale destacar que o estudo foi desenvolvido no ICESP que é um centro hospitalar de referência para o tratamento oncológico do Estado de São Paulo-SP.

Consequentemente, muitos pacientes do presente estudo foram admitidos para tratamento após já terem realizado a biópsia diagnóstica e até mesmo a cirurgia do tumor primário nas suas respectivas unidades encaminhadoras. Isso naturalmente resultou em dificuldade de acesso ao material anatomopatológico.

Além disso, naqueles pacientes que foram testados para os biomarcadores, nós também encontramos um percentual de pacientes portadores de mutações BRAF abaixo do reportado na literatura.

6 CONCLUSÕES


6 CONCLUSÕES

Dados apontam para um pior prognóstico (pior SG em 5 anos) do lado direito dentre os pacientes com CCR estágio III ressecados e tratados com regime de mFLOX adjuvante quando comparados com os tumores do lado esquerdo. Não se demonstrou impacto prognóstico dos biomarcadores moleculares (*status* dMMR e *status* das mutações K-RAS, N-RAS e BRAF) quando estratificados segundo a lateralidade. Uma análise futura que envolva um percentual maior de pacientes com alterações nesses biomarcadores poderá ser útil na melhor determinação do papel prognóstico desses biomarcadores neste cenário.

7 ANEXOS

7 ANEXOS

7.1 Anexo 1- Parecer consubstanciado do CEP da FMUSP (página 1 de 3)

<p>USP - FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FMUSP</p> 								
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA								
Título da Pesquisa: Impacto prognóstico da localização do tumor primário de pacientes com câncer de cólon ressecado estágio III tratados com quimioterapia adjuvante baseada em Fluorouracil (5-FU) com Oxaliplatina e sua relação com o status das enzimas de reparo de DNA e o status das mutações K-RAS, N-RAS e BRAF.								
Pesquisador: Roger Chammas								
Área Temática:								
Versão: 1								
CAAE: 04224618.9.0000.0065								
Instituição Proponente: FUNDACAO FACULDADE DE MEDICINA								
Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO								
DADOS DO PARECER								
Número do Parecer: 3.084.419								
Apresentação do Projeto: <p>O projeto propõe o estudo do câncer colorretal (CCR), que representa a 2ª neoplasia maligna mais comum entre os homens e a 3ª mais frequente nas mulheres. O tratamento atual do CCR baseia-se na exérese do tumor associada à quimioterapia conforme o estadiamento anátomo-patológico, porém recidiva e óbito ocorrem em cerca de 30% dos pacientes após 5 anos. Além do estadiamento TNM, a lateralidade do tumor primário tem impacto no prognóstico dos pacientes, com menor sobrevida global naqueles que apresentam lesão no cólon direito independentemente da presença de mutações BRAF, RAS e de instabilidade de microsatélite. No entanto, não há até o momento estudo semelhante na população brasileira e incluindo pacientes com CCR não metastático.</p>								
Objetivo da Pesquisa: <p>O presente estudo retrospectivo incluirá pacientes adultos (18 anos) tratados com ressecção completa do CCR não metastático (ECIII) e quimioterapia adjuvante com pelo menos 1 ciclo de fluoracil e oxaliplatina entre outubro de 2007 a fevereiro de 2013. Pacientes com tumores retais, tratados com quimiorradioterapia ou que não possuam material biológico armazenado serão excluídos. O projeto tem como objetivos avaliar a lateralidade do CCR em pacientes com estágio ECIII e sua relação com características clínicas dos pacientes, dos tumores ressecados e seu</p>								
<table border="1"><tr><td>Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36</td><td>CEP: 01.246-903</td></tr><tr><td>Bairro: PACAEMBU</td><td></td></tr><tr><td>UF: SP</td><td>Município: SAO PAULO</td></tr><tr><td>Telefone: (11)3893-4401</td><td>E-mail: cep.fm@usp.br</td></tr></table>	Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36	CEP: 01.246-903	Bairro: PACAEMBU		UF: SP	Município: SAO PAULO	Telefone: (11)3893-4401	E-mail: cep.fm@usp.br
Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36	CEP: 01.246-903							
Bairro: PACAEMBU								
UF: SP	Município: SAO PAULO							
Telefone: (11)3893-4401	E-mail: cep.fm@usp.br							
<small>Página 01 de 03</small>								

7.1 Anexo 1- Parecer consubstanciado do CEP da FMUSP (página 2 de 3)

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 3.084.419

estadiamento TNM, e do tratamento adjuvante e sua eficácia e toxicidade. Também será investigada a correlação entre lateralidade do tumor e a ocorrência de mutações BRAF, K-RAS, N-RAS e de instabilidade de microssatélite.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Por se tratar de um estudo retrospectivo utilizando material biológico previamente coletado e armazenado, não há riscos nem benefícios diretos aos pacientes incluídos na pesquisa. Conforme o anexo "tcle" os pesquisadores sugerem que os resultados poderão beneficiar pacientes que apresentem recidiva do tumor.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo relevante por incluir uma população brasileira e propor a avaliação da lateralidade como fator prognóstico independente em pacientes com CCR não metastático.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória encontram-se adequados, salvo observações abaixo.

Recomendações:

As informações presentes no anexo "tcle" a respeito da pesquisa das mutações K-RAS, N-RAS e BRAF e de instabilidade de microssatélite como procedimentos padrões no ICESP e cujos resultados estarão disponíveis à equipe médica do ICESP são relevantes. Sugere-se sua inclusão no projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- Adequar o cronograma do estudo para início somente após aprovação pelo CEP.
- Providenciar assinatura da folha de rosto pelo responsável pela instituição proponente (termo de compromisso).


Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1258710.pdf	27/11/2018 18:46:03		Aceito

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

7.1 Anexo 1- Parecer consubstanciado do CEP da FMUSP (página 3 de 3)

USP - FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FMUSP				
<small>Continuação do Parecer: 3.084.419</small>				
Outros	Comite_Etica_FMUSP.pdf	27/11/2018 18:45:34	Bruno Mendonça Protásio da Silva	Aceito
Outros	Nucleo.pdf	22/11/2018 21:39:59	Bruno Mendonça Protásio da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Patologia.jpg	22/11/2018 21:37:38	Bruno Mendonça Protásio da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	oncologia.pdf	22/11/2018 21:37:00	Bruno Mendonça Protásio da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	22/11/2018 21:36:13	Bruno Mendonça Protásio da Silva	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	22/11/2018 21:30:56	Bruno Mendonça Protásio da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	22/11/2018 21:30:13	Bruno Mendonça Protásio da Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	22/11/2018 21:27:24	Bruno Mendonça Protásio da Silva	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 14 de Dezembro de 2018


Assinado por:
Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador(a))

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br


Página 03 de 03

7.2 Anexo 2- Ciência do serviço de oncologia clínica do ICESP- HC-FMUSP

6



INSTITUTO DO
CÂNCER
DO ESTADO DE
SÃO PAULO
GRUPO HCPA DE SAÚDE



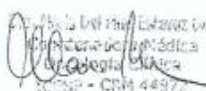
FACULDADE
FACULDADE DE MEDICINA

São Paulo, 04 de 10 de 2018.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o Serviço de Oncologia Clínica está ciente e concorda em participar do estudo no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo "Impacto prognóstico da localização do tumor primário de pacientes com câncer de cólon ressecado estágio III tratados com quimioterapia adjuvante baseada em Fluorouracil (5-FU) com Oxaliplatina e sua relação com o *status* das enzimas de reparo de DNA e o *status* das mutações K-RAS, N-RAS e BRAF", que tem como pesquisador executante Bruno Medonça Protásio da Silva, sob a supervisão do Prof. Roger Chammas.

Atenciosamente;





Associação Brasileira de
Oncologia Clínica
ICESP - CRM 44877

Dra. Maria del Pilar Estevez Diz
Coordenadora Oncologia Clínica ICESP

7.3 Anexo 3- Ciência do serviço de patologia do ICESP- HC-FMUSP

5

 INSTITUTO DO
CÂNCER
DO ESTADO DE
SÃO PAULO
INSTITUTO DE PESQUISA DE SÃO PAULO

 FUNDAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA

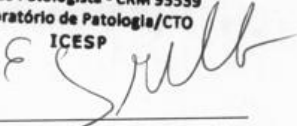
São Paulo, 12 de Setembro de 2018.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o Serviço de Patologia está ciente e concorda em participar do estudo no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo "Impacto prognóstico da localização do tumor primário de pacientes com câncer de cólon ressecado estágio III tratados com quimioterapia adjuvante baseada em Fluorouracil (5-FU) com Oxaliplatina e sua relação com o *status* das enzimas de reparo de DNA e o *status* das mutações K-RAS, N-RAS e BRAF", que tem como pesquisador executante Bruno Medonça Protásio da Silva, sob a supervisão do Prof. Roger Chammas.


Atenciosamente;

Prof. Dr. Evandro Sobroza de Mello
Médico Patologista - CRM 95539
Laboratório de Patologia/CTO
ICESP



Prof. Dr. Evandro Sobroza de Mello
Coordenador Pesquisa Médica
Laboratório de Anatomia Patológica - ICESP

7.4 Anexo 4- Estudo apresentado em parte sob a forma de *Abstract* eletrônico no Congresso Anual da Sociedade Americana de Oncologia Clínica em 2023

 Check for updates

GASTROINTESTINAL CANCER—COLORECTAL AND ANAL

e15622 **Publication Only**

Prognostic impact of primary tumor sidedness in stage III colorectal cancer.

Bruno Mendonça Protasio, Tiago Biachi de Castria, Daniel Fernandes Saragiotto, Renato José Mendonça Natalino, Flávia Regina Rotea Mangone, Jorge Sabbaga, Paulo M Hoff, Roger Chammas; PPG Oncologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (FMUSP). Núcleo de Oncologia da Bahia (NOB)- Grupo Oncoclínicas, Salvador, Brazil; Moffitt Cancer Center, Tampa Bay, FL; Centro Brasileiro de Radioterapia, Oncologia e Mastologia (CEBROM)- Grupo Oncoclínicas, Goiânia, Brazil; Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO)- ICESP- FMUSP, São Paulo, Brazil; Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Departamento de Oncologia- ICESP- FMUSP, São Paulo, Brazil

Background: Primary tumor sidedness (PTS) has been shown to be an independent prognostic factor for patients with metastatic colorectal cancer (CRC), with worse prognosis for right-sided tumors. There are limited data regarding the prognostic impact of PTS in stage III CRC. Objective: The main objective of this study was to analyze the prognostic impact of PTS in stage III CRC. **Methods:** A retrospective and uni-institutional cohort study was performed in a reference center in São Paulo-SP, Brazil. All consecutive patients with stage III CRC and treated with a 5-fluorouracil and oxaliplatin-based chemotherapy regimen (mFLOX regimen) from October 2007 to February 2013 were included. The primary outcome was probability of overall survival (OS) at 5 years stratified by PTS. Secondary outcomes were probability of disease-free survival (DFS) at 5 years stratified by PTS, and analysis of the prognostic impact of clinical and molecular biomarkers. The time-to-event variables were reported by the Kaplan Meier estimation method and prognostic factors associated with OS and DFS were assessed by Cox models. **Results:** 265 patients were included. Transverse colon tumors, multicentric tumors and undetermined primary subsite were later excluded, totaling 234 patients who were classified according to PTS: 95 on the right side (40.6%) and 139 on the left side (59.4%). Median age was 58 and 59 years for right- and left-sided tumors, respectively. For both groups, approximately 67% had stage IIIB. The median follow-up time was 66 months (range: 0-149). The 5-year OS probabilities for right-sided and left-sided tumors were 67% (95% CI: 58%-77%) and 82% (75%-89%), respectively. [Hazard ratio [HR]=2.02, 95% CI: 1.18-3.46; p=0.010]. The 5-year probability of DFS for right-sided and left-sided tumors were 58% (49%-69%) and 65% (58%-74%), respectively. [HR=1.29, 0.84-1.97; p=0.248]. Of the 234 patients, 61 patients (26%) had tissue samples available for DNA sequencing by NGS and immunohistochemical analysis. Of these, 12 patients (19.7%) had a RAS mutation, no patient had a BRAF mutation (V600E) and 6 patients (9.8%) had DNA repair enzyme deficiency (dMMR). No statistically significant difference was identified in the probability of OS and DFS at 5 years when comparing patients with right-sided and left-sided tumors when stratified by RAS mutation status and MMR status. Among patients with right-sided tumors, age >70 years (HR=4.11, 1.67-10.1; p=0.002), pN2 (HR=2.52, 1.23-5.17; p=0.012) and high-risk stage III according to the IDEA trial (HR=2.95, 1.35-6.44; p=0.002) were predictors of worse OS at 5 years. Among patients with left-sided tumors, poorly differentiated histology (HR=3.93, 1.44-10.7; p=0.007) and angiolymphatic invasion (HR=5.23, 1.54-17.8; p=0.008) were predictors of worse OS in 5 years. **Conclusions:** Data indicate a worse prognosis (inferior OS at 5 years) for resected right-sided stage III CRC treated with adjuvant mFLOX regimen. Research Sponsor: Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO)- ICESP- FMUSP, São Paulo-SP, Brasil.

© 2023 by American Society of Clinical Oncology. Visit meetings.asco.org and search by abstract for disclosure information.
 Downloaded from ascopubs.org by 189.59.212.38 on July 8, 2023 from 189.059.212.038
 Copyright © 2023 American Society of Clinical Oncology. All rights reserved.

DOI: 10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.e15622 Journal of Clinical Oncology 41, no. 16_suppl (June 01, 2023) e15622-e15622.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa 2023. Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>.
2. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023;73(1):17-48.
3. Weiser MR. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2018 Jun;25(6):1454-1455.
4. Kuebler JP, Wieand HS, O'Connell MJ, Smith RE, Colangelo LH, Yothers G, Petrelli NJ, Findlay MP, Seay TE, Atkins JN, Zapas JL, Goodwin JW, Fehrenbacher L, Ramanathan RK, Conley BA, Flynn PJ, Soori G, Colman LK, Levine EA, Lanier KS, Wolmark N. Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07. *J Clin Oncol.* 2007;25(16):2198-204.
5. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A; Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med.* 2004;350(23):2343-51.
6. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Bonetti A, Clingan P, Bridgewater J, Rivera F, de Gramont A. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol.* 2009;27(19):3109-16.

7. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, Hill M, Gilberg F, Rittweger K, Schmoll HJ. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(11):1465-71.
8. Schmoll HJ, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, Hill M, Hoersch S, Rittweger K, Haller DG. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid as adjuvant therapy for stage iii colon cancer: final results of the NO16968 Randomized Controlled Phase III Trial. *J Clin Oncol*. 2015;33(32):3733-40.
9. Grothey A, Sobrero AF, Shields AF, Yoshino T, Paul J, Taieb J, Souglakos J, Shi Q, Kerr R, Labianca R, Meyerhardt JA, Vernerey D, Yamanaka T, Boukovinas I, Meyers JP, Renfro LA, Niedzwiecki D, Watanabe T, Torri V, Saunders M, Sargent DJ, Andre T, Iveson T. Duration of adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer. *N Engl J Med*. 2018;378(13):1177-88.
10. André T, Meyerhardt J, Iveson T, Sobrero A, Yoshino T, Souglakos I, Grothey A, Niedzwiecki D, Saunders M, Labianca R, Yamanaka T, Boukovinas I, Vernerey D, Meyers J, Harkin A, Torri V, Oki E, Georgoulas V, Taieb J, Shields A, Shi Q. Effect of duration of adjuvant chemotherapy for patients with stage III colon cancer (IDEA collaboration): final results from a prospective, pooled analysis of six randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol*. 2020;21(12):1620-9.
11. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 2008;358(5):502-11.
12. Cantwell-Dorris ER, O'Leary JJ, Sheils OM. BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(3):385-94.
13. de la Chapelle A. Microsatellite instability. *N Engl J Med*. 2003;349(3):209-10.
14. de la Chapelle A, Hampel H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3380-7.

15. Dasgupta S, Ewing-Graham PC, Groenendijk FH, Stam O, Biermann KE, Doukas M, Dubbink HJ, van Velthuysen MF, Dinjens WNM, Van Bockstal MR. Granular dot-like staining with MLH1 immunohistochemistry is a clone-dependent artefact. *Pathol Res Pract*. 2020;216(1):152581.
16. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, Walsh-Vockley C, Petersen GM, Walsh MD, Leggett BA, Young JP, Barker MA, Jass JR, Hopper J, Gallinger S, Bapat B, Redston M, Thibodeau SN. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol*. 2002;20(4):1043-8.
17. Bufill JA. Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Ann Intern Med*. 1990;113(10):779-88.
18. Stintzing S, Tejpar S, Gibbs P, Thiebach L, Lenz HJ. Understanding the role of primary tumour localisation in colorectal cancer treatment and outcomes. *Eur J Cancer*. 2017;84:69-80.
19. Meza R, Jeon J, Renehan AG, Luebeck EG. Colorectal cancer incidence trends in the United States and United Kingdom: evidence of right- to left-sided biological gradients with implications for screening. *Cancer Res*. 2010;70(13):5419-29.
20. Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz HJ, Innocenti F, Fruth B, Meyerhardt JA, Schrag D, Greene C, O'Neil BH, Atkins JN, Berry S, Polite BN, O'Reilly EM, Goldberg RM, Hochster HS, Schilsky RL, Bertagnolli MM, El-Khoueiry AB, Watson P, Benson AB 3rd, Mulkerin DL, Mayer RJ, Blanke C. Effect of first-line chemotherapy combined with cetuximab or bevacizumab on overall survival in patients with KRAS wild-type advanced or metastatic colorectal cancer: A randomized clinical trial. *JAMA*. 2017;317(23):2392-401.
21. Venook AP, Niedzwiecki D, Innocenti F, Fruth B, Greene C, O'Neil BH, Shaw JE, Atkins JN, Horvath LE, Polite BN, Meyerhardt JA, O'Reilly EM, Goldberg RM, Hochster HS, Blanke CD, Schilsky RL, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Lenz H-J. Impact

of primary (1°) tumor location on overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of CALGB/SWOG 80405 (Alliance). *J Clin Oncol*. 2016;34(15) Suppl. Abstract 2016 ASCO Annual Meeting (suppl; abstr 3504).

22. Schrag D, Weng S, Brooks G, Meyerhardt JA, Venook AP. The relationship between primary tumor sidedness and prognosis in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34(15) Suppl. Abstract 2016 ASCO Annual Meeting (suppl; abstr 3505).

23. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-7.

24. Gavin PG, Colangelo LH, Fumagalli D, Tanaka N, Remillard MY, Yothers G, Kim C, Taniyama Y, Kim SI, Choi HJ, Blackmon NL, Lipchik C, Petrelli NJ, O'Connell MJ, Wolmark N, Paik S, Pogue-Geile KL. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. *Clin Cancer Res*. 2012;18(23):6531-41.

25. Stintzing S, Tejpar S, Gibbs P, Thiebach L, Lenz HJ. Understanding the role of primary tumour localisation in colorectal cancer treatment and outcomes. *Eur J Cancer*. 2017;84:69-80.

26. Devall M, Sun X, Yuan F, Cooper GS, Willis J, Weisenberger DJ, Casey G, Li L. Racial disparities in epigenetic aging of the right vs left colon. *J Natl Cancer Inst*. 2021;113(12):1779-82.

27. Yamauchi M, Morikawa T, Kuchiba A, Imamura Y, Qian ZR, Nishihara R, Liao X, Waldron L, Hoshida Y, Huttenhower C, Chan AT, Giovannucci E, Fuchs C, Ogino S. Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum. *Gut*. 2012;61(6):847-54.

-
28. Wong SH, Yu J. Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(11):690-704.
 29. Wieczorska K, Stolarek M, Stec R. The role of the gut microbiome in colorectal cancer: where are we? where are we going? *Clin Colorectal Cancer*. 2020;19(1):5-12.
 30. Cheng Y, Ling Z, Li L. The intestinal microbiota and colorectal cancer. *Front Immunol*. 2020;11:615056.
 31. Kim J, Lee HK. Potential role of the gut microbiome in colorectal cancer progression. *Front Immunol*. 2022;12:807648.
 32. Gao Z, Guo B, Gao R, Zhu Q, Qin H. Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Front Microbiol*. 2015;6:20.
 33. Sinicrope FA, Mahoney MR, Yoon HH, Smyrk TC, Thibodeau SN, Goldberg RM, Nelson GD, Sargent DJ, Alberts SR; Alliance for Clinical Trials in Oncology. Analysis of molecular markers by anatomic tumor site in stage III Colon Carcinomas from Adjuvant Chemotherapy Trial NCCTG N0147 (Alliance). *Clin Cancer Res*. 2015;21(23):5294-304.
 34. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa E Melo F, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernards R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015;21(11):1350-6.
 35. Loree JM, Pereira AAL, Lam M, Willauer AN, Raghav K, Dasari A, Morris VK, Advani S, Menter DG, Eng C, Shaw K, Broaddus R, Routbort MJ, Liu Y, Morris JS, Luthra R, Meric-Bernstam F, Overman MJ, Maru D, Kopetz S. Classifying colorectal

cancer by tumor location rather than sidedness highlights a continuum in mutation profiles and consensus molecular subtypes. *Clin Cancer Res.* 2018;24(5):1062-72.

36. Protásio BM, Matutino A, Lage LV, Santana I, Ramos R, Sabbaga J, Capareli F, Saragiotto D, Riechelmann R, Hoff PM. Safety and efficacy of a modified FLOX adjuvant regimen for patients with stage III colorectal cancer treated in the community. *Clin Colorectal Cancer.* 2017;16(1):65-72.

37. Malapelle U, Vigliar E, Sgariglia R, Bellevicine C, Colarossi L, Vitale D, Pallante P, Troncone G. Ion Torrent next-generation sequencing for routine identification of clinically relevant mutations in colorectal cancer patients. *J Clin Pathol.* 2015;68(1):64-8.

38. Bruera G, Pepe F, Malapelle U, Pisapia P, Mas AD, Di Giacomo D, Calvisi G, Troncone G, Ricevuto E. KRAS, NRAS and BRAF mutations detected by next generation sequencing, and differential clinical outcome in metastatic colorectal cancer (MCRC) patients treated with first line FIr-B/FOx adding bevacizumab (BEV) to triplet chemotherapy. *Oncotarget.* 2018;9(41):26279-90.

39. Hendriks Y, Franken P, Dierssen JW, De Leeuw W, Wijnen J, Dreef E, Tops C, Breuning M, Bröcker-Vriends A, Vasen H, Fodde R, Morreau H. Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. *Am J Pathol.* 2003;162(2):469-77.

40. de la Chapelle A, Hampel H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(20):3380-7.

41. Taieb J, Tabernero J, Mini E, Subtil F, Folprecht G, Van Laethem JL, Thaler J, Bridgewater J, Petersen LN, Blons H, Collette L, Van Cutsem E, Rougier P, Salazar R, Bedenne L, Emile JF, Laurent-Puig P, Lepage C; PETACC-8 Study Investigators. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab in patients with resected stage III colon cancer (PETACC-8): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(8):862-73.

-
42. Taieb J, Kourie HR, Emile JF, Le Malicot K, Balogoun R, Taberero J, Mini E, Folprecht G, Van Laethem JL, Mulot C, Bouché O, Aparicio T, Michel P, Thaler J, Bridgewater J, Van Cutsem E, Perkins G, Lepage C, Salazar R, Laurent-Puig P; Pan-European Trials in Alimentary Tract Cancer (PETACC)-8 Investigators. Association of prognostic value of primary tumor location in stage III colon cancer with RAS and BRAF mutational status. *JAMA Oncol.* 2018;4(7):e173695.
43. Alberts SR, Sargent DJ, Nair S, Mahoney MR, Mooney M, Thibodeau SN, Smyrk TC, Sinicrope FA, Chan E, Gill S, Kahlenberg MS, Shields AF, Quesenberry JT, Webb TA, Farr GH Jr, Pockaj BA, Grothey A, Goldberg RM. Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. *JAMA.* 2012;307(13):1383-93.
44. Sinicrope FA, Mahoney MR, Yoon HH, Smyrk TC, Thibodeau SN, Goldberg RM, Nelson GD, Sargent DJ, Alberts SR; Alliance for Clinical Trials in Oncology. Analysis of molecular markers by anatomic tumor site in stage III Colon Carcinomas from Adjuvant Chemotherapy Trial NCCTG N0147 (Alliance). *Clin Cancer Res.* 2015;21(23):5294-304.
45. Innocenti F, Ou FS, Qu X, Zemla TJ, Niedzwiecki D, Tam R, Mahajan S, Goldberg RM, Bertagnolli MM, Blanke CD, Sanoff H, Atkins J, Polite B, Venook AP, Lenz HJ, Kabbarah O. Mutational analysis of patients with colorectal cancer in CALGB/SWOG 80405 identifies new roles of microsatellite instability and tumor mutational burden for patient outcome. *J Clin Oncol.* 2019;37(14):1217-27.
46. Dienstmann R, Mason MJ, Sinicrope FA, Phipps AI, Tejpar S, Nesbakken A, Danielsen SA, Sveen A, Buchanan DD, Clendenning M, Rosty C, Bot B, Alberts SR, Milburn Jessup J, Lothe RA, Delorenzi M, Newcomb PA, Sargent D, Guinney J. Prediction of overall survival in stage II and III colon cancer beyond TNM system: a retrospective, pooled biomarker study. *Ann Oncol.* 2017;28(5):1023-31.
47. Venook AP, Ou FS, Lenz HJ, Kabbarah O, Qu X, Niedzwiecki D, Zemla T, Goldberg RM, Hochster HS, O'Neil BH, Sanoff HK, Mayer RJ, Bertagnolli MM,

Blanke CD, Innocenti F. Primary tumor location as an independent prognostic marker from molecular features for overall survival in patients with metastatic colorectal cancer: analysis of CALGB/SWOG 80405 (Alliance). *J Clin Oncol* 35, 2017;35(15) Suppl. Abstract 2017 ASCO Annual Meeting (suppl; abstr 3503).

48. Schmol HJ, Cartwright T, Tabernero J, Nowacki MP, Figer A, Maroun J, Price T, Lim R, Van Cutsem E, Park YS, McKendrick J, Topham C, Soler-Gonzalez G, de Braud F, Hill M, Sirzén F, Haller DG. Phase III trial of capecitabine plus oxaliplatin as adjuvant therapy for stage III colon cancer: a planned safety analysis in 1,864 patients. *J Clin Oncol*. 2007;25(1):102-9.