



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS – UFT
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CERB-B2, P53 E
INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES NO ADENOCARCINOMA COLORRETAL NO
ESTADO DO TOCANTINS**

VIRGILIO RIBEIRO GUEDES

**PALMAS – TO
2020**

VIRILIO RIBEIRO GUEDES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEINAS CERB-B2, P53 E INSTABILIDADE DE
MICROSSATÉLITES NO ADENOCARCINOMA COLORRETAL NO ESTADO DO
TOCANTINS**

Tese de doutorado apresentada ao
Curso de Doutorado do Programa de
Pós-Graduação em Biodiversidade e
Biotecnologia da Rede BIONORTE, na
Universidade Federal do Tocantins,
como requisito parcial para a obtenção
do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cristina da
Silva Pranchevicius

**PALMAS - TO
MARÇO / 2020**

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação

Guedes, Virgílio Ribeiro
Avaliação da Expressão das Proteínas Cerb-B2, P53 e Instabilidade de Microssatélites no Adenocarcinoma Colorretal no Estado do Tocantins / Virgílio Ribeiro Guedes – Palmas: TO, 2020.

107 f.: il.

Orientação: Prof^a. Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede Bionorte, 2020

CDU xxx

VIRGILIO RIBEIRO GUEDES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CERB-B2, P53 E INSTABILIDADE DE
MICROSSATÉLITES NO ADENOCARCINOMA COLORRETAL NO ESTADO DO
TOCANTINS.**

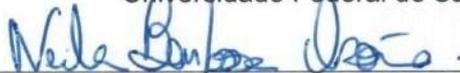
Tese de doutorado apresentada ao
Curso de Doutorado do Programa de
Pós-Graduação em Biodiversidade e
Biotecnologia da Rede BIONORTE, na
Universidade Federal do Tocantins,
como requisito parcial para a obtenção
do Título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em: 18 / 03 / 2020

Banca examinadora



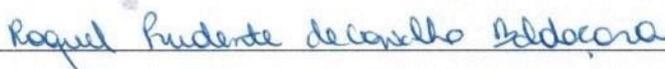
Prof. Dra. Maria Cristina Pranchevicius
Universidade Federal de São Carlos



Prof. Dra. Neila Osório Barbosa
Universidade Federal do Tocantins - UMA



Prof. Dr. Luiz Sinesio Sousa Neto
Universidade Federal do Tocantins – Medicina



Prof. Dra. Raquel Prudente Baldaçara
Universidade Federal do Tocantins – Medicina



Prof. Dr. Raphael Sânzio Pimenta
Universidade Federal do Tocantins - Bionorte

À minha esposa, Ana Carolina pela
dedicação, carinho, amizade e amor
incondicional, sempre fiel e companheira.

Às minhas filhas Maria Clara, Cecília e
Júlia, que fazem tudo valer a pena.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Laboratório CDA PALMAS e a todas as pessoas que colaboraram de modo relevante, especialmente ao amigo Hallyson, cuja dedicação e assistência foram essenciais para a seleção dos casos, execução e conclusão dos exames de imunoistoquímica.

À Natália Ferreira Bueno, Victor Vargas de Oliveira, Luca Bontempo, Gabriela Costa Jácome, Elaine de Almeida Lustosa, Laure Darelle e Viviane Bangoyi Nguimbi que me ajudaram na coleta de dados e seleção de artigos.

À Andreia Cristina Travassos da Costa, que me ajudou na organização e estatística.

E por fim, a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para realização deste projeto.

Muito obrigado!

“ Qual a mais difícil de todas as coisas?... É aquela que lhe parece a mais fácil; Ver com os teus olhos, o que está diante deles.”

Johann Goethe

GUEDES, Virgilio Ribeiro. **Avaliação da expressão das proteínas Cerb-B2, P53 e Instabilidade de Microssatélites no Adenocarcinoma Colorretal no Estado do Tocantins**. 2019. 106f. Tese (Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE) - Universidade Federal de Tocantins, Palmas, 2019.

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é uma das neoplasias mais frequentes no mundo. No Brasil ainda existe muito atraso no diagnóstico e tratamento, sendo o CCR diagnosticado em estádios avançados associados a altos índices de mortalidade. A instabilidade de microssatélites (MSI) é um importante fator de impacto prognóstico com um significativo potencial na classificação dos pacientes para a quimioterapia. Outros marcadores moleculares que mostram o estado de alterações e mutações são as proteínas cerb-B2, p53 que estão sendo atualmente muito usados para orientar o prognóstico e tratamento individualizado do CCR. Deste modo, o objetivo desse trabalho foi relacionar a expressão imunohistoquímica dos marcadores p53, cerb-B2 e MSI com parâmetros clínicos e patológicos em indivíduos com CCR no Estado do Tocantins. Para isso, foi realizado estudo transversal, no período de março de 2017 a março de 2019 com portadores de CCR submetidos a exame anatomopatológico e imunohistoquímico. Para o estudo imunohistoquímico utilizou-se os marcadores MSI, cerb-B2 e p53. A classificação histológica seguiu os critérios da Organização Mundial da Saúde. O Teste de Fisher foi utilizado para avaliar as diferenças entre as proporções dos marcadores p53, cerb-B2 e MSI com parâmetros clínicos e patológicos. Considerou-se significância estatística valores de $p \leq 0,05$. O estudo incluiu 77 pacientes com média de idade de $60,1 \pm 14,8$ anos. Destaca-se que a idade foi um fator risco para CCR, a presença do tumor aumentou quanto maior foi a faixa etária, e em mais de 50% dos casos ocorreu em indivíduos com mais de 50 anos. A frequência de CCR no sexo masculino (57,2%) foi ligeiramente maior do que no sexo feminino (42,8%). O grau de diferenciação celular do CCR é um fator importante para determinar o prognóstico e neste estudo o tipo histopatológico mais frequente foi adenocarcinoma em 73 casos (94,8%). A frequência de expressão imunohistoquímica dos marcadores cerb-B2, p53 e MSI em indivíduos com CCR foi de 2,6%, 57,1% e 62,3%, respectivamente. O marcador p53 relacionou-se com a idade dos indivíduos, enquanto os marcadores cerb-B2 e MSI não apresentaram associação estatística com os parâmetros clínicos e morfológicos avaliados. Além disso, o tamanho do tumor não teve relação com idade, grau de diferenciação e invasão linfática. A expressão de MSI não teve associação significativa com a expressão do p53 e do cerb-B2, pois esses marcadores podem atuar em vias carcinogênicas distintas. Dessa forma, conclui-se que a expressão do MSI foi a mais frequente entre os indivíduos com CCR no estado do Tocantins, enquanto o marcador p53 relacionou-se com a idade dos pacientes.

Palavras-chave: Carcinoma colorretal; instabilidade de microssatélites; P53; cerb-B2; Imuno-histoquímico.

GUEDES, Virgilio Ribeiro. **Avaliação da expressão das proteínas Cerb-B2, P53 e Instabilidade de Microssatélites no Adenocarcinoma Colorretal no Estado do Tocantins.** 2019. 106f. Tese (Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE) - Universidade Federal de Tocantins, Palmas, 2019.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common neoplasms in the world. In Brazil there is a delay in diagnosis and treatment of CRC, what cause a high mortality rates. Microsatellite instability (MSI) is an important prognostic factor, and it has a significant potential in the classification of patients for chemotherapy treatment. Other molecular markers in CCR are cerb-B2 and p53 proteins, that are currently widely used to guide the prognosis and individualized treatment. Thus, the aim of this study was to correlate the immunohistochemical expression of p53, cerb-B2 and MSI markers to clinical and pathological parameters, in people with CRC in the state of Tocantins. For this, a cross-sectional study was performed between March 2017 and March 2019. Colorectal samples were submitted to anatomopathological and immunohistochemical examination to detection of CCR. The immunohistochemical study was performed for the MSI, cerb-B2 and p53 markers. The histological classification used was the proposed by the World Health Organization. Fisher's test was performed to evaluate the differences between the proportions of p53, cerb-B2 and MSI markers with clinical and pathological parameters. Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant. The study included 77 patients with mean age of 60.1 ± 14.8 years. It stands out that age was a risk factor for CRC because tumor presence increased with age, and more than 50% of cases occurred in individuals older than 50 years. The frequency of CRC in males (57.2%) was slightly higher than in females (42,8%). The degree of cell differentiation of CRC is an important factor in determining the prognosis. In this study, the most common histopathological type was adenocarcinoma in 73 cases (94.8%). The frequency of immunohistochemical expression of cerb-B2, p53 and MSI markers in CRC individuals was 2.6%, 57.1% and 62.3%, respectively. The p53 marker was related to individuals age, while the cerb-B2 and MSI markers had no statistical association with the clinical and morphological parameters evaluated. In addition, tumor size was not related to age, degree of differentiation and lymphatic invasion. The expression of MSI had no significant association with the expression of p53 and cerb-B2, since these markers can work in different carcinogenic pathways. Thus, it was concluded that MSI expression was the most frequent among individuals with CRC in the state of Tocantins, while the p53 marker was related to the patient's age.

Keywords: Colorectal cancer; microsatellite instability; P53; Cerb-B2; Immunohistochemical.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência mundial de carcinoma colorretal (idade ajustada de acordo com a população padrão mundial, por 100.000) em 2012.....	16
Figura 2. Mortalidade mundial por carcinoma colorretal (idade ajustada de acordo com a população padrão mundial, por 100.000) em 2012.	17
Figura 3. Estadiamento do câncer pela American Joint Committee on Cancer.....	24
Figura 4. Via supressora.....	26
Figura 5. Via mutadora.....	27
Figura 6. Imunohistoquímica positiva para: A) cerb-B2, B) p53 e C) MSI	48
Figura 7. Classificação TNM de indivíduos com câncer colorretal. Estado do Tocantins, 2017-2019.....	52
Figura 8. Distribuição da expressão imunoistoquímica dos marcadores p53, cerb-B2, a instabilidade de microssatélites (MSI) de indivíduos com câncer colorretal.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas e patológicas de indivíduos com câncer colorretal. Estado do Tocantins, 2017-2019.	43
Tabela 2 – Distribuição dos indivíduos com câncer colorretal de acordo com o tamanho do tumor e características clínicas. Estado do Tocantins, 2017-2019.	45
Tabela 3 – Distribuição da expressão imunoistoquímica do marcador cerb-B2 segundo características clínicas e patológicas de indivíduos com câncer colorretal. Estado do Tocantins, 2017-2019.	47
Tabela 4 – Distribuição da expressão imunoistoquímica do marcador p53 segundo características clínicas e patológicas de indivíduos com câncer colorretal. Estado do Tocantins, 2017-2019.	48
Tabela 5 – Distribuição da expressão imunoistoquímica da instabilidade de microssatélites (MSI) segundo características clínicas e patológicas de indivíduos com câncer colorretal. Estado do Tocantins, 2017-2019.	49
Tabela 6 – Distribuição da expressão imunoistoquímica dos marcadores p53, cerb-B2, a instabilidade de microssatélites (MSI) de indivíduos com câncer colorretal. Estado do Tocantins, 2017-2019.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS - Ácido Acetil Salicílico
AINEs - anti-inflamatórios não esteroides
AJCC - American Joint Committee on Cancer
APC - Adenomatous Polyposis Coli
BRAF - Mutação do Gene Raf
CCR - Câncer Colorretal
Cerb-B2 - Mutação do Oncogenes
CIMP - Fenótipo Metilador das Ilhotas
CpG - Citosina-phosphate-Guanina
COX-2 - Enzima ciclooxigenase-2
DUHS - Dow University of Health Sciences
FAP - Síndrome Polipose Adenomatose Familiar
FDA - Food and Drug Administration
5-FU - 5-Fluorouracil
HNPCC - Câncer de Cólon Hereditário Não Associado à Polipose -
Síndrome de De Lynch).
ICG-HNPCC - International Collaborative Group on Hereditary Non-polyposis
Colorectal Cancer
IDH - Índice de Desenvolvimento Humano
IHQ - Imunohistoquímica
INCA - Instituto Nacional do Câncer
IARC - International Agency for Research on Cancer
KRAS - Mutação do Gene Ras
MGMT - O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase
MLH1 - , Instabilidade de Microsatélite Tipo 1
MLH1 - Mutl Homolog 1
MLH3 - Mutl Homolog 3
MMR - Genes de Reparo de Mal Pareamento
MSH2 - Instabilidade de Microsatélite Tipo 2
MSH2 - Muts Homolog 2
MSH3 - Muts Homolog 3
MSH6 - Instabilidade de Microsatélite Tipo 6
MSI - Instabilidade de Microsatélite
MSI-H - Alta Instabilidade de Microsatélite
MSI-L - Baixa Instabilidade de Microsatélite

MSS - Ausência de Instabilidade de Microssatélite

MSS - Microssatélite Estável

NCI - National Cancer Institute

OMS - Organização Mundial de Saúde

P53 - Mutação do Oncogenes

PAF - Polipomatose Adenomatosa Familiar

PMS1 - Postmeiotic Segregation Increased 1

PMS2 - Postmeiotic Segregation Increased 2

RER - Replication Error

TNM - Tumor / Linfonodo / Metástase

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	viii
RESUMO	x
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
SUMÁRIO	11
1 – INTRODUÇÃO	13
2 - REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 - CARCINOMA COLORRETAL	16
2.1.1 – Aspectos Epidemiológicos	17
2.1.2 – Fatores de risco	18
2.1.3 – Prevenção farmacológica	19
2.1.4 - Características morfológicas	20
2.2 – ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DO CÂNCER COLORRETAL	21
2.2.1 - Avaliação histológica	21
2.2.2 - Classificação Tumor / Linfonodo / Metástases (TNM)	22
2.2.3 – Estudo dos Linfonodos	24
2.2.4 - Tamanho tumoral	25
2.3 - ALTERAÇÕES GENÉTICAS (CARCINOGENESE COLÔNICA)	25
2.3.1 - Via supressora (ou do Adenomatous Polyposis Coli / beta-catenina)	26
2.3.2 - Via mutadora (ou via de instabilidade de microsátélites)	27
2.3.3 - Eventos Epigenéticos	28
2.4 - CÂNCER COLORRETAL ESPORÁDICO	28
2.5 – CÂNCER COLORRETAL HEREDITÁRIO	29
2.5.1 - Síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar	29
2.5.2 - Câncer Colorretal Hereditário Não Polipose (HNPCC)	29
2.5.3 - Síndrome de Turcot	31
2.5.4 - Síndrome de Gardner	31
2.6 – ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO	32
2.6.1 - Instabilidade de Microsátélites.	32
2.6.2 - Gene Tp53	34
2.6.3 - Gene Cerb-B2	36
3 - OBJETIVOS	38

3.1 - OBJETIVO GERAL	38
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 – METODOLOGIA	39
4.1 - CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA	39
4.2 – POPULAÇÃO	39
4.3 – DADOS	39
4.4 – PROCESSAMENTO DO MATERIAL	40
4.4.1- Fixação	40
4.4.2 - Clivagem	41
4.4.3 - Processamento Histológico	42
4.5 – CORTES HISTOLÓGICOS	44
4.6 – COLORAÇÃO E MONTAGEM	45
4.7 – CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA	45
4.8 - ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO	47
5 - RESULTADOS	50
6 - DISCUSSÃO	59
7 – CONCLUSÃO	64
8 - REFERÊNCIAS	65
9 – APÊNDICES	74
9.1 - CAPÍTULO DE LIVRO	74
9.1.1 PRINCIPAIS ASPECTOS GENÉTICOS E MARCADORES MOLECULARES DO CÂNCER COLORRETAL.	74
9.2 - ARTIGOS PUBLICADOS	90
9.2.1 - AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA P53 NO ADENOCARCINOMA COLORRETAL - REVISÃO BIBLIOGRÁFICO	90
9.2.2 - EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MUTANTES DO KRAS NO ADENOCARCINOMA COLORRETAL – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	97
9.3 COMPROVANTES DE ACEITAÇÃO DO CAPÍTULO DE LIVRO E ARTIGO	104
9.3.1. Capítulo de livro	104
9.3.2 Artigos publicados	105
9.4 APROVAÇÕES DO CEP	107

1 – INTRODUÇÃO

O carcinoma colorretal (CCR) é uma neoplasia que pode acometer qualquer área dos segmentos do cólon e do reto, pode possuir aspectos clínico-patológicos múltiplos e não possui sintomas ou sinais patognomônicos (CUTAIT; FARIAS, 2016).

O CCR apresenta-se como um problema de saúde pública de escala mundial, embora sua incidência varie bastante nos diferentes países, os maiores valores são encontrados nos continentes mais ricos ou industrializados, como Oceania (Austrália), América do Norte e parte da Europa, enquanto África, Ásia (Índia) e América do Sul apresentam valores menores (STEWART *et al.*, 2014).

Além da incidência, o CCR é um tumor com elevadas taxas de mortalidade (SENOL *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2017) tanto no ocidente quanto no oriente. As neoplasias colorretais representam uma causa importante de letalidade, configurando de 10% a 20% de todos os óbitos, e o índice de sobrevivência geral inferior a 40%. Mesmo diante dos aperfeiçoamentos do diagnóstico e no tratamento do câncer colorretal, as taxas persistem quase inalteradas (INCA, 2019).

Em 2018, dados provenientes dos Registros de Câncer do Instituto Nacional de Câncer (INCA) apontam 17.380 casos novos de CCR, correspondendo a 8,1% dos casos de câncer em homens e 18.980 novos casos em mulheres, o que corresponde a 9,4% dos casos de câncer em mulheres. Nos homens o CCR foi o 3º mais frequente em 2018, depois de câncer de próstata e traqueia, brônquio e pulmão. Já nas mulheres, foi o segundo mais incidente, depois do câncer de mama e a frente da incidência do câncer de colo de útero (INCA, 2019).

No que se refere a mortalidade, em 2017 o CCR foi responsável por 9.207 óbitos em homens, 8% da mortalidade por câncer, ainda atrás de câncer de traqueia, brônquios e pulmões e próstata. Nas mulheres, foi responsável 9.660 óbitos por câncer (9,3%) depois de óbitos por câncer de mama e traqueia, brônquios e pulmões (INCA, 2019).

Na região centro-oeste, em 2018 o CCR foi responsável por 8,5% dos casos de câncer nos homens e 10,1% dos casos de câncer nas mulheres. Nos homens sua incidência vem depois dos casos de câncer de próstata e traqueia, brônquio e pulmão e nas mulheres depois depois do câncer de mama e colo do útero (INCA, 2019).

Na região nordeste, os homens foram acometidos pelo CCR em 5,2% dos casos de câncer, ocupando a 4ª posição em relação a incidência de câncer, atrás de câncer de próstata, estômago, traqueia, brônquios e pulmão e nas mulheres ocupou a 3ª posição com 6,2% dos casos, com incidência inferior aos casos de câncer de mama e colo do útero (INCA, 2019).

A região norte segue padrão parecido ao da região nordeste, sendo o CCR o 4º mais frequente com incidência de 4,8% dos casos de câncer. Nas mulheres, o CCR ocupa também a terceira posição, responsável por 7,1% de todos os casos de câncer (INCA, 2019).

Na região Sudeste o padrão se modifica e o CCR nos homens torna-se o segundo mais frequente no ano de 2018, com incidência de 10,4% dos casos de câncer, depois dos casos de câncer de próstata. Da mesma forma foi o segundo mais incidente nas mulheres (11,2% dos casos), depois do câncer de mama (INCA, 2019).

Por fim, na região Sul foi o terceiro mais frequente tipo de câncer nos homens (6,7% dos casos) depois de câncer de próstata e traqueia, brônquios e pulmão. Nas mulheres ocupa a segunda incidência de câncer (9% dos casos), depois do câncer de mama (INCA, 2019).

Sobre mortalidade por regiões, as regiões Norte e Nordeste tem apresentado um aumento na mortalidade por CCR entre os anos de 1996 e 2012 tanto em homens quanto em mulheres (OLIVEIRA *et al.*, 2018). No que se refere especificamente ao estado do Tocantins, que possui uma população de 1.572.866 habitantes (IBGE, 2019), em 2018 o CCR apresentou uma taxa de 4,48 casos a cada 100 mil e em mulheres 8,25 casos a cada 100 mil. Oliveira *et al.* (2018), destacam um aumento significativo nas taxas de mortalidade por CCR no estado do Tocantins, sendo o quarto estado com maior incremento na taxa de mortalidade nos homens (0,21 casos/ano) e o segundo nas mulheres (0,18 casos/ano). Os autores relatam que diferenças quanto às taxas de mortalidade do CCR, assim como a evolução temporal, segundo estados e regiões podem ser reflexo das desigualdades socioeconômicas ao acesso aos serviços de saúde, que estão diretamente relacionadas aos fatores de risco para o CCR. Esses autores destacam que as diferenças nas taxas de mortalidade podem advir do sub-registro e das mudanças no perfil populacional dos estados brasileiros (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Segundo Neves *et al.* (2017), que avaliaram os tipos de câncer mais prevalentes e a ocorrência de óbitos em indivíduos internados por câncer no período de 2010 a 2015 no Hospital Geral Público de Palmas (maior hospital público do Tocantins) o CCR foi a 8ª causa mais frequente de internação, totalizando 5,32% de todas as internações por câncer nesse período. Em relação a mortalidade por câncer apresentada nesse estudo, 5,16% das mortes por câncer no Hospital Geral Público de Palmas de 2010 a 2015 foram decorrentes do CCR (NEVES *et al.*, 2017).

Em relação ao perfil dos pacientes acometidos por CCR, Valadão *et al.* (2010), destacam que apesar de um bom conhecimento a respeito do CCR e da ampliação da chance de sobrevida decorrente de rastreamento, cirurgias, quimioterapia e radioterapia, esta realidade não se aplica de maneira uniforme no Brasil. Esses mesmos autores encontraram em seu estudo que 70% dos casos de CCR foram diagnosticados já em estádios tardios e

destacam a necessidade de um melhor restreamento e diagnóstico precoce para essa condição. Um diagnóstico precoce do CCR favorece um bom prognóstico (OUAKRIM *et al.*, 2015). Dessa forma, a organização da rede assistencial quanto à prevenção, à detecção e ao tratamento oportuno podem levar a um consequente aumento da sobrevida dos pacientes (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Para estabelecer o diagnóstico precoce e um melhor tratamento destacam-se o estudo dos marcadores tumorais, que são produtos moleculares secretados por tecido neoplásico, detectáveis em células e fluidos orgânicos que são capazes de indicar presença, extensão, resposta ao tratamento e presença de recorrência da neoplasia (HÜNERBEIN, 1998).

Deste modo, a identificação de marcadores moleculares no panorama atual podem impactar significativamente no conhecimento, possibilitando tratamentos mais individualizados, seja cirúrgico, por quimioterapia ou radioterapia (OLIVEIRA; FONSECA, 2011).

No CCR, dentre os marcadores moleculares destacam-se: a instabilidade de microssatélites (MSI), que ocorre quando há alterações no pareamento do DNA e alterações nos genes de reparo de mal pareamento (MMR), e que assumem um importante papel para o prognóstico com um significativo potencial na classificação dos pacientes para a quimioterapia (MLECNIK *et al.*, 2016; GUEDES; PRANCHEVICIUS, 2019). A proteína cerb-B2 e p53 também assumem o papel de protagonistas para determinar o prognóstico e tratamento do CCR, possibilitando a identificação de alterações moleculares e mutações das vias de carcinogênese (COHEN *et al.*, 2017; CICHENAS *et al.*, 2017; SINICROPE *et al.*, 2015; WON *et al.*, 2017, GUEDES, *et al.*, 2019).

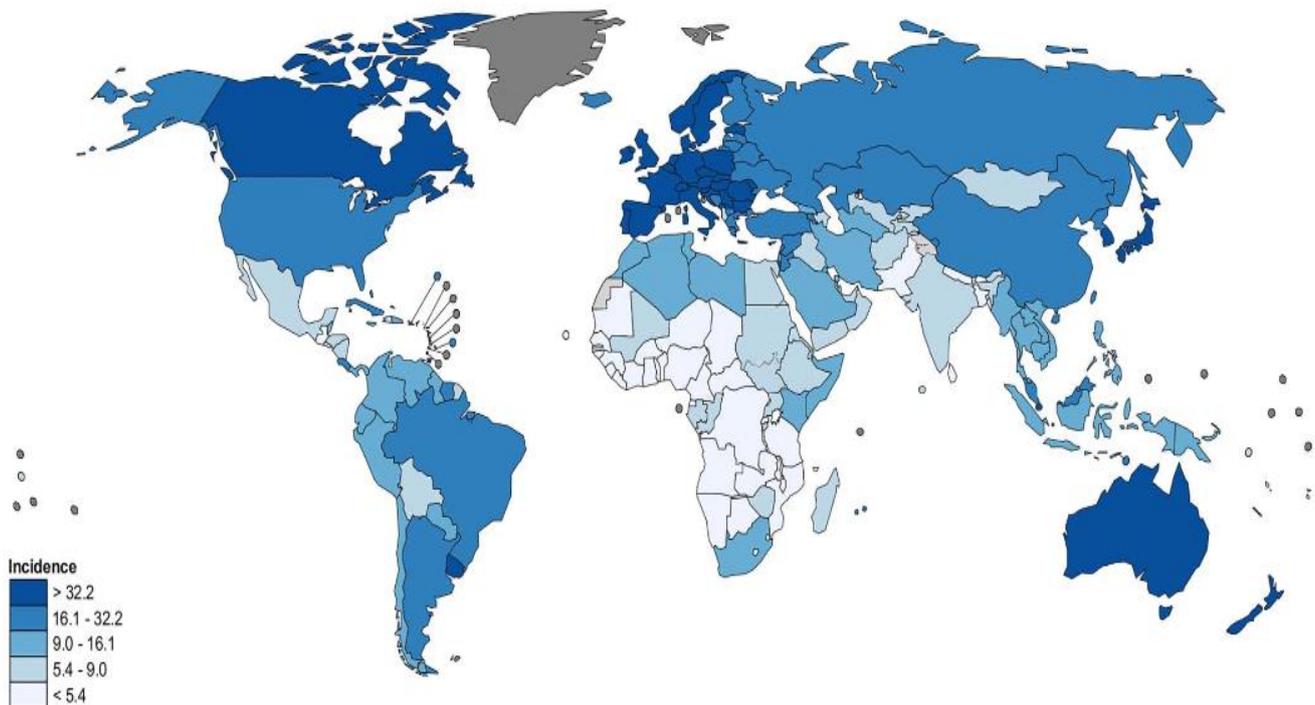
Diante desse cenário, destaca-se a importância do estabelecimento de medidas que favoreçam o diagnóstico precoce e um tratamento direcionado aos indivíduos acometidos pelo CCR. Além disso, é sabido que a oferta de serviços e programas de rastreamento de câncer é desigual no território brasileiro (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Nesse sentido, até o presente estudo, não foram encontrados dados relacionados especificamente ao perfil de pacientes com CCR no estado do Tocantins, nem mesmo sobre o perfil de expressão de marcadores tumorais que têm demonstrado grande relevância para o diagnóstico e tratamento do CCR. Dessa forma, este estudo mostra as características clínicas e patológicas de indivíduos com CCR no estado do Tocantins e qual a relação dessas com a expressão imunohistoquímica dos marcadores p53, cerb-B2 e MSI.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - CARCINOMA COLORRETAL

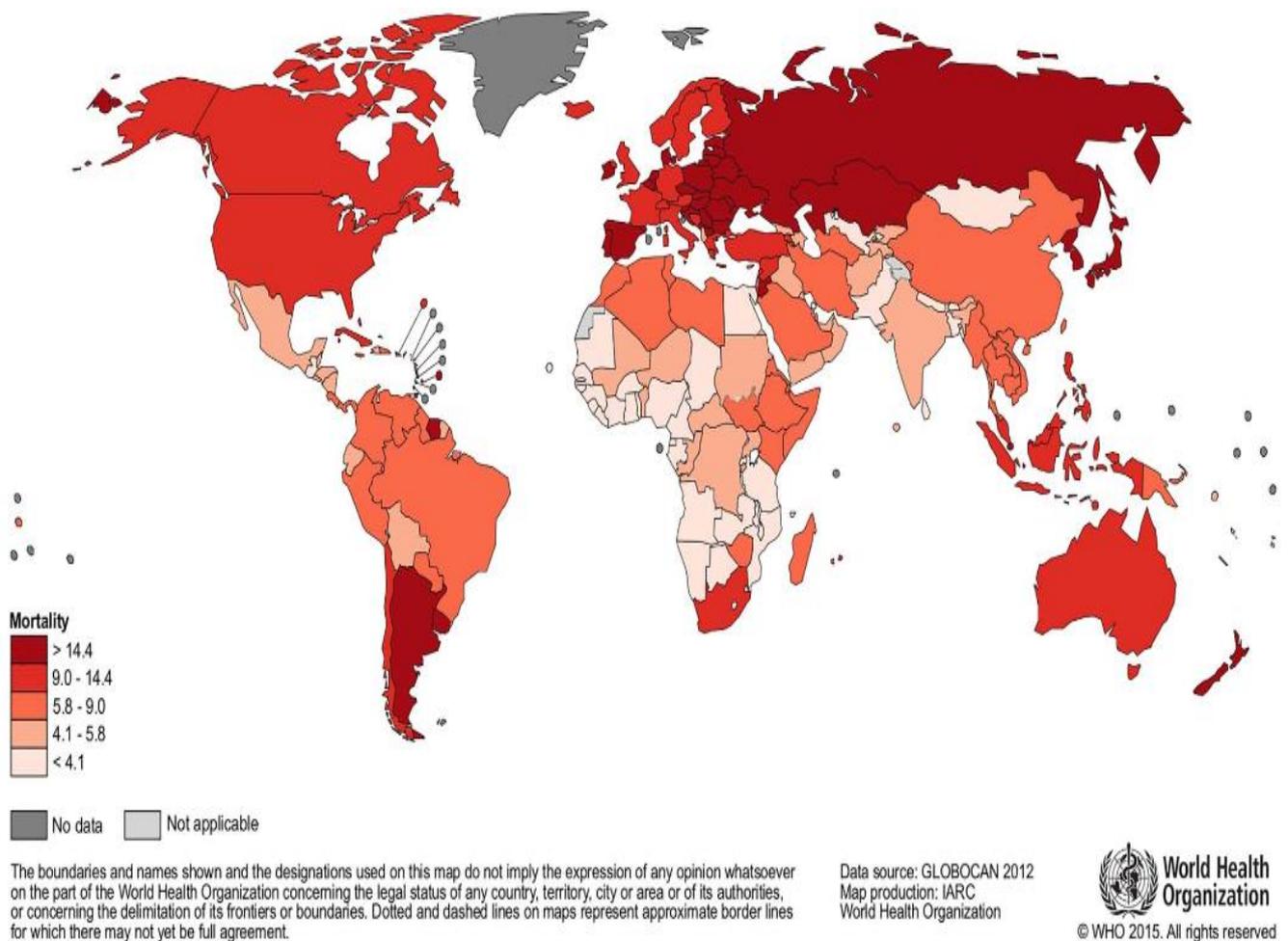
O CCR é um processo proliferativo maligno que pode acometer qualquer parte do segmento do intestino grosso, com maior prevalência nos adultos de ambos os sexos (SENOL *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2017). É uma patologia composta de vários aspectos clínico-patológicos, com localizações múltiplas, não possuindo sinais ou sintomas clínicos específicos ou patognomônicos, porém tem elevadas taxas de incidência e mortalidade (SENOL *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2017). Essas taxas variam amplamente no mundo e estão relacionadas ao índice de desenvolvimento humano (IDH) (ARNOLD *et al.*, 2016) (Figura 1).

Figura 1 – Incidência mundial de carcinoma colorretal (idade ajustada de acordo com a população padrão mundial, por 100.000) em 2012.



Fonte: Ferlay *et al.*, 2013.

Figura 2 – Mortalidade mundial por carcinoma colorretal (idade ajustada de acordo com a população padrão mundial, por 100.000) em 2012.



Fonte: Ferlay *et al.*, 2013.

2.1.1 – Aspectos Epidemiológicos

Em alguns países desenvolvidos, o CCR é o segundo tipo de carcinoma mais comum em termos de incidência (BEPA, 2009). O fato de sua história natural ser bem conhecida, com uma lesão precursora que, após um tempo, normalmente superior a dez anos, cresce e se transforma em uma neoplasia maligna, torna esta doença passível de identificação, ressecção e, portanto, de prevenção através de provas de rastreamento populacional (BEPA, 2009).

O CCR apresenta ampla distribuição pelo mundo, mas a sua incidência é mais alta nos Estados Unidos da América e nos países da Europa Ocidental (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Tem pico de incidência entre 60 e 79 anos, mas ocorre também antes dos 50 anos (menos de 20% dos casos) e, nesses casos, deve-se suspeitar de outras condições clínicas (CAMPOS, 2017).

Nos Estados Unidos em 2019 as estimativas da *American Cancer Society* para o número de casos de câncer colorretal são de 101.420 novos casos de câncer de cólon e 44.180 novos casos de câncer reto (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Em geral, o risco de desenvolver um CCR é de aproximadamente 1 em 22 (4,49%) para homens e 1 em 24 (4,15%) para mulheres (FERLAY et al., 2013). Este risco é ligeiramente menor nas mulheres do que nos homens e outros fatores também podem afetar o risco de desenvolver o CCR. Em relação a mortalidade, nos Estados Unidos, o CCR é a terceira principal causa de mortes relacionadas ao câncer em homens e mulheres, e a segunda causa mais comum de morte por câncer quando homens e mulheres são combinados. Espera-se que cause cerca de 51.020 mortes durante 2019 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer a estimativa para cada ano do biênio 2018-2019, é de 17.380 de novos casos de CCR para os homens e de 18.980 para mulheres (INCA, 2018). Esses valores correspondem a um risco estimado de 16,83 casos novos a cada 100 mil homens e 17,90 para cada 100 mil mulheres. E ainda segundo o INCA em 2016, este era o terceiro tipo de câncer mais frequente em homens e o segundo entre as mulheres, com o número de mortes de 15.415 casos; sendo 7.387 em homens e 8.024 em mulheres (INCA, 2018). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CCR em homens é o segundo mais frequente na região Sudeste (23,29/100 mil), terceiro nas regiões Sul (22,17/100 mil) e Centro-Oeste (16,95/100 mil), ocupando a quarta posição nas regiões Nordeste (7,98/100 mil) e Norte (4,97/100 mil). Para as mulheres, é o segundo tipo de tumor mais frequente nas regiões Sudeste (23,86/100 mil) e Sul (22,92/100 mil) e nas regiões Centro-Oeste (17,98/100 mil), Nordeste (9,52/100 mil) e Norte (7,38/100 mil), é o terceiro mais frequente.

2.1.2 – Fatores de risco

O risco de desenvolver CCR depende de vários fatores que podem ser classificados em estilo de vida ou fatores comportamentais e fatores determinantes genéticos (LABIANCA et al., 2013).

A idade é considerada um importante fator de risco, com quase 90% dos casos ocorrendo depois dos 50 anos (INCA, 2018).

Atualmente sabe-se que setenta e cinco por cento dos cânceres de cólon são esporádicos e não estão associados a síndromes hereditárias (DEVITA; LAWRENCE; ROSENBERG, 2014).

Existem diferenças geográficas na incidência do CCR, porém com um aumento da

incidência em todos os países, o que podem refletir a adoção de hábitos alimentares em comum da humanidade, devido a globalização. (ARNOLD *et al.*, 2016). Dentre os fatores dietéticos, os que mais se relacionam com o aparecimento do CCR estão a ingestão energética excessiva, baixa ingestão de fibras vegetais inabsorvíveis, alta ingestão de gorduras e de carboidratos refinados, assim como o consumo elevado de carnes vermelhas e baixa ingestão de vitaminas (BRASILEIRO FILHO, 2017).

Apesar dessa relação entre hábitos alimentares e CCR estar estabelecida, o mecanismo pelo qual os hábitos alimentares aumentam os riscos, permanece ainda pouco esclarecido. Uma hipótese é que o grande consumo de alimentos gordurosos aumenta a síntese hepática de colesterol e ácidos biliares, que podem ser transformados em carcinógenos por bactérias intestinais (FAUSTO; KUMAR; ABBAS, 2016). Uma dieta com uma quantidade reduzida de fibras leva à diminuição do volume das fezes, fazendo com que microbiota intestinal fique alterada. Esta alteração pode aumentar a síntese de subprodutos oxidativos potencialmente tóxicos do metabolismo bacteriano, que ficam em contato com a mucosa do cólon durante muito tempo e levam a uma transformação neoplásica (FAUSTO; KUMAR; ABBAS, 2016).

No CCR, os fatores de risco ligados ao estilo de vida e hábitos alimentares, podem ser modificáveis como o consumo de bebidas alcoólicas, a baixa ingestão de frutas e vegetais, o alto consumo de carnes vermelhas e de alimentos processados, a obesidade, o tabagismo e a inatividade física (BOUVARD *et al.*, 2015; FEDIRKO *et al.*, 2011; HARRISS *et al.*, 2009; WALTER *et al.*, 2014).

2.1.3 – Prevenção farmacológica

Além da modificação dietética e hábitos de vida, a quimio-prevenção farmacológica no CCR tornou-se uma área de grande interesse. Em estudo epidemiológico Kummer e Coelho (2002) sugerem que a aspirina e/ou outros anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) têm um efeito protetor. Isto é também relatado no estudo de Cole *et al.* (2009) que demonstraram que alguns AINEs causam regressão de pólipos em pacientes com Polipomatose Adenomatosa Familiar (PAF). Suspeita-se que esse efeito seja mediado pela inibição da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), que é expressa em cerca de 90% dos carcinomas colorretais e em 40% a 90% dos adenomas.

2.1.4 - Características morfológicas

O CCR é uma doença com grande heterogeneidade e apresentação de tumores clínico-patológicos muito semelhantes, sendo que a grande dificuldade do diagnóstico começa a partir do seu quadro semiótico variado e depende da localização e do tamanho do tumor (COOPER, 2005)

Os sinais e sintomas são inespecíficos e podem incluir alterações do ritmo intestinal, sensação de cansaço constante, sangue nas fezes e perda de peso. Em um estudo Carneiro Neto *et al.*, (2006) demonstraram que os sinais e sintomas mais prevalentes foram: dor abdominal, alteração do hábito intestinal, além de perda ponderal, dor retal e hematoquezia (CARNEIRO NETO *et al.*, 2006).

O quadro clínico do paciente com CCR varia de acordo com a localização do tumor. Tumores localizados no cólon direito costumam ulcerar, portanto geralmente os indivíduos têm sintomas como fadiga, palpitação, angina e anemia hipocrômicas e microcítica (devido a deficiência de ferro). Aqueles localizados no cólon transversal ou esquerdo causam obstruções, provocando cólicas abdominais e até perfurações. Por fim, os que se encontram no reto e sigmóide podem apresentar hematoquezia, tenesmo e diminuição do calibre das fezes (KASPER *et al.*, 2008).

A localização do tumor ao longo da mucosa do intestino grosso ocorre em cerca de 50% dos tumores no reto e no sigmóide, 20% dos casos no cólon esquerdo e 30% no cólon direito. Macroscopicamente, pode assumir forma exofítica (vegetante), polipóide ou infiltrativa (ulcerada). Em pacientes mais jovens, o CCR é descrito como sendo mais volumoso, mais avançado, com pouca diferenciação histológica e com invasão das estruturas adjacentes (CARNEIRO NETO *et al.*, 2006).

O adenoma colorretal é considerado um precursor do desenvolvimento do CCR, que junto a processos genéticos complexos com alterações mutacionais, leva ao aparecimento do câncer (SENOL *et al.*, 2017; XI HONG-QING *et al.*, 2017). Os pólipos adenomatosos são divididos em 3 subtipos: a) adenomas tubulares: apresentam mais de 75 % de sua arquitetura composta por glândulas tubulares e são a grande maioria dos adenomas; b) adenomas vilosos: apresentam mais que 50 % de projeções vilosas; c) adenomas túbulo-vilosos: constituindo entre 5 a 10 % dos adenomas colorretais, são constituídos por um misto de glândulas tubulares e projeções vilosas, onde estas últimas compõem entre 25 e 50 % do total da arquitetura da lesão (FAUSTO; KUMAR; ABBAS, 2016). Embora os adenomas vilosos contenham focos de invasão mais frequentes do que adenomas tubulares, a arquitetura por si só não aumenta o risco de CCR, quando o tamanho do pólipo é considerado (FAUSTO; KUMAR; ABBAS, 2016).

Outros tipos de pólipos que são descritos são os pólipos serrilhados que são clinicamente e molecularmente diversos e têm como característica comum, a morfologia das criptas luminiais, caracterizadas por arquitetura glandular serrilhada e um maior potencial de malignização (SZYLBURG *et al.*, 2015). A classificação histológica dos pólipos serrilhados tem evoluído ao longo das duas últimas décadas para distinguir três subtipos: pólipo hiperplásico, adenoma serrilhado séssil e adenoma serrilhado tradicional (ROSTY e BETTINGTON, 2013).

O carcinoma intramucoso é resultado de uma lesão adenomatosa de alto grau prévia, a qual apresenta células epiteliais displásicas que rompem a membrana basal para invadir a lâmina própria ou a camada muscular da mucosa. Como nesta área não há vasos linfáticos funcionais, então o carcinoma intramucoso não possui capacidade metastática e se o tratamento for uma polectomia e tiver ressecção completa, sem margens comprometidas, o paciente está tratado (cura). A invasão abaixo da muscular da mucosa inclusive do pedículo submucoso é compatível com um adenocarcinoma invasor, apresentando nesta forma riscos de metástases (FAUSTO; KUMAR; ABBAS, 2016).

2.2 – ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS DO CÂNCER COLORRETAL

Os CCR são lesões com origem em pólipos benignos (adenomas), que podem crescer na parede interna do intestino grosso e/ou reto e evoluírem para uma neoplasia maligna (FLETCHER, 2007).

2.2.1 - Avaliação histológica

Histologicamente, 95 % dos tumores do intestino grosso são adenocarcinomas, cujo o grau de diferenciação, pode ser classificado quanto a diferenciação celular em: bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado (CUTAIT E FARIAS, 2016). O grau de atipias é avaliado por pleomorfismo celular, aumento da atividade mitótica e sobreposição nuclear (pseudo-estratificação). Quanto mais próximo o epitélio estiver das características de um epitélio normal, este será mais bem diferenciado. E quanto mais diferente estiver das características de um epitélio normal, será mais pouco diferenciado (GORDON; NIVATVONGS, 1999).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece outras variantes histológicas, porém são mais raras como, Carcinoma mucinoso/coloide (mais de 50% da área tumoral com

presença de áreas mucinosas/ colóide), Carcinoma de células em anel de sinete (mais de 50% da área tumoral, com presença de áreas de células em anel de sinete), Carcinoma neuroendócrino de alto grau, Carcinoma neuroendócrino de grandes células, Carcinoma neuroendócrino de pequenas células, Carcinoma de células escamosas, Carcinoma adenoescamoso, Carcinoma medular e Carcinoma indiferenciado (BOSMAN *et al.* 2010). Outras neoplasias que acometem o intestino grosso são linfomas e tumor carcinoide (BRASILEIRO FILHO, 2017).

2.2.2 - Classificação Tumor / Linfonodo / Metástases (TNM)

Atualmente, o estadiamento anatomopatológico é o principal recurso para determinar o prognóstico dos pacientes portadores de CCR (ZLATIAN *et al.*, 2015), sendo que o sistema de classificação é baseado no Sistema Tumor / Linfonodo / Metástase (TNM), que avalia o tamanho do tumor, o “status” dos linfonodos loco-regionais e metástases a distância, sendo este sistema o mais usado para esta finalidade (DAWSON *et al.*, 2019).

No decorrer do tempo algumas classificações foram propostas, no início a mais usada foi a descrita por Dukes (AJCC, 2016) e, posteriormente, foi modificada por Astler-Coller (AJCC, 2016) (Figura 3).

A *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) publicou a primeira edição do seu manual de estadiamento em 1977 e começou a utilizar o esquema organizado de estadiamento T (tumor) N (status linfonodal) e M (presença ou ausência de metástases a distância por via sanguínea).

Atualmente, a classificação proposta pela União Internacional de Combate ao Câncer e AJCC (2016), é recomendada para uso geral, e assim é descrita:

Tx - O tumor primário não pode ser avaliado

T0 - Não há evidências de tumor primário

Tis - Carcinoma in situ: intraepitelial ou invasão da lâmina própria

T1 - Tumor que invade a submucosa

T2 - Tumor que invade a muscular própria

T3 - Tumor que invade através da muscular própria, alcançando os tecidos pericólicas

T4a - Tumor que penetra na superfície do peritônio visceral

T4b - Tumor que invade diretamente outros órgãos ou estruturas ou que adere a eles

Nx - Os linfonodos regionais não podem ser avaliados

N0 - Ausência de metástases em linfonodos regionais

- N1 - Metástase em 1-3 linfonodos regionais
- N1a - Metástase em 1 linfonodo regional
- N1b - Metástase em 2-3 linfonodos regionais
- N1c - Depósito (s) de tumor na subserosa, no mesentério ou tecidos pericólicos ou perirretais não peritonizados sem metástase em linfonodos regionais
- N2 - Metástase em 4 ou mais linfonodos regionais
- N2a - Metástase em 4-6 linfonodos regionais
- N2b - Metástase em 7 ou mais linfonodos regionais
- Mx - Metástase à distância não podem ser avaliadas
- M0 - Ausência de metástase à distância
- M1 - Metástase à distância
- M1a - Metástase confirmada a um órgão ou local (p. ex., fígado, pulmão, ovário, linfonodo não regional)
- M1b - Metástase em mais de um órgão/local ou peritônio

O estadiamento patológico para o CCR, também denominado estágio cirúrgico é mais preciso do que o estadiamento clínico.

O conhecimento do diagnóstico histopatológico do tumor não é pré-requisito para se realizar o estadiamento do CCR. Em consulta de primeira vez, suspeitando do diagnóstico de neoplasia maligna, o médico clínico poderá, a partir de uma coleta bem feita da história natural do tumor, identificando queixas principais e buscando todos os sinais que se associam ao mesmo, procurar avaliar a extensão da doença (INCA; 2011).

O sistema descrito para estadiamento do CCR sempre deve contar com a adição do estadiamento patológico, denominado estágio cirúrgico, sendo este bem mais preciso do que o estadiamento clínico, levando-se em conta que é a soma dos resultados do exame físico, biópsias, exames de imagem e peças cirurgias (Oncoguia, 2019).

De acordo com a classificação TNM obtém-se a classificação com os estádios I, II, III e IV (Figura 3) (AJCC, 2016).

Figura 3 – Estadiamento do câncer pela American Joint Committee on Cancer (AJCC, 2016).**Table 17-13** Colorectal Cancer Staging Systems

	American Joint Committee on Cancer (AJCC) Stage			Astler-Coller Modification of Dukes Classification
	T	N	M	
I	T1	N0	M0	A
	T2	N0	M0	B1
IIA	T3	N0	M0	B2
IIB	T4a	N0	M0	B2
IIC	T4b	N0	M0	B3
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	C1
	T1	N2a	M0	C1
IIIB	T3, T4a	N1 (any)	M0	C2
	T2, T3	N2a	M0	C1/C2
	T1, T2	N2b	M0	C1
IIIC	T4a	N2a	M0	C2
	T3, T4a	N2b	M0	C2
	T4b	N1, N2	M0	C3
IVA	Any T	Any N	M1a	D*
IVB	Any T	Any N	M1b	D*

*Stages not included in original Dukes classification; added later for comparison with AJCC staging.

Fonte: AJCC, 2016.

2.2.3 – Estudo dos Linfonodos

A presença de invasão de blocos de células tumorais no interior de vasos linfáticos é considerada como infiltração linfática pelo tumor e é um fator adverso independente no prognóstico através de análises multivariadas e univariadas (ZLOBEC; LUGLI, 2008).

Embora as alterações histológicas como adenocarcinoma pouco diferenciado juntamente com carcinoma mucinoso, sejam associadas a pior prognóstico, os dois fatores prognósticos mais importantes são a profundidade da invasão (T) e presença de metástases em linfonodos (N) (BRASILEIRO FILHO, 2011).

2.2.4 - Tamanho tumoral

O tamanho do tumor é medido no maior eixo do CCR e é registrado no laudo com avaliação macroscópica, para fins de estudo de margens, verificando se as distâncias das margens cirúrgicas estão livres de comprometimento neoplásico e para documentação do caso, para possível comparação com os exames de imagem, porém o tamanho do tumor não tem significância prognóstica (COMPTON *et al.*, 2003).

2.3 - ALTERAÇÕES GENÉTICAS (CARCINOGENÊSE COLÔNICA)

As alterações genéticas ou carcinogênese são o resultado de várias etapas de alterações, podendo estar associada a dezenas, até centenas, de genes, por meio de instabilidade genômica, mutações gênicas, amplificações gênicas, quebras e perdas cromossômicas e mecanismos epigenéticos, sendo envolvidos vários grupos de genes nesse processo: proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados ao reparo do DNA (ROCHA; SILVA, 2003).

Os protooncogenes (oncogenes) são genes sintetizam proteínas que estimulam a proliferação e o crescimento celular. Estas mutações produzem ganho de função e podem ser causadas pela mutação em apenas um dos alelos. Os principais oncogenes envolvidos no CCR são os genes da família RAS (KRAS e NRAS) (VASEN, 2000).

Os genes de supressão tumoral (genes supressores de tumor) produzem proteínas que inibem a formação do tumor pela regulação da atividade mitótica, proporcionando controle inibitório do ciclo celular. Ocorre proliferação tumoral quando esses controles inibitórios são desregulados pela mutação. Os principais genes supressores de tumor relacionados ao CCR são o gene Adenomatous Polyposis Coli (APC) e o gene p53. (JIMENO *et al.*, 2009).

O sistema de reparo de DNA (Genes de reparo) atua durante o seu processo de replicação e é responsável pela substituição, com alta fidelidade, de nucleotídeos que apresentem pareamento incorreto. A inativação desse sistema, portanto, pode levar ao acúmulo errôneo de nucleotídeos pareados e predisposição à carcinogênese. Mutações nesses genes estão relacionadas à síndrome de CCR hereditário não polipose (HNPCC), ou Síndrome de Lynch (VASEN, 2000).

A carcinogênese colônica possui duas vias patogênicas que são: Via supressora (ou do *Adenomatous Polyposis Coli / beta-catenina*), na qual a instabilidade genômica provoca uma série de mutações sucessivas e ordenadas que leva à formação de adenomas e sua

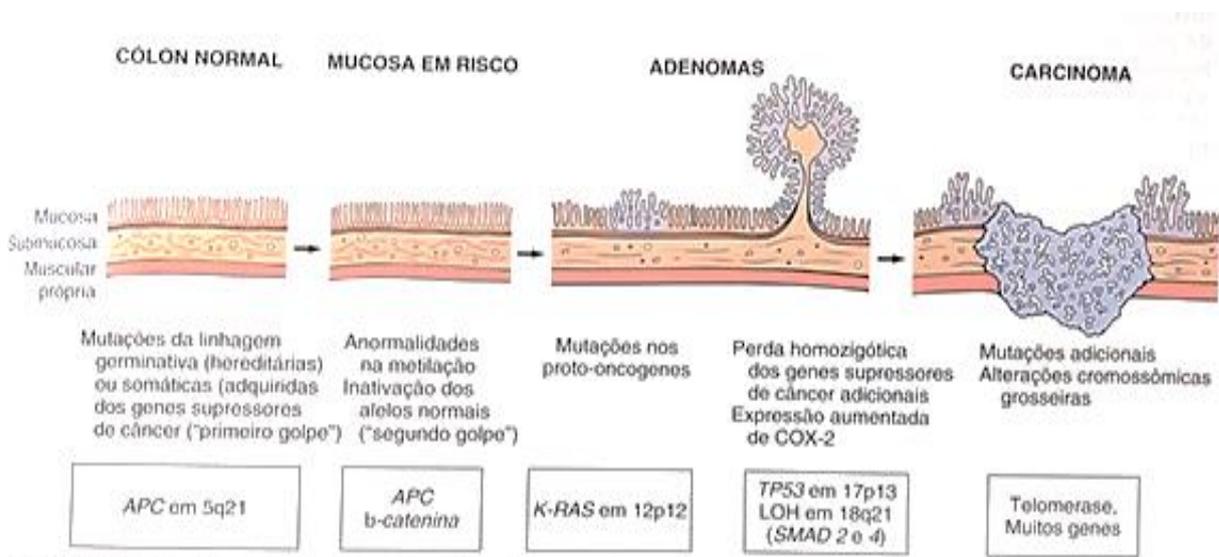
posterior malignização. Via mutadora (ou da instabilidade de microssatélites), caracterizada por mutações ou inativações nos genes de reparo do DNA (MMR) (BRASILEIRO FILHO, 2011).

2.3.1 - Via supressora (ou do Adenomatous Polyposis Coli / beta-catenina)

Esta via é marcada por transtornos da regulação da proliferação celular da via supressora da carcinogênese colônica. Quando há instabilidade genômica, que favorece mutações sucessivas em múltiplos genes supressores e proto-oncogenes, resulta em adenomas que irão progredir para um adenocarcinoma. As mutações no gene APC são as primeiras alterações em 80% dos tumores esporádicos. A progressão de um adenoma para adenocarcinoma ocorre devido à alterações de mutação adicionais e/ou perda da heterozigose em alguns genes que promovem o crescimento do adenoma, levando a um grau maior de displasia e capacidade de infiltrar e invadir tecidos, que é o adenocarcinoma (BRASILEIRO FILHO, 2011) (Figura 4).

Em alguns casos pode ocorrer adenocarcinoma sem que haja a presença de pólipos adenomatosos precursores de displasias (lesões displásicas associadas a uma doença inflamatória crônica intestinal, RCUI, Doença de Crohn ou a criptas aberrantes) originando a neoplasia sem um adenoma prévio no local. Os principais genes que sofrem mutações nesta via são: APC, KRAS, SMAD, TGF β e o p53 (BRASILEIRO FILHO, 2011).

Figura 4 - Via supressora.

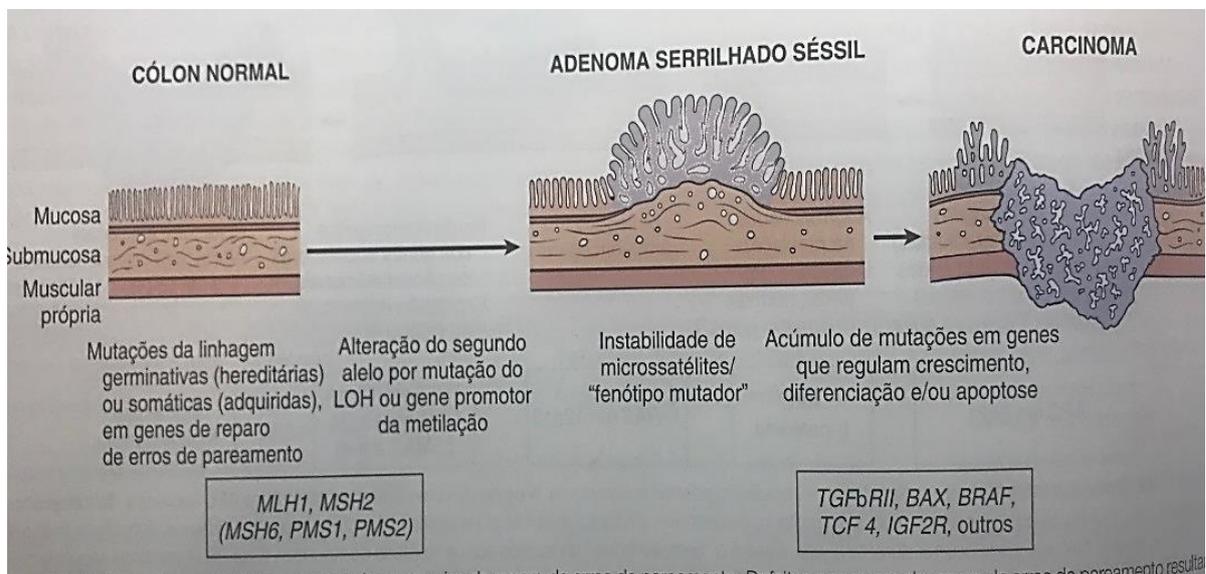


Fonte: FAUSTO; KUMAR; ABBAS, 2016.

2.3.2 - Via mutadora (ou via de instabilidade de microsatélites)

As alterações genômicas (mutações e inativação) são caracterizadas por genes de reparo do DNA. O produto destes genes (hMSH2, hMLH1, hMSH6, hPMS1, hPMS2) são revisores do “DNA”, pois eles vão detectar erros ocorridos durante a replicação celular. A grande maioria das mutações envolve o hMSH2 (cromossomo 2p22) e o hMLH1 (cromossomo 3p21). No genoma humano existem sequências repetidas (50.000 a 100.000) de um a seis nucleotídeos que receberam o nome microsatélites (BRASILEIRO FILHO, 2011). As mutações no gene de reparo do DNA correlacionam por vezes a alterações de sequências repetidas de nucleotídeos chamadas de MSI. Algumas destas sequências ficam pareadas ou ocorrem em regiões codificadoras de genes envolvidos com a proliferação celular, como TGF β R tipo II, IGF1R, Braf e BAX. (Figura 3).

Figura 5 - Via mutadora.



Fonte: FAUSTO; KUMAR; ABBAS, 2016.

As mutações nesses genes MSI resultam no aumento da proliferação celular e/ou diminuição da apoptose. Nos genes de reparo do DNA com anormalidades as taxas de novas mutações aumentam de 100 a 1000 vezes (BRASILEIRO FILHO, 2011).

2.3.3 - Eventos Epigenéticos

Os processos que regulam a expressão gênica e que não estão relacionados à sequência primária do DNA, são definidos pelo termo “Eventos Epigenéticos”, sendo que estes processos são herdáveis ao longo das divisões celulares (REIK *et al.*, 2003). A metilação do DNA é um processo no qual o radical metil (-CH₃) é adicionado ao carbono 5 da citosina (5 metilcitosina) e ocorre predominantemente em regiões denominadas “ilhas CpG” (KLOSE; BIRD, 2006), regiões do DNA ricas em dinucleotídeos C-G (TANG *et al.*, 2007). O fenótipo metilador da ilha CpG (CIMP) está presente em vários tipos de câncer inclusive no CCR, sendo este conceito introduzido por Toyota *et al.* (1999).

Aproximadamente 60% das regiões promotoras de genes humanos são ricas em ilhas CpG e quando não metiladas encontram-se em estado ativo para a transcrição e quando são metiladas a transcrição gênica fica impedida, ou seja, o gene alvo é reprimido, sugerindo que estes clusters são importantes elementos de regulação gênica (STRAUSSMAN *et al.* 2009). Os eventos epigenéticos possibilitam o silenciamento de muitos genes por metilação, o que pode aumentar a progressão ao longo da cada via da carcinogênese. (FAUSTO; KUMAR; ABBAS, 2016).

2.4 - CÂNCER COLORRETAL ESPORÁDICO

O CCR tem diferentes fatores que parecem estar relacionados com a ocorrência da doença, contudo mais de 75% dos casos de CCR são definidos como esporádicos, de caráter não familiar e decorrente de uma exposição crônica da mucosa intestinal a agentes carcinogênicos (BEPA, 2009).

No entanto, estudos epidemiológicos demonstram alguns fatores de risco envolvidos como, idade avançada, histórico de adenomas, doença inflamatória intestinal e histórico familiar de CCR hereditário (BEPA, 2009).

No caso do CCR esporádico, ele se caracteriza pela presença de genes com ambos os alelos inativados por eventos epigenéticos fortuitos, como mutações somáticas, deleções ou hipermetilações (DEVITA; LAWRENCE; ROSENBERG, 2014). Ademais, para que ambos os alelos dos genes envolvidos sejam perdidos no mecanismo da carcinogênese, em geral, são necessárias várias décadas, o que poderia explicar porque o CCR esporádico tem maior prevalência em pessoas com idade mais avançada (VASEN, 2000).

2.5 – CÂNCER COLORRETAL HEREDITÁRIO

O CCR hereditário é dividido em dois subtipos: Síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e Câncer Colorretal Hereditário Não Polipose (HNPCC), que recebe a nomenclatura de Síndrome de Lynch (LYNCH *et al.*,1995; LYNCH *et al.*,1998).

2.5.1 - Síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar

A Síndrome da polipose adenomatosa familiar (PAF) é doença hereditária de caráter autossômico dominante, sendo responsável por apenas 1% dos casos de CCR na população (HABR-GAMA *et al.*, 2005). É caracterizada pela presença de centenas a milhares de pólipos adenomatosos colorretais, na qual, e se não for realizado o tratamento cirúrgico, haverá desenvolvimento de CCR em 100% dos casos. O defeito genético localiza-se no gene APC situado no braço longo do cromossomo 5q21 (KINZLER *et al.*, 1991), sendo que em aproximadamente 20% dos casos, a doença pode ser decorrente de mutações genéticas (GRODEN *et al.*,1991).

2.5.2 - Câncer Colorretal Hereditário Não Polipose (HNPCC)

É uma síndrome relacionada a mutações da linhagem germinativa dos genes de reparo (MMR), que incluem o CCR entre outros tipos de neoplasias (BALMAÑA *et al.*, 2006). Deverão ser usados critérios para indicação de testes genéticos para a detecção do Câncer Colorretal Hereditário Não Polipose (HNPCC) (VALADÃO; CASTRO, 2007).

A síndrome de Lynch I, ou HNPCC clássica, apresenta critérios bem definidos estabelecidos por um Grupo Colaborativo Internacional em HNPCC (ICG-HNPCC) (Critérios de Amsterdam I, (VASEN *et al.*, 1991)). Critérios menos restritivos têm sido propostos por diferentes grupos, como os critérios de Bethesda (RODRIGUEZ-BIGAS *et al.*, 1997) e os do ICG-HNPCC (Critérios de Amsterdam II, (VASEN *et al.*, 1999)), considerando a presença de tumores extra-colônicos (Síndrome de Lynch II). Os critérios sugeridos para realização de testes moleculares para detecção de alterações nos genes MSI são os seguintes:

• Critérios de Amsterdã I

1. CCR histologicamente confirmado em, pelo menos, três parentes, um dos quais parente em primeiro grau dos outros dois;
2. Pelo menos duas gerações sucessivas diagnosticadas com CCR;
3. Pelo menos um caso de CCR diagnosticado antes dos 50 anos, e
4. Exclusão clínica de FAP.

• Critérios de Amsterdã II

Famílias com pelo menos três parentes apresentando um dos cânceres associados a HNPCC (CCR, câncer de endométrio, intestino delgado, ureter ou pelve renal), sendo que:

5. Um deve ser parente em primeiro grau dos outros dois;
6. Pelo menos duas gerações sucessivas devam ser afetadas;
7. Pelo menos um caso de câncer deve ser diagnosticado antes dos 50 anos de idade;
8. O diagnóstico de polipose adenomatosa familiar deve ser excluído nos casos de CCR;
9. Os tumores devem ser verificados por exame anátomo-patológico.

• Critérios de Bethesda

1. Indivíduos com CCR em famílias que preenchem os critérios de Amsterdã; ou
2. Indivíduos com dois cânceres associados ao HNPCC, incluindo CCR sincrônico e metacrônico ou cânceres extra-colônicos (endométrio, ovário, estômago, intestino delgado, hepatobiliar, pelve renal ou ureter); ou
3. Indivíduos com CCR e com um parente em primeiro grau com CCR ou com câncer extra-colônico associado ao HNPCC e/ou com adenoma colorretal; um dos cânceres diagnosticados antes dos 45 anos, e o adenoma diagnosticado antes dos 40 anos; ou
4. Indivíduos com CCR ou câncer de endométrio diagnosticado antes dos 45 anos; ou
5. Indivíduos com CCR no cólon direito com padrão histopatológico indiferenciado, diagnosticado antes dos 45 anos; ou
6. Indivíduos com CCR com padrão histopatológico em anel de sinete, diagnosticado antes

dos 45 anos; ou

7. Indivíduos com adenoma diagnosticado antes dos 40 anos.

A identificação de tumores associados à MSI, do Kras e do Braf são muito importantes, visto que constitui um critério de rastreamento para o câncer de cólon hereditário não associado à polipose (HNPCC), popularmente chamada de síndrome de Lynch (BACCHI *et al.*, 2014).

2.5.3 - Síndrome de Turcot

Os pacientes que são considerados portadores da síndrome de Turcot são aqueles com síndrome de PAF ou síndrome de Lynch que apresentam tumor cerebral. Existem muitas mutações genéticas diferentes podem causar a síndrome de Turcot. Sendo que freqüentemente, uma mutação em um gene chamado APC faz a doença se desenvolver. Anormalidades no gene APC são tipicamente associadas a síndrome de PAF. Existem outros casos, em que as mutações nos genes S, que são responsáveis pela reparação de outros genes, também conhecidos como genes de reparo incompatíveis, que também podem causar a síndrome. Quando a síndrome de Turcot é secundária a esse tipo de defeito, ela é frequentemente considerada um subconjunto da síndrome de Lynch. (BRASILEIRO FILHO, 2011).

2.5.4 - Síndrome de Gardner

A Síndrome de Gardner podem apresentar sinais e sintomas principalmente na partir da segunda década, mas podem aparecer em qualquer fase da vida, é uma doença autossômica dominante, no gene APC, do cromossomo 5q21, sendo assim considerada uma PAF. Afeta 1:14000, de forma igual entre homens e mulheres. Relacionado com a síndrome, há a presença de outros tumores extra-colônicos, podendo ser osteomas, câncer de tireoide, cistos epidermóides, fibromas, cistos sebáceos, anormalidades dentais e tumores periampulares. Além da polipose intestinal, pode acarretar outros pólipos no duodeno, no baço, no mesentério e no intestino delgado. (BRASILEIRO FILHO, 2011).

2.6 – ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

A imunistoquímica (IHQ) é um procedimento diagnóstico amplamente utilizado na patologia, as reações imunistoquímicas podem ser utilizadas nas mais diferentes situações dentro de um laboratório de patologia cirúrgica. Segundo Bodey (2002) são as mais importantes:

- 1) elucidação do tecido de origem de uma neoplasia indiferenciada;
- 2) determinação do órgão de origem de uma neoplasia diferenciada;
- 3) subclassificação de linfomas;
- 4) pesquisa de fatores prognósticos, terapêuticos e índices proliferativos de algumas neoplasias;
- 5) identificação de estruturas, organismos e materiais secretados pelas células;
- 6) detecção de células neoplásicas metastáticas.

A IHQ também pode fornecer informações genéticas importantes sobre os tumores, atualmente com a ampliação do espectro de novos painéis de anticorpos, bem como a disponibilidade de técnicas de recuperação de antígenos mais eficazes e uma melhor compreensão das alterações moleculares dos tumores e juntamente com sistemas de detecção imunistoquímicos altamente sensíveis, pode-se realizar diagnósticos com informações mais relevantes em patologias como o CCR (CHRISTOPHER *et al.*, 2014).

Por exemplo, a IHQ para a MSI é recomendado para todos os pacientes com CCR, sendo esta importante para a identificação de pacientes com Síndrome de Lynch, além de orientar as decisões terapêuticas e aconselhamento genético (VAKIANI, 2017).

Outra situação, as amostras de mucosa colônica submetidas a técnica IHQ apresentam resultados para expressão de p53, em cerca de 80% das amostras de CCR (ZLATIAN *et al.*, 2015; SENOL *et al.*, 2017; XI HONG-QING *et al.*, 2017). O cerbB-2 é considerado um biomarcador promissor, porém ainda não se tem informação suficiente para utilizá-lo na prática clínica diária (HERRERO; LÓPEZ; GIL 2015).

2.6.1 - Instabilidade de Microssatélites.

A patogenia do CCR ainda não está muito bem esclarecida, entretanto, é comumente definida por duas vertentes moleculares de instabilidade genômica. Uma delas é a

instabilidade cromossômica, que está envolvida em certos oncogênese e genes supressores de tumor, como a proteína p53 e a outra via é a MSI (MLECNIK *et al.*, 2016; AMIRA *et al.*, 2014; ALEX 2016; KAWAKAMI; ZAANAN; SINICROPE, 2015). A presença de MSI no CCR é muito importante na clínica oncológica, pois desta forma pode-se prever resultados favoráveis, sendo que o tumor pode ser menos agressivo e há uma probabilidade menor de metástases para linfonodos (MLECNIK *et al.*, 2016).

Os microssatélites são sequências proteicas curtas presentes em todo o genoma e são usadas como marcadores de deficiência de MMR (do inglês: “mismatchrepair”) que são genes de reparo do sistema DNA-MMR. Este sistema é composto de 4 genes MMR e suas proteínas codificadas: MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 (KAWAKAMI; ZAANAN; SINICROPE, 2015; SETAFFY; LANGNER, 2015; CHRISTOPHER *et al.*, 2014). Estudos moleculares têm identificado que esta família de genes pode predispor os indivíduos ao CCR. Por exemplo, alguns destes genes envolvidos no MMR, sendo eles: hMSH2, hMLH1, hPMS2, hMSH3 e hMSH6 (GRIZZLE *et al.*, 1999), tem sido correlacionados a Síndrome de Lynch (HNPCC) (LYNCH *et al.*, 1991; LYNCH *et al.*, 1997) e respondem por aproximadamente 15% de todos os CCR (KAWAKAMI; ZAANAN; SINICROPE, 2015; 2015; YUAN *et al.*, 2015; NOWAK *et al.*, 2017) que advêm da via de MSI, que é uma consequência da deficiência do reparo de incompatibilidade de DNA MMR (dMMR). (KAWAKAMI; ZAANAN; SINICROPE, 2015).

A perda da MMR leva a frequência elevada de pontos de mutação (*mutator phenotype*) e MSI. As mutações desses genes, resultam no aumento dessa proliferação e/ou diminuição da apoptose que predispõem ao CCR (BRASILEIRO FILHO, 2011). As proteínas MMR estão anormalmente presentes em muitas células humanas, particularmente em células em proliferação, tais como epitélio da cripta intestinal (CHEN; SWANSON; FRANKEL, 2017).

Nos casos de neoplasias deficientes nos genes MMR (dMMR) apresentam características patológicas e clínicas peculiares, incluindo início mais precoce da doença, a sua localização é mais proximal, grande reação inflamatória linfocitária do tipo Crohn e padrão de crescimento medular, resultando num pior prognóstico para o paciente (YUAN *et al.*, 2015).

No CCR não-polipóide (HPNCC), é muito importante realizar teste para identificação e a pesquisa de MSI, onde se realiza a comparação de sequências de microssatélites das células tumorais com as do tecido normal. A classificação é baseada de acordo com o número de marcadores onde for detectada a instabilidade: MSS (stable) quando nenhum marcador mostra instabilidade, MSI-L (low) quando se observa a instabilidade em um marcador, e MSI-H (high) quando houver instabilidade em dois ou mais marcadores (LASSANCE *et al.* 2012).

A MSI deve-se a deficiência do sistema de reparos com erros de mal pareamento cromossômico, causada por silenciamento epigenético de MLH1 ou por mutações germinativas de um gene de reparo de DNA, seguido pela inativação somática do segundo alelo, caracterizando a síndrome de Lynch (MLECNIK *et al.*, 2016).

Na maioria dos CCR de pacientes com HNPCC ocorrem MSI, as quais são usadas como biomarcadores. O gene hMLH1 está localizado no cromossomo 3p21-23 em área de importância para os genes envolvidos no CCR hereditário não polipóide (LINDBLUM *et al.*, 1993; NYNSTROM-LAHTI *et al.*, 1994) e o gene hMSH2 está localizado no cromossomo 2p21, em área inicialmente identificada como uma região importante para genes envolvidos no CCR hereditário não polipóide (HNPCC) (LEACH *et al.*, 1993; PELTOMAKI *et al.*, 1993).

A identificação do MSI no CCR é de grande importância, já que este marcador ajuda a diferenciar o CCR com dMMR e com MSS, o que ajuda na individualização do tratamento e da avaliação clínica e prognóstica do paciente (YUAN *et al.*, 2015).

2.6.2 - Gene Tp53

A ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor são a base molecular para o surgimento das neoplasias malignas no cólon. A maioria dos CCR se desenvolve a partir de adenomas preexistentes, em pacientes com polipomatose adenomatosa familiar, há uma mutação herdada no cromossomo 5q, responsável pelo epitélio hiperproliferativo, que caracteriza uma carcinogênese em estágio inicial nestes pacientes.

O Tp53 é um gene supressor do tumor, que está localizado no cromossomo 17 e 18, este gene codifica uma fosfoproteína denominada proteína p53, que exerce um importante papel no controle do ciclo celular e previne o aparecimento de câncer (EISENBERG; KOIFMAN, 2001). A proteína p53 é uma ativadora de apoptose e tem o papel de bloquear a divisão celular nas células que sofreram injúrias no seu DNA, dando assim tempo para a reparação celular (ALMEIDA *et al.*, 2007). Sendo assim as deleções nos cromossomos 17p e 18q, bem como mutações no gene Tp53 ocorrem com mais frequência em estágio tardio da carcinogênese (CUTAIT; FARIAS, 2016; FEARON; VOGELSTEIN 1990). Mutações na proteína p53 são encontradas em cerca de 50% de todos os casos de câncer humanos e em mais de 50 tipos diferentes de tumores (MATTOS *et al.*, 2005).

A superexpressão da p53 leva a um crescimento acelerado devido à aceleração da fase G1-S (DEMIR *et al.*, 2014). Porém, caso os danos ao DNA não possam ser reparados, a p53 inicia a apoptose, ativando o gene Bax pró-apoptótico. Se as mutações na célula se tornarem permanentes, as células neoplásicas passarão a acumular a proteína p53 mutada, que pode ser visualizada por técnicas de IHQ (MELINCOVICI *et al.*, 2016).

O exame de IHQ do p53 é importante para a diferenciação dos tipos de tumor, e na avaliação de sua agressividade e reconhecimento da origem de metástases (ZLATIAN *et al.*, 2015). Sob a análise do exame de um IHQ para p53, o núcleo da célula apresenta vários

grânulos marrons, quando é positivo, e possibilita assim sua visualização no núcleo celular (MELINCOVICI *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2017).

A expressão de p53 pode contribuir para a decisão do tratamento do CCR, e é um marcador de prognóstico reservado para a doença. (MELINCOVICI *et al.*, 2016; SENOL *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2017; JUNIKU-SHKOLOLLI *et al.*, 2015; SAYAR *et al.*, 2015). Quanto menor a diferenciação do tumor, maior a expressão de p53, portanto a p53 pode indicar o comportamento de maior agressividade (malignidade) do CCR (WU *et al.*, 2017; JUNIKU-SHKOLOLLI *et al.*, 2015; SAYAR *et al.*, 2015). A expressão de p53 também aumenta o risco de morte e recidiva tumoral, porém sua expressão não interfere no desfecho clínico do tratamento quimioterápico (DEMIR *et al.*, 2014).

O gene TP53 mutante no CCR se relaciona com resistência à quimioterapia e com pior prognóstico, bem como metástases em linfonodos (METEOGLU *et al.*, 2015). À medida que o CCR se desenvolve, as mutações no gene TP53 se tornam mais frequentes, sendo estas menos frequentes no adenoma e mais frequentes no CCR (METEOGLU *et al.*, 2015).

O CCR com superexpressão de p53 se associa com metástases em linfonodos, disseminação por contiguidade e metástases a distância (metástases hepáticas, infiltração pleural e invasão extra-tireóidea) (LI *et al.*, 2016). A expressão de p53 em metástases linfonodais é bem maior do que nos tumores primários (METEOGLU *et al.*, 2015). A superexpressão de p53 também modula o risco de metástases pulmonar (metástases a distância) e reduz o tempo de sobrevida à metastectomia pulmonar (retiradas de metástases pulmonar), sendo a sobrevida maior em pacientes com p53 negativos e menor para pacientes com p53 positivos (LI *et al.*, 2016).

A heterogenicidade de um tumor é um ponto crítico e limitante para seu diagnóstico molecular e para uma terapia individualizada, porém no CCR se tem distribuição homogênea de p53. A baixa taxa de heterogenicidade da p53 suporta a afirmação de que as mutações no gene TP53 são um evento precoce no desenvolvimento do CCR (ZLATIAN *et al.*, 2015; STAHL *et al.*, 2015; SENOL *et al.*, 2017; KOBAYASHI *et al.*, 2014). O *status* genômico do TP53 pode ser analisado por meio de sequenciamento genético, porém a reprodutibilidade, concordância e o baixo preço da IHQ, fazem com que este método diagnóstico seja o mais conveniente, sendo assim a IHQ da proteína p53 faz-se útil na detecção de CCR em estágios iniciais (LI *et al.*, 2016).

2.6.3 - Gene Cerb-B2

O gene *cerb-b2*, também descrito na literatura por diversos outros nomes e grafias (*c-erbB-2*; *cerbB-2*; *C-erbB-2*; *HER-2*; *HER-2/neu*; *ERBB2*; *erbB2*; *erbB-2*; *neu/ c-erbB-2*; oncogene *neu*; proteína *neu*; *neu*), localiza-se no cromossomo 17q21.1 e é responsável pela codificação de uma proteína transmembrana que atua como receptor tirosina quinase, de 185kDa, membro da família dos receptores dos fatores de crescimento (BEGNAMI *et al.*, 2005; EISENBERG; KOIFMAN 2001).

A amplificação do *cerb-b2* se relaciona com a superexpressão na membrana celular da proteína que o mesmo codifica, é denominada também de proteína *cerb-b2*. Estudos apontam que esse gene está superexpresso nos cânceres de mama e em diversos tipos de carcinomas, como nos ovarianos, de glândulas salivares, colônicos e no CCR (BEGNAMI *et al.*, 2005; SHABBIR *et al.*, 2016). Várias mutações ativadoras de *cerb-B2*, às vezes amplificações *cerb-B2* concomitantes, foram identificados no CCR. Estas mutações estão presentes em aproximadamente 7% dos CCR, em dados do “The Cancer Genome Atlas”, e pode coexistir com a amplificação do gene *cerb-B2* em cerca de 20% dos casos (KAVURI *et al.* 2015).

Alguns autores correlacionam a expressão aumentada de *cerbB-2* como um indicador de pior prognóstico. De acordo com estes autores, pacientes com tumores que apresentam expressão aumentada de *cerbB-2* tiveram um período livre de doença menor e com uma menor sobrevida em geral. No entanto, estes autores, em análises multivariadas não conseguiram encontrar uma associação entre sobrevida geral, ou período livre de doença a presença da expressão do *cerbB-2* (EISENBERG; KOIFMAN, 2001).

Herrero, López e Gil (2015) classificaram os biomarcadores moleculares e genômicos no CCR com base nas categorias estabelecidas pelo consenso realizado pelo *College Of American Pathologists*. Essas categorias foram baseadas em evidências apresentadas como fatores diagnósticos e são elas: categoria I: definitivamente comprovado como fator prognóstico e utilizado na prática clínica diária; categoria IIA: extensivamente estudado, com valor prognóstico e/ou preditivo de resposta, porém sua importância clínica ainda não foi validada em ensaios clínicos randomizados; categoria IIB: fatores promissores, porém sem informação suficiente para a inclusão na categoria I ou IIA; categoria III: fatores ainda não estudados o suficiente para determinar o seu valor prognóstico ou preditivo; categoria IV: fatores sem significância prognóstica.

O *cerbB-2* é classificado como categoria IIB, ou seja, considerado um biomarcador promissor, porém ainda não se tem informação suficiente para utilizá-lo na prática e na clínica diária. Ainda não existem estudos clínicos suficientes que tenham explorado de maneira

adequada o papel de terapias anti cerb-B2 no CCR, e se tem apenas dados muito limitados, que inclui estudos com um número pequeno de pacientes, porém este marvcador poderá ser uma possibilidade terapêutica (HERRERO; LÓPEZ; GIL, 2015).

3 - OBJETIVOS

3.1 - OBJETIVO GERAL

Relacionar a expressão imunoistoquímica dos marcadores p53, cerb-B2 e MSI com parâmetros clínicos e patológicos em indivíduos com câncer colorretal no Estado do Tocantins.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as características clínicas e patológicas de indivíduos com câncer colorretal.
- Associar a distribuição dos indivíduos com câncer colorretal de acordo com o tamanho do tumor e características clínicas.
- Analisar a distribuição da expressão imunoistoquímica dos marcadores p53, cerb-B2 e MSI de indivíduos com câncer colorretal .
- Associar a distribuição da expressão imunoistoquímica do marcador cerb-B2 com características clínicas e patológicas de indivíduos com câncer colorretal.
- Associar a distribuição da expressão imunoistoquímica do marcador p53 com características clínicas e patológicas de indivíduos com câncer colorretal.
- Associar a distribuição da expressão imunoistoquímica da MSI com características clínicas e patológicas de indivíduos com câncer colorretal.
- Associar a distribuição da expressão imunoistoquímica da MSI com a expressão dos marcadores p53 e cerb-B2 de indivíduos com câncer colorretal.
- Subsidiar o conhecimento científico acerca de tumores colônicos e marcadores tumorais de interesse oncológico.

4 – METODOLOGIA

4.1 - CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA

Este é um estudo transversal, realizado no período compreendido entre março de 2017 a março de 2019, com abordagem predominantemente quantitativa.

4.2 – POPULAÇÃO

A população-alvo foram pacientes portadores de CCR, com diagnóstico realizado por exame anatomopatológico e imunoistoquímico no Laboratório Centro Diagnóstico de Anatomia Patológica de Palmas (CDA) o qual atende pacientes da cidade de Palmas e também de outros grandes municípios do estado como Araguaína e Gurupi, sendo estas as principais cidades do Estado do Tocantins.

No presente estudo, o delineamento transversal foi escolhido pois pretendia-se investigar a presença ou ausência de alterações do CCR, sendo avaliado a expressão do marcadores tumorais e as características clínicas e anatomopatológicas.

O estudo transversal é uma caracterização do estudo clínico-patológico de acordo com o seu período de seguimento (março de 2017 a março de 2019, com abordagem predominantemente quantitativa). Este delineamento é utilizado quando pretende-se realizar um corte instantâneo em determinada população por meio de uma amostragem (HOCHMAN *et al.*, 2005).

4.3 – DADOS

Os dados foram coletados a partir dos resultados obtidos de exames anatomopatológicos (biópsias endoscópicas e peças cirúrgicas), sendo estes coletados em indivíduos oriundos dos três maiores centros do Estado do Tocantins: Araguaína, Palmas e Gurupi).

Os exames anatomopatológicos após a coleta foram recebidos pelo laboratório CDA, onde foram registrados e identificados por número próprio, além de ser encaminhado

para o exame macroscópico, aonde será descrito cor, tamanho, peso e aparência do órgão analisado. No caso de diagnóstico patológico, este registro foi acompanhado de uma ficha técnica com identificação do órgão e as datas de fixação e da entrada do material no laboratório, e informações do paciente. Os resultados de carcinomas do colorretal invasores foram classificados seguindo os parâmetros morfológicos da OMS (BOSMAN, 2010).

Os resultados dos exames anatomopatológicos incluem dados sobre sexo, idade, caracterização histológica e tamanho do tumor, grau de diferenciação, além da presença ou ausência de invasão linfática. Tais variáveis foram utilizadas para a caracterização clínica dos indivíduos incluídos na pesquisa.

O estudo imunoistoquímico do nosso trabalho foi realizado com os painéis de rotina para os marcadores p53, cerb-B2 e MSI, seguindo as diretrizes de Bethesda para detecção do CCR hereditário não associado à polipose (HNPCC - Síndrome de Lynch). A caracterização da expressão imunohistoquímica desses marcadores foi então posteriormente associada às características clínicas obtidas por meio dos exames anatomopatológicos.

4.4 – PROCESSAMENTO DO MATERIAL

O material selecionado para este estudo foi oriundo do laboratório CDA, o qual foi registrado e acompanhado de ficha técnica com a identificação do órgão, a datas de fixação e entrada do material, bem como as informações clínicas pertinentes aos pacientes, sendo estas enviadas pelo médico assistente. Em todos os casos, na entrada foram verificadas as condições do transporte, acondicionamento e fixação, sendo o material encaminhado logo após para a clivagem, depois submetido ao processamento histológico, emblocamento em parafina, cortes dos blocos de parafina, confecção de lâminas e coloração com hematoxilina e eosina, montagem das lâminas, análise histológica e diagnóstico anatomopatológico.

Em se tratando de estudo envolvendo seres humanos vivos, foram observados todos os princípios da ética médica, normas da VISA (Vigilância Sanitária), bem como as Resoluções do Conselho Federal de Medicina.

4.4.1- Fixação

As peças cirúrgicas foram imersas em formol tamponado a 10%, sendo que esta fixação impede o processo de autólise ou morte tecidual, fazendo que as estruturas biológicas

se mantenham praticamente intactas. Segundo Caputo *et al.* a fixação interrompe o processo de autólise do tecido que retirado do organismo ou após a sua morte, deixa de ser oxigenado, aí as moléculas de dióxido de carbono começam a se acumular nestes tecidos, fazendo com que enzimas lisossomiais atuem sobre as próprias células. Para que o fenômeno da autólise não ocorra, faz-se necessário o processo de fixação dos tecidos. Para uma boa fixação, utilizamos o formol tamponado cobrindo todo tecido a temperatura ambiente (em média 25° C), no mínimo por 2 horas e com uma relação do volume fixador de 10 vezes o volume do material a ser fixado.

4.4.2 - Clivagem

A clivagem (corte das peças) foi realizada após o processo de fixação, sendo esta utilizada para reduzir o tamanho das peças e para facilitar a penetração do formol tamponado 10% em menor tempo, evitando assim, perda de qualidade do tecido bem como a necrose isquêmica e autólise tecidual. As peças cirúrgicas foram abertas longitudinalmente pela borda antimesentérica, procurando não transfixar a lesão; as margens foram pintadas com nanquim preta, para avaliação de invasão e comprometimento destas margens.

Os cortes foram seccionados de forma perpendicular à superfície e acompanharam paralelamente a orientação das fibras tecido muscular. O tumor foi medido em seus eixos maiores, após foram realizados cortes em toda a sua profundidade e foram incluídos fragmentos representativos das margens radial, proximal e distal, com fragmentos representativos da transição entre a lesão e a mucosa não neoplásica.

As secções das peças cirúrgicas foram realizadas com lâminas de aço cortante afiada, sendo utilizado cabo de aço de bisturi cirúrgico número 3, e o corte foi realizado em uma ação com o movimento único se iniciando a partir do cabo para a ponta da lâmina do bisturi, obtendo-se fragmentos planos e paralelos, sem franjas. Em média os fragmentos das peças cirúrgicas foram na espessura de 3,5 mm de espessura, mas em alguns dos fragmentos chegaram a 6,0 mm.

A orientação dos cortes na peça cirúrgica foi realizada para dar a melhorar a orientação para a inclusão no bloco de parafina para a microtomia. Os cortes das peças cirúrgicas foram inseridas diretamente em cassetes e colocadas no formol.

No caso das biópsias endoscópicas foram colocadas em papel de filtro e inseridas dentro dos cassetes e colocadas diretamente no formol.

4.4.3 - Processamento Histológico

O material clivado foi enviado para o processamento histológico, o qual é basicamente uma preparação físico-químico, sendo que estes fragmentos foram desidratados, diafanizados, impregnados por parafina, incluídos e emblocados em parafina. O processamento histológico é descrito abaixo:

4.4.3.1 - Desidratação

O material biológico, segundo Michalany, mesmo após a fixação, ainda retém cerca de 85% de água em seu interior. Diversas substâncias desidratantes são eficazes, para realizar a desidratação, sendo que no laboratório CDA o produto utilizado para esta função é álcool etílico. A parafina é um produto derivado do petróleo e é insolúvel em água, e para que a parafina consiga penetrar no tecido processado, é necessário que a água presente nos fragmentos seja retirada, por isso são utilizadas substâncias desidratantes como o álcool.

O Processador Automático de Tecidos Lupetec Modelo PT05 TS, possui recipientes de álcool que foram utilizados para realizar a desidratação do tecido, de forma progressiva quanto à grau de concentração alcoólica, indo da mais baixa concentração para a mais alta e não diretamente com o álcool absoluto. Isto porque a desidratação se for rápida pode provocar uma grande retração do tecido. A quantidade de volume que foi utilizada de álcool etílico para processo de desidratação foi de 20 vezes maior que o volume dos fragmentos das peças cirúrgica e das biópsias endoscópicas.

Segundo Masson a desidratação a partir do álcool absoluto produz excelentes resultados, sendo sua finalidade é retirar a água dos tecidos, e a água que é retirada, também é responsável pela diluição do desidratante.

Os recipientes de álcool utilizados no Processador Automático de Tecidos Lupetec Modelo PT05 TS, durante o processamento dos tecidos, fizeram movimentos constantes, permitindo que a mistura da água depositada no fundo com o álcool ficasse homogeneizada com o restante do líquido presente do recipiente.

Houveram várias trocas de álcool realizadas pelo Processador Automático de Tecidos Lupetec Modelo PT05 TS, que possui uma sequência de 6 frascos de 2 litros contendo álcool em concentrações diferentes, sendo que a água liberada dos fragmentos foi sendo desprezada paulatinamente, à medida que a cesta contendo os fragmentos passava para os outros banhos de álcool no processador. Outro detalhe é que o Processador Automático de Tecidos Lupetec Modelo PT05 TS, possui recipientes com fundo largo, assim

favorecendo o volume de água ser depositada no fundo, proporcionando menor contato da água depositada com a peça cirúrgica ou biópsia endoscópica a ser desidratada.

4.4.3.2 - Diafanização ou clarificação

Para realizarmos a diafanização ou clarificação, foi utilizado o Processador Automático de Tecidos Lupetec Modelo PT05 TS, o qual possui dois recipientes de 2 litros com xilol, e este faz a substituição do álcool por xilol, penetrando no material processado, o tornando mais claro, motivo o qual a etapa se chamada também de clarificação. O diafanizador que foi utilizado para o processamento histológico de rotina no laboratório CDA foi o xilol, sendo que este produto é manipulado de acordo com as exigências de biossegurança e normas da VISA, com a utilização adequada dos Equipamentos de Proteção Individual (EPI) e luvas, além de não ser descartado em rede de esgoto.

O tempo de processamento histológico na clarificação, dentro dos frascos de xilol foi controlado automaticamente pelo Processador Automático de Tecidos Lupetec Modelo PT05 TS, evitando prejudicar a qualidade e o ressecamento do material. Para o controle de troca do xilol, foi verificado de maneira sistemática, se havia uma nata branca na superfície do recipiente, indicando que o material processado em contato com o xilol não estava sendo bem desidratado, assim detectado, realizamos a troca por xilol novo imediatamente.

4.4.3.3 - Impregnação

Neste estudo foi utilizado a parafina histológica SOLVEN WAX 140, na rotina para processamento histológico, no Processador Automático de Tecidos Lupetec Modelo PT05 TS o qual possui dois recipientes termo-reguláveis, o qual aquece a parafina próximo ao seu ponto de fusão de aproximadamente 60° C. A parafina é sólida à temperatura ambiente, porém quando fica em estado líquido, tem a capacidade de infiltrar tecidos, penetrando nos espaços internos e depois endurece quando fica resfriada, formando fragmentos impregnados de parafina, com rigidez suficiente para a realização dos cortes. A parafina utilizada em nosso laboratório sempre foi filtrada, antes de ser utilizada para realização de impregnações. Desta forma, evitou-se o carreamento de impurezas do processamento para o material, como artefatos nas lâminas durante a microscopia.

4.4.3.4 – Inclusão

A inclusão na parafina foi feita com os fragmentos processados, após a etapa da impregnação, deixando-os depois esfriar e endurecer, e logo depois foram colocados em moldes metálicos, na central inclusora LEICA, observando a superfície secção, voltada para baixo, depois foi preenchido com parafina em fase líquida. Com o molde preenchido, colocou-se o cassete histológico (peça de plástico devidamente identificada a qual é fixada ao micrótomo para o corte do bloco) sobre o molde. Feito isso, o molde foi colocado na placa fria na central inclusora LEICA, promovendo o resfriamento da parafina e o endurecimento do bloco. Conferimos sempre após o resfriamento a posição que os fragmentos nos blocos, como foram colocados no molde, se estavam corretas, ou não, visto que isso determina a incidência de corte.

4.5 – CORTES HISTOLÓGICOS

Foi utilizado para realizar os cortes histológicos de rotina o micrótomo rotatório American Optical 620 com navalhas de aço da marca LEICA 505 (navalhas descartáveis, de boa qualidade e adaptável ao porta-navalhas). O material incluído em parafina, foi previamente avaliado para que não houvesse, nos blocos de parafina, nenhuma substância anticorrosivas ou impurezas, bem como fios de aço utilizados para clampar alças intestinais.

Os cortes foram feitos na espessura de 3,5 a 5 micrômetros, segundo Michalany, 1990 e Caputo *et al.*, 2010, sendo estas a espessura ideal para a passagem de luz e evidenciação do tecido em microscópio. As fitas de parafina produzidas com estes cortes histológicos, foram depositadas com o auxílio de uma pinça de algodão número 3, com delicadeza, em banho-maria previamente aquecido, para ser realizada a distensão sobre a água, evitando a formação assim de dobras, na temperatura aproximada de 40°C.

Depois das fitas de parafina prontas, foi realizado a pesca destas fitas com lâminas de vidro de ponta fosca, previamente limpas e identificadas, sendo levadas para uma estufa FENAN de secagem e esterilização à 60°.

Seguindo orientações do manual de histologia USP 2002, foi realizada a limpeza das lâminas, antes da microtomia, para tirar todas as impurezas e evitar a contaminação dos cortes. Após a limpeza, a lâminas receberam à devida identificação, sendo feita marcações a lápis e com etiquetas próprias com o respectivo código de barras, contendo o número de registro correspondente ao bloco. Para evitar que os cortes se desprendem-se das lâminas durante a etapa da coloração, foi aplicado albumina sobre todas as lâminas.

4.6 – COLORAÇÃO E MONTAGEM

Segundo Aarestrup, 2012 e Souza Junior, 2010 a coloração universal utilizada para histologia e histopatologia, é a hematoxilina e eosina (HE). A técnica de coloração Hematoxilina-Eosina foi usada para a classificação histológica em nosso estudo. Logo após a fixação, processamento e os cortes, já descritos, os tecidos mostram células sem cores transparentes, sendo utilizado para a microscopia a coloração HE.

Os cortes dos tecidos foram depositados nas lâminas após saírem da estufa, sendo lavados com xilol, antes da coloração, para a retirada de restos de parafina que ainda estavam nas lâminas. Depois deste procedimento as lâminas foram submetidas à hidratação em álcool, em sequência decrescente de grau de concentração, para que o meio ficasse pronto para receber os corantes solúveis em água, sendo logo depois expostas aos corantes. Foi aplicada neste estudo a técnica de coloração da Hematoxilina-Eosina (HE) descrita segundo Prophet *et al.*, (1992), sendo feita da seguinte maneira:

- Água destilada - 6 a 8 minutos,
- Hematoxilina - 10 minutos,
- Água - remoção do excesso de corante,
- Solução de HCL a 1% - 6 a 8 imersões.
- Água corrente (controle da coloração núcleo/microscópio),
- Eosina - 1 a 2 minutos,
- Álcool etílico a 95% - 6 a 8 imersões, e lavar com Xilol.
- Montagem da lâmina.

As lamínulas antes de serem colocadas sobre as lâminas coradas, foram limpas em solução alcoólica até ficarem translúcidas evitando posteriormente manchas e sombras ao serem observadas ao microscópio. O Etellan foi utilizado para fixar a lamínula nas lâminas coradas, durante a colocação da lamínula sobre o tecido, tomou-se muito cuidado para evitar a formação de bolhas, que poderiam prejudicar a visualização dos fragmentos estudados.

4.7 – CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA

A necessidade de se classificar histologicamente os casos de câncer baseia-se na constatação do tipo de tumor e seu comportamento em relação com o hospedeiro. A

classificação das neoplasias malignas em grupos obedece a diferentes variáveis de diagnóstico histopatológico.

O Sistema de classificação histológica utilizado foi o proposto pela organização mundial de saúde (OMS; 2010), com os seguintes tipos histológicos:

- Adenocarcinoma,
- Carcinoma mucinoso / colóide (mais de 50% da área tumoral representada por áreas mucinosas/colóide),
- Carcinoma de células em anel de sinete (mais de 50% da área tumoral representada por células em anel de sinete),
- Carcinoma neuroendócrino e alto grau,
- Carcinoma neuroendócrino de grandes células,
- Carcinoma neuroendócrino de pequenas células,
- Carcinoma escamoso,
- Carcinoma adenoescamoso,
- Carcinoma medular
- Carcinoma indiferenciado.

O termo diferenciação tumoral refere-se ao grau em que as células neoplásicas assemelham-se às células normais.

As neoplasias malignas podem apresentar células com grau variável de diferenciação (bem diferenciado, moderadamente diferenciado, pouco diferenciado ou indiferenciado).

As células indiferenciadas, são chamadas também de células anaplásicas.

O grau histológico (diferenciação tumoral) dos adenocarcinomas de cólon foi classificado de acordo com o preconizado pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC, 2016):

- Baixo grau (bem e moderadamente diferenciado):
 - Grau 1 – bem diferenciado;
 - Grau 2 – moderadamente diferenciado;

- Alto grau (pouco diferenciado ou indiferenciado):
 - Grau 3 – pouco diferenciado;
 - Grau 4 – indiferenciado.

4.8 - ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

Os blocos de parafina contendo o material oriundo das biópsia endoscópicas e fragmentos das peças cirurgicas, foram processados e submetidos aos cortes histológicos.

A espessura média de cada corte foi de 3,5 micras. Estes cortes foram colocados em lâminas de vidro silanizadas.

Após esta etapa, os cortes partiram para secagem em temperatura ambiente por 24 horas, com identificação da lâmina.

Em seguida, as lâminas foram colocadas em estufa a 60° C para desparafinar por 60 minutos, lavadas com dois banhos de xilol por 6 minutos cada, para a retirada de resíduos de parafina que ainda estavam nas lâminas.

Depois deste procedimento as lâminas foram submetidas à hidratação em álcool, em sequência decrescente de grau de concentração. Após, as lâminas foram lavadas em água deonizada por 1 minuto.

Para o estudo do exame IHQ, utilizou-se a recuperação antigênica pelo calor úmido sob pressão, com uso de uma câmara de pressão Riptide (Celerus), sendo utilizado o tampão universal DIVA - BioCare por 40 minutos a temperatura de 98°C com auxílio da jarra de Coplin.

Após o resfriamento a temperatura ambiente foi efetuada a lavagem com tampão PBS (Phosphate Buffered Saline) ph 7,6 por 5 minutos. Sendo submetida então ao bloqueio da peroxidase por 10 minutos, utilizando peróxido de hidrogênio a 30% diluído em tampão PBS ph 7,6.

Logo em seguida foi efetuada duas lavagens com tampão PBS ph 7,6 e uma lavagem com tampão TBST (Tris Buffered Saline) ph 7,6 e efetuado o bloqueio da proteína (Background Sniper).

As amostras foram incubadas por uma hora com os anticorpos primários. O painel de rotina utilizado foram os marcadores: p53 (BioCare, Lote 081719, diluição 1:500), cerb-B2 (BioCare, Lote 022219, diluição 1:250) e MSI (BioCare, Lote 091718, diluição 1:250).

Posteriormente sendo efetuada duas lavagens por TBST ph 7,6 por 03 minutos cada e incubado no polímero Probe Mouse (Kit universal Mach 4- Polimer) por 30 minutos, em seguida mais duas lavagens em tampão TBST ph 7,6 pelo tempo de 03 minutos cada.

As lâminas foram incubadas posteriormente em MR HRP- Polymer pelo tempo de 30 minutos, passando novamente por duas lavagens em tampão TBST ph 7,6.

Na sequência os cortes foram incubados no DAB (Diaminobenzidina) por 5 minutos e submetidas a coloração de fundo pela hematoxilina de Harris.

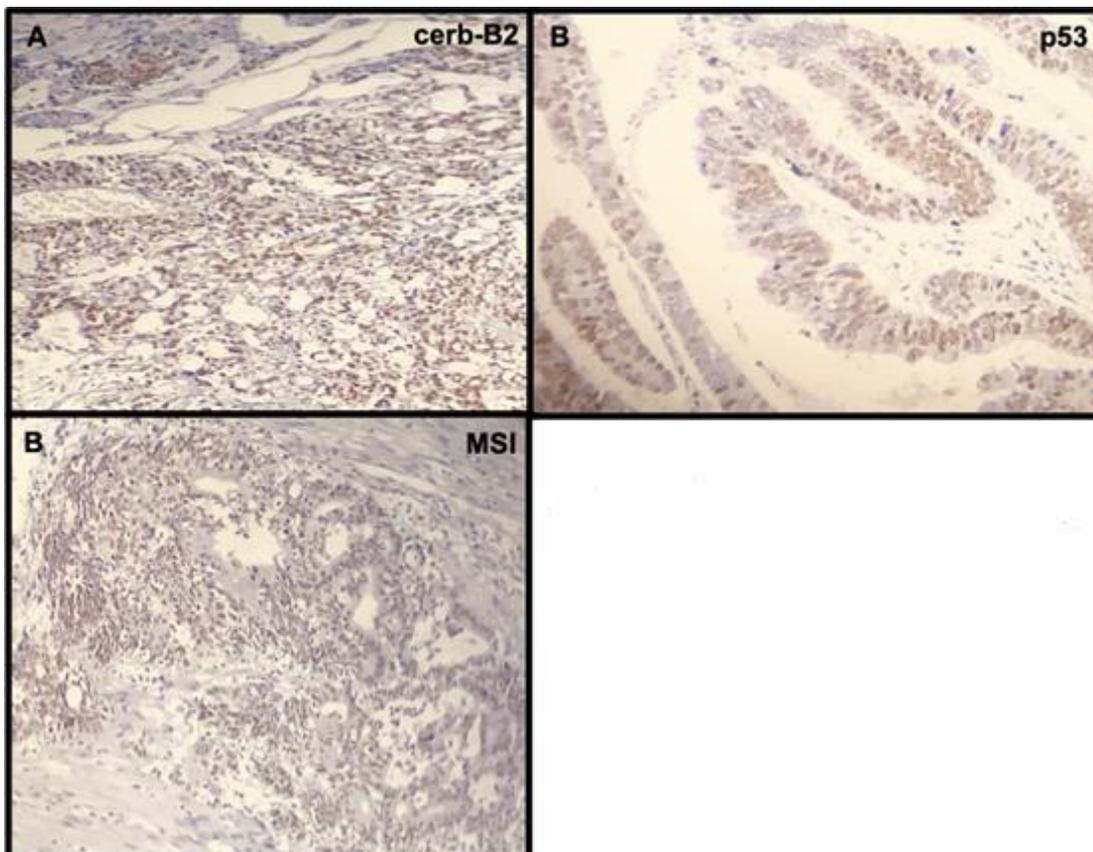
O controle negativo da técnica foi realizado pela execução da técnica sem a

adição do anticorpo primário, enquanto o positivo foi realizado com lâmina proveniente de paciente portador de CCR com reconhecida expressão positiva. Para análise imunohistoquímica utilizou-se microscópio óptico comum (Nikon Eclipse E200), 40x, 100x e magnificação final de 400x.

Todas as lâminas foram lidas por patologista experiente, sem o conhecimento prévio das características clínicas de cada doente e com acesso somente aos seus próprios resultados, o qual classificou a expressão tecidual dos marcadores cerb-B2, p53 e MSI. Após leitura de três campos adotou-se o resultado, positivo ou negativo. Considerou-se como reação positiva à coloração nuclear que ocorreu de modo difuso, com pontos de intensidade variáveis e distribuição homogênea. Considerou-se ausência de expressão tecidual (negativo) quando menos de 10% das células analisadas apresentavam expressão tecidual para os marcadores cerb-B2, p53 e MSI.

A figura 5 mostra o padrão imunohistoquímico positivo para os marcadores cerb-B2, p53 e MSI. A leitura da imunocoloração foi sempre realizada na região de graduação (diferenciação) histológica do tumor definida previamente no estudo convencional pela técnica da hematoxilina-eosina. Assim, caso a neoplasia fosse considerada como bem diferenciada a leitura foi realizada nessa área.

Figura 6. Imagens dos resultados positivos na avaliação imunohistoquímica para os marcadores (A) cerb-B2, (B) p53 e (C) MSI. 100x.



4.9 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram digitados no Programa Excel e analisados no Programa Stata 14.0. Para as variáveis qualitativas, os dados foram descritos em valores absolutos e relativos; e, para as variáveis quantitativas por meio de média e desvio-padrão. Utilizou-se o Teste de Fisher para avaliar as diferenças entre as proporções dos marcadores p53, cerb-B2 e MSI com parâmetros clínicos e patológicos. Considerou-se significância estatísticas valores de $p \leq 0,05$.

4.10 - ASPECTOS ÉTICOS

O uso de material biológico humano, coleta dos dados e a manipulação das informações deste projeto, foram somente utilizadas a partir da permissão e a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Tocantins (CEP – UFT).

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS CERB-B2, P53, INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES E MUTAÇÕES DO KRAS E BRAF, EM PACIENTES COM ADENOCARCINOMA COLORRETAL NO ESTADO DE TOCANTINS.

Pesquisador Responsável: Maria Cristina da Silva Pranchevicius.

Área Temática: Biotecnologia

Versão: 2. CAAE: 93356218.9.0000.5519.

Submetido em: 17/04/2018.

APROVADO EM: 13/06/2019.

Instituição Proponente: Fundação Universidade Federal do Tocantins.

Situação da Versão do Projeto: Aprovado.

Localização atual da Versão do Projeto: CAAE: 93356218.9.0000.5519

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio.

5 - RESULTADOS

O estudo foi realizado com 77 pacientes portadores de câncer colorretal (CCR). A média de idade encontrada nos pacientes portadores de CCR foi de 60,1 anos ($\pm 14,8$). Em relação à faixa etária, 14,3% dos indivíduos possuíam idade inferior a 40 anos (11 casos), 11,7% com idade entre 41 a 50 anos (09 casos) e 74,0% com idade superior a 50 anos (57 casos) (Tabela 1).

Sendo que a frequência entre os gêneros foi 57,2% pertencente ao sexo masculino e 42,8% pertencente ao sexo feminino (Tabela 1).

Quando nós avaliamos o tipo histopatológico, a maior prevalência foi de adenocarcinoma, com presença de 73 casos (94,8%), e o de menor frequência foi de carcinoma mucinoso com 4 casos (5,2%) (Tabela 1).

A maioria dos pacientes apresentaram a diferenciação histológica de baixo grau (94,8%; 73 casos) (adenocarcinoma bem diferenciados e moderadamente diferenciados) e apenas 5,2% (4 casos) dos pacientes possuíam a diferenciação histológica de alto grau (adenocarcinomas pouco diferenciados ou indiferenciados) (Tabela 1).

As peças cirúrgicas (colectomias) no material analisado foram 44 (57,1%) casos, entre esses, 54,5% dos casos tinham presença de tumor medindo entre 2,0 a 5,0 cm, 34,1% maiores que 5,0 cm, e apenas 6,8% menores ou igual a 2,0 cm (Tabela 1).

A avaliação de presença de invasão linfática (metástases para linfonodos regionais) foi positiva para 23 casos (52,3%) e negativa para 16 casos (36,4%) e em 5 (11,3%) foram desconhecidas (Tabela 1).

Tabela 1. Características clínicas e patológicas de indivíduos com CCR (cancer colorretal). Estado do Tocantins, 2017-2019. (n=77)

Características	n(%)
<i>Média de idade (\pmDP)</i>	60,1 \pm 14,8 anos
<i>Faixa etária</i>	
\leq 40 anos	11 (14,3)
41 – 50 anos	9 (11,7)
> 50 anos	57 (74,0)
<i>Sexo masculino</i>	44 (57,2)
<i>Sexo feminino</i>	33 (42,8)
<i>Tipo histológico</i>	
Adenocarcinoma	73 (94,8)
Carcinoma Mucinoso	4 (5,2)
<i>Grau de diferenciação</i>	
Baixo grau	73 (94,8)
Alto grau	4 (5,2)

<i>Tipo de procedimento</i>	
Cirúrgico	44 (57,1)
Endoscópico	33 (42,9)
<i>Tamanho do tumor (extensão) (n=42)*</i>	
< 2,0 cm	3 (6,8)
2,0 a 5,0 cm	24 (54,5)
> 5,0 cm	15 (34,1)
<i>Sistema TNM</i>	
<i>Invasão da parede (T)</i>	
Camada submucosa (T1)	2 (2,6)
Camada muscular (T2)	0 (0,0)
Camada serosa (T3)	42(54,5)
Orgão vizinhos (T4)	0 (0,0)
Sem avaliação (Tx)	33 (42,9)
<i>Invasão linfática (N) (n=44)**</i>	
Positiva (N1,N2)	23 (52,3)
Negativa (N0)	16 (36,4)
Desconhecido (Nx)***	5 (11,3)
<i>Metastases a distância (M)</i>	
Desconhecido (Mx)	77 (100)
Total	77 (100,0)

* Foram excluídos os 33 casos oriundos de biopsias endoscópicas e 2 casos de peças cirúrgicas fragmentas.

** Foram excluídos os 33 casos oriundos de biopsias endoscópicas.

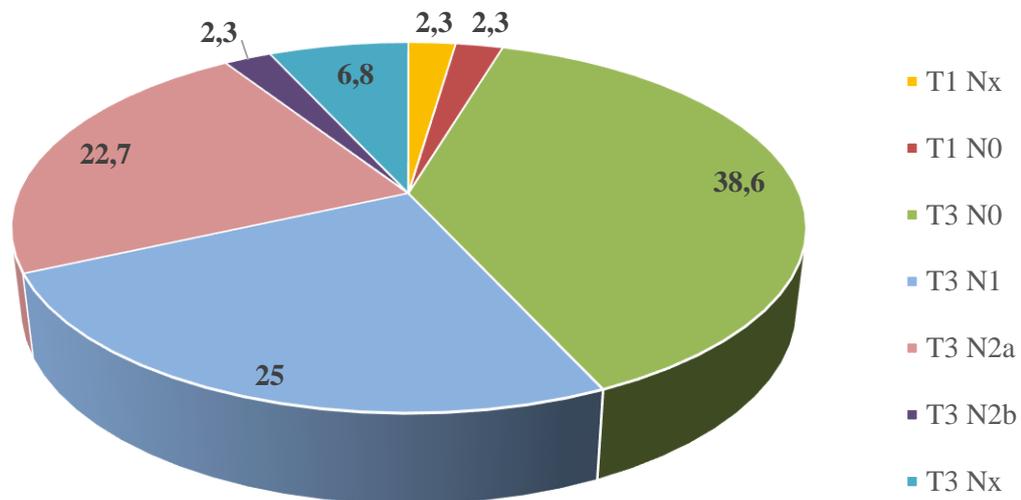
*** Presença de 5 peças cirúrgicas sem linfonodos avaliáveis.

De acordo com a classificação TNM (tumor, linfonodos, metástases) e o estadiamento segundo o American Joint Committee on Cancer (AJCC, 2016) (Figura 1), dos 44 pacientes com peça cirúrgica ressecada, 42 tumores foram T3 e 2 tumores T1. Quando associados a N (linfonodos) obtivemos os seguintes resultados: em 1 caso (2,3%) classificado como T1N0 (estadio I), em 1 caso (2,3%) classificado como T1 Nx (estadio I), em 3 casos (6,8%) classificado como T3 Nx (estadio IIA), em 17 casos (38,6%) classificado como T3 N0, (estadio IIA), em 11 casos (25%) classificado como T3 N1, (estadio IIIB), em 10 casos (22,7%) classificado como T3 N2a (estadio IIIB), e por fim 1 caso (2,3%) foi classificado como T3 N2b (estadio IIIC) (Figura 7).

As peças endoscópicas foram excluídas da classificação TNM, pois não possibilitaram esta avaliação. O tamanho do tumor, a invasão linfática, foram parâmetros apenas utilizados para as peças cirúrgicas.

A ausência do envio dados clínicos e um followup dos pacientes, pelo medico soliciante, em 33 casos para pacientes os portadores de CCR, não possibilitou a avaliação pelo sistema TNM (tamanho do tumor, invasão linfática ou a presença de metástases a distância), sendo que estes casos foram classificados apenas como Tx (invasão de parede desconhecida ou não pode ser avaliada).

Figura 7. Classificação TNM (tumor, linfonodos, metástases) de indivíduos com CCR (câncer colorretal). Estado do Tocantins, 2017 -2019. (n=44)



Tumores com tamanho entre 2,0 a 5,0 centímetros foram mais prevalentes nos indivíduos com idade entre 41 a 50 anos (80,0%). Em indivíduos com idade superior a 50 anos, 45,2% possuíam tumor com tamanho entre 2,0 e 5,0 cm e 45,2% tumores com tamanho acima de 5,0 cm.

Em relação ao grau de diferenciação, tumores entre 2,0 e 5,0 cm ocorreram em 55% dos tumores de baixo grau de diferenciação, enquanto todos os casos de tumores com alto grau de diferenciação possuíam tamanho entre 2,0 a 5,0 cm.

A invasão linfática foi mais prevalente (54,6%) também nos tumores entre 2,0 a 5,0 cm, enquanto 40,9% dos tumores maiores que 5,0 cm possuíam invasão linfática positiva (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição dos indivíduos com CCR (câncer colorretal) de acordo com o tamanho e características clínicas. Estado do Tocantins, 2017-2019.

Características	Tamanho			p
	< 2,0cm n(%)	2,0 – 5,0cm n(%)	>5,0cm n(%)	
<i>Idade (n=42)*</i>				0,112
≤ 40 anos	0 (0,0)	6 (100,0)	0 (0,0)	
41 – 50 anos	0 (0,0)	4 (80,0)	1 (20,0)	
> 50 anos	3 (9,6)	14 (45,2)	14 (45,2)	
<i>Grau de diferenciação (n=42)*</i>				0,455
Baixo grau	3 (7,5)	22 (55,0)	15 (37,5)	
Alto grau	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	

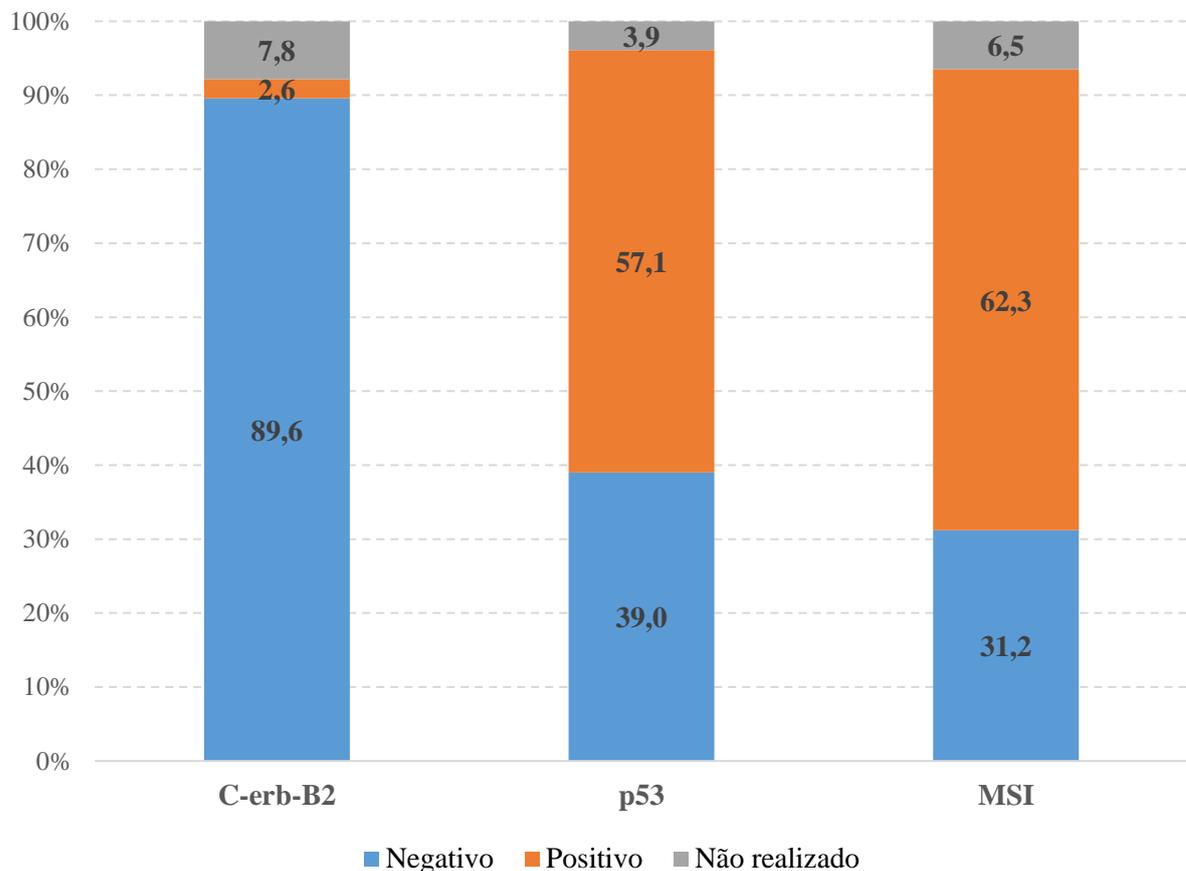
Sistema TNM (n=42)*			
<i>Invasão da parede (T)</i>			0,116
Camada submucosa (T1)	1 (33,3)	2 (66,7)	0 (0,0)
Camada serosa (T3)	2 (5,1)	22 (56,4)	15 (38,5)
<i>Invasão linfática (N)</i>			0,380
Positiva (N1,N2)	1 (4,5)	12 (54,6)	9 (40,9)
Negativa (N0)	2 (12,5)	8 (50,0)	6 (37,5)
Desconhecida (Nx)**	0 (0,0)	4 (100,0)	0 (0,0)
Total	3 (7,1)	24 (57,2)	15 (35,7)

*Foram excluídos 33 casos oriundos de biopsias endoscópicas e 2 casos de peças cirúrgicas fragmentas.

** Presença de 4 peças cirúrgicas sem linfonodos avaliáveis.

Em relação à frequência de expressão imunohistoquímica dos marcadores cerb-B2, p53 e MSI em indivíduos com câncer colorretal, 2,6% foram positivos para cerb-B2, 57,1% para p53 e 62,3% dos casos apresentaram o marcados MSI (Figura 8).

Figura 8 . Distribuição da expressão imunohistoquímica dos marcadores p53, cerb-B2 e MSI de indivíduos com CCR (câncer colorretal). Estado do Tocantins, 2017-2019. (n=77).



A pesquisa para cerb-B2 apresentou 2 (2,6%) casos positivos, 69 (89,6%) negativos, e em 6 (7,8%) dos casos a pesquisa para marcador cerb-B2 não pode ser realizada, por falta por blocos esgotados, com material exíguo para estudo.

Para o marcador cerb-B2, indivíduos com idade abaixo de 40 anos 9 casos (81,8%) foram negativos, 2 casos (18,2%) foram desconhecidos e nenhum caso foi positivo (0,0%). Entre os pacientes com 41 a 50 anos, 7 casos (77,8%) foram negativos e 2 casos (22,2%) foram desconhecidos.

Nos indivíduos com idade acima de 50 anos o cerb-B2 apresentou-se positivo em 2 casos (3,5%), negativo em 52 (93,0%) e desconhecido em 2 (3,5%) (Tabela 3).

Em relação ao sexo, o marcador cerb-B2 foi positivo em 2,3% dos homens e em 3,0% das mulheres com CCR. Os casos desconhecidos entre os homens teve uma prevalência de 11,3%, e entre as mulheres de 3%.

O tipo histológico de CCR encontrado nos casos positivos para o marcador cerb-B2 foi o adenocarcinoma, sendo que os casos de carcinoma mucinoso foram negativos. Ademais, casos negativos para o cerb-B2 foram identificados em 100% dos casos com lesão de alto grau e em 89,1% das lesões de baixo grau, enquanto que dos casos positivos 2,7% todos apresentaram lesões de baixo grau. O tamanho do tumor não associou-se ao marcador cerb-B2.

Em relação à invasão linfática, 100% dos casos de invasão de linfonodos negativos, também foram negativos para o marcador cerb-B2 e 87% dos positivos apresentaram negatividade para este marcador (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição da expressão imunoistoquímica do marcador cerb-B2 segundo características clínicas e patológicas de indivíduos com CCR (cancer colorretal). Estado do Tocantins, 2017-2019. (n=77)

Características	Marcador cerb-B2			p
	Positivo n(%)	Negativo n(%)	Não realizado n(%)	
<i>Idade</i>				0,181
≤ 40 anos	0 (0,0)	9 (81,8)	2 (18,2)	
41 – 50 anos	0 (0,0)	7 (77,8)	2 (22,2)	
> 50 anos	2 (3,5)	52 (93,0)	2 (3,5)	
<i>Sexo</i>				0,398
Masculino	1 (2,3)	38 (86,4)	5 (11,3)	
Feminino	1 (3,0)	31 (94,0)	1 (3,0)	
<i>Tipo histológico</i>				0,404
Adenocarcinoma	2 (2,7)	66 (90,4)	5 (6,9)	
Carcinoma Mucinoso	0 (0,0)	3 (75,0)	1 (25,0)	
<i>Grau de diferenciação</i>				0,783
Baixo grau	2 (2,7)	65 (89,1)	6 (8,2)	
Alto grau	0 (0,0)	4 (100,0)	0 (0,0)	

<i>Tamanho do tumor (n=42)*</i>				0,191
< 2,0 cm	0 (0,0)	3 (100,0)	0 (0,0)	
2,0 a 5,0 cm	0 (0,0)	20 (83,3)	4 (16,7)	
> 5,0 cm	0 (0,0)	15 (100,0)	0 (0,0)	
Sistema TNM				
<i>Invasão da parede (T)</i>				0,533
Camada mucosa (T1)	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	
Camada serosa (T3)	0 (0,0)	38 (90,5)	4 (9,5)	
Desconhecidos (Tx)	2 (6,1)	29 (87,8)	2 (6,1)	
<i>Invasão linfática (n=44)**</i>				0,252
Positiva (N1,N2)	0 (0,0)	20 (87,0)	3 (13,0)	
Negativa (N0)	0 (0,0)	16 (100,0)	0 (0,0)	
Desconhecida (Nx)	0 (0,0)	4 (80,0)	1 (20,0)	
Total	2 (2,6)	69 (89,6)	6 (7,8)	

*Foram excluídos os 33 casos oriundos de biopsias endoscópicas e 2 casos de peças cirúrgicas fragmentas.

** Foram excluídos os 33 casos oriundos de biopsias endoscópicas.

Com relação à distribuição imunoistoquímica do marcador p53 (Tabela 4), 44 casos (57,1%) foram positivos, 30 casos (39,0%) negativos, e 3 (3,9%) eram desconhecidos. O marcador p53 foi associado estatisticamente com a idade ($p < 0.044$), sendo que as prevalências de positivos foram de 54,5%, 55,6% e 57,9%, entre os casos com idade igual ou inferior a 40 anos, entre 41 a 50 anos e maior que 50 anos, respectivamente.

Destacam-se as proporções de casos não realizados para este marcador entre as faixas etárias, cujos valores foram de 18,2% entre o grupo com idade inferior a 41 anos e 11,1% entre aqueles com idade superior a 50 anos (Tabela 4).

Foi observado que, entre o sexo masculino, 59,1% foram positivos para o marcador p53, 34,1% foram negativos e 6,8% desconhecidos. Entre as mulheres, 54,5% foram positivas e 45,5% negativas. Quanto ao tipo histológico, obtivemos em 57,5% dos adenocarcinomas e 50% dos carcinomas mucinosos positividade para o marcador p53 (Tabela 4).

Foi encontrado valores positivos para o p53 em 56,2% e 75% dos casos de baixo e alto grau de diferenciação, respectivamente. A porcentagem de marcador p53 positivo entre os tamanhos de tumor foi de 66,7% entre os casos com tumores menores que 2,0 cm, 45,8% entre os casos com tumores entre 2,0 a 5,0 cm, e 53,3%, para aqueles casos com tumores maiores que 5,0 cm.

Entre os indivíduos com invasão linfática positiva, 43,5% foram positivos para o p53, 47,8% negativos e 8,7% não realizados. Em relação aos casos com invasão linfática negativa, 68,7% foram positivos para este marcador, 31,3% negativos e em 8,7% destes a pesquisa para o p53 não foi realizada (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição da expressão imunistoquímica do marcador p53 segundo características clínicas e patológicas de indivíduos com CCR (câncer colorretal). Estado do Tocantins, 2017-2019. (n=77)

Características	Marcador p53			p
	Positivo n(%)	Negativo n(%)	Não realizado n(%)	
<i>Idade</i>				0,044
≤ 40 anos	6 (54,5)	3 (27,3)	2 (18,2)	
41 – 50 anos	5 (55,6)	3 (33,3)	1 (11,1)	
> 50 anos	33 (57,9)	24 (42,1)	0 (0,0)	
<i>Sexo</i>				0,230
Masculino	26 (59,1)	15 (34,1)	3 (6,8)	
Feminino	18 (54,5)	15 (45,5)	0 (0,0)	
<i>Tipo histológico</i>				0,846
Adenocarcinoma	42 (57,5)	28 (38,4)	3 (4,1)	
Carcinoma Mucinoso	2 (50,0)	2 (50,0)	0 (0,0)	
<i>Grau de diferenciação</i>				0,737
Baixo grau	41 (56,2)	29 (39,7)	3 (4,1)	
Alto grau	3 (75,0)	1 (25,0)	0 (0,0)	
<i>Tamanho do tumor (n=42)*</i>				0,617
< 2,0 cm	2 (66,7)	1 (33,3)	0 (0,0)	
2,0 a 5,0 cm	11 (45,8)	10 (41,7)	3 (12,5)	
> 5,0 cm	8 (53,3)	7 (46,7)	0 (0,0)	
<i>Sistema TNM</i>				0,202
<i>Invasão da parede (T)</i>				
Invasão mucosa (T1)	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	
Invasão serosa (T3)	22 (54,4)	17(40,5)	3 (7,1)	
Desconhecida (Tx)	21(63,6)	12 (36,4)	0 (0,0)	
<i>Invasão linfática (n=44)**</i>				0,225
Positiva (N1,N2)	10 (43,5)	11 (47,8)	2 (8,7)	
Negativa (N0)	11 (68,7)	5 (31,3)	0 (0,0)	
Desconhecida (Nx)	3 (60,0)	1 (20,0)	1 (20,0)	
Total	44 (57,1)	30 (39,0)	3 (3,9)	

*Foram excluídos os 33 casos oriundos de biopsias endoscópicas e 2 casos de peças cirurgicas fragmentas.

** Foram excluídos os 33 casos oriundos de biopsias endoscópicas.

A pesquisa para MSI (Tabela 5) apresentou o total de casos de 48 (62,3%) positivos, 24 (31,2%) negativos e, em 5 (6,5%) casos a pesquisa não foi realizada.

Nos indivíduos com faixa etária abaixo de 40 anos, os casos distribuíram-se com 9 (81,8%) de casos positivos, 1 (9,1%) de casos negativos e 1 (9,1%) de casos desconhecidos. Pacientes com faixa etária entre 40 a 50 anos contabilizaram 6 (66,7%) casos positivos, 1 (11,1%) de casos negativos e 2 (22,2%) de casos desconhecidos para o marcador p53. Nos pacientes acima de 50 anos, 33 (57,9%) casos foram positivos, 22 (38,6%) negativos e 2 (3,5%) desconhecidos (Tabela 5).

Na Tabela 5, pode-se observar que todos os casos com tumores ≤ 2,0 cm (100%, n=3) foram positivos para a instabilidade microssatélite. A invasão linfática foi positiva em 34,8% e negativa em 50% dos indivíduos positivos para MSI.

Tabela 5. Distribuição da expressão imunohistoquímica da MSI segundo características clínicas e patológicas de indivíduos com CCR (câncer colorretal). Estado do Tocantins, 2017-2019. (n=77)

Características	Instabilidade de microssatélites (MSI)			p
	Positivo n(%)	Negativo n(%)	Não realizado n(%)	
<i>Idade</i>				0,059
≤ 40 anos	9 (81,8)	1 (9,1)	1 (9,1)	
41 – 50 anos	6 (66,7)	1 (11,1)	2 (22,2)	
> 50 anos	33 (57,9)	22 (38,6)	2 (3,5)	
<i>Sexo</i>				0,282
Masculino	29 (65,9)	11 (25,0)	4 (9,1)	
Feminino	19 (59,6)	13 (39,4)	1 (3,0)	
<i>Tipo histológico</i>				0,304
Adenocarcinoma	46 (63,0)	23 (31,5)	4 (5,5)	
Carcinoma Mucinoso	1 (25,0)	2 (50,0)	1 (25,0)	
<i>Grau de diferenciação</i>				0,805
Baixo grau	45 (61,6)	23 (31,5)	5 (6,9)	
Alto grau	3 (75,0)	1 (25,0)	0 (0,0)	
<i>Tamanho do tumor (n=42)*</i>				0,152
< 2,0 cm	3 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
2,0 a 5,0 cm	8 (33,3)	13 (54,2)	3 (12,5)	
> 5,0 cm	7 (46,7)	8 (53,3)	0 (0,0)	
<i>Sistema TNM</i>				0,179
<i>Invasão de parede (T)</i>				
<i>Invasão mucosa (T1)</i>	2 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
<i>Invasão serosa (T3)</i>	19 (45,3)	20 (47,6)	3 (7,1)	
Desconhecidos (Tx)	23 (69,7)	8 (24,2)	2 (6,1)	
<i>Invasão linfática (n=44)**</i>				0,348
Positiva (N1,N2)	8 (34,8)	13 (56,5)	2 (8,7)	
Negativa (N0)	8 (50,0)	8 (50,0)	0 (0,0)	
Desconhecida (Nx)	1 (20,0)	3 (60,0)	1 (20,0)	
Total	48 (62,3)	24 (31,2)	5 (6,5)	

*Foram excluídos os 33 casos oriundos de biopsias endoscópicas e 2 casos de peças cirúrgicas fragmentas.

** Foram excluídos os 33 casos oriundos de biopsias endoscópicas.

Não foram encontradas associações estatísticas entre a proporção de expressão dos marcadores p53 e cerb-B2 com a MSI de indivíduos com CCR. Entre os casos com marcação positiva para p53 e cerb-B2, 73,2% e 100% foram positivos para a marcação MSI, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição da expressão imunoistoquímica dos marcadores p53, cerb-B2 e MSI de indivíduos com CCR. Estado do Tocantins, 2017-2019. (n=71)*

Marcadores	Instabilidade de microssatélites (MSI)		p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)	
P53			0,146
Negativo	13 (43,3)	17 (56,7)	
Positivo	11 (26,8)	30 (73,2)	
cerb-B2			0,305
Negativo	24 (34,8)	45 (65,2)	
Positivo	0 (0,0)	2 (100,0)	

*Foram 6 casos excluídos ou não realizados.

6 - DISCUSSÃO

O CCR possui grande relevância epidemiológica por ser a terceira neoplasia maligna mais comumente diagnosticada, e a quarta principal causa de morte por câncer (INCA, 2018). No presente estudo a faixa etária que foi acometida variou de 45,3 anos a 74,9 anos. Os indivíduos mais afetados tinham mais 50 anos de idade (57,2%), sendo que a média de idade dos pacientes acometidos foi de 60,1 anos. Tais achados corroboram com a literatura, onde foi demonstrado que o CCR tem pico de incidência entre 60 e 79 anos, podendo ocorrer também antes dos 50 anos (menos de 20% dos casos) e nesses casos deve-se suspeitar de outras condições clínicas (BRASILEIRO FILHO, 2011).

Em outros trabalhos, as populações que mais foram afetadas possuíam entre 50 e 75 anos, sendo a idade média de 62 anos (KOYAMA; KOTAKE, 1997, MENDES; COSTA; TAMURA, 1992, PINHO *et al.*, 2004, PONK DE LEON *et al.*, 2004), mostrando uma maior prevalência da doença na população mais idosa, semelhante aos encontrados em nosso estudo. Em consonância com os resultados obtidos, destaca-se que a idade é fator risco para CCR, sendo que o risco desse tumor aumenta quanto maior for a faixa etária, uma vez que mais de 50% dos casos ocorrem em indivíduos com mais de 50 anos (HABR-GAMA, 2005).

Em nosso estudo, a maioria dos pacientes portadores de CCR foram do sexo masculino com 44 casos (57,2%) e 33 casos (42,8%) foram pertencentes ao sexo feminino, porém sem significância estatística, e com pouca diferença em relação a outros estudos (BRASIL, 2017; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Em geral, a literatura descreve que o risco de desenvolver um CCR é de aproximadamente 1 em 22 (4,49%) para homens e 1 em 24 (4,15%) para mulheres. Este risco é ligeiramente menor nas mulheres do que nos homens, sendo que outros fatores também podem afetar o risco de desenvolver o CCR (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

No Brasil o CCR entre os homens é o segundo mais frequente na Região Sudeste (23,29/100 mil) e o terceiro nas Regiões Sul (22,17/100 mil) e Centro-Oeste (16,95/100 mil). Nas Regiões Nordeste (7,98/100 mil) e Norte (4,97/100 mil), ocupa a quarta posição. Para as mulheres, é o segundo mais frequente nas Regiões Sudeste (23,86/100 mil) e Sul (22,92/100 mil). Nas Regiões Centro-Oeste (17,98/100 mil), Nordeste (9,52/100 mil) e Norte (7,38/100 mil), é o terceiro mais frequente (BRASIL, 2017).

No Estado do Tocantins, a estimativa de novos casos em 2018, foi em taxas brutas e ajustadas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária de CCR, de 50 casos em homens, taxa bruta 6,91, e uma taxa ajustada 8,48, e para as mulheres de 60 casos, uma taxa bruta 8,20 e uma taxa ajustada de 8,25 (BRASIL, 2017). Sugere-se que estas variações das taxas de incidência do

CCR no Estado do Tocantins (Região Norte) serem diferentes de outras regiões do Brasil, poderia ser em virtude do Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) (ALLEMANI, *et al.*, 2015).

Em nossa casuística, o tipo histológico mais frequente entre os casos de CCR foi o adenocarcinoma, acometendo 94,8% dos indivíduos incluídos no estudo. De acordo com alguns autores, os adenocarcinomas respondem por cerca 95% dos tumores do intestino grosso (SANTOS; SILVA; MIIJI, 2005). A progressão de um adenoma para adenocarcinoma é a via carcinogênica mais comum que ocorre, devido às alterações de mutação adicionais e/ou perda da heterozigose, em alguns genes que promovem o crescimento do adenoma, que levam a um grau maior de displasia e capacidade de infiltrar e invadir tecidos (BRASILEIRO FILHO, 2011). Este fato explica o adenocarcinoma ser a neoplasia mais frequente no colon.

Em nosso estudo, o tipo histológico de menor frequência foi de carcinoma mucinoso com 4 casos (5,2%). Carcinomas mucinosos de CCR na literatura apresentam incidência de 8 a 20% (PINHO *et al.*, 2004). Em uma análise realizada no *Oxford Cancer Registry* (GREEN *et al.*, 2007) foi demonstrado que 10% dos tumores de cólon e 5% dos tumores de reto são mucinosos. O adenocarcinoma mucinoso, em qualquer grau de diferenciação, é considerado como fator localmente agressivo e de pior prognóstico (MONTEIRO *et al.*, 2006). Tumores mucinosos são os que, com maior assiduidade, se associam a um maior envolvimento da circunferência intestinal (FARHOUD *et al.*, 2002) podendo levar a obstruções.

A distribuição do grau de diferenciação celular nos pacientes do nosso estudo foi semelhante à encontrada na literatura (LUPINACCI *et al.*, 2003; GREEN *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2006), pois a maior parte dos pacientes apresentaram ao diagnóstico, um adenocarcinoma com baixo grau diferenciação, em 73 casos (94,8%). O grau de diferenciação celular do CCR é um fator importante para determinar o prognóstico. A graduação histológica mostrou ter um efeito significativo na sobrevivência independentemente do estadiamento, mas seu valor prognóstico ainda pode ser aperfeiçoado se critérios mais objetivos forem usados para melhor avaliar essa variável (VOLPATO; KOCH, 2009).

Outro fator importante é o estadiamento anátomo-patológico (classificação TNM) da peça operatória, sendo que esta é a principal ferramenta utilizada isoladamente para oferecer subsídios para o prognóstico em pacientes com CCR (VOLPATO; KOCH, 2009).

As categorias T e N podem ser subclassificadas em graduações numéricas e graduações alfabéticas (a, b, c). Tanto as graduações numéricas como as alfabéticas expressam o nível de evolução do tumor e dos linfonodos comprometidos. O símbolo "X" é utilizado quando uma categoria não pode ser devidamente avaliada. Quando as categorias T, N e M são agrupadas em combinações pré-estabelecidas, ficam distribuídas em estádios que, geralmente, variam de I a IV. Estes estádios podem ser subclassificados em A e B, para expressar o nível de evolução da doença. (INCA; 2018). Em 44 pacientes que tiveram peças cirúrgicas ressecadas em nosso estudo, foram estadiados pelo grau de invasão (T), em 42

casos (95,45%) apresentavam grau de invasão T3 e apenas 2 casos (4,55%) foram estadiados como T1, isso demonstra o CCR diagnosticado em uma fase mais avançada da doença, na maioria dos casos. A avaliação do envolvimento de linfonodos regionais (N) é de suma importância para determinar o prognóstico e seu estudo é mandatório (YASUDA *et al.*, 2001; JESTIN *et al.*, 2005; CSERNI, 2002), desta forma associamos o estudo dos linfonodos para fazer o estadiamento (AJCC, 2016) em nossa avaliação.

O sistema de estadiamento tumor / linfonodo / metástases (Sistema TNM) da UICC/AJCC ainda se mantém como padrão ouro (COMPTON, 2006) para fatores prognósticos nos CCR. Em nossos resultados, obtivemos 50,0% dos casos em estadiamento III, 45,4% dos casos em estadiamento II, 4,6% dos casos em estadiamento I, demonstrando um diagnóstico da doença em estadiamentos clínicos avançados. Com relação ao estadiamento clínico, dados publicados pelos Registros Hospitalares de Câncer mostram que até 80% dos pacientes encontram-se em estadiamentos avançados da doença no momento do diagnóstico (estadiamentos III e IV) (BRASIL, 2003). Sabe-se que quanto maior os estadiamentos menor a sobrevida. A taxa de sobrevida para pacientes com CCR é correlacionada diretamente ao estadiamento TNM, o qual foi inicialmente desenvolvido para prever prognóstico, porém sua função foi alterada e valorizada, podendo assim também auxiliar nas decisões e na escolha do tratamento (ZLOBEC; LUGLI, 2008).

Outro fator estudado foi tamanho do tumor, que é um achado morfológico que está principalmente relacionado com as manifestações clínicas, sendo importante também para documentação do caso, e para possível comparação com os exames de imagem, se caso for necessário, porém não há evidências demonstrando que o tamanho do tumor tem alguma significância prognóstica (COMPTON, 2003), o que corrobora com os dados encontrados neste estudo, pois o tamanho de tumor não apresentou associação estatística, nem com a idade, ou grau de diferenciação e invasão linfática nos indivíduos com CCR.

No estudo de Volpato e Koch (2008), tentou-se associar o diâmetro maior que 3,5 cm a outros parâmetros clínicos, mas tumores maiores apenas apresentaram um estadiamento T mais avançado, porém no geral, não atribuí valor de importância ao tamanho da neoplasia. Em um outro estudo Yasuda *et al.*, (2001), também não conseguiram demonstrar relação significativa entre a recorrência do CCR e a presença de tumores de diâmetros maiores que 3,5 cm.

Em relação à frequência de expressão imunohistoquímica dos marcadores cerb-B2, p53 e MSI, em indivíduos com câncer colorretal, 2,6% dos casos foram positivos para cerb-B2, 57,1% dos casos para p53 e 62,3% dos casos apresentaram o marcação positiva para MSI. Na literatura foi encontrado valores similares ao nosso estudo, Amira *et al.*, (2014) encontraram uma prevalência de expressão de MSI em 71% dos indivíduos com CCR, enquanto Xi Hong-Qing *et al.*, (2017) detectaram a expressão da proteína p53 em 60,6% dos CCR, Laurent-Puig *et al.* (2016) encontraram que a superexpressão de cerb-B2 é responsável

por aproximadamente 2% nos casos CCR.

O *cerb-B2*, embora, corroborando com a literatura apresentou uma frequência de expressão baixa (2,6%) e não se associou estatisticamente às características clínicas. Tal achado pode relacionar-se ao aspecto do *cerb-B2* ser um marcador que está surgindo como um preditor negativo para resposta aos tratamentos direcionados ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (LAURENT-PUIG *et al.*, 2016), porém estudos ainda deverão ser realizados para validar sua utilização na oncologia. Alterações genéticas deste marcador já foram identificadas clinicamente em alguns pacientes com CCR (BERTOTTI *et al.*, 2015). Embora o papel do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (*cerb-B2*) permaneça ainda incerto como biomarcador prognóstico no CCR, seu papel como alvo terapêutico, a cada dia está aumentando. Desta forma, pacientes com CCR e *cerb-B2* positivo, poderão ter menos opções de tratamento e prognóstico menos favorável (HAINSWORTH *et al.*, 2018). Outro fato é a diversificação de funções de *cerb-B2*, que pode se dar também pela utilização de diferentes vias intracelulares de sinalização (FREITAS *et al.*, 2008). Várias mutações ativadoras de *cerb-B2*, que podem ser concomitantes, foram identificados no CCR. Estas mutações estão presentes em aproximadamente 7% dos CCR, e estas podem coexistir com a amplificação do gene *cerb-B2* em cerca de 20% dos casos (KAVURI *et al.*, 2015).

No presente estudo, mais da metade dos casos foram positivos para p53 e, foi encontrado associação com a idade acima de 50 anos, reforçando os achados da literatura que demonstram que a forma mais comum de transformação maligna é a esporádica (BRASILEIRO FILHO, 2011). A progressão de um adenoma para adenocarcinoma, são devidas às alterações de mutação adicionais e/ou perda da heterozigose (LOH) em alguns genes que promovem o crescimento do adenoma, levando a um grau maior de displasia e capacidade de infiltrar e invadir tecidos (BRASILEIRO FILHO, 2011). Em um estudo Martinez *et al.*, (2008) encontraram positividade da proteína p53 em 77% dos casos. Com relação as diferentes variáveis clínicas consideradas verificou-se maior tendência de expressão da proteína mutante quando se considerava a idade, porém não encontrou relação com gênero e tamanho do tumor (MARTINEZ *et al.*, 2008), assim como os achados do nosso estudo.

As mutações no gene APC (via supressora) que estão associadas ao p53, tem uma incidência em 80% dos tumores esporádicos (BRASILEIRO FILHO, 2011) que são encontrados em pacientes com idade mais avançada. Embora o APC não foi analisado nesse estudo, a expressão do marcador p53 associou-se a idade dos pacientes sendo mais frequente em pacientes acima de 50 anos. Também é de conhecimento que a proteína p53 é uma ativadora de apoptose e tem o papel de bloquear a divisão celular em células que sofreram injúrias no seu DNA, dando tempo para a sua reparação (BRASILEIRO FILHO, 2011). A perda da função desse gene pode estar relacionada tanto à iniciação, quanto a progressão tumoral (ALMEIDA *et al.*, 2007), desta forma, também podemos associar a

sequência de progressão adenoma para adenocarcinoma, justificando o tipo histológico mais encontrado nos casos positivos para p53 ser o adenocarcinoma.

Os autores Xi Hong-Qing *et al.*, (2017) apontam uma diferença da expressão de p53 quanto ao tamanho e o grau de diferenciação variando com o tipo histológico do CCR, sendo que quanto maior o tumor, consecutivamente menor será o grau de diferenciação e maior a presença de mutação do p53. Essa associação não foi encontrada nesse estudo, pois a expressão do p53 foi mais frequente em tumores menores de 2,0 cm. Porém de acordo com alguns estudos a maior expressão do p53 está associada a menor diferenciação do tumor e pior comportamento (agressividade tumoral) (WU *et al.*, 2017; JUNIKU-SHKOLOLLI *et al.*, 2015; SAYAR *et al.*, 2015) o que corrobora com o encontrado nesse estudo, pois 75% dos tumores com alto grau de diferenciação foram positivos para o p53. Desta forma, a expressão da p53 pode contribuir para a decisão do tratamento do CCR, pois esta é um marcador de prognóstico reservado para a doença (MELINCOVICI *et al.*, 2016; SENOL *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2017; JUNIKU-SHKOLOLLI *et al.*, 2015; SAYAR *et al.*, 2015). A expressão de p53 também aumenta o risco de morte e recidiva, porém sua expressão não interfere no desfecho clínico do tratamento quimioterápico (DEMIR *et al.*, 2014).

Na análise de nossa casuística para MSI, não foi encontrada qualquer relação entre características histológicas dos tumores e idade dos pacientes, mesmo considerando os grupos abaixo de 40 anos e acima desta idade. Alguns trabalhos (GUASTADISEGNI *et al.*, 2010; PINHO, , 2004) correlacionam a MSI com CCR, com o aparecimento de tumores precoces (abaixo de 50 anos) e maior incidência de tumores mucinosos (SINICROPE, *et al.*, 2015; BOGLIOLO, 2011). Em nosso estudo, 48 (62,3%) dos indivíduos com CCR, apresentaram positividade para MSI, sendo que destes 15 indivíduos (19,5%) foram positivos abaixo de 50 anos de idade.

Em nosso estudo o carcinoma mucinoso apresentou de 4 casos (5,2%), apesar de ter havidos casos de metástases positivas linfonodal e MSI positivo, observou-se também que indivíduos com presença de invasão linfática, não apresentaram associação estatística com a MSI. Desta forma, corroborando com a literatura referendada, que descreve que tumores MSI positivo, podem predizer menor frequência de invasão de vasos, menor número de metástases linfonodais e um melhor prognóstico (GUASTADISEGNI *et al.*, 2010; PINHO *et al.*, 2004).

A expressão de MSI não teve associação significativa com a expressão do p53 e do cerb-B2. Isso pode estar relacionado ao fato desses marcadores indicarem aspectos comportamentais diferentes do CCR e por ter origem em vias carcinogênicas distintas (BRASILEIRO FILHO, 2011). Por fim, ressaltamos que a expressão das proteínas cerb-B2, p53 e MSI, estão também correlacionadas com outros marcadores, e que são necessários mais estudos para entender melhor seu comportamento frente a outras alterações.

7 – CONCLUSÃO

O câncer colorretal é uma neoplasia muito frequente, associa-se a altos índices de comorbidade e mortalidade, e pode-se inferir que os indivíduos no Estado do Tocantins estão sendo diagnosticados tardiamente, já que a maior parte dos pacientes classificados em nosso estudo, foram diagnosticados com o adenocarcinoma em estádios avançados da doença. Ademais o nosso estado vem apresentando aumento progressivo nas taxas de mortalidade por câncer de cólon é reto.

Foi observado que o CCR diagnosticado em indivíduos mais velhos teve associação ao marcador p53, corroborando com resultados típicos mostrados, que a forma mais comum de transformação maligna é a esporádica. Vale ressaltar que a expressão da p53 pode estar correlacionada também com outros marcadores, e que são necessários mais estudos para entender melhor seu comportamento frente a estas e outras alterações.

A expressão da MSI não teve associação com a expressão do p53 ou com cerb-B2, demonstrando não haver correlação direta entre as vias de carcinogênese, sendo assim os marcadores podem ser expressos nos casos de CCR, concomitantemente ou não, com vias distintas de mutações, demonstrando que o CCR é uma doença multifatorial, com riscos diferentes.

O marcador cerb-B2 não apresentou associação com os parâmetros clínicos e morfológicos avaliados, dessa forma a expressão deste marcador pode estar associada a outras características que não foram investigadas nesse estudo, sendo uma área altamente significativa para estudos exploratórios futuros.

Destaca-se a relevância deste estudo, pois é o primeiro no Tocantins e um dos poucos da região Norte a demonstrar as características clínicas e patológicas de indivíduos com CCR, assim como o perfil de expressão de marcadores tumorais nesses indivíduos. No presente trabalho a utilização de biomarcadores moleculares para o diagnóstico do CCR, dá respaldo científico às correlações encontradas, oferece subsídio teórico para novos estudos e melhores classificações morfológicas, bem como aplicabilidade na oncologia. Além disso, o conhecimento de biomarcadores no CCR e fatores genéticos específicos, respalda tratamentos mais individualizados, seja cirúrgico, por quimioterapia, radioterapia ou imunoterapia, resultando em um melhor prognóstico ou mesmo a cura.

8 - REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, B. J. *Histologia: essencial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 457p.
- ALEX, A.K. A influência da instabilidade de microssatélites e outros biomarcadores nos desfechos clínicos de pacientes com câncer colorretal metastático: um estudo caso-controle. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ALLEMANI, C. *et al.* Global surveillance of cancer survival 1995-2009: Analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). **The Lancet**. London, v.385, n.9972, p.977–1010, 2015.
- ALMEIDA, J.R.C. *et al.* Marcadores Tumoriais: Revisão De Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**. Rio de Janeiro, v.53, n.3, p.305-316, 2007.
- AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. *AJCC Cancer Staging Manual*, 2016. Disponível em: <http://www.cancerstat-ing.org>. Acesso em: 09 out. 2019.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. *Key Statistics for Colorectal Cancer*. Atlanta, 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/about/key-statistics.html>. Acesso em: 10 out. 2019.
- AMIRA, A.T. *et al.* Immunohistochemical expression pattern of MMR protein can specifically identify patients with colorectal cancer microsatellite instability. **Tumour Biology**. California, v.35, n,7, p.6283–6291, 2014.
- ARNOLD, M. *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**. London, v.66, n.1, p.683-91, 2016.
- ARVELO, F.; SOJO, F.; COTTE, C. Biology of colorectal cancer. **Ecancermedicalscience**. Bristol, v.9, n.9, p.520, 2015.
- BACCHI, E. *et al.* *Manual de padronização de laudos histopatológicos*. 4. ed. Barueri: Minha Editora, 2014.
- BALMAÑA, J. *et al.* Prediction of MLH1 and MSH2 mutations in Lynch syndrome. **Journal of the American Medical Association**. Chicago, v.296, n.12, p.1469-78, 2006.
- BEGNAMI, M.D.F.S. *et al.* Expressão imuno-histoquímica de c-erb-B2 e p53 em carcinomas gástricos. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**. Rio de Janeiro, v.41, n.4, p.279-86, 2005.
- BEPA, Boletim epidemiológico paulista (Online). A relevância do câncer colorretal. São Paulo, v.6, n.68, ago. 2009. Disponível em <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180642722009000800006&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 08 out. 2019.
- BERTOTTI, A. *et al.* The genomic landscape of response to EGFR blockade in colorectal cancer. **Nature**. New York, v.526, n.7572, p.263–267, 2015.
- BODEY, B. The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms. **Expert opinion on biological therapy**. London, v. 2, n. 4, p.371-93, 2002.
- BOSMAN, F.T. *et al.* Classification of Tumours of the Digestive System. **World Health Organization**, v.5, n.3, 2010.

BOUTIN, ADAM T. ET AL., Oncogenic Kras drives invasion and maintains metastases in colorectal cancer. **Genes & development**. 2017; v. 31, n. 4, p. 370-382.

BOUVARD, V. et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. **Lancet oncology**. London, v. 16, n.16, p.1599-600, 2015.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Falando sobre câncer do intestino / Instituto Nacional de Câncer, Sociedade Brasileira de Coloproctologia, Colégio Brasileiro de Cirurgiões, Associação Brasileira de Colite Ulcerativa e Doença de Crohn, Colégio Brasileiro de Cirurgia Digestiva, Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva, Sociedade Brasileira de Cancerologia, Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica. - Rio de Janeiro: INCA, 2003.

BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo patologia. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo patologia. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

CAMPOS, F.G.C.M. *et al.* Incidência de câncer colorretal em pacientes jovens. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. Rio de Janeiro, v.44, n.2, p.208-2015, 2017.

CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. de B.; MANSO, P. P. de A. Técnicas histológicas. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. (Org.). Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010. p. 89-188.

CARNEIRO NETO, J.D. *et al.* Câncer Colorretal: Características Clínicas e Anatomopatológicas em Pacientes com Idade Inferior a 40 Anos. **Revista Brasileira de Coloproctologia**. Rio de Janeiro, v.26, n.4, 2006.

COPPER, D.L. Marcadores tumorais. In: CECIL GOLDMAN, L., AUSIELLO, D. Tratado de medicina interna. 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005: p.1309-312.

CHEN, W.; SWANSON, B.J.; FRANKEL, W.L. Molecular genetics of microsatellite-unstable colorectal cancer for pathologists. **Diagnostic Pathology**. London, v.12, n.1, p.24, 2017.

CHRISTOPHER, W.T. *et al.* BRAF V600E immunohistochemistry in conjunction with mismatch repair status predicts survival in patients with colorectal cancer. **Modern Pathology**. Baltimore, v.27, n.1, p.644–650, 2014.

CICENAS, J. et al., KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma. **Medical oncology**. Houndmills, v.34, n.2, p.26, 2017.

COHEN, R. *et al.* BRAF-Mutated Colorectal Cancer: What Is the Optimal Strategy for Treatment? **Current treatment options in oncology**. Philadelphia, v.18, n.2, p.9, 2017.

COLE, B.F. *et al.* Aspirin for chemoprevention of colorectal adenomas: meta-analysis of the randomized trials. **Journal of the national cancer institute**. Cary, v.101, n.1, p.256– 66, 2009.

COMPTON, C. Colorectal Carcinoma: Diagnostic, Prognostic, and Molecular Features. **Modern Pathology**. Baltimore, v.16, n.4, p.376-88, 2003.

COMPTON C. Prognostic factors in cancer. 3. ed. Chichester: John Wiley & Sons; 2006.

CSERNI G. The influence of nodal size in the staging of colorectal carcinomas. **Journal of clinical pathology**. London, v.55, n.5, p.386-390, 2002.

CUTAIT, R.; FARIAS, R.L.S.; Câncer Colorretal. In: Lopes AC. **Tratado de Clínica Médica-3ª ed.** Rio de Janeiro: Roca, 2016.

DAWSON, H. *et al.* A Review of Current Challenges in Colorectal Cancer Reporting. **Archives of pathology & laboratory medicine.** Chicago, v. 143, n.7, p.869-82, 2019.

DEMIR, L. *et al.* The impact of cell proliferation markers and p53 mutation status on prognosis of non-metastatic colon cancer. **Journal of surgical oncology.** New York, v.109, n.7, p.665-675, 2014.

DEVITA, V.T.J.; LAWRENCE, T.S.; ROSENBERG, S.A. Principles & Practice of Oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2014.

EISENBERG, A.L.A.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais. **Rev Bras Cancerol.** v.47, n.4, p.377-88, 2001.

ESTIMATIVA 2018: INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL / Instituto Nacional de Câncer. José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

FAUSTO, N.; KUMAR, V.; ABBAS. Robbins & Cotran. Patologia: bases patológicas das doenças. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

FARHOUD, S. *et al.* Variáveis clínicas e macroscópicas que influenciam o prognóstico do carcinoma colorretal. **Arquivos de gastroenterologia.** São Paulo, v.39, n.3, p.163- 172, 2002.

FEARON ER, E.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cancer cell.** Cambridge, v.61, n.5, p.759-767, 1990.

FEDIRKO, V. *et al.* Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. **Annals of oncology.** Dordrecht, v.16, n.16, p. 1599-600, 2015.

FERLAY, J. *et al.* GLOBOCAN, v.10, 2012. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: **IARC Cancer Base No. 11.** Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013.

FLETCHER, C.D.M. Diagnostic histopathology of tumors. 3.ed. Livingstone: Elsevier Churchill, 2007.

FREITAS, C. S. Estendendo o Conhecimento sobre a Família Her-Receptores para o Fator de Crescimento Epidérmico e seus ligantes às Malignidades Hematológicas. **Revista brasileira de cancerologia.** Rio de Janeiro, v.54, n.1, p.79–86, 2008.

GORDON, P.H.; NIVATVONGS, S. Principles and practices of surgery for the Colon, Rectum, and Anus. 2. ed. St Louis: Quality Medical Publishing, 1999.

GREEN, J. *et al.* Stage, grade and morphology of tumors of the colon and rectum recorded in the Oxford Cancer Registry, 1995-2003. **British journal of cancer.** London, v.96, n.1, p.140-142, 2007.

GRIZZLE, W.E. *et al.* Molecular Pathology of Early Cancer. Washington: IOS Press, 1999.

GRODEN, J. *et al.* Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. **Cancer cell.** Cambridge, v.66, n.1, p.589-600, 1991.

GUASTADISEGNI, C. *et al.* Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. **European journal of cancer**. Oxford, v.46, n.15, p.2788-98, 2010.

GUEDES, V. R; PRANCHEVICIUS, M.C.S. Principais aspectos genéticos e marcadores moleculares do câncer colorretal. In: SILVA, C.A. *et al.* **Tópicos especiais em biotecnologia e biodiversidade**. 4. ed. Curitiba: CRV, 2019. p.83-101.

GUEDES, V.R. *et al.* Avaliação da Expressão Imunoistoquímica da Proteína P53 No Adenocarcinoma Colorretal - Revisão Bibliográfica. **Revista de Patologia do Tocantins**. Palmas, v.6, n.1, p. 47-49, 2019.

HABR-GAMA A. Câncer colorretal – A importância de sua prevenção. **Arquivos de Gastroenterologia**. São Paulo, v.42, n.1, p.2-3, 2005.

HAINSWORTH, J.D. *et al.* Targeted therapy for advanced solid tumors on the basis of molecular profiles: results from MyPathway, an open-label, phase IIa multiple basket study. **Journal of clinical oncology**. New York, v.36, n.6, p.536–542, 2018.

HARRISS, D.J. *et al.* Lifestyle factors and colorectal cancer risk (1): systematic review and meta-analysis of associations with body mass index. **Colorectal disease**. Oxford, v.11, n. 6, p.547-63, 2009.

KASPER, D.L. *et al.* Medicina interna de Harrison. 19. ed. Rio de Janeiro:McGraw-Hill, 2008.

HERRERO, F.R., LÓPEZ, C.L., GIL, N. V. Biomarcadores moleculares y genómica en el cáncer colorrectal (CCR). **Grupo clínico de Biomarcadores en oncología**. [S.I.] 2015. Disponível em: home-extension://oemmnclbldboiebfnladdacbdm / https://www.institutoroche.es/static/oncobyg/files/colorrectal_rev_dic2015.pdf. Acesso em: 09 out. 2019.

HOCHMAN, B. *et al.* Desenhos de pesquisa. **Acta cirúrgica brasileira**. São Paulo, v.20(SUPPL. 2), p.2–9, 2005.

HÜNERBEIN M. The value of tumor markers in colorectal cancer. **American Association for Cancer Research**. Baltimore, v.146, n.45, p.55, 1998.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo demográfico**, 2010. Rio de Janeiro, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. INCA. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/>. Acesso em: 07 set. 2019.

INSTITUTO ONCOGUIA(Disponível em:(<http://www.oncoquia.org.br/conteudo/quimioterapia-para-cancer-colorretal/3229/180/>)). Acesso em 10/02/2019

JESTIN, P. *et al.* Cancer staging and survival in colon cancer is dependent on the quality of the pathologists' specimen examination. **European journal of cancer**. Oxford, v.41, n.14, p.2071-1078, 2005.

JIMENO, A. *et al.* Mutations and Sensitivity to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Colorectal Cancer: Practical Application of Patient Selection. **Journal of clinical oncology**. New York, v.27, n.7, p.1130-6, 2009.

JUNIKU-SHKOLOLLI, A. *et al.* Expression of immunohistochemical markers of progression in pre-cancerous and cancerous human colon: Correlation with serum vitamin D levels. **Anticancer research**. Athens, v.35, n.3, p.1513-1520, 2015.

KAVURI, S.M. *et al.* HER2 activating mutations are targets for colorectal cancer treatment. **Cancer discovery**. Philadelphia, v.5, n.8, p.832–841, 2015.

KAWAKAMI, H.; ZANAN, A.; SINICROPE, F.A. Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer. **Current treatment options in oncology**. Philadelphia, v.16, n.1, p.30, 2015.

KIM, J. *et al.* Number of lymph nodes examined and its impact on colorectal cancer staging. **American journal of surgery**. New York, v.72, n.10, p.902-905, 2006.

KINZLER, K.W. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. **Science**. New York, v.253, n.5020, p.661-5, 1991.

KLOSE, R.; BIRD, A.P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends in biochemical sciences**. Cambridge, v. 31, n.1, p.89-9, 2006.

KOBAYASHI, S. *et al.* Immunohistochemical assessment of a unique basal pattern of p53 expression in ulcerative-colitis-associated neoplasia using computer-assisted cytometry. **Diagnostic pathology**. London, v. 9, n.1, p.99, 2014.

KOYAMA, Y.; KOTAKE, K. Overview of colorectal cancer in Japan. **Diseases of the Colon and Rectum**. Philadelphia, v.40, suppl.10, p.S2, 1997.

KUMMER, C.L.; COELHO, T.C.R.B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. Campinas, v. 52, n. 4, p.598-512, 2002.

LABIANCA, R. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of oncology**. Dordrecht, v.9, n.1, p.520, 2015.

LASSANCE, F.A.C. *et al.* Câncer colorretal e síndromes hereditárias. **Revista de Medicina e Saúde**. Brasília, v.1, n.1, p.34-35, 2012.

LAURENT-PUIG, *et al.* ERBB2 alterations a new prognostic biomarker in stage III colon cancer from a FOLFOX based adjuvant trial (PETACC8). **Annals of oncology**. Dordrecht, v.27, suppl.6, abstr.4590, 2016.

LEACH, F.S. *et al.* Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cancer cell**. Cambridge, v.75, n.6, p.1215–1225, 1993.

LI, C. *et al.* Prognostic value of p53 for colorectal cancer after surgical resection of pulmonary metastases. **World journal of surgical oncology**. London, v.14, n.1, p.308, 2016.

LINDBLOM, A. *et al.* Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary nonpolyposis colon cancer. **Nature genetics**. New York, v.5, n.1, p.279–82, 1993.

LU, X.; YUANJIE, Y.; SHIYUN, T. p53 expression in patients with ulcerative colitis-associated with dysplasia and carcinoma: a systematic meta-analysis. **BMC gastroenterology**. London, v.17, n.1, p.111, 2017.

LUPINACCI, R.M. *et al.* Análise comparativa das características clínicas, anátomo-patológicas e sobrevida entre pacientes com câncer colorretal abaixo e acima de 40 anos de idade. **Revista Brasileira de Coloproctologia**. Rio de Janeiro, v.23, n.3, p.155-162, 2003.

LYNCH, P.M. *et al.* A follow-up study of colonic epithelial proliferation as a biomarker in a Native American family with hereditary nonpolyposis colon cancer. **Journal of the national cancer institute**. Cary, v.83, n.1, p.951-54, 1991.

LYNCH, H.T. *et al.* Etiology, natural history, management and molecular genetics of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes): genetic counseling implications. **Cancer epidemiology, biomarkers and prevention**. Philadelphia, v.6, n.1, p.987-91, 1997.

MARTINEZ, C.A.R. *et al.* Influência da localização do tumor na expressão tecidual da proteína p53 em doentes com câncer colorretal: estudo de 100 casos. **Revista Do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. Rio de Janeiro, v.35, n.4, p.235–243, 2008.

MATTOS, L.L. *et al.* Tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais. **Arquivos médicos do ABC**. Santo André, v.30, n.1, p.19-25, 2005.

MELINCOVICI, C.S. *et al.* The prognostic significance of p53, Bax, Bcl-2 and cyclin E protein overexpression in colon cancer-an immunohistochemical study using the tissue microarray technique. **Romanian journal of morphology and embryology**. Bucuresti, v.57, n.1, p.81-89, 2016.

MENDES, M.B.P; COSTA, L.D.B.; TAMURA, S. Tumores do cólon e reto: experiência de 16 anos. **Revista Brasileira de Coloproctologia**. Rio de Janeiro, v.12, n.4, p.132-138, 1992.

METEOGLU, I. *et al.* Nuclear factor kappa B, matrix metalloproteinase-1, p53, and Ki-67 expressions in the primary tumors and the lymph node metastases of colorectal cancer cases. **Gastroenterology research and practice**. Cairo, v.945392, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. *Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA; 2016.

MICHALANY, J. Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. 2. ed. São Paulo: Michalany, 1990. 277p.

MLECNIK, B. *et al.* Integrative analyses of colorectal cancer show immunoscore is a stronger predictor of patient survival than microsatellite instability. **Immunity**. Cambridge, v.44, n.1, p. 698–711, 2016.

MONTEIRO, E.P. *et al.* Neoplasia colorretal até os 40 anos – Experiência em cinco anos. **Revista Brasileira de Coloproctologia**. Rio de Janeiro, v.26, n.2, p.156-161, 2006.

NEVES, R.R. *et al.* Panorama Dos Casos De Câncer Atendidos No Hospital Geral Público De Palmas, Tocantins, Brasil. **Revista de Patologia do Tocantins**. Palmas, v.4, n.3, p.22-26, 2017.

NYSTRÖM-LAHTI, M. *et al.* Close linkage to chromosome 3p and conservation of ancestral founding haplotype in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Allahabad, v.91, n.1, p.6054-6058.

NOWAK J.A. *et al.* Detection of mismatch repair deficiency and microsatellite instability in colorectal adenocarcinoma by targeted next-generation sequencing. **Journal of molecular diagnostics**. Bethesda, v.19, n.1, p.84–91, 2017.

OLIVEIRA, M.; LATORRE; M.R.D.O.; TANAKA, L.F.; ROSSI, B.M.; CURADO, M.P. Disparidades na mortalidade de câncer colorretal nos estados brasileiros. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. São Paulo, v.11, p. e180012, 2018.

OLIVEIRA, G., FONSECA, C. Uso de marcadores tumorais no diagnóstico e acompanhamento do tratamento do câncer. **Revista Eletrônica De Farmácia**. Goiania, v.8, n.2, p,15, 2011.

OUAKRIM, D.A. et al. Trends in colorectal cancer mortality in Europe: retrospective analysis of the WHO mortality database. **British Medical Association**. London, 351:h4970, 2015.

PELTOMAKI, P. *et al.* Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. **Science**. New York, v.260, n.1, p.810–12, 1993.

PINHO, M.S.L. *et al.* Câncer colorretal: Análise do valor prognóstico do número total de linfonodos identificados na peça de ressecção. **Revista Brasileira Coloproctologia**. Rio de Janeiro, v.24, n.2, p.126-130, 2004.

PROPHET, E.B. et al. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington DC: American Registry of Pathology, 1992.

REIK, W.; SANTOS, F.; DEAN, W. Mammalian epigenetics: reprogramming the genome for development and therapy. **Theriogenology**. Stoneham, v.59, n.1, p.21–32, 2003.

ROCHA, J.C.C.; SILVA, S.N. Oncogenética. In: COELHO, F.R.G.; KOWALSKI, L.P. Bases da Oncologia. 2. ed. São Paulo: TECMEDD, 2003. p. 423-32.

RODRIGUEZ-BIGAS, M.A. *et al.* A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. **Journal of the National Cancer Institute**. Bethesda, v.89, n.1, p.1758-1762, 1997.

ROSTY, C.; BETTINGTON, M. Serrated colorectal polyps and polyposis. **Diagnostic Histopathology**. Chichester Sussex, v.20, n.1, p.30-7, 2014.

SANTOS, C.H.M.; SILVA, C.N.; MIIJI, L.N.O. Adenocarcinoma de Colon e Carcinoma Espinocelular de Canal Anal Concomitante. Relato de Caso e Revisão da Literatura. **Revista Brasileira de Coloproctologia**. Rio de Janeiro, v.25, n.2, p.162-164, 2005.

SAYAR, I. *et al.* Relationship among mismatch repair deficiency, CDX2 loss, p53 and E-cadherin in colon carcinoma and suitability of using a double panel of mismatch repair proteins by immunohistochemistry. **Polish journal of pathology**. Krakow, v.66, n.3, p.246-253, 2015.

SENOL, S. *et al.* Immunohistochemical profile of tumor pathways and prognostic significance in colon adenocarcinomas. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**. New York, v.36, n.1. 2017.

SETAFFY, L.; LANGNER, C. Microsatellite instability in colorectal cancer: clinicopathological significance. **Polish journal of pathology**. Krakow, v.66, n.1, p.203-218, 2015.

SHABBIR, A. *et al.* Frequency of Her2/neu expression in colorectal adenocarcinoma: a study from developing South Asian Country. **BMC Cancer**. London, v.16, n.1, p.855, 2016.

SINICROPE, F.A. *et al.* Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. **Gastroenterology**. London, v.148, n,1, p.22-99, 2015.

STAHL, P.R. *et al.* Determination of tumor heterogeneity in colorectal cancers using heterogeneity tissue microarrays. **Pathology & Oncology Research**. Budapest, v.21, n.4, p.1183-1189, 2015.

STEWART, B.W.; KLEIHUES, P. World Cancer Report. World Health Organization. **International Agency for Research on Cancer (IARC)**; 2014.

STRAUSSMAN, R. *et al.* Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. **Nature Structural & Molecular Biology**. New York, v.16, n.1, p. 564–571, 2009.

SZYLBERG, L. *et al.* Serrated polyps and their alternative pathway to the colorectal cancer: a systematic review. **Gastroenterology research and practice**. Cairo, 2015.

TANG, W. *et al.* Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**. Boston, v.8, n.1, p.173, 2007.

TOYOTA, M. *et al.* CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**. Washington, v.96, n.15, p.8681–6, 1999.

USP (Universidade de São Paulo). **Manual de técnicas em histologia e biologi celular do laboratório de biologia celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: consolidação dos procedimentos**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2002. 154p

VAKIANI, E. Molecular Testing of Colorectal Cancer in the Modern Era: What Are We Doing and Why? **Surgical Pathology Clinics**. New York, v.10, n.4, p.1009–1020, 2017.

VALADÃO, M.; CASTRO, L.S. Câncer colo-retal hereditário. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. Rio de Janeiro, v.34, n.3, p.193-200, 2007.

VALADÃO, M.; LEAL, R.A.; BARBOSA, L.C.; CARNEIRO, M.; MUHARRE, R.J. Perfil dos pacientes portadores de câncer colorretal operados em um hospital geral: Necessitamos de um programa de rastreamento acessível e efetivo. **Revista Brasileira de Coloproctologia**. Rio de Janeiro, v.30, n.2, p.160-6, 2010.

VASEN, H.F. *et al.* The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). **Diseases of the colon and rectum**. Philadelphia, v.34, n.1, p.424-425,1991.

VASEN, H.F. *et al.* New clinical criteria for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. **Gastroenterology**. Baltimore, v.116, n.1, p.1453-1456,1999.

VASEN, H.F. A Clinical diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndroms. **Journal of clinical oncology**. New York, v.18, p.81s-92s, 2000.

VOLPATO, M.G.; KOCH, K.S. Fatores de Mau Prognóstico nas Peças Operatórias de Pacientes Submetidos ao Tratamento Cirúrgico do Câncer Colorretal. **Revista Brasileira de Coloproctologia**. Rio de Janeiro, v.28, n.4, p. 414-424, 2008.

WALTER, V. *et al.* Smoking and survival of colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. **Annals of oncology**. Dordrecht, v.25, n.8, p.1517-25, 2014.

WON, D.D. *et al.* The prognostic significance of KRAS and BRAF mutation status in Korean colorectal cancer patients. **BMC Cancer**. London, v.17, n,1, p.403, 2017.

WU, Y. *et al.* Combined detection of the expression of Nm23-H1 and p53 is correlated with survival rates of patients with stage II and III colorectal cancer. **Oncology letters**. Athens, v.13, n.1, p.129-136, 2017.

XI HONG-QING, *et al.*, Expression and clinic pathologic significance of TUFM and p53 for the normal–adenoma–carcinoma sequence in colorectal epithelia. **World journal of surgical oncology**. London, v.15, n.1, p.90, 2017.

YASUDA, K. *et al.* Pattern of lymph node micrometastasis and prognosis of patients with colorectal cancer. **Annals of surgery**. Philadelphia, v.8, n.4, p.300-304, 2001.

YUAN, L. *et al.* Immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in molecular subtyping of colorectal carcinoma based on mismatch repair competency. **International journal of clinical and experimental medicine**. Madison, v.8, n.1, p.20988–21000, 2015.

ZLATIAN, O.M. *et al.* Histochemical and immunohistochemical evidence of tumor heterogeneity in colorectal cancer. **Romanian journal of morphology and embryology**. Bucuresti, v.56, n.1, p.175-181, 2015.

ZLOBEC, I.; LUGLI, A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. **Journal of clinical pathology**. London, v.61, n.5, p.561-9, 2008.

9 – APÊNDICES

9.1 - CAPÍTULO DE LIVRO

9.1.1 PRINCIPAIS ASPECTOS GENÉTICOS E MARCADORES MOLECULARES DO CÂNCER COLORRETAL.

Virgílio Ribeiro Guedes
Maria Cristina da Silva Pranchevicius

Neste capítulo apresentaremos informações que permitirão ao leitor conhecer as principais características na gênese do câncer colorretal e de alguns marcadores tumorais moleculares, que podem demonstrar alterações e mutações, sendo que estas atualmente são muito usadas para orientar o prognóstico e tratamento desta enfermidade.

INTRODUÇÃO

Aspectos Gerais do Câncer Colorretal e de Suas Características Genéticas

O câncer colorretal (CCR) é um problema de saúde pública e de proporções mundial. Esta neoplasia apresenta taxas de incidências e mortalidade que variam bastante em todo o mundo, sendo que as maiores frequências estão nos continentes mais industrializados e ricos, como América do Norte, parte da Europa e Oceania (Austrália), no entanto, está ocorrendo um aumento crescente na América do Sul, Ásia (Índia) e África (STEWART, BW; KLEIHUES, P, 2014).

No Brasil, segundo os dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) a incidência de CCR também está aumentando, com estimativa de 36.360 novos casos, sendo 17.380 homens e 18.980 mulheres (INCA, 2008). O número de mortes corresponde a 16.697; sendo 8.163 homens e 8.533 mulheres (ATLAS DE MORTALIDADE POR CÂNCER (AMC), 2015).

O CCR é uma patologia com localizações e aspectos clínico-patológicos múltiplos e não possui sintomas ou sinais patognomônicos. A dificuldade em seu diagnóstico pode ser ocasionada pelo quadro clínico variado, localização e tamanho do tumor (INCA, 2008). Semelhante a outras neoplasias malignas, o CCR tem diferentes fatores que parecem estar relacionados com a ocorrência da doença, como a idade avançada, o histórico de adenomas, doença inflamatória intestinal e histórico familiar de CCR hereditário (BEPA, 2009).

De acordo com a etiologia e genética da doença, o CCR é classificado em esporádico, familiar e hereditário. Em mais de 75% dos casos, os CCRs podem ser definidos

como esporádicos, de caráter não familiar, sendo que este é comum entre os idosos, provavelmente como resultado de fatores ambientais, dietéticos e do envelhecimento (ARVELO *et al.*, 2015). O câncer familiar é também frequentemente considerado esporádico e nenhum gene associado foi identificado ainda. Neste tipo de câncer, as pessoas com histórico de CCR, em um parente de primeiro grau, apresentam um risco aumentado de duas a três vezes maior do que a população normal (NATURE, 2012). O câncer hereditário é classificado em cinco subtipos: síndrome Lynch (LS), polipose associada à MUTYH (MAP), polipose adenomatosa familiar (FAP), síndrome de Peutz-Jeghers (PJS), síndrome da polipose serrilhada (SPS) (NOJADEH *et al.*, 2018).

Também conhecida como câncer colorretal hereditário sem polipose, a síndrome de Lynch (LS) é a síndrome mais comum de câncer de cólon hereditário. LS é uma doença autossômica dominante e é causada por mutações germinativas em um dos vários genes de reparo do mal pareamento de DNA (MMR), incluindo o MSH2 no cromossomo 2p16, MLH1 no cromossomo 3p21, MSH6 no cromossomo 2p16 e PSM2 no cromossomo 7p22 (NOJADEH *et al.*, 2018; LYNCH *et al.*, 2009). As mutações MSH2 e MLH1 são responsáveis pela maioria dos casos de síndrome de Lynch (LYNCH & SHAW, 2013)

A polipose associada à MUTYH é uma doença autossômica recessiva causada por uma mutação germinativa bi-alélica no gene MUTYH do cromossomo 1p34.1. O gene MUTYH codifica uma enzima chamada MYH glicosilase que está envolvida em um sistema de reparo de DNA chamado reparo de excisão de base (BER) (NOJADEH *et al.*, 2018; GOODENBERGER & LINDOR, 2011).

Polipose adenomatosa familiar é a síndrome de polipose hereditária mais comum, que é uma doença autossômica dominante causada por mutações no gene APC (inserções, deleções, mutações nonsense), presente no cromossomo 5q21 (BOGAERT & PRENEN, 2014). O gene APC é um gene supressor de tumor que produz a proteína APC, uma proteína multifuncional que controla a rapidez com que as células crescem e previnem o desenvolvimento de tumores (NOJADEH *et al.*, 2018). Além das mutações APC, outras mutações como K-RAS, DCC, P53, COX-2, BCL-2 também levam ao desenvolvimento do câncer (ZEICHNER *et al.*, 2012; NOJADEH *et al.*, 2018).

A síndrome de Peutz-Jeghers é uma desordem autossômica dominante rara, no qual é uma das síndromes de polipose hereditárias. Esta é caracterizada por múltiplos pólipos hamartomatosos benignos no trato gastrointestinal, mais comumente encontrados no intestino delgado. O número de pólipos na PJS é menor que na síndrome MAP e esses pólipos estão presentes desde a infância (NOJADEH *et al.*, 2018; GIARDIELLO & TRIMBATH, 2006). A principal causa desta doença são as mutações germinativas no gene STK11 (quinase serina treonina 11), também conhecido como LKB1, que é um gene supressor de tumor e está localizado no cromossomo 19p13.3 (CHAE & JEON, 2014; NOJADEH *et al.*, 2018)

A síndrome da polipose serrilhada é uma síndrome relativamente rara, caracterizada por múltiplos pólipos serrilhados do cólon, e que anteriormente era conhecida como síndrome polipose hiperplásica (NOJADEH et al., 2018; SWEETSER et al., 2013). A SPS é considerada esporádica e as causas genéticas subjacentes estão relacionadas a mutações germinativas dos genes da via de senescência induzida por oncogene (GALA et al., 2014). Frequentemente, estes tumores possuem instabilidade de microssatélites baixa (MSI-low) ou microssatélite estável (MSS) (NOJADEH et al., 2018; GUARINOS et al., 2012).

Os CRCs se desenvolvem através da transformação do epitélio colônico normal para um intermediário adenomatoso e por fim para o adenocarcinoma, também denominado sequência adenoma-carcinoma (PINO & CHUNG, 2010; MORSON, 1974). O CCR tem assinaturas genéticas variáveis, que podem ser únicas e específicas para determinado paciente. No entanto, o CCR se desenvolve através da aquisição de instabilidade genética de pelo menos 3 vias principais, que incluem instabilidade cromossômica (CIN), reparo de mal pareamento do DNA (MMR) e fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP) (WRIGHT et al., 2017). Considerando que essas vias não são exclusivas, o tumor pode apresentar características das múltiplas vias (PINO & CHUNG, 2010).

- **Instabilidade cromossômica (CIN)**

A maioria dos casos de câncer colorretal ocorre através da via de CIN, que é caracterizada por desequilíbrios generalizados no número de cromossomos e perda de heterozigose (PINO & CHUNG, 2010). A sequência adenoma-carcinoma normalmente se inicia através da mutação de um gene supressor de tumor, denominado Polipose adenomatosa coli (APC), e são descritas em até 85% dos pacientes com CCR esporádicos (WRIGHT et al., 2017; CARETHERS & JUNG, 2015). Em CCR, as mutações no gene APC geralmente são seguidas por mutações no gene KRAS, uma classe de genes conhecidos como oncogenes, e na progressão para o carcinoma pode também ser encontradas mutações no gene p53 (FEARON & VOGELSTEIN, 1990), um gene supressor de tumor.

- **Reparo de mal pareamento do DNA (MMR)**

Os genes da via de MMR codificam proteínas relacionadas ao reparo de DNA, que podem sofrer mutações (IMAI & YAMAMOTO, 2008). Inativações genéticas e epigenéticas dos genes dessa via estão relacionados a síndrome de Lynch e à instabilidade de microssatélites (MSI) (NOWAK & HORNICK, 2016). Aproximadamente, 15% dos CRCs surgem a partir da via MMR, sendo que a maioria (12%) são esporádicos, ocasionados por mutações somáticas ou mecanismos epigenéticos e os restantes (3%) estão relacionados às mutações germinativas associadas à síndrome de Lynch (WRIGHT et al., 2017; NOWAK & HORNICK, 2016; BOLAND & GOEL, 2010). Os microssatélites são segmentos de DNA não

codificantes presentes em todo o genoma, essas sequências são polimórficas entre os indivíduos, entretanto, são únicas e uniformes em comprimento em cada tecido de cada pessoa (BOLAND & GOEL, 2010). O acúmulo de mutações em regiões de microssatélites, produz a MSI que apresenta um fenótipo hipermutado e ocasiona perda de atividade do reparo de mal pareamento do DNA (BAUDRIN et al., 2018; BOLAND & GOEL, 2010).

- **Fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP)**

As ilhas de CpG são segmentos do DNA ricos em CG e que ocorrem em metade de todos promotores de genes. O fenótipo metilador da ilha CpG (CIMP) está presente em vários tipos de câncer e foi originalmente introduzido por Toyota e colaboradores em 1999 (TOYOTA et al., 1999). O CIMP é caracterizado pela hipermetilação simultânea de numerosas ilhas CpG circundando as regiões promotoras de vários genes (JOVER et al., 2011). Este fenômeno ocasiona o silenciamento de muitos genes não mutados, inclusive os genes supressores de tumor (ISSA, 2004). Os tumores podem ser classificados em alto grau de hipermetilação (CIMP-H), baixo grau de metilação (CIMP-L) e CIMP negativos (CIMP-N) (SIDERIS & PAPAGRIGORIADIS, 2014; ANG et al., 2010). Existe uma associação de CIMP-H com a idade avançada, sexo feminino, localização tumoral proximal, alto grau de diferenciação e tipo histológico mucinoso (KUDRYAVTSEVA et al., 2016). Além disso, altas taxas de mutações em genes KRAS, ou BRAF (oncogene) e, em menor proporção, mutações em p53 também foram observadas (WRIGHT et al., 2017; SAMOWITZ et al., 2005, HAWKINS et al., 2002), em adenoma serrilhado séssil (CARETHERS & JUNG, 2015).

PRINCIPAIS MARCADORES MOLECULARES DO CÂNCER COLORRETAL

Os marcadores moleculares, também denominados biomarcadores, são moléculas capazes de serem detectadas em tecido ou soro do paciente, e que permitem identificar uma condição particular ou uma doença (BERRETTA et al., 2017). Os marcadores tumorais podem possibilitar um diagnóstico precoce e o risco de estratificação (DUFFY et al., 2011).

Os marcadores preditivos detectam a resposta do paciente a determinados medicamentos, permitindo o uso de uma droga mais adequada e prevenindo sua toxicidade, e os marcadores de prognóstico permitem estimar o curso da doença, classificando os tumores em desfecho favorável ou desfecho desfavorável (PELUSO et al., 2017). Embora os marcadores tumorais podem ser moléculas relacionadas a diferentes processos como, proliferação celular, diferenciação, angiogênese, invasão e metástase (LI et al., 2003). Em CCRs, as mutações KRAS, BRAF, MSI e o p53 são muito detectadas, nas etapas de diagnóstico, prognóstico e terapêutico (PELUSO et al., 2017; FEARON & VOGELSTEIN,

1990).

- **KRAS**

A maioria dos cânceres epiteliais humanos é caracterizada pela ativação funcional de fatores de crescimento e de receptores da família do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). O EGFR é um receptor de tirosina quinase que, ao desencadear uma série de sinais intracelulares, controla a proliferação de células cancerígenas, a diferenciação, a angiogênese e a disseminação de metástases (PORRU et al., 2018). A cascata de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK, conhecida como a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), conduz à proliferação, diferenciação, migração, sobrevivência e angiogênese celular. A desregulação desta via está subjacente a muitos casos de tumorigênese (SANZ-GARCIA et al., 2017; ASCIERTO et al., 2012).

Se os genes RAS e/ou RAF estiverem mutados, a proteína mutada não será regulada pelo sinal de EGFR a montante e permanecerá no estado ativada, continuando a ativar a via de MAPK a jusante, levando à proliferação celular descontrolada e ao câncer (YANG et al., 2018; DE ROOCK et al., 2010).

O KRAS é um proto-oncogene que codifica uma proteína GTPase com várias funções nas vias de sinalização molecular. Em situações normais, a proteína KRAS do tipo selvagem provoca a progressão do ciclo celular. No entanto, pode atuar como um “*gate keeper*” ao longo do crescimento do tumor e bloquear o desenvolvimento do câncer (ZHANG et al., 2001). Mutações no gene que codifica a KRAS podem alterar a sua capacidade de hidrolisar GTP para GDP e resultar em proteína KRAS constantemente ativada (LARKI et al., 2017; KRANENBUR, 2005; McCOY et al., 1983).

Em CCR, aproximadamente, um terço das KRAS possuem mutações no éxon 2 (códon 12 and 13) ou no éxon 3, o que provoca ativação permanente da via RAS/RAF/MAPK/ERK (ZARKAVELIS et al., 2017). Acredita-se que a sinalização MAPK é constitutivamente ativa no CCR com KRAS mutado, o que promoveria a progressão do tumor independentemente da estimulação externa do EGFR (BLAJ et al., 2017; HATZIVASSILIOU et al., 2013; KHAMBATA-FORD et al., 2007).

As mutações nos genes RAS e RAF são independentes uma da outra, somente pacientes com os genes KRAS, NRAS e BRAF do tipo selvagem podem beneficiar da terapia anti-EGFR, enquanto que pacientes com mutações nos genes KRAS, NRAS e BRAF são resistentes a terapia com anticorpos monoclonais anti-receptor do fator de crescimento epidérmico (anti-EGFR), tais como cetuximab e panitumumab (YANG et al., 2018; GONZALEZ-PONS & CRUZ-CORREA, 2015; KARAPETIS et al., 2008). Portanto, a detecção dessas mutações tornou-se de alta utilidade como um fator preditivo, quando se decide sobre o uso de inibidores EGFR (PELUSO et al., 2017; ZARKAVELIS et al., 2017).

Em casos de neoplasia colorretal metastática com mutação KRAS, um fator de crescimento endotelial anti-vascular (VEGF), pode ser usado junto com a quimioterapia metastática, como o FOLFOX, e fornece vantagem adicional de sobrevida. No gene KRAS do tipo selvagem, a adição de uma terapia anti-EGFR ao regime padrão FOLFOX fornece um tratamento direcionado. O agente anti-EGFR liga-se ao EGFR impedindo a ativação a jusante da via ERK MAPK, resultando em melhor sobrevida quando combinada com FOLFOX (WRIGHT et al., 2017)

- **BRAF**

O oncogênese BRAF, codifica uma quinase serina/treonina citoplasmática que está imediatamente a jusante do KRAS na via de sinalização MAPK (URSEM et al., 2018). Esta via é composta pela pequena RAS (GTPase), que ativa as proteínas da família RAF (ARAF, BRAF e CRAF), também conhecida como RAF1. Proteínas RAF ativadas levam à fosforilação e ativação de proteínas MEK1/2, que subsequentemente fosforilam e ativam ERKs. As ERKs fosforilam uma variedade de substratos, incluindo múltiplos fatores de transcrição e regulam várias atividades celulares importantes (SANZ-GARCIA et al., 2017). Aproximadamente 90% de todas as mutações de BRAF identificadas são uma transverso de T1799A no éxon 15, que resulta em uma substituição de aminoácidos de valina (V) para ácido glutâmico (E) no códon 600 (c. 1799T> A ou pV600E) (URSEM et al., 2018; CANTWELL-DORRIS et al., 2011).

Embora o melanoma maligno é a doença mais comum associada com a mutação BRAFV600E, as mutações do BRAF em CCR estão presentes em 10% dos casos. Embora com menor frequência, as mortes por CRC mutantes em BRAF excedem as dos melanomas mutados em BRAF (URSEM et al., 2018). Semelhante às mutações RAS, CCRs mutantes em BRAF são menos susceptíveis à terapia anti-EGFR. O vemurafenib, um inibidor BRAF, não apresenta atividade clínica significativa em pacientes com CRC mutante BRAFV600E e a resistência a este fármaco é devido à reativação mediada por EGFR da sinalização MAPK (INAMURA, 2018; SHYAM et al., 2015; LITO et al., 2012; CORCORAN et al., 2012). Adicionalmente, mutações BRAFV600E estão associadas fortemente a tumores hipermutados e, frequentemente, exibem um fenótipo metilador de ilha CpG (CIMP) e esporádicas instabilidades de microssatélites (MSI) (ENGLISH et al., 2008).

É importante considerar que a mutação BRAF é considerada como um direcionador na via serrilhada e os pólipos serrilhados são considerados lesões precursoras (RAD et al., 2013). Os tumores serrilhados não são cromossomicamente instáveis, no entanto, frequentemente exibem extensivas metilações no DNA das ilhas CpG, que podem ocorrer no promotor do gene MLH1 (um gene do sistema de reparo), ocasionando o fenótipo de microssatélite instável (MSI) esporádico (SANZ-GARCIA et al., 2017;

WETEISENBERGER et al., 2006). O CCR MSI esporádico está associado em 60% dos tumores com mutação BRAF (TIE et al., 2011). No entanto, a mutação BRAF não é observada na síndrome de Lynch, uma vez que a instabilidade dos microssatélites ocorre por meio de uma via diferente, baseada em mutações germinativas nos genes de reparo de mal pareamento (SANZ-GARCIA et al., 2017; DENG et al., 2004).

- **MSI (Instabilidade de Microssatélites)**

Os microssatélites são sequências repetitivas dispersas no genoma, que contêm mono, di, trinucleotídeo ou nucleotídeo tetra com repetições (A)_n ou (CA)_n. (KUNKEL & ERIE, 2005). A maioria dessas repetições precisamente predispõe ao acúmulo de mutações, pois normalmente às DNA polimerases não conseguem se ligar completamente ao DNA no período de síntese e, geralmente ocorrem os erros de correspondência de base-base. Os nucleotídeos desemparelhados surgem quando o nucleotídeo inicial e a cadeia molde separam e incorretamente se anelam em um microssatélite. Inserções ou deleções em microssatélites situados em regiões dos éxons causam mutações em *frame*, que podem levar a formação de proteínas truncadas (PARINE et al., 2016).

A instabilidade de microssatélites (MSI) é encontrada em aproximadamente 15% dos cânceres colorretais (CCR) de estágio II a III, e podem ser causadas por mutações germinativas hereditárias de genes de reparo de mal pareamento (MMR) ou inativação epigenética desses genes. Destes, 3% estão associados com síndrome de Lynch (SAMSTEIN & CHAN, 2017; ANDRÉ et al., 2015). Os principais genes afetados são MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 (POYNTER et al., 2008). Apesar da presença de MSI predizer um bom desfecho em CCR, com uma taxa de sobrevivência de até 15% quando comparada com pacientes com microssatélite estável (MSS) (KANG et al., 2018; POPAT et al., 2005; GRYFE et al., 2000), a razão para seu bom prognóstico ainda não está esclarecida, e o MSI tem vários problemas que limitam seu uso como um fator prognóstico prático em todos os estágios do CCR (KANG et al., 2018). Os CCRs MSI são propensos à inativação epigenética do gene MLH1, possuem um fenótipo CIMP-positivo e SCNA-baixo (alterações no número de cópias somáticas), apresentam alta frequência da mutação BRAFV600E e uma baixa frequência de mutações APC e TP53, e são caracterizadas por sua ocorrência em fêmeas que possuem uma idade tardia, e no cólon proximal com pobre diferenciação tumoral e histologia celular mucinosa /anel de sinete (INAMURA, 2018; BOLAND & GOEL, 2010).

A detecção de MSI é realizada indiretamente pela análise da expressão da proteína MMR por coloração Imunohistoquímica (IHC), ou diretamente por amplificação de repetições específicas de microssatélites por PCR, que é o método mais comum para detectar MSI (BUECHER et al., 2013). Os antimetabolitos (5-fluorouracil), agentes alquilantes e inibidores de topoisomerase são as três categorias de agentes quimioterápicos usados no

tratamento de CCR (NOJADEH et al., 2018; WARUSAVITARNE & SCHNITZLER, 2007). Apesar do tratamento quimioterápico ser eficaz em alguns pacientes, estes podem causar muitos efeitos adversos (NOJADEH et al., 2018; ROTHENBERG et al., 2001; ADLARD et al., 2002). Em 2017, o *Food and Drug Administration* (FDA, 2017) dos EUA aprovou o pembrolizumab, um anticorpo monoclonal anti-PD-1 (PDCD1), para pacientes com tumores sólidos deficientes em MSI ou MMR. Esta foi a primeira aprovação pelo FDA de um tratamento contra o câncer baseado em um biomarcador comum, em vez de uma abordagem baseada em órgãos (INAMURA, 2018).

- **P53**

O gene humano TP53 está localizado no cromossomo 17p e consiste de 11 éxons e 10 introns (SAHA et al., 2013) e está bem caracterizado como um gene supressor de tumor (CHANG et al., 2003). A proteína p53 selvagem consiste de 393 resíduos de aminoácidos e de vários domínios funcionais, como o domínio de transativação (TAD), domínio rico em prolina, domínio de tetramerização e domínio básico (LI et al., 2015). No início de sua descoberta, a p53 foi classificada como proteína de ligação ao antígeno T grande SV40 (TAN et al., 1986; FARNEBO et al., 2010). A p53 é um fator de transcrição induzível por estresse que regula um grande número de diversos genes a jusante e exerce múltiplas funções no processo de sinalização (LI et al., 2015).

Embora a proteína p53, não seja necessária para o crescimento normal da célula, esta proteína desempenha um papel crítico na prevenção da formação de tumores, pois é capaz de induzir a parada do ciclo celular, fazer o reparo do DNA, inibir a angiogênese, diferenciação, ou apoptose em resposta ao estresse celular oncogênico, incluindo danos no DNA induzidos por carcinogênicos, estimulação proliferativa anormal e hipóxia (CHANG et al., 2003).

Em cânceres humanos, o gene Tp53 é o mais alterado, com mutações em aproximadamente 60% dos cânceres (FEARON et al., 1987; LEVINE, 1993; VOGELSTEIN, 1990). Destas, 74% são mutações missense, que resultam na formação de uma proteína mutada (NAKAYAMA et al., 2017; MULLER & VOUSDEN, 2014; BROSH & ROTTER, 2009).

Em CCR a p53 mutação ocorre em 34% dos tumores de cólon proximal e 45% dos tumores colorretal distal (RYAN et al., 2001). A maioria das mutações ocorrem no éxon 5 ao 8 (no domínio de ligação ao DNA) e, principalmente, em códons *hotspots* como o 175, 245, 248, 237 e 282, compreendendo a transição de G para A e C para T, e ocasionando a substituição de um único aminoácido na proteína p53 (LI et al., 2015; LÓPEZ et al., 2012; RUSSO et al., 2005). Estudos tem sugerido que a presença de p53 mutante do tipo missense em *hotspots* pode promover a progressão dos tumores de cólon de adenoma para adenocarcinoma, através do mecanismo de ganho de função (COOKS et al., 2018), e a

adicional perda de p53 selvagem através da perda de heterozigose (LOH) induz um fenótipo mais avançado em um estágio posterior da tumorigênese (NAKAYAMA & OSHIMA, 2018; MULLER & VOUSDEN, 2014; BROSH & ROTTER, 2009).

O sequenciamento de DNA tem sido usado com um padrão ouro para a detecção de mutações em p53 (IACOPETTA, 2003). No entanto, a avaliação da superexpressão da p53 usando um procedimento padronizado de Imunohistoquímica (IHC) ainda é um método promissor, conveniente e barato de identificar pacientes com CCR, e que pode fornecer benefícios para o direcionamento do regime de quimioterapia adjuvante padrão e em uso para esta doença (IACOPETTA, 2003).

Embora ocorram algumas evidências de que diferentes mutações do gene p53 estão associadas a diferentes propriedades clínicas, incluindo prognóstico e resposta à terapia, estudos mais aprofundados são necessários para estabelecer essa relação. No entanto, o perfil de p53 pode ter aplicação clínica para a identificação de pacientes que poderiam se beneficiar da quimioterapia baseada em 5-fluorouracil (5-FU) (IACOPETTA, 2003), pois a atividade antitumoral do 5-FU, em parte, foi atribuída à sua capacidade de induzir a parada do crescimento celular dependente de p53 e levar a célula à apoptose (SUN et al., 2007).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir, que o adenocarcinoma colorretal é um tipo câncer com altas taxas de incidência, prevalência e mortalidade significativa, e que o estudo da expressão gênica e de seu produto proteico, como os marcadores moleculares, possuem um papel importante para corroborar na detecção precoce, prognóstico e decisão do tratamento.

Estes marcadores podem ser analisados por diversos métodos como, IHQ, Reação em Cadeia da Polimerase, entre outros, oferecendo ao médico e ao paciente uma importante ferramenta de valor diagnóstico e prognóstico, uma vez que são capazes de evidenciar uma transformação neoplásica precoce e predizer o comportamento biológico do tumor.

Vale a pena ressaltar também que a expressão e/ou mutações de KRAS e BRAF, p53, MSI, aqui citadas, podem estar também correlacionadas com outros marcadores, sendo assim são necessários maiores estudos para entender melhor o comportamento desta patologia frente a outras alterações genéticas e até imunológicas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Com o conhecimento e entendimento de uma gama cada vez maior de

oncogenes, proto-oncogenes, proteínas tumorais, genes supressores tumorais, mutações genéticas e vias alternativas de sinalização, as quais determinam fatores genéticos, bem como variantes imunofenotípicas, em um futuro bem próximo iremos determinar o perfil biológico de cada paciente. Isto permitirá melhores respostas ao tratamento individualizado e personalizado, seja este cirúrgico, por quimioterapia ou radioterapia, resultando em um melhor prognóstico e melhores índices terapêuticos com queda exponencial da morbidade e mortalidade para esta patologia.

Assim novas pesquisas que contemplam a padronização e a caracterização deste tumor vão propiciar uma melhor compreensão dos subtipos moleculares e imunofenótipos do câncer colorretal, colaborando com terapias mais eficazes e a cura desta enfermidade.

REFERÊNCIAS

- ADLARD, JW, RICHMAN SD, SEYMOUR MT, QUIRKE P. Prediction of the response of colorectal cancer to systemic therapy. *Lancet Oncol.* 8:75–82, 2002.
- ANDRÉ T, DE GRAMONT A, VERNEREY D, CHIBAUDEL B, BONNETAIN F, TIJERAS-RABALLAND A. et al., Adjuvant fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in stage II to III colon cancer: updated 10-year survival and outcomes according to BRAF mutation and mismatch repair status of the MOSAIC Study. *J Clin Oncol.* 33:4176–87, 2015.
- ANG PW, LOH M, LIEM N, LIM PL, GRIEU F, VAITHILINGAM A, PLATELL C, YONG WP, IACOPETTA B, SOONG R. Comprehensive profiling of DNA methylation in colorectal cancer reveals subgroups with distinct clinic pathological and molecular features. *BMC cancer.*10:227, 2010.
- BEPA, A relevância do câncer colorretal. Boletim Epidemiológico Paulista. BEPA, (Online), SãoPaulo v.6, n.68 ago. 2009. Disponível em <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180642722009000800006&lng=pt&nrm=iso>
- ARVELO F, SOJO F, COTTE C. Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalscience.* Apr 9;9:520, 2015.
- ASCIERTO PA, KIRKWOOD JM, GROB JJ et al., The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med.* 10: 85, 2012.
- Atlas de Mortalidade por Cancer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/aplicativos/atlas-de-mortalidade-por-cancer>>
- BAUDRIN LG, DELEUZE JF, HOW-KIT A. Molecular and Computational Methods for the Detection of Microsatellite Instability in Cancer. *Front Oncol.* Dec 12;8:621, 2018.
- BLAJ C, SCHMIDT EM, LAMPRECHT S, HERMEKING H, JUNG A, KIRCHNER T, HORST

- D. Oncogenic Effects of High MAPK Activity in Colorectal Cancer Mark Progenitor Cells and Persist Irrespective of RAS Mutations. *Cancer Res.* 2017 Apr 1;77(7):1763-1774.
- BERRETTA M., ALESSANDRINI L., DE DIVITIIS C., et al., Serum and tissue markers in colorectal cancer: State of art. *Critical Review in Oncology/Hematology.* 2017;111:103–116.
- BOLAND CR, GOEL A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2073-2087.e3.
- BOGAERT J, PRENEN H. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol.* 2014;27:9–14.
- BROSH R, ROTTER V. When mutant gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 701–713.
- BUECHER B, CACHEUX W, ROULEAU E, DIEUMEGARD B, MITRY E, LIÈVRE A. Role of microsatellite instability in the management of colorectal cancers. *Dig Liver Dis.* 2013;45:441–9.
- CANTWELL-DORRIS ER, O'LEARY JJ, SHEILS OM. BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 385–394.
- CARETHERS JM, JUNG BH. Genetics and genetic biomarkers in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology* 2015;149(5):1177–90.e3.
- CHAE HD, JEON CH. Peutz-Jeghers syndrome with germline mutation of STK11. *Ann Surg Treat Res.* 2014;86:325–30.
- CHANG FH, TZENG DS, LEE TM, CHEN TC, HSU LS, LUNG FW. Mutations in the p53 tumor suppressor gene in colorectal cancer in Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci.* 2003 Apr;19(4):151-8.
- COOKS, T., PATERAS, I.S., JENKINS, L.M., ET AL., Mutant p53 cancers reprogram macrophages to tumor supporting macrophages via exosomal miR-1246. *Nat. Commun.* 9, 771, 2018.
- CORCORAN R.B., EBI H., TURKE A.B., COFFEE E.M., NISHINO M., COGDILL A.P., BROWN R.D., DELLA PELLE P., DIAS-SANTAGATA D., HUNG K.E., et al., EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib. *Cancer Discov.* 2012;2:227–235.
- DENG G, BELL I, CRAWLEY S et al., BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 191–195.
- DE ROOCK W, CLAES B, BERNASCONI D, DE SCHUTTER J, BIESMANS B, FOUNTZILAS G, et al., Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* (2010) 11:753–62. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70130-3
- DUFFY M. J., O'DONOVAN N., CROWN J. Use of molecular markers for predicting therapy

- response in cancer patients. *Cancer Treatment Reviews*. 2011;37(2):151–159.
- ENGLISH DR, YOUNG JP, SIMPSON JA, et al., Ethnicity and risk for colorectal cancers showing somatic BRAF V600E mutation or CpG island methylator phenotype. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(7):1774–1780.
- FARNEBO M, BYKOV VJ, WIMAN KG. The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396:85–89.
- FDA. American Association for Cancer Research First tissue-agnostic drug approval issued. *Cancer Discov*. 2017;7:656.
- FEARON ER, VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61(5):759–67.
- FEARON ER, HAMILTON SR, VOGELSTEIN B. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 1987;328:193–7.
- GALA MK, MIZUKAMI Y, LE LP, MORIICHI K, AUSTIN T, YAMAMOTO M, ET AL., Germline mutations in oncogene-induced senescence pathways are associated with multiple sessile serrated adenomas. *Gastroenterology*. 2014;146:520–9
- GONZALEZ-PONS M., CRUZ-CORREA M. Colorectal cancer biomarkers: where are we now? *BioMed Research International*. 2015;2015:14.
- GRYFE R, KIM H, HSIEH ET, et al., Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;342:69–77.
- GUARINOS C, SANCHEZ-FORTN C, RODRIGUEZ-SOLER M, ALENDA C, PAYA A, JOVER R. Serrated polyposis syndrome: molecular, pathological and clinical aspects. *World J Gastroenterol*. 2012;18:2452–61.
- GIARDIELLO FM, TRIMBATH JD. Peutz-Jeghers syndrome and management recommendations. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4:408–15.
- GOODENBERGER M, LINDOR NM. Lynch syndrome and MYH-associated polyposis: review and testing strategy. *J Clin Gastroenterol*. 2011;45:488–500
- HATZIVASSILIOU G, HALING JR, CHEN H, SONG K, PRICE S, HEALD R, et al., Mechanism of MEK inhibition determines efficacy in mutant KRAS- versus BRAF-driven cancers. *Nature* 2013;501:232–6.
- HAWKINS N, NORRIE M, CHEONG K, MOKANY E, KU SL, MEAGHER A, O'CONNOR T, WARD R. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology*. 2002;122:1376–1387.
- IACOPETTA B. TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat*. 2003 Mar;21(3):271-6.
- IMAI K, YAMAMOTO H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 2008;29(4):673–80.
- INAMURA K. Colorectal Cancers: An Update on Their Molecular Pathology. *Cancers (Basel)*.

2018 Jan 2010

- ISSA JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(12):988–93.
- JOVER R, NGUYEN TP, PEREZ-CARBONELL L, ZAPATER P, PAYA A, ALENDA C, et al., 5-Fluorouracil adjuvant chemotherapy does not increase survival in patients with CpG island methylator phenotype colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2011;140(4):1174–81.
- KANG S, NA Y, JOUNG SY, LEE SI, OH SC, MIN BW. The significance of microsatellite instability in colorectal cancer after controlling for clinicopathological factors. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Mar;97(9):e0019.
- KHAMBATA-FORD S, GARRETT CR, MEROPOL NJ, BASIK M, HARBISON CT, WU S, et al., Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2007;25:3230–7
- KARAPETIS C. S., KHAMBATA-FORD S., JONKER D. J., et al., K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2008;359:1757–1765.
- KRANENBURG O. The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1756(2):81–82
- KUDRYAVTSEVA AV LIPATOVA AV, ZARETSKY AR, MOSKALEV AA, FEDOROVA MS, RASSKAZOVA AS, SHIBUKHOVA GA, SNEZHKINA AV, KAPRIN AD, ALEKSEEV BY, DMITRIEV AA, KRASNOV GS. Important molecular genetic markers of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016 Aug 16;7(33):53959-53983.
- KUNKEL TA, ERIE DA. DNA mismatch repair*. *Annu Rev Biochem*. 2005; 74:681–710.
- LASSANCE FAC, LASSANCE PMS, GARICOCHEA B, COTTI GC, CUTAIT R. Câncer colorretal e síndromes hereditárias. *Rev Med Saúde Brasília* 2012; 1(1): 34-50
- LARKI P, GHARIB E, YAGHOOB TALEGHANI M, KHORSHIDI F, NAZEMALHOSSEINI-MOJARAD E2, ASADZADEH AGHDAEI H. Coexistence of KRAS and BRAF Mutations in Colorectal Cancer: A Case Report Supporting The Concept of Tumoral Heterogeneity. *Cell J*. 2017 Spring;19(Suppl 1):113-117.
- LEVINE AJ. The tumor suppressor genes. *Annu Rev Biochem* (1993);62:623–51.
- LI LS, KIM NG, KIM SH, PARK C, KIM H, KANG HJ, KOH KH, KIM SN, KIM WH, KIM NK, KIM H. Chromosomal imbalances in the colorectal carcinomas with microsatellite instability. *The American journal of pathology*. 2003;163:1429–1436.
- NATURE. The Cancer Genome Atlas Consortium. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; 487: 330 – 7
- LI XL, ZHOU J, CHEN ZR1, CHNG WJ. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol*. 2015 Jan 7;21(1):84-93.

- LITO P., PRATILAS C.A., JOSEPH E.W., TADI M., HALILOVIC E., ZUBROWSKI M., HUANG A., WONG W.L., CALLAHAN M.K., MERGHOUB T., et al., Relief of profound feedback inhibition of mitogenic signaling by RAF inhibitors attenuates their activity in BRAFV600E melanomas. *Cancer Cell*. 2012;22:668–682.
- LÓPEZ I, P OLIVEIRA L, TUCCI P, ALVAREZ-VALÍN F, A COUDRY R, MARÍN M. Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer. *Gene*. 2012;499:81–87.
- [
- LYNCH HT, LYNCH PM, LANSPA SJ, SNYDER CL, LYNCH JF, BOLAND CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet*. 2009;76:1–18.
- LYNCH HT, SHAW TG. Practical genetics of colorectal cancer. *Chin Clin Oncol*. 2013;2:12.
- MCCOY MS, TOOLE JJ, CUNNINGHAM JM, CHANG EH, LOWY DR, WEINBERG RA. Characterization of a human colon/lung carcinoma oncogene. *Nature*. 1983;302(5903):79–81.
- MORSON B. President's address: the polyp-cancer sequence in the large bowel. *Proc R Soc Med*. 1974;67:451–457.
- NOJADEH JN, BEHROUZ SHARIF S, SAKHINIA E. Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI J*. 2018 Jan 22;17:159-168.
- MULLER PAJ, VOUSDEN KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* 2014; 25: 304–317
- NAKAYAMA M, SAKAI E, ECHIZEN K, YAMADA Y, OSHIMA H, HAN TS, OHKI R, FUJII S, OCHIAI A, ROBINE S, VOON DC, TANAKA T, TAKETO MM, OSHIMA M. Intestinal cancer progression by mutant p53 through the acquisition of invasiveness associated with complex glandular formation. *Oncogene*. 2017 Oct 19;36(42):5885-5896.
- NAKAYAMA M, OSHIMA M. Mutant p53 in colon cancer. *J Mol Cell Biol*. 2018 Nov 29. doi: 10.1093/jmcb/mjy075.
- NOWAK JA, HORNICK JL. Molecular evaluation of colorectal adenocarcinoma: current practice and emerging concepts. *Surg Pathol Clin* 2016;9(3):427–39.
- PARINE NR, VARSHA RS, AND MOHAMMAD SAUD ALANAZI MS. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer, Microsatellite Markers, Ibrokchim Y. Abdurakhmonov, IntechOpen. 2016 DOI: 10.5772/65429. Available from: <<https://www.intechopen.com/books/microsatellite-markers/microsatellite-instability-in-colorectal-cancer>>
- PELUSO G, INCOLLINGO P, CALOGERO A, TAMMARO V, RUPEALTA N, CHIACCHIO G, SANDOVAL SOTELO ML, MINIERI G, PISANI A, RICCIO E, SABBATINI M, BRACALE UM, DODARO CA, CARLOMAGNO N. Current Tissue Molecular Markers in Colorectal Cancer: A Literature Review. *Biomed Res Int*. 2017.
- PINO MS, CHUNG DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2059-72.

- POPAT S, HUBNER R, HOULSTON R. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005;23:609–18.
- PORRU M, POMPILI L, CARUSO C, BIROCCIO A, LEONETTI C. Targeting KRAS in metastatic colorectal cancer: current strategies and emerging opportunities. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Mar 13;37(1):57.
- POYNTER JN, SIEGMUND KD, WEISENBERGER DJ, et al., Molecular characterization of MSI-H colorectal cancer by MLHI promoter methylation, immunohistochemistry, and mismatch repair germline mutation screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:3208–15
- RAD R, CADIÑANOS J, RAD L et al., A genetic progression model of BrafV600E-induced intestinal tumorigenesis reveals targets for therapeutic intervention. *Cancer Cell* 2013; 24: 15–29.
- ROTHENBERG ML, MEROPOL NJ, POPLIN EA, VAN CUTSEM E, WADLER S. Mortality associated with Irinotecan plus bolus Fluorouracil/Leucovorin. Summary findings of an independent panel. *J Clin Oncol*. 2001;19:3801–3807.
- RUSSO A, BAZAN V, IACOPETTA B, KERR D, SOUSSI T, GEBBIA N. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol*. 2005;23:7518–7528.
- RYAN KM, PHILLIPS AC, VOUSDEN KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13:332–337
- Warusavitarne J, Schnitzler M. The role of chemotherapy in microsatellite unstable (MSI-H) colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2007;22:739–748.
- SAMOWITZ WS, ALBERTSEN H, HERRICK J, LEVIN TR, SWEENEY C, MURTAUGH MA, WOLFF RK, SLATTERY ML. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology*. 2005;129:837–845.
- SAMSTEIN RM, CHAN T. Dissecting microsatellite instability in colorectal cancer: one size does not fit all. Dissecting microsatellite instability in colorectal cancer: one size does not fit all. *Genome Med*. 2017 May 24;9(1):45.
- SAHA MN, QIU L, CHANG H. Targeting p53 by small molecules in hematological malignancies. *J Hematol Oncol*. 2013;6:23.
- SWEETSER S, SMYRK TC, SINICROPE FA. Serrated colon polyps as precursors to colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11:760–7.
- SANZ-GARCIA E, ARGILES G, ELEZ E, TABERNERO J. BRAF mutant colorectal cancer: prognosis, treatment, and new perspectives. *Ann Oncol*. 2017 Nov 1;28(11):2648-2657.
- SHYAM M. KAVURI, NAVEEN JAIN, FRANCESCO GALIMI, FRANCESCA COTTINO, SIMONETTA M. LETO, GIORGIA MIGLIARDI, ADAM C. SEARLEMAN, WEI SHEN, JOHN MONSEY, LIVIO TRUSOLINO, SAMUEL A. JACOBS, ANDREA BERTOTTI, AND RON

- BOSE. *Cancer Discov*, 5(8); 832–41. ©2015 AACR.
- SIDERIS M, PAPAGRIGORIADIS S. Molecular biomarkers and classification models in the evaluation of the prognosis of colorectal cancer. *Anticancer research*. 2014;34: 2061–2068.
- SUN XX, DAI MS, LU H. 5-fluorouracil activation of p53 involves an MDM2-ribosomal protein interaction. *J Biol Chem*. 2007 Mar 16;282(11):8052-9.
- TIE J, GIBBS P, LIPTON L et al., Optimizing targeted therapeutic development: analysis of a colorectal cancer patient population with the BRAF(V600E) mutation. *Int J Cancer* 2011; 128: 2075–2084.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Falando sobre câncer do intestino / Instituto Nacional de Câncer, Sociedade Brasileira de Coloproctologia, Colégio Brasileiro de Cirurgiões, Associação Brasileira de Colite Ulcerativa e Doença de Crohn, Colégio Brasileiro de Cirurgia Digestiva, Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva, Sociedade Brasileira de Cancerologia, Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica. - Rio de Janeiro: INCA, 2003
- TAN TH, WALLIS J, LEVINE AJ. Identification of the p53 protein domain involved in formation of the simian virus 40 large T-antigen-p53 protein complex. *J Virol*. 1986;59:574–583.
- TOYOTA M, AHUJA N, OHE-TOYOTA M, HERMAN JG, BAYLIN SB, ISSA JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(15):8681–6.
- URSEM C, ATREYA CE, VAN LOON K. Emerging treatment options for BRAF-mutant colorectal cancer. *Gastrointest Cancer*. 2018;813-23. doi: 10.2147/GICTT.S125940.
- VOGELSTEIN B. Cancer. A deadly inheritance. *Nature* 1990;348: 681–2.
- ZARKAVELIS G, BOUSSIOS S, PAPADAKI A, KATSANOS KH, CHRISTODOULOU DK, PENTHEROUDAKIS G. Current and future biomarkers in colorectal cancer. *Ann Gastroenterol*. 2017;30(6):613-621.
- ZHANG Z, WANG Y, VIKIS HG, JOHNSON L, LIU G, LI J, et al., Wildtype Kras2 can inhibit lung carcinogenesis in mice. *Nat Genet*. 2001;29(1):25–33.
- ZEICHNER SB, RAJ N, CUSNIR M, FRANCAVILLA M, HIRZEL A. A de novo germline APC mutation (3927del5) in a patient with familial adenomatous polyposis: case report and literature review. *Clin Med Insights Oncol*. 2012;6:315–323.
- WEISENBERGER D. J, SIEGMUND KD, CAMPAN M et al., CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet*. 2006; 38; 787–793.
- WRIGHT M, BEATY JS, TERNENT CA. Molecular Markers for Colorectal Cancer. *Surg Clin North Am*. 2017;97(3):683-701.
- YANG Q, HUO S, SUI Y, DU Z, ZHAO H, LIU Y, LI W, WAN X, LIU T, ZHANG G. Mutation Status and Immunohistochemical Correlation of KRAS, NRAS, and BRAF in 260 Chinese Colorectal and Gastric Cancers. *Front Oncol*. 2018 Oct 26;8:487.

9.2 - ARTIGOS PUBLICADOS

9.2.1 - AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA P53 NO ADENOCARCINOMA COLORRETAL - REVISÃO BIBLIOGRÁFICO

Virgílio Ribeiro Guedes, Natália Ferreira Bueno, Victor Vargas de Oliveira, Maria Cristina da Silva Pranchevicius

RESUMO

Introdução: O carcinoma colorretal (CCR) é um tumor que se destaca por suas taxas de incidência e mortalidade no mundo. A maioria dos CRR se desenvolve a partir de adenomas preexistentes devido a mutações genéticas acumuladas. As mutações no gene TP53 são as mais comuns encontradas nas neoplasias malignas humanas. Sua mutação pode levar ao acúmulo da proteína p53 nuclear, que pode ser vista por métodos de imuno-histoquímica (IHQ). Atualmente, o estadiamento anatomopatológico é principal método utilizado para determinar o prognóstico de pacientes com CCR. **Metodologia:** Foi realizado um levantamento bibliográfico na base eletrônica PubMed utilizando os descritores: “*colorectal cancer*” and “*p53 protein*” and “*immunohistochemistry*”. **Resultados:** O CCR é um tumor com altas taxas de incidência e mortalidade no ocidente e oriente. A mutação no gene TP53 parece ser um precursor do CCR e leva ao acúmulo da p53 mutada, que é visível aos métodos de IHQ. A maioria das amostras de CCR apresentaram-se positivas para p53, o que determina um comportamento mais agressivo do tumor e também serve como um fator de prognóstico ruim. Sua superexpressão indica maior chance de metástases e redução da sobrevida. Uma vez que a mutação do TP53 é um evento precoce, a detecção precoce do CCR pode ser feita através da visualização de p53 acumulada sob IHQ. Alterações no gene TP53 são fatores de prognóstico ruim em vários tipos de câncer, incluindo o CCR. Outros marcadores e fenótipos se correlacionam com a p53 no desenvolvimento do CCR, como a vitamina D, o estrogênio e a progesterona. Por fim, em nosso estudo não foi detectado relação entre a expressão da p53, idade, gênero, invasão tumoral, e taxa de regressão. **Conclusão:** Pode-se inferir que o CCR é um câncer com taxas de incidência, prevalência e mortalidade significantes, e que a IHQ da p53 tem papel importante na detecção precoce e decisão do tratamento.

Palavras-chave: Carcinoma colorretal; gene TP53; proteína p53; imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Introduction: Colorectal cancer (CRC) is well known for its incidence and mortality rate. Most of CRCs develops from colonic adenoma, that accumulates genetic mutations. TP53 gene's mutations are the most common mutations found in human cancers. It's mutation leads to nuclear p53 accumulation, which can be seen by immunohistochemistry (IHC) methods.

Method: A research was done in PubMed using the following words: “*colorectal cancer*” and “*p53 protein*” and “*immunohistochemistry*”. **Resulted:** The CRC is a tumor with high incidence and mortality rates in the west and in the east. A mutation in TP53 gene seems to be a precursor of the CRC and leads to the accumulation of mutated p53, seen by the IHC methods. Most of CRC samples presents positive p53, and its positivity determinate a more aggressive behavior of the tumor, leading to a poor prognosis. Its overexpression indicates bigger chances of metastasis and survival rate loss. Being an early event, TP53 mutation and the following p53 nuclear accumulation makes the detection of CRC easier by IHC methods. TP53 gene alterations are also poor prognosis factors in various types of cancer, including the CRC. Other marks and phenotypes correlate with p53 in the evolution of CRC, like the vitamin D, estrogen and progesterone. Lastly, it wasn't detected the relation between age, gender, tumor invasion, neither regression rate. **Conclusion:** It can be inferred that the CRC is a cancer with significant incidence, prevalence and mortality rates, and that the IHC methods have an important role in the early detection and decision-making.

Keywords: Colorectal carcinoma; TP53 gene; p53 protein; immunohistochemistry.

INTRODUÇÃO

O carcinoma colorretal (CCR) é um tumor que se destaca por suas taxas de incidência e mortalidade no mundo todo, em especial na população ocidental.^{1,2} Apesar deste destaque, sua incidência varia pelo mundo: é a segunda neoplasia mais comum nos EUA, enquanto que alcança a quarta posição no Brasil, com destaque para os estados de Rio de Janeiro e São Paulo.¹

A maioria dos CCRs se desenvolve a partir de adenomas preexistentes. A ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor são a base molecular para o surgimento do carcinoma. Em pacientes com polipomatose adenomatosa familiar (PAF), há uma mutação herdada no cromossomo 5q, responsável pelo epitélio hiperproliferativo, que caracteriza uma tumorigênese em estágio inicial nestes pacientes. Deleções nos cromossomos 17p e 18q, bem como mutações no gene TP53 ocorrem com mais frequência em estágio tardio da tumorigênese.^{1,3}

Mutações no TP53 são as mudanças genéticas mais comuns encontradas em neoplasias humanas.⁴⁻⁵ A proteína p53, codificada pelo TP53, está envolvida no desenvolvimento de vários tipos de carcinomas humanos⁵. O TP53 selvagem é responsável por parar o ciclo celular na fase G1, permitindo reparos ao DNA. Porém, caso os danos ao DNA não possam ser reparados, a p53 inicia a apoptose, ativando o gene Bax pró-apoptótico. Se as mutações na célula se tornarem permanentes, as células neoplásicas passarão a acumular a proteína p53 mutada, que pode ser visualizada por técnicas imuno-histoquímicas (IHQ).⁶

O adenocarcinoma é o tipo mais comum de CCR. Cerca de 50% dos tumores são localizados no reto e sigmoide, 20% no cólon esquerdo e 30% no cólon direito. Macroscopicamente, pode assumir forma exofítica (vegetante), polipoide ou infiltrativa (ulcerada), enquanto que microscopicamente pode ser classificado em diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado.¹ Em pacientes mais jovens, o carcinoma colorretal é descrito como mais volumoso, mais avançado, com pouca diferenciação e com invasão de estruturas adjacentes.⁷

Atualmente, o estadiamento anatomopatológico é o principal recurso para determinar o prognóstico dos pacientes portadores de CCR⁵, sendo que o sistema de classificação *tumor, node, metastasis* (TNM) é o sistema mais usado para tal finalidade.²

METODOLOGIA

A revisão de literatura foi realizada na base de dados eletrônica PubMed. Para o levantamento bibliográfico foram utilizados os seguintes descritores: “*colorectal cancer*” and “*p53 protein*” and “*immunohistochemistry*”. Os artigos foram selecionados com base na leitura de títulos e resumos, considerando trabalhos apenas em inglês. Primeiramente, foram escolhidos 17 artigos com data de publicação nos últimos 5 anos, porém, ao longo da elaboração do trabalho, um artigo foi excluído por se tratar de um relato de caso.

RESULTADOS

O CCR é um tumor com elevadas taxas de incidência e mortalidade,⁸⁻⁹ tanto no ocidente quanto no oriente, crescendo em incidência a 4,2% por ano na China.⁹ O adenoma colorretal é considerado um precursor de seu desenvolvimento,^{8, 10} que junto a processos genéticos complexos, leva a sua origem.

O TP53, presente no cromossomo 17p, codifica a proteína p53, que é responsável pela regulação do ciclo celular.⁵⁻¹¹ A mutação do TP53, o evento mais comum nos carcinomas humanos,^{4, 5, 11} leva ao acúmulo de p53 mutante, que tem meia vida maior que a p53 selvagem^{10, 12-13}, possibilitando sua coloração e visualização no núcleo celular através da IHQ.⁶⁻¹¹ Sob a IHQ, o núcleo da célula apresenta grânulos marrons quando positiva para p53.⁹ A superexpressão da p53 leva a um crescimento acelerado devido à aceleração da fase G1-S.¹³

Em quatro artigos originais pesquisados,^{5, 8-10} amostras de mucosa colônica normal apresentaram resultados negativos para expressão de p53, enquanto que em amostras de CCR houve expressão de p53 positiva. Em dois estudos,^{10, 12} houve diferença significativa da expressão de p53 no adenoma colônico em relação ao CCR, sendo que em um deles¹⁰ houve 21,5% de positividade para o adenoma e 61% de para o CCR. No caso do adenoma, a expressão de p53 foi proporcional ao tamanho e à displasia, variando com o tipo histológico.¹⁰

A expressão de p53 pode contribuir para a decisão do tratamento do CCR, e é um marcador de prognóstico reservado para a doença.^{6,8,9,12,14} Quanto menor a diferenciação do tumor, maior a expressão de p53, portanto a p53 pode indicar o comportamento e malignidade do CCR.^{9,12,14} A expressão de p53 aumenta o risco de morte e recidiva, porém sua expressão não interfere no desfecho clínico do tratamento quimioterápico.¹³

A IHQ é importante para a diferenciação dos tipos de tumor, avaliação de sua agressividade e reconhecimento da origem de metástases.⁵ CCRs com superexpressão de p53 se associam com metástases em linfonodos, invasão extra-tireóidea, infiltração pleural, disseminação por contiguidade e metástases hepáticas.¹⁵ A superexpressão de p53 modula o risco de metástase pulmonar e reduz o tempo de sobrevivência à metastasectomia pulmonar, sendo este estendido para 62,6 meses em pacientes com p53 (-) e 46,1 meses para pacientes com p53 (+).¹⁵ A expressão de p53 em metástases linfonodais é maior do que nos tumores primários.¹⁶

A heterogenicidade de um tumor é crítica e limitante para seu diagnóstico molecular e terapia focalizada¹⁷, porém o CCR tem distribuição homogênea de p53.^{5,17,18} A baixa taxa de heterogenicidade da p53 suporta a afirmação de que as mutações no gene TP53 são um evento precoce no desenvolvimento do CCR^{5,8,17,18}. Portanto, a IHQ da p53 faz-se útil na detecção de CCR em estágios iniciais.^{5,18}

A superexpressão da proteína p53 e as alterações específicas no gene TP53 são eventos difíceis de se correlacionar.¹⁵ O *status* genômico do TP53 pode ser analisado por meio de sequenciamento genético, porém a reprodutibilidade, concordância e o preço da IHQ fazem com que este método seja mais conveniente.¹⁵ Alterações no TP53 indicam prognóstico ruim em vários tipos de câncer.^{16,19} O TP53 mutante no CCR se relaciona com resistência à quimioterapia e com pior prognóstico, bem como metástases em linfonodos.¹⁶ À medida que o CCR se desenvolve, as mutações no TP53 se tornam mais frequentes sendo estas menos frequentes no adenoma e mais frequentes no câncer invasivo.¹⁶

Em relação a outros marcadores e fenótipos, destaca-se que pacientes com Bcl-2 (-)/p53(-)/Bax(+), p53(-)/Bax(+), Bcl(-)/p53(-) têm menor taxa de sobrevivência.⁶ Não houve relação da expressão de p53 com proteína MMR, E-caderina ou CDX2.¹⁹ A presença de PAK 1, β -catenina e p53 no núcleo se correlacionou com presença de tumor em estágio avançado, e os níveis de vitamina D foram menores em pacientes com acúmulo de p53, expressão nuclear de β -catenina e expressão elevada de Ki67.¹² Estudos experimentais em ratos e linhagens celulares mostraram que progesterona e estrogênio ativam a sinalização de efeitos inibidores de crescimento nas células de CCR através de *upregulation* de p53.¹⁵

Gasinska *et. al.*²¹ não encontraram relação entre a expressão de p53 com o sistema de classificação TNM, porém Demir *et. al.*¹³ e Juniku-Shkolli *et. al.*¹² relataram que a expressão de p53 é proporcional ao estágio do tumor. Huh *et. al.*¹⁹ não detectaram associação

significativa entre a expressão de p53 com idade¹³, sexo, tamanho do tumor, invasão linfática, vascular, perineural, disseminação por contiguidade ou taxa de regressão.

CONCLUSÃO

Pode-se inferir que o CCR é um câncer com taxas de incidência, prevalência e mortalidade significantes, e que a IHQ tem papel importante na detecção precoce e decisão do tratamento. Dentre os marcadores que podem ser visualizados pela IHQ, destaca-se a proteína p53, com valor diagnóstico e prognóstico, uma vez que é capaz de evidenciar uma transformação neoplásica precoce e predizer o comportamento do tumor. Vale ressaltar também que a expressão da p53 pode estar correlacionada com outros marcadores, e que são necessários mais estudos para entender melhor seu comportamento frente a outras alterações.

REFERÊNCIAS

1. Cutait R, Farias RIs. Câncer Colorretal. In: Lopes AC. Tratado de Clínica Médica-3ª ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016.
2. Dawson H, Kirsch R, Messenger D, e Driman D. A Review of Current Challenges in Colorectal Cancer Reporting. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2019.
3. Fearon ER, e Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767. 1990.
4. Cascinu S, *et al.*, Immunohistochemical determination of p53 protein does not predict clinical response in advanced colorectal cancer with low thymidylate synthase expression receiving a bolus 5-fluorouracil—leucovorin combination. *Annals of oncology* 11.8: 1053-1056. 2000.
5. Zlatian OM, *et al.*, Histochemical and immunohistochemical evidence of tumor heterogeneity in colorectal cancer. *Rom J Morphol Embryol* 56.1: 175-181. 2015.
6. Melincovici CS, *et al.*, The prognostic significance of p53, Bax, Bcl-2 and cyclin E protein overexpression in colon cancer-an immunohistochemical study using the tissue microarray technique. *Rom J Morphol Embryol*57.1: 81-89. 2016.
7. Neto JDC, *et al.*, Câncer colorretal: características clínicas e anatomopatológicas em pacientes com idade inferior a 40 anos. *Rev Brás Coloproctologia* 26: 430-435. 2006
8. Senol S, *et al.*, Immunohistochemical profile of tumor pathways and prognostic significance in colon adenocarcinomas. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 36.1. 2017.

9. Wu Y, *et al.*, Combined detection of the expression of Nm23-H1 and p53 is correlated with survival rates of patients with stage II and III colorectal cancer. *Oncology letters* 13.1: 129-136. 2017.
10. Xi Hong-Qing, *et al.*, Expression and clinicopathologic significance of TUFM and p53 for the normal–adenoma–carcinoma sequence in colorectal epithelia. *World journal of surgical oncology* 15.1: 90. 2017.
11. Lu X, Yuanjie Y, e Shiyun T. p53 expression in patients with ulcerative colitis-associated with dysplasia and carcinoma: a systematic meta-analysis. *BMC gastroenterology* 17.1: 111. 2017.
12. Juniku-Shkololli A, *et al.*, Expression of immunohistochemical markers of progression in pre-cancerous and cancerous human colon: Correlation with serum vitamin D levels. *Anticancer research* 35.3: 1513-1520. 2015.
13. Demir L, *et al.*, The impact of cell proliferation markers and p53 mutation status on prognosis of non-metastatic colon cancer. *Journal of surgical oncology* 109.7: 665-675. 2014.
14. Sayar I, *et al.*, Relationship among mismatch repair deficiency, CDX2 loss, p53 and E-cadherin in colon carcinoma and suitability of using a double panel of mismatch repair proteins by immunohistochemistry. *Polish journal of pathology: official journal of the Polish Society of Pathologists* 66.3: 246-253. 2015.
15. Li C, *et al.*, Prognostic value of p53 for colorectal cancer after surgical resection of pulmonary metastases. *World journal of surgical oncology* 14.1: 308. 2016.
16. Meteoglu I, *et al.*, Nuclear factor kappa B, matrix metalloproteinase-1, p53, and Ki-67 expressions in the primary tumors and the lymph node metastases of colorectal cancer cases. *Gastroenterology research and practice* 2015. 2015.
17. Stahl PR, *et al.*, Determination of tumor heterogeneity in colorectal cancers using heterogeneity tissue microarrays. *Pathology & Oncology Research* 21.4: 1183-1189. 2015.
18. Kobayashi S, *et al.*, Immunohistochemical assessment of a unique basal pattern of p53 expression in ulcerative-colitis-associated neoplasia using computer-assisted cytometry. *Diagnostic pathology* 9.1: 99. 2014.
19. Huh, JW, *et al.*, Immunohistochemical detection of p53 expression in patients with preoperative chemoradiation for rectal cancer: association with prognosis. *Yonsei medical journal* 56.1: 82-88. 2015.
20. Brändstedt J, *et al.*, Associations of hormone replacement therapy and oral contraceptives with risk of colorectal cancer defined by clinicopathological factors, beta-catenin alterations, expression of cyclin D1, p53, and microsatellite-instability. *BMC cancer* 14.1: 371. 2014.

21. Gasinska A, *et al.*, Gender-related differences in pathological and clinical tumor response based on immunohistochemical proteins expression in rectal cancer patients treated with short course of preoperative radiotherapy. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 18.7: 1306-1318. 2014.

9.2.2 - EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MUTANTES DO KRAS NO ADENOCARCINOMA COLORRETAL – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Virgílio Ribeiro Guedes, Natália Ferreira Bueno, Victor Vargas de Oliveira, Maria Cristina da Silva Pranchevicius

RESUMO

Introdução: Os tumores colorretais foram o terceiro tipo de câncer mais diagnosticado em 2018. Na tentativa de aumentar a sobrevivência de pacientes com metástases, o teste KRAS é relevante para a escolha da terapia mais apropriada para o carcinoma colorretal (CCR). O gene KRAS (Kirsten Ras Oncogene) acompanhado dos genes BRAF e NRAS é responsável por codificar as proteínas RAS na importante via de sinalização celular RAS/RAF/MEK/ERK. A presença de KRAS mutante no CCR é o principal biomarcador tecidual que indica a resistência do tumor à terapia de primeira linha com anticorpos monoclonais inibidores do EGFR (Cetuximabe e Panitumumabe). **Metodologia:** Foi realizado um levantamento bibliográfico na base eletrônica Google Scholar utilizando os descritores: “*colorectal cancer*” and “*KRAS gene*”. **Resultados:** A conversão do aminoácido glicina (G) para ácido aspártico (D) no códon 12, também chamada de KRAS G12D, é a mutação mais frequente do KRAS nas neoplasias malignas gastrointestinais. Cerca de 40% dos CCRs têm a mutação no gene KRAS nos códons 12 e 13 do éxon 2. Houve predomínio (57,4%) das mutações no sexo masculino, e todas as amostras de cólon esquerdo, 66% das de cólon direito e 51,8% das de reto apresentaram mutações no KRAS. A sinalização de células com KRAS mutante determina um papel crítico no rompimento inicial da submucosa e, por isso é essencial para a progressão da invasão e metástase do CCR. A eficácia de anti-EGFR é limitada em pacientes que possuem mutação KRAS, entretanto 20% dos pacientes com KRAS selvagem se beneficiam diante da terapia. Atualmente não há droga ou vacina que consiga focalizar efetivamente a proteína KRAS G12D em humanos. **Conclusão:** Pode-se inferir que o CCR é um câncer de prognóstico ainda reservado. A decisão terapêutica apropriada depende do conhecimento do status mutacional do KRAS e as mutações no éxon 2 são claramente preditivas às terapias com anticorpos monoclonais inibidores do EGFR.

Palavras-chave: Carcinoma colorretal; gene KRAS; mutação.

ABSTRACT

Introduction: Colorectal tumors were the third most diagnosed type of cancer in 2018. Trying to improve the overall survival of patients with metastasis, the KRAS test is relevant for choosing a more appropriate therapy for the colorectal carcinoma (CRC). The KRAS gene (Kirsten Ras Oncogene) along with BRAF and NRAS genes is responsible for encoding RAS proteins from the important RAS / RAF / MEK / ERK cell signaling pathway. The presence of

mutant KRAS in the CCR is the major tissue biomarker indicating the patient's resistance to first-line therapy with the monoclonal vaccine EGFR inhibitors (Cetuximabe and Panitumumabe). **Methodology:** A bibliographic survey was carried out in the database of Google Scholar using the descriptors: "colorectal cancer" and "KRAS gene". **Results:** The conversion of the amino acid glycine (G) to aspartic acid (D) at codon 12, also called KRAS G12D, is a more frequent mutation of KRAS in gastrointestinal malignancies. About 40% of the RCCs have a mutation in the KRAS gene at codons 12 and 13 of exon 2. There was a predominance (57.4%) of the mutations in the male sex, and all samples from the left colon, 66% of the right colon and 51.8% of the mutational changes in KRAS. Marking of cells with mutant KRAS determines a non-initial critical role of the submucosa and is therefore essential for progression of CCR invasion and metastasis. Anti-EGFR is limited to patients who have KRAS mutation, in addition, 20% of wild-type KRAS patients benefit from the therapy. There is currently no drug or vaccine that can concentrate on a KRAS G12D protein in humans. **Conclusion:** It can be inferred that the CRC still has a reserved prognosis. The multitude of KRAS and mutations in exon 2 are clearly prescribed in therapies with EGFR inhibitory monoclonal antibodies.

Keywords: Colorectal cancer; KRAS gene; mutation.

INTRODUÇÃO

O câncer foi responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018.¹ Em nível global, uma em cada seis mortes está relacionada à doença, ou seja, é a segunda causa de morte no mundo.¹ Os tumores colorretais são o terceiro tipo de câncer mais diagnosticado -1,8 milhão de casos- e o segundo tipo de câncer mais fatal - 862 mil mortes.¹

Cerca de 90% dos carcinomas colorretais (CCR) são adenocarcinomas.² Lesões originárias de pólipos benignos que podem crescer na parede interna do intestino grosso e/ou reto e evoluírem a uma neoplasia maligna. Se realizado um diagnóstico precoce, este pode impedir o aparecimento de metástases e, possivelmente, permitirá a cura. Entretanto, aproximadamente 40%-50% dos pacientes desenvolvem câncer metastático e 80%-90% destes apresentam metástases não ressecáveis.³

O tratamento do CCR metastático inclui a quimioterapia, sendo que os principais fármacos utilizados são 5-Fluorouracil/Leucovorina, Irinotecano, Oxaliplatina e Trifluridina/Tipiracil.⁴ Os quimioterápicos atuam em nível sistêmico e dessa forma, a não seletividade com as células cancerosas permite sua interferência no crescimento de células normais e resulta no aparecimento de efeitos colaterais.⁵

Na tentativa de aumentar a sobrevida de pacientes com metástases, o teste KRAS é relevante para a escolha da terapia mais apropriada para o CCR.^{4,6,7} O gene KRAS (Kirsten Ras Oncogene), localizado no braço curto do cromossomo 12, juntamente com os genes

BRAF e NRAS é responsável por codificar as proteínas RAS da via de sinalização celular RAS/RAF/MEK/ERK.⁴

A presença de mutações envolvendo o gene KRAS reduz dramaticamente a taxa de hidrólise do GTP com posterior aumento de estímulos intracelulares e formação resultante de células desordenadas.^{4,8} Os polimorfismos nos códons 12,13,61,146 dos éxons 2,3,4 são encontrados em torno de 50% dos casos de CCR.^{4,8,9,10,11,12}

Atualmente, a classificação do status mutacional do KRAS tem consequências clínicas importantes. A presença de KRAS mutante no CCR é o principal biomarcador tecidual que indica a resistência do tumor à terapia de primeira linha com anticorpos monoclonais inibidores do EGFR (Cetuximabe e Panitumumabe).^{4, 6,10}

METODOLOGIA

A revisão de literatura foi realizada na base de dados eletrônica Google Scholar. Para o levantamento bibliográfico foram utilizados os seguintes descritores: “*colorectal cancer*” and “*KRAS gene*”. Os artigos foram selecionados com base na leitura de títulos e resumos, considerando trabalhos apenas em inglês. Foram escolhidos 10 artigos com data de publicação nos últimos 5 anos.

RESULTADOS

Há predomínio de mutações do KRAS em malignidades epiteliais.⁸ A conversão do aminoácido glicina (G) para ácido aspártico (D) no códon 12, também chamada de KRAS G12D, é a mutação mais frequente do KRAS nas neoplasias malignas gastrointestinais. Cerca de 45% dos cânceres pancreáticos e 13% dos cânceres colorretais têm a mutação KRAS G12D.¹¹ Mutações somáticas no KRAS ocorrem em 30-55% dos CCRs com predominância no códon 12.^{13, 14} Cerca de 40% dos CCRs têm a mutação no gene KRAS nos códons 12 e 13.¹²

O KRAS é um importante biomarcador que identifica resistência à terapia com anticorpo monoclonal anti-EGFR.^{6, 13, 14} A determinação de seu status faz parte da prática clínica na maioria dos países: na França, a prescrição em primeira linha do teste KRAS chega a 81%.⁶

Em um estudo,⁹ 53,8% dos CCRs apresentavam mutações no KRAS, sendo a mais comum a mutação no códon 13, seguida da mutação no códon 12. Houve também mutação nos dois códons simultaneamente, sugerindo um caráter heterogêneo das mutações e do tumor.^{9, 10} Ainda nesse estudo⁹, houve predomínio (57,4%) das mutações no sexo masculino, e todas as amostras de cólon esquerdo, 66% das de cólon direito e 51,8% das de reto apresentaram mutações no KRAS.

Em outro estudo,¹⁵ não houve diferença da expressão de EGFR e gene KRAS entre

o grupo controle e o grupo com câncer colorretal, e a expressão do gene KRAS foi maior em pacientes diagnosticados com CCR abaixo dos 60 anos de idade. Em uma comparação entre pacientes com KRAS selvagem e KRAS G13D, os pacientes com KRAS G13D tiveram uma pior resposta tumoral.¹² Apesar de um estudo correlacionar a expressão do KRAS com o grau de diferenciação do tumor⁹ outro estudo determinou que a expressão do KRAS não mostrou correlação com o desfecho clínico.¹⁵

Para Boutin et.al,⁹ apesar da sinalização do KRAS oncogênico ser dispensável para o crescimento adenomatoso, ela é essencial para a progressão da invasão e metástase do CCR. De acordo com o grupo, células com KRAS mutante ativado superam as células com KRAS selvagem e sua sinalização determina um papel crítico no rompimento inicial da submucosa. Ainda no mesmo estudo⁹, a tendência de maior frequência alélica do KRAS no avanço do estágio 1 para o estágio 4 do CCR confirmou a hipótese dos pesquisadores de que o oncogene KRAS é indispensável para a manutenção do CCR avançado. Além disso, tal estudo também comprovou que a extinção da sinalização do KRAS previne e elimina células cancerígenas invasivas ou metastáticas.⁹

Knight e Irving,⁸ constataram que mutações no KRAS aumentam a proporção de pacientes com recaída no tratamento e com envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC). Em outro estudo⁹, metástases pulmonares do CCR foram correlacionadas com a presença do oncogene, indicando que esta é duas vezes mais comum na presença de KRAS mutante nos pacientes. Kosmidou et.al¹⁰ destacou em outro estudo que 68,2% das metástases hepáticas também apresentam a mutação. Entretanto, análises de estudos demonstraram que o CCR com KRAS selvagem é capaz de metastatizar e por isso a sobrevida de pacientes é limitada.^{9,16}

No CCR metastático a decisão terapêutica apropriada só pode ser tomada quando o estado mutacional do KRAS for conhecido.⁶ A eficácia de anti-EGFR é limitada em pacientes que possuem mutação KRAS.¹⁴ Células que apresentam mutação C.38 G>A são mais sensíveis à terapia anti-EGFR comparada a outras mutações no KRAS, ao passo que mutações nos códons 61 e 146 conferem resistência à essa terapia.¹⁰ Já a mutação do KRAS no éxon 2 é preditiva para o não benefício com anti-EGFR.¹² Quando se excluem pacientes com mutação no KRAS, apenas 20% dos pacientes se beneficiam diante da terapia com anti-EGFR.¹³

A ativação do anticorpo anti-EGFR não só falhou ao tentar aprimorar desfechos, como também reduziu a sobrevida geral (SG) e a sobrevida livre de progressão (SLP) em tais pacientes, independente do estado mutacional ou não do KRAS.¹⁶ No entanto, para outro estudo¹² não houve diferença na SG de pacientes com KRAS selvagem e KRAS G13D e apenas a KRAS G12D estava associada com efeito preditivo negativo na SG. Nesse mesmo estudo,¹² detectou-se também uma significância estatística no efeito do tratamento sobre a

SLP entre KRAS selvagem e KRAS mutante.

Mutações no KRAS são fatores negativos para a eficácia do Cetuximabe,¹⁴ e em pacientes com tumores que apresentam KRAS mutante, o uso de Cetuximabe apresentou efeito prejudicial.¹⁶ Entretanto, o benefício do Cetuximabe também foi limitado em pacientes com tumor que apresentam KRAS selvagem, com apenas 3.5 meses de SG.¹⁶ Em se tratando de mutações específicas, pacientes com mutações KRAS G13D se beneficiaram com a adição de Cetuximabe: 7.6 meses contra 5.7 meses na SG; 4 meses contra 1.9 meses na SLP.¹² O Cetuximabe teve uma resposta melhor em pacientes com mutação KRAS G13D em relação a pacientes com KRAS G12D.¹²

O uso de Cetuximabe e quimioterapia em relação a quimioterapia exclusiva apresentou diferença insignificante na SLP em pacientes com KRAS G13D.¹² A adição de Cetuximabe ao 5-Fluoracil (5-FU) / Leucovorina e Irinotecan não ocasionou nenhuma diferença na SLP independente do estado mutacional do KRAS. Contudo, pacientes com KRAS selvagem recebendo 5-FU tiveram sua SLP prolongada no grupo que recebeu Cetuximabe.¹⁶

Em relação ao Panitumumabe, sua adição ao 5-FU/Leucovorina e Oxaliplatina teve benefício restrito em pacientes com KRAS selvagem, com ligeiro aumento na SLP e aumento insignificante na SG. Sua adição ao 5-FU/Leucovorina e Irinotecan aumentou a SLP em pacientes com tumor KRAS selvagem,¹⁶ porém não apresentou benefício na SLP em pacientes com KRAS mutante (7.3 semanas em relação a 7.4 semanas).¹²

O benefício do Cetuximabe e Panitumumabe foi restrito em pacientes com CCR metastático que apresentaram mutação no KRAS. Apenas 20-40% dos pacientes com CCR com KRAS selvagem respondem ao Cetuximabe seja em monoterapia ou em terapia combinada.¹⁴

Atualmente não há droga ou vacina que consiga focalizar efetivamente a proteína KRAS G12D em humanos¹¹, porém segundo um relato de caso, paciente com CCR metastático teve regressão do seu tumor após administração de células TCD8⁺ tendo como alvo o KRAS G12D mutante¹¹. Inibidores da MEK suprimiram a resistência ao Cetuximabe em células de CCR com mutação KRAS.¹⁴

Com a progressão da doença, alelos KRAS mutados podem ser encontrados em amostras de sangue de pacientes com CCR, inclusive naqueles que respondem ao tratamento anti-EGFR.¹³ Sua porcentagem cai quando o tratamento com anti-EGFR é suspenso e se mantém abaixo da detecção após tratamento subsequente, e seu nível é reduzido até mesmo em populações com CCR resistente à terapia.¹³

Em relação a outros genes e marcadores tumorais, mutações no KRAS foram detectadas na maioria dos tumores PIK3CA, o que sugere um efeito sinérgico de ambos.¹⁰ O KRAS e o BRAF atualmente estão sendo focados como potenciais biomarcadores de

prognóstico e predição em pacientes com CCR metastático tratados com anti-EGFR.¹⁰ A amplificação de genes KRAS e MET assim como mutação no domínio extracelular do EGFR mantem a resistência a anticorpos anti-EGFR em pacientes com CCR.¹³ A expressão do gene KRAS não sofreu diferença com a variação do antígeno carcino-embriogênico (CEA) prévio ao início do tratamento do câncer.¹⁵

CONCLUSÃO

Pode-se inferir que o CCR é um câncer de prognóstico ainda reservado. A decisão terapêutica apropriada depende do conhecimento do status mutacional do KRAS e as mutações no éxon 2 são claramente preditivas à terapias com anticorpos monoclonais inibidores do EGFR. Dessa forma, compreender o papel da sinalização do KRAS mutante na regulação de outros processos envolvidos na carcinogênese do cólon pode contribuir para novas abordagens terapêuticas nos casos de CCR resistentes à terapia anti-EGFR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organização Pan-americana da Saúde – OPAS (Acesso em 10/02/2019 Disponível em: https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094).
2. Fletcher CDM. Diagnostic histopathology of tumors. 3th ed. Livingstone: Elsevier Churchill; 2007.
3. Fields K, Lipton L. World J Gastroenterol. 2007 28 de julho; 13 (28): 3806-15.
4. Folletto, Eliara Fernanda. Análise da variabilidade genética do gene KRAS em pacientes portadores de câncer colorretal do Rio Grande do Sul. 2015.
5. Instituto Oncoguia (Acesso em 10/02/2019 Disponível em: <http://www.oncoquia.org.br/conteudo/quimioterapia-para-cancer-colorretal/3229/180/>).
6. Barone, C.; Pinto, C.; Normanno, N.; Capussotti, L.; Cognetti, F.; Falcone, A.; Mantovani, L. KRAS early testing: consensus initiative and cost effectiveness evaluation for metastatic colorectal patients in an Italian setting. PLoS One, 2014; v. 9, n. 1, p. e85897.
7. Alves, Sara Cristina Sequeira. Impact of mutated KRAS signaling on autophagy regulation in colorectal carcinoma. 2014.
8. Knight, T.; Irving, J. A. Ras/Raf/MEK/ERK Pathway Activation in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Therapeutic Targeting. Front Oncol. 2014; v. 4, n., p. 160.
9. Boutin, Adam T. et al., Oncogenic Kras drives invasion and maintains metastases in colorectal cancer. Genes & development. 2017; v. 31, n. 4, p. 370-382.

10. Kosmidou, V.; Oikonomou, E.; Vlassi, M.; Avlonitis, S.; Katseli, A.; Tsipras, I.; Mourtzoukou, D.; Kontogergos, G.; Zografos, G.; Pintzas, A. Tumor heterogeneity revealed by KRAS, BRAF, and PIK3CA pyrosequencing: KRAS and PIK3CA intratumor mutation profile differences and their therapeutic implications. *Hum Mutat.* 2014; v. 35, n. 3, p. 329-340.
11. Tran, Eric et al., T-cell transfer therapy targeting mutant KRAS in cancer. *New England Journal of Medicine.* 2016; v. 375, n. 23, p. 2255-2262.
12. Feng, Q. Y.; Wei, Y.; Chen, J. W.; Chang, W. J.; Ye, L. C.; Zhu, D. X.; Xu, J. M. Anti-EGFR and anti-VEGF agents: important targeted therapies of colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol.* 2014; v. 20, n. 15, p. 4263-4275.
13. Siravegna, Giulia et al., Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nature medicine.* 2015; v. 21, n. 7, p. 795.
14. Jeong, W. J.; Cha, P. H.; Choi, K. Y. Strategies to overcome resistance to epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2014; v. 20, n. 29, p. 9862-9871.
15. Carvalho, Thais Inácio de et al., Analysis of gene expression EGFR and KRAS, microRNA-21 and microRNA-203 in patients with colon and rectal cancer and correlation with clinical outcome and prognostic factors. *Acta Cirurgica Brasileira.* 2017; v. 32, n. 3, p. 243-250.
16. Mahipal, A.; Kothari, N.; Gupta, S. Epidermal growth factor receptor inhibitors: coming of age. *Cancer Control.* 2014; v. 21, n. 1, p. 74-79.

9.3 COMPROVANTES DE ACEITAÇÃO DO CAPÍTULO DE LIVRO E ARTIGO

9.3.1. Capítulo de livro



Compartilhando informações e experiências
por um mundo melhor!

DECLARAÇÃO

Declaramos a quem possa interessar que os professores **VIRGÍLIO RIBEIRO GUEDES, MARIA CRISTINA DA SILVA PRANCHEVICIUS** são autores do capítulo "**PRINCIPAIS ASPECTOS GENÉTICOS E MARCADORES MOLECULARES DO CÂNCER COLORRETAL**" do livro intitulado "**TÓPICOS ESPECIAIS EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE - VOLUME IV**", apreciado e aceito pelo nosso Conselho Editorial, previsto para ser publicado em 2019.

Curitiba, 20 de maio de 2019.

Por ser verdade, assino

Railson Moura

CPF: 901.417.256-72

Editor-Chefe

Editora CRV Ltda.

9.3.2 Artigos publicados

REVISTA DE PATOLOGIA DO TOCANTINS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

Avenida LO05, Quadra 306Sul, Lote 23
 Plano Diretor Sul | 77001-036 | Palmas/TO
 (63) 3213-2322 | (63) 9 8490-6822 | revpatocantins@uft.edu.br



DECLARAÇÃO DE PUBLICAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o manuscrito intitulado “**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA P53 NO ADENOCARCINOMA COLORRETAL - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**” sob autoria de “Virgílio Ribeiro Guedes, Natália Ferreira Bueno, Victor Vargas de Oliveira, Maria Cristina da Silva Pranchevicius” foi publicado na versão online da Revista de Patologia do Tocantins volume 6 número 1 em 06 de maio de 2019.

Palmas, 13 de junho de 2019.

Felipe Cãmargo Ferreira Dias
 Diretor de redação

ISSN: 2446-6492

Qualis capes: B4 - Plataforma Sucupira

Indexadores:



REVISTA DE PATOLOGIA DO TOCANTINS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

Avenida LO05, Quadra 306Sul, Lote 23
 Plano Diretor Sul | 77001-036 | Palmas/TO
 (63) 3213-2322 | (63) 9 8490-6822 | revpatocantins@uft.edu.br



DECLARAÇÃO DE PUBLICAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o manuscrito intitulado **“EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MUTANTES DO KRAS NO ADENOCARCINOMA COLORRETAL – REVISÃO BIBLIOGRAFICA”** sob autoria de “Virgílio Ribeiro Guedes, Natália Ferreira Bueno, Victor Vargas de Oliveira, Maria Cristina da Silva Pranchevicius” foi publicado na versão online da Revista de Patologia do Tocantins volume 6 número 1 em 06 de maio de 2019.

Palmas, 13 de junho de 2019.

Felipe Camargo Ferreira Dias
 Diretor de redação

ISSN: 2446-6492

Qualis capes: B4 - Plataforma Sucupira

Indexadores:



9.4 APROVAÇÕES DO CEP

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DO TOCANTINS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS C-ERB-B2, P53, INSTABILIDADE MICROSSATÉLITES E MUTAÇÕES DO KRAS E BRAF, EM PACIENTES COM ADENOCARCINOMA COLORREctal NO ESTADO DE

Pesquisador: Maria Cristina da Silva Pranchevicius

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 93356218.9.0000.5519

Instituição Proponente: Fundação Universidade Federal do Tocantins

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.390.938

Apresentação do Projeto:

O câncer colorretal (CCR) é uma das neoplasias mais frequentes no mundo. Nosso objetivo é conhecer o perfil dos genes alterados através da expressão imunoistoquímica dos marcadores p53, c-erb-B2 (HER2), Kras, Braf e a instabilidade microssatélites, característico de cada paciente. Isto poderá permitir um tratamento mais individualizado, seja cirúrgico, seja por quimioterapia ou radioterapia, resultando em um melhor prognóstico para o doente. Este trabalho será um estudo analítico, observacional, transversal, no período compreendido entre janeiro de 2012 e dezembro de 2017, com abordagem predominantemente quantitativa. Os 168 pacientes com CCR que foram submetidos a exame anatomopatológico e imunoistoquímico no laboratório CDA Palmas terão seus resultados laboratoriais analisados em conjunto para determinar alterações nas proteínas p53, c-erb-B2 (HER2), Kras e Braf, bem como na instabilidade microssatélites caracterizando assim a amostra dos casos de CCR no estado do Tocantins.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Conhecer o perfil dos genes alterados através da expressão imunoistoquímica dos marcadores p53, C-ERB-B2 (HER2), Kras, Braf e a instabilidade microssatélites, característico de cada paciente. Isto poderá permitir um tratamento mais individualizado, seja cirúrgico, seja por quimioterapia ou radioterapia, resultando em um melhor prognóstico para o doente.

Endereço: Avenida NS 15, 109 Norte Prédio do Almoarifado
Bairro: Plano Diretor Norte **CEP:** 77.001-090
UF: TO **Município:** PALMAS
Telefone: (63)3232-8023 **E-mail:** cep_ufi@uft.edu.br

Continuação do Parecer: 3.390.938

Objetivo Secundário:

- Caracterizar o perfil de incidência do câncer colorretal no estado do Tocantins, analisando as variáveis sexo, idade, localização, tipo histológico do tumor e o perfil imunoistoquímico;
- Fazer correlação entre os tipos histológicos do câncer colorretal, com menor e maior agressividade histológica e a expressão imunoistoquímica dos marcadores p53, c-erb-B2 (HER2), e a instabilidade microsatélites;
- Fazer a subclassificação do perfil genético baseado no estado de mutação de genes BRAF e KRAS;
- Verificar a frequência dos pacientes que apresentam e não apresentam características da Síndrome de Hiperplasia Não Polipóide do Câncer do Colon (HNPCC) usando os critérios de Bethesda;
- Subsidiar o conhecimento científico acerca de tumores colônicos e marcadores tumorais de interesse oncológico para uma melhor ação terapêutica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos inerentes à pesquisa são: estigmatização a partir da divulgação dos resultados, descarte inadequado do material, invasão de privacidade, divulgação de dados confidenciais e risco a segurança dos prontuários. Para minimizar estes riscos serão tomadas as seguintes providências: limitar o acesso aos prontuários apenas pelo tempo, quantidade e qualidade das informações específicas para a pesquisa; garantir a não violação e a integridade dos documentos (danos físicos, cópias, rasuras); assegurar a confidencialidade e a privacidade, a proteção da imagem e a não estigmatização, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de auto-estima, de prestígio e/ou econômico; assumir o compromisso de comunicar às autoridades sanitárias os resultados da pesquisa, sempre que os mesmos puderem contribuir para a melhoria das condições de saúde da coletividade, preservando, porém, a imagem e assegurando que os sujeitos da pesquisa não sejam estigmatizados ou percam a autoestima; e garantir que o material biológico e os dados obtidos na pesquisa serão utilizados exclusivamente para a finalidade prevista no seu protocolo.

Benefícios: Esperamos com o nosso trabalho poder contribuir de alguma forma para uma melhor classificação dos subtipos de tumores colorretais e colaborar com as pesquisas que contemplam a padronização e a caracterização deste tipo de tumor, propiciando terapias mais

Endereço: Avenida NS 15, 109 Norte Prédio do Almoarifado
 Bairro: Plano Diretor Norte CEP: 77.001-090
 UF: TO Município: PALMAS
 Telefone: (63)3232-8023 E-mail: cep_uf@uft.edu.br

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DO TOCANTINS



Continuação do Parecer: 3.390.938

eficazes e até mesmo a cura desta neoplasia. Com conhecimento destes fatores genéticos específicos para cada paciente, permitirá no futuro um tratamento mais individualizado, seja cirúrgico, seja quimioterapia ou radioterapia, resultando em um melhor prognóstico para o doente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O Projeto é relevante ao contexto proposto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto apresenta todos os itens obrigatórios de acordo com a Norma Operacional 001/2013, item 3.4.

Recomendações:

- Atualizar o cronograma de execução da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- Não há.

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_1145324.pdf	17/04/2019 08:13:32		Aceito
Outros	TERMO_DE_FIEL_DEPOSITARIO_ATUALIZADO.pdf	17/04/2019 08:12:52	Maria Cristina da Silva Pranchevicius	Aceito
Outros	TERMO_DE_ANUENCIA_ATUALIZADO.pdf	17/04/2019 08:12:38	Maria Cristina da Silva Pranchevicius	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.pdf	17/04/2019 08:12:22	Maria Cristina da Silva Pranchevicius	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_ATUALIZADO.docx	17/04/2019 08:12:04	Maria Cristina da Silva Pranchevicius	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	15/06/2018 17:50:27	Maria Cristina da Silva Pranchevicius	Aceito
Outros	Termo_de_Fiel_Depositario.pdf	28/05/2018 10:56:51	Maria Cristina da Silva Pranchevicius	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Solicitacao_de_Isencao_do_Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido.pdf	28/05/2018 10:56:23	Maria Cristina da Silva Pranchevicius	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	28/05/2018	Maria Cristina da	Aceito

Endereço: Avenida NS 15, 109 Norte Prédio do Almoarifado
 Bairro: Plano Diretor Norte CEP: 77.001-090
 UF: TO Município: PALMAS
 Telefone: (63)3232-8023 E-mail: cep_uf@uft.edu.br

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DO TOCANTINS



Continuação do Parecer: 3.390.938

Orçamento	Orcamento.pdf	10:55:53	Silva Pranchevicius	Aceito
Outros	Declaracao_de_Fase_Inicial.pdf	28/05/2018 10:55:40	Maria Cristina da Silva Pranchevicius	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Coordenadora.pdf	28/05/2018 10:55:13	Maria Cristina da Silva Pranchevicius	Aceito
Cronograma	Cronograma_de_Execucao.pdf	28/05/2018 10:54:24	Maria Cristina da Silva Pranchevicius	Aceito
Outros	Carta_de_Apresentacao.pdf	28/05/2018 10:54:14	Maria Cristina da Silva Pranchevicius	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_DOUTORADO.pdf	28/05/2018 10:52:51	Maria Cristina da Silva Pranchevicius	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PALMAS, 13 de Junho de 2019

Assinado por:
Victor Rodrigues Nepomuceno
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida NS 15, 109 Norte Prédio do Almoarifado
 Bairro: Plano Diretor Norte CEP: 77.001-090
 UF: TO Município: PALMAS
 Telefone: (63)3232-8023 E-mail: cep_uf@uft.edu.br