

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

Suziene Caroline Silva Cardoso

Análise da expressão imunoistoquímica da *Checkpoint Kinase - 2* no
Carcinoma epidermóide da cavidade oral

Ribeirão preto

2018

SUZIENE CAROLINE SILVA CARDOSO

**Análise da expressão imunoistoquímica da *Checkpoint Kinase – 2*
no Carcinoma epidermóide da cavidade oral**

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

Dissertação apresentada ao
Departamento de Patologia e Medicina
Legal da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Área de Concentração: Patologia
Opção: Patologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Alfredo Ribeiro da Silva

Ribeirão Preto

2018

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

Cardoso, Suziene Caroline Silva

Análise da expressão imunoistoquímica da *Checkpoint Kinase – 2*
no Carcinoma epidermóide da cavidade oral

Ribeirão Preto, 2018.

46 páginas

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração:
Patologia. Opção: Patologia Experimental

Orientador: Ribeiro-Silva, Alfredo.

1. Câncer oral. 2. Carcinoma epidermóide oral. 3.
Biomarcador. 4. Sobrevida. 5. Chk2

FOLHA DE APROVAÇÃO

Suziene Caroline Silva Cardoso

Análise da expressão imunoistoquímica da *Checkpoint Kinase – 2* no Carcinoma epidermóide da cavidade oral

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

Área de Concentração: Patologia

Opção: Patologia Experimental

Aprovada em: 12 de Novembro de 2018.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esta dissertação a Deus, que toda honra e glória seja dada a Ele.

Aos meus pais, José Wilson e Susi Mara, e ao meu esposo, Flávio, que dão
sentido a minha vida.

Amo vocês!

Agradecimentos

A Deus, por fazer todas as coisas cooperarem para o meu bem.

Ao Prof. Dr. Alfredo Ribeiro-Silva, pela oportunidade concedida e pela confiança.

Às técnicas, Laura e Márcia, e aos colegas de departamento pela ótima convivência.

À Andressa Duarte, companheira de laboratório, que se tornou uma grande amiga, obrigada pela infinita paciência comigo.

Aos meus pais, José Wilson e Susi Mara, por lutarem incansavelmente para que fosse possível eu chegar até aqui.

Ao meu esposo, Flávio, por mudar toda sua vida se mudando para Ribeirão Preto, mesmo em meio à dificuldades, para que eu possa realizar meus sonhos.

Aos meus tios, Pedro e Izabel, por terem me abrigado, em sua casa, com muito carinho em Ribeirão Preto.

Aos meus amigos da ABU-RP (Aliança Bíblica Universitária), que tornaram o caminho mais fácil em Ribeirão Preto.

Aos meus amigos e família por toda força, apoio e compreensão.

À CNPq pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*“O cavalo prepara-se para o dia da batalha, mas do Senhor vem
a vitória.”*

Provérbios 21:31

RESUMO

Resumo

CARDOSO, Suziene Caroline Silva. **Análise da expressão imunoistoquímica da *Checkpoint Kinase - 2* no Carcinoma epidermóide da cavidade oral.** 2018. 46 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil., 2018.

O carcinoma epidermóide da cavidade oral (CEO) é o tumor maligno mais frequente da região da cabeça e pescoço. O Chk2 (*Checkpoint kinase 2*) é considerado um supressor tumoral que atua na resposta celular ao dano do DNA. Entretanto, a relação do Chk2 entre CEO ainda não está compreendida. O objetivo deste estudo foi avaliar a imunoexpressão do Chk2 nos CEOs e associar sua expressão com parâmetros clínico-patológicos de importância prognóstica, incluindo a sobrevida global, sobrevida livre de doença e livre de metástase. A expressão de Chk2 foi analisada em 101 amostras de pacientes com CEO por meio da técnica de imunoistoquímica e foi positiva em 97,11% dos nossos casos com CEO, com isso, estratificamos apenas os casos de marcação positiva, e dividimo-los em alta expressão (> 66%) com 58 casos e baixa expressão (<66%) com 43 casos, e excluímos os casos negativos (n=3) de nossa análise, pois o número de casos com expressão negativa para Chk2 seria inclusivo para realizarmos as análises estatísticas. A positividade de Chk2 na maioria dos nossos casos sugere que o Chk2 possa estar envolvido na patogênese desses tumores, porém em nosso trabalho, a expressão de Chk2 não se associou com os parâmetros prognósticos. Não houve diferença entre a sobrevida global, sobrevivência livre de metástases e sobrevida livre de doença de acordo com a marcação de Chk2. Em conclusão, em nossos achados, o Chk2 não pode ser considerado como um biomarcador prognóstico do carcinoma de células epidermóides da cavidade oral.

Palavras-chave: *Checkpoint Kinase 2* (Chk2). Carcinoma epidermóide oral (CEO). Sobrevida. Biomarcador.

ABSTRACT

Abstract

CARDOSO, Suziene Caroline Silva. **Expression immunohistochemistry analysis of Checkpoint Kinase - 2 in oral squamous cell carcinoma.** 2018. 46 p. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – Department of Pathology of the School of Medicine of Ribeirao Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Squamous cell carcinoma of the oral cavity (CEO) is the most frequent malignant tumor of the head and neck region. Chk2 (Checkpoint kinase 2) is considered a tumor suppressor that acts on the cellular response to DNA damage. However, the Chk2 relationship between CEO is not yet understood. The objective of this study was to evaluate the Chk2 immunoexpression in the CEOs and to associate their expression with clinical-pathological parameters of prognostic importance, including global survival, disease-free survival, and metastasis-free. The expression of Chk2 analyzed in 101 samples of patients with CEO using the technique of immunohistochemistry and was positive in 97.11% of our cases with CEO. We stratified only the cases of positive marking, and we divided them in high (> 66%) with 58 cases and low expression (<66%) with 43 cases, and we excluded the negative cases from our analysis, since the number of cases with negative expression for Chk2 would be inclusive for statistical analysis. The positivity of Chk2 in most of our cases suggests that Chk2 may be involved in the pathogenesis of these tumors, but in our study, the expression of Chk2 not associated with the prognostic parameters. There was no difference between overall survival, metastasis-free survival, and disease-free survival according to Chk2 labeling. In conclusion, in our findings, Chk2 cannot be considered as a prognostic biomarker for squamous cell carcinoma of the oral cavity.

Keywords: Checkpoint Kinase 2 (Chk2). Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC). Survival. Biomarker

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura do Chk2	20
Figura 2- Processo de ativação do Chk2.....	20
Figura 3- Fotomicrografia da expressão nuclear de Chk2 positiva (100x).....	32
Figura 4- Fotomicrografia da expressão nuclear de Chk2 positiva (200x).....	32
Figura 5- Curva Kaplan-Meier, analisada para a sobrevida global (SG) de acordo com a expressão imunoistoquímica de Chk2 nos pacientes com carcinoma epidermóide oral.....	34
Figura 6 Curva Kaplan-Meier, analisada para a sobrevida livre de doença (SLD) de acordo com a expressão imunoistoquímica de Chk2 nos pacientes com carcinoma epidermóide oral.....	34
Figura 7 Curva Kaplan-Meier, analisada para a sobrevida livre de metástase (SLM) de acordo com a expressão imunoistoquímica de Chk2 nos pacientes com carcinoma epidermóide oral	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultado da expressão imunoistoquímica do Chk2 e dos parâmetros clínico-patológicos avaliados nesse estudo	31
Tabela 2- Relação entre a expressão imunoistoquímica do Chk2 com os parâmetros clínico-patológicos dos pacientes	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATM** - *Ataxia telangiectasia mutated*
- brca1** – *Breast cancer 1*
- Cdc25** - *Cell division cycle 25*
- Cdk1/A** - *Cyclin-dependent kinase 1/A*
- Cdk1/B** - *Cyclin-dependent kinase 1/B*
- CECP** - Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
- CEO** - Carcinoma epidermóide oral
- CHK2** ou **CHECK2** - *Checkpoint kinase 2*
- DAB** - Diaminobenzidina
- DNA** - Ácido desoxirribonucléico
- FHA** - *Forkhead associated*
- HPV** - *Human papillomavirus*
- Kb** - Quilobase
- P53** - Proteína 53
- pCHK2** – *Checkpoint Kinase 2 fosforilada*
- PIK3** - Fosfoinosítideo 3-quinase
- SG** - Sobrevida global
- SLD** - Sobrevida livre da doença
- SLF** – Síndrome de Li-Fraumeni
- SLM** - Sobrevida livre de metástase
- SQ/TQ** - Serine-glutamine (SQ)/threonine-glutamine
- TMA** - *Tissue microarrays*

Sumário

INTRODUÇÃO	17
1.1 Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP)	17
1.2 Carcinoma epidermóide oral (CEO)	17
1.3 Pontos de checagem - <i>Checkpoints</i>	18
1.4 <i>Checkpoint kinase 2</i> (Chk2)	18
1.5 Estrutura e ativação do Chk2	19
1.6 Alvos do Chk2 e sua função.....	20
1.5.1 Chk2 e o câncer	21
OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.3 Aspectos éticos	26
2.4 Casuística.....	26
2.5 Microarranjos teciduais (<i>Tissue microarrays</i>)	27
2.6 Estudo imunoistoquímico	27
2.7 Análise estatística	28
RESULTADOS	30
3.1 Características dos pacientes e dos tumores.....	30
3.2 Análises da reação de imunoistoquímica	32
3.3 Análise de sobrevida	33
DISCUSSÃO	37
CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXO I – Comitê de ética	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP)

O câncer de cabeça e pescoço tem 90% de sua origem em células escamosas e abrange toda a cavidade bucal, labial, faringe, laringe, glândulas salivares, orelha, cavidade nasal e os seios paranasais (Szturz e Vermorken, 2016). Está associado a uma alta morbidade e mau prognóstico quando diagnosticado em estágios avançados (Pimenta Amaral *et al.*, 2004). Ocupa a sexta posição como a neoplasia maligna mais frequente no mundo, representando 2-3% de todos os casos de cânceres (Leemans *et al.*, 2011; Young *et al.*, 2015).

Apenas 40-50% dos pacientes diagnosticados com o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) sobrevivem mais de cinco anos (Ferlay *et al.*, 2015); e dentre os principais fatores de risco destacam-se o consumo do tabaco e álcool. Existem outros cofatores que influenciam na tumorigênese, como a poluição ambiental, a nutrição, a falta de higiene bucal, a predisposição genética, a infecção por HPV (*Human Papillomavirus*) e do *Epster-Barr* vírus (Döbrossy, 2005).

O prognóstico e a definição da terapia restringem-se, sobretudo, em parâmetros clínicos, imaginológicos e histopatológicos, que se fundamentam no local do tumor primário e na presença ou ausência de metástase em linfonodos cervicais e metástases a distância (Thomas *et al.*, 2005).

A terapia para pacientes com CECP consiste em três tipos de tratamentos: a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, podendo ser isolados, ou combinando-os. O tratamento é agressivo, prolongado e apresenta efeitos colaterais (List *et al.*, 2002).

1.2 Carcinoma epidermóide oral (CEO)

O carcinoma epidermóide oral (CEO) é a doença maligna mais comum que acomete a região da cabeça e pescoço, excluindo o câncer de pele não melanoma da cabeça e pescoço (Chi *et al.*, 2015). A cavidade oral inclui: a mucosa labial e bucal, o assoalho da boca, a crista alveolar e a gengiva, dois terços anteriores da língua, palato duro e trígono retromolar (Chi *et al.*, 2015). Segundo os últimos dados da base do GLOBOCAN, o CEO no ano de 2012, representaram 300 mil casos, dos quais ocorreram 145 mil mortes em todo o mundo, principalmente em países menos desenvolvidos, sendo a Melanésia, a região de maior incidência, além de também

apresentar alta incidência na Europa Central e Oriental. Esse carcinoma é mais comum no sexo masculino, com aproximadamente dois terços dos casos, comparados com o sexo feminino (Ferlay *et al.*, 2015).

No Brasil, foram estimados para o ano de 2018 e 2019, 11.200 novos casos de CEO em homens e 3.500 em mulheres. (INCA, 2018).

Na fisiopatologia do CEO, biomarcadores como: tamanho do tumor, grau histológico, estágio da doença, hábitos orais e variantes genéticas podem exercer impacto no prognóstico e tratamento dos pacientes. Genes responsáveis pelo reparo do DNA são essenciais na prevenção da tumorigênese (Avci *et al.*, 2017). Estima-se que cerca de 50.000 a 500.000 agressões ocorrem ao DNA diariamente como resultado metabólico do nosso organismo. Contudo, esse número é ainda aumentado por vários fatores como: tabagismo, aditivos alimentares, toxinas e níveis de radiação (Hoeijmakers, 2009). Essas agressões podem induzir a quebra da dupla fita do DNA ocasionando dano permanente. Diante disso, nosso organismo trabalha para reparar esses danos ou eliminar essas células.

1.3 Pontos de checagem - “*Checkpoints*”

A integridade do genoma está intimamente ligada à prevenção da evolução do tumor e é fundamental que os *checkpoints* do ciclo celular estejam em estado funcional a fim de evitar a tumorigênese (Zhou e Elledge, 2000; Hoeijmakers, 2001; Bartek e Lukas, 2003). Os *checkpoints* referem-se à interrupção do ciclo celular para assegurar que processos como a replicação de DNA ou a mitose possam ocorrer sem nenhum dano às células. Quando ativados, retardam o ciclo celular, a fim de tornar possível o reparo do DNA, além de induzir a morte celular por apoptose para eliminar as células danificadas protegendo o organismo contra o câncer. Podem também identificar o dano e sinalizar a outras proteínas celulares efetoras para entrarem em ação e realizarem o reparo (Bartek e Lukas, 2003). Após o reparo, as células podem prosseguir para o ciclo celular, mas caso o dano persista, as células ficarão estacionadas em senescência ou entrarão em apoptose (Benada e Macurek, 2015).

1.4 Chk2

O gene *Checkpoint Kinase 2* (CHECK2 ou CHK2) codifica a proteína quinase Chk2 que tem a função de realizar a checagem e parada do ciclo celular, por meio da fosforilação de proteínas como o p53, cdc25C, cdc25A, brca1 que possuem funções sobre a resposta aos danos do DNA na célula. A associação do Chk2 com o processo da tumorigênese em humanos considera-o um gene supressor tumoral (Ahn *et al.*, 2004).

1.5 Estrutura e ativação do Chk2

O Chk2 está localizado no cromossomo 22q12.1, possui aproximadamente 50 quilobases (kb) e é constituído por 14 exons. Sua estrutura possui três domínios funcionais: o domínio SQ/TQ, domínio FHA (*forkhead associated*) e um domínio quinase (Figura 1) (Bartek e Lukas, 2001). O domínio SQ/TQ é um N-terminal que consiste em regiões de serina e treonina, ambas acompanhadas por glutamina. Nesse domínio, ocorre a fosforilação de treonina 68 pela ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) em resposta ao dano no DNA (Ahn *et al.*, 2000). O domínio FHA é necessário para realizar interações proteína-proteína, para suceder a dimerização do Chk2, a fim de promover fosforilações no domínio quinase do Chk2 (Lukas *et al.*, 2001). O domínio quinase, trata-se de um carbono terminal e é ativado quando os sítios treonina 383 e treonina 387 são fosforilados, ativando, assim, completamente o Chk2 (Lee e Chung, 2001).

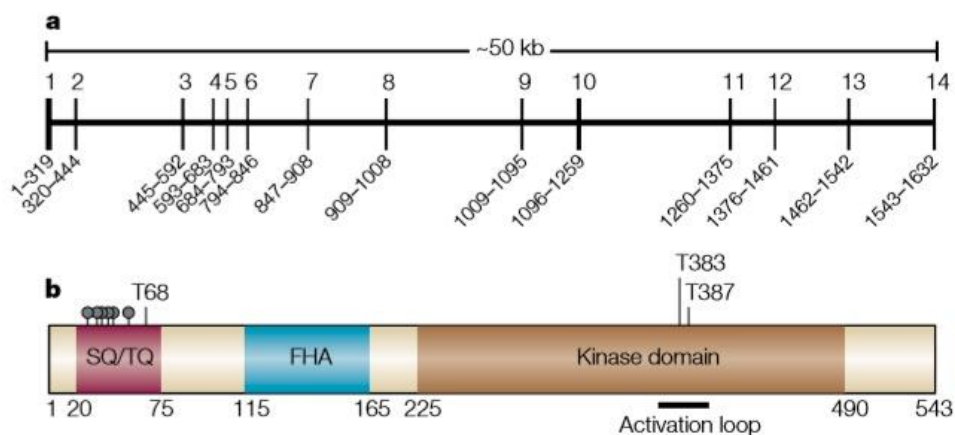


Figura 1. Estrutura do Chk2. Fonte: Bartek e Lukas, 2001.

O Chk2 permanece inativo na ausência de dano no DNA durante o ciclo celular. O dano no DNA, seja por radiação ionizante, pela quebra dos telômeros ou por medicamentos radiomiméticos, o Chk2 é fosforilado pela ATM, que é uma proteína quinase da família PIK3 (fosfoinosídeo 3-quinase), que realiza a transdução de sinais iniciais em resposta à quebra da dupla fita no DNA (Lukas *et al.*, 2001; Shiloh, 2003).

A ativação do Chk2 (Figura 2) dá-se através da fosforilação de treonina 68 pela ATM no domínio SQ/TQ, que ocasiona a oligomerização de Chk2, originando um sítio de ligação para o domínio FHA de outra proteína Chk2 (Bartek e Lukas, 2001; Bartek e Lukas, 2013). Com isso, ocorre uma homodimerização e autofosforilação do Chk2 no domínio quinase nos sítios treonina 383, 387 e serina 16. Os dímeros Chk2 se dissociam em monômeros ativos que são liberados para fosforilar moléculas efetoras dos pontos de controle (Lee e Chung, 2001; Ahn *et al.*, 2002).

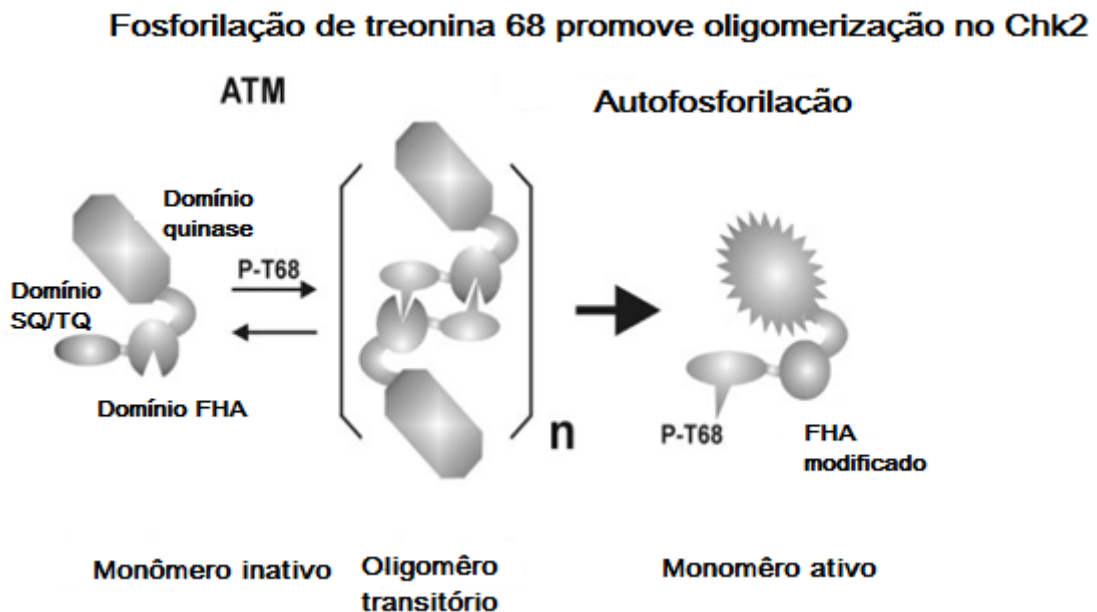


Figura 2. Processo de ativação do Chk2 (Adaptado por Ahn *et al.*, 2002).

1.6 Alvos do Chk2 e suas funções

Após ser ativado, o Chk2 envia sinais do ponto de controle para os substratos efetores que podem: parar o ciclo celular nas fases G1 para S e G2 para M; ativar o

reparo do DNA; e, em alguns casos, induzir a apoptose (Bartek e Lukas, 2001; Ahn *et al.*, 2004).

Os membros da família das fosfatases Cdc25: Cdc25A e Cdc25C são fosforilados e inativados pelo Chk2, a fim de não permitir a transição do ciclo de uma fase para a outra. A Cdc25A ativa complexos dependentes de ciclina, como o Cdk2/A e Cdk2/E, que participam da entrada e continuidade na fase S do ciclo celular. Quando a Cdc25A é fosforilada pelo Chk2, não ocorre a replicação do DNA e faz com que a progressão do ciclo na fase G1/S seja estacionada (Falck *et al.*, 2001). Já a Cdc25C, quando fosforilada pelo Chk2, não ativa a Cdk1/A e a Cdk1/B, induzindo a parada do ciclo celular em G2/M (Pommier *et al.*, 2005).

O brca1 é outro substrato que ao ser fosforilado pelo Chk2 se separa do complexo brca1-Chk2, esse evento é importante na manutenção da estabilidade genética para a sobrevivência celular após o dano no DNA (Lee *et al.*, 2000).

O Chk2 também fosforila p53 junto com MDM2, a fim de estabilizar a p53 para regular a expressão de fatores envolvidos no reparo do DNA, morte celular e controle do ciclo celular (Hirao *et al.*, 2000; Bartek e Lukas, 2001).

1.7 Chk2 e o câncer

A ausência de sinalização apoptótica dependente de Chk2 oportuniza a propagação de mutações, aumentando, assim, a instabilidade do genoma. A primeira vez que o Chk2 foi considerado um supressor de tumor foi pela descoberta de uma mutação rara no gene CHK2 que inativa o TP53 em uma subpopulação de famílias com Síndrome de Li- Fraumeni (SLF) (Bell *et al.*, 1999), uma síndrome de câncer hereditário que habitualmente está relacionada por múltiplos casos de tumores primários em crianças e jovens adultos, que incluem sarcomas, carcinomas mamários, tumores cerebrais, leucemias e tumores do córtex adrenal (Li *et al.*, 1988). Semelhante às mutações que ocorrem na SLF, em alguns estudos o Chk2 e p53 apresentaram mutações conjuntas, como no câncer colorretal (Falck *et al.*, 2001) e em carcinomas mamários (Sullivan *et al.*, 2002), sugerindo que Chk2 e p53 possuem funções correlacionadas.

As mutações somáticas de Chk2 foram encontradas em alguns casos esporádicos, envolvendo carcinomas cólon (Bell *et al.*, 1999), pulmão (Haruki *et al.*,

2000), vulva (Reddy *et al.*, 2002), mamários (Sullivan *et al.*, 2002), entre outros (Bartek e Lukas, 2003).

Grande parte dessas mutações pode ser agrupada nos três domínios do Chk2: o domínio N-terminal, o FHA e o domínio quinase C-terminal. Conforme seja o domínio haverá diferentes mutações, como diminuição ou perda da atividade quinase e defeitos no reconhecimento de seus substratos como Cdc25A, p53 ou BRCA1 (Bartek e Lucas, 2003).

O presente trabalho analisou a associação entre o Chk2 e o CEO, utilizando biópsias dos pacientes através da técnica de imunistoquímica para análise da expressão de Chk2 e a correlação com os dados clínicos.

2. OBJETIVOS

- OBJETIVO GERAL:
 - Avaliar o impacto prognóstico expressão da *checkpoint kinase* – 2 (Chk2) no carcinoma epidermóide oral.
- OBJETIVOS ESPECÍFICOS
 - Avaliar a expressão imunoistoquímica da *checkpoint kinase* – 2 (Chk2) no carcinoma epidermóide oral;
 - Avaliar a associação entre a expressão imunoistoquímica da *checkpoint kinase* – 2 (Chk2) com parâmetros clínicos-patológicos de importância prognóstica no carcinoma epidermóide oral;
 - Avaliar a relação entre a expressão da *checkpoint kinase* – 2 (Chk2) com a sobrevida global, sobrevida livre de doença e sobrevida livre de metástase em pacientes com carcinoma epidermóide oral.

3. Materiais e métodos

3.1 Aspectos éticos

Sob o nº. 6.116/2016, este trabalho foi integralmente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP/USP) (Anexo A).

3.2 Casuística

Os dados clínico-patológicos do trabalho foram obtidos analisando-se os prontuários médicos do Serviço de Arquivo Médico (SAME) do HC-FMRP/USP. Foram selecionados pacientes que tiveram o diagnóstico de CECP confirmado por biópsia, entre os anos de 2005 a 2015. Na avaliação dos prontuários médicos dos pacientes, foram obtidas as seguintes informações: idade, gênero, localização tumoral primária, consumo de tabaco e bebidas alcoólicas, classificação histológica, recidivas, metástases, óbitos, sobrevida livre de doença (SLD), sobrevida livre de metástases (SLM) e sobrevida global (SG).

Este é um trabalho de modelo experimental do tipo coorte retrospectiva.

Critérios de inclusão:

- Foram incluídos no trabalho apenas casos de CEO de mandíbula, assoalho, retromolar, boca, cavidade oral, língua, mucosa jugal, gengiva, palato duro e mucosa labial.

- Como na análise inicial grande parte dos casos foram positivos (97,11%) para Chk2, optamos por incluir no estudo apenas os casos positivos, que foram estratificados em alta e baixa expressão, >66% e <66%, respectivamente, de marcação nuclear, adaptando o trabalho de Lee (2014).

Critérios de exclusão:

- Dos 400 casos inicialmente coletados para este trabalho, foram excluídos os casos que não possuíam informações clínicas relevantes (idade, tamanho do tumor, hábitos de consumo (tabagismo e etilismo), grau histológico (bem diferenciado – grau I, moderadamente diferenciado – grau II e bem diferenciado – grau III), estadiamento, recidivas, metástases em linfonodos regionais, metástases à distância e óbito) em seus prontuários.

- Também foram excluídos casos de carcinoma epidermóide das seguintes regiões da cabeça e pescoço: nariz, orelha, pele e olhos, amígdala, orofaringe, palato mole, laringe e glote.

- Foram excluídos os casos em que não havia material suficiente para a montagem dos TMA para as reações de imunistoquímica.

Contudo, a casuística desde estudo após os critérios estabelecidos foi de 101 casos.

Para analisar a associação de Chk2 com a sobrevida dos pacientes, a A sobrevida global (SG) foi calculada a partir do diagnóstico até o último seguimento ou óbito do paciente. A sobrevida livre de doença (SLD) foi estimada como o tempo decorrido entre a ressecção tumoral e a recorrência da doença como novo tumor primário ou metástase; e a sobrevida livre de metástase (SLM) foi estimada como o tempo decorrido entre o diagnóstico até a data de óbito dos pacientes

3.3 Microarranjos teciduais (*Tissue microarrays*)

As lâminas coradas com hematoxilina e eosina foram revisadas por patologista experiente, a fim de delimitar a área mais significativa de cada tumor, para serem utilizadas para a confecção do microarranjo tecidual (TMA, do inglês *tissue microarray*). A confecção do TMA foi realizada no laboratório de Oncopatologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Dos blocos de parafina doadores, previamente marcados, foram retirados cilindros de 2mm de diâmetro e ordenados dentro de um bloco de parafina receptor utilizando o equipamento *Tissue Microarray Builder Kit* (TMA) (*Histopathology Ltd., Hungary*). A partir de cada bloco de TMA foram feitos cortes histológicos de 4µm de espessura em micrótomo rotativo convencional (Leica RM2125RTS, Alemanha).

3.4 Estudo imunistoquímico

De maneira sucinta, segue a descrição do protocolo que foi realizado em nosso laboratório: Foi utilizado um corte para cada bloco de TMA. Todas as amostras teciduais foram processadas de acordo com a rotina do laboratório e com protocolos pré-estabelecidos. Para esta técnica as reações foram realizadas

utilizando-se o *Kit Revel* Sistema de Detecção Livre de Biotina - *Biogen*. Os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em uma série de álcoois (95%, 80% e 70%), água corrente e água destilada. A recuperação antigênica foi realizada utilizando uma panela a vapor com tampão citrato à 10mM por 40 minutos, sendo resfriadas por 40 minutos.

Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena através de soluções provenientes do Kit. Após esse procedimento, incubou-se o anticorpo primário por 1 hora em temperatura ambiente. O anticorpo primário utilizado neste estudo foi o CHK2 (*Abcan, antibody NCL-chk2, clone DCS 270.1, against Prokaryotic GST-Chk2 fusion protein*) com diluição de 1:50, da *Mouse Monoclonal Antibody*.

Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram incubados com o *Reveal* Complemento por 10 minutos e então incubados com o HRP, sistema de amplificação, por 15 minutos (ambos parte do *Kit Biogen*).

A reação foi corada pelo diaminobenzidina (DAB) e contra coradas com hematoxilina. Os cortes foram novamente hidratados em água destilada e desidratados em uma série de álcoois e xilol. Em seguida, as lâminas foram cobertas por lamínula, com auxílio de Entellan (*Merck, Alemanha*).

Para controle positivo do CHK2 foi utilizado tecido da pele normal. Controles negativos foram realizados suprimindo-se os anticorpos primários. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz convencional (Leica, DM 4000B, Alemanha). Foram examinados todos os cilindros dos TMAs e qualquer marcação acima de 10% de núcleos marcados foi considerada positiva independente de sua intensidade (Di Benedetto *et al.*,2017).

3.5. Análise estatística

Cento e um casos foram inclusos na análise estatística. A análise estatística foi feita utilizando o software *SPSS* versão 22. As análises dos dados, obtidos por meio dos prontuários, foram feitas pelo teste do qui quadrado. Foi realizada a análise de sobrevivência de *Kaplan-Meier* com o teste de *log-rank*. Foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1 Características dos pacientes e dos tumores

Conforme explicado em materiais e métodos, foram incluídos no trabalho apenas CEO com localização na boca, mandíbula, assoalho da boca, trígono retromolar, cavidade oral, língua, mucosa jugal, gengiva, palato duro e lábio (mucosa). Com isso, a casuística final deste estudo foi de 101 casos de CEO.

Dos pacientes diagnosticados com

CEO, obtivemos os seguintes resultados: Cinquenta e oito (57.43%) apresentaram alta expressão para o Chk2, enquanto 43 (42.57%) apresentaram uma baixa expressão para o Chk2. Três pacientes possuíam menos de 40 anos de idade (2.97%), 49 (48.51%) possuíam entre 41 e 60 anos e 49 (48.51%) pacientes possuíam mais de 60 anos de idade. Oitenta e oito (87.13%) são homens e 13 são mulheres (12.87%). Oitenta e um pacientes são tabagistas (80.20%), 18, não tabagistas (17.82%) e 02 pacientes (1.98%) não possuíam esta informação em seus prontuários. Setenta e oito são etilistas (77.23%), 21, não etilistas (20.79%) e 02 pacientes (1.98%) não possuíam esta informação em seus prontuários. Os tumores foram classificados como grau I (27 [26.73%]), grau II (63[62.38%]), grau III (10[9.90%]) e 01 prontuário (0.99%) não foi encontrado esta informação. Sessenta e um pacientes (60.40%) foram diagnosticados sem comprometimento de linfonodos, enquanto 40 (39.60%) apresentavam metástases em linfonodos. Um (0.99%) paciente foi diagnosticado como *in situ*, 04pacientes (3.96%) foram classificados como estágio I, 11(10.89%) como II, 14(13.86%) como III, 33(32.67%) como IV e em 38(37.62%) pacientes não obtivemos esta informação. Metástases à distância ocorreram em 16 pacientes (15.84%) e 85 (84.16%) não apresentaram metástases à distância. Cinquenta e seis (55.45%) não apresentaram recorrência da doença, enquanto 43 (42.57%) apresentaram recorrência e 02 (1.98%) pacientes não apresentavam esta informação em seus prontuários. Cinquenta e sete (56.44%) vieram a óbito, 44 pacientes (43.56%) estavam em tratamento ou não possuíam informações de óbito em seus prontuários

A tabela 1 apresenta o resultado da expressão imunoistoquímica do Chk2 e dos parâmetros clínico-patológicos avaliados nesse estudo.

Tabela 1. Resultado da expressão imunoistoquímica do Chk2 e dos parâmetros clínico-patológicos avaliados nesse estudo.

Características	No (%) de pacientes (N=101)
Chk2	
Alta expressão (>66%)	58 (57.43%)
Baixa expressão (<66%)	43 (42.57%)
Gênero	
Feminino	13 (12.87%)
Masculino	88 (87.13%)
Idade	
< 40	03 (2.97%)
41 – 60	49 (48.51%)
> 60	49 (48.51%)
Estadiamento	
I	04 (3.96%)
II	11 (10.89%)
III	14 (13.86%)
IV	33 (32.67%)
<i>In situ</i>	01 (0.99%)
Sem informações	38 (37.62%)
Etilismo	
Sim	78 (77.23%)
Não	21 (20.79%)
Sem informações	02 (1.98%)
Tabagismo	
Sim	81 (80.20%)
Não	18 (17.82%)
Sem informações	02 (1.98%)
Grau histológico	
I	27 (26.73%)
II	63 (62.38%)
III	10 (9.90%)
Sem informações	01 (0.99%)
Metástase linfonodos	
Sim	40 (39.60%)
Não	61 (60.40%)
Metástase à distância	
Sim	16 (15.84%)
Não	85 (84.16%)
Recidiva	
Sim	43 (42.57%)
Não	56 (55.45%)
Sem informações	02 (1.98%)
Óbito	
Sim	57 (56.44%)
Não ou sem informações	45 (43.56%)

4.2 Análises da reação de imunoistoquímica

Na análise inicial, a expressão imunoistoquímica de Chk2 foi evidenciada na maioria dos casos avaliados (97.11%). Conforme explicado em materiais e métodos, entretanto, foram incluídos no estudo apenas casos positivos para o Chk2. Deste modo, adaptamos o trabalho de Lee (2014) e estratificamos os casos positivos em alta e baixa expressão, >66% e <66%, respectivamente, de marcação nuclear (Figura 03 e 04).

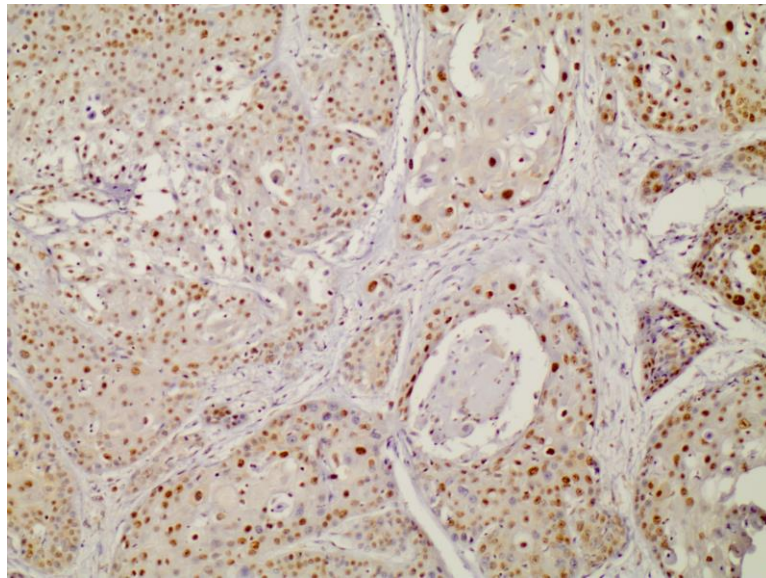


Figura 3 - Fotomicrografia da expressão nuclear de Chk2 positiva (100x)

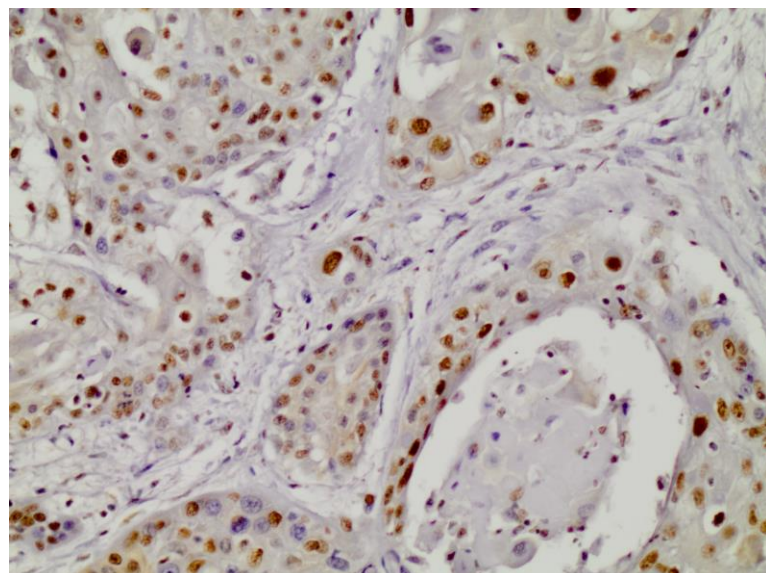


Figura 04 - Fotomicrografia da expressão nuclear de Chk2 positiva (200x)

Cinquenta e oito pacientes (57.43%) apresentaram alta expressão para o Chk2, enquanto 43 (42.57%) apresentaram uma baixa expressão para o Chk2. Não

houve correlação estatística do Chk2 com nenhum dos parâmetros clínico-patológicos avaliados (Tabela 2).

Tabela 2. Relação entre a expressão imunoistoquímica do Chk2 com os parâmetros clinicopatológicos dos pacientes

Características	Chk2 alta expressão	Chk2 baixa expressão	p valor
Total	58	43	
Gênero			
Feminino	08	05	0,748
Masculino	50	38	
Idade			
<40	01	02	0,574
41 – 60	27	22	
> 60	30	19	
Estadiamento			
I	01	03	0,243
II	09	02	
III	07	07	
IV	19	14	
<i>In situ</i>	01	00	
Etilismo			
Sim	45	33	0,663
Não	11	10	
Tabagismo			
Sim	47	34	0,534
Não	09	09	
Grau histológico			
I	12	15	0,302
II	39	24	
III	06	04	
Metástase linfonodos			
Sim	23	17	0,990
Não	35	26	
Metástase distância			
Sim	09	07	0,917
Não	49	36	
Recidiva			
Sim	24	19	0,756
Não	33	23	
Óbito			
Sim	31	25	0,639
Não ou sem informações	27	18	

4.3 Análise de sobrevida

O período de seguimento dos pacientes deste estudo variou de 0 a 127 meses (média de 35,30 meses). Utilizando-se a análise de sobrevida de *Kaplan-Meier* com

o teste de *log-rank* não foram encontradas diferenças significantes em relação à SG, SLD e a SLM com o Chk2, ($p=0,886$), ($p=0,426$) e ($p=0,706$) respectivamente (Figuras 05, 06 e 07)

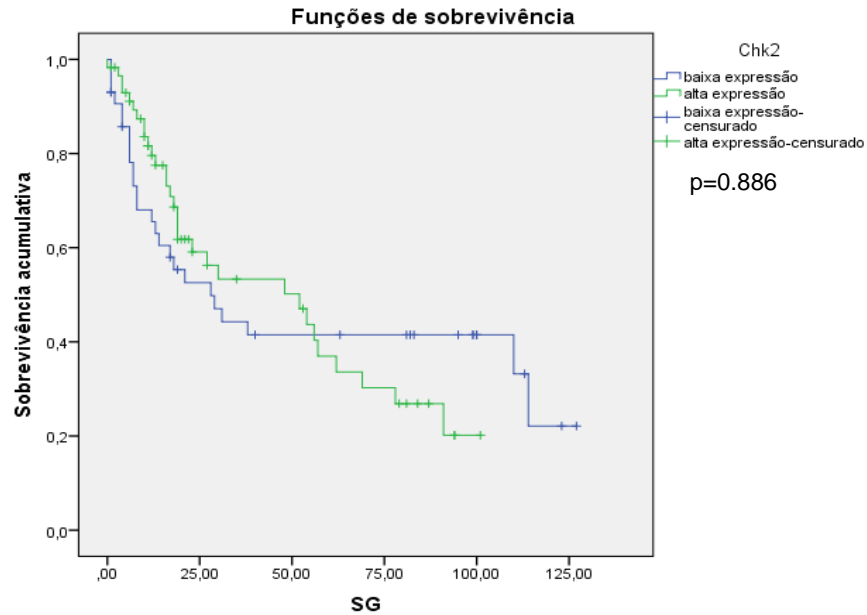


Figura 5 - Curva Kaplan-Meier, analisada para a sobrevida global (SG) de acordo com a expressão imunoistoquímica de Chk2 nos pacientes com carcinoma epidermoide oral.

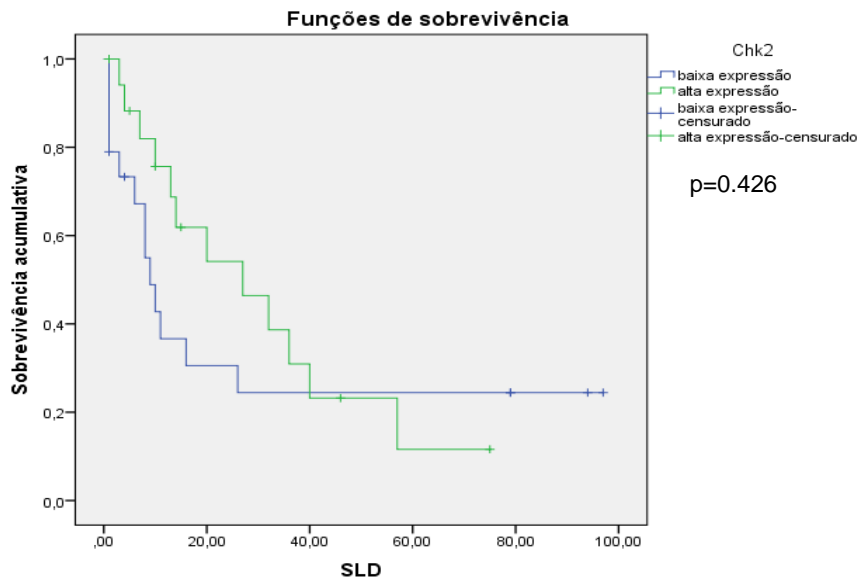


Figura 6 - Curva Kaplan-Meier, analisada para a sobrevida livre de doença (SLD) de acordo com a expressão imunoistoquímica de Chk2 nos pacientes com carcinoma epidermoide oral.

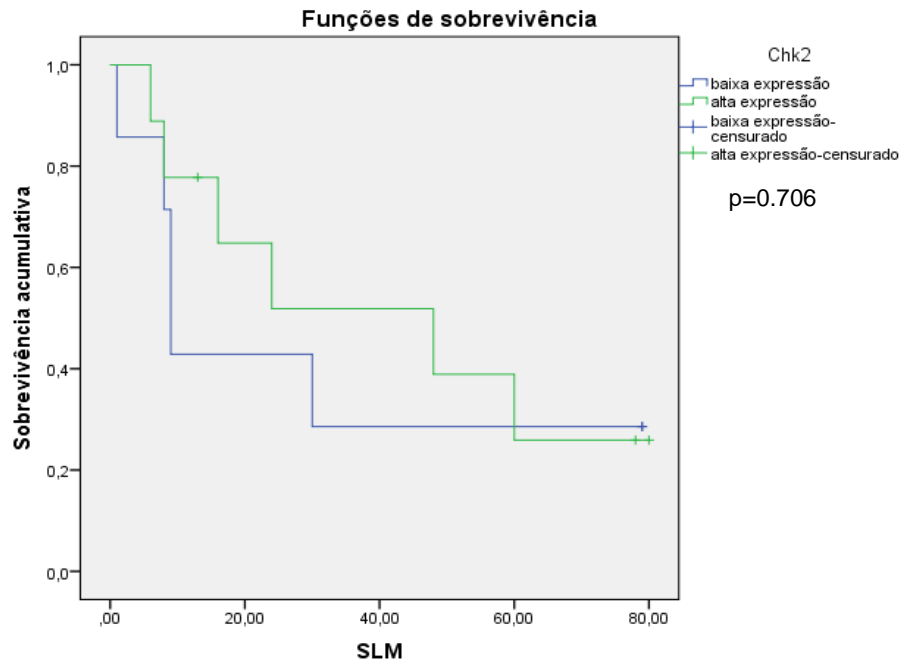


Figura 7 - Curva Kaplan-Meier, analisada para a sobrevida livre de metástase (SLM) de acordo com a expressão imunoistoquímica de Chk2 nos pacientes com carcinoma epidermoide oral.

5. Discussão

As pesquisas relacionadas ao CEO têm progredido e vários biomarcadores prognósticos e preditivos já foram descritos na literatura, entretanto, até o momento, nenhum biomarcador é unanimemente aceito para uso clínico de rotina dos pacientes (Kim *et al.*, 2014).

O Chk2 atua como um supressor tumoral e está sendo considerado um alvo promissor para fins terapêuticos e prognósticos. Muitos estudos têm associado ao Chk2 diferentes tipos de cânceres, como o carcinoma hepatocelular (Carloni *et al.*, 2017), ovário (Szymanska-Pasternak *et al.*, 2006) e bexiga (Zlowocka *et al.*, 2007). Porém, a relação entre o Chk2 e CEO ainda é pouco compreendida. Por isso, a hipótese do presente trabalho foi verificar a correlação da expressão de Chk2 com a progressão do CEO.

A expressão imunoistoquímica de Chk2 foi evidenciada na maioria dos casos avaliados (97.11%), estando em concordância com outros estudos que também demonstraram expressão do Chk2 (Ribeiro-Silva *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2018), o que sugere que o Chk2 pode estar relacionado ao processo da patogênese dessas neoplasias, assim como no CEO.

De 104 casos, três casos não apresentaram marcação para Chk2. Com isso ficamos incapacitados de realizar a análise estatística comparando a expressão imunoistoquímica positiva com a negativa, pois, assim, os nossos resultados seriam inconsistentes e inconclusivos. Então, adaptamos o padrão de marcação de Lee e colaboradores (2014) e estratificamos os casos de imunomarcção positiva acima de 66%, classificando-os como alta expressão para Chk2 e abaixo de 66% como baixa expressão. Desse modo, obteríamos resultados fidedignos e responderíamos nossa hipótese se o Chk2 poderia ser considerado um biomarcador prognóstico para o CEO.

Em trabalhos anteriores de nossa equipe, o Chk2 foi estudado a fim de verificar e compreender sua expressão em algumas neoplasias, como o carcinoma mamário (Ribeiro-Silva *et al.*, 2006) e o câncer de colorretal (Ribeiro *et al.*, 2014).

Em 2014 foi verificado a existência de associação da expressão do Chk2 em relação aos dados clínicos-patológicos obtidos por meio dos prontuários dos pacientes, onde foi visto um relação entre a expressão de Chk2 e a metástase para linfonodos no câncer de cólon e ao óbito por Ribeiro e colaboradores (2014). No trabalho de Ribeiro-Silva e colaboradores (2006), o Chk2 se associou ao estágio

avançado da doença no câncer de mama. Contudo, no presente trabalho, a expressão de Chk2 não foi associada aos parâmetros clínico-patológicos.

Nas análises de sobrevida dos pacientes, em nosso trabalho, não encontramos associação entre a expressão de Chk2 com a sobrevida global, sobrevida livre de doença e a sobrevida livre de metástase. Diferente do presente trabalho, Ribeiro-Silva e colaboradores (2006), demonstraram que a negatividade de Chk2 se associou com a SLD no carcinoma de mama. No trabalho de Ribeiro e colaboradores (2014) a negatividade da expressão de Chk2 associou-se a uma melhor sobrevida no carcinoma de cólon metastático. Entretanto, Lee e colaboradores (2014) demonstraram, em seu trabalho, que a negatividade de Chk2 em pacientes com câncer gástrico associa-se ao tempo de sobrevida significativamente menor do que aqueles que apresentam expressão positiva de Chk2. Contudo, o Chk2 atuou de forma distinta em diferentes sítios tumorais.

O trabalho de Yoon e colaboradores (2007) demonstraram que o Chk2 fosforilado (pChk2), a forma ativa de Chk2, em lesões orais pChk2 positivas tiveram um risco 8 vezes de desenvolver o CEO em comparação àqueles com lesões pChk2 negativas, além de propor que o estudo de pChk2, como um biomarcador em relação ao CEO poder discriminar lesões em risco à desenvolverem-se em CEO.

No trabalho de Nikitakis e colaboradores (2018) a expressão de pChk2 foi alta nos CEO. Yutori e colaboradores (2007), em seu trabalho, observaram que a redução do número de células que expressam pChk2 associou-se à progressão tumoral e que células que foram expostas a radiação ionizante, tiveram níveis de pChk2 aumentados drasticamente. Contudo, a expressão de pChk2 foi analisada no mesmo sítio tumoral, o CEO, e tanto a expressão positiva quanto a expressão negativa de pChk2 se associaram ao mau prognóstico da doença, sugerindo, assim, que pChk2 pode estar associado de alguma forma no CEO.

Torna-se necessário mais estudos associando pChk2 ao CEO, entretanto, com casuística maior, realizando estudos geográficos, verificando dados sobre os hábitos dos pacientes, além de analisar mutações em pChk2, a fim de compreender de que forma o pChk2 está envolvido na patogênese do CEO.

Embora em nosso trabalho, a expressão de Chk2 total não se associou com o CEO, sua marcação está presente na maioria de nossos casos, nos sugerindo que o Chk2 pode estar envolvido, de alguma forma, na patogênese do CEO. Um dos

possíveis caminhos futuros a considerar é analisar pChk2 em CEO, a fim de elucidar de que forma o Chk2 atua no CEO.

6.Conclusão

Com os resultados obtidos do presente trabalho podemos concluir que:

1. O Chk2 encontra-se positivo em 97,11% dos casos de carcinomas epidermóides orais estudados.
2. Em carcinomas epidermóides orais, a expressão imunoistoquímica do Chk2 não apresentou associação com os parâmetros clinico-patológicos estudados.
3. Não houve diferença estatística quando associamos a expressão de Chk2 com a sobrevida livre da doença, sobrevida livre de metástase e sobrevida global do carcinoma epidermóide oral.
4. Os nossos achados não favorecem o Chk2 como um potencial biomarcador prognóstico no carcinoma epidermóide oral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, J. Y. *et al.* Phosphorylation of threonine 68 promotes oligomerization and autophosphorylation of the Chk2 protein kinase via the forkhead-associated domain. **J Biol Chem**, v. 277, n. 22, p. 19389-95, May 2002. ISSN 0021-9258.

AHN, J.; URIST, M.; PRIVES, C. The Chk2 protein kinase. **DNA Repair (Amst)**, v. 3, n. 8-9, p. 1039-47, 2004 Aug-Sep 2004. ISSN 1568-7864.

AHN, J. Y. *et al.* Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. **Cancer Res**, v. 60, n. 21, p. 5934-6, Nov 2000. ISSN 0008-5472.

AVCI, H. *et al.* A Strong Relationship Between Oral Squamous Cell Carcinoma and DNA Repair Genes. **Biochem Genet**, v. 55, n. 5-6, p. 378-386, Dec 2017. ISSN 1573-4927.

BARTEK, J.; LUKAS, J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. **Curr Opin Cell Biol**, v. 13, n. 6, p. 738-47, Dec 2001. ISSN 0955-0674.

_____. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. **Cancer Cell**, v. 3, n. 5, p. 421-9, May 2003. ISSN 1535-6108.

BELL, D. W. *et al.* Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. **Science**, v. 286, n. 5449, p. 2528-31, Dec 1999. ISSN 0036-8075.

BENADA, J.; MACUREK, L. Targeting the Checkpoint to Kill Cancer Cells. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1912-37, Aug 2015. ISSN 2218-273X.

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer.
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/boca/definicao>.
 Acesso em 23 de Setembro de 2018.

CARLONI, V. *et al.* CHK2 overexpression and mislocalisation within mitotic structures enhances chromosomal instability and hepatocellular carcinoma progression. **Gut**, v. 67, n. 2, p. 348-361, 02 2018. ISSN 1468-3288.

CHI, A. C.; DAY, T. A.; NEVILLE, B. W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. **CA Cancer J Clin**, v. 65, n. 5, p. 401-21, 2015 Sep-Oct 2015. ISSN 1542-4863.

DI BENEDETTO, A. *et al.* Analysis of the ATR-Chk1 and ATM-Chk2 pathways in male breast cancer revealed the prognostic significance of ATR expression. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 8078, Aug 2017. ISSN 2045-2322

DÖBROSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. **Cancer Metastasis Rev**, v. 24, n. 1, p. 9-17, Jan 2005. ISSN 0167-7659.

FALCK, J. *et al.* Functional impact of concomitant versus alternative defects in the Chk2-p53 tumour suppressor pathway. **Oncogene**, v. 20, n. 39, p. 5503-10, Sep 2001. ISSN 0950-9232.

FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar 2015. ISSN 1097-0215.

HARUKI, N. *et al.* Histological type-selective, tumor-predominant expression of a novel CHK1 isoform and infrequent in vivo somatic CHK2 mutation in small cell lung cancer. **Cancer Res**, v. 60, n. 17, p. 4689-92, Sep 2000. ISSN 0008-5472.

HIRAO, A. *et al.* DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. **Science**, v. 287, n. 5459, p. 1824-7, Mar 2000. ISSN 0036-8075.

HOEIJMAKERS, J.H. DNA damage, aging, and cancer. **N. Engl. J. Med.** v. 15, n. 361, p. 1475–85, Oct 2009.

HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 366-74, May 2001. ISSN 0028-0836.

KIM, K. Y.; MCSHANE, L. M.; CONLEY, B. A. Designing biomarker studies for head and neck cancer. **Head Neck**, v. 36, n. 7, p. 1069-75, Jul 2014. ISSN 1097-0347.

LEE, C. H.; CHUNG, J. H. The hCds1 (Chk2)-FHA domain is essential for a chain of phosphorylation events on hCds1 that is induced by ionizing radiation. **J Biol Chem**, v. 276, n. 32, p. 30537-41, Aug 2001. ISSN 0021-9258.

LEE, H. E. *et al.* DNA damage response-related proteins in gastric cancer: ATM, Chk2 and p53 expression and their prognostic value. **Pathobiology**, v. 81, n. 1, p. 25-35, 2014. ISSN 1423-0291.

LEE, J. S. *et al.* hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. **Nature**, v. 404, n. 6774, p. 201-4, Mar 2000. ISSN 0028-0836.

LI, F. P. *et al.* A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. **Cancer Res**, v. 48, n. 18, p. 5358-62, Sep 1988. ISSN 0008-5472.

LIST, M. A. *et al.* An exploration of the pretreatment coping strategies of patients with carcinoma of the head and neck. **Cancer**, v. 95, n. 1, p. 98-104, Jul 2002. ISSN 0008-543X.

LUKAS, C. *et al.* DNA Damage-activated Kinase Chk2 Is Independent of Proliferation or Differentiation Yet Correlates with Tissue Biology. **Cancer Research** v. 61, p. 4990-93, Jul 2001.

NIKITAKIS, N. G. *et al.* Alterations in the expression of DNA damage response-related molecules in potentially preneoplastic oral epithelial lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 125, n. 6, p. 637-649, 06 2018. ISSN 2212-4411.

PIMENTA AMARAL, T. M. *et al.* Predictive factors of occult metastasis and prognosis of clinical stages I and II squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. **Oral Oncol**, v. 40, n. 8, p. 780-6, Sep 2004. ISSN 1368-8375.

POMMIER, Y. *et al.* Targeting chk2 kinase: molecular interaction maps and therapeutic rationale. **Curr Pharm Des**, v. 11, n. 22, p. 2855-72, 2005. ISSN 1381-6128.

REDDY, A. *et al.* Analysis of CHK2 in vulval neoplasia. **Br J Cancer**, v. 86, n. 5, p. 756-60, Mar 2002. ISSN 0007-0920.

RIBEIRO, K.B. *et al.* CHK2 Immunohistochemical Expression in Colon Cancer and its Relation with Clinicopathological Features and Outcome in Metastatic Colon Cancer Patients. **J Cytol Histol**, v. 5, n. 6, p. 1-5, 2014. ISSN 2157-7099.

RIBEIRO-SILVA, A. *et al.* Expression of checkpoint kinase 2 in breast carcinomas: correlation with key regulators of tumor cell proliferation, angiogenesis, and survival. **Histol Histopathol**, v. 21, n. 4, p. 373-82, Apr 2006. ISSN 1699-5848.

SHILOH, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 3, p. 155-68, Mar 2003. ISSN 1474-175X.

SZTURZ, P.; VERMORKEN, J. B. Treatment of Elderly Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. **Front Oncol**, v. 6, p. 199, 2016. ISSN 2234-943X.

SULLIVAN, A. *et al.* Concomitant inactivation of p53 and Chk2 in breast cancer. **Oncogene**, v. 21, n. 9, p. 1316-24, Feb 2002. ISSN 0950-9232.

SZYMANSKA-PASTERNAK, J. *et al.* CHEK2 variants predispose to benign, borderline and low-grade invasive ovarian tumors. **Gynecol Oncol**, v. 102, n. 3, p. 429-31, Sep 2006. ISSN 0090-8258.

THOMAS, G.R.; NADIMINTI, H.; REGALADO, J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Rev. Int.J. Exp. Path**, v. 6, n. 86, p. 347-63, Dec 2005. ISSN 0959-9673.

YOON, A. J. *et al.* Activated checkpoint kinase 2 expression and risk for oral squamous cell carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 16, n. 12, p. 2768-72, Dec 2007. ISSN 1055-9965.

YOUNG, D. *et al.* Increase in head and neck cancer in younger patients due to human papillomavirus (HPV). **Oral Oncol**, v. 51, n. 8, p. 727-30, Aug 2015. ISSN 1879-0593.

YUTORI, H. *et al.* Restoration of fragile histidine triad expression restores Chk2 activity in response to ionizing radiation in oral squamous cell carcinoma cells. **Cancer Sci**, v. 99, n. 3, p. 524-30, Mar 2008. ISSN 1349-7006.

ZHAO, W. et al. CHK2 Promotes Anoikis and is Associated with the Progression of Papillary Thyroid Cancer. **Cell Physiol Biochem**, v. 45, n. 4, p. 1590-1602, 2018. ISSN 1421-9778.

ZHOU, B. B.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**, v. 408, n. 6811, p. 433-9, Nov 2000. ISSN 0028-0836.

ZŁOWOCKA, E. et al. Germline mutations in the CHEK2 kinase gene are associated with an increased risk of bladder cancer. **Int J Cancer**, v. 122, n. 3, p. 583-6, Feb 2008. ISSN 1097-0215.

ANEXO



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



Ribeirão Preto, 22 de junho de 2016.

Ofício nº 2082/2016
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 6116/2016

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado "**PARTICIPAÇÃO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO NOS CARCINOMAS DE BOCA, MAMA E PRÓSTATA**", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 430ª Reunião Ordinária realizada em 20/06/2016, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como a solicitação de dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

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 (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

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

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustíssimos Senhores
PROF. DR. ALFREDO RIBEIRO DA SILVA
ANDRESSA DUARTE
Depto. de Patologia e Medicina Legal

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário - Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP
Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FAA-0002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br