UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

KAREN BENTO RIBEIRO

**Estudo da associação entre o gene KRAS e células tronco
tumoriais com características clínico-patológicas e
sobrevida no câncer de cólon metastático**

Ribeirão Preto

2013

KAREN BENTO RIBEIRO

**Estudo da associação entre o gene KRAS e células tronco
tumoriais com características clínico-patológicas e
sobrevida no câncer de cólon metastático**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas.

Área de concentração: Clínica Médica- opção
Investigação Clínica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Maris Peria

Ribeirão Preto
2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ribeiro, Karen Bento

Estudo da associação entre o gene KRAS e células tronco tumorais com características clínico-patológicas e sobrevida no câncer de cólon metastático. Ribeirão Preto, 2013.

99 p. : il.; 30cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP- Área de concentração: Clínica Médica, opção Investigação Clínica.

Orientador: Peria, Fernanda Maris

1. Câncer de cólon. 2. Células tronco tumorais. 3. Oncogene KRAS. 4. Sobrevida. 5. Características clinico-patológicas

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: RIBEIRO, Karen Bento

Título: Estudo da associação entre o gene KRAS e células tronco tumorais com características clínico-patológicas e sobrevida no câncer de cólon metastático.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Médica- opção Investigação Clínica.

Aprovado em: ____/____/2013

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Aparecida Helena Bento Ribeiro** e **Roberto Melo Ribeiro** que sempre me estimularam ao crescimento profissional, torceram e me apoiaram em todos os momentos e me ensinaram os verdadeiros valores da vida.*

*Às minhas irmãs, **Karine Bento Ribeiro** e **Karoline Bento Ribeiro** pelo companheirismo, apoio, torcida e admiração que sempre me demonstraram.*

A todos os meus familiares que também torceram e me apoiaram em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A todos os **Pacientes** e seus familiares pela colaboração em participar deste estudo, a contribuição de vocês foi imprescindível para a realização deste estudo.

Ao **Prof Drº Sérgio Britto Garcia** pela parceria, iniciativa e orientação.

Ao **Serviço de Patologia Clínica do HCFMRP-USP**, pelo apoio na realização deste projeto e disponibilidade do material.

Ao **Laboratório do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP-USP**, em especial à **Deisy Mara da Silva**, pela parceria na realização dos resultados do trabalho, eficiência e disposição para ajudar sempre e à **Rosângela Orlandim Lopes** pela força e empenho em me auxiliar no mundo das técnicas de TMA e imunohistoquímica.

À **Divisão de Coloproctologia do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP**, pela parceria clínico-cirúrgica e científica no tratamento dos pacientes com câncer cólon-retal.

À **Juliana Zanetti**, pelos seus ensinamentos, paciência e colaboração que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À **Leida Mara de Lima Almeida** (Secretária do Serviço de Oncologia Clínica do HCFMRP-USP) pela sua simpatia, profissionalismo e disposição para ajudar sempre.

Ao **Émerson Quirino de Oliveira** (Secretário de Pós-Graduação do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP) pela ajuda, lembretes e orientações durante este período da Pós-graduação.

*À **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo** por oferecer-me toda a estrutura e condições para a realização deste estudo.*

*E a **todos** que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*À **Prof^a. Dr^a. Fernanda Maris Peria**, pela confiança, entusiasmo e incentivo durante todo o processo de elaboração deste projeto, condução e orientação; pela presença sempre constante em todas as fases deste projeto colaborando sempre de forma firme e eficaz para a conclusão do mesmo. Fica aqui o meu eterno agradecimento por ter aprendido muito com você e minha grande admiração.*

*Ao **Prof^o Dr^o Alfredo Ribeiro Silva**, pela parceria neste projeto, dedicação, competência e orientação, por proporcionar a realização das análises laboratoriais sempre de forma atenciosa e amigável. Sua parceria foi imprescindível, sem isso esse trabalho não teria sido possível.*

RESUMO

RIBEIRO, KB. **Estudo da associação entre o gene KRAS e células tronco tumorais com características clínico-patológicas e sobrevida no câncer de cólon metastático.** 2013. 99f. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

INTRODUÇÃO: Os múltiplos passos da carcinogênese do câncer de cólon envolvem a existência de subpopulações de células tronco tumorais (CSC), responsáveis pela transformação, crescimento e proliferação das células tumorais. As proteínas CD44 e CD166 são marcadores de CSC associados a sinalização celular, adesão, migração, metástase e resposta linfocitária. Alguns fatores podem modular a expressão CSC como a mutação KRAS. **OBJETIVO:** correlacionar a expressão dos marcadores CD44 e CD166 em carcinoma de cólon metastático e status do oncogene KRAS (selvagem/mutado) com as características clínico-patológicas e desfecho do paciente ao final do seguimento. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram coletadas 58 amostras de tecido tumoral de pacientes com neoplasia de cólon metastático, tratados com CapeOx no Serviço de Oncologia Clínica do HCFMRP-USP de 2003 a 2012. Foram coletadas informações do prontuário sobre status do gene KRAS, características clínico-patológicas e desfecho clínico, sendo também realizada imunohistoquímica para marcação CD44 e CD166 através da técnica de TMA. Utilizado software SPSS 17 para análise estatística e considerado valor de $p < 0,050$ para significância dos dados. **RESULTADOS:** A expressão de CD44 e CD166 foi positiva em 41,4% e 43%, respectivamente, e o status KRAS mutado em 48,3%. No subgrupo KAs selvagem e nos idosos (>65 anos), houve associação entre CD44 e CD166, $p=0,042$ e $p=0,001$, respectivamente. Pacientes CD166 negativo tiveram 3 vezes mais chances de progressão de doença ($p=0,02$) do que CD166 positivo. Pacientes Kras mutado e CD166 negativo tiveram 8 vezes risco de progressão ($p < 0,01$). Pacientes CD44 positivo tiveram 4 e 5 vezes mais chances de evoluir com metástases hepática e pulmonar ($p < 0,01$) em relação aos CD44 negativo. Pacientes com a combinação KRAS mutado e CD44 positivo tiveram 7 vezes mais chance de evoluir com metástase pulmonar ($p=0,02$) em relação a pacientes KRAS selvagem e CD44 negativo. **DISCUSSÃO:** Na amostra estudada observamos a influência das expressões dos marcadores de CSC e suas combinações com o status de mutação do gene KRAS, de modo que pacientes com CD166 negativo no tumor primário apresentam um desfecho de maior recorrência e o CD44 positivo favorece a evolução para metástases pulmonar e hepática. A mutação do gene KRAS atua modulando a via do EGF influenciando o comportamento biológico do tumor e os desfechos (recidiva e metástases) diretamente relacionados com a expressão dos marcadores de CSC no cancer de colon metastático. **CONCLUSÃO:** Este estudo demonstrou interação entre a expressão imuno-histoquímica dos marcadores CSC de cólon (CD166 e CD44) e o status KRAS, podendo caracterizar subgrupos de pacientes com maiores chances de evolução desfavorável e assim propor um modelo de tratamento e seguimento mais individualizado.

Palavras-chave: 1. Câncer de cólon. 2. Células tronco tumorais. 3. Oncogene KRAS. 4. Sobrevida. 5. Características clinico-patológicas

ABSTRACT

RIBEIRO, KB. **Association between KRAS gene and cancer stem cells with clinicopathologic features and survival in metastatic colon cancer..** In 2013. 99f. Master's Dissertation-Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

BACKGROUND: Colon cancer carcinogenesis has been recently correlated with specific cancer stem cell (CSC) subpopulations which are associated with transformation, growth and spread process of tumor cells. CD44 and CD166 are CSC markers correlated with cell signalization, adhesion, migration, metastasis, and lymphocyte response. Some factors as KRAS mutation could modulate CSC. **OBJECTIVE:** Analyze CD44 and CD166 expressions in metastatic colon carcinoma and its correlation with KRAS status, clinicopathological features, disease recurrence and patient survival. **MATERIAL AND METHODS:** Tissues were obtained from 58 patients with confirmed metastatic colon cancer, treated with CapeOx at FMRP-USP from 2003 to 2012. Clinical and outcomes informations and KRAS gene status were obtained from medical records. KRAS status was analyzed with RT-PCR. CD44 and CD166 were analyzed with TMA immunohistochemistry. Statistical analyses were performed using SPSS 17.0. A p-value $<0,050$ was considered to be statistically significant. **RESULTS:** CD44 and CD166 expressions were positive in 41,4% and 43%, respectively, and KRAS status was mutate in 48,3%. Wild-type KRAS in elderly patients had statistical association between CD44 and CD166, $p=0,042$ and $p=0,001$, respectively. Patients with CD166 negative had 3 fold increase in progression disease ($p<0,01$). Patients with CD44 positive had 4 and 5 fold increase in liver and lung metastasis ($p<0,01$), respectively. Patients with combined mutated KRAS and CD44 positive had 7 fold increase in lung metastasis ($p=0,02$) compared with wild-type KRAS and CD44 negative. **DISCUSSION:** In this study, the influence of markers expression of colon CSC (CD44 and CD166) and its combinations with status KRAS were proven. Patients with CD166 negative in primary colon tumor are more likely to present higher recurrence and, CD44 positive have a higher chance to develop lung and liver metastasis. KRAS mutation contributed, associated with studied CSC expressions, to cancer biological behavior and agressivness. **CONCLUSIONS:** This study demonstrated interaction between imunohistochemical expression of colonic CSC markers (CD166 and CD44) and KRAS gene status. Subgroups of patients with worse outcomes could be identified and this biological information contributed to personalized treatments and follow ups that should be proposed for these patients.

Key Words: 1.Colon cancer. 2. Cancer stem cells. 3. KRAS Oncogen. 4. Survival. 5. Clinical-Pathological features.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Curva de sobrevida Global Kaplan-Meier para a amostra geral de pacientes	73
GRÁFICO 2 - Curva de sobrevida Livre de Progressão Kaplan-Meier para a amostra geral de pacientes	73
GRÁFICO 3 - Curva de sobrevida Global Kaplan-Meier de acordo com a expressão imunohistoquímica de CD166 (negativo <i>versus</i> positivo)	74
GRÁFICO 4 - Curva de Sobrevida Livre de Progressão Kaplan-Meier de acordo com a expressão imunohistoquímica de CD166 (negativo <i>versus</i> positivo)	75
GRÁFICO 5 - Curva de Sobrevida Global Kaplan-Meier de acordo com a expressão imunohistoquímica de CD44 (negativo <i>versus</i> positivo)	76
GRÁFICO 6 - Curva de Sobrevida Livre de Progressão Kaplan-Meier de acordo com a expressão imunohistoquímica de CD44 (negativo <i>versus</i> positivo)	76
GRÁFICO 7 - Curva de sobrevida Global Kaplan-Meier de acordo com o status KRAS (selvagem <i>versus</i> mutado)	77
GRÁFICO 8 - Curva de sobrevida Livre de Progressão Kaplan-Meier de acordo com o status KRAS (selvagem <i>versus</i> mutado)	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Fonte e diluição dos anticorpos primários utilizados	44
TABELA 2 - Distribuição das características clínicas dos pacientes	53
TABELA 3 - Distribuição das características histopatológicas dos tumores	54
TABELA 4 - Análise de associação entre as características clínicas, histopatológicas e do status KRAS com a expressão imunohistoquímica do CD44	55
TABELA 5 - Análise de associação entre as características clínicas, histopatológicas e do status KRAS com a expressão imunohistoquímica do CD166	56
TABELA 6 - Análise de associação entre as características clínicas, histopatológicas e da expressão imunohistoquímica do CD44 e do CD166 com o status KRAS	56
TABELA 7 - Análise de associação entre a expressão imuno-histoquímica de CD44 e CD166 e o status KRAS. Legenda: IMH: imuno-histoquímica	57
TABELA 8 - Análise de associação entre expressão imuno-histoquímica de CD44 e CD166 e o status KRAS dentro dos grupos idosos, não idosos e sexo masculino e a razão de chances entre o tipo de expressão (positivo ou negativo) de CD44 e CD166 para as características imuno-histoquímicas e status KRAS	58
TABELA 9 - Análise de regressão multivariada segundo modelo de riscos proporcionais de Cox para o risco de óbito segundo as características analisadas	60
TABELA 10 - Análise de regressão multivariada segundo modelo de riscos proporcionais de Cox para o risco de progressão de doença tumoral segundo as características analisadas	61
TABELA 11 - Análise de regressão segundo modelo de riscos proporcionais de Cox por grupos e subgrupos de CD44 e KRAS para o risco de progressão de doença tumoral	62
TABELA 12 - Análise de regressão segundo modelo de riscos proporcionais de Cox por grupos e subgrupos de CD166 e KRAS para o	63

risco de progressão de doença tumoral

TABELA 13 - Análise de regressão segundo modelo de riscos proporcionais de Cox por grupos e subgrupos de CD44 e KRAS para o risco de apresentar metástase hepática 64

TABELA 14 - Análise de regressão segundo modelo de riscos proporcionais de Cox por grupos e subgrupos de CD166 e KRAS para o risco de apresentar metástase hepática 66

TABELA 15 - Análise de regressão segundo modelo de riscos proporcionais de Cox por grupos e subgrupos de CD44 e KRAS para o risco de apresentar metástase pulmonar 67

TABELA 16 - Análise de regressão segundo modelo de riscos proporcionais de Cox por grupos e subgrupos de CD166 e KRAS para o risco de apresentar metástase pulmonar 69

TABELA 17 - Análise de regressão segundo modelo de riscos proporcionais de Cox por grupos e subgrupos de CD44 e KRAS para o risco de envolvimento linfonodal por células neoplásicas 70

TABELA 18 - Análise de regressão segundo modelo de riscos proporcionais de Cox por grupos e subgrupos de CD166 e KRAS para o risco de envolvimento linfonodal por células neoplásicas 72

TABELA 19 - Dados de Sobrevida Global em média para os grupos de pacientes de acordo com a expressão imunohistoquímica (positivo versus negativo) de CD44 e CD166 e de acordo com o status KRAS (selvagem versus mutado) 78

TABELA 20 - Dados de Sobrevida Livre de Progressão em média para os grupos de pacientes de acordo com a expressão imunohistoquímica (positivo versus negativo) de CD44 e CD166 e de acordo com o status KRAS (selvagem versus mutado) 79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Sequência de mutações gênicas envolvidas na carcinogênese do adenoma-carcinoma dos tumores cólon-retais	21
Figura 2 - Diferentes efeitos da expressão das três isoformas Ras (Hras, Nras e KRAS) ativadas nas células tronco/progenitoras endodermas e suas consequências para a oncogênese	30
Figura 3 - Diferentes efeitos da expressão das três isoformas Ras (Hras, Nras e kras) ativadas nas células tronco/progenitoras endodermas e suas consequências para a oncogênese	33
Figura 4 - Terapia convencional (quimioterapia e radioterapia) e terapia alvo contra as células tronco tumorais	35
Figura 5 - Células neoplásicas de cólon mostrando imunorreatividade negativa para CD166 (Imunohistoquímica, padrão citoplasma e membrana, 400x)	49
Figura 6 - Células neoplásicas de cólon mostrando imunorreatividade positiva para CD166 (Imunohistoquímica, padrão citoplasma e membrana, 400x)	49
Figura 7 - Células neoplásicas de cólon mostrando imunorreatividade negativa para CD44 (Imunohistoquímica, padrão citoplasma e membrana, 400x)	49
Figura 8 - Células neoplásicas de cólon mostrando imunorreatividade positiva para CD44 (Imunohistoquímica, padrão citoplasma e membrana, 400x)	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracila
ABCB1-MDR1C	<i>Cassette sub-family B member 1 Multi drug resistance</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT	<i>Protein Kinase B</i>
ALCAM	Molécula de adesão celular ativadora de leucócito
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
CapeOx	Esquema quimioterápico de capecitabina + oxaliplatina
CCR	Câncer de Cólon e Reto
CSC	<i>Cancer stem cell</i> – células tronco tumorais
DAB	Diaminobenzidina
DCC	<i>Deleted in Colorectal Cancer gene</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EC	Estadio Clínico
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
GTP	guanidina tri-fosfato
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina e eosina
HR	<i>Hazard Ratio</i>
Hras	v-HA-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog

IgG1	<i>Immunoglobulin G</i>
Ki67	<i>Antigen KI-67</i>
KRAS	<i>v-Kiras2 Kiersten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog</i>
LV	<i>Leucovorin</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NF-KB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
Nras	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
OMS	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCNA	<i>Antígeno nuclear de proliferação celular</i>
PET	<i>Positron emission tomography</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositide 3-kinases</i>
RASCAL	<i>The Kirsten ras in-colorectal-cancer collaborative group</i>
RT-PCR	<i>Real Time- polymerase chain reaction</i>
SOX2	<i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i>
Src	<i>V-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCLE	<i>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</i>
TMA	<i>Tissue Microarray – Microarranjos teciduais</i>
TNM	<i>Classification of Malignant Tumours</i>
UFT	<i>Tegafur-Uracil</i>
USP	<i>Universidade de São Paulo</i>
UICC	<i>União Internacional Contra o Câncer</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Epidemiologia do câncer cólon-retal.....	19
1.2 Carcinogênese do câncer cólon-retal.....	20
1.3 Fatores de risco, estadiamento e fatores prognósticos do câncer de cólon.....	22
1.4 Tratamento do câncer de cólon.....	23
1.5 Oncogene KRAS no câncer cólon-retal.....	25
1.6 Células tronco tumorais e a via de sinalização do EGF.....	29
1.7 CD166.....	36
1.8 CD44.....	38
1.9 Associação CD44 e CD166.....	40
 2 OBJETIVOS.....	 42
 3 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS.....	 43
3.1 Pacientes.....	43
3.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	44
3.2.1 Critérios de inclusão dos paciente na pesquisa.....	44
3.2.2 Critérios de exclusão dos pacientes na pesquisa.....	44
3.3 Materiais.....	45
3.4 Métodos.....	45
3.4.1 Método de confecção do Tissue Micro-Array (TMA) – Microarranjos teciduais.....	46
3.4.2 Método imunohistoquímico.....	47
3.4.3 Análise e interpretação da marcação imunohistoquímica dos anticorpos utilizados.....	49
3.4.4. Análise estatística.....	51
 4 RESULTADOS.....	 53

4.1 Análise descritiva dos dados.....	53
4.2 Análise de associação entre as características clínicas, imunohistoquímica e do status KRAS.....	55
4.3 Análise de regressão multivariada segundo modelo de riscos proporcionais de Cox.....	60
4.3.1 Análise de regressão para o risco de óbito.....	60
4.3.2 Análise de regressão para o risco de recorrência/progressão de doença tumoral.....	61
4.3.3 Análise de regressão para o risco de apresentar metástase hepática.....	65
4.3.4 Análise de regressão para o risco de apresentar metástase pulmonar.....	68
4.3.5 Análise de regressão para o risco de comprometimento linfonodal.....	71
4.4 Análise de Sobrevida pelo método não-paramétrico de Kaplan- Meier.....	74
4.4.1 Para a amostra geral.....	74
4.4.2 Para CD166.....	75
4.4.3 Para CD44.....	77
4.4.4 Para KRAS.....	78
5 DISCUSSÃO.....	81
6 CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
ANEXO A.....	97
ANEXO B.....	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer cólon-retal

O câncer é um importante problema de saúde pública mundial representando aproximadamente 12% de todas as causas de morte no mundo, sendo o câncer cólon-retal (CCR) o terceiro mais incidente em mulheres e o quarto em homens, causando cerca de 610.000 mortes por ano mundialmente. O câncer cólon-retal é a causa mais comum de mortes por doença maligna no mundo ocidental sendo que o adenocarcinoma cólon-retal representa mais de 90% dos tumores malignos que acometem o intestino grosso (1).

A Sociedade Americana de Câncer reportou cerca de 101.340 novos casos de câncer de cólon e 49.380 mortes em 2011 nos Estados Unidos, o que corresponde a quase 10% da mortalidade por câncer nos EUA, sendo a principal causa de morte a presença de metástases hepáticas. A sobrevida média global em cinco anos é em torno de 55% nos países desenvolvidos e 40% para países em desenvolvimento; e pouco se alterou nos últimos 40 anos, apesar da melhoria nas práticas médicas e cirúrgicas (2).

Algumas das explicações para a problemática crescente do câncer devem-se ao fato de ser uma doença cuja idade média está acima de 60 anos de idade; o envelhecimento populacional global e um melhor controle das doenças infectocontagiosas nos países menos desenvolvidos. As taxas de incidência em países de baixa e média renda também contribuem significativamente para este aumento. Por extrapolação destes dados, considerando as mudanças demográficas, estima-se um progressivo aumento da incidência de câncer de 1% ao ano. Estas estimativas, transpostas para o ano de 2030, estima-se que ocorram aproximadamente 26,4 milhões casos novos e 17 milhões de mortes devido ao câncer por ano (3).

O número de casos novos de câncer de cólon-retal estimado para o Brasil no ano de 2012 foi de 14.180 casos em homens e de 15.960 em mulheres (1). No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 são válidas também para o ano de 2013 e

apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Excluindo os casos de câncer de pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos no Brasil. Os tumores mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon-retos e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon-retos e glândula tireoide para o sexo feminino. São esperados um total de 257.870 casos novos de câncer para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. Confirma-se a estimativa que o câncer da pele não melanoma (134 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon-retos (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) no ano de 2012 (1).

1.2 Carcinogênese do câncer cólon-retal

As bases genéticas e moleculares do CCR exemplificam como o acúmulo das mutações gênicas ordenadas progride com a evolução de uma lesão pré-maligna (pólipo adenomatoso benigno) para o estágio de doença invasiva propriamente dita. O desenvolvimento do CCR é precedido por uma série de alterações genéticas que envolvem ativação de oncogenes, e perda da funcionalidade de genes supressores de tumores, envolvidos em funções do metabolismo, proliferação, diferenciação, morte e mecanismos de reparação de danos celulares (2).

Fearon e Vogelstein propuseram um modelo de carcinogênese em múltiplos passos denominado “Sequência Adenoma-Carcinoma” (4). Esse modelo propõe que as mutações nos genes supressores de tumor e oncogenes promovem o surgimento e o desenvolvimento do CCR através de uma sequência de eventos (mutação no gene APC, hipometilação, mutação no gene KRAS, mutação do gene DCC e mutação do gene TP53). Segundo esse modelo, a primeira alteração, na maioria dos casos, é a inativação do gene APC, levando à introdução de um códon de parada na tradução proteica, o que resulta em uma proteína APC truncada, ou à perda de um alelo. A proteína APC funciona como regulador da proteína β -catenina na via canônica de sinalização Wnt. As alterações no gene APC são detectadas em

aproximadamente 75% dos casos de CCR esporádico, levando a um crescimento celular anormal, promovendo a formação de um epitélio hiperproliferativo (5) (Figura 1).

Figura 1 - Sequência de mutações gênicas envolvidas na carcinogênese do adenoma-carcinoma dos tumores cólon-retais. Fonte: N Engl J Med 2009. Molecular basis of colorectal cancer.

Porém, essa mutação sozinha não é suficiente para permitir a progressão dos adenomas para um câncer invasivo. É necessário que ocorram mutações em outros genes. Outras mutações somáticas como a mutação do KRAS e do p53 colaboram com a inativação do APC para promover a progressão de uma lesão adenomatosa para o câncer de cólon (5). A maioria dos casos de CCR é considerada de aparecimento esporádico, sendo 10% apenas associados à hereditariedade e 20% enquadra-se em alguma síndrome familiar (6). Entretanto, a origem precisa da célula que dá origem ao câncer de cólon-retal permanece ainda desconhecida. Aventam-se possibilidades da origem do câncer cólon-retal a partir de evidências da presença de células tronco-tumorais (CSC) em várias neoplasias malignas epiteliais, incluindo os tumores cólon-retais (7).

1.3 Fatores de risco, estadiamento e fatores prognósticos do câncer de cólon

Para avaliar o prognóstico do câncer de cólon e o tempo estimado de sobrevida desses pacientes, existem critérios bem estabelecidos que envolvem o estadiamento clínico e patológico do tumor (AJCC/UICC), características histológicas e marcadores moleculares. O estadiamento patológico inclui a análise do tamanho tumoral em profundidade de acometimento das camadas do órgão (da submucosa à serosa e órgãos adjacentes), o número de linfonodos comprometidos (quanto maior a quantidade, pior o prognóstico – relação numérica proporcional) e a presença ou não de metástases (linfonodos não regionais, órgãos à distância e peritônio comprometidos por células neoplásicas (8).

Dessa forma, os pacientes são estratificados em estadio clínico/patológico em escala de I a IV, com diferentes curvas de sobrevida para cada um deles. Pacientes com estágio I apresentam sobrevida mediana em 05 anos aproximada de 97%, com gradual redução das taxas de sobrevida à medida que se tem uma progressão do estadiamento de modo que pacientes com estágio IV possuem uma sobrevida mediana em 05 anos de 8% (8). Cerca de 25% dos pacientes apresentam EC II ao diagnóstico (7).

Dentre as características histológicas são consideradas importantes fatores prognósticos: o tipo histológico (mucinosos, adenocarcinomas puros, componente neuroendócrino, células em anel de sinete, medular); grau de diferenciação histológica (quanto maior a diferenciação celular mais semelhante é a célula neoplásica da célula que originou o tumor e menos agressiva é o seu comportamento); presença de infiltração perineural e linfovascular; infiltrado linfocítico peritumoral sinal de reação imune do hospedeiro ao tumor) e índice de proliferação celular, representado pelos índices de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e de Ki67 (2,9,10). Tumores obstrutivos e perfurativos levam a uma sobrevida menor pela gravidade do quadro de uma perfuração e obstrução intestinal (2).

Algumas alterações gênicas tumorais geram diferentes fenótipos de doença que implicam diferentes curvas de sobrevida aos pacientes, por exemplo, a presença de instabilidade de microssatélites (defeitos nas vias de reparo do DNA), perda de

heterozigossidade, ampliações gênicas, translocações cromossômicas, perda dos alelos 18q (mutações gênicas envolvendo DCC, Smad2, Smad4), e alterações na expressão de proteínas oncogênicas e de produtos gênicos supressores de tumores como p53 e p21, RAS e BRAF (9,10).

Após análise desses fatores prognósticos, indica-se terapia complementar adjuvante nos tumores para estágio II de alto risco e estágio III e terapia paliativa para tumores em estágio IV como o objetivo de diminuir o risco de recorrência e aumentar a sobrevida dos pacientes. A cirurgia do tumor primário e a linfadenectomia são de extrema importância no tratamento do CCR, contribuindo para o estadiamento e para evitar complicações obstrutivas pelo tumor, perfuração e sangramentos. Além da abordagem cirúrgica do tumor primário, há benefício de ressecção de metástases, sobretudo as hepáticas, pois contribui para o aumento da sobrevida dos pacientes (11,12).

1.4 Tratamento do câncer de cólon

Mais de 50% dos pacientes com ECIII irão desenvolver recorrência local e metástases e cerca de 30% dos pacientes em qualquer estágio irão desenvolver metástases. A taxa de falha no cenário de terapia adjuvante é cerca de 30% para os pacientes em ECII de alto risco e ECIII (7).

O tratamento sistêmico da doença avançada evoluiu muito nos últimos anos, mas mesmo assim, a taxa de resposta global é de aproximadamente 60% no ECIV (7). O 5FU (5-fluoruracila) foi durante vários anos a principal medicação disponível, utilizado em diversos esquemas associado ou não a outras drogas promovendo uma sobrevida média de 12 meses. A incorporação do irinotecano (campotensina semissintética) e da oxaliplatina (classe das melhoraram os resultados até então obtidos quanto à sobrevida global (15 a 17 meses em média), palição de sintomas e qualidade de vida (2,12).

Não são observadas reações cruzadas entre a oxaliplatina e o irinotecano, aumentando, com isto, a média de sobrevida com a exposição sequencial aos diferentes agentes, para aproximadamente 18 a 24 meses. Outras medicações incorporadas ao tratamento do câncer cólon-retal são as fluoropirimidinas orais

(antimetabólicos), como a capecitabina e o tegafuor/uracila (UFT), que possuem a vantagem da comodidade posológica por ser de administração oral. Apresentam resultados semelhantes aos esquemas que utilizam a droga 5FU de forma infusional (2,12).

O desenvolvimento de terapias biológicas, as chamadas “*driven target therapy*”, associadas à quimioterapia, têm mostrado ser uma alternativa promissora, aumentando as taxas de respostas e o tempo médio de sobrevida. Dentre essas novas terapias, destacam-se o cetuximabe (um anticorpo monoclonal IgG1, quimérico humano-camundongo); o panitumumabe (anticorpo monoclonal totalmente humanizado), ambos com alvo no receptor de fator de crescimento de epidérmico (EGFR), frequentemente hiperexpresso no câncer de cólon-retal. Também o bevacizumabe e o aflibercept, ambos anticorpos anti-VEGF (fator de crescimento endotelial vascular circulante) e o regorafenib, um inibidor multikinase, recentemente aprovado pelo FDA para paciente poli-tratados (11,13,14).

Essas medicações têm demonstrado sinergismo com as drogas quimioterápicas citotóxicas usuais, promovendo taxas de resposta ainda maiores e aumento na sobrevida de pacientes portadores de algumas características genéticas específicas expressas pelo tecido tumoral. Como exemplo, pode-se citar pacientes que não expressam a mutação do oncogene KRAS (denominado KRAS selvagem) no tecido tumoral analisado apresentam uma grande chance de resposta à terapia usando drogas contra o EGFR (9,12,13,15,16,17). Todas estas terapias, apesar do acréscimo em sobrevida, apresentam toxicidades inerentes e importantes. Sendo assim, é importante e necessário identificar e estabelecer critérios clínicos e moleculares cada vez mais precisos e confiáveis para determinarmos subgrupos de pacientes que realmente irão se beneficiar dessas terapêuticas combinadas.

Os avanços tecnológicos para promover um maior conhecimento da biologia molecular do CCR têm contribuído para uma maior compreensão dos mecanismos carcinogênicos nas síndromes hereditárias CCR e no CCR esporádico. A elucidação destes mecanismos moleculares tem redefinido os fatores de risco para as recomendações clínicas de rastreamento desses tumores em populações de risco e também contribuído para o entendimento das bases da carcinogênese do CCR auxiliando o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas mais específicas e eficazes contra essa doença.

1.5 Oncogene KRAS no câncer cólon-retal

Mutações no oncogene KRAS ocorrem em 50% dos adenomas de cólon maiores que 1,0 cm e em apenas 9% dos adenomas menores que isso. A mutação KRAS é encontrada em cerca de 40% dos tumores CCR (2,10,15,16).

Uma vez ocorrida a mutação KRAS, inicia-se um processo de sinalização intracelular promovendo a proliferação celular e a continuidade no processo de carcinogênese (2,4,10,18,19). Estudos prévios demonstram diferentes efeitos fenotípicos das mutações do gene KRAS, sendo alguns reportando não haver efeito algum sobre as células epiteliais colônicas e outros reportando um aumento da expressão no número de células de Globet, redução do número de células de Paneth (células guardiãs das células tronco) nas criptas de Lieberkühn, hiperplasia epitelial e mudanças na arquitetura epitelial (4,13,15,19).

A família ras é composta por 3 genes localizados no cromossomo 12: KRAS (v-Kiras2 Kiersten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog), Hras (v-HA-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog) e Nras (neuroblastoma RAS viral oncogene homolog), que codificam pequenas proteínas (21kDa) que se ligam a GTP (guanidina tri-fosfato). As proteínas ras, também chamadas de p21, são produtos da expressão gênica desses três genes mencionados e estão localizadas na membrana celular. Estão envolvidas no processo de transdução de sinais a partir de receptores tirosina-quinase, como o EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), para o citoplasma da célula desencadeando uma cascata de sinalização intracelular envolvida em várias funções celulares (20).

A mutação somática do gene KRAS mais frequente acontece nos códons 12 (80%) e 13 (17%). Já as mutações em outras posições, como nos códons 61 e 146, têm sido encontradas em menor frequência (1 a 4%) e sua relevância clínica é incerta (21). Cada uma das três isoformas da proteína ras mutada, (KRAS, Hras e Nras), podem exercer uma atividade oncogênica diferente e ativar alelos em uma grande variedade de tumores no ser humano. A isoforma KRAS mutada é a isoforma mais frequentemente encontrada nos cânceres malignos e a mais frequentemente detectada em tecidos derivados do endoderma, incluindo pâncreas, pulmão e cólon (20).

Mutações KRAS são detectadas com grande frequência em tumores de pâncreas (85%), pulmão (35%) e (30 a 40%). Esses tecidos são complexos e compostos por diferentes tipos celulares que contribuem para diferentes funções especializadas. Esses tecidos compartilham uma característica ancestral comum: todos são derivados de uma mesma camada de células germinativas primárias – o endoderma. Essa característica nos leva a considerar a possibilidade de que a ativação do KRAS possa exercer sua atividade oncogênica ao nível de células progenitoras ou de células tronco (20).

Há diferenças na expressão das várias isoformas ras em tecidos tumorais específicos. Todas as três isoformas estão expressas amplamente em todas as células, porém nem todas as células respondem de forma semelhante à ativação ras-GTPase. Por exemplo, a ativação do Ras pode promover proliferação e sobrevivência em tipos celulares sensíveis à transformação, enquanto que em outros tipos celulares resistentes à transformação pode induzir à diferenciação, senescência e apoptose. O efeito das isoformas ras em outras células progenitoras, como o PCC4, que dão origem a células mesenquimais e não endodermis não produzem nenhum efeito fenotípico (20).

As formas ativas mutadas das três isoformas ras são capazes de promover a transformação oncogênica de fibroblastos NIH3T3. O Hras é considerado o oncogene ras mais potente devido sua surpreendente atividade sobre as células NIH3T3, sendo por isso, dentre as três isoformas, a mais estudada (20).

As três isoformas ras são estruturalmente semelhantes, exceto pela região carbono-terminal (C-terminal), cuja variabilidade determina modificações pós-translacionais através de lipídeos da membrana celular e em diferentes compartimentos subcelulares, promovendo diferentes funções biológicas e efeitos de interação com componentes das vias de sinalização celulares e seus efetores. Por exemplo, a diferenciação mediada pelo Hras requer a localização no complexo de Golge. O Kras4A e Kras4B, duas isoformas splice do KRAS, são idênticas, exceto pela sua extremidade C-terminal, que se diferem funcionalmente, sendo a primeira induzindo a apoptose enquanto a última promove a expansão das células tronco. Também não podemos excluir a possibilidade de existirem ligantes específicos, ainda não identificados, que se associam às distintas regiões C-terminal das proteínas ras contribuindo para a produção de fenótipos diferenciados produzidos por essas isoformas proteicas (20).

A proteína ras ocupa posição chave na via de ativação do EGFR, funcionando como interruptor da ativação entre a conexão do receptor de tirosina kinase e a cascata de eventos subsequentes (16). As proteínas ras interagem com um grande número de efetores para gerar sinais celulares com diferentes funções, entre elas as de proliferação, diferenciação, senescência e transformação celular. Entre os principais efetores ligados à função oncogênica ras são o Raf, PI3K e as proteínas RalGDS (20).

As proteínas ras são ativadas pela ligação GTP e desativadas pela ação de duas enzimas GTPases (ras-GAP-P120 e neurofibromina). Os oncogenes RAS são ativados por mutações pontuais que inibem a ação destas GTPases. Cerca de 43% dos casos de CCR esporádico apresentam mutações no gene KRAS e alterações neste gene estão associadas com o aumento da expressão da DNA metiltransferase, da ciclina D1 e da gastrina, consideradas proteínas de grande importância para a tumorigênese. A mutação do gene KRAS mais frequente ocorre nos códons 12 (80%) e 13 (17%), sendo do tipo *missense* (troca pontual de uma base nitrogenada por outra) codificando um aminoácido diferente e levando à formação de uma proteína funcional ou não. A proteína ras mutada provoca contínua ativação da via de sinalização do EGFR na ausência de estímulo externo ao seu receptor, estimulando a proliferação celular, diferenciação, senescência e transformação celular (21,22).

Aproximadamente, 30% de todos os tumores no homem apresentam a mutação nos genes Ras, além de várias outras mutações em vias relacionadas ao Ras. A ativação de várias isoformas pode promover a formação de fenótipos distintos, a depender do tipo celular no qual essas isoformas estão sendo expressas. Parece não haver nenhuma correlação dessas isoformas com o perfil de expressão ou com o perfil de moléculas efetoras com os quais há interação. É possível que cada isoforma se encarregue diferentemente de vários efetores reguladores resultando em diferentes intensidades e duração de sinais, promovendo diferentes desfechos consequentemente. Dependendo do contexto celular, os próprios efetores Ras podem exibir aparentemente efeitos opostos. Por exemplo, a inibição do PI3K, no contexto do Hras V12 previne a sua indução à diferenciação, mas a inibição do PI3K no contexto do KrasV12 inibe sua habilidade de manter as propriedades de célula-tronco na presença do ácido retinóico (20).

Dependendo da isoforma Ras ativada, haverá inibição do PI3K que poderá resultar tanto em autorrenovação das células-tronco ou diferenciação celular. A atividade da PI3K medeia a expressão da Oct3/4 cuja expressão é necessária para a autorrenovação das células tronco. Se a isoforma KRAS estiver ativada, a inibição do PI3K pode reprimir a expressão da Oct3/4, bloqueando essa autorrenovação ou se a isoforma Hras estiver ativada haverá manutenção da expressão da Oct3/4 prevenindo a diferenciação celular (20).

Há um grande interesse por parte dos pesquisadores em conhecer melhor a biologia do câncer e essas proteínas, devido à alta frequência de mutação de genes que codificam essas proteínas e suas implicações terapêuticas.

Diversos estudos clínicos comprovaram que a presença da mutação do KRAS é um fator preditivo de resistência ao uso dos anticorpos monoclonais anti-EGFR,. Também tem sido associada a uma menor sobrevida livre de progressão e sobrevida global (15,16,17). Todavia, apenas uma fração dos pacientes com ausência desta mutação (KRAS selvagem) e um subgrupo de pacientes que possuem uma mutação específica no códon 13 no gene KRAS (substituição da glicina pela asparagina), apresentam resposta clínica ao uso destas terapias alvo-EGFR. Isso demonstra serem necessários mais estudos para um melhor entendimento destas vias (21).

No estudo RASCAL, observou-se que somente uma mutação específica no códon 12 do gene KRAS, (substituição da glicina pela valina), encontrada apenas em 9% dos tumores cólon-retais, está associada a um desfecho adverso. Isso demonstra que diferentes mutações distribuídas nos códons 12 e 13 no oncogene KRAS podem levar a diferentes desfechos durante a evolução clínica dos pacientes, sugerindo que a tumorigênese possa percorrer vias diferentes a depender das mutações gênicas presentes (15).

A despeito dos avanços recentes na medicina para o tratamento do câncer de cólon, cerca de 50% desses pacientes apresentarão recorrência da doença. A razão para isso ainda não é totalmente conhecida, mas se sabe que a presença de células tronco tumorais resistentes a quimioterapia é uma das explicações para a recorrência dos tumores (5).

1.6 Células tronco tumorais e a via de sinalização do EGF

As células tronco do adulto são células indiferenciadas presentes conjuntamente com as células diferenciadas que compõem os tecidos e órgãos. Possuem a função de manter e reparar os tecidos. Sua origem ainda é tema de grandes debates: se originaram das células remanescentes embrionárias que não se diferenciaram ou de um conjunto de células diferenciadas que, após a formação do tecido, desdiferenciaram-se. As células tronco adultas do cólon possuem o papel de promover a renovação das células do epitélio colônico sadio. Há evidências que existam também células tronco tumorais responsáveis pela inicialização da carcinogênese, metástases e resistência ao tratamento, levando a progressão da doença tumoral (7).

Já é bem estabelecido o conceito de heterogeneidade tumoral. Sabe-se que dentro de uma população de células, existem subgrupos de células com características gênicas diferentes, que expressam funções celulares diferentes e, por conseguinte, expressões fenotípicas diferentes. Todas as células tumorais compõem uma mistura de células proliferativas e células-tronco (menos de 1% das células tumorais), formando nichos celulares com funções especializadas, capazes de interagir com o hospedeiro, determinando um comportamento biológico diferente para cada indivíduo (23,24).

Recentemente, a identificação de células-tronco tumorais tem recebido atenção especial em pesquisas clínicas por ser um potencial alvo-terapêutico, através do bloqueio de cascatas envolvidas na ativação das células tronco tumorais: vias hedgehog, Wnt/B-catenina, Notch, EGFR, AKT, MAPK, Myc, Src, NF-KB, survivina, e mTOR. Atuam também sobre as proteínas (ABCB1-MDR1) envolvidas no efluxo de agentes quimioterápicos de dentro das células. Estudos têm desenvolvido terapias com proteínas indutoras da diferenciação das células tronco tumorais anticorpos monoclonais contra receptores alvo expressos da superfície da CSC (25).

Ao contrário do modelo estocástico convencional (onde um único clone celular sofre mutações aleatórias transformando-se em células tumorais), um novo modelo conceitual indica que apenas uma pequena subpopulação de células tronco tumorais

possam deter esta capacidade de iniciar e sustentar o crescimento celular. Neste modelo, estas células tronco tumorais promovem a proliferação celular, a autorrenovação e diferenciação celular e ainda se mantêm em estado de quiescência, enquanto que grande parte das células tumorais dentro da massa tumoral não possuem essas capacidades (7).

Muitos investigadores têm utilizado marcadores de membrana e de citoplasma para identificar e isolar um conjunto de células tronco tumorais de carcinoma de cólon, tais como CD133, CD29, CD44, CD166 (ALCAM), EpCAM, ALDH1A1 e ALDH1B1. Através da identificação destas células tronco tumorais, busca-se associar as suas formas de expressão com características comportamentais da doença, como predição de risco de progressão, identificando pacientes com maior risco de recorrência. A presença dessas proteínas expressas nas células tem sido associada a características de células tronco tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Ainda existem incertezas quanto à capacidade destes marcadores de células tronco tumorais estarem expressos exclusivamente na população de células tronco ou realmente são capazes de prever um determinado comportamento biológico da doença (7) (Figura 2).

Figura 2 – Distribuição dos tipos celulares da mucosa colônica (células progenitoras, células tronco, células de Paneth e células tronco tumorais) e a combinação de marcadores de células tronco identificando um conjunto de células cancerosas com características de células tronco tumorais. Legenda: CSC: câncer stem cell (células tronco tumoral). Fonte: J Mol Med. Sep 2009. Colon cancer stem cells.

Muitas dessas características explicariam a resistência das células tronco tumorais à quimioterapia, justificando os quadros de recidiva e metástases dos tumores mesmo após tratamento citotóxico sistêmico. A proliferação e a diferenciação das células intestinais normais provenientes das células tronco são moduladas por um micro ambiente específico. A presença da matrix extra celular, o contato direto célula-célula e fatores humorais são essenciais para a manutenção adequada desse nicho de células tronco contribuindo para seu desenvolvimento tanto em tecidos normais com em tecidos tumorais. Fatores humorais, incluindo os fatores de crescimento epidérmico e de fibroblastos são essenciais para a ativação da proliferação e para inibição da apoptose de células tronco intestinais (5).

Estudos *in vitro* observaram que a via de sinalização do EGF é importante para a formação de esferas tumorais constituídas de células tronco tumorais com as mesmas características genéticas e tumorigênicas. Essas esferas tumorais quando expostas a inibidores do EGFR apresentam em seu interior uma menor formação de agrupamentos de células tronco tumorais, menor viabilidade de crescimento e maior taxa de apoptose. Observa-se também que este evento é dose dependente, podendo-se dizer que a formação de esferas de células tronco tumorais esta relacionada com a via de sinalização do EGF (26).

Alguns estudos já demonstraram a importância da via de sinalização do EGF na autorrenovação de células tronco tumorais no câncer de próstata e também com outros tumores não hematológicos. O EGF é um dos reguladores positivos para a proliferação e sobrevivência de células indiferenciadas intestinais em modelos experimentais de camundongos. Também demonstra atividade inibindo a apoptose de células progenitoras, contribuindo, desta forma para a homeostase do microambiente e interação epitélio-mesênquima. Existem outras vias envolvidas na manutenção do crescimento e integridade funcional das células tronco tumorais, principalmente via Wnt/ β -catenina, Notch e Hedgehog (27,28).

Em células epiteliais intestinais normais, a ativação do EGFR estimula a progressão do ciclo celular, a migração e a diferenciação celular, inibindo a apoptose. Em células cancerosas, acredita-se que o EGFR promova o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência das células tumorais. Seguindo-se à ativação do

EGFR, três vias de sinalização principais são ativadas: a via da quinase PI3K/Akt, do Ras-ERK e a dependente da STAT3. Os inibidores do EGFR inibem as vias do Ras-ERK e PI3K/Akt e, entender os mecanismos de sinalização dessas vias pode abrir caminhos para novas formas de abordagem terapêutica (6,22,23,24).

Alguns tumores biologicamente agressivos demonstram uma expressão gênica característica da presença de células-tronco embrionárias humanas. Entretanto, o tratamento atual com drogas citotóxicas para as neoplasias atua, de forma inespecífica, contra células tumorais e normais com alto índice de proliferação. As células tronco tumorais, por sua vez, apresentam um metabolismo e ciclo celular mais lentos, dificultando a efetividade da quimioterapia neste cenário. São consideradas, devido suas propriedades, como células radorresistentes e quimiorresistentes, explicando, em parte, a refratariedade, falha e recorrência mesmo após tratamento de algumas neoplasias com quimioterapia e radioterapia (29,30).

Para se avaliar experimentalmente a influência das diferentes isoformas da proteína ras sobre a diferenciação celular e expressão de células tronco, Quinlan *et al.* utilizou um modelo experimental *in vitro* de crescimento de células tronco tumorais embrionárias de ratos F9 tratadas com ácido retinóico. O ácido retinóico é indispensável para o desenvolvimento de órgãos derivados do endoderma durante a embriogênese, levando à perda da expressão de marcadores de células tronco, como SOX2 e Oct3/4 Nanog, interrompendo a proliferação celular e iniciando a expressão de genes GATA4 associados à diferenciação precoce do endoderma. A via Hras mutada (HrasV12) induz a diferenciação celular, mesmo na ausência do ácido retinóico, levando à interrupção da proliferação e também eventual morte celular. Ao contrário, a expressão da via KrasV12 mutada, promove a expansão de populações de células F9 através do estímulo à proliferação celular, reduzindo a diferenciação celular mesmo sob o estímulo do ácido retinóico, apresentando um potencial de replicação indefinido e permanecendo com a expressão de fatores transcritores de células tronco como Oct3/4, Nanog e SOX2. O NrasV12 mutado, por sua vez, não apresenta nenhum efeito biológico detectável neste modelo experimental testado. Portanto, a presença do *status* mutado dos genes Hras e KRAS causam efeitos biológicos opostos nas células progenitoras/células tronco (20).

Figura 3 – Diferentes efeitos da expressão das três isoformas Ras (Hras, Nras e KRAS) ativadas nas células tronco/progenitoras endodermiais e suas consequências para a oncogênese. A autorrenovação das células tronco está identificada com a seta curvada. O RA reprime a programação das células tronco, incluindo o Oct3/4 e a autorrenovação e induz a diferenciação endodérmica GATA4 e a cessação da proliferação. A ativação do Hras reprime a expressão de Oct3/4, terminando a sua auto-renovação e promovendo a diferenciação endodérmica, na ausência do RA. A ativação do Nras não traz consequências detectáveis nesse sistema. A expressão do Kras ativado mantém a expressão do Oct3/4 e a autorrenovação mesmo na presença do fator indutor de diferenciação, como o RA. Isso resulta na expansão das células progenitoras/tronco, e permitindo acúmulos de mutações adicionais. Legenda: RA: ácido retinóico. Fonte: Cell Cycle 2008. Explaining the preponderance of KRAS mutations in human cancer. An isoform-specific function in stem cell expansion.

Essas diferenças nas isoformas Ras são devidas principalmente à alta frequência das mutações KRAS nos cânceres humanos e revelam o possível papel das mutações KRAS como eventos de ativação e iniciação na tumorigênese, expandindo células progenitoras e células tronco. A mutação do KRAS, diferentemente do Hras e do Nras promovem a expansão de células progenitoras/tronco de origem endodérmica, de origem pancreática, colônica e pulmonar, bloqueando sua diferenciação (16,20) (Figura 3).

Por outro lado, ao contrário da inativação do APC, também foi demonstrado que a ativação do KRAS não aumenta a expressão de marcadores de células tronco em criptas do epitélio glandular intestinal e a formação de colônias de células em meios de cultura de forma isolada. Este fato nos leva a pensar que a mutação do gene KRAS não inicie sozinha a progressão adenoma-carcinoma, em parte porque

não ser capaz de aumentar a formação de células tronco nas criptas do epitélio colônico com hiperplasia glandular (26,27,28).

São descritas e estudadas algumas moléculas proteicas de superfície da membrana celular e citoplasma marcadoras da expressão de células tronco tumorais em cólon; identificadas como CD133, CD44, CD24 e CD166 (29,30). Alguns fatores podem modular a expressão destes marcadores, sendo um desses fatores a mutação KRAS (26,27).

O CD133 é um antígeno de superfície celular que foi identificado em células tronco tumorais do cérebro, cólon e próstata. É o mais importante marcador de célula tronco tumoral. Sua expressão está relacionada ao tamanho tumoral e ao sexo dos pacientes, sendo maior expressão no sexo masculino. Tumores classificados em estádios iniciais apresentam menor expressão deste marcador comparado com tumores CCR mais (30).

O CD24, também é um antígeno marcador de superfície celular. É uma proteína da classe das sialoglicoproteínas. Sua expressão em células tumorais está relacionada ao grau de diferenciação tumoral, à presença de metástases linfonodais e a um desfecho clínico desfavorável em pacientes com CCR (30).

A expressão de CD133, CD166 e CD24 em células tronco tumorais está relacionada à maior invasividade e ao grau de indiferenciação das células tumorais, porém alguns estudos não reproduzem esses achados e não demonstram associação com uma pior evolução clínica do câncer nestes pacientes (29,30). Esses três marcadores ganham força e significância quando são avaliados de forma conjunta, permitindo estratificar os pacientes em baixo, intermediário e alto risco para mortalidade câncer-específica, principalmente para os estádios clínicos (EC) I e II, reforçando a necessidade de discussão quanto à realização de tratamento adjuvante e um seguimento personalizado mesmo nestes estádios (7,29,31). Mais estudos prospectivos são necessários para se estabelecer a relação desses marcadores com as características clínico-patológicas, evolução e de sobrevida dos pacientes com CCR.

Alguns estudos têm demonstrado a relação entre a expressão desses marcadores de células tronco tumorais com prognóstico, porém ainda não há uma associação definitiva com o comportamento da doença, progressão ou sobrevida

(31,32). É necessário conhecer a relação entre as características clínico-patológicas dos tumores de cólon e a expressão de células tronco tumorais para que se possa identificar subgrupos de pacientes de maior risco de desenvolver metástases, recorrência e óbito. É de grande importância reconhecer a expressão e a interação dessas inúmeras moléculas, variáveis genéticas e mutações no comportamento da célula tumoral levando ao conhecimento de padrões fenotípicos distintos do carcinoma de cólon. Diante das opções terapêuticas que se dispõem na atualidade, seria um diferencial poder selecionar os pacientes que mais se beneficiarão da quimioterapia, radioterapia e de agentes alvo moleculares, seja no cenário adjuvante para um subgrupo de pacientes com maior risco de recidiva com também no cenário paliativo, além de propor um seguimento pós-tratamento individualizado de acordo com o risco de cada paciente (7) (Figura 4).

Figura 4 – Terapia convencional (quimioterapia e radioterapia) e terapia alvo contra as células tronco tumorais . Terapias direcionadas e específicas a um alvo molecular para as células tronco tumorais podem selecionar de modo mais eficaz células com capacidade de iniciação e sobrevivência à terapia convencional e, assim, prevenir a recidiva tumoral. Legenda: CSC: câncer stem cell (célula tronco tumoral). Fonte: Cancer letters 2011.Targeting apoptosis pathways in cancer stem cells.

1.7 CD166

O CD166 (ALCAM - molécula de adesão celular ativadora de leucócito) é uma glicoproteína de 65 kDa, da superfamília das imunoglobulinas, com vários domínios transmembranas, que está fisiologicamente expressa em leucócitos ativados, células neurais, células epiteliais e células progenitoras hematopoiéticas. Funciona como molécula de adesão celular, atuando também na ligação de interação entre as células epiteliais tínicas e os timócitos (33).

Essa molécula atua no desenvolvimento de diferentes tecidos durante a embriogênese, como a hematopoiese e a angiogênese. Está expressa em vários tecidos malignos, como no melanoma, onde foi primariamente descrita, e nos tumores de esôfago, pâncreas, próstata e tumores ginecológicos, principalmente durante a progressão de adenoma para carcinoma. Sua expressão se correlaciona com diferentes desfechos e características clínicas e patológicas tumorais e tem sido descrita como marcador de progressão tumoral (33). Também já foi descrita em sarcomas e correlacionado com quimiorresistência. Em melanomas, a expressão de ALCAM está associada à fase de crescimento vertical e com fenótipo mais agressivo de doença (34).

O padrão de expressão de marcação do CD166 acontece predominantemente na membrana celular, mas também no citoplasma. Geralmente a expressão citoplasmática sempre está acompanhada com a expressão forte de membrana. Nem sempre a expressão do CD166 na membrana está acompanhada da expressão citoplasmática (33,34).

Sua expressão está significativamente aumentada em células tumorais cólon-retais se comparada com a expressão da mucosa normal desses tecidos. Acredita-se que a superexpressão do CD166 é um evento precoce da transformação maligna das células, sendo encontrada em quase todos os adenomas do cólon, considerados lesões precursoras das neoplasias malignas do cólon (33).

Porém, ainda não existem dados consistentes a respeito do significado dessa expressão sobre o valor prognóstico ou um significado clínico. A expressão do CD166 está presente tanto no tumor primário quanto em seus sítios de metástases. A expressão do CD166 é menor em linfonodos comprometidos por células tumorais e nas metástases de câncer de cólon em relação ao tecido da mucosa colônica do

tumor primário. Através de estudos de imunohistoquímica, 59% dos cânceres de cólon apresentam imunorreatividade citoplasmática positiva de ALCAM e 31% membranosa em comparação com células colônicas da mucosa normal (34).

A molécula CD166 está normalmente expressa na superfície do epitélio saudável das criptas do cólon, caracterizando um nicho de células tronco intestinais normais. Seu papel fisiológico parece estar relacionado a morfogênese das estruturas tubulares, através da interação célula-célula e célula-matrix celular; as quais são perdidas durante a desdiferenciação das células tumorais. Tecidos normais e tumores de baixo grau ainda têm a capacidade de formar estruturas epiteliais tubulares, enquanto que tumores de alto grau perdem a capacidade de produzir formações celulares, aumentando seu potencial metastático (34).

Dessa forma, nos linfonodos e nos sítios de metástases à distância, existe menor expressão do CD166 quando comparadas ao tumor primário. Também existe uma associação inversa entre o grau de diferenciação celular tumoral e a expressão do CD166, ou seja, nos tecidos tumorais mais indiferenciados, existe uma menor expressão do CD166. Em análise de regressão multivariada e univariada, a expressão positiva do CD166 é um fator prognóstico favorável a maior sobrevida global (34).

Alguns estudos demonstram resultados conflitantes. Weichert *et al.*, em uma coorte de 111 pacientes com tumor cólon-retal, não encontraram associação entre a expressão do CD166 e características histopatológicas, porém, demonstraram, em análise de regressão univariada e multivariada, valor prognóstico independente para a expressão CD166 positivo (padrão membranoso) para uma menor sobrevida global, principalmente quando o padrão de marcação era fortemente positivo na membrana celular. Além disso, em tumores de próstata, estes autores demonstraram que a célula tumoral perdia a expressão de ALCAM quanto mais indiferenciada, o que não foi demonstrado para as células tumorais de cólon (33).

Horst *et al.*, em uma coorte de 110 pacientes com tumor cólon-retal, não demonstraram associação clínica ou patológica com a expressão de CD166, nem significado de associação com a sobrevida desses pacientes (29). Lugli *et al.* realizaram o maior estudo sobre a expressão do CD166 em 1420 amostras de CCR usando a técnica de TMA, revelando, em análise univariada, uma associação significativa entre CD166 negativo e maior tamanho tumoral, disseminação

linfonodal, infiltração da borda tumoral, maior potencial de invasão tumoral e menor sobrevida global em relação aos pacientes CD166 positivos (35).

Alguns fatores podem contribuir e explicar as discrepâncias nos resultados apresentados por esses estudos; um deles é a intensidade e especificidade da marcação da imunohistoquímica usando diferentes concentrações do anticorpo. As diluições variaram de 1:100 a 1:450 nos estudos, dificultando a comparação dos resultados imunohistoquímicos. Outros fatores foram: a utilização de diferentes valores de *cut off* para consideração negativa e positiva da expressão imunohistoquímica; falhas na padronização de metodologias e coorte heterogênea e pequena de pacientes (34).

1.8 CD44

O CD44, também conhecido como molécula de adesão e migração celular, é uma glicoproteína transmembrana de superfície celular expressa em linfócitos, monócitos e granulócitos. É identificado como marcador de célula tronco em tumores de cabeça e pescoço e em tumores de mama. Funciona como a principal molécula de adesão celular para o ácido hialurônico, um componente da matriz extracelular e para as metaloproteinases tipo I. É uma molécula multifuncional cujas funções não são totalmente conhecidas (36). Existem mais de 20 diferentes isoformas do CD44 que se ligam também às selectinas e osteopontinas, assumindo funções na organogênese, migração celular e disseminação tumoral durante o processo de metástases (25).

O CD44 está envolvido em uma infinidade de processos patológicos e fisiológicos como: ativação de linfócitos, cicatrização de feridas, migração celular através da ECM, crescimento das células tumorais e metástases. As isoformas do CD44 também estão expressas em células inflamatórias assim como na membrana de células normais da mucosa colônica, nas regiões das criptas basais. Juntamente com a E-caderina, o CD44 atuam diretamente na adesão celular. A inativação dessas duas proteínas associa-se a uma menor sobrevida em pacientes com tumores de cólon (31).

A variante CD44 v6 está caracteristicamente expressa em células tumorais de cólon. Cerca de 60% das amostras tumorais do cólon têm expressão positiva para CD44 v6. Existem variações gênicas do CD44 que demonstram ter um valor prognóstico (7,31).

A molécula CD44 é detectada em até 90% das células tumorais por *imunoblot* e têm como alvo a via de sinalização Wnt/B-catenina nos processos celulares. Em experimentos *in vitro* e *in vivo*, o silenciamento de CD44 em linhagens celulares de câncer de cólon promoveu um menor número de clones e redução da progressão/evolução tumoral (32).

A associação da superexpressão do CD 44 com o CD133 demonstrou ser mais efetiva para identificar células tronco tumorais no câncer cólon-retal; tumores com pior prognóstico e com maior risco de recorrência (37).

Tumores grandes, maiores que 5,5 cm, frequentemente expressam mais CD44, sugerindo que esse marcador de superfície celular possa estar relacionado à carga clínica tumoral. Em estágio clínico II, a expressão aumentada de CD44 é um fator prognóstico para a sobrevida global (32); enquanto que em outros trabalhos, a expressão negativa de CD44 é que está relacionada a uma pior sobrevida para destes pacientes (31).

Outros estudos avaliando a variante CD44 v6 demonstraram que em estágios iniciais do tumor e regiões mais infiltrativas do tumor há uma maior expressão dessa variante enquanto que, em estágio mais avançados e tumores maiores, ocorre a perda da expressão do CD44 v6 (36).

Em um trabalho conduzido por Lugli *et al*, utilizando um cut off de 5%, a expressão CD44 negativo esteve presente em 48%, associado-se a tumores mais avançados; à presença de envolvimento linfonodal; presença de invasão vascular; tumores do lado esquerdo do cólon e padrão de infiltração da borda tumoral. Houve uma tendência a favor do CD44 negativo quanto a recorrência local. A taxa de sobrevida em 5 anos para pacientes com CD44 negativo foi 53,4%, menor se comparada aos pacientes CD44 positivo (59,3%). O prognóstico desfavorável da perda da expressão do CD44 não uma causa, mas consequente a progressão tumoral local, em linfonodos, a invasão vascular e padrão de crescimento infiltrativo (35); enquanto que outros trabalhos não demonstraram evidência de um padrão de expressão do CD44 sobre comportamento da doença (7).

Outro estudo demonstrou a associação da superexpressão do CD44 na presença de invasão vascular e, uma menor expressão relacionada a uma menor de sobrevida global em pacientes com câncer de cólon em ECII,; não sendo, entretanto, demonstrado para pacientes com estágio ECIII (31).

Assim como o CD44, a expressão do CD166 diminui da região central para a periferia do tumor, fato este observado em 51 dos 100 casos para o CD166 e em 47 dos 99 casos para o CD44. Aproximadamente 80% dos tumores com CD166 negativo e 78% com CD44 negativo, apresentavam características infiltrativas nas bordas tumorais, demonstrando uma associação entre o CD166 e CD44 negativos e o crescimento e disseminação tumoral (35).

Pacientes com tumores que expressam menos CD166 e CD44 na borda tumoral, quando comparados com as áreas mais centrais do tumor, demonstraram um desfecho adverso (progressão tumoral) significativamente maior quando comparados com pacientes que expressavam ambas as proteínas (35).

A menor expressão de CD44 e suas variantes também estão associadas a uma menor sobrevida em pacientes com rabdomiossarcoma, câncer de próstata e câncer de ovário. Em tumores de cólon, a perda da expressão de CD44 tem sido considerada um indicador relativamente confiável de comprometimento linfonodal (31). Assim, o CD44 age tanto como promotor tumoral como supressor de tumor, dependendo dos ligantes aos quais interage. Os padrões de expressão do CD44 não são constantes e imutáveis, podendo se alterar durante a progressão do tumor, sendo necessário estudar as várias isoformas para determinar os aspectos multifuncionais do CD44 (36).

1.9 Associação CD44 e CD166

Em estudo de Lugli *et al*, foi avaliado se a perda concomitante da expressão conjunta de CD166 e CD44 alterava de forma negativa ou positiva o desfecho dos pacientes. Em células normais, a expressão de CD44 estava presente em 4,3% e de CD166 em 43,1% e, nas células tumorais de cólon, a expressão de CD44 estava presente em 33,1% e de CD166 em 64,4; sendo, essa diferença estatisticamente significativa. A expressão negativa de ambos os marcadores em 276 (24%) dos

1160 pacientes, enquanto que o restante dos casos (884 casos) mostrou várias combinações diferentes entre esses dois marcadores. A taxa de sobrevida em 5 anos para os casos com perda da expressão de CD44 e de CD166 concomitantes foi 48,3%, enquanto que para o restante dos fenótipos em várias associações foi 58,6%. O valor prognóstico desta combinação CD166 negativo e CD44 negativo não contribuiu, de forma independente, em análise multivariada, para um desfecho desfavorável (35).

2 OBJETIVOS

Considerando o cenário do câncer de cólon metastático, este estudo tem como objetivos:

- Classificar os pacientes segundo o *status* do gene KRAS (mutado ou selvagem);
- Caracterizar a expressão de marcadores imunohistoquímicos de células tronco tumorais (CD44 e CD166) na amostra geral de pacientes e nos subgrupos de pacientes com KRAS selvagem e mutado;
- Relacionar os achados referentes à mutação do gene KRAS e à marcação imunohistoquímica de células tronco tumorais (CD44 e CD166) com as características clínicas e patológicas; evolução (sítios de metástases) e dados de sobrevida (sobrevida global e sobrevida livre de progressão);
- Caracterizar subgrupos de pacientes de acordo com a expressão KRAS, CD44 e CD166 segundo o risco de progressão; metástases hepática e pulmonar; comprometimento linfonodal e óbito.

3 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Neste estudo baseou-se em uma amostra de conveniência, onde foram incluídas amostras de tecido tumoral de 58 pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de cólon metastático, provenientes da ressecção do tumor primário e conservados em parafina. Esses pacientes foram acompanhados e tratados pelo Serviço de Oncologia Clínica do HCFMRP-USP, no período de 2003 a 2012. Selecionou-se apenas uma biópsia por paciente e, para cada caso, foram revisadas sistematicamente as lâminas coradas com HE (hematoxilina-eosina) para confirmar o diagnóstico de adenocarcinoma de cólon e para selecionar o bloco de parafina mais representativo para confecção dos microarranjos teciduais (TMA). Apenas foram selecionados blocos cujos tecidos não apresentavam artefatos de autólise ou sinais de processamento inadequados.

Através de informações obtidas em revisão do prontuário médico, estes pacientes foram estadiados de acordo os critérios definidos pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC, 2010), sendo selecionados apenas os casos de pacientes com doença metastática (apresentação inicial ou evolução da doença) (8).

Após análise dos critérios de inclusão e exclusão e apresentação do estudo, estes pacientes foram questionados ao interesse de participação no estudo e consentimento quanto a utilização dos dados clínicos e de material biológico proveniente do tecido tumoral ressecado.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi oferecido a cada paciente que aceitou participar do estudo (ou seu representante legal) e após a leitura, entendimento e assinatura deste, os pacientes foram incluídos para esse trabalho (ANEXO A). Os pacientes foram incluídos em momentos diferentes no período de fevereiro de 2012 até dezembro de 2012.

No desenvolvimento deste estudo, foram respeitadas as normas de boas praticas em pesquisa clinica e o mesmo foi delineado em conformidade com a Diretriz Ética em Pesquisa de 1975, da Declaração de Helsink. Este projeto foi

submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP local (Processo HCRP nº 14277/2011) (Anexo B).

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

3.2.1 Critérios de inclusão dos pacientes na pesquisa

- a. Diagnóstico de neoplasia maligna (adenocarcinoma, mucinoso) de cólon metastático, segundo os critérios da OMS;
- b. Possuir material histológico conservado em parafina junto ao Serviço de Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal do HCFMRP-USP;
- c. Possuir em prontuário médico o resultado da análise do status da mutação do gene KRAS (análise do material parafinado através da técnica de RT-PCR e sequenciamento direto);

3.2.2 Critérios de exclusão dos pacientes na pesquisa

- a. Casos que não contenham informações a respeito das características clínicas, histopatológicas, dados de evolução e de sobrevida dos pacientes;
- b. Pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna de reto, intestino delgado ou tumores de linhagem neuroendócrina;
- c. Ausência do resultado da análise do status da mutação KRAS no tumor primário do cólon ou resultado da análise do status da mutação KRAS realizada no material da metástase proveniente do tumor primário;

3.3 MATERIAIS

Os anticorpos utilizados para as reações imunohistoquímicas foram:

- anticorpo monoclonal anti-coelho CD166, clone EPR2759(2), IgG, 1:400, Abcam, Cambridge, UK, marcador de membrana celular e citoplasma com controle positivo de tecido glandular prostático humano;
- anticorpo monoclonal anti-camundongo CD44, clone DF1485, IgG1, 1:50, DakoCytomation com controle positivo de tecido de amígdala humano (tabela 1).

Tabela1 - Fonte e diluição dos anticorpos primários utilizados

Anticorpo	Clone	Marca	Diluição	Controles	Características imunomarcção
CD166	EPR2759(2)	Abcam	1:400	prostático humano	membrana celular e citoplasma
CD44	DF1485	Dako Cytomation	1:50	amígdala humano	membrana celular e citoplasma

Utilizou-se Kit REVEAL-Sistema de Detecção Livre de Biotina, BIOGEN, com os anticorpos primários produzidos em coelhos e camundongos.

3.4 MÉTODOS

Foram coletadas, de forma retrospectiva, informações contidas no prontuário médico do paciente relacionadas às características clínicas, histopatológicas, evolução (sítio de metástases: pulmonar e hepática), desfecho clínico (tempo de sobrevida global e sobrevida livre de progressão) e status da mutação do gene Kras (mutado ou selvagem).

As características clínicas avaliadas foram: sexo (masculino, feminino); idade (média, mediana, >65 anos e <65 anos) e ECOG (0/1 ou 2). As características histopatológicas analisadas foram: grau de diferenciação tumoral (bem a moderadamente diferenciado ou pouco diferenciado); histologia do tumor (adenocarcinoma puro ou mucinoso); profundidade de acometimento tumoral (T2,

T3, T4); comprometimento linfonodal (presente ou ausente), segundo os critérios TNM do AJCC 7ª edição-2010 e metástase sincrônica (presente ou ausente) ou metacrônica (presente ou ausente) (8).

Quanto ao desfecho clínico, foram analisados o tempo de sobrevida global, definido como o tempo decorrido da data do diagnóstico do tumor por biópsia até a data de óbito por qualquer causa; e o tempo livre de progressão, definido como o tempo decorrido da data do diagnóstico do tumor por biópsia até a data de aparecimento de metástase, progressão da metástase existente ou óbito por qualquer causa. Também foram analisados os sítios de metástases com enfoque para pulmão e fígado.

O status do gene KRAS foi classificado como:

- selvagem, quando não havia mutação detectada nos éxons 1/2 pela técnica de sequenciamento direto RT-PCR;
- mutado, quando identificado algum ponto de mutação nos éxons 1/2.

3.4.1 Método de confecção do *Tissue Micro-Array* (TMA) – Microarranjos teciduais

A seleção dos fragmentos tumorais foi realizada através da análise de lâminas arquivadas, previamente coradas por HE. Selecionaram-se os blocos de parafina correspondentes aos fragmentos mais representativos de cada lesão para a confecção dos TMAs.

Para a confecção dos blocos de TMA, usou-se caneta metálica da marca Zytovision para retirar, em formato cilíndrico de 2mm de profundidade e de diâmetro, um fragmento da área sólida de tumor mais representativa do bloco. Essa área sólida do tumor correspondia a uma área central do tumor e não de sua periferia.

Cada bloco do TMA continha 4 linhas e 6 colunas, sendo a posição 1,1 representativa do ponto de referência para leitura das demais posições (linha, coluna). Cada fragmento retirado foi colocado em um bloco receptor de parafina utilizando o equipamento Manual Tissue Arrayer I (Beecher Instruments, Silver Spring, USA) contendo 24 posições. O bloco receptor foi levado para estufa a 60°C

por 20 minutos e após, foi resfriado em temperatura ambiente por 20 minutos e depois levado ao freezer a -8°C por 1 minuto.

A partir de cada bloco de TMA pronto, foram feitos cortes histológicos de 3 µm de espessura em micrótomo rotativo convencional (Microm HM315, Walldorf, Alemanha), utilizando o *paraffin tape-transfer system* (Instrumedics, Saint Louis, USA). Um corte foi reservado para ser corado com HE para confirmar a presença de tumor no cilindro do TMA utilizando microscópio de luz convencional, analisando a representatividade e verificando possíveis cilindros perdidos. Após esta confirmação, os cortes histológicos foram colocados em lâminas de vidro embebidas pela polilisina a 8% para a realização do método imunohistoquímico (39).

Para os cilindros considerados perdidos (menos de 50% do cilindro inteiro), repetiu-se novo corte de TMA para refazer a reação imunohistoquímica. Para os casos em que as lâminas de HE do tumor primário demonstravam baixa representatividade do tumor, analisou-se toda a lâmina do bloco do tumor primário para a leitura das reações imunohistoquímicas. Para a análise quantitativa da imunomarcção, foi considerada como representatividade de 100% a área inteira de cada cilindro representado no bloco de TMA.

3.4.2 Método imunohistoquímico

Todas as amostras teciduais foram rotineiramente fixadas em formalina e embebidas em parafina. Utilizou-se o bloqueio de peroxidase endógena para o protocolo da reação imunohistoquímica, seguindo o sistema avidina-biotina peroxidase, utilizando-se o kit do polímero REVEAL (BIOGEN). Os blocos confeccionados para o TMA foram cortados em espessura de 3µm. Os cortes foram preparados em lâminas recobertas com poli-L-lisina 8%. As lâminas foram deixadas em estufa a 60°C por 10 minutos para promover a retirada da parafina. Em seguida, as lâminas foram desparafinizadas em concentrações decrescentes de xilol e, em seguida, hidratadas, passando-se em concentrações decrescentes de

álcool absoluto por duas vezes, álcool 90% por duas vezes, álcool 70% por uma vez e água destilada por uma vez para a retirada do xilol e hidratação.

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada em uma solução contendo 0,3% de solução de peróxido de hidrogênio por 30 minutos. A seguir, promoveu-se a recuperação antigênica em panela a vapor (Stemaer), utilizando-se tampão citrato de sódio 0,001M, pH 6,0 no recipiente, por 40 minutos. Em seguida, as lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente por 30 minutos e secadas.

A etapa seguinte foi a incubação do anticorpo primário por 1 hora, permitindo a cobertura de aproximadamente 100 µl por corte em câmara úmida à temperatura ambiente e, em seguida, submetidas a lavagem com tampão TBS por 1 minuto. Após, foi aplicado anticorpo secundário universal (kit REVEAL BIOGEN) por 10 minutos, aplicado conjugado HRP por 15 minutos e em seguida lavado com TBS.

A reação foi revelada corando-se as lâminas com substrato cromógeno para peroxidase diaminobenzidina (DAB) e, em seguida, lavadas com água. Neste momento, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina por 30 segundos. Em seguida foram lavadas em água corrente e água amoniacal; desidratadas por uma série de soluções de alcoóis e, em seguida, passadas em concentração de xilol, seladas com lamínula e coladas com Permount (Fisher Scientific, Fairlawn, NJ).

Os controles negativos foram preparados suprimindo-se o anticorpo primário da reação e os controles externos positivos foram realizados conforme especificação dos fabricantes. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz convencional (Axiostar Plus, Zeiss, Göttingen, Alemanha). Foram examinados todos os cilindros do TMA e foram consideradas células com marcação positiva aquelas coradas em marrom escuro após as reações.

3.4.3 Análise e interpretação da marcação imunohistoquímica dos anticorpos utilizados

Para a análise e interpretação da marcação do CD44, utilizou-se uma somatória de dois parâmetros (análises semiquantitativa e semiquantitativa) para se atingir um escore final de imunorreatividade presente na membrana celular e/ou citoplasma. Considerou-se CD44 negativo quando a somatória atingiu o valor de 0 a 2 e positivo se encontrado valor de 3 a 6. Para a análise semiquantitativa, consideraram-se as seguintes pontuações: 0 = 0% de marcação de células imunorreativas; 1 = menos de 5% de marcação da área do cilindro com células imunorreativas; 2 = entre 5 a 50% e 3 = mais de 50% de marcação. Para a análise semiquantitativa, observou-se a intensidade da coloração obtida da imunorreatividade, sendo valor 0 = sem nenhuma marcação de imunorreatividade; 1 = intensidade de marcação fraca; 2 = marcação intermediária e 3 = marcação de forte intensidade (32) (Figuras 7 e 8).

Para a análise e interpretação da marcação do CD166 levou-se em consideração apenas a existência ou não de imunorreatividade, sem levar em conta uma sub análise quantitativa ou de intensidade. Foi considerado CD166 positivo os casos de imunorreatividade inequívoca de qualquer intensidade na membrana celular acompanhada ou não de imunorreatividade citoplasmática e, CD166 negativo, nos casos onde não foi detectada imunorreatividade na membrana celular mesmo que presente no citoplasma. Geralmente, quando há imunomarcação no citoplasma da célula esta vem acompanhada da imunomarcação de membrana celular (33,34). Para a análise qualitativa de intensidade de marcação, consideramos como marcação forte a intensidade mais forte visualizada no controle positivo do respectivo anticorpo no tecido indicado pelo fabricante (Figuras 5 e 6).

Figura 5- Células neoplásicas de cólon mostrando imunorreatividade negativa para CD166 (Imunohistoquímica, padrão citoplasma e membrana, 400x).

Figura 6- Células neoplásicas de cólon mostrando imunorreatividade positiva para CD166 (Imunohistoquímica, padrão citoplasma e membrana, 400x).

Figura 7- Células neoplásicas de cólon mostrando imunorreatividade negativa para CD44 (Imunohistoquímica, padrão citoplasma e membrana, 400x).

Figura 8.- Células neoplásicas de cólon mostrando imunorreatividade positiva para CD44 (Imunohistoquímica, padrão citoplasma e membrana, 400x).

3.4.4 Análise estatística

A análise descritiva das variáveis contínuas foi apresentada em média, mediana, valores mínimo e máximo e frequência absoluta e percentual para análise dos valores numéricos. A análise estatística foi realizada utilizando-se o *software* SPSS17.

Para verificar a associação das variáveis qualitativas categóricas foi utilizado o teste Qui-quadrado (χ^2) para três ou mais variáveis e teste exato de Fisher para duas variáveis.

Na análise de sobrevida foi utilizado o método não-paramétrico de Kaplan-Meier e usado teste Log-rank para comparar as curvas de sobrevida entre os grupos (KRAS selvagem versus KRAS mutado; CD166 positivo versus CD166 negativo e CD44 positivo versus CD44 negativo). A perda de seguimento ou a ausência da informação foi considerada como dado censurado. O tipo de censura usado neste estudo foi a censura tipo I, na qual os pacientes eram incluídos em tempos diferentes durante o período de acompanhamento, de modo que os tempos de sobrevivência são maiores que o tempo final do experimento.

Para verificar o efeito de interação entre o status KRAS e os marcadores de células tronco tumoral com as variáveis de interesse, foi utilizado o modelo de regressão logística obtendo o valor de *Odds Ratio* (OR) verificando-se a medida de associação.

A fim de verificar o efeito de interação entre o status KRAS e os marcadores de células tronco tumorais quanto ao tempo de sobrevida global e livre de progressão e o risco de envolvimento linfonodal, foi utilizado modelo de riscos proporcionais de Cox, obtendo-se o valor de *Hazard Ratio* (HR), permitindo identificar o valor prognóstico de cada variável sobre o desfecho. Na análise do risco de envolvimento linfonodal (*outcome*) através da regressão de Cox, utilizou-se o tempo livre de progressão, pois se sabe que o paciente que possui linfonodos comprometidos por células neoplásicas têm um risco muito maior de apresentar progressão de doença precoce.

O menor valor de α (nível de significância) escolhido para rejeitar a hipótese nula foi 0,05. Portanto, para valores de p maiores que α , não foi rejeitada a hipótese nula.

4 RESULTADOS

4.1 Análise descritiva dos dados

Foram analisadas 58 amostras de tecido tumoral provenientes da ressecção do tumor primário de cólon de pacientes diagnosticados e tratados pelas equipes dos Serviços de Proctologia da FMRP-USP e de Oncologia Clínica da FMRP-USP e que apresentavam ao diagnóstico ou durante o período de seguimento presença de metástase ou progressão da doença em algum momento. A inclusão dos pacientes se deu em tempos diferentes ao longo do estudo (censura tipo I), durante o período de maio de 2012 a abril de 2013, data do fechamento dos dados do estudo.

Da amostra analisada, 28(48,3%) pacientes apresentavam KRAS mutado e 30(51,7%) KRAS selvagem; 25(43%) pacientes apresentavam CD166 positivo e 33(57%) CD166 negativo; 24(41,4%) pacientes apresentavam CD44 positivo e 34(58,6%) CD44 negativo.

Vinte e seis (44,8%) pacientes eram do sexo feminino e 32(55,2%) do sexo masculino. A idade dos pacientes variou de 24 a 89 anos, sendo a média e mediana, respectivamente, 57,28 anos e 54 anos; sendo 19(32,7%) pacientes acima de 65 anos e 39(67,3%) abaixo de 65 anos. Mais de 90% dos pacientes apresentavam bom *performance status*, sendo 54(93%) pacientes com ECOG 0/1 e 4(7%) ECOG 2. Dezesesseis (27,6%) pacientes apresentaram abdome agudo obstrutivo e/ou perfurativo ao diagnóstico do tumor e foram submetidos à cirurgia de urgência para resolução do quadro clínico.

Com relação às características histopatológicas dos tumores, 50(86%) pacientes apresentavam adenocarcinoma puro e 8(14%) tumores mucinosos; 53(91%) pacientes tinham tumores de grau bem a moderadamente diferenciados e 5(9%) pacientes tinham tumores pouco diferenciados.

A distribuição dos tumores conforme os critérios de estadiamento TNM (AJCC, 2010) foi: 5(8,6%) pacientes com T2, 38(65,5%) pacientes com T3 e 15(25,9%) pacientes com T4; 42(72,4%) pacientes com linfonodos comprometidos e 16(27,6%) pacientes sem comprometimento linfonodal. Ao diagnóstico, 8(13,8%) pacientes apresentavam ECII, 14(24,2%) pacientes apresentavam ECIII e 36(62%) pacientes apresentavam ECIV.

Metástases sincrônicas estavam presentes em 36(62%) pacientes e metacrônicas em 22(38%) pacientes, sendo os tempos médio e mediano de aparecimento de progressão de doença de 14,6 meses (10,8 a 18,4 meses) e 11 meses (8,3 a 13,6), respectivamente. As características clínicas e patológicas estão descritas nas tabelas 2 e 3.

O tempo de seguimento de cada paciente desde o seu diagnóstico até a data do óbito ou à data de fechamento de inclusão de pacientes variou de 34 a 60 meses (abril de 2003 a abril de 2013) sendo que, ao final do período, 47(81%) pacientes apresentavam metástases hepáticas e 27(46,5%) pacientes com metástases pulmonares. Apenas 9 pacientes (15,5%) não apresentaram recorrência/progressão da doença metastática e 37 pacientes (63,8%) estavam vivos ao final do seguimento.

Tabela 2 - Distribuição das características clínicas dos pacientes. Legenda: ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group.

Características Clínicas	Total: 58 (%)
Sexo	
Masculino	32 (55,2%)
Feminino	26 (44,8%)
Idosos	19 (32,7%)
Não idosos	39 (67,3%)
ECOG	
0/1	54 (93%)
2	4 (7%)
Abdome agudo perfurativo/obstrutivo	
Presente	16 (27,6%)
Ausente	42 (72,4%)
Metástase sincrônica	36 (62%)
Metástase metacrônica	22 (38%)

Tabela 3 - Distribuição das características histopatológicas dos tumores. Legenda: TNM: *tumor, node, metastasis* (AJCC, 2010), T: extensão tumoral, EC: estadio clínico.

Características Histopatológicas	Total:58 (%)
Histologia	
Adenocarcinoma	50 (86%)
Mucinoso	8 (14%)
Diferenciação celular	
Bem a moderadamente diferenciado	53 (91%)
Pouco diferenciado	5 (9%)
TNM	
T2	5 (8,6%)
T3	38 (65,5%)
T4	15 (25,9%)
Comprometimento linfonodal	
Presente	
Ausente	42 (72,4%)
	16 (27,6%)
EC	
ECII	8 (13,8%)
ECIII	14 (24%)
ECIV	36 (62,2%)
Status KRAS	
Mutado	28 (48,3%)
Selvagem	30 (51,7%)
CD44	
Positivo	24 (41,4%)
Negativo	34 (58,6%)
CD166	
Positivo	25 (43%)
Negativo	33 (57%)

4.2 Análise de associação entre as características clínicas, imunohistoquímicas e do *status* KRAS

Não houve associação entre as características clínicas (sexo, idoso, ECOG, abdome agudo obstrutivo/perfurativo), histopatológicas (tipo histológico,

comprometimento linfonodal, categoria T de comprometimento, metástases sincrônicas e EC) e o *status* KRAS com a expressão imuno-histoquímica do CD44, de forma significativa (tabela 4).

Tabela 4 - Análise de associação entre as características clínicas, histopatológicas e do *status* KRAS com a expressão imunohistoquímica do CD44. Legenda: T: extensão tumoral, EC: estadio clínico, ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*

Características analisadas	Associação com CD44 – valor de p
KRAS	0,595
CD166	0,016
sexo	0,596
idoso	1,0
histologia	1,0
Comprometimento linfonodal	0,385
Categoria T de comprometimento	0,546
EC	0,133
Abdome agudo obstrutivo/perfurativo	0,773
Metástases sincrônica	0,106
ECOG	0,635

Não houve associação significativa entre as características clínicas (sexo, idade, ECOG, abdome agudo obstrutivo/perfurativo), histopatológicas (tipo histológico, comprometimento linfonodal, categoria T de comprometimento, metástases sincrônicas e EC) e o *status* KRAS com a expressão imono-histoquímica do CD166 (tabela 5).

Tabela 5 - Análise de associação entre as características clínicas, histopatológicas e do *status* KRAS com a expressão imunohistoquímica do CD166. Legenda: T: extensão tumoral, EC: estadió clínico, ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*.

Características analisadas	Associação com CD166 - valor de p
KRAS	0,062
CD44	0,016
sexo	0,599
idoso	0,779
histologia	0,272
Comprometimento linfonodal	1,0
Categoria T de comprometimento	0,098
EC	0,367
Abdome agudo obstrutivo/perfurativo	0,563
Metástases sincrônica	0,274
ECOG	1,0

Também não houve associação significativa entre as características clínicas (sexo, idade, ECOG, abdome agudo obstrutivo/perfurativo), histopatológicas (tipo histológico, comprometimento linfonodal, categoria T de comprometimento, metástases sincrônicas e EC) e expressão imuno-histoquímica do CD44 e do CD166 com o *status* KRAS (tabela 6).

Tabela 6 - Análise de associação entre as características clínicas, histopatológicas e da expressão imunohistoquímica do CD44 e do CD166 com o *status* Kras. Legenda: T: extensão tumoral, EC: estadió clínico, ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*.

Características analisadas	Associação com KRAS - valor de p
CD166	0,062
CD44	0,595
sexo	1,0
idoso	0,781

histologia	0,464
Comprometimento linfonodal	1,0
Categoria T de comprometimento	0,079
EC	0,364
Abdome agudo obstrutivo/perfurativo	0,561
Metástases sincrônica	0,184
ECOG	0,344

Dentro do grupo de pacientes com KRAS mutado, 13 pacientes apresentavam CD44 positivo e 15 apresentavam CD44 negativo; no grupo de pacientes com KRAS selvagem, 11 eram CD44 positivo e 19 negativo; entretanto essa associação não se mostrou significativa ($p=0,595$) (Tabela 7).

Para o CD166 e no grupo de pacientes KRAS mutado, 16 pacientes apresentavam CD166 positivo e 12 apresentavam CD166 negativo e, para KRAS selvagem, 9 pacientes apresentavam CD166 positivo e 21 apresentavam CD166 negativo; essa associação também não se mostrou significativa ($p=0,062$), mas demonstrou que pacientes KRAS mutado expressaram mais CD166 positivo em relação ao KRAS selvagem (Tabela 7).

Tabela 7 - Análise de associação entre a expressão imunohistoquímica de CD44 e CD166 e o status KRAS. Legenda: IMH: imunohistoquímica.

	IMH	KRAS selvagem	KRAS mutado	p-value
CD44	positivo	11	13	0,595
	negativo	19	15	
CD166	positivo	9	16	0,062
	negativo	21	12	

No grupo de pacientes com KRAS selvagem, houve associação entre a expressão imunohistoquímica de CD44 e CD166 ($p=0,042$), sendo que pacientes

CD44 positivo tiveram 6 vezes mais chances de expressar CD166 positivo (OR: 6,4 IC95%: 1,16-35,44, $p=0,03$) (Tabela 8).

No grupo de pacientes idosos (>65anos), houve associação entre a expressão de CD166 e CD44 ($p=0,01$), sendo que pacientes com CD44 positivo tiveram 31 vezes mais chances de expressar também CD166 positivo (OR: 31,5 IC95%: 2,35-422,29, $p=0,01$). Enquanto que, no grupo de pacientes não idosos (<65anos), houve associação entre a expressão de CD166 e o status KRAS, ($p=0,025$); sendo que pacientes CD166 negativo tiveram 5 vezes mais chances de expressar KRAS selvagem (OR:5,03 IC95%: 1,26-20,0, $p=0,02$) (Tabela 8).

Para o grupo de pacientes do sexo masculino, houve associação entre a expressão de CD44 e CD166 ($p=0,027$); sendo que pacientes com CD44 positivo apresentaram 7 vezes mais chances de expressar CD166 positivo (OR:7,0 IC95%: 1,38-35,34, $p=0,02$). Ainda nesse subgrupo, também houve associação entre a expressão CD166 e o *status* KRAS ($p=0,012$); sendo que pacientes CD166 negativo apresentaram 9 vezes mais chances de expressar KRAS selvagem (OR:8,94 IC95%: 1,80-44,34, $p=0,01$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Análise de associação entre expressão imunohistoquímica de CD44 e CD166 e o *status* KRAS dentro dos grupos idosos, não idosos e sexo masculino e a razão de chances entre o tipo de expressão (positivo ou negativo) de CD44 e CD166 para as características imunohistoquímicas e *status* KRAS.

Grupo	Marcadores	p-value	Subgrupo	OR IC95%	p-value
KRAS selvagem	CD166 x CD44	0,042	CD44 positivo	6,4 (1,16-35,44) de ser CD166 positivo	0,03
idosos	CD166 x CD44	0,01	CD44 positivo	31,5 (2,35-42,29) de ser CD166 positivo	0,01
Não idosos	CD166 x KRAS	0,025	CD166 negativo	5,03 (1,26-20) de ser KRAS selvagem	0,02

Sexo	CD166 x CD44	0,027	CD44	7,0 (1,38-35,34)	0,02
masculino			positivo	de ser CD166 positivo	
	CD166 x KRAS	0,012	CD166 negativo	8,94 (1,80-44,34) de ser KRAS selvagem	0,01

4.3 Análise de regressão multivariada segundo modelo de riscos proporcionais de Cox

4.3.1 Análise de regressão para o risco de óbito

Considerando as variáveis analisadas (ECOG, metástases sincrônica/metacrônica, comprometimento linfonodal e estadio T), observou-se, pela regressão multivariada de Cox, um aumento no risco de óbito para pacientes com pior *performance status* (ECOG 2) (HR:11,34 IC95% 1,81-70,98, $p<0,01$) e para pacientes com metástases sincrônicas (HR: 17,71 IC95% 2,45-127,8, $p<0,01$) (tabela 9).

O *status* da mutação Kras e as expressões de CD44 e CD166 não mostraram influência significativa no risco de óbito para os pacientes. Mas se observou a influência negativa (valor preditivo negativo) pelo aumento do HR para essas características sobre o desfecho (óbito) (Tabela 9).

Tabela 9 - Análise de regressão multivariada segundo modelo de riscos proporcionais de Cox para o risco de óbito segundo as características analisadas. Legenda: ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*, T: extensão tumoral.

CARACTERÍSTICAS	HR (IC95%)	p-value
ECOG	11,34 (1,81-70,98)	<0,01
Metástases sincrônicas	17,71 (2,45-127,8)	<0,01
Comprometimento linfonodal	0,647 (0,199-2,096)	0,467
Categoria T de comprometimento	1,819 (0,715-4,628)	0,209
KRAS	2,2 (0,11-1,76)	0,25
CD44	2,21 (0,62-9,35)	0,779
CD166	1,42 (0,18-2,66)	0,768

4.3.2 Análise de regressão para o risco de recorrência/progressão de doença tumoral

Dentre as variáveis analisadas (ECOG, metástases sincrônica/ metacrônica, comprometimento linfonodal e estadió T), observou-se pela regressão multivariada de Cox que um pior *performance status* (ECOG 2) (HR:4,55 IC95% 1,21-17,05, p=0,021), e estadió T tumoral mais avançado (HR:2,08 IC95% 1,17-3,71, p=0,013) influenciaram de maneira negativa o tempo livre de progressão de doença (Tabela 10).

Na amostra geral dos pacientes, a expressão imuno-histoquímica do CD166, CD44 e o status KRAS não demonstraram influência significativa sobre o risco de progressão de doença tumoral. Mas se observou a influência negativa (valor preditivo negativo) pelo aumento do HR para o KRAS (HR:1,84) sobre o desfecho (progressão de doença) (Tabela 10).

Tabela 10 - Análise de regressão multivariada segundo modelo de riscos proporcionais de Cox para o risco de progressão de doença tumoral segundo as características analisadas. Legenda: ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*, T: extensão tumoral.

CARACTERÍSTICAS	HR (IC95%)	p-value
ECOG	4,55 (1,21-17,05)	0,021
Metástases sincrônicas	1,28 (0,66-2,51)	0,458
Comprometimento linfonodal	0,792 (0,40-1,56)	0,500
Categoria T de comprometimento	2,08 (1,17-3,71)	0,013
KRAS	1,84 (0,92-3,68)	0,085
CD44	0,65 (0,32-1,32)	0,237
CD166	0,65 (0,32-1,32)	0,423

Fazendo análise de regressão por subgrupos, pacientes com CD44 positivo e KRAS mutado apresentaram um risco 2,64 vezes maior de progressão de doença ao final do seguimento em relação aos pacientes CD44 positivo e KRAS selvagem (HR:2,64 IC 95% 1,05-6,68, $p=0,04$); demonstrando a influência do status da mutação Kras sobre o risco de progressão (Tabela 11).

No subgrupo de pacientes com CD44 negativo e KRAS mutado, também se observou o impacto negativo do status KRAS mutado sobre a progressão de doença, porém sem significância estatística (HR:1,43, IC95% 0,67-3,04, $p=0,35$) em relação aos pacientes CD44 negativo e KRAS selvagem (Tabela 11).

No grupo de pacientes KRAS mutado, os pacientes CD44 positivo apresentaram um risco 2,08 vezes maior de progressão de doença ao final do seguimento em relação aos pacientes CD44 negativo (HR:2,08 IC95% 0,89-4,84, $p=0,09$); mostrando a influência negativa da expressão CD44 positivo na progressão da doença, porém sem significância estatística (Tabela 11).

No grupo de pacientes KRAS selvagem, também se identificou uma influência negativa do CD44 positivo na progressão de doença (HR: 1,12, IC95% 0,48-2,66, $p=0,79$), porém sem significância estatística, em relação aos pacientes CD44 negativo (Tabela 11).

Pacientes KRAS mutado/CD44 positivo apresentaram um risco 3 vezes maior de progressão de doença ao final do seguimento em relação aos que expressaram KRAS selvagem/CD44 negativo (HR:3,0 IC95% 1,33-6,64, $p=0,01$); mostrando a influência conjunta do *status* KRAS e da expressão de CD44 no risco de progressão de doença tumoral (Tabela 11).

Tabela 11 - Análise de regressão segundo modelo de riscos proporcionais de Cox por grupos e subgrupos de CD44 e KRAS para o risco de progressão de doença tumoral.

Característica	Subgrupo	HR (IC95%)	p-value
CD44 positivo	Kras mutado	2,64 (1,05-6,68)	0,04
CD44 negativo	Kras mutado	1,43 (0,67-3,04)	0,35
KRAS mutado	CD44 positivo	2,08 (0,89-4,84)	0,09
KRAS selvagem	CD44 positivo	1,12 (0,48-2,66)	0,79
KRAS mutado/CD44 positivo		3,0 (1,33-6,64)	0,01

No grupo de pacientes com KRAS mutado, pacientes CD166 negativo apresentaram um risco 6,66 vezes maior de progressão da doença tumoral ao final do seguimento em relação aos pacientes CD166 positivo (HR:6,66 IC95% 2,5-25, $p<0,001$); mostrando a influência da marcação CD166 negativo no risco de progressão de doença.

Nos grupo de pacientes KRAS selvagem, também se observou a influência do CD166 negativo em aumentar o risco de progressão de doença (HR:1,38, IC95%: 0,18-2,89, $p=0,64$), porém sem significância estatística.

No grupo de pacientes CD166 negativo, os pacientes KRAS mutado apresentaram um risco 6,37 maior de progressão de doença ao final do seguimento

(HR:6,37 IC95% 2,21-18,33, $p=0,0006$) em relação aos pacientes KRAS selvagem; mostrando a influência do status da mutação KRAS no risco de progressão.

No subgrupo de pacientes CD166 positivos, também se observou a influência do *status* KRAS mutado no aumento do risco de progressão da doença (HR:1,29 IC95%: 0,31-5,43, $p=0,72$) em relação aos pacientes KRAS selvagem, porém sem significância estatística.

Pacientes KRAS mutado/CD166 negativo apresentaram um risco 8,83 vezes maior de progressão (HR:8,83 IC95% 1,98-39,36, $p<0,01$) em relação aos pacientes KRAS selvagem/CD166 positivo; demonstrando a influência negativa ainda maior da combinação do *status* KRAS e CD166 na progressão de doença.

Tabela 12 - Análise de regressão segundo modelo de riscos proporcionais de Cox por grupos e subgrupos de CD166 e KRAS para o risco de progressão de doença tumoral.

Característica	Subgrupo	HR (IC95%)	p-value
CD166 negativo	Kras mutado	6,37 (2,21-18,33)	0,0006
CD166 positivo	Kras mutado	1,29 (0,31-5,43)	0,72
KRAS mutado	CD166 negativo	26,66 (2,04-25)	<0,001
KRAS selvagem	CD166 negativo	1,38 (0,18-2,89)	0,64
KRAS mutado/CD166 negativo		8,83 (1,98-39,36)	0,01

4.3.3 Análise de regressão para o risco de apresentar metástase hepática

Na amostra geral, a expressão imunohistoquímica do CD44 influenciou as chances de o paciente evoluir com metástase hepática, de modo que pacientes CD44 positivo apresentaram um risco 3,7 vezes maior de evoluir com metástase hepática em relação aos pacientes CD44 negativo (HR:3,7 IC95% 1,53-8,94, $p<0,01$).

No grupo de pacientes CD44 positivo, os pacientes KRAS mutado apresentam um risco 1,67 vezes maior de desenvolver metástase hepática em relação aos pacientes Kras selvagem (HR:1,67 IC95% 0,51-5,50, $p=0,40$).

No grupo de pacientes CD44 negativo, os pacientes KRAS selvagem apresentaram um risco 2,94 vezes maior de desenvolver metástase hepática em relação aos pacientes KRAS mutado (HR:2,94 IC95% 0,84-10,0, $P=0,09$).

No grupo de pacientes KRAS mutado, os pacientes CD44 positivo apresentaram um risco 8 vezes maior de desenvolver metástase hepática em relação aos pacientes CD44 negativo (HR:8,0 IC95% 2,21-30,52, $p<0,01$).

No grupo de pacientes KRAS selvagem, também se observou a influência do CD44 positivo sobre o risco de metástase hepática em relação ao CD44 negativo, porém de modo discreto e sem significância estatística (HR:1,66 IC95% 0,52-5,36, $p=0,39$).

Pacientes com a combinação KRAS selvagem/CD44 positivo apresentaram um risco 5 vezes maior de desenvolver metástase hepática em relação a pacientes KRAS mutado/CD44 negativo (HR:5,0 IC95% 1,36-16,66, $p=0,01$).

Tabela 13 - Análise de regressão segundo modelo de riscos proporcionais de Cox por grupos e subgrupos de CD44 e KRAS para o risco de apresentar metástase hepática.

Característica	Subgrupo	HR (IC95%)	p-value
CD44 positivo		3,7 (1,53-8,94)	<0,01
CD44 positivo	KRAS mutado	1,67 (0,51-5,50)	0,40
CD44 negativo	KRAS selvagem	2,94 (0,84-10,0)	0,09
KRAS mutado	CD44positivo	8,0 (2,21-30,52)	<0,001
KRAS selvagem	CD44 positivo	1,66 (0,52-5,36)	0,39
KRAS selvagem/ CD44 positivo		5,0 (1,36-16,66)	0,01

A expressão imunohistoquímica CD166 não alterou o risco de o paciente apresentar metástase hepática ao final do seguimento; de modo que pacientes CD166 positivo apresentaram um risco 1,56 maior (HR:1,56 IC95% 0,67-3,62, p=0,30), em relação aos pacientes CD166 negativo.

O status da mutação KRAS não alterou o risco de o paciente apresentar ao final do seguimento metástase hepática. Pacientes KRAS selvagem apresentaram um risco 1,66 maior (HR:1,66 IC95% 0,25-1,44, p=0,26), em relação ao KRAS mutado, sem significância estatística.

No grupo de pacientes CD166 positivo, os pacientes com KRAS selvagem apresentaram um risco 2,5 maior de evoluir com metástase hepática, em relação aos pacientes KRAS mutado (HR:2,5 IC95%: 0,66-9,09, p=0,18).

No grupo de pacientes CD166 negativo, os pacientes com KRAS selvagem apresentaram um risco 1,09 maior de evoluir com metástase hepática, em relação aos pacientes KRAS mutado (HR:1,09 IC95%: 0,33-3,57, p=0,88).

No grupo de pacientes KRAS mutado, os pacientes CD166 positivo apresentaram um o risco de 1,04 maior de evoluir com metástase hepática em relação aos pacientes CD166 negativo (HR:1,04 IC95%: 0,32-3,38, p=0,95).

No grupo de pacientes KRAS selvagem, os pacientes CD166 positivo apresentaram um risco 2,35 maior de evoluir com metástase hepática em relação aos pacientes CD166 negativo (HR:2,35 IC95%: 0,65-8,53, p=0,19).

Pacientes com KRAS selvagem/CD166 positivo tiveram risco 2,56 vezes maior (HR:2,56 IC95% 0,11-1,39, p=0,14) comparados aos pacientes KRAS mutado e CD166 negativo.

Tabela 14 - Análise de regressão segundo modelo de riscos proporcionais de Cox por grupos e subgrupos de CD166 e KRAS para o risco de apresentar metástase hepática.

Característica	Subgrupo	HR (IC95%)	p-value
CD166 positivo		1,56 (0,67-3,62)	0,30
KRAS selvagem		1,66 (0,25-1,44)	0,26
CD166 positivo	KRAS selvagem	2,5 (0,66-9,09)	0,18
CD166 negativo	KRAS selvagem	1,09 (0,33-3,57)	0,88
KRAS mutado	CD166 positivo	1,04 (0,32-3,38)	0,95
KRAS selvagem	CD166 positivo	2,35 (0,65-8,53)	0,19
KRAS selvagem/ CD166 positivo		2,56 (0,11-1,39)	0,14

4.3.4 Análise de regressão para o risco de apresentar metástase pulmonar

Na amostra geral, a expressão imunohistoquímica CD44 mostrou influência no risco de o paciente evoluir com metástase pulmonar ao final do seguimento, de modo que pacientes CD44 positivo apresentaram um risco 5,3 maior de evoluir com metástase pulmonar em relação aos pacientes CD44 negativo (HR:5,3 IC 95% 1,64-15,42, $p<0,01$) de forma significativa.

No grupo de pacientes KRAS mutado, os pacientes CD44 positivo apresentaram um risco 5,24 maior (HR:5,24 IC95% 1,05-26,7, $p=0,04$) em relação aos pacientes CD44 negativo de evoluir com metástase pulmonar de forma significativa.

No grupo de pacientes KRAS selvagem, os pacientes CD44 positivo apresentaram um risco 4,78 maior (HR:4,68 IC95% 0,95-23,95, $p=0,06$) em relação aos pacientes CD44 negativo de evoluir com metástase pulmonar.

No grupo de pacientes CD44 negativo, os paciente KRAS mutado apresentaram um risco 1,28 maior (HR:1,24 IC95% 0,24-6,89, $p=0,77$), em relação aos pacientes KRAS selvagem de evoluir com metástase pulmonar.

No grupo de pacientes CD44 positivo, os pacientes KRAS mutado apresentaram um risco 1,42 maior (HR:1,42 IC95% 0,30-6,65, $p=0,65$) em relação aos pacientes KRAS selvagem de evoluir com metástase pulmonar.

Pacientes com a combinação KRAS mutado/CD44 positivo apresentaram um risco 6,8 maior de evoluir com metástase pulmonar em relação a pacientes com KRAS selvagem/CD44 negativo (HR:6,8 IC95% 1,36-33,83, $p=0,02$) de forma significativa.

Tabela 15 - Análise de regressão segundo modelo de riscos proporcionais de Cox por grupos e subgrupos de CD44 e KRAS para o risco de apresentar metástase pulmonar.

Característica	Subgrupo	HR (IC95%)	p-value
CD44 positivo		5,3 (1,64-15,42)	<0,01
CD44 positivo	KRAS mutado	1,42 (0,30-6,65)	0,65
CD44 negativo	KRAS mutado	1,24 (0,24-6,89)	0,77
KRAS mutado	CD44 positivo	5,24 (1,05-26,7)	0,04
KRAS selvagem	CD44 positivo	4,68 (0,95-23,95)	0,06
KRAS mutado/ CD44 positivo		6,8 (1,36-33,83)	0,02

A expressão imunohistoquímica CD166 não alterou o risco de o paciente apresentar metástase pulmonar de forma expressiva. Pacientes CD166 positivo apresentaram um risco 1,28 maior (HR:1,28 IC95% 0,40-4,09, p=0,67), em relação aos pacientes CD166 negativo.

No grupo de pacientes KRAS mutado, os pacientes CD166 negativo apresentaram um risco 1,2 maior (HR:1,2 IC95% 0,19-3,60, p=0,80), em relação aos pacientes CD166 positivo, de evoluir metástase pulmonar.

No grupo de pacientes KRAS selvagem, os pacientes CD166 positivo apresentaram um risco 2,0 maior (HR:2,0 IC95% 0,31-12,65, p=0,46) em relação aos pacientes CD166 negativo de evoluir com metástase pulmonar.

No grupo de pacientes CD166 negativo, os pacientes KRAS mutado apresentaram um risco 1,88 maior (HR:1,8 IC95% 0,45-7,91, p=0,39) em relação aos pacientes KRAS selvagem de evoluir com metástase pulmonar.

No grupo de pacientes CD166 positivo, os pacientes KRAS selvagem apresentaram um risco 1,28 maior (HR:1,28 IC95% 0,12-5,17, p=0,80) em relação aos pacientes KRAS mutado de evoluir com metástase pulmonar.

Pacientes com a combinação KRAS selvagem/CD166 positivo apresentam risco 1,2 maior (HR:1,2 IC95% 0,17-5,31, p=0,95) em relação aos pacientes KRAS mutado/CD166 negativo de evoluir com metástase pulmonar.

Na amostra geral, o status da mutação KRAS não alterou o risco do paciente apresentar até o final do seguimento metástase pulmonar. Pacientes KRAS mutado apresentaram risco 1,21 maior (HR:1,21 IC95% 0,38-3,91, p=0,75), em relação a pacientes KRAS selvagem.

Tabela 16 - Análise de regressão segundo modelo de riscos proporcionais de Cox por grupos e subgrupos de CD166 e KRAS para o risco de apresentar metástase pulmonar.

Característica	Subgrupo	HR (IC95%)	p-value
CD166 positivo		1,28 (0,40-4,09)	0,67
KRAS mutado		1,21 (0,38-3,91)	0,75
CD166 positivo	KRAS selvagem	1,28 (0,12-5,17)	0,80
CD166 negativo	KRAS mutado	1,8 (0,45-7,91)	0,39
KRAS mutado	CD166 negativo	1,2 (0,19-3,60)	0,80
KRAS selvagem	CD166 positivo	2,0 (0,31-12,65)	0,46
KRAS selvagem/ CD166 positivo		1,2 (0,17-5,31)	0,95

4.3.5 Análise de regressão para o risco de comprometimento linfonodal

Na amostra geral, pacientes CD44 positivo apresentaram um risco 1,51 maior (HR:1,51 IC95% 0,69-3,32, $p=0,31$) de ter linfonodos comprometidos por células neoplásicas em relação aos pacientes CD44 negativo.

No grupo de pacientes CD44 positivo, os pacientes KRAS mutado apresentaram um risco 2,16 maior (HR:2,16 IC95% 0,55-8,46, $p=0,27$) de ter linfonodos comprometidos por células neoplásicas em relação aos pacientes KRAS selvagem.

No grupo de pacientes CD44 negativo, os pacientes KRAS mutado apresentaram um risco 2,24 maior (HR:2,24 IC95% 0,80-6,29, $p=0,13$) de ter linfonodos comprometidos por células neoplásicas em relação aos pacientes Kras selvagem.

No grupo de pacientes KRAS mutado, os pacientes CD44 positivo apresentaram um risco 1,48 maior (HR:1,48 IC95% 0,49-4,47, $p=0,48$) de ter linfonodos comprometidos por células neoplásicas em relação aos pacientes CD44 negativo.

No grupo de pacientes KRAS selvagem, os pacientes CD44 positivo apresentaram um risco 1,54 maior (HR:1,54 IC95% 0,48-4,98, $p=0,47$) de ter linfonodos comprometidos por células neoplásicas em relação aos pacientes CD44 negativo.

A interação da expressão imuno-histoquímica do CD44 e o status KRAS mostraram influência no risco de o paciente apresentar envolvimento linfonodal, de modo que pacientes com a combinação KRAS mutado/CD44 positivo apresentaram um risco 3,33 maior (HR:3,33 IC95% 1,97-1,04, $p=0,03$) de ter linfonodos comprometidos por neoplasia em relação aos pacientes KRAS selvagem/CD44 negativo, de forma significativa.

Tabela 17 - Análise de regressão segundo modelo de riscos proporcionais de Cox por grupos e subgrupos de CD44 e KRAS para o risco de envolvimento linfonodal por células neoplásicas.

Característica	Subgrupo	HR (IC95%)	p-value
CD44 positivo		1,51 (0,69-3,32)	0,31
CD44 positivo	KRAS mutado	2,16 (0,55-8,46)	0,27
CD44 negativo	KRAS mutado	2,24 (0,80-6,29)	0,13
KRAS mutado	CD44 positivo	1,48 (0,49-4,47)	0,48
KRAS selvagem	CD44 positivo	1,54 (0,48-4,98)	0,47
KRAS mutado/ CD44 positivo		3,33 (1,97-1,04)	0,03

Na amostra geral, a expressão imunohistoquímica CD166, o *status* KRAS e a interação entre essas duas características mostraram influência no risco de o paciente apresentar envolvimento linfonodal.

Pacientes CD166 negativo apresentaram um risco 2,7 maior (HR:2,7 IC 95% 1,08-6,66, p=0,03) de ter linfonodos comprometidos por células neoplásicas em relação aos pacientes CD166 positivo.

Pacientes KRAS mutado apresentaram um risco 2,73 maior de ter linfonodos comprometidos por células neoplásicas (HR:2,73 IC95% 1,11-6,73, p=0,03) em relação as pacientes KRAS selvagem.

No grupo de pacientes KRAS mutado, os pacientes CD166 negativo apresentaram um risco 7,8 maior de ter linfonodos comprometidos por células neoplásicas (HR:7,8 IC95% 2,38-25, p=0,0007) em relação aos pacientes CD166 positivo.

No grupo de pacientes KRAS selvagem, os pacientes CD166 positivo apresentaram um risco 1,07 maior de ter linfonodos comprometidos por células neoplásicas (HR:1,07 IC95% 0,29-3,94 ,p=0,92) em relação aos pacientes CD166 negativo.

No grupo de pacientes CD166 negativo, os pacientes KRAS mutado apresentaram um risco 8,0 maior de ter linfonodos comprometidos por células neoplásicas (HR:8,0 IC95% 2,57-24,57, p=0,0003) em relação aos pacientes KRAS selvagem.

No grupo de paciente CD166 positivo, os pacientes KRAS selvagem apresentaram um risco 1,06 maior de ter linfonodos comprometidos por células neoplásicas (HR:1,06 IC95% 0,27-4,16, p=0,93) em relação aos pacientes KRAS mutado.

Pacientes com a combinação KRAS mutado/CD166 negativo apresentaram um risco 7,44 maior de ter linfonodos comprometidos por células neoplásicas (HR:7,44 IC95% 1,78-31,17, p=0,01) em relação aos pacientes KRAS selvagem/CD166 positivo.

Tabela 18 - Análise de regressão segundo modelo de riscos proporcionais de Cox por grupos e subgrupos de CD166 e KRAS para o risco de envolvimento linfonodal por células neoplásicas.

Característica	Subgrupo	HR (IC95%)	p-value
CD166 negativo		2,7 (1,08-6,66)	0,03
KRAS mutado		2,73 (1,11-6,73)	0,03
CD166 positivo	KRAS selvagem	1,06 (0,27-4,16)	0,93
CD166 negativo	KRAS mutado	8,0 (2,57-24,57)	0,0003
KRAS mutado	CD166 negativo	7,8 (2,38-25)	0,0007
KRAS selvagem	CD166 positivo	1,07 (0,29-3,94)	0,92
KRAS mutado/ CD166 negativo		7,44 (1,78-31,17)	0,01

4.4 Análise de Sobrevida pelo método não-paramétrico de Kaplan- Meier

4.4.1 Para a amostra geral

O tempo se sobrevida global na amostra geral foi em média 63 (46-79) meses e mediana 47 (34-60) meses (Gráfico 1). O tempo livre de progressão na amostra geral foi em média 14,5 (10,8-18) meses e mediana 11 (8-13,5) meses (Gráfico 2).

Gráfico 1- Curva de sobrevida Global Kaplan-Meier para a amostra geral de pacientes.

Gráfico 2. Curva de sobrevida Livre de Progressão Kaplan-Meier para a amostra geral de pacientes.

4.4.2 Para CD166

A sobrevida global dos pacientes CD166 positivo foi em média 80 meses (56,7 a 103,2 meses) e para os pacientes CD166 negativo foi em média 54,5 meses (39,5 a 69,4 meses), $p=0,811$ (Gráfico 3). A sobrevida livre de progressão dos pacientes CD166 negativo foi em média 16,3 meses (10,4 a 22 meses) e para os pacientes CD166 positivo foi em média 12,3 meses (8,7 a 16 meses), $p=0,450$ (Gráfico 4).

Gráfico 3. Curva de sobrevivência Global Kaplan-Meier de acordo com a expressão imunohistoquímica de CD166 (negativo *versus* positivo).

Gráfico 4. Curva de Sobrevivência Livre de Progressão Kaplan-Meier de acordo com a expressão imunohistoquímica de CD166 (negativo *versus* positivo).

4.4.3 Para CD44

A sobrevida global dos pacientes CD44 positivo foi em média 80,6 meses (55,6 a 105,6 meses) e para os pacientes CD44 negativo foi em média 53,6 meses (39 a 68,3 meses), $p=0,677$ (Gráfico 5). A sobrevida livre de progressão para os pacientes CD44 negativo foi em média 16,7 meses (11,3 a 22 meses) e para os pacientes CD44 positivo foi em média 10,7 meses (8 a 13,5 meses), $p=0,164$ (Gráfico 6).

Gráfico 5. Curva de Sobrevida Global Kaplan-Meier de acordo com a expressão imunohistoquímica de CD44 (negativo *versus* positivo).

Gráfico 6. Curva de Sobrevida Livre de Progressão Kaplan-Meier de acordo com a expressão imunohistoquímica de CD44 (negativo *versus* positivo).

4.4.4 Para KRAS

A sobrevida global para os pacientes KRAS mutado foi em média 59,65 meses (33,6 a 85,7 meses) e para os pacientes KRAS selvagem foi em média 59,59 meses (43,2 a 76 meses), $p=0,526$ (Gráfico 7). A sobrevida livre de progressão para os pacientes KRAS mutado foi em média 11,3 meses (7,3 a 15,2 meses) e para os pacientes KRAS selvagem foi em média 17,3 meses (11,8 a 22,7 meses), $p=0,035$ (Gráfico 8).

Gráfico 7. Curva de sobrevida Global Kaplan-Meier de acordo com o status KRAS (mutado *versus* selvagem).

Gráfico 8. Curva de sobrevida Livre de Progressão Kaplan-Meier de acordo com o status KRAS mutado *versus* selvagem).

Tabela 19 - Dados de Sobrevida Global em média para os grupos de pacientes de acordo com a expressão imunohistoquímica (positivo versus negativo) de CD44 e CD166 e de acordo com o status KRAS (selvagem versus mutado).

SG (meses)	Negativo	Positivo	p-value
CD166	54,5 (39,5-69,4)	79,2 (56,7-103,2)	0,81
CD44	53,6 (38,9-68,3)	80,6 (55,6-105,6)	0,67
	Selvagem	Mutado	
KRAS	59,6 (43,2-76)	59,6 (33,6-85,7)	0,52

Tabela 20 - Dados de Sobrevida Livre de Progressão em média para os grupos de pacientes de acordo com a expressão imunohistoquímica (positivo versus negativo) de CD44 e CD166 e de acordo com o status KRAS (selvagem versus mutado).

SLP (meses)	Negativo	Positivo	p-value
CD166	16,3 (10,4-22,2)	12,3 (8,7-15,9)	0,45
CD44	16,7 (11,3-22,1)	10,8 (8,0-13,5)	0,16
	Selvagem	Mutado	
KRAS	17,29 (11,9-22,7)	11,29 (7,3-15,2)	0,03

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, os pacientes incluídos apresentaram um tempo de evolução de doença de 3 a 5 anos, o que foi considerado suficiente para se avaliar as características evolutivas do câncer de cólon nessa amostra de pacientes incluídos, desde o diagnóstico até o período de maior risco para metástases (hepáticas/pulmonares) ou recorrência locorregional. Grande parte dos pacientes com câncer CCR apresentam metástases e progressão de doença nos dois primeiros anos de evolução após o diagnóstico (11).

Isso foi observado no estudo, pois o tempo médio de progressão da doença metastática foi 14 meses. Mais da metade dos pacientes não eram idosos (<65 anos) e apresentavam um bom *performance status* ao diagnóstico (ECOG 0/1), colaborando para um tempo de sobrevida global acima do esperado (34 a 60 meses). A literatura demonstra que o tempo de sobrevida esperado para pacientes com CCR metastático é 30 meses, aproximadamente, quando submetidos a várias linhas de quimioterapia, incluindo os anticorpos monoclonais (11).

Todos os pacientes realizaram cirurgia oncológica para ressecção do tumor primário, respeitando-se as exigências para uma cirurgia de citorredução ótima. Também foram tratados com quimioterápica adjuvante para os estádios ECII alto risco e ECIII e com quimioterapia paliativa para os estádios ECIV, de acordo com as doses e esquemas preconizados nos consensos internacionais de tratamento. Não foi objetivo deste estudo avaliar taxa de resposta ao tratamento oncológico quimioterápico recebido. Cerca de 30% dos pacientes KRAS selvagem receberam terapia anti-EGFR no cenário paliativo.

O adenocarcinoma puro foi a histologia mais frequentemente encontrada, presente em 86% dos pacientes; o que está de acordo com os dados da literatura (2). As análises estatísticas realizadas para testar a associação do tipo histológico com as outras variáveis de interesse e avaliar o risco sobre os desfechos ficaram prejudicadas devido ao desequilíbrio entre os grupos, pois o subtipo adenocarcinoma puro estava presente em 86% dos pacientes e o subtipo mucinoso

em 14% dos pacientes. O mesmo ocorreu para o grau de diferenciação tumoral. Em toda a amostra, houve apenas 5 pacientes (9%) com tumores pouco diferenciados.

Ao diagnóstico da doença, o paciente pode apresentar abdome agudo obstrutivo ou perfurativo, uma vez que o tumor de cólon pode ter um padrão de crescimento mais infiltrativo para dentro das camadas da parede da alça intestinal até chegar à perfuração ou para fora da parede em direção à luz da alça intestinal, causando obstrução (2).

Neste estudo, a perfuração e a obstrução estiveram presentes em 30% dos pacientes, demonstrando que esse subgrupo de pacientes apresentava um comportamento mais agressivo da doença (2). Aproximadamente 65% dos pacientes apresentavam tumores comprometendo além da camada muscular própria até tecidos pericólicos vizinhos (T3) e 30% dos pacientes com comprometimento além da serosa e subserosa do órgão, chegando a outros tecidos e estruturas vizinhas (T4).

Aproximadamente 70% dos pacientes do estudo apresentaram tumores com infiltração linfonodal por células neoplásicas, demonstrando a existência de uma fase inicial de disseminação loco-regional e sistêmica da doença, através dos vasos linfáticos e uma fase de disseminação tumoral para os vasos sanguíneos e desenvolvimento de metástases à distância (2,8,10).

Setenta por cento dos pacientes deste estudo apresentaram comprometimento linfonodal, mais de 80% dos pacientes apresentaram ECIII ou ECIV e mais de 60% apresentaram metástases sincrônicas. Entretanto a presença de disseminação linfonodal não é uma condição indispensável para que ocorra a disseminação da célula tumoral pela corrente sanguínea (2,10). Nessa amostra, observaram-se pacientes sem comprometimento linfonodal (27%) na peça operatória do tumor primário e que já apresentavam, ao diagnóstico, disseminação da doença à distância (fígado e pulmão). Essa observação demonstra que a célula tumoral pode escolher caminhos mais apropriados para a sua disseminação e sobrevivência, a depender de sua programação genética, determinando a expressão de proteínas intracelulares e moléculas na superfície da membrana celular promovendo interações adequadas com o meio ambiente do hospedeiro (2,8,9,10).

Neste estudo não foi demonstrada associação entre as características clínicas e histopatológicas com a expressão CD44, CD166 e *status* KRAS, de forma isolada. Porém, quando analisados, de forma conjunta, os subgrupos de pacientes de acordo com o *status* KRAS com a expressão CD44 e CD166, encontraram-se algumas associações significativas. Foi demonstrada associação entre a expressão CD44 e CD166 ($p=0,016$). Foi documentado previamente na literatura que a expressão positiva de ambos os marcadores CD44 e CD166 consegue melhor selecionar grupos de células tumorais com características de células tronco (29). Neste trabalho, não foram feitas análises de associação com CD44 positivo e CD 166 positivos entre os subgrupos segundo características clínicas e histopatológicas por tratar-se de um estudo envolvendo amostra de conveniência.

No grupo de pacientes KRAS selvagem, a associação entre CD44 e CD166 foi significativa, de modo que pacientes CD44 positivo apresentaram 6 vezes a chance de também apresentar CD166 positivo. Um dado interessante encontrado foi que, na amostra de pacientes idosos, essa associação foi mais significativa e a chance foi ainda maior (31 vezes) de o paciente CD44 positivo também apresentar CD166 positivo.

O envelhecimento aumenta o risco de desenvolver tumores de cólon pela exposição acumulada a carcinógenos e isso está associado a um aumento da expressão de marcadores de células tronco tumorais em cólon e do EGFR. Em experimentos prévios com ratos, foi dosado o mRNA de marcadores proteicos de células tronco tumorais CD133, CD44, CD166 e ALDH1 em mucosa colônica normal e observou-se que havia um aumento da expressão desses marcadores em ratos idoso, comparados a ratos jovens, e um aumento na proporção de células tronco tumorais na mucosa colônica. Observou-se também que, quando foram expostos a inibidores EGFR, houve uma inibição da expressão desses marcadores de células tronco tumorais (39).

Neste trabalho, os pacientes não idosos (67% da amostra) e os pacientes do sexo masculino (55% da amostra) apresentaram associação significativa entre a expressão CD44 e CD166, de modo que pacientes CD166 negativo tiveram mais chances de apresentar tumores KRAS selvagem. Não há relato na literatura de associação do sexo com a expressão de marcadores de células tronco tumorais

CD44 e CD166. Choi *et al.* relacionou o sexo masculino com maior expressão de CD133 (30). Isso nos leva a pensar que quando se tem a expressão positiva de um marcador de célula tronco tumoral, haverá uma chance maior de se expressar positivamente outro marcador de célula tronco tumoral, partindo-se do princípio da expansão monoclonal inicial. No grupo de pacientes do sexo masculino, ficou evidente a associação entre CD166 negativo e KRAS selvagem; podendo sugerir uma via de coexpressão e modulação entre KRAS e CD166.

Neste estudo, objetivou-se analisar a expressão imunohistoquímica de marcadores de células tronco tumorais CD44 e CD166 e associar essa expressão com o *status* de gene KRAS (mutado e selvagem). Nesta série de pacientes, a frequência de expressão positiva de CD44 (41,4%) e a de CD166 (43%) nas células tumorais foram semelhantes às encontradas na literatura. Estudos prévios demonstram 31% das células tumorais no tumor primário expressando CD166 positivo na membrana celular e 59% no citoplasma, 52% para as isoformas de CD44 positivo, enquanto que 60% para CD44 positivo variante 6 (2,31,34).

O gene KRAS está envolvido na carcinogênese de muitos tumores. No câncer de cólon, o oncogene KRAS encontra-se mutado em cerca de 41%; o que está de acordo com os achados deste trabalho (2,10). Vinte e oito pacientes (48,3%) nesta série apresentaram KRAS mutado no tumor primário.

O principal sítio de metástase no câncer de cólon documentado neste trabalho foi o fígado, o que está de acordo com os dados encontrados na literatura, seguido do pulmão (2,15). Cerca de 80% dos pacientes (47 pacientes) apresentaram metástases hepáticas e 45% dos pacientes (27 pacientes) apresentaram metástases pulmonares, sendo que alguns pacientes apresentaram metástases hepáticas e pulmonares ao mesmo tempo.

Observou-se que a expressão do CD44 influenciou o risco de o paciente desenvolver metástase hepática em algum momento da sua evolução desde o diagnóstico; de modo que pacientes com CD44 positivo tiveram 3,7 vezes de ter metástases hepáticas em relação ao CD44 negativo de forma significativa. Isso também foi observado no grupo de pacientes KRAS mutado (8 vezes) que

expressavam CD44 positivo, demonstrando a influência aditiva negativa do status mutado do gene KRAS em combinação com CD44 positivo sobre o risco de metástase hepática, de forma significativa.

Porém, o *status* KRAS selvagem não influenciou de forma significativa o risco de o paciente apresentar metástase hepática. Pacientes com a combinação KRAS selvagem/CD44 positivo apresentaram um risco 5 vezes maior de ter metástase hepática em relação aos pacientes KRAS mutado/CD44 negativo, de forma significativa, sugerindo que a influência CD44 positivo possa ser maior do que o *status* KRAS mutado. Na literatura, não há nenhum trabalho que demonstra a associação do *status* KRAS e a expressão CD44 sobre o risco de metástase hepática.

De forma isolada, a análise do *status* KRAS, sem estar combinado com a análise da expressão CD44 ou do CD166, não influenciou o risco de metástase hepática, nessa amostra de pacientes. O estudo RASCAL demonstrou que CCR com mutação KRAS tem mais chances de desenvolver metástases pulmonares e em estudo chinês demonstrou que a mutação KRAS em CCR aumentou o risco de metástases hepáticas (40,41). Alguns trabalhos já realizados não demonstraram a associação CD44 e metástases hepáticas e pulmonares (7,31,35,36).

A expressão imunohistoquímica do CD166 não alterou o risco de o paciente apresentar metástase hepática ao final do seguimento, porém se observou a influência negativa do CD166 positivo sobre o risco muito discretamente (HR:1,56) em relação ao CD166 negativo. É descrito na literatura que a marcação positiva de CD166 se relaciona como fator de progressão de doença tumoral (33).

No grupo de pacientes KRAS selvagem, a expressão CD166 positivo demonstrou um maior risco (HR:2,35) de metástases hepáticas em relação ao CD166 negativo, não significativamente. Diferentemente do que ocorreu com o CD44, a associação do KRAS selvagem/CD166 positivo gerou um impacto maior sobre o risco de metástase hepática (HR:2,56) em relação ao KRAS mutado/CD166 negativo, porém isso não foi significativo; com isso pode-se pensar que o CD166 positivo tem maior influência sobre o risco de desenvolver metástases hepáticas em relação ao *status* KRAS.

Portanto, a análise conjunta do KRAS e do CD44 identificou um subgrupo de pacientes com um risco significativo de evoluir com metástase hepática que foi o subgrupo de pacientes KRAS mutado e CD44 positivo. A expressão do CD166 parece ter menos influência sobre o risco de metástases hepáticas. Mas conseguiu identificar um subgrupo de pacientes que possa ter mais risco de metástase hepática que são os pacientes KRAS selvagem e CD166 positivo.

Para metástases pulmonares, a expressão positiva de CD44 foi associada com o aparecimento de metástases em algum momento da doença. Isso não é descrito na literatura. Pacientes com CD44 positivo tiveram maior risco de ter metástase pulmonares (5,3 vezes) em relação ao CD44 negativo de forma significativa. Isso se refletiu também dentro dos subgrupos de pacientes KRAS mutado e KRAS selvagem, demonstrando o impacto negativo do CD44 positivo sobre o risco de o paciente evoluir com metástase pulmonar.

Assim como foi observado para as metástases hepáticas, o *status* KRAS se analisado de forma isolada, ou seja, não associado a marcação CD144 e CD166, não demonstrou influência sobre o risco de o paciente ter metástase pulmonares de forma significativa; ao contrário do que se observou no trabalho do Cejas *et al.* (41). Houve um discreto aumento no risco a favor do grupo KRAS mutado; observado dentro dos subgrupos de pacientes CD44 negativo (1,24 vezes) e CD44 positivo (1,42 vezes) de forma não significativa. Dessa forma, pacientes com a combinação KRAS mutado/CD44 positivo foram os pacientes que mais apresentaram risco de evoluir com metástase pulmonar em algum momento (6,8 vezes), de forma significativa.

Com relação a marcação CD166, a sua expressão não alterou de forma expressiva o risco de o paciente ter metástase pulmonar como a expressão do CD44. Na amostra geral, observou-se um discreto aumento não significativo no risco de ter metástase pulmonar a favor da marcação positiva (HR:1,28). A associação KRAS mutado e CD166 negativo tende a aumentar o risco de metástase pulmonar e da mesma forma para a associação KRAS selvagem e CD166 positivo, porém de forma não expressiva e significativa. Portanto, parece que o CD166 negativo traz mais impacto sobre a metástase pulmonar quando combinado com o KRAS mutado e o CD166 positivo com o KRAS selvagem. Isso pode refletir formas diferentes de

interação entre o gene KRAS e o CD166 que possa determinar um tipo de marcação do CD166 mais frequente e assim levar um comportamento diferente na célula tumoral. Quando comparamos essas duas associações entre si (KRAS mutado CD166 negativo *versus* KRAS selvagem e CD166 positivo), parece não haver diferença no risco de metástase pulmonar entre elas.

Diferentemente do que foi observado com o CD44, não se identificou uma combinação de KRAS e CD166 que aumente de forma significativa o risco de os pacientes apresentarem em algum momento, desde o seu diagnóstico, metástase pulmonar.

Portanto, sem um paciente tiver a análise do status da mutação do gene KRAS por RT-PCR e dos marcadores de células tronco tumorais por imunohistoquímica na peça cirúrgica do tumor primário e apresentar a combinação KRAS mutado, CD166 negativo e CD44 positivo ou KRAS selvagem, CD166 positivo e CD44 positivo, terá maior risco de metástases hepática e pulmonar. Isso seria importante para que se identifique grupos de maior risco e com isso individualizar a terapia e o seguimento oncológicos.

Sabe-se que a ausência ou menor expressão de marcação de células tronco tumorais, como CD166 e CD44, estão relacionados a tumorigênese, invasividade e disseminação tumoral (23,24). Neste estudo, observou-se que pacientes com tumores CD166 negativo, KRAS mutado e a combinação CD166 negativo/ KRAS mutado apresentaram um expressivo risco de ter linfonodos comprometidos por células neoplásicas de forma significativa, sendo esse risco maior ainda quando se expressa CD166 negativo e KRAS mutado, demonstrando que a não expressão de marcadores de células tronco potencializa a capacidade de disseminação tumoral representada pelo comprometimento dos linfonodos por células tumorais e que isso é modulado positivamente pela mutação KRAS. Lugli *et al.* já havia demonstrado em seu trabalho a associação CD166 negativo e a disseminação linfonodal de forma significativa (35).

A mutação KRAS tanto nos subgrupos CD44 e CD166 seja, negativo ou positivo, aumenta o risco de comprometimento linfonodal também. Nesta amostra de pacientes, a expressão do CD44 isoladamente não interferiu de forma significativa no risco de comprometimento linfonodal. Observou-se um discreto aumento no risco

a favor do grupo de pacientes CD44 positivo. Quando se avaliou a combinação status KRAS e o CD44, encontrou-se um risco significativo de comprometimento linfonodal a favor de pacientes com tumores KRAS mutado e CD44 positivo (3,33 vezes). Diante disso, sugere-se que a influência da mutação KRAS seja maior do que a da marcação CD44 sobre a característica de comprometimento linfonodal.

Pode ser que entre o CD166 e o CD44, o primeiro tenha maior influência sobre a disseminação tumoral para os vasos linfáticos. A influência da via do EGF já foi demonstrada em estudos experimentais de forma que há uma maior expressão de células tronco nas células tumorais influenciado pela ação de moduladores da via do EGF (26). Por isso é que notamos a influência maior do KRAS mutado, no qual a via do EGF está mais ativa, sobre o efeito da expressão positiva dos marcadores CD44 e CD166.

Os pacientes desta amostra sobreviveram em média por 63 meses, tempo acima do esperado para um grupo de pacientes com câncer de cólon metastático. Segundo dados da literatura, pacientes com doença avançada metastática, mesmo submetidos a terapia oncológica quimioterápica, atinge uma sobrevida de 24 a 30 meses (11,12). Não foi objetivo deste trabalho avaliar resposta terapêutica ao esquema quimioterápico utilizado. Grande parte dos pacientes da pesquisa apresentavam um bom performance clínico (93% ECOG 0/1) e cerca de 30% dos pacientes KRAS selvagem foram tratados em algum momento com cetuximabe; talvez essas características contribuíssem de forma significativa para um tempo de sobrevida maior.

O tempo de sobrevida global de pacientes com KRAS mutado não foi diferente daqueles com KRAS selvagem. Algumas séries de alguns estudos demonstram que paciente com KRAS mutado apresentam um tempo de sobrevida global menor (40,41). Não foi o que verificamos neste estudo; talvez porque o tempo de seguimento desses pacientes foi curto e a quantidade de pacientes incluídos neste estudo foi pequeno.

Pacientes CD44 negativo viveram menos, em média 53,6 meses, em relação ao pacientes CD44 positivo; o mesmo aconteceu com paciente CD166 negativo, em média 54,5 meses, em relação aos paciente CD166 positivo. Sabe-se que a negatividade de expressão de marcadores de células tronco tumorais está

relacionada à refratariedade à terapêutica oncológica quimioterápica e à agressividade de doença, logo com um menor tempo de sobrevida global (33,34).

Os pacientes KRAS selvagem levaram um tempo maior para apresentar progressão das metástases sincrônicas ou aparecimento das metástases metacrônicas, ou seja, apresentaram um tempo livre de progressão maior (17,3 meses em média), de forma significativa, em relação aos pacientes KRAS mutado (11,3 meses em média). Essa diferença também foi observada dentro de cada subgrupo de pacientes CD44 negativo (16,7 meses em média) e CD166 negativo (16,3 meses em média). Talvez o tempo livre de progressão possa ser uma melhor forma de avaliar o impacto da doença sobre a curva de sobrevida neste trabalho, pois não necessitaria de um tempo de seguimento muito longo para se avaliar progressão, uma vez que pelos dados da literatura a progressão da maioria dos tumores acontece nos dois primeiros anos e estaríamos avaliando o comportamento inicial na neoplasia frente a um tratamento oncológico inicial (11,12,18).

Neste trabalho, os pacientes que apresentaram tumores com expressão CD44 positivo progrediram mais rapidamente do que tumores com expressão negativa, de forma não significativa se analisado isoladamente. Mas quando se associou a esta análise o status da mutação KRAS, observou-se que pacientes CD44 positivo e KRAS mutado apresentaram de forma significativa (HR:3,0) um maior risco de progressão de doença em relação aos pacientes KRAS selvagem/CD44 negativo. Esses achados estão de acordo com os dados já relatados na literatura em estudos prévios, pois para o início do processo de metastatização acontece primeiramente um processo de expansão clonal de células tronco tumorais (conversão monoclonal), maior expressão de células tronco, estimulando a uma maior proliferação e disseminação de células tumorais. Este fato demonstra também, de forma indireta, que existe uma modulação entre o status da mutação KRAS sobre a expressão de células tronco tumorais, determinando uma diferença de efeito dessa interação sobre o desfecho estudado (20,26,29,42,43).

Diferentemente do CD44, a expressão negativa de CD166 foi associada, de forma significativa, com maiores risco de progressão de doença, tanto nos subgrupos KRAS selvagem quanto KRAS mutado. Esse risco foi ainda maior quando os pacientes apresentavam KRAS mutado (HR:26,66). Isso pode demonstrar que,

no processo de disseminação tumoral, os marcadores de células tronco tumorais podem se comportar de formas diferentes como resultado de diferentes mecanismos de ação e interação com o microambiente (20,26,29, 39).

Portanto, se fôssemos traçar um perfil de marcadores CD44, CD166 em associação com o *status* KRAS, poderíamos dizer que os pacientes CD166 negativo, CD44 positivo, KRAS mutado teriam um prognóstico pior. Para esse subgrupo de pacientes, poderíamos definir um seguimento mais rígido, com exames de imagem de maior sensibilidade para detecção precoce de metástases, como, por exemplo, o PET-CT. Outra estratégia seria definir os pacientes com esse perfil de expressão com pacientes mais propensos a disseminação tumoral e, assim, propor estudos clínicos randomizados para avaliar o benefício de instituir terapias específicas, direcionadas a esse subgrupo de células tronco tumorais (25).

Esses achados podem categorizar pacientes de modo que eles possam receber uma estratégia de tratamento oncológico e seguimento pós-tratamento de forma mais individualizada. Estudos de caráter prospectivos com uma maior amostragem de pacientes se fazem necessários para explorar melhorar os achados deste trabalho e determinar com mais clareza o papel desses marcadores de células tronco tumorais e sua associação com o gene KRAS no câncer de cólon.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstra que existe uma interação e sinergismo sobre o desfecho dos pacientes com tumor de cólon na expressão de marcação imunohistoquímica de células tronco tumorais em tecido tumoral primário de cólon e o status da mutação KRAS. Foi possível determinar e classificar alguns pacientes de acordo com a expressão da marcação imunohistoquímica de CD44 e CD166 e associá-las ao status de mutação do KRAS, identificando subgrupos de pacientes que possuem um maior risco de recorrência, recidiva, comprometimento linfonodal e desenvolvimento de metástases hepáticas e pulmonares.

Os resultados deste estudo sugerem, nessa amostra de pacientes, que não houve associação entre as características clínicas e histopatológicas com a expressão de CD44, CD166 e status do gene KRAS.

Pacientes com KRAS mutado expressaram mais CD166 positivo, o que não foi demonstrado para o CD44. No grupo KRAS selvagem, os idosos e aqueles do sexo masculino, com expressão positiva de CD44 tiveram maiores chances de também expressar CD166 positivo. No grupo de pacientes não idosos e no sexo masculino, pacientes que expressavam CD166 negativo tiveram mais chances de ter KRAS selvagem.

O status da mutação KRAS e a expressão de CD44 e de CD166 não mostraram influência no risco de óbito de forma independente. Demonstrou-se, entretanto, a influência negativa da expressão CD44 positivo e do CD166 negativo sobre a progressão da doença e, que a combinação CD44 positivo com KRAS mutado e CD166 com KRAS mutado associaram-se a um impacto ainda maior sobre o risco de progressão da doença.

O risco de o paciente evoluir com metástases hepáticas e pulmonares foi maior em pacientes CD44 positivo e este fato foi potencializado com a associação ao *status* mutado do gene KRAS. Por outro lado, o comprometimento linfonodal foi afetado pela expressão negativa do CD166 e este fato também foi potencializado com a associação ao *status* mutado do gene KRAS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/tabelaestados.asp?UF=BR>. Acesso em 07/10/2013.
2. De Vita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. Cancer Principles E Practice of Oncology, 8th edition. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
3. World Cancer Report. 42 - Section 1 - Global Cancer Control Chapter. 1.3: Worldwide Cancer Burden – 43. 2008.
4. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990; 61: 759-67.
5. Roy S, Majumdar APN. Signaling in colon cancer stem cells. Journal of Molecular Signaling. August 2012.;7:11.
6. Allen, WL, Johnston, PG. Role of genomic markers in colorectal cancer treatment. J Clin Oncol, n. 23, p. 4545-52, 2005.
7. Langan RC, Mullinax JE, Ray S, Raiji MT, Schaub N, Xin HW, Koizumi T, Steinberg SM, Anderson A, Wiegand G, Butcher D, Anver M, Bilchik AJ, Stojadinovic A, Rudloff U, Avita I. A Pilot Study Assessing the Potential Role of non-CD133 Colorectal Cancer Stem Cells as Biomarkers. Journal of Cancer. Jun 2012.;3: 231-240.
8. American Joint Committee on Cancer –AJCC. Cancer Staging Handbook, 7th edition. New York. Springer, 2009.
9. Waldner MJ, Neurath, MF. The molecular therapy of colorectal cancer. Molecular Aspects of Medicine 2010; 31: 171-178.
10. Ferreira CG, Rocha JC. Biologia Molecular. Carcinogênese - aspectos moleculares. Oncologia – aspectos moleculares, 2ª edição. Editora Atheneu, 2004.
11. Kelly H, Golberg RM. Systemic therapy for metastatic colorectal cancer: current options, current evidence. J Clin Oncol 2005; 23: 4553-60.

12.NHI consensus conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. JAMA 1990; 264(11):1444-1450.

13.Allen WL, Johnston PG. Role of genomic markers in colorectal cancer treatment. J Clin Oncol 2005;23:4545-52.

14.Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, Humblet Y, Bouché O, Mineur L, Barone C, Adenis A, Tabernero J, Yoshino T, Lenz HJ, Goldberg RM, Sargent DJ, Cihon F, Cupit L, Wagner A, Laurent D. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet. Jan 2013.;26(381):303-12.

15.Andreyev HJN, Norman AR, Cunningham D et al. Kirsten ras mutation in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. Journal of the National Cancer Institute 1998; 90(9): 675-684.

16.Milano G, Etienne-Grimaldi MC, Dahan L, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status and Kras mutations in colorectal cancer. Ann Oncol 2008;19:2033-8.

17.Lievre A, Bachet JB, Boige V, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. J Clin Oncol 2008;26:374-9.

18.Garrrity MM, Burgart LJ, Mahoney MR, Windschitl HE et al. Prognostic value of proliferation, apoptosis, defective DNA mismatch repair and p53 overexpression in patients with resected Dukes B2 or C colon cancer: A North Central Cancer Treatment Group Study. J Clin Oncol 2004; 22(9):1572-1582.

19.Croce CM. Oncogene and cancer. N Engl J Med 2008; 358:204-11.

20.Quinlan M, Settleman J.Explaining the preponderance of Kras mutations in human câncer. An isoform-specific function in stem cell expansion. Cell Cycle 2008;7(10): 1322-35.

21.De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F et AL. Association of KRAS p.G13D Mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. JAMA 2010; 304(16): 1812-1820.

- 22.Sanford D, Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2009;361:2449-60.
- 23.Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. Jan 2000.;100:57–70.
- 24.Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. Mar 2011.;4(144):646-74.
- 25.Ischenko I, Seeliger H, Schaffer M, Jauch KW, Bruns CJ. Cancer Stem Cells: How can we Target them? *Current Medicinal Chemistry*. 2008.;15:3171-84.
- 26.Suzuki A, Sekiya S, Gunshima E, Fujii S, Taniguchi H. EGF signaling activates proliferation and blocks apoptosis of mouse and human intestinal stem/progenitor cells in long-term monolayer cell culture. *Laboratory Investigation*. 2010 Jul.; 90: 1425–1436.
- 27.Feng Y, Dai X, Li X, Wang H, Liu J, Zhang J, Du Y, Xia L. EGF signalling pathway regulates colon cancer stem cell proliferation and apoptosis. *Cell Prolif*. 2012 Mar.;45:413–419.
- 28.Feng Y, Bommer GT, Zhao J, Green M, Sands E, Zhai Y, Brown K, Burberry A, Cho KR, Fearon ER. Mutant Kras Promotes Hyperplasia and Alters Differentiation in the Colon Epithelium But Does Not Expand the Presumptive Stem Cell Pool. *Gastroenterology*. 2011 September.;141(3):1003–1013.
- 29.Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. Prognostic significance of the Cancer stem cell markers CD133, CD44 and CD166 in colorectal cancer. *Cancer Investigation* 2009; 27:844–850.
- 30.Choi D, Lee HW, Hur KY, Kim JJ, Park GS, Jang SH, Song YS, Jang YK, Paik SS. Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2009; 15(18): 2258-2264.
- 31.Ngan NY, Yamamoto I, Seshimo I, Ezumi K, Terayama M, Hemmi H, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Monden M. Multivariate Analysis of Adhesion Molecules Expression in Assessment of Colorectal Cancer. *Journal of Surg Oncol*. Apr 2007.;95:652–62.

- 32.Fang YJ, Zhang L, Wu XJ, Lu ZH, Li JB, Ou QJ, Zhang MF, Ding PR, Pan ZZ, Wan DS. Impact of ER β and CD44 expression on the prognosis of patients with stage II colon cancer. *Tumor Biol.* May 2012.;33:1907–14.
- 33.Weichert W, Kno“sel T, Bellach J, Dietel M, Kristiansen G. ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Pathol.* Apr 2004.;57:1160–64.
- 34.Tachezy T, Zander H, Gebauer F, Marx A, Kaifi JT, Izbicki JR, Bockhorn M. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166) prognostic power for colorectal cancer patients. *J Surg Res.* Sep 2012.;177(1):e15-20.
- 35.Lugli A, Iezzi G, Muraro MG, Mele V, Tornillo L, Spagnoli G, Terracciano L, Zlobec I. Prognostic impact of the expression of putative cancer stem cell markers CD133, CD166, CD44s, EpCAM, and ALDH1 in colorectal cancer. *Br J Cancer.* Jul 2010.;27(103):382 –90.
- 36.Ishida T. Immunohistochemical Expression of the CD44 Variant 6 in Colorectal Adenocarcinoma. *Jpn J Surg.* Jul 2000.;30:28-32.
- 37.Galizia G, Gemei M, Del Vecchio L, Zamboli A, Di Noto R, Mirabelli P, Salvatore F, Castellano P, Orditura M, De Vita F, Pinto M, Pignatelli C, Lieto E. Combined CD133/CD44 expression as a prognostic indicator of disease-free survival in patients with colorectal cancer. *Arch Surg.* Jan 2012.;147(1):18-24.
- 38.Hidalgo, A., Pina, P., Guerrero, G., Lazos, M. and Salcedo, M. A simple method for the construction of a small format tissue arrays. *J. Clin. Pathol.* 2003.;56: 144-46.
- 39.Nautiyal J, Du J, Yu Y, Kanwar SS, Levi E, Majumdar APN. EGFR regulation of colon cancer stem-like cells during aging and in response to the colonic carcinogen dimethylhydrazine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Jan 2012.;302:655-63.
- 40.Cejas P, GomezML, Aguayo C, Madero R, Carpen JC, Iniesta CBB, Barriuso J, Garcia VM, Larrauri J, Lopez R, Casado H, Baron MG, Feliu J. KRAS Mutations in Primary Colorectal Cancer Tumors and Related Metastases: A Potential Role in Prediction of Lung Metastasis. *PLoS ONE.* Dec 2009.;4(12): e8199.
41. Z Li, Y Chen, D Wang, G Wang, L He, J So. Detection of Kras Mutations and Their Associations with Clinicopathological Features and Survival in Chinese Colorectal Cancer Patients. *J Int Med Res.* 2012.;40:1589-98.

42. Margaret P. Quinlan MP, Quatela SE, Philips MR, Settleman J. Activated Kras, but not Hras or Nras, may initiated tumors of Endodermal Origin via Stem Cell Expansion. *Molecular and Cellular Biology*. 2008; 28(8): 2659–2674.

43. Vitiani LR, Fabrizio E, Palio E, Maria R. Colon cancer stem cells. *J Mol Med*. Sep 2009; 87:1097–1104.

ANEXO A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Protocolo de Pesquisa: **“Estudo da associação entre o gene KRAS e células tronco tumorais com características clínico-patológicas e sobrevida no câncer de cólon metastático”**

Pesquisadores: Pós Graduanda: Dra Karen Bento Ribeiro
Profª Drª Fernanda Maris Peria – pesquisadora responsável

O(A) Sr(a).está sendo acompanhado no Serviço de Oncologia Clínica deste hospital para tratamento/ seguimento de uma neoplasia (tumor) localizada inicialmente no intestino grosso (cólon-retos). Quando o senhor fez a biopsia ou cirurgia da lesão no intestino para confirmar o diagnóstico de tumor, este material foi armazenado pelo Serviço de Patologia deste hospital. Neste momento, gostaríamos de convidar o Sr (a) a estar participando deste estudo onde não modificaremos em nada o tratamento e o seguimento do senhor. Trata-se de um estudo onde utilizaremos parte deste tecido tumoral armazenado para realizar estudos envolvendo moléculas capazes de ajudar a identificar a agressividade do tumor e a possível chance de ter uma boa resposta ao tratamento com quimioterapia. Também faz parte deste estudo analisar informações clínicas anotadas em seu prontuário médico e laudos dos exames que o Sr (a) realizou antes, durante e após o término do seu tratamento.

Gostaríamos de informar que estes resultados podem ajudar outros pacientes e a própria equipe médica a entender de forma mais precisa qual paciente que realmente terá uma boa resposta com redução do tumor usando este tipo de tratamento com quimioterapias.

Informamos também que não será realizada nenhuma outra coleta de material biológico (sangue ou tecido tumoral), que não será administrado nenhuma outra medicação, ou seja, que não haverá qualquer intervenção com o Sr (a) ou seu tratamento.

A sua participação em nosso estudo é voluntária e informamos que esta pesquisa não promoverá nenhum risco adicional ao Sr (a) ou ao seu tratamento. É importante lembrar que este é apenas um convite e se o Sr (a) não aceitar participar de nosso estudo não haverá prejuízo nenhum para o Sr (a) ou qualquer diferença em seu tratamento. Em aceitando participar do evento, informamos que o Sr (a) poderá desistir do estudo a qualquer momento, sem que isto interfira com o atendimento ou tratamento que o Sr (a) está recebendo.

Destacamos que manteremos a confidencialidade de qualquer informação que possa comprometer o sigilo ou a identificação dos participantes do estudo. Todas as informações obtidas serão utilizadas exclusivamente para o presente estudo.

Informamos também que a participação do Sr (a) no estudo não implicará em custo nenhum e que também não haverá recebimento de nenhum tipo de remuneração.

Desde já, agradecemos sua participação em nosso estudo.

Eu, _____, _____ anos,

Reg HC Nº _____ aceito participar de forma livre e esclarecida do estudo ***“Estudo da associação entre o gene KRAS e células tronco tumorais com características clínico-patológicas e sobrevida no câncer de cólon metastático”*** estando de acordo com as condições do mesmo.

Nome do participante _____

Assinatura do participante:

Nome do Pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador:

Testemunha 1: _____

Testemunha 2: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

ANEXO B

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 08 de fevereiro de 2012

Ofício nº 435/2012
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **“CORRELAÇÃO DO “STATUS” DO GENE K-ras (MUTADO OU SELVAGEM) E SUAS MUTAÇÕES ESPECÍFICAS COM A ANGIOGÊNESE, CÉLULAS TRONCO TUMORAIS E CRITÉRIOS CLÍNICOS NO ADENOCARCINOMA COLON-RETAL METASTÁTICO”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 339ª Reunião Ordinária realizada em 06/02/2012, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 14277/2011.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR^a. MARCIA GUTMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras
PROF^a. DR^a. FERNANDA MARIS PERIA
KAREN BENTO RIBEIRO
Depto. de Clínica Médica – Divisão de Oncologia