UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE ONCOLOGIA CLÍNICA, CÉLULAS
TRONCO E TERAPIA CELULAR

FABIANNA PANSANI

**Expressão imunohistoquímica do Chk2 e associação com
características clínico-patológicas e desfecho em
pacientes com câncer de cólon metastático**

**Ribeirão Preto
2015**

FABIANNA PANSANI

**Expressão imunohistoquímica do Chk2 e associação com
características clínico-patológicas e desfecho em
pacientes com 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.

Área de concentração: Diferenciação Celular
Normal e Neoplásica.

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

Ribeirão Preto

2015

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

Pansani, Fabianna

Expressão imunohistoquímica do Chk2 e associação com características clínico-patológicas e desfecho em pacientes com câncer de cólon metastático. Ribeirão Preto, 2015.

90 p. : il.; 30cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP- Área de concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

Orientador: Peria, Fernanda Maris

1. Checkpoint Quinase 2. Câncer Colorectal. 3. Imunohistoquímica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: PANSANI, Fabianna

Título: Expressão imunohistoquímica do Chk2 e associação com características clínico-patológicas e desfecho em pacientes com 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.

Área de concentração: Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

Aprovado em: ____/____/2015

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Luis Antonio Pansani e Shirlei de Fátima Marques Pansani** que sempre me estimularam ao crescimento profissional e me ensinaram os verdadeiros valores da vida.*

*As minhas irmãs, **Giovanna Pansani e Vivianne Pansani** pelo companheirismo e admiração que sempre me demonstraram.*

Esses estiveram comigo durante todos os momentos, de vitórias e derrotas, de alegrias e tristezas, sempre com uma palavra de conforto. Meu eterno agradecimento a vocês.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me conduzir corretamente durante esta caminhada e por mais esta benção alcançada.

A todos os **Pacientes** pela colaboração em participar deste estudo, a contribuição de vocês foi imprescindível.

À **Profª. Drª. Daniela Tirapelli** pela confiança em me receber e ceder espaço e, além disso, pela amizade, incentivo e companheirismo e com isso contribuindo para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao **Profº. Drº. José César Rosa** pela parceria de trabalhar no seu laboratório, iniciativa e orientação; e a **Erika Czernisz** pela parceria na realização dos resultados do trabalho, eficiência e disposição para ajudar sempre.

A **Luana Antonio e Renata Sichieri** (técnicas do laboratório de Biologia Molecular) pelo carinho que me receberam, pela disponibilidade e ajuda de grande valia.

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

Ao **Adriana Teles e Raquel Botelho** (Secretárias de Pós-Graduação do Departamento de Oncologia Clínica, Terapia Celular e Células Tronco do Hemocentro de Ribeirão Preto-USP) pela ajuda, lembretes e orientações durante este período da Pós-graduação.

*À toda Equipe do Centro de Endoscopia do HC, em especial a **Dr^a. Ana Luiza Almeida e Dr^o. Paulo Henrique Pisi** por todos os ensinamentos, pela amizade, confiança, apoio, incentivo e colaboração desde o início deste projeto.*

*Ao meu namorado, **Tiago Mascia**, que me apoiou quando mais precisei, agradeço pelas palavras de força e incentivo em continuar, sempre.*

*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.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*À **Prof.^a Dr.^a Fernanda Maris Peria**, pela confiança, motivação e incentivo profissional, que mesmo antes de ser sua aluna me era demonstrado, pelas palavras de conforto e carinho nos momentos que mais precisei, pelo seu entusiasmo contagiante e acima de tudo pelo seu profissionalismo, dedicação, sabedoria e empenho para conclusão deste estudo. A você, o meu eterno agradecimento e admiração.*

RESUMO

RESUMO

PANSANI, F. **Expressão imunohistoquímica do Chk2 e associação com características clínico-patológicas e desfecho em pacientes com câncer de cólon metastático.** 2015. 90f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

INTRODUÇÃO: O câncer de cólon é a terceira neoplasia mais prevalente no país, com aumento progressivo da incidência associada ao envelhecimento populacional. Os avanços nos tratamentos local e sistêmico do câncer de cólon metastático tem aumentado significativamente o tempo de sobrevida global. Entretanto, ainda não existem biomarcadores consolidados na literatura, capazes de prever resposta a estes tratamentos ou o prognóstico. No processo da carcinogênese, uma das importantes vias que se encontra alterada é a via de reparo do DNA. A Chk2 é uma proteína quinase com atividade no reparo celular atuando de forma supressora no processo da carcinogênese, sendo que alterações em sua expressão e/ou função têm sido associadas à progressão tumoral em outras neoplasias como no câncer de mama, pulmão, vulva, bexiga, cólon, ovário, osteossarcoma e linfomas.

OBJETIVO: Avaliar a expressão imunohistoquímica do Chk2 no câncer de cólon metastático e correlacionar sua expressão com características clínico-patológicas e sobrevida.

PACIENTES E MÉTODOS: Foram incluídos 58 pacientes com diagnóstico confirmado de câncer de cólon metastático, tratados em primeira linha com quimioterapia baseada em fluorouracila e oxaliplatina. O tempo mínimo de seguimento foram de 2 anos pós-diagnóstico. Para análise da expressão do Chk2 foram utilizadas as técnicas de *tissue microarray* e imunohistoquímica. Estes resultados foram correlacionados com características clínicas, patológicas e de sobrevida. Para análise estatística, foi utilizado o programa SPSS17 e o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS: A expressão de Chk2 foi positiva em 69% dos pacientes. Houve associação entre a expressão de Chk2 e o *status* linfonodal ($p = 0,012$) e entre a sobrevivência ($p=0,034$). A expressão negativa de Chk2 aumentaram as chances de envolvimento linfonodal (OR:10,2, $p=0,03$). O tempo de sobrevida global de pacientes Chk2 negativo foi maior (72 *versus* 59 meses, $p=0,155$), o mesmo foi observado com o tempo sobrevida livre de progressão (19 *versus* 13 meses, $p=0,293$). As curvas de sobrevida foram diferentes de acordo com a expressão do Chk2 em pacientes com ou sem envolvimento linfonodal, sendo menor nos pacientes com Chk2 positivo, $p=0,028$. Houveram mais óbitos em pacientes com Chk2 positivo. Análise multivariada identificou o *performance status* segundo a escala de ECOG ($p=0,001$); metástase sincrônica ($p=0,037$); diferenciação das células tumorais ($p=0,029$) e expressão de Chk2 ($p=0,020$) como fatores independentes para sobrevida global.

CONCLUSÃO: A expressão positiva do Chk2 no adenocarcinoma de cólon metastático foi indicativa de maior agressividade e disseminação tumoral, impactando de forma negativa na sobrevida e desfecho dos pacientes.

Palavras-chave: 1. Checkpoint Quinase 2. Câncer Colorectal. 3. Imunohistoquímica

ABSTRACT

ABSTRACT

PANSANI, F. **Immunohistochemistry expression of Chk2 and its relation with clinical-pathological features and patients outcome in metastatic colon cancer.** In 2015. 90f. Master's Dissertation-Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

INTRODUCTION: The DNA damage checkpoint pathway has been of interest to the field of cancer biology, since checkpoint defects result in the accumulation of altered genetic information, a central feature of carcinogenesis. Little is known about the role of Chk2 in colorectal cancer tumorigenesis.

OBJECTIVE: The purpose of this study was to evaluate Chk2 expression in metastatic colon cancer and correlate this with clinicopathological features and patient survival.

PATIENTS AND METHODS: Tissues were obtained from 58 patients with confirmed metastatic colon cancer diagnosis, treated with capecitabine and oxaliplatin chemotherapy as standard doses. Patients included had, at least, 2 years post diagnosis of clinical following. The tissue microarray immunohistochemistry was the technic to evaluate Chk2 expression. Statistics analysis used SPSS 17. A p-value <0,050 was considered to be statistically significant. Immunohistochemical expression of Chk2 and its relationship with clinical and pathological characteristics and survival data was reported.

RESULTS: The expression of Chk2 was positive in 69%. There was association between expression of Chk2 and lymph node status ($p=0.012$) and between survival ($p=0.034$). The negative expression of Chk2 enhanced the chances of linfonodal involvement (OR:10,2, $p=0.03$). The global survival time of Chk2 negative patients was higher (72 versus 59 months, $p=0.155$); the same was observed with progression-free survival time (19 versus 13 months, $p=0.293$). The survival curves were different according to Chk2 expression in patients with or without lymph node involvement, being lower in patients with Chk2 positive, $p=0.028$. There were more deaths in patients with Chk2 positive. Multivariate regression analysis identified performance status ECOG ($p=0.001$), synchronous metastasis ($p=0.037$), tumor cell differentiation ($p=0.029$) and expression of Chk2 ($p=0.020$) as independent factors to overall survival.

CONCLUSION: This study demonstrated that the Chk2 positive expression in colon cancer indicates increased tumor spread and tumoral aggressiveness, impacting negatively on survival and outcome of patients.

KEYWORDS: 1. Checkpoint Kinase 2. Colorectal Cancer. 3. Immunohistochemistry

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Curva Kaplan-Meier para sobrevida global de acordo com a expressão imunohistoquímica de Chk2 (negativa *versus* positiva) nos pacientes com adenocarcinoma de colon.....65
- Gráfico 2** - Curva Kaplan-Meier para sobrevida livre de progressão de acordo com a expressão imunohistoquímica de Chk2 (negativa *versus* positiva) nos pacientes com adenocarcinoma de cólon.....66

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das características clínicas e histopatológicas da amostra geral dos pacientes com carcinoma de cólon.....	61
Tabela 2 - Análise de associação entre as características clínico-patológicas e a expressão imunohistoquímica (negativa e positiva) de Chk2 no adenocarcinoma de colon.....	62
Tabela 3 - Fatores prognósticos independentes analisados por regressão logística para a sobrevida global.....	67
Tabela 4 - Fatores prognósticos independentes analisados por regressão logística para a sobrevida livre de progressão.....	67

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não-melanoma.....	26
Figura 2 - Diferente tipos de danos no DNA.....	31
Figura 3 - Sequência de mutações gênicas envolvidas na carcinogênese do adenoma-carcinoma dos tumores cólon-retais.....	33
Figura 4 - O ciclo do envelhecimento e da instabilidade genômica.....	35
Figura 5 – Mecanismos de Reparo Celular.....	36
Figura 6 - Resposta do dano celular no DNA.....	39
Figura 7 - Células neoplásicas com expressão nuclear de moderada a intensa imunorreatividade.....	57
Figura 8 - Papéis da Chk1 e Chk2 em resposta aos danos no DNA.....	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAOP	Abdome Agudo Obstrutivo Perfurativo
ACS	<i>American Cancer Society</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	<i>Adematous Polyposis Coli</i> (Gene Supressor de Tumor)
ATM	<i>Ataxia Telangeiectasia Mutaded</i>
ATR	<i>Ataxia Telangeiectasia Related</i>
BRCA	<i>Breast Cancer Susceptibility Gene</i>
CBC	Células Baso Celulares
CCR	Câncer de Cólon e Reto
CDC	<i>Cell Division Cycle</i>
CDK	Ciclina Dependente Quinase
CT	Colonoscopia Total
DCC	Displasia Cleidocranical
DII	Doenças Inflamatórias Intestinais
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EC	Estadio Clínico
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FHA	Domínio <i>Fork Head</i> -Associated

FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
FOBT	<i>Fecal Occult Blood Test</i>
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HR	<i>Hazard Ratio</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
H&E	Hematoxilina & Eosina
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IgG	Imunoglobulina G
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MS	Ministério da Saúde
MRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Naetwork</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds Ratios</i>
PLK	<i>Polo Like Kinase</i> (Proteína Quinase)
PML	<i>Promyelocytic Leukemia</i> (Proteína Quinase)
P53	<i>Protein 53</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
SG	Sobrevida Global
SBC	Sociedade Brasileira de Cancerologia
SER/THR	<i>Serine/Threonine</i>
SLP	Sobrevida Livre de Progressão

TBF	<i>Tris Buffer Saline</i>
TMA	<i>Tissue Micro-Array</i>
TNM	<i>Classification of Malignant Tumours</i>
UFT	<i>Uracil Tegafur (Tegafluor/Uracila)</i>
USA	<i>United States of America</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WCR	<i>Word Cancer Report</i>
WHO	<i>Word Health Organization</i>
5FU	5 - Fluoracila

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	26
1.1. Câncer Cólon Retal.....	26
1.2. Tratamento do Câncer Cólon.....	29
1.3. Carcinogênese do Câncer Cólon-Retal.....	31
1.4. Reparo Celular.....	34
1.4.1. Quinases: Chk1/Chk2.....	37
 2. JUSTIFICATIVA.....	 46
 3. HIPÓTESES.....	 49
 4. OBJETIVOS.....	 51
 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	 53
3.1. Local do estudo.....	53
3.2. Casuística.....	53
3.3. Amostragem.....	54
3.3.1. Coleta de informações clínicas, patológicas e de sobrevida.....	54
3.3.2. Técnicas Utilizadas.....	55
3.3.2.1 Método de confecção do Tissue Micro-Array (TMA) – Microarranjos teciduais.....	55
3.3.2.2. Método imunohistoquímico.....	56
3.4. Análise Estatística.....	57
 4. RESULTADOS	 61
4.1. Análise descritiva.....	61
4.2. Análise de associação.....	62
4.3. Análise de sobrevida Kaplan-Meier.....	64
4.4. Regressão Logística	66

5. DISCUSSÃO.....	70
6. CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS.....	78
ANEXO A.....	87
ANEXO B.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer Cólon-Retal

O câncer é um desafio global, seus custos econômicos no mundo estão estimados em 572 bilhões por ano (AHMEDINJEMAL *et al.*, 2011). O número de novos casos de câncer a cada ano está aumentando gradualmente: a taxa de mortalidade no ano de 2008, foram de 7,6 milhões e espera-se um aumento para aproximadamente 17 milhões para o ano de 2030 (FERLAY *et al.*, 2010; BRAY *et al.*, 2013). Estes números devem repercutir no planejamento das políticas de saúde mundialmente, sendo que, os países em desenvolvimento devem ser os mais afetados, entre eles o Brasil (INCA, 2014).

O INCA estima cerca de 580 mil casos novos da doença para 2014. De acordo com a publicação, Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil, os cânceres mais incidentes na população brasileira no próximo ano serão: pele não melanoma (182 mil), próstata (69 mil); mama (57 mil); cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil) e estômago (20 mil). Ao todo estão relacionados na publicação os 19 tipos de cânceres mais incidentes, sendo 14 na população masculina e 17 na feminina (INCA, 2014).

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma* (FIGURA 1)

Localização primária	casos novos	%		Localização primária	casos novos	%
Próstata	68.800	22,8%		Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%		Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%		Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%		Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%		Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%		Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%		Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%		Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%		Leucemias	4.320	1,6%

* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não-melanoma. Fonte: INCA. Incidência de Câncer no Brasil.

No Brasil, o investimento do Ministério da Saúde na assistência aos pacientes com câncer, foram de R\$ 2,1 bilhões no ano de 2013, demonstrando um

crescimento de 26% em relação a 2010. A previsão é que, em 2014, o valor alocado no fortalecimento do atendimento em oncologia chegue a R\$ 4,5 bilhões (INCA, 2014).

Em média, uma em cada três pessoas tem chance de ter algum tipo de câncer ao longo da vida e esta frequência deverá aumentar com o envelhecimento populacional global (QUAGLIA *et al.*, 2005). A este fato, acrescenta-se a restrição ao amplo acesso da população brasileira aos exames para detecção precoce do câncer, contribuindo para o aumento no número de mortes relacionadas ao câncer, (WHO, 2008). Dentre as neoplasias mais prevalentes estão: os tumores malignos da próstata, mama, pulmão e o câncer cólon-retal; correspondendo estes a aproximadamente 50% do total de casos diagnosticados (INCA, 2014).

O câncer cólon-retal (CCR) é um dos mais frequentes tumores sólidos em todo o mundo considerando o número absoluto de casos novos por ano (SOERJOMATARAM *ET AL.*, 2008; SIEGEL, 2012), representando aproximadamente 10% de todos diagnósticos de câncer (FERLAY, 2010). Apesar dos avanços nas técnicas cirúrgicas e no tratamento sistêmico envolvendo quimioterapia e drogas alvo-específicas, o CCR ainda causa aproximadamente 600.000 mortes por ano, representando mais da metade de todos os óbitos causados por cânceres localizados no trato gastrointestinal (SOREIDE *et al.*, 2011; NEDREBO *et al.*, 2011; PERRY *et al.*, 2012; CUNNINGHAM *et al.*, 2010).

Na população geral ocidental, segundo alguns autores, existe um risco estimado de uma pessoa ter diagnóstico de CCR de aproximadamente 5-6% (HERBST *et al.*, 2012; BRETtauHER, 2011). Este risco aumenta substancialmente (15-30%) na presença de algum antecedente familiar de primeiro grau com história de CCR, e, em grau muito elevado (> 80%) em algumas das síndromes hereditárias relacionadas ao câncer (SOREIDE, 2007). Fatores associados a um maior risco CCR incluem o consumo de álcool, obesidade, tabagismo e o consumo de carne processada e condimentos. Alguns fatores que têm sido associados com uma redução do risco de CCR incluem: o aumento da atividade física, reposição hormonal na pós-menopausa e o uso de medicamentos anti-inflamatórios não-esteroidais. A colonoscopia como exame de triagem com início aos 50 anos de idade tem sido preconizada em alguns *guidelines* para reduzir a incidência e mortalidade do CCR, através da remoção de pólipos e lesões suspeitas (NCI, 2013).

Desde a última década, tem havido especial interesse na busca de ferramentas clínicas e moleculares para a triagem do CCR em suas fases mais precoces (PANT, 2002; NELSON, 2009; WINAWER *et al.*, 1993). O teste do sangue oculto nas fezes (FOBT) é o único clinicamente aceito, quando se trata de exames sem características invasivas (KUIPERS *et al.*, 2013). Este método, bem como a retossigmoidoscopia, colonoscopia, colonoscopia virtual e radiografia contrastada com bário, melhoram as taxas de detecção do CCR. No entanto, apresentam limitações quanto aos custos, riscos, acurácia (especialmente nos estágios iniciais e inconvenientes para o paciente (STRUL, 2007).

Alguns autores propõem a análise de células que são continuamente expelidas nas fezes, devido a uma elevada taxa proliferativa, de modo que o DNA mutado possa ser detectado nas fezes destes pacientes (BOSCH *et al.*, 2011). A mutação na APC, KRAS e gene p53, foram inicialmente investigadas em amostras de fezes de pacientes de CCR, de acordo com o modelo de Volgenstein (BOSCH *et al.*, 2011), em busca de biomarcadores precoces da doença que possam ser usados em testes não-invasivos (urina e soro do sangue) (BONCHEVA *et al.*, 2013).

Os estadios iniciais do CCR são geralmente assintomáticos e estima-se que até 50% dos pacientes sejam diagnosticados com câncer localmente avançado ou metastático, limitando drasticamente as chances de cura destes pacientes (WAGNER, 2012).

O diagnóstico precoce, incluindo a detecção de adenomas benignos, é considerado um aspecto fundamental para aumentar a sobrevida. Os biomarcadores prognósticos e preditivos de resposta são considerados de grande importância para orientar a terapia do paciente ou de monitorização do tratamento eficaz. No entanto, a transposição de um biomarcador de sua fase experimental até sua aplicação clínica requer tempo, e poucas são as moléculas que realmente chegam para o uso rotineiro na prática clínica. O *USA Food and Drug Administration (FDA)* tem atualmente aprovados menos de 30 biomarcadores relacionados ao câncer, sendo estes principalmente para monitorar resposta à terapia, apesar da extensa gama de artigos científicos relacionados publicados anualmente (WAGNER, 2012).

1.2 Tratamento do câncer de cólon

O tratamento do câncer de cólon baseia-se fundamentalmente no estadiamento cirúrgico, sendo o mais comumente usado aquele proposto pela *American Joint Committee on Cancer* (EDGE *et al.*, 2010). Esta classificação traz informações quanto: a extensão tumoral (T); a disseminação tumoral para os gânglios linfáticos de drenagem do cólon (N) e o acometimento de órgãos ou estruturas à distância, denominados metástases (M). As informações do T, N e M são combinados para determinar a extensão local e a distância da doença, estratificando-a nos estádios de I a IV (DUKES, 1932; ASTLER, 1954). Pacientes com estadio I apresentam sobrevida mediana em 05 anos aproximada de 90% a 95% após cirurgia de ressecção, com gradual redução das taxas de sobrevida à medida que se tem uma progressão do estadiamento; de modo que pacientes com estadio IV possuem uma sobrevida mediana em 05 anos de 5% a 10% (ETZIONI *et al.*, 2003).

Aproximadamente 25% dos pacientes apresentam EC II ao diagnóstico (ZHANG *et al.*, 2004). Mais de 50% dos pacientes com câncer de cólon localmente avançado (estádio clínico III segundo TNM) irão desenvolver recorrência local e metástases, e aproximadamente 30% dos pacientes em qualquer estadio irão desenvolver metástases. A taxa de falha no cenário da terapia sistêmica adjuvante (terapia com intenção curativa buscando exterminar as células tumorais circulantes) no câncer de cólon é de 30% para os pacientes em estadio clínico II de alto risco e III (LANGAN *et al.*, 2012).

O tratamento sistêmico do câncer de cólon avançado evoluiu muito nos últimos anos, ainda assim, a taxa de resposta global é de aproximadamente 60% na doença com metástases à distância (estadio IV do TNM) (LANGAN *et al.*, 2012).

O 5FU (5-fluoracila) foi durante vários anos a principal medicação disponível, utilizado em diversos esquemas associados ou não a outras drogas, promovendo uma sobrevida média de 12 meses. A incorporação do irinotecano (uma campotensina semissintética) e da oxaliplatina (uma platina de terceira geração) melhoraram os resultados até então obtidos quanto à sobrevida global (15 a 17 meses em média), palição de sintomas e qualidade de vida (DE VITA *et al.*, 2008; NHI, 1990). Reações cruzadas entre a oxaliplatina e o irinotecano são infrequentes, aumentando a média de sobrevida para aproximadamente 18 a 24 meses com a exposição sequencial aos diferentes agentes. Dentre outras medicações também

incorporadas ao tratamento do câncer cólon-retal estão: fluoropirimidinas orais (antimetabólicos) como a capecitabina e o tegafuor/uracila (UFT); os quais possuem a vantagem da comodidade posológica da administração oral e apresentam resultados semelhantes aos esquemas que utilizam 5FU de forma infusional (DE VITA *et al.*, 2008; NHI, 1990).

O desenvolvimento de terapias biológicas, conhecidas como “*driven target therapy*”, quando associadas à quimioterapia, têm se mostrado como 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 multi-quinase, recentemente aprovado pelo FDA para paciente poli tratados (KELLY *et al.*, 2005; ALLEN *et al.*, 2005; GROTHEY *et al.*, 2013).

Essas medicações têm demonstrado sinergismo com as drogas quimioterápicas citotóxicas usuais, promovendo taxas de resposta ainda maiores e aumento na sobrevida dos pacientes portadores de algumas características genéticas específicas expressas pelo tecido tumoral. Como exemplo, destacam-se os pacientes que não expressam a mutação do oncogene KRAS (denominado KRAS selvagem) no tecido tumoral analisado, os quais apresentam uma maior probabilidade de resposta às terapias alvo anti-EGFR (WALDNER *et al.*, 2010; NHI, 1990; ALLEN *et al.*, 2005; ANDREYEV *et al.*, 1998; MILANO *et al.*, 2008; LIEVRE *et al.*, 2008).

Todas estas opções terapêuticas, apesar do acréscimo em sobrevida, apresentam toxicidades inerentes, justificando a importância de se identificar critérios clínicos e moleculares cada vez mais precisos e confiáveis para determinar os subgrupos de pacientes que realmente irão se beneficiar destes tratamentos combinados.

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 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 drogas terapêuticas mais específicas e eficazes.

1.3. Carcinogênese do câncer cólon-retal

Acumuladas mutações e aberrações cromossômicas, alterações em genes supressores de tumores e protooncogenes são características marcantes do processo da carcinogênese. As células cancerosas por serem instáveis, se perpetuam através de gerações celulares sucessivas em consequência a defeitos nos mecanismos de reparo e de manutenção da integridade do genoma humano, como os mecanismos de reparo do DNA pelas vias de sinalização *checkpoint* do ciclo celular (BARTEK *et al.*, 2003). Neste processo, também são encontradas alterações no nível de metabolismo celular, alterando a sinalização celular e impedindo o processo de diferenciação (WARD *et al.*, 2012).

Figura 2 – Diferentes danos ao DNA ocasionando diferentes lesões, desencadeando diferentes respostas, podendo levar a: sobrevivência da célula e retomada normal do ciclo celular; morte celular ou transformação maligna. O mecanismo e sinalização celular que distingue se a célula irá sobreviver conduzida à morte celular não está totalmente elucidado. Fonte: Nature Reviews Cancer, 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity

É compreendido que o CCR se desenvolve a partir da mucosa normal do cólon, em consequência a sucessivas alterações genéticas, iniciando-se com lesões precursoras como as neoplasias intra-epiteliais, clinicamente identificadas como lesões adenomatosas, as quais podem ou não progredir para o câncer invasivo (LENGAUER *et al.*, 1997; SHIH *et al.*, 2001; KINZLER, 1996; VAN *et al.*, 2002).

O processo da carcinogênese do CCR inclui ativação de mutações em oncogenes e inativação de mutações em genes supressores de tumor. O evento genético inicial mais comum envolve a inativação do gene supressor de tumor APC, que conduz a uma estabilização e a translocação nuclear de β -catenina (SAIF, 2010). Por muitos anos, este evento inicial foi pensado por ocorrer principalmente, se não exclusivamente, em células-tronco de criptas no cólon (BARKER *et al.*, 2009).

O modelo proposto por Fearon e Vogelstein, denominado “Sequência Adenoma-Carcinoma”, apresenta de forma detalhada os múltiplos passos da carcinogênese no CCR (FEARON *et al.* 2012). Este modelo preconiza 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 p53). A primeira alteração, na maioria dos casos, é a inativação do gene APC, introduzindo um códon de parada na tradução protéica, 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 (ROY *et al.*, 2012).

Entretanto, apenas a mutação da APC não é suficiente para permitir a progressão dos adenomas para o câncer invasivo, sendo necessário que ocorram mutações em outros genes. Assim, mutações somáticas, como a mutação do KRAS e do p53, colaboram para a inativação do APC promovendo a progressão de uma lesão adenomatosa para o câncer de cólon (ROY *et al.*, 2012).

Figura 3 - Sequência de mutações gênicas envolvidas no processo de carcinogênese segundo a sequência adenoma-carcinoma dos tumores cólon-retais. Fonte: N Engl J Med 2009. Molecular basis of colorectal cancer

Pacientes com doenças inflamatórias intestinais (DII), colite ulcerativa e doença de Crohn têm maior risco de desenvolver CCR em consequência ao processo inflamatório crônico da mucosa gastrointestinal (ULLMAN, 2011).

O entendimento do processo da carcinogênese no CCR segundo a teoria do adenoma-carcinoma teve grande impacto na prática clínica, possibilitando o rastreamento deste tipo de câncer, pois na maioria dos casos, as lesões invasivas se desenvolvem a partir de uma lesão precursora displásica, apresentando progressão lenta e sua ressecção, através da polipectomia endoscópica, atua como forma efetiva de prevenção da doença (PIGNONE *et al.*, 2002).

No caso do CCR esporádico, assim como em outras neoplasias malignas, aventa-se também a presença de células tronco-tumorais envolvidas no processo da carcinogênese (LANGAN *et al.*, 2012)

Já pacientes com DII, desenvolvem lesões displásicas que podem ser polipóides, planas, localizadas ou multifocais, decorrentes do estímulo inflamatório contínuo do cólon, e apresentam risco maior de transformação neoplásica, sendo necessária intervenção cirúrgica para a remoção de parte ou mesmo todo o cólon e reto (ULLMAN, 2011).

A OMS também relata que a porcentagem de novos diagnósticos de câncer vem aumentando anualmente em países de baixa e média renda e esta é atribuída a uma grande variedade de comportamento, como risco genético e fatores ambientais. (THUN *et al.*, 2010). Apesar das medidas para diagnosticar o câncer cólon-retal em seus estádios iniciais, 7% a 29% dos pacientes com CCR primário apresentam sintomas agudos obstrutivos, caracterizando uma doença em estágio localmente avançado. (PHILLIPS *et al.*, 1985; UMPLEBY *et al.*, 1984; MELLA *et al.*, 1997; SERPELL *et al.*, 1989; KIM *et al.*, 2009; TROMPETAS, 2008).

1.4. Reparo Celular

O DNA, anteriormente considerado uma molécula altamente estável, teve seu conceito remodelado, com a identificação de constantes alterações e lesões que está sujeita, além da descoberta de processos químicos que auxiliam na estabilidade do genoma, descritos como reparo celular (CRICK, 1974).

Qualquer dano que ocorra com o DNA, pode ocasionar prejuízos ao metabolismo celular, desencadeando um mau funcionamento dos mecanismos de reparo celular, resultando em acúmulo de alterações, conduzindo à morte celular ou às sucessivas mutações e instabilidade genética. Estes processos de dano ao DNA estão diretamente associados ao envelhecimento (senescência celular) fisiológico e ao processo patológico da carcinogênese (FERREIRA, 2011).

Devido a instabilidade das ligações químicas específicas dos nucleotídeos sob condições fisiológicas de temperatura e pH na célula, ocorrem lesões espontâneas; e as lesões ambientais resultam de interações da molécula de DNA por diferentes agentes físicos (radiação ultravioleta e radiações ionizantes) e compostos químicos (poluentes e químio-terápicos), considerados agentes genotóxicos capazes de romper a fita dupla do DNA (FERREIRA, 2011).

A molécula de DNA é tida como uma grande molécula dentro da celular, assim uma simples modificação química na base resulta na formação de lesões espontâneas, entre as alterações mais comuns estão: as mudanças tautoméricas das bases; des-aminações e perda das bases (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

Figura 4 - O ciclo do envelhecimento e da instabilidade genômica, onde as mutações espontâneas e rearranjos acumulam-se com o tempo, conduzindo à desregulação da transcrição, resposta prejudicada ao estresse e perda da função de genes de reparo do DNA. Fonte: Nucleic Acids Res, 2007. Changes in DNA repair during aging.

Quando a molécula de oxigênio é reduzida para água, que acontece durante a respiração mitocondrial, podem ocorrer escapes de espécies reativas de oxigênio, as quais reagem com outras moléculas biológicas na célula e, entre elas, a molécula de DNA, gerando lesões de bases. Logo, as enzimas como superóxido dismutases, catalase e glutathione peroxidase, são as primeiras barreiras que protegem a célula, porém, mesmo com essas enzimas protetoras, as espécies reativas de oxigênio ainda podem interagir com o DNA, resultando em lesões oxidativas de base que podem bloquear ou emparelhar-se com erros durante a duplicação do DNA (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

Alterações causadas no DNA por agentes quimioterápicos podem interferir em sua síntese, resultando na parada da replicação celular que se dividem rapidamente, como as células malignas, explicando a especificidade dos fármacos utilizados na terapia destes tumores, podendo causar diferentes lesões na molécula de DNA,

entre elas as ligações químicas entre as fitas, conhecidas como ligações cruzadas (*crosslinks*) (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

Erros durante o metabolismo do DNA nos processos de duplicação e recombinação, ocasionam alterações na seqüência de nucleotídeos, emparelhamento errôneo das bases nitrogenadas nas duas fitas de DNA (*mismatch*), implicando na instabilidade genética e mutações (FRIEDBERG *et al.*, 2006).

Os principais mecanismos de reparo estão divididos em 4 classes principais: reversão da lesão (quando uma única enzima reconhece e reverte a lesão); excisão da lesão (removem bases alteradas e substituem por seqüências de nucleotídeos não alteradas); recombinação homóloga (trocam informações genéticas entre seqüência alélicas durante a meiose e mitose, fazendo o reparo da fita com quebra, forquilha de replicação quebradas ou bloqueadas, ligação covalente cruzada e telômeros replicados de forma incompleta); e por último, junção de extremidades (quando duas terminações da molécula de DNA não compatíveis, são processadas e ligadas diretamente) (FRIEDBERG *et al.*, 2006; WETERINGS *et al.*, 2008).

Figura 5 – Na primeira etapa (a), consiste no reconhecimento da alteração estrutural; (b) na incisão da cadeia polinucleotídica situada nas proximidades da lesão; (c) etapa mediada por uma enzima denominada endonuclease dímero-específica; (d) ocorre a remoção do fragmento da cadeia que contém a lesão e a ressíntese do segmento removido; (e) restauração por excisão finalizada pela ligação do segmento neossintetizado a extremidade da cadeia preexistente, onde restabelece o posicionamento do segmento, medida pela enzima polinucleotídeo-ligase. Fonte: Genética Molecular, 2011. Reparo celular

Quando é detectado a quebra da fita dupla, a quinase serina/treonina ATM, inicialmente associada as regiões de cromatina mais relaxadas que flanqueiam a lesão. Esta proteína ATM, membro da família das quinases, da qual também faz parte ATR, um de seus alvos, é a quinase Chk2, importante transdutor das respostas desencadeadas por essa via de sinalização (FERREIRA, 2011).

1.4.1. Quinases: Chk1/Chk2

Dentre as vias de sinalização celular, os *checkpoints*, são ativados em resposta a qualquer tipo de dano ao DNA ou erros genéticos em eventos do ciclo celular, tais como estresse oxidativo, replicação do DNA e separação cromossômica, danos induzidos por fatores ambientais como radiação ionizantes ou por drogas genotóxicas. As células, durante o processo de divisão, também estão propensas aos erros durante as fases de replicação do DNA e da mitose. Assim as vias de sinalização, conhecidas como Chk1 e Chk2, tem função de reparar o dano provocado no DNA e eliminar este dano as outras células, induzindo-as a apoptose. Esta sinalização ocorre através do *downstream* intra e intercelular de proteínas quinases efetoras, com o objetivo de manter a estabilidade genômica, pois são capazes de transduzir o sinal para seus substratos, ativando assim a resposta aos danos no DNA (BARTEK, 2003; BARTEK *et al.*, 2001; MOTOYAMA, 2004; PARRILLA *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2002).

As quinases Chk2/Chk1 são um grupo de enzimas da mesma família multifuncional, cuja função central é a indução da parada do ciclo celular e indução a apoptose em resposta ao dano do DNA na célula. Seu funcionamento, através da sua estrutura em domínios, é ativado através de processos de fosforilação. A relação da Chk2 com o processo da carcinogênese em humanos apontam sua atividade como sendo um gene supressor de tumor (AHN *et al.*, 2004).

Chk2/Chk1 são proteínas quinases serina/treonina ativadas, estruturalmente diferentes, mas funcionalmente semelhantes, cuja função principal está relacionada à sinalização inicial da via de *checkpoints* da família fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), particularmente a ATM, ATR e ATX (RIBEIRO *et al.*, 2006). A escolha dos transdutores de sinais ao dano celular reflete o tipo de estímulo que provoca o dano ao DNA celular. O substrato Chk1 geralmente está envolvido no eixo de ativação ATR-Chk1 e a Chk2 no eixo ATM-Chk2, embora exista uma sobreposição entre

esses dois eixos (STAWINSKA *et al.*, 2008). A proteína ATM foi identificada como produto do gene que está mutado (perdida ou inativado), reside predominantemente no núcleo de células em divisão, envolvida com a autofosforilação, trabalha com o reparo das quebras duplas do DNA, onde a quinase Chk2, é um de seus alvos e um transdutor importante das repostas desencadeadas por essa via de sinalização. A quinase ATR é essencial para a viabilidade das células replicativas, ativada durante a fase S regulando a iniciação das origens de replicação, reparar forquilhas de replicação bloqueadas e prevenir a mitose prematura, e com a ATR o substrato mais estudado é a quinase Chk1, importante transdutor de sinal por essa via de sinalização (FERREIRA, 2011).

A Chk2 é uma proteína estável expressa ao longo do ciclo celular e parece estar inativa na ausência de dano ao DNA celular. É ativada logo que o dano celular é detectado, após estímulo externo de radiação ultravioleta ionizante e de drogas inibidoras de replicação celular utilizadas em tratamento de doenças como, por exemplo, os quimioterápicos contra o câncer. A ativação da molécula Chk2 se dá através de mecanismos de fosforilação pelo eixo da ATM em resposta à quebra da dupla fita de DNA através da dimerização e autofosforilação de sua molécula pelos eixos da ATR e outros ATM-independentes (RIBEIRO *et al.*, 2006; BARTEK, 2003).

A proteína Chk2 contém 3 domínios distintos funcionais: domínio SQ/TQ (SCD), domínio *forkhead associated* (FHA) e um domínio quinase Ser/Thr. O primeiro domínio contém 5 regiões SQ e duas TQ, as quais interagem com substratos primários do eixo ATM quinase (*ataxia-telangectasia mutated*). O domínio FHA se trata de um aminoácido fosfopeptídeo, formando estruturas com várias voltas (*loopings*) conferindo diversidade em seu reconhecimento (STAWINSKA *et al.*, 2008). ATM fosforila Chk2 no domínio Thr68, assim promove a oligomerização do Chk2 ao criar um sítio específico de ligação para o domínio FHA de uma outra molécula Chk2. A homodimerização da Chk2 também facilita a transfosforilação do domínio quinase C-terminal (Thr383, Thr387) para sua completa ativação (BARTEK, 2003).

A distribuição da molécula Chk2 ativada inicialmente acontece nos sítios de danos à molécula de DNA subnuclear e ao se ligar aos seus substratos, como Cdc25A, Cdc25C e p53, proteínas altamente solúveis, se redistribuem rapidamente para toda a região do núcleo celular. Essa característica também é observada na

molécula de Chk1, por isso são denominadas de proteínas propagadoras de sinalização (RIBEIRO *et al.*, 2006).

A Chk1 é essencial também para o desenvolvimento embrionário, onde sugere que sua função não esteja somente ligada no momento de absorver genotóxicos, mas também em condições fisiológicas normais. A Chk1 foi detectada para ser fosforilada na ausência de agentes genotóxicos exógenos, possivelmente devido a sinais gerados por forças de replicação inativas, que ocorrem em cada ciclo celular (CHEN, 2004; KALOGEROPOULUS *et al.*, 2004).

Figura 6 - Resposta ao dano celular no DNA: quebra de cadeia simples e duplas sinalizam sensores (MRN e 9-1-1) mostrados em roxo; mediadores em azul (H2AX, BRCA1, MDC1, 53BP1); transdução de sinal das quinases em amarelo (ATM, ATR); quinases efetoras em rosa (Chk2, Chk1) e proteínas efetoras em verde (E2F1, p53, Cdc25), que conduzem a: transcrição de genes; apoptose, e parada do ciclo celular. As proteínas fosforiladas pela ATM, ATR, e / ou DNA-PK estão marcadas por um grupo fosfato amarelo e proteínas que são fosforiladas pela Chk2 e / ou de Chk1 são marcadas por um grupo fosfato rosa. Fonte: Cell Communication and Signaling 2010. Phosphatases in the cellular response to DNA damage.

A Chk1 também sofre fosforilação na ausência de agentes genotóxicos externos, possivelmente devido a sinais de estabilização celular gerados durante o ciclo celular normal através do eixo ATR e não necessita de dimerização e

autofosforilação para exercer sua função (RIBEIRO *et al.*, 2006; BARTEK, 2003). Chk1 sofre fosforilação no seu resíduo Ser317 em resposta a hidroxauréia e radiação ultravioleta; e no resíduo Ser345 em resposta a hidroxauréia, radiação ultravioleta e radiação ionizante, através do eixo ATM/ATR. Dois complexos protéicos são necessários para ativação Chk1, Rad17/fator de replicação (RFC) e Rad9/sensível hidroxauréia1 (Hus1)/Rad1 (9-1-1) (BARTEK, 2003).

Embora a estrutura do domínio quinase externo da Chk1 seja diferente da molécula da Chk2, ambas proteínas podem fosforilar um subgrupo semelhante de substratos. Ambas quinases fosforilam e inativam a Cdc25 (*cell division cycle*) fosfatase, através da degradação mediada por proteassoma e ubiquitinação (BARTEK, 2003). A supressão da Cdc25A promove a inibição da fosforilação e ativação da ciclina E/Cdk2 (ciclina dependente quinase) e da ciclina A/Cdk2 quinase as quais são necessárias para as células progredirem no ciclo celular e entrar para a fase S. Ao passo que, a fosforilação da Cdc25C leva à inativação dessa fosfatase direta ou indiretamente através da criação de um sítio de ligação protéico. Essa interação resulta em uma localização citoplasmática persistente da Cdc25C desse modo prevenindo a transição G2/M uma vez que o complexo B/Cdk1 não pode ser ativado. Existem algumas proteínas com domínio BRCT, incluindo as 53BP1, BRCA1 (*breast cancer susceptibility gene 1*) e MDC1, que fazem o papel de mediadoras da resposta das *checkpoints*, modulando diversos eventos, incluindo a ativação de Chk1 e Chk2 e promoção de outras formas de fosforilação não mediada pela ATM através de interação proteína-proteína. Outras proteínas efetoras também estão envolvidas no *downstream* da sinalização, tais como TLquinases, proteína PML, PLK3 quinases e fator de transcrição E2F1 (*cell cycle*) (RIBEIRO *et al.*, 2006).

É rara associação de alterações do gene Chk1 com processo da carcinogênese, sendo, até o momento, relacionados estritamente aos carcinomas de estômago, endométrio e cólon, os quais apresentam instabilidade de microssatélites gerados por mutações *frameshifts* devido inserção ou deleção de uma adenina na sequência gênica do Chk1, resultando em uma proteína Chk1 truncada defeituosa. A inativação mutacional do gene Chk1 raramente ocorre em cânceres do trato gastrointestinal. Sua deficiência em células embrionárias de camundongos resulta em letalidade precoce, ao passo que a deficiência de Chk1 em células com mutação do p53 resulta em crescimento celular aceitável em alguns tumores. Assim, é possível que as mutações do Chk1 e defeitos do Chk2 que ocorrem durante a

progressão do câncer num estadio em que as células são menos propensas a apoptose (tais como aquelas com mutação p53) possam contribuir para aumento da instabilidade gênica em alguns tumores (RIBEIRO *et al.*, 2006; BARTEK, 2003).

Os defeitos de Chk1 e Chk2 são sugeridos como contribuintes para o desenvolvimento de cânceres hereditários e esporádicos (BERTONI *et al.*, 1999; MENOYO *et al.*, 2001; REDDY *et al.*, 2002; SHIGEISHI *et al.*, 2002; TORT *et al.*, 2002; VAHTERISCO *et al.*, 2001; VAHTERISCO *et al.*, 2002; KILPIVAARA *et al.*, 2003; CYBULSKI *et al.*, 2004; WEISHER *et al.*, 2006). Vários estudos analisaram o estado mutacional de Chk1 e Chk2 em neoplasias (BERTONI *et al.*, 1999; MENOYO *et al.*, 2001; TORT *et al.*, 2002; VAHTERISCO *et al.*, 2001; VAHTERISCO *et al.*, 2002; KILPIVAARA *et al.*, 2003; CYBULSKI *et al.*, 2004). No entanto, a informação sobre a expressão da proteína em diferentes tipos de cânceres é muito limitada (REDDY *et al.*, 2002; SHIGEISHI *et al.*, 2002; TORT *et al.*, 2002; LUKAS *et al.*, 2001; MATSUOKA *et al.*, 2001).

Mutações somáticas do Chk2, por sua vez, são encontradas em subgrupos de alguns tipos de tumores esporádicos humanos, incluindo os carcinomas de mama, pulmão, vulva, bexiga, cólon, ovário, osteossarcoma e linfomas. A maioria dessas mutações são *missenses* ou truncadas distribuídas nos três domínios do Chk2: no domínio regulatório SQ/TQ N-terminal, domínio FHA de interação proteína-proteína ou domínio catalítico C-terminal. Algumas mutações no domínio FHA (por exemplo, R145W) ou no domínio quinase (por exemplo, D311Val, 1100delC) produzem proteínas instáveis que são alvos facilmente degradáveis pelo processo mediado por proteassoma, e como consequência, essas proteínas são expressas em níveis muito menores do que as proteínas Chk2 selvagem. Mutações dentro do domínio catalítico levam a perda ou menor atividade quinase, enquanto que aquelas no domínio FHA são geralmente mutações que levam a um defeito no reconhecimento de seus substratos, tais como Cdc25A, p53 ou BRCA1, e que apresentam um efeito negativo dominante quando co-expresso com Chk2 selvagem. As outras mutações que geram proteínas instáveis são incapazes de interferir de maneira efetiva na atividade remanescente do Chk2 selvagem e, dessa forma, representam mutações clássicas de perda de função, gerando tumores pela perda da heterozigosidade do alelo. Nesses tumores observa-se redução significativa ou perda da expressão do padrão de marcação da Chk2 por análise imunohistoquímica (RIBEIRO *et al.*, 2006).

Existe uma mutação germinativa rara no gene Chk2 em um subgrupo de membros da família com síndrome de Li Fraumeni (síndrome genética familiar de predisposição ao câncer associada à mutação no gene p53, caracterizada pelo aparecimento em idade precoce de tumores como de mama e sarcomas), produzindo uma proteína mutada truncada 1100delC. Nesses casos, os membros desse subgrupo com p53 selvagem (sem a mutação no gene p53), mas com essa mutação no gene Chk2, têm a mesma predisposição de desenvolver os tumores da síndrome de Li Fraumeni (RIBEIRO *et al.*, 2006).

Em famílias com mutação nos genes BRCA1 e BRCA2 (genes de susceptibilidade ao câncer de mama), o Chk2 1100delC, alelo de baixa penetrância, não confere um aumento no risco para câncer de mama. Ao nível molecular, a proteína truncada 1100delC elimina o domínio quinase e a atividade da Chk2. O alelo restante selvagem (*wild-type*) gera uma proteína instável e geralmente perde sua função no tumor, o que resulta numa perda completa da função do Chk2 e redução nos níveis da proteína Chk2; um fenômeno que facilita a detecção de tumores com a proteína Chk2 1100delC por imunohistoquímica. Uma outra variante Chk2 I157T, de baixa penetrância, originalmente detectada em famílias da Síndrome Li Fraumeni, pode contribuir na população da Finlândia, para um aumento no risco de câncer de mama através de seu efeito negativo dominante sobre o alelo remanescente selvagem. Desse modo a proteína Chk2 I157T estável é deficiente em reconhecer seus substratos p53, Cdc25A e BRCA1, prejudicando a função do Chk2 selvagem quando expresso nas mesmas células, resultando em defeitos no processo de reparação do DNA induzidos pela radiação ionizante, predispondo à susceptibilidade aos portadores dessas variantes aos tumores de mama e de cólon. Dessa forma, caracteriza-se o gene Chk2 como um gene supressor de tumor (RIBEIRO *et al.*, 2006).

Sem haver mutação gênica reconhecida, existe uma fosforilação constitutiva da atividade Thr68 do Chk2 em subgrupos de carcinomas de cólon e de mama não submetidos a estímulo de dano ao DNA celular pelo tratamento com radioterapia ou quimioterapia, particularmente naqueles em que há a mutação do p53. Independentemente da ativação, a via ATM-Chk2 encontra-se persistentemente estimulada devido essa fosforilação constitutiva (RIBEIRO *et al.*, 2006).

Bartkova *et al.* se propuseram avaliar se o Chk2 era ativado em lesões e tumores pré-malignos, para tal compararam lesões superficiais com estádios iniciais

invasivos e estádios mais avançados de câncer na bexiga (BARTKOVA *et al.*, 2005). Através da técnica de imunohistoquímica, demonstrou-se coloração heterogênea positiva nas lesões superficiais em estádios iniciais, enquanto carcinomas primários mais avançados apresentaram coloração um pouco menor. Os autores concluíram que a ativação constitutiva da via ATM-Chk2 geralmente ocorre em fases pré-neoplásicas nos tumores de mama, cólon, bexiga e pulmão.

Outro trabalho analisando câncer de vulva, não houve associação com a perda da expressão de Chk2 no mRNA ou em nível da proteína e, em carcinomas gástricos, a expressão da proteína Chk2 esteve aumentada (REDDY *et al.*, 2002; SHIGEISHI *et al.*, 2002). Shigeishi *et al.* sugeriram que a expressão da proteína Chk2 aumenta em tumores gástricos com p53 mutado (SHIGEISHI *et al.*, 2002). No entanto, Tort *et al.* indicou que pode ocorrer alteração de expressão da proteína Chk2 independentemente do estado do p53 em outros tumores como linfomas (TORT *et al.*, 2002).

Bartkova *et al.* demonstrou que a cascata de ATM-Chk2-p53 é ativada em tumores de bexiga antes da ocorrência de mutações do p53 (BARTKOVA *et al.*, 2005).

Stawinska *et al.* avaliou o nível das proteínas Chk1 e Chk2 nas formas fosforiladas e não fosforiladas em tumores malignos de cólon esporádicos com o intuito de determinar a sua contribuição para o processo da carcinogênese utilizando a técnica Western-blot e ELISA (STAWINSKA *et al.*, 2008; BARTEK, 2003). Observou-se que houve um decréscimo dos níveis de pChk2 (forma fosforilada) de forma significativa em estádios iniciais de neoplasia e na ausência de envolvimento linfonodal; sendo também identificado um aumento da expressão de pChk2 de forma significativa nos tumores avançados com envolvimento linfonodal, permitindo associar a expressão de pChk2 com estádios mais avançados da doença e a um comportamento biológico mais agressivo (BARTEK, 2003). Este trabalho teve importante contribuição para o entendimento da participação das quinases Chk1 e Chk2 no envolvimento no processo da carcinogênese. Enquanto a expressão reduzida de Chk2 e de pChk2 podem ser um importante mecanismo de inativação, contribuindo para o desenvolvimento de neoplasias colorretais; o aumento da expressão parece estar correlacionada com o grau de malignidade.

Em relação à mucosa normal, a expressão de Chk1 está aumentada em cerca de 50%, porém não de forma significativa, e a sua forma ativada pChk1 está

diminuída em cerca de 50%, porém também não de forma significativa. Uma das possibilidades aventadas é que isto ocorra porque o Chk1 é uma proteína essencial da embriogênese, sendo necessária em alguns processos fisiológicos. Pouco ainda é conhecido sobre as atividades da Chk1 no câncer colón-retal ou o seu papel na sinalização intracelular (BARTEK, 2003). A informação sobre a expressão proteica do Chk1 e Chk2 através de análise por imunohistoquímica em tecidos tumorais humanos ainda é bastante limitada.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

O CCR é uma das neoplasias mais prevalentes mundialmente e no Brasil o número de casos novos tende a subir em consequência do envelhecimento populacional global. Sobretudo nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, onde existe dificuldade de acesso aos exames para diagnóstico precoce, aproximadamente metade dos pacientes diagnosticados com CCR apresenta-se com tumores já em estadios avançados, reduzindo substancialmente as taxas de resposta e possibilidades de cura (BOSCH *et al.*, 2011).

Buscando identificar biomarcadores que auxiliem no diagnóstico precoce ou que estratifiquem o comportamento biológico do tumor, permitindo uma individualização do tratamento, existem na literatura grupos de pesquisa voltados para biomarcadores gênicos (AGESEN *et al.*, 2012; HAN *et al.*, 2008; MAAK *et al.*, 2013; MARSHALL *et al.*, 2010; SALAZAR *et al.*, 2011; YIP *et al.*, 2010); biomarcadores protéicos (BUNGER *et al.*, 2011; SHIMWELL *et al.*, 2010; TAO *et al.*, 2012; WILD *et al.*, 2010); marcadores metabólicos (RITCHIE *et al.*, 2010); pesquisa do DNA tumoral nas fezes (AHLQUIST *et al.*, 2012) e marcadores de metilação do DNA como a septina 9 (mSEPT9) (GRUTZMANN *et al.*, 2008; AHLQUIST *et al.*, 2012).

No decorrer do processo da carcinogênese, o funcionamento inadequado da via de reparo celular tem grande importância na propagação das células neoplásicas, onde as quinases tem atividade fundamental no desfecho para o reparo da célula, a apoptose ou a continuidade do processo de transcrição. A expressão gênica e protéica das quinases têm sido estudadas em diversos tumores, incluindo tumores de mama, pulmão, ovário e cólon. Entretanto não há estudos que avaliam associações da expressão das quinases com características e o comportamento clínico do CCR.

Neste trabalho, será avaliada a expressão imunohistoquímica da Chk2 e sua associação com características clínicas e sobrevida dos pacientes com câncer de cólon metastático, buscando identificar um subgrupo de pacientes com doença mais agressiva, para os quais haveria, então, possivelmente, um maior benefício de

planejar o tratamento sistêmico envolvendo combinações de quimioterápicos e terapias-alvo, buscando alcançar no tratamento de primeira linha a máxima resposta possível.

HIPÓTESES

3. HIPÓTESES

A proteína Chk2 permanece estável durante o ciclo celular, ativada apenas quando um dano no DNA for detectado. Esta quinase já foi estudada em carcinomas de mama, pulmão, vulva, bexiga urinária, cólon, ovário, osteossarcoma e linfomas.

Considerando que a expressão reduzida de Chk2 e de pChk2 contribuem para o desenvolvimento de neoplasias cólon-retais, o aumento da expressão parece correlacionar-se com o grau de malignidade (STAWINSKA *et al.*, 2008).

Com este estudo, espera-se identificar uma maior positividade na expressão imunohistoquímica da Chk2 tumores de cólon metastáticos com comportamento biológico mais agressivo, doença mais extensa e aqueles com menor sobrevida.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

Este estudo tem por objetivos:

- 4.1. Caracterizar a expressão protéica da Chk2 no adenocarcinoma de cólon metastático, através da técnica de imunohistoquímica;
- 4.2. Associar a expressão da Chk2 com características clínico-patológicas e sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma de cólon metastático.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

O protocolo utilizado neste estudo esteve em conformidade com a diretriz ética de 1975 da Declaração de Helsinki e foi aprovado pelo Comitê de Ética Local (Processo HCRP nº 14277/2011).

3.1. Local do estudo

Este estudo foi realizado no HCFMRP-USP, na unidade do Campus Universitário. O HCFMRP-USP é caracterizado como um hospital universitário integrado ao Sistema Único de Saúde (SUS) que apresenta como natureza de organização uma autarquia, sendo a esfera administrativa e a gestão de âmbito estadual.

A assistência clínica aos pacientes oncológicos desta instituição é realizada através do Serviço de Oncologia Clínica, composto por ambulatório, enfermaria, farmácia e central de quimioterapia. Como recursos humanos esta equipe é composta por médicos, enfermeiros, farmacêuticos, técnicos de enfermagem e equipe multiprofissional (psicóloga, terapeuta ocupacional, assistente social, nutricionista, dentre outros), tendo como objetivo proporcionar atendimento integral ao paciente. As consultas médicas e orientação da enfermagem quanto a exames, retorno às consultas, tratamento quimioterápico, dentre outros, são realizadas diariamente no Ambulatório de Oncologia Clínica.

O processamento das amostras e as técnicas para montagem dos blocos de TMA (*Tissue Micro-Array*) e análises imunohistoquímicas foram realizadas no Laboratório do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP-USP em colaboração com o médico patologista Professor Doutor Alfredo Ribeiro Silva.

3.2. Casuística

Foram incluídas amostras de tecido tumoral parafinados de 58 pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma esporádico de cólon metastático, de ambos os

sexos; com idade maior ou igual a 18 anos, submetidos à ressecção do tumor primário pela equipe do Serviço de Proctologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP). Esses pacientes foram acompanhados e tratados pelo Serviço de Oncologia Clínica do HCFMRP-USP, no período de 2003 a 2013.

3.3. Amostragem

3.3.1. Coleta de informações clínicas, patológicas e de sobrevida

Foram coletadas, de forma retrospectiva, informações provenientes de dados clínicos, contidos em prontuário médico do paciente a respeito das características clínicas, histopatológicas e desfecho clínico.

As características clínicas e histopatológicas incluídas para a análise foram:

- sexo (masculino e feminino);
- idade em média e mediana;
- idosos (>65 anos e <65 anos);
- *performance status* segundo a classificação de ECOG;
- presença de abdome agudo obstrutivo/perfurativo;
- grau de diferenciação da célula tumoral (bem a moderadamente diferenciado e pouco diferenciado);
- subtipo histológico da neoplasia de cólon (adenocarcinoma e adenocarcinoma com componente mucinoso);
- profundidade de comprometimento tumoral (T2, T3 e T4);
- envolvimento linfonodal (presente e ausente),
- estadio clínico ao diagnóstico inicial (II e III);
- metástase sincrônica e metacrônica (ausente e presente).

Definiu-se metástase sincrônica como lesão metastática detectada à distância ao tempo de diagnóstico da neoplasia primária de cólon ou por até 6 meses de seu aparecimento e metástase metacrônica como lesão metastática à distância detectada após 6 meses da data de diagnóstico da neoplasia primária de cólon.

Os carcinomas foram estadiados de acordo com tamanho, comprometimento axilar e presença de metástases segundo os critérios definidos pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC, 7ª edição, 2010).

Quanto ao desfecho clínico, foram analisados:

- tempo de sobrevida global;
- tempo livre de progressão;
- sítios de metástases (pulmão e fígado) encontrados ao final do seguimento do paciente até análise dos dados.

Definiu-se tempo de sobrevida global como tempo decorrido da data do diagnóstico até a data de óbito por qualquer causa e tempo livre de progressão como tempo decorrido da data do diagnóstico até a data de progressão de doença (recidiva local, aparecimento de metástases e progressão para outros órgãos à distância) ou óbito por qualquer causa.

3.3.2. Técnicas Utilizadas

Selecionou-se apenas uma biópsia por paciente e, para cada caso, foram revisadas todas as lâminas coradas com H&E (hematoxilina-eosina) para confirmar o diagnóstico de adenocarcinoma de cólon e 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.

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

Para a confecção dos blocos de TMA, usou-se caneta metálica da marca *Hystopathology Ltda*, Hungria para retirada de fragmento de área representativa e central do tumor em formato cilíndrico. 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). Os fragmentos retirados foram colocados no bloco receptor, contendo 24 posições e levado para estufa a 60°C por 20 minutos; seguido

de resfriamento em temperatura ambiente por 20 minutos, e 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 coloração com HE no intuito de confirmar a presença de tumor no cilindro do TMA e, em seguida, os cortes histológicos foram colocados em lâminas de vidro embebidas pela poli-lisina a 8% para a realização do método imunohistoquímico. Para os cilindros com menos de 50% do cilindro total, repetiu-se novo corte de TMA.

3.3.2.2. Método imunohistoquímico

Todas as amostras teciduais foram fixadas em formalina e embebidas em parafina. Utilizou-se o bloqueio de peroxidase endógena para o protocolo de reação imunohistoquímica, que foi feito utilizando-se o kit do polímero REVEAL (Spring, BIOGEN – Hamburg, Germany). Foi utilizado o anticorpo Checkpoint quinase 2 (Chk2), clone DCS 270.1, Novocastra, *Newcastle upon Tyne*, UK, na diluição 1:50.

As lâminas foram deixadas em estufa para a retirada da parafina. Em seguida foram desparafinizadas em concentrações decrescentes de xilol e hidratadas, passando-se em concentrações decrescentes de álcool absoluto e água destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada em uma solução contendo 0,3% de solução de peróxido de hidrogênio, promovendo a recuperação antigênica em panela a vapor (*steamer*), utilizando-se tampão citrato de sódio 0,001M, pH 6,0 no recipiente. Em seguida, as lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente e secadas. Iniciou-se a incubação do anticorpo primário por 1 hora, seguida do anticorpo secundário universal biotinilado (kit REVEAL BIOGEN) por 10 minutos; aplicado conjugado polímero HRP (Horseradish peroxidase) por 15 minutos e em seguida lavado com solução salina tamponada TBS (*Tris buffer saline*). A reação foi revelada, corando-se com substrato cromógeno para peroxidase diaminobenzidina (DAB) e, em seguida, lavado com água. Nesta etapa final, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina, lavadas em água corrente, água amoniacal, desidratadas por uma série de alcoóis, passadas em concentração de xilol, seladas

com lamínula e coladas com *Permount* (Fisher Scientific, Fairlawn, NJ). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz convencional, em aumento de 40x (*Axiostar Plus*, Zeiss, Göttingen, Alemanha).

O controle negativo foi preparado suprimindo-se o anticorpo primário da reação e o controle positivo foi realizado utilizando-se a reação imunohistoquímica em tecido glandular sadio de mama. Para análise imunohistoquímica foi considerada “positiva” toda célula neoplásica com núcleo corado em marrom escuro e considerado Chk2 positivo se o cilindro de TMA apresentasse pelo menos 60% das células neoplásicas com expressão nuclear de moderada a intensa imunorreatividade (Figura 7).

Figura 7 - (A) Cilindro de TMA com corte de material contendo adenocarcinoma de cólon, considerado positivo (mais de 60% de imunomarcagem nuclear positiva, aumento 5x). (B) Células neoplásicas do cólon mostrando imunorreatividade para Chk2 (coloração nuclear, imunohistoquímica, 400x).

3.4. Análise Estatística

A análise descritiva das variáveis contínuas foi apresentada em média, mediana, valores mínimo e máximo, frequência absoluta e percentual. A análise estatística foi realizada utilizando-se o software SPSS 17.0 para regressão de Cox e análises de associação, e o software SAS® 9, através da PROC LOGISTIC (HOSMER *et al.*, 2000; SAS, 1999), para regressão logística.

A associação das variáveis qualitativas categóricas foi analisada através do teste qui-quadrado (χ^2) - para três ou mais variáveis categóricas - e teste exato de Fisher - para duas variáveis categóricas. Análises de associação foram feitas entre a expressão imunohistoquímica de Chk2 (negativo ou positivo) e as variáveis: sexo (masculino; feminino), idoso (>65 anos; <65 anos), histologia (adenocarcinoma; mucinoso), estadio T (T2; T3; T4), estadio N (N0; N1; N2), estadio clínico (ECII, ECIII, ECIV), abdome agudo obstrutivo/perfurativo (presente; ausente), metástase (sincrônica; metacrônica), comprometimento linfonodal (presente; ausente), sobrevida (vivo, morto), recorrência (presente; ausente), metástase pulmonar (presente; ausente), metástase hepática (presente; ausente), grau de diferenciação celular (grau I+II; grau III), ECOG (0+1; 2+3).

Os dados de sobrevida foram avaliados através do método não paramétrico de Kaplan-Meier e usado teste *long-rank* para comparar as curvas de sobrevida entre os grupos (Chk2 positiva *versus* negativa). A perda de seguimento ou a ausência da informação foi considerada como dado censurado. O tipo de censura usado neste estudo foi 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. Os dados foram trabalhados como dados de censura aleatória, já que o estudo foi interrompido após um período de tempo de observação pré-estabelecido.

Para verificar o efeito de interação entre a expressão imunohistoquímica Chk2 e as variáveis de interesse, foi utilizado o modelo de regressão logística, para estimar a probabilidade de um evento ocorrer em função de uma variável categórica/binária, obtendo-se assim o valor de *Odds Ratio* (OR), da variável binária com o desfecho (SG/SLP/ocorrência de metástases hepática/pulmonar e comprometimento linfonodal), verificando a medida de associação (Hosmer e Lemeshow, 2000). Os resultados foram obtidos com auxílio do software SAS® 9, através da PROC LOGISTIC (HOSMER *et al.*, 2000; SAS, 1999).

A interação entre a expressão imunohistoquímica Chk2 sobre tempo de sobrevida global, tempo livre de progressão, risco de envolvimento linfonodal e desenvolvimento de metástases pulmonares e hepáticas, foi utilizado modelo de riscos proporcionais de Cox, obtendo-se valor de *Hazard Ratio* (HR), pelo software SPSS 17.0, permitindo identificar valor prognóstico de cada variável sobre o desfecho. Este modelo não paramétrico que tem como princípio que o risco da

ocorrência de um evento é sempre uma constante nos dois grupos de comparação durante o período de observação, análise o risco de um evento (SG/SLP/ocorrência de metástases hepática/pulmonar e comprometimento linfonodal) ocorrer em um grupo em relação ao outro (grupo exemplo: Chk2 negativo versus Chk2 positivo).

O menor valor de α (nível de significância) escolhido para rejeitar a hipótese nula foi 0,05.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Análise descritiva

Da amostra analisada, 40 (69%) pacientes apresentaram expressão imunohistoquímica positiva para Chk2 e 18 (31%) expressão negativa. 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 boa condição clínica, sendo 54 (93%) pacientes classificados com ECOG 0/1 (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das características clínicas e histopatológicas da amostra geral dos pacientes com carcinoma de cólon

Características clínicas	Total: 58	Características histopatológicas	Total: 58
Masculino/feminino	32/26	Adenocarcinoma/mucinoso	50/8
Idosos/não idosos	19/39	Bem a moderadamente diferenciados/pouco diferenciados	53/5
ECOG 0-1/2	54/4	T2/T3/T4	5/38/15
AAOP		N+/N0	42/16
presente/ausente	16/42		
Metástases	36/22	ECII/ECIII/ECIV	8/14/36
Sincrônica/Metacrônica			

Legenda: ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*, ECOG 0: fully active, able to carry on all pre-disease performance without restriction, ECOG 1: restricted in physically strenuous activity but ambulatory and able to carry out work of a light or sedentary nature, ECOG 2: ambulatory and capable of all self care but unable to carry out any work activities, up and about more than 50% of waking hours. AAOP: abdome agudo obstrutivo/perfurativo, T: nível de comprometimento tumoral, N: nível de comprometimento linfonodal, N+: comprometimento linfonodal presente, N0: comprometimento linfonodal ausente, EC: estadio clínico.

Quanto às características histopatológicas do tumor primário, 50 (86%) pacientes tinham diagnóstico de adenocarcinoma e 53 (91%) pacientes apresentavam tumores bem ou moderadamente diferenciados. Dezesesseis (27,6%)

pacientes foram submetidos à cirurgia de urgência, devido abdome agudo obstrutivo ou perfurativo.

Segundo o estadiamento TNM, 5 (8,6%) pacientes apresentavam ao diagnóstico tumores estágio T2; 38 (65,5%) estadio T3 e 15 (25,9%) estadio T4; 42 (72,4%) pacientes com linfonodos comprometidos (N positivo) e 16 (27,6%) pacientes sem comprometimento linfonodal (N0). Ao diagnóstico, 8 (13,8%) pacientes foram classificados como estadio II e 14 (24%) como estadio III. Metástases sincrônicas ocorreram em 36 (62%) pacientes e metacrônicas em 22 (38%) pacientes (tabela 1). O tempo médio e mediano para a progressão de doença foi de 14,6 meses (10,8 a 18,4 meses) e 11 meses (8 a 13), respectivamente.

Os pacientes foram acompanhados pela equipe do Serviço de Oncologia Clínica do HCFMRP-USP por 34 a 60 meses, sendo que ao final deste período, 47 (81%) pacientes apresentavam metástases hepáticas e 27 (46,5%) pacientes apresentavam metástases pulmonares. Apenas 15,5% (9 pacientes) não apresentaram recorrência ou progressão da doença tumoral e 63,8% (37 pacientes) permaneceram vivos até o final do seguimento e análise dos dados. O tempo médio e mediano do tempo de sobrevida global foi de 63 (46-69) meses e 47 (34-60) meses, respectivamente. O tempo livre de progressão médio e mediano foi de 14,5 (10,8-18) meses e 11 (8-13) meses na amostra geral.

4.2. Análise de associação

Encontrou-se associação significativa entre a expressão de Chk2 com o *status* de acometimento linfonodal (presente ou ausente), $p=0,012$; e com a sobrevida (vivo ou morto), $p=0,034$; sendo mais frequente Chk2 negativa em pacientes vivos ao final do seguimento e 10 vezes mais chance de haver acometimento linfonodal, em relação àqueles com Chk2 positivo (OR:10,2, IC95% 1,23 – 84,62, $p=0,03$). Análise pelo software SPSS 17.0. Os dados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Análise de associação entre as características clínico-patológicas e a expressão imunohistoquímica (negativa e positiva) de Chk2 no adenocarcinoma de cólon.

Feature	Chk2 negative (18)	Chk2 positive (40)	p-value
Gender			0,268
Male	12	20	
Female	6	20	
Idoso			0,367
>65 anos	4	15	
<65 anos	14	25	
Histologia			0,413
Adenocarcinoma	17	33	
Mucinoso	1	7	
Estágio T			0,302
T2	3	2	
T3	10	28	
T4	5	10	
Estágio N			0,042
N0	1	15	
N1	8	11	
N2	9	14	
Estadio Clínico (EC)			0,051
ECII	0	8	
ECIII	7	7	
ECIV	11	25	
Abdome agudo obstrutivo/perfurativo (AAOP)			0,538
Presente	6	10	
Ausente	12	30	
Metástases			1,0
Sincrônica	11	25	
Metacrônica	7	15	
Envolvimento linfonodal			0,012
Presente	17	25	
Ausente	1	15	
Óbito			0,044
Sim	3	18	
Não	15	22	
Recorrência			0,119
Sim	13	36	
Não	5	4	
Metástase hepática			0,474
Presente	16	31	
Ausente	2	9	
Metástase pulmonar			0,404
Presente	10	17	
Ausente	8	23	
Grau de diferenciação celular tumoral			0,641

Grau I+II	16	37	
Grau III	2	3	
ECOG			1,0
ECOG 0+1	17	37	
ECOG 2	1	3	

Legenda: estadio T (TNM), T2: tumor invade muscular própria, T3: tumor invade além da muscular própria em direção ao tecido pericólico; T4 tumor invade o peritônio visceral ou adere às estruturas e/ou órgãos adjacentes; estadio N (TNM), N0: sem acometimento de metástases linfonodais, N1: metástases em 1 a 3 linfonodos regionais, N2: metástases em 4 ou mais linfonodos regionais, ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*; grau de diferenciação celular: Grau I: bem diferenciado, grau II: moderadamente diferenciado, grau III: pouco diferenciado.

4.3. Análise de sobrevida Kaplan-Meier

O tempo de sobrevida global dos pacientes Chk2 negativa até o término do período de seguimento foi, em média, 72,17 meses (IC95% 48-96 meses), não sendo estatisticamente diferente ($p=0,115$) daqueles pacientes Chk2 positiva (59,5 meses IC95% 41-78 meses) (Gráfico 1).

As curvas de sobrevida global foram estatisticamente diferentes entre os pacientes Chk2 negativa *versus* positiva quando a análise foi realizada ajustando-se os dados de acordo com a presença ou não de comprometimento linfonodal (positivo ou negativo) ($p=0,028$), ocorrendo maior número de óbitos entre os pacientes Chk2 positiva. O mesmo ocorreu, quando os dados de sobrevida global foram ajustados para o status de metástases hepáticas (presente ou ausente), observando-se um maior número de óbitos para os pacientes Chk2 positiva em relação aos pacientes Chk2 negativa, ($p=0,05$).

Quanto a sobrevida livre de progressão, também não houve diferença entre os grupos Chk2 negativa (19,27 meses, com IC95% 8,8-29,8 meses) e Chk2 positiva (13,33 meses IC95% 9,7-17 meses); $p=0,293$ (Gráfico 2).

Gráfico 1 - Curva Kaplan-Meier para sobrevida global de acordo com a expressão imunohistoquímica de Chk2 (negativa *versus* positiva) nos pacientes com adenocarcinoma de cólon.

Nos pacientes Chk2 negativa, a curva de sobrevida global foi maior, tanto para pacientes com metástases metacrônicas quanto sincrônicas. A sobrevida média dos pacientes com metástases sincrônicas foi 28,18 meses (IC95% 23,42-33) e com metástases metacrônicas foi 81,46 meses (IC95% 06,15-102,8), $p=0,05$. O subgrupo de pacientes Chk2 negativa apresentou um tempo de sobrevida maior, 35,4 meses (IC95% 25,93-44,86), em comparação ao Chk2 positivo, 25,12 meses (IC95% 20,6-19,64), no grupo com metástases sincrônicas. O subgrupo de pacientes Chk2 negativa apresentou um tempo de sobrevida maior, 89 meses (IC95%: 73,75-104,24), em comparação ao Chk2 positiva, 78 meses (IC95%: 53-102,96), no grupo de metástases metacrônicas, $p=0,05$.

Gráfico 2 - Curva Kaplan-Meier para sobrevida livre de progressão de acordo com a expressão imunohistoquímica de Chk2 (negativa *versus* positiva) nos pacientes com adenocarcinoma de cólon.

4.4. Regressão Logística

Obtendo-se o valor de *Odds Ratio* (OR), da variável binária com o desfecho, estimando a probabilidade de um evento ocorrer em função de uma variável categórica/binária, este modelo foi utilizado para verificar o efeito de interação entre a expressão imunohistoquímica Chk2 e as variáveis de interesse, analisando assim a medida de associação (Hosmer e Lemeshow, 2000). Os resultados foram obtidos com auxílio do software SAS® 9, através da PROC LOGISTIC (HOSMER *et al.*, 2000; SAS, 1999).

Foram identificados como fatores prognósticos independentes para uma menor sobrevida global: metástases sincrônicas (OR: 5,34, IC95% 1,1-25,88, $p=0,037$), ECOG avançado (OR: 77,5, IC95% 7,83-167, $p=0,001$), grau de diferenciação celular tumoral menor (OR: 9,02, IC95% 1,25-64,44, $p=0,029$) e

expressão positiva por imunohistoquímica de Chk2 (OR: 11,76, IC95%: 1,46-94,23, $p=0,020$).

Para a sobrevida livre de progressão, foram fatores prognósticos o ECOG (OR: 6,62, IC95% 1,46-21,6, $p=0,012$) e o grau de diferenciação celular tumoral (OR: 8,8, IC95% 2,43-31,74, $p=0,001$). Os dados estão descritos nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Fatores prognósticos independentes analisados por regressão logística para a sobrevida global

Variable	OR	95% CI	p-value
CHK2 expression	11,76	1,46 - 94,23	0,020
Performance status	77,51	7,83 – 767	0,001
Synchronous metastasis	5,34	1,10 - 25,88	0,037
Tumor cell differentiation	9,02	1,25 - 64,66	0,029
Lymph node involvement	0,24	0,05 - 1,01	0,053
Gender	0,347	0,093-1,292	0,115
Idoso (>65 anos)	0,437	0,126-1,518	0,193
Histology	1,036	0,214-5,016	0,965
AAO	3,813	0,924-15,742	0,064
Metástase hepática	0,333	0,061-1,807	0,203
Metástase pulmonar	0,832	0,280-2,476	0,741

Tabela 4 - Fatores prognósticos independentes analisados por regressão logística para a sobrevida livre de progressão

Variable	OR	95% CI	p-value
CHK2 expression	1,34	0,608-2,973	0,465
Gender	1,8	0,805-4,055	0,152
Idoso	1,103	0,501-2,428	0,808
Histology	0,57	0,213-1,532	0,266
AAO	0,857	0,409-1,794	0,682
Performance status	5,62	1,463-21,59	0,012
Tumor cell differentiation	8,79	2,434-31,74	0,001

Lymph node involvement	0,95	0,421-2,148	0,903
------------------------	------	-------------	-------

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Na amostra de pacientes estudada, todos os pacientes até o momento da inclusão no estudo já apresentavam metástases em algum órgão à distância (fígado e pulmão).

Ao diagnóstico, apenas 22 (37,8%) pacientes apresentavam ECII ou ECIII, pois o objetivo do trabalho enfocou a análise da expressão imunohistoquímica da Chk2 no cenário de doença metastática. A análise da expressão por imunohistoquímica foi realizada a partir de material do tumor primário obtido do cólon e não foram analisados tecidos tumorais provenientes de metástases.

Chk1 e Chk2 tem grande importância na via de reparo celular, direcionando se a célula alterada irá para apoptose, manterá o processo de transcrição ou será reparada. (GARRETT *et al.*, 2011).

Figura 8 - Atividade das Chk1 e Chk2 em resposta aos danos no DNA. Fonte: Trends Pharmacol Sci, 2011. Anticancer therapy with checkpoint inhibitors: what, where and when?

A molécula da Chk2 é uma proteína celular denominada como “*checkpoint*” quinase, atuando como proteína supressora de tumor devido à sua importante função de reparo e regulação na via de sinalização celular em resposta ao dano do DNA celular por agentes diversos (RIBEIRO *et al.*, 2006; BARTEK, 2003; AHN *et al.*, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2006).

A resposta a danos no DNA ocorre em diversas etapas sequenciais, como a parada do ciclo celular e reparação do DNA danificado (JACKSON *et al.*, 2009). Considerando o contexto do DNA danificado, os genes da Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM) e a Ataxia Telangiectasia Relacionada (ATR), agem como reguladores principais em resposta aos danos no DNA, ativando a Chk1 e Chk2, desencadeando a parada do ciclo celular através da via do gene p53 e o DNA danificado sendo, então, reparado (YAJIMA *et al.*, 2014). Quando os danos ao DNA não são corrigidos ou a célula em questão não entra em apoptose, ocorre o processo de transcrição da célula com o DNA alterado, contribuindo para a formação e progressão dos tumores malignos (OKA *et al.*, 2010; TAKABAYASHI *et al.*, 2013).

Em contrapartida, quando as repostas aos danos ocorrem de forma adequada e suficiente, mesmo no contexto das células neoplásicas, estas permanecem estáveis geneticamente. No entanto, quando as moléculas envolvidas nas respostas aos danos são afetadas, as células neoplásicas se tornam ainda mais instáveis contribuindo para a progressão destas para um genótipo e fenótipo ainda mais agressivos e com potencial de invasão e metástase (BARTKOVA *et al.*, 2005).

Em resposta a quebra da fita dupla ou estresse oxidativo, a ATM mutada é ativada, induzindo a fosforilação do Chk2-Thr68, ativando assim a Chk2 e desencadeando a ativação da cascata Chk2-ATM que estabilizam a p53 (fator de transcrição) através da fosforilação. Com a p53 estabilizada, este, induz a parada do ciclo celular (incluindo a senescência) ou a apoptose através da regulação da expressão de várias proteínas, entre elas a p21 (inibidor de Cdk) ou as proteínas BAX e PUMA (pró-apoptóticas). Esta via tem importância não apenas interrompendo o ciclo celular na fase G1-S, mas também funcionando como supressora tumoral (HIDEMASA *et al.*, 2012)

A expressão e atividade da Chk2, considerando sua relevância no reparo celular, tem sido estudada em diversos tumores. No câncer de pulmão, a expressão de Chk2 analisada por *western blot* foi menor, em relação a tecido pulmonar normal, ocasionando uma menor inativação e reparo aos danos do DNA celular e

contribuindo para o desenvolvimento tumoral. Essa menor expressão é atribuída a alterações epigenéticas, como a metilação do gene promotor do Chk2, prevenindo a ligação do fator transcricional, levando a um silenciamento da transcrição do gene Chk2. Como a função da quinase Chk2 é participar na via de sinalização do reparo ao DNA celular, a menor expressão de Chk2 nas neoplasias de pulmão pode explicar em parte a quimiorresistência e radiorresistência (ZHANG *et al.*, 2004).

A função da Chk2 na tumorigênese mamária também ainda é pouco conhecida, mas já foi descrita a associação entre uma menor expressão imunoistoquímica desta quinase nos tumores mais avançados. Entretanto, não foram identificadas associações entre a expressão de Chk2 (positiva ou negativa) e o *status* linfonodal; idade da paciente; grau de diferenciação da célula tumoral e dados de sobrevida (SG e SLP) (RIBEIRO *et al.*, 2006; SULLIVAN *et al.*, 2002; VAHTERISCO *et al.*, 2002; DUNNE *et al.*, 2003).

Em tumores germinativos de testículo observou-se redução e até ausência da expressão proteica da Chk2 em subgrupos de neoplasias invasivas comparadas às células germinativas normais e lesões pré-malignas, sugerindo que a diminuição da expressão proteica de Chk2 possa estar envolvida no desenvolvimento e progressão dessa neoplasia (BARTKOVA *et al.*, 2001).

A detecção de mutações gênicas germinativas do gene Chk1 e do Chk2 em um subgrupo de famílias diagnosticadas com síndrome de *Li Fraumeni* sugere que estas possam ser atuar como genes supressores tumorais em tumores esporádicos. Esta afirmação foi demonstrada através de uma sub-população da família portadores da síndrome de *Li Fraumeni* apresentando o gene p53 selvagem, mas, com Chk2 mutado, sugerindo que mutações germinativas no Chk2 participem da inativação do p53. O alelo Chk2 contendo a mutação 1100delC codifica uma proteína truncada C-terminal dentro do domínio quinase e confere um aumento no risco de câncer de mama independente de mutação associada ao *loci* BRCA, o qual confere susceptibilidade ao câncer de mama. As mutações *missenses* em todos os três domínios funcionais acontecem em vários tipos de tumores. O impacto funcional da mutação Chk2 geralmente reflete sua localização. Mutações no domínio quinase levam a ativação defeituosa após uma radiação ionizante, enquanto que mutações no domínio FHA podem acelerar a degradação da Chk2 ou podem induzir mudanças estruturais conferindo defeitos de interação proteína-proteína (AHN *et al.*, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2006).

Interessantemente, os carcinomas de vulva não exibem perda de expressão de Chk2 ao nível de mRNA e em nível protéico, enquanto que em carcinomas gástricos com mutação do p53 há aumento da sua expressão (REDDY *et al.*, 2002; SHIGEISHI *et al.*, 2002).

A ativação constitutiva da via ATM-Chk2 é um evento comumente ocorrido em estadios pré-invasivos da maioria dos tumores humanos. O padrão de expressão imunohistoquímica de Chk2 em lesões pré-malignas, lesões precoces e lesões superficiais invasivas e mais avançadas em tumores de bexiga é diferente. Há uma marcação positiva heterogênea nas lesões superficiais precoces e nas lesões iniciais invasivas, enquanto que nas lesões mais avançadas da neoplasia primária o padrão de marcação é menor (WILLIANS *et al.*, 2006; BARTKOVA *et al.*, 2005).

Estudos demonstram resultados discrepantes quanto ao efeito da deficiência de Chk2 sobre o fenótipo de células de camundongos à radiação ionizante, demonstrando serem mais resistentes ao dano celular, a alterações funcionais do p53 e a apoptose. Células HCT-15 de carcinoma de cólon deficientes em Chk2 foram estudadas para avaliar o efeito dessa deficiência na fase S do ciclo celular, confirmando o mau funcionamento da via de sinalização dos *checkpoints*, levando a síntese de DNA parcialmente resistente à radiação (BARTEK, 2003).

Neste trabalho, a expressão imunohistoquímica da Chk2 foi associada ao *status* de comprometimento linfonodal, de modo que a expressão negativa aumentou as chances de comprometimento linfonodal. O tempo de sobrevida livre de progressão foi menor em pacientes sem a expressão de Chk2 no tumor primário, podendo sugerir que a não expressão de Chk2 possa facilitar o processo de metastatização à distância. Alguns autores já descreveram que baixos níveis citoplasmáticos da forma fosforilada de Chk2 estão associados à condição de disseminação e invasão de várias neoplasias (STAWINSKA *et al.*, 2008; MATSUOKA *et al.*, 2001).

Em análise de regressão multivariada, demonstrou-se o impacto negativo sobre a sobrevida dos pacientes que expressavam padrão positivo de Chk2 por imunohistoquímica no tumor primário de cólon, acompanhado das metástases sincrônicas, pior condição clínica (avaliada pela escala de ECOG) e menor grau de diferenciação celular, de forma estatisticamente significativa. Não há estudo prévio descrito na literatura que analise a expressão imunohistoquímica Chk2 com o tempo de sobrevida em pacientes com câncer de cólon metastático.

O que já foi descrito na literatura a respeito de Chk2 e neoplasia de cólon é que o aumento da expressão da forma fosforilada da proteína Chk2 está relacionada a maior grau de malignidade. Sabe-se que o grau de malignidade da neoplasia implica em um comportamento mais agressivo da doença e impacta negativamente na sobrevida desses pacientes (RIBEIRO *et al.*, 2006). Dessa forma, é de se esperar que a expressão positiva por imunohistoquímica, que avalia uma forma de expressão protéica, tenha um valor prognóstico negativo na sobrevida.

Este estudo apresenta algumas limitações com relação à quantidade de pacientes envolvidos e por tratar-se de uma análise retrospectiva dos dados de sobrevida através de consulta às informações descritas em prontuário médico. Ainda assim, alguns dados foram relevantes nesta série de pacientes, demonstrando-se o valor prognóstico do Chk2 e a sua associação com o processo de disseminação do tumor através do comprometimento linfonodal. Estas informações vêm no sentido de instigar estudos laboratoriais funcionais e ensaios clínicos prospectivos avaliando a molécula Chk2 na neoplasia de cólon.

A via da Chk2 pode direcionar potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas-alvo. A combinação de inibidores de Chk2 e agentes quimioterápicos que levam a quebra e perda da função do DNA é uma possibilidade a ser considerada. Várias pequenas moléculas inibidoras de Chk1/2 já estão em testes pré-clínicos (CHIR124) e em estudos fase I (XL844, PF-00477736, AZD7762) (GARRITY *et al.*, 2004). Caracterizar os pacientes oncológicos de acordo com a expressão de moléculas envolvidas no processo da carcinogênese de significado prognóstico possibilita buscar o desenvolvimento de terapias anti-neoplásicas personalizadas e mais eficazes, no intuito de modificar o curso natural da doença neoplásica no indivíduo.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A expressão positiva do Chk2 no adenocarcinoma de cólon metastático foi indicativa de maior agressividade e disseminação tumoral, impactando de forma negativa na sobrevida e desfecho dos pacientes.

REFERÊNCIAS

AGESEN, T.H.; SVEEN, A.; MEROK, M.A.; *et al.* ColoGuideEx: a robust gene classifier specific for stage II colorectal cancer prognosis. **Gut**; 61: 1560-1567 [PMID: 22213796 DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301179]. 2012.

AHLQUIST, D.A.; ZOU, H.; DOMANICO, M.; *et al.* Next-generation stool DNA test accurately detects colorectal cancer and large adenomas. **Gastroenterology**; 142: 248-56; quiz e25-6 [PMID: 22062357 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.10.031]. 2012.

AHMEDINJEMAL, D.V.M.; FREDDIE, B.; CENTER, M.M.; *et al.* Global Cancer Statistics. **American Cancer Society**; 61:69–90. 2011.

AHN, J.; URIST, M.; PRIVES, C. The Chk2 protein kinase. **DNA Repair**. 3:1039–1047. 2004.

ALLEN, W.L.; JOHNSTON, P.G. Role of genomic markers in colorectal cancer treatment. **J Clin Oncol**, n. 23, p. 4545-52, 2005.

ANDREYEV, H.J.N.; NORMAN, A.R.; 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.

ASTLER, V.B.; COLLER, F.A. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. **Ann Surg**; 139: 846–852. 1954.

BARTEK, J.; FALCK, J.; LUKAS, J. Chk2 kinase—a busy messenger. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2:877–886. 2001.

BARTEK, J.; LUKAS, J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. **Cancer Cell**. May 2003.

BARTKOVA, J.; FALCK, J.; RAIPERT-DE MEYTS, E.; *et al.* Chk2 tumour suppressor protein in human spermatogenesis and testicular germ-cell tumours. **Oncogene**; 20(41):5897–5902. 2001.

BARTKOVA, J.; HOREJSI, Z.; KOED, K.; *et al.* DNA damage response as a candidate anticancer barrier in early human tumorigenesis. **Nature**; 434:864–70. 2005.

BARKER, N.; *et al.* Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. **Nature**; 457(7229):608–611. 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site+/home+/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014. Acesso em 27 novembro 2013.

BRAY, F.; REN, J.S.; MASUYER, E.; FERLAY, J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. **Int J Cancer**; 132: 1133–1145. 2013.

BERTONI, F.; CODEGONI, A.M.; FURLAN, D.; *et al.* CHK1 frameshift mutations in genetically unstable colorectal and endometrial cancers. **Genes Chromosomes Cancer** 26:176–180. 1999.

BRETTTHAUER, M. Colorectal cancer screening. **J Intern Med**; 270: 87–98. 2011.

BONCHEVA, V.; BONNEY, S.A.; BROOKS, S.E.; *et al.* New targets for the immunotherapy of colon cancer—does reactive disease hold the answer? **Cancer Gene Therapy** 20, 157–168. 2013.

BOSCH, L.J.; CARVALHO, B.; FIJEMAN, R.J.; *et al.* Molecular tests for colorectal cancer screening. **Clin Colorectal Cancer**; 10: 8-23 [PMID: 21609931]. 2011.

BOYLE, T.; HEYWORTH, J.; BULL, F.; *et al.* Timing and intensity of recreational physical activity and the risk of subsite-specific colorectal cancer. **Cancer Causes Control**; 22: 1647–1658. 2011.

BUNGER, S.; HAUG, U.; KELLY, F.M.; *et al.* Toward standardized high-throughput serum diagnostics: multiplex-protein array identifies IL-8 and VEGF as serum markers for colon cancer. **J Biomol Screen**; 16: 1018-1026 [PMID: 21807963 DOI: 10.1177/1087057111414894]. 2011.

CHEN, Y.; SANCHEZ, Y. Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. **DNA Repair** 3:1025–1032.

CUNNINGHAM, D.; ATKIN, W.; LENZ, H.J.; *et al.* **Colorectal cancer**. *Lancet*; 375: 1030– 1047. 2010.

CRICK, F. The double helix: A personal view. **Nature** 248, 766 – 769, 1974.

CYBULSKI, C.; GORSKI, B.; HUZARSKI, T.; *et al.* CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. **Am J Hum Genet** 75(6):1131–1135. 2004.

DEBERNARDIS, R.J.; LUM, J.J.; HATZIVASSILOU, G.; THOMPSON, C.B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. **Cell Metab**; 7: 11–20. 2008.

DE VITA, V.T.; LAWRENCE, T.S.; ROSENBERG, S.A. *Cancer Principles E Practice of Oncology*, 8th edition. Philadelphia. **Lippincott Williams & Wilkins**, 2008.

DUNNE, B.; GUSTERSON, B.A.; OSIN, P.; *et al.* Concomitant inactivation of p53 and Chk2 in breast cancer. **Oncogene**; 21(9):1316–24. 2003.

DUKES, C.E. The classification of cancer of the rectum. **J Pathol Bacteriol**; 35:323–332. 1932.

EDGE, S.B.; BYRD, D.R.; COMPTON, C.C.; *et al.* **AJCC Cancer Staging Manual**. 7th edn. Springer, New York, 2010.

ETZIONI, R.; URBAN, N.; RAMSEY, S.; *et al.* The case for early detection. **Nat Rev Cancer**; 3: 243-252 [PMID: 12671663 DOI: 10.1038/nrc1041]. 2003.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell** 1990; 61: 759-67.

FERLAY, J.; SHIN, H.R.; BRAY, F.; *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer**; 127: 2893–2917. 2010.

FERLAY, J.; SHIN, H.R.; BRAY, F.; *et al.* GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2010.

FREEMAN, A.K.; MONTEIRO, A.N. Phosphatases in the cellular response to DNA damage. **Cell Communication and Signaling** 2010.

FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. Oncologia Molecular. **Ed Atheneu**, 2º ed, 2011.

FRIEDBERG, E.C.; WALKER, W.; SIEDE, R.D.; *et al.* DNA repair and mutagenesis. **ASM Press**, 2006.

GARRETT, M.D.; COLLINS, I. Anticancer therapy with checkpoint inhibitors: what, where and when? **Trends Pharmacol Sci**, 2011.

GARRITY, M.M.; BURGAT, L.J.; MAHONEY, M.R.; *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.

GROTHEY, A.; VAN CUTSEM, E.; SOBRERO, A.; *et al.* 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.

GRUTZMANN, R.; MOLNAR, B.; PILARSKY, C.; *et al.* Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. **PLoS One**; 3: e3759 [PMID: 19018278 DOI: 10.1371/journal.pone.0003759]. 2008.

HAN, M.; LIEW, C.T.; ZHANG, H.W.; *et al.* Novel blood-based, five-gene biomarker set for the detection of colorectal cancer. **Clin Cancer Res**; 14: 455-460 [PMID: 18203981 DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-07-1801]. 2008.

HERBST, A.; KOLLIGS, F.T. Detection of DNA hypermethylation in remote media of patients with colorectal cancer: new biomarkers for colorectal carcinoma. **Tumour Biol**; 33: 297–305. 2012.

HIDEMASA, G.; ICHIRO, I.; PING, L.; *et al.* Novel regulation of checkpoint kinase 1: is checkpoint kinase 1 a good candidate for anti-cancer therapy? **Cancer Sci**, 2012

HOSMER, D.W.; LEMESHOW, S. Applied Logistic Regression, 2ed., New York: **John Willey & Sons**, 2000.

JACKSON, S.P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, 2009.

KALOGEROPOULOS, N.; CHRISTOFOROU, C.H.; GREEN, A.J.; *et al.* Chk-1 is an essential gene and is required for an S-M checkpoint during early embryogenesis. **Cell Cycle** 3:1196–1200. 2004.

KELLY, H.; GOLBERG, R.M. Systemic therapy for metastatic colorectal cancer: current options, current evidence. **J Clin Oncol** 2005; 23: 4553-60.

KILPIVAARA, O.; LAIHO, P.; AALTONEN, L.A.; NEVANLINNA, H. CHEK2 1100delC and colorectal cancer. **J Med Genet** 40:e110. 2003.

KIM, J.S.; HUR, H.; MIN, B.S.; *et al.* Oncologic outcomes of self-expanding metallic stent insertion as a bridge to surgery in the management of left-sided colon cancer obstruction: comparison with nonobstructing elective surgery. **World J Surg**; 33:1281-1286. 2009.

KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. **Cell**; 87: 159-170. 1996.

KUIPERS, E.J.; ROSCK, T.; BRETTAUER, M. Colorectal cancer screening--optimizing current strategies and new directions. **Nat Rev Clin Oncol**; 10: 130-142 [PMID: 23381005 DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.12]. 2013.

LANGAN, R.C.; MULLINAX, J.E.; RAY, S.; *et al.* A Pilot Study Assessing the Potential Role of non-CD133 Colorectal Cancer Stem Cells as Biomarkers. **Journal of Cancer**. Jun 2012.;3: 231-240.

LENA, M.D.; TRAVAGLIO, E.; ALTOMARE, D.F. New strategies for colorectal cancer screening. **World J Gastroenterol**; 19(12): 1855-1860. 2013.

LENGAUER, C.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instability in colorectal cancers. **Nature**; 386: 623–627. 1997.

LIEVRE, A.; BACHET, J.B.; 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.

LUKAS, C.; BARTKOVA, J.; LATELLA, L.; *et al.* DNA Damage-activated kinase Chk2 is independent of proliferation or differentiation yet correlates with tissue biology. **Cancer Res** 61:4990–4993. 2001.

MAAK, M.; SIMON, I.; NITSCHKE, U.; *et al.* Independent validation of a prognostic genomic signature (ColoPrint) for patients with stage II colon cancer. **Ann Surg**; 257: 1053-1058 [PMID: 23295318 DOI: 10.1097/SLA.0b013e31827c1180]. 2013.

MATSUOKA, S.; NAKAGAWA, T.; MASUDA, A.; *et al.* Reduced expression and impaired kinase activity of a Chk2 mutant identified in human lung cancer. **Cancer Res** 61:5362–5365. 2001.

MARSHALL, K.W.; MOHR, S.; KHETTABI, F.E.; *et al.* A blood-based biomarker panel for stratifying current risk for colorectal cancer. **Int J Cancer**; 126: 1177-1186 [PMID: 19795455 DOI: 10.1002/ijc.24910]. 2010.

MELLA, J.; BIFFIN, A.; RADCLIFFE, A.G.; STAMATAKIS, J.D.; STEELE, R.J. Population-based audit of colorectal cancer management in two UK health regions. Colorectal Cancer Working Group, Royal College of Surgeons of England Clinical Epidemiology and Audit Unit. **Br J Surg**;84: 1731-1736. 1997.

MENOYO, A.; ALAZZOUZI, H.; ESPIN, E.; *et al.* Somatic Mutations in the DNA damageresponse genes ATR and Chk1 in sporadic stomach tumors with microsatellite instability. **Cancer Res** 61:7727–7730. 2001.

MILANO, G.; ETIENNE-GRIMALDI, M.C.; DAHAN, L.; *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) status and Kras mutations in colorectal cancer. **Ann Oncol** 2008;19:2033-8.

MOTOYAMA, N.; NAKA, K. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. **Curr Opin Genet Deve** 14:11–16. 2004.

National Cancer Institute. NCI Dictionary Cancer Terms. Em <http://www.cancer.gov/dictionary?cdrid=655245>. Acesso em: 16 março 2014.

National Cancer Institute Factsheets. Tests to detect colorectal cancer and polyps<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/colorectal-screening>. Acesso em: 20 março 2014.

NCI (2013) Colorectal cancer prevention (PDQ_). National Cancer Institute, Rockville, MD.http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/prevention/colorectal/HealthProfessional/page2#Section_995. Acesso em 15 fevereiro 2013.

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

NEDREBO, B.S.; SOREIDE, K.; ERIKSEN, M.T.; *et al.* Survival effect of implementing national treatment strategies for curatively resected colonic and rectal cancer. **Br J Surg**; 98: 716–723. 2011.

NELSON, R.S.; THORSON, A.G. Colorectal cancer screening. **Curr Oncol Rep**; 11: 482-489 [PMID: 19840526]. 2009.

OKA, K.; TANAKA, T.; ENOKI, T.; *et al.* DNA damage signaling is activated during cancer progression in human colorectal carcinoma. **Cancer Biol Ther**, 2010

PARRILLA-CASTELLAR, E.R.; ARLANDER, S.J.H.; KARNITZ, L. Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. **DNA Repair** 3:1009–1014. 2004.

PANT, K.D.; MCCracken, J.D. Noninvasive colorectal cancer screening. **Dig Dis Sci**; 47: 1236-1240 [PMID: 12064797]. 2002.

PIGNONE, M.; RICH, M.; TEUTSCH, S.M.; BERG, A.O.; LOHR, K.N. Screening for colorectal cancer in adults at average risk: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. **Ann Intern Med**; 137: 132-141 [PMID: 12118972]. 2002.

PHILLIPS, R.K.; HITTINGER, R.; FRY, J.S.; FIELDING, L.P. Malignant large bowel obstruction. **Br J Surg**; 72:296-302. 1985.

PEERY, A.F.; DELLON, E.S.; LUND, J.; *et al.* Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update. **Gastroenterology**; 143: 1179–1187. e1173. 2012.

QUAGLIA, A.; VERCELLI, M.; LILLINI, R.; *et al.* Socio-economic factors and health care system characteristics related to cancer survival in the elderly. A population-based analysis in 16 European countries (ELDCARE project). **Crit Rev Oncol Hematol**; 54: 117–128. 2005.

REDDY, A.; YUILLE, M.; SULLIVAN, A.; *et al.* Analysis of CHK2 in vulval neoplasia. **Br J Cancer** 86:756–760. 2002.

RIBEIRO-SILVA, A.; KOYOTA, M.A.; BECKER, M.H.; *et al.* Expression of checkpoint kinase 2 in breast carcinomas: correlation with key regulators of tumor cell proliferation, angiogenesis, and survival. **Histol Histopathol**.:21: 000-000. 2006.

RITCHIE, S.A.; AHIAHONU, P.W.; JAYASINGHE, D.; *et al.* Reduced levels of hydroxylated, polyunsaturated ultra long-chain fatty acids in the serum of colorectal cancer patients: implications for early screening and detection. **BMC Med**; 8: 13 [PMID: 20156336 DOI: 10.1186/1741-7015-8-13]. 2010.

ROY, S.; MAJUMDAR, A.P.N. Signaling in colon cancer stem cells. **Journal of Molecular Signaling**. August 2012.;7:11.

SAIF, M.W.; CHU, E. Biology of colorectal câncer. **Cancer J**;16(3):196-201. 2010.

SALAZAR, R.; ROEPMAN, P.; CAPELLA, G.; *et al.* Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. **J Clin Oncol**; 29: 17-24 [PMID: 21098318 DOI: 10.1200/jco.2010.30.1077]. 2011.

SANTOS, D. Reparo do DNA. **Genética Molecular**. 2011.

SAS Institute Inc.. SAS/STAT® User's Guide. Version 9.0. Cary, NC: **SAS Institute Inc.**. 1999.

STAWINSKA, M.; CYGANKIEWICZ, A.; TRCINSKI, R.; *et al.* Alterations of Chk1 and Chk2 expression in colon cancer. **Int J Colorectal Dis**. Aug.;23:1243–1249. 2008.

SERPELL, J.W.; MCDERMOTT, F.T.; KATRIVESSIS, H.; HUGHES, E.S. Obstructing carcinomas of the colon. **Br J Surg**; 76:965-969. 1989.

SIEGEL, R.; DESANTIS, C.; VIRGO, K.; *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics. **CA Cancer J Clin** 2012; 62: 220–241. 2012.

SHIGEISHI, H.; YOKOZAKI, H.; QUE, N.; *et al.* Increased expression of Chk2 in human gastric carcinomas harboring P53 mutations. **Int J Cancer** 99:58–62. 2002.

SHIH, I.M.; ZHOU, W.; GOODMAN, S.N.; *et al.* Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. **Cancer Res**; 61: 818–822. 2001.

SHILOH, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. **Nature Reviews Cancer** 2003.

SHIMWELL, N.J.; WEI, W.; WILSON, S.; *et al.* Assessment of novel combinations of biomarkers for the detection of colorectal cancer. **Cancer Biomark**; 7: 123-132 [PMID: 21263188 DOI: 10.3233/cbm-2010-0155]. 2010.

SOREIDE, K. Molecular testing for microsatellite instability and DNA mismatch repair defects in hereditary and sporadic colorectal cancers – ready for prime time? **Tumour Biol**; 28: 290–300. 2007.

SOREIDE, K.; BERG, M.; SKUDAL, B.S.; NEDREBO, B.S. Advances in the understanding and treatment of colorectal cancer. **Discov Med**; 12: 393–404. 2011.

SOERIMATARAM, I.; LORTET-TIEULENT, J.; PARKIN, D.M.; *et al.* Global burden of cancer in 2008: a systematic analysis of disability-adjusted life-years in 12 world regions. **Lancet**; 380: 1840–1850. 2012.

STRUL, H.; ARBER, N. Screening techniques for prevention and early detection of colorectal cancer in the average risk population. **Gastrointest Cancer Res**; 1: 98–106. 2007.

TAKABAYASHI, H.; WAKAI, T.; AJIOKA, Y.; *et al.* Alteration of the DNA damage response in colorectal tumor progression. **Human Pathol**, 2013.

TAO, S.; HAUG, U.; KUHN, K.; BRENNER, H. Comparison and combination of blood-based inflammatory markers with faecal occult blood tests for non-invasive colorectal cancer screening. **Br J Cancer**; 106: 1424-1430 [PMID: 22454079 DOI: 10.1038/bjc.2012.104]. 2012.

TORT, F.; HERNANDEZ, S.; BEA, S.; *et al.* CHK2- decreased protein expression and infrequent genetic alterations mainly occur in aggressive types of non-Hodgkin lymphomas. **Neoplasia** 100:4602–4608. 2002.

THUN, M.J.; DELANCEY, J.O.; CENTER, M.M.; *et al.* The global burden of cancer: priorities for prevention. **Carcinogenesis**; 31: 100–110. 2010.

TROMPETAS, V. Emergency management of malignant acute left-sided colonic obstruction. **Ann R Coll Surg Engl**;90:181-186. 2008.

ULLMAN, T.A.; ITZKOWITZ, S.H. Intestinal Inflammation and Cancer. **Gastroenterology**;140:1807–1816. 2011.

UMPLEBY, H.C.; WILLIAMSON, R.C. Survival in acute obstructing colorectal carcinoma. **Dis Colon Rectum**;27:299-304. 1984.

VAHTERISTO, P.; TAMMINEN, A.; KARVINEN, P.; *et al.* p53, CHK2, and CHK1 genes in Finnish families with Li- Fraumeni syndrome: further evidence of CHK2 in inherited cancer predisposition. **Cancer Res** 61:5718–5722. 2001.

VAHTERISTO, P.; BARTKOVA, J.; EEROLA, J.; *et al.* CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 71:432–438. 2002.

YAJIMA, N.; WADA, R.; MATSUZAKI, Y., *et al.* DNA damage response and its clinicopathological relationship in appendiceal tumors. **Int J Colorectal Dis**. 2014

VAN DE WETERING, M.; SANCHO, E.; VERWEJJ, C.; *et al.* The β -catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. **Cell**; 111: 241–250. 2002.

XU, X.; TSVETKOV, L.M.; STERN, D.F. Chk2 activation and phosphorylation-dependent oligomerisation. **Mol Cell Biol** 22:4419–4432. 2002.

YIP, K.T.; DAS, P.K.; SURIA, D.; *et al.* A casecontrolled validation study of a blood-based seven-gene biomarker panel for colorectal cancer in Malaysia. **J Exp Clin Cancer Res**; 29: 128 [PMID: 20846378 DOI: 10.1186/1756- 9966-29-128]. 2010.

WALDNER, M.J.; NEURATH, M.F. The molecular therapy of colorectal cancer. **Molecular Aspects of Medicine** 2010; 31: 171-178.

WAGNER, P.D.; SRIVASTAVA, S. New paradigms in translational science research in cancer biomarkers. **Transl Res**; 159: 343-353 [PMID: 22424436 DOI: 10.1016/j.trsl.2012.01.015. 2012.

WARD, P.S.; THOMPSON, C.B. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate. **Cancer Cell**; 21: 297–308. 2012.

WEISCHER, M.; NOJESSEN, S.E.; TYJOERG-HANSEN, A.; *et al.* Increased risk of breast cancer associated with CHEK2* 1100delC. **J Clin Oncol** 24:1–7. 2006.

WETERINGS, E.; CHEN, D.J. The endless tale of non-homologous end-joining. **Cell Res**, 2008.

WILD, N.; ANDRES, H.; ROLLINGER, W.; *et al.* A combination of serum markers for the early detection of colorectal cancer. **Clin Cancer Res** 2010; 16: 6111-6121 [PMID: 20798228 DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-10-0119].

WILLIAMS, L.H.; CHOONG, D.; JOHNSON, L.H.; CAMPBELL, I.G. Genetic and Epigenetic Analysis of *CHEK2* in Sporadic Breast, Colon, and Ovarian Cancers. **Clin Cancer Res**;12(23):6967-72. 2006.

WINAWER, S.J.; ZAUBER, A.G.; HO, M.N.; *et al.* Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. **N Engl J Med**; 329: 1977-1981 [PMID: 8247072]. 1993.

WHO. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Action plan for the global strategy for the prevention and control of noncommunicable diseases: prevent and control cardiovascular diseases, cancers, chronic respiratory diseases and diabetes. **World Health Organization** 2008; Printed by the WHO Document Production Services: Geneva, Switzerland, ISBN 978 92 4 159741. 2008-2013

ZHANG, P.; WANG, J.; GAO, W.; *et al.* CHK2 kinase expression is down-regulated due to promoter methylation in non-small cell lung cancer. **Mol Cancer**. : 3:14. May 2004.

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
Biomédica Fabianna Pansani
Profa Dra Fernanda Maris Peria – pesquisador 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