



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**EXPRESSÃO DE PARKINA, APC, APEX1, BCL2L1, CD36 e p53 –
IMPLICAÇÕES EM ADENOCARCINOMA COLORRETAL**

Mestranda: AMANDA PEREIRA AGOSTINHO
Orientadora: VANESSA SANTOS SOTOMAIOR
Coorientadora: LÚCIA DE NORONHA

CURITIBA
2020

AMANDA PEREIRA AGOSTINHO

**EXPRESSÃO DE PARKINA, APC, APEX1, BCL2L1, CD36 e p53 –
IMPLICAÇÕES EM ADENOCARCINOMA COLORRETAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Vanessa Santos Sotomaior
Coorientadora: Lúcia de Noronha

CURITIBA

2020

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Pamela Travassos de Freitas – CRB 9/1960

A275e
2020 Agostinho, Amanda Pereira
Expressão de parkina, APC, APEX1, BCL2L1, CD36 e p53 – implicações em adenocarcinoma colorretal / Amanda Pereira Agostinho ; orientadora: Vanessa Santos Sotomaior ; coorientadora: Lúcia de Noronha. – 2020
83 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2020

Bibliografias: 70-83

1. Adenocarcinoma. 2. Biomarcadores. 2. Cólon (Anatomia) – Câncer.
3. Reto - Câncer. I. Sotomaior, Vanessa Santos. II. Noronha, Lúcia de.
III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDD 20. ed. – 616.994347

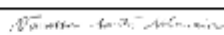


Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL
DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.**

Aos 09 dias do mês de setembro de 2020 às 08:30, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação "EXPRESSÃO DE PARKINA, APC, APEX1, BCL2L1, CD36 e p53 – IMPLICAÇÕES EM ADENOCARCINOMA COLORRETAL" apresentado por Amanda Pereira Agostinho para obtenção do título de mestre; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior – Presidente (PUCPR)	
Profa. Dra. Selene Elifio Esposito (PUCPR)	
Profa. Dra. Ana Paula Percicote (UFPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior	Conceito: Aprovada
Profa. Dra. Selene Elifio Esposito	Conceito: Aprovada
Profa. Dra. Ana Paula Percicote	Conceito: Aprovada

Parecer Final: Aprovada

Observações da Banca Examinadora:
Sem observações.



Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior
Presidente da Banca Examinadora



Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

Rua Imaculada Conceição, 1155 – Prado Velho – CEP 80215-901
Tel./Fax: (41) 3271-2285 – E-mail: ppgcs@pucpr.br
www.pucpr.br – Curitiba – Paraná – Brasil

Dedicatória

Dedico este estudo aos meus amados pais, Eliseu e Simone, por seu apoio incondicional; aos meus irmãos, João Vitor e Júlia, por serem a maior alegria e motivação que uma irmã poderia pedir e, principalmente, a Deus por todas as graças que têm me concedido.

Agradecimentos

Acima de tudo, gostaria de agradecer a Deus por estar comigo durante a minha caminhada, por ser o meu maior apoio durante os momentos bons e os momentos difíceis, e, principalmente, por todas as pessoas e oportunidades que colocou em meu caminho.

Sou eternamente grata aos meus amados pais, Eliseu de Sá Agostinho e Simone dos Santos Pereira, por todo seu amor, paciência e dedicação. Meu muito obrigada e minha eterna admiração a eles que muito sacrificaram pelo meu bem-estar e futuro e que desde muito pequena me incentivaram a seguir em frente e me ensinaram com amor a valiosa lição do trabalho duro, esforço e dedicação. Nada que é duradouro vem fácil, diziam eles, então se esforce, estude e trabalhe para garantir o seu futuro. Sou abençoada em tê-los como meus pais, e mais abençoada ainda por tê-los como companheiros nesta jornada.

Aos meus queridos irmãos, João Vitor Pereira Agostinho e Júlia Pereira Agostinho, que mesmo não compreendendo completamente o objetivo desse trabalho, do seu jeitinho, me impulsionam todos os dias a seguir em frente; por me fazerem sorrir nos momentos em que mais preciso, pela paciência e compreensão com as minhas ausências e por serem a melhor parte de mim. Amo muito vocês!

Aos meus tios, Rosicléia Nascimento e Jorge Luiz Nascimento, por serem para mim mais do que apenas os meus tios, mas também incentivadores e apoiadores fiéis. Meu muito obrigada por todas as suas palavras de encorajamento e auxílio, mesmo que muitas vezes de longe. Tenho vocês como minha segunda mãe e meu segundo pai.

Aos demais familiares que demonstraram seu apoio, meu muito obrigada.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Vanessa Santos Sotomaior, pela oportunidade que me concedeu anos atrás no meu primeiro PIBIC, e por toda a sua sábia orientação, auxílio e incentivo durante esses anos. Muito obrigada por compartilhar comigo parte do seu grande conhecimento e por confiar a mim este trabalho. É um exemplo de profissional, quem sempre terei como uma grande mentora e exemplo de pesquisadora. Me sinto honrada em ser sua aluna.

À minha coorientadora, Prof.^a Dra. Lúcia de Noronha, por toda a sua valiosa contribuição neste estudo. Muito obrigada por toda a sua dedicação, por partilhar comigo parte de seu conhecimento, por sua paciência e disponibilidade para me ensinar as técnicas necessária para este trabalho, e sanar as dúvidas que surgiam a cada etapa.

A todos os meus colegas de laboratório, com quem eu pude contar e que em muito contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho. A ciência não é um trabalho individual, mas um esforço conjunto, e me sinto grata e honrada por tê-los como companheiros de pesquisa.

À equipe do Laboratório de Patologia Experimental, Ana Paula Martins Camargo, Carol Vaz, Marina Azevedo e Seigo Nagashima. Extremamente prestativos e competentes, me forneceram inestimável auxílio e colaboração nas diferentes etapas deste estudo.

À Prof.^a Márcia Olandoski, por sua inestimável contribuição na realização deste estudo e realização das análises estatísticas.

A todos os professores que vêm participando da avaliação deste estudo. Meu muito obrigada por sua disponibilidade e prontidão em contribuir para o desenvolvimento deste trabalho e por partilharem sua experiência e conhecimento.

Ao prêmio Marcelino Champagnat, pela concessão de uma bolsa que me garantiu a grande oportunidade de cursar esta pós-graduação. Serei eternamente grata à PUCPR por esse prêmio.

A todos os meus amigos, em especial a Débora dos Santos, Camila Coelho, Nicolas Cardoso e Alexandre Chinda, muito obrigada por sua paciência e compreensão com as minhas ausências. Sua amizade e apoio são essenciais para mim.

A todos que eu mencionei aqui, novamente meu muito obrigada. Sem eles este trabalho não teria sido concluído.

“Quanto mais eu estudo a natureza,
mais eu fico maravilhado com as obras do Criador.
A ciência me aproxima de Deus.”

Louis Pasteur

Resumo

INTRODUÇÃO: O câncer colorretal (CCR) é o terceiro mais diagnosticado e o segundo em número de mortes no mundo. Os tratamentos convencionais incluem quimioterapia e radioterapia e podem ser neoadjuvantes e/ou adjuvantes. Contudo, os pacientes respondem de modo diferente à terapêutica e eventualmente apresentam resistência aos quimioterápicos ou à radiação. Biomarcadores tem sido utilizados em diferentes tipos de câncer desde a identificação de lesões iniciais até a estratificação dos pacientes em grupos de risco, o que colabora para um prognóstico individualizado e uma conduta clínica mais eficaz. Neste contexto, a parkina, uma ubiquitina E3 ligase, e os seus alvos de ubiquitinação (APC, APEX1, BCL2L1, CD36 e p53) surgem como potenciais biomarcadores em CCR. **OBJETIVO:** Avaliar a expressão imunoistoquímica de parkina, APC, APEX1, BCL2L1, CD36 e p53 em CCR, a fim de selecionar novos biomarcadores de estratificação de risco e prognóstico para esta doença. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram selecionados 211 casos de CCR, compreendendo amostras do *bulk* e *front* tumorais. Estas amostras foram alocadas em blocos e lâminas de microarranjos de tecido (TMA – *tissue microarray*) para os testes imunoistoquímicos com os anticorpos específicos. Morfometria e Escore de *Allred* foram empregados na análise da expressão das proteínas estudadas. Os casos foram igualmente avaliadas quanto à expressão de marcadores de instabilidade de microssatélites por técnicas de rotina. Dados clínicos e de sobrevida dos pacientes foram coletados diretamente dos prontuários médicos. **RESULTADOS:** Entre os pacientes não submetidos ao tratamento neoadjuvante, a expressão de parkina na região de *bulk* tumoral foi associada às variáveis idade ($p = 0,008$), sendo mais expressa naqueles com >50 anos, e estadiamento T ($p = 0,005$), com sua maior expressão em amostras T1/T2. Notavelmente, no grupo que recebeu tratamento neoadjuvante, foi encontrada associação entre a expressão de APC no *front* e a sobrevida geral destes pacientes ($p = 0,038$; HR: 0,094). Ainda, no mesmo grupo, a expressão de APC no *front* foi associada ao tipo histológico ($p = 0,009$), com maior expressão proteica no subtipo de melhor prognóstico, o adenocarcinoma tubular. **CONCLUSÃO:** A expressão de APC tem uma possível função protetora em pacientes submetidos ao tratamento neoadjuvante, bem como um potencial papel prognóstico nos dois grupos estudados.

Abstract

INTRODUCTION: The colorectal cancer (CRC) is the third most diagnosed cancer in the world and the second one in number of deaths. The conventional approaches include the chemotherapy and radiotherapy and can be either neoadjuvant and/or adjuvant. However, the patients respond differently to the therapeutics and eventually they present resistance either to the chemotherapy or to the radiation. Biomarkers have been used for different cancer types, from the early lesions' identification to the stratifying of patients in risk groups, collaborating for individualized prognosis and a more effective clinical approach. In this context, the parkin, an E3 ubiquitin ligase, and its ubiquitination targets (APC, APEX1, BCL2L1, CD36 and p53), emerge as potential biomarkers for CRC. **OBJECTIVE:** Evaluate the immunohistochemistry expression of parkin, APC, APEX1, BCL2L1, CD36 and p53 in CRC, to select new risk's stratifying and prognosis biomarkers for this disease. **MATERIALS AND METHODS:** 211 cases of CRC were selected, including tumor samples from the bulk and front. These samples were allocated on tissue microarray (TMA) blocks and slides for the immunohistochemistry tests using the specific antibodies. Morphometry and Allred Score methods were applied for the expression analysis of the studied proteins. The cases were also analyzed as for the expression of microsatellites instability markers by routine techniques. Clinical and patients' survival data were collected direct from the medical records. **RESULTS:** Among the patients that have not undergone neoadjuvant treatment, the parkin expression in the tumoral bulk was associated to the variables age ($p = 0,008$), presenting a higher expression in those patients over 50 years, and staging T ($p = 0,005$), with a higher expression in T1/T2 samples. Remarkably, for the group that underwent neoadjuvant treatment, an association was found between the APC expression in the front and the overall survival of these patients ($p = 0,038$; HR: 0,094). Moreover, for the same group, the APC expression in the front was associated to the histological subtype ($p = 0,009$), presenting a higher protein expression in the subtype of better prognosis, the tubular adenocarcinoma. **CONCLUSION:** The APC expression has a potential protection function in patients that underwent neoadjuvant treatment, and a potential prognosis hole to both studied groups as well.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição proporcional, por sexo, dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o biênio 2018-2019, no Brasil, exceto pele não melanoma	2
Figura 2. Sequência de desenvolvimento adenoma-adenocarcinoma via instabilidade cromossômica	10
Figura 3. Localização e caracterização das regiões amostradas	26
Figura 4. Bloco receptor e lâmina de microarranjos de tecidos	28
Figura 5. Confeção dos microarranjos de tecidos (TMA).....	29
Figura 6. Escore de <i>Allred</i>	33
Figura 7. Tempo de seguimento (em anos) para os casos submetidos e não submetidos ao tratamento neoadjuvante	38
Figura 8. Análise morfométrica da expressão de parkina em amostra de CCR.....	40
Figura 9. Análise morfométrica da expressão de APC em amostra de CCR.....	40
Figura 10. Análise morfométrica da expressão de BCL2L1 em amostra de CCR.....	40
Figura 11. Análise morfométrica da expressão de CD36 em amostra de CCR.....	41
Figura 12. Expressão e correlação das proteínas estudadas no <i>bulk</i> e <i>front</i> dos grupos sem e com tratamento neoadjuvante.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição do estadiamento TNM para o CCR, segundo AJCC	5
Tabela 2. Descrição do estadiamento clínico	6
Tabela 3. Informações dos anticorpos empregados nos testes imunoistoquímicos	30
Tabela 4. Características clínico-patológicas quantitativas dos pacientes com CCR analisados	36
Tabela 5. Características clínico-patológicas categóricas dos pacientes com CCR analisados	36
Tabela 6. Óbitos entre os pacientes com CCR analisados	37
Tabela 7. Tempo de seguimento (em anos) dos pacientes com CCR analisados	37
Tabela 8. Número de óbitos relacionados ao CCR observados durante o seguimento	38
Tabela 9. Expressão das proteínas parkina, APC, BCL2L1 e CD36 avaliadas por morfometria nas amostras de CCR estudadas	42
Tabela 10. Comparação da expressão, nas regiões <i>bulk</i> e <i>front</i> , das proteínas parkina, APC, BCL2L1 e CD36 avaliadas por morfometria nas amostras de CCR estudadas	43
Tabela 11. Expressão das proteínas parkina, APEX1 e p53 avaliadas por Escore de Allred nas amostras de CCR estudadas	44
Tabela 12. Comparação da expressão, nas regiões <i>bulk</i> e <i>front</i> , das proteínas parkina, APEX1 e p53 avaliadas por Escore de Allred nas amostras de CCR estudadas	45
Tabela 13. Expressão das proteínas MSH2 e MSH6 nas amostras de CCR estudadas	46
Tabela 14. Correlação entre a expressão das proteínas parkina, APC, APEX1, BCL2L1, CD36 e p53 nas regiões <i>bulk</i> e <i>front</i> nas amostras de CCR estudadas	47
Tabela 15. Associação da expressão das proteínas estudadas e fatores clínico-patológicos categóricos, considerando as amostras de CCR dos casos sem tratamento neoadjuvante	49
Tabela 16. Associação entre a expressão de MSH2 e MSH6 e o tamanho tumoral (mm), considerando as amostras de CCR dos casos sem tratamento neoadjuvante	50
Tabela 17. Associação entre sobrevida e as variáveis clínico-patológicas para os casos sem tratamento neoadjuvante	51
Tabela 18. Correlação entre as proteínas estudadas e o tamanho tumoral (mm), considerando as amostras de CCR dos casos com tratamento neoadjuvante	52
Tabela 19. Associação entre sobrevida e a expressão de APC no <i>front</i> invasivo nos casos com tratamento neoadjuvante	53
Tabela 20. Avaliação da associação entre o tratamento neoadjuvante e a expressão da proteína APEX1	54

LISTA DE ABREVIACES

ACT	<i>adoptive T cell therapy</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT	proteína <i>AKT serine/threonine kinase 1</i>
anti-PD-1	<i>anti-programmed death 1</i>
APC	proteína <i>adenomatous polyposis coli</i>
APEX1	proteína <i>apurinic/apyrimidinic endodeoxyribonuclease 1</i>
BAK	proteína <i>BCL2 antagonist/killer 1</i>
BAX	proteína <i>BCL2 associated X, apoptosis regulator</i>
BCL2L1	proteína <i>BCL2L1 BCL2 like 1</i>
BRAF	proteína <i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
CCR	cncer colorretal
CD36	proteína <i>CD36 molecule</i>
CIMP	metilao de ilhas CpG
CIN	instabilidade cromossmica
CK19	proteína <i>keratin 19</i>
CMS	<i>Consensus Molecular Subtypes</i>
CMS1	<i>Consensus Molecular Subtype 1</i>
CMS2	<i>Consensus Molecular Subtype 2</i>
CMS3	<i>Consensus Molecular Subtype 3</i>
CMS4	<i>Consensus Molecular Subtype 4</i>
COX-2	proteína <i>mitochondrially encoded cytochrome c oxidase II</i>
CPT1A	gene <i>carnitine palmitoyltransferase 1</i>
CPT2	gene <i>carnitine palmitoyltransferase 2</i>
DAMPs	padres moleculares associados ao dano
DCC	proteína <i>DCC netrin 1 receptor</i>
DCNT	doença crnica não transmissível
EGFR	proteína <i>epidermal growth factor receptor</i>
EPHA2	proteína <i>eph receptor A2</i>
ESR1	gene <i>estrogen receptor 1</i>
FAP	Síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar
GPC3	proteína <i>glypican 3</i>
HC-UFPR	Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

(Continua)

HE	hematoxilina-eosina
HIF-1 α	proteína <i>hypoxia inducible factor-1 alpha</i>
HNPCC	Câncer Colorretal Hereditário Não Polipose
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
KRAS/KRAS	Proteína/gene <i>KRAS proto-oncogene, GTPase</i>
LEF-1	proteína <i>lymphoid enhancer binding factor 1</i>
LPA	proteína <i>lipoprotein a</i>
MGMT	proteína <i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
MLH1	proteína <i>mutL homolog 1</i>
MSI	instabilidade de microssatélites
MSH2	proteína <i>mutS homolog 2</i>
MSH6	proteína <i>PMS1 homolog 2, mismatch repair system component</i>
MSI-H	alta instabilidade de microssatélites
MSI-L	baixa instabilidade de microssatélites
MTOR	proteína <i>mechanistic target of rapamycin kinase</i>
MYC	proteína <i>MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor</i>
NF- κ B	proteína <i>nuclear factor kappa B</i>
NRAS	gene <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
p15	proteína <i>cyclin dependent kinase inhibitor 2B</i>
p16	proteína <i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
p21	proteína <i>cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>
p53	proteína <i>tumor protein p53</i>
PA	Para análise
PARK2	gene <i>parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase</i>
PIK3CA/PIK3CA	proteína/gene <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
PKD-1	proteína <i>protein kinase D1</i>
PMS1	proteína <i>PMS1 homolog 1, mismatch repair system component</i>
PMS2	proteína <i>PMS1 homolog 2, mismatch repair system component</i>
PRKN	gene <i>parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase</i>
PTEN/PTEN	proteína/gene <i>phosphatase and tensin homolog</i>
RBR	<i>ring-between-ring</i>

SMAD2	proteína <i>SMAD family member 2</i>
SMAD4	proteína <i>SMAD family member 4</i>
SOX9	proteína <i>SRY-box transcription factor 9</i>
STAT3	proteína <i>signal transducer and activator of transcription-3</i>
TCR	receptores de células T
TIF	teste imunoistoquímico fecal
TGF- β	proteína <i>transforming growth factor-beta</i>
TGFBRII	proteína <i>transforming growth factor beta 2</i>
TGFBRI	proteína <i>transforming growth factor beta 1</i>
TMA	<i>tissue microarray</i>
TNM	<i>Tumor, Nodes, Metastases</i>
WNT	proteína <i>wingless/integrated</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O câncer colorretal	1
1.2. A classificação do câncer colorretal	4
1.3. A carcinogênese do câncer colorretal	8
1.4. Abordagens terapêuticas empregadas em CCR	12
1.5. Biomarcadores	14
1.6. Expressão de parkina, APC, APEX1, BCL2L1, CD36 e p53 em câncer	15
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos Específicos	23
3. MÉTODOS	24
3.1. Amostras estudadas	24
3.2. Preparo histológico	27
3.3. Preparo imunoistoquímico	29
3.4. Leitura das lâminas de imunoistoquímica	31
3.4.1. Análise morfométrica	31
3.4.2. Escore de <i>Allred</i>	32
3.4.3. Análise de Instabilidade de Microssatélites	34
3.5. Análise estatística	34
4. RESULTADOS	35
4.1. Características clínico-patológicas	35
4.2. Sobrevida global	37
4.3. Expressão proteica	39
4.3.1. Expressão de parkina, APC, BCL2L1 e CD36	39
4.3.2. Expressão de parkina, APEX e p53	43
4.3.3. Expressão MSH2 e MSH6	45
4.4. Correlação de expressão entre as proteínas estudadas	46
4.5. Associação entre a expressão das proteínas estudadas e fatores clínico-patológicos dos pacientes não submetidos ao tratamento neoadjuvante	47

(Continua)

4.5.1. Fatores clínico-patológicos categóricos	47
4.5.2. Fatores clínico-patológicos quantitativos	50
4.6. Análise de fatores associados à sobrevida nos pacientes não submetidos ao tratamento neoadjuvante	50
4.7. Associação entre a expressão das proteínas estudadas e fatores clínico-patológicos dos pacientes submetidos ao tratamento neoadjuvante	52
4.8. Análise de fatores associados à sobrevida no grupo submetido ao tratamento neoadjuvante	53
4.9. Comparação entre os grupos sem e com tratamento neoadjuvante em relação a expressão das proteínas	53
5. DISCUSSÃO	55
5.1. APEX1	55
5.2. parkina	58
5.3. CD36	59
5.4. APC	60
5.5. BCL2L1	63
5.6. p53	64
5.7. MSH2 e MSH6	65
5.8. Sobrevida global no grupo sem tratamento neoadjuvante	66
6. CONCLUSÕES	68
7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	69
8. REFERÊNCIAS.....	70
9. ANEXO	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. O câncer colorretal

O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia maligna que acomete os cólons (ascendente, transverso, descendente e sigmoide) e o reto (INCA, 2018). As suas ocorrências mais comuns são no cólon sigmoide e reto. O CCR pode ser definido por seu tipo histológico mais frequente, o adenocarcinoma, que se caracteriza pela origem em células epiteliais da mucosa colorretal (INCA, 2018; OMS, 2010). Outros tipos histológicos de menor frequência são os carcinomas neuroendócrinos, de células escamosas, adenoescamosos, de células em anéis de sinete e indiferenciados (FLEMING *et al*, 2012, OMS, 2010).

Estudos prévios sugerem que em casos metastáticos a topografia (cólon direito, cólon esquerdo ou reto) acometida pelo tumor primário interfere na progressão tumoral por diferentes vias de sinalização (IACOPETTA, 2002). Venook *et al*, em 2016, observaram que pacientes com tumores primários no lado esquerdo do cólon possuíam uma maior taxa de sobrevida em relação àqueles que apresentavam tumores primários no lado direito e propuseram uma possível correlação entre sobrevida de pacientes com CCR e o lado de ocorrência do tumor primário (VENOOK *et al*, 2016).

O desenvolvimento do CCR, uma doença multifatorial, apresenta inúmeros fatores de risco, entre os quais: o histórico familiar de pólipos no cólon ou reto, de câncer colorretal e de doenças inflamatórias intestinais; a origem étnica, como no caso de judeus Ashkenazi; idade superior a 50 anos; e sexo masculino. Outros fatores de risco como sobrepeso; obesidade; *diabetes mellitus*; sedentarismo; consumo de alimentos processados ou preparados em altas temperaturas; dieta rica em carne vermelha e pobre em frutas, verduras, cereais integrais, legumes, grãos e sementes; tabagismo; e uso frequente de álcool, todos relacionados ao estilo de vida, podem ser mitigados pela mudança de hábitos alimentares e de exercícios físicos. Recentemente, o microbioma surgiu como importante fator para o desenvolvimento de CCR e doenças inflamatórias intestinais (ACS, 2018; GILBERT, J. A. *et al*, 2018; MÁRMOL *et al*, 2017; JOHNSON *et al*, 2013).

Associado principalmente a áreas urbanas, o CCR é um problema global. Este tipo de câncer é o terceiro mais diagnosticado e o segundo em número de mortes no mundo. Em 2018, foram registrados ~1,8 milhão de casos de CCR (10,2% do total de casos de câncer considerando câncer de pele não melanoma na categoria outros) e 861.663 óbitos decorrentes desta doença. A incidência mundial do CCR deve aumentar em ~10,9% em 2020 (IARC, 2018).

No Brasil, o CCR é o segundo mais comum entre homens e mulheres, com exceção do câncer de pele não melanoma (Figura 1) e sua taxa de incidência deve crescer acima da estimativa mundial (INCA, 2020). Para 2018-2019 foram estimados 36.360 novos casos a cada ano (INCA, 2019), enquanto para 2020-2022 esta estimativa subiu para 40.990, um aumento de ~12,7% (INCA, 2020). O número de mortes no Brasil por CCR também vem expandindo: 18.667 em 2017 e 23.868 em 2018 (crescimento de ~27,8%) (INCA, 2019).

Figura 1. Distribuição proporcional, por sexo, dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o triênio 2020-2022, no Brasil, exceto pele não melanoma.

Figura 1

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2020.

Na última década vêm sendo observados, em relação às taxas de incidência e mortalidade do CCR, três padrões globais: a) aumento na incidência e mortalidade (países Bálticos, Rússia, China e Brasil); b) aumento na incidência e diminuição da

mortalidade (Canadá, Reino Unido, Dinamarca e Singapura); e c) diminuição da incidência e mortalidade (Estados Unidos, Japão e França) (IARC, 2018).

O teste imunoistoquímico fecal (TIF), o teste para sangue oculto nas fezes, a colonoscopia, a colonografia por exames de imagem e a retossigmoidoscopia são métodos disponíveis e bem estabelecidos no rastreamento do CCR, e seu emprego permite o descobrimento de lesões pré-cancerosas, os pólipos, bem como possibilita o diagnóstico precoce desta doença. A difusão destes métodos é um importante mecanismo praticado para a diminuição nas taxas de incidência e mortalidade, bem como para o aumento da sobrevida global, em CCR (ACS, 2018; REX *et al.*, 2017). O fato de que tais opções de triagem apresentam maior disponibilidade em países com alto IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) pode vir a explicar porque eles possuem as menores taxas de mortalidade, e taxas de incidência e prevalência decrescentes (ACS, 2018; REX *et al.*, 2017).

Por outro lado, os sintomas do CCR, como diarreia, constipação, obstrução intestinal, sangramento retal, sangue oculto nas fezes, dores abdominais, fadiga e perda não intencional de peso, são comuns a outras condições de saúde, como infecções, hemorroidas, síndrome do intestino irritável e doenças inflamatórias intestinais (ACS, 2018). Entretanto, na maioria dos casos, não há apresentação de sintomas em estádios mais iniciais de desenvolvimento.

Assim, e ainda considerando que a maior parte dos pacientes não é submetida a exames de triagem, estima-se que nos Estados Unidos ~50% dos pacientes ao diagnóstico já apresentam metástases, sejam estas regionais ou à distância (ACS 2018; ÁLVAREZ-CHAVER *et al.*, 2014). Se estes pacientes fossem triados pelos testes citados, como a colonoscopia, pólipos ou outras fases iniciais do CCR poderiam ser identificados. Em caso de ressecção cirúrgica de tumores sem invasão locorregional, ou seja, retirada de tumores que não sofreram metástase, mais de 90% dos pacientes apresentam taxas de sobrevida superiores a 5 anos (ÁLVAREZ-CHAVER *et al.*, 2014).

1.2. A classificação do câncer colorretal

Uma das formas de classificar o CCR, assim como qualquer tipo de câncer, é feita com base no seu estágio de desenvolvimento. Este processo de classificação é chamado de “estadiamento” e é realizado por meio de um sistema universalmente conhecido como TNM (do inglês, *Tumor, Nodes, Metastases*), publicado pelo AJCC (do inglês, *American Joint Committee on Cancer*) e atualizado em junho de 2018 (AJCC, 2018).

Nesta classificação, “T” avalia o tamanho do tumor primário, “N” avalia o envolvimento de linfonodos e “M” indica se há ou não metástase em órgãos distantes (ACS, 2017) (Tabela 1). Em caso de estadiamento com base nas características anatomopatológicas, é utilizado o prefixo *p*. Quando o estadiamento é realizado após tratamento com quimioterapia e radioterapia, é utilizado prefixo *y*. Utiliza-se ainda o prefixo *r* em caso de recidiva do tumor, e o prefixo *c* para caracterização do estadiamento clínico. Por fim, o sufixo *m* indica a ocorrência de dois ou mais carcinomas primários identificados ao mesmo tempo (BOSMAN *et al*, 2010).

A classificação proposta pelo AJCC é também considerada como um importante fator prognóstico em pacientes com adenocarcinoma colorretal, uma vez que indica quão avançado é o tumor, o envolvimento dos linfonodos e se há ou não metástase (JESSUP *et al.*, 2017).

É comum na prática clínica a utilização das informações fornecidas pelo estadiamento TNM para a classificação geral ou clínica. Nela, há a combinação de dados do estadiamento TNM a fim de enquadrar o paciente em uma classificação que varia de 0 a 4 (ASCO, 2018) (Tabela 2).

Tabela 1. Descrição do estadiamento TNM para o CCR, segundo AJCC.

Tumor primário (T)	
Tx	Não há descrição disponível sobre o tamanho do tumor
Tis	Tumor em seu estágio mais inicial, o carcinoma se encontra <i>in situ</i>
T1	Tumor invade a camada submucosa
T2	Tumor invade a camada muscular própria
T3	Tumor atingiu as camadas mais externas do cólon e reto, porém sem alcançar órgão próximos
T4	Tumor atravessou as paredes do cólon e reto
Linfonodos regionais (N)	
NX	Linfonodos não podem ser avaliados por falta de informações
N0	Tumor não atingiu linfonodos próximos
N1	Metástase em 1 a 3 linfonodos regionais
N1a	Metástase em 1 linfonodo regional
N1b	Metástase em 2 a 3 linfonodos regionais
N1c	Quando a disseminação atinge a camada serosa, sem evidências de disseminação nos nódulos linfáticos
N2	Metástase em 4 ou mais linfonodos regionais
N2a	Metástase em 4 a 6 linfonodos regionais
N2b	Metástase em 7 ou mais linfonodos regionais
Metástase à distância (M)	
M0	Ausência de metástase à distância
M1a	Metástase à distância confinada a apenas um sítio ou órgão (exemplo: fígado, pulmão, ovário, linfonodos não-regionais)
M1b	Metástase para mais de um órgão distante ou invasão em partes distantes do peritônio

Fonte: America Joint Committee on Cancer, 2018.

Tabela 2. Descrição do estadiamento clínico.

	Estadiamento clínico	TNM
Estádio 0	Quando o tumor se encontra <i>in situ</i>	Tis, N0, M0
Estádio I	Quando o tumor apresenta um tamanho pequeno ou não apresenta invasão para tecidos próximos	T1 ou T2, N0, M0
Estádio II e III	Quando o tumor apresenta maior tamanho ou quando apresenta invasão para tecidos próximos. Nestes estádios, pode haver comprometimento de linfonodos	T3, N0, M0 (IIa)
		T4a, N0, M0 (IIb)
		T4b, No, M0 (IIc)
		T1 ou T2, N1/N1c, M0; T1, N2a, M0 (IIIa)
		T3 ou T4a, N1/N1c, M0; T2 ou T3, N2a, M0; T1 ou T2, N2b, M0 (IIIb)
Estádio IV	Câncer avançado e/ou câncer metastático, compreende os casos em que o tumor compromete outros órgãos	T4a, N2a, M0; T3 ou T4a, N2b, M0; T4b, N1 ou N2, M0 (IIIc)
		Qualquer T, qualquer N, M1a (IVa)
		Qualquer T, qualquer N, M1b (IVb)
		Qualquer T, qualquer N, M1c (IVc)

Fonte: American Society of Clinical Oncology, 2018; American Cancer Society, 2018.

Alternadamente, é possível classificar o CCR com base em suas características histopatológicas e moleculares.

Em relação à sua classificação histopatológica e de acordo com a classificação dos Tumores de Sistema Digestivo, publicada em 2010 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o adenocarcinoma colorretal pode ser classificado em: adenocarcinoma mucinoso ou coloide, carcinoma de células em anel de sinete, carcinoma medular, carcinoma micropapilar, carcinoma serrilhado e adenocarcinoma padrão cribriforme (FLEMING *et al*, 2012; BOSMAN *et al*, 2010).

Entre os subtipos histológicos, o mucinoso se caracteriza por apresentar grande quantidade de mucina extracelular (~50%), maior que a sua contraparte não-mucinoso, correspondendo entre 10 a 20% dos casos e diagnosticado principalmente em casos mais avançados de CCR (LUO *et al*, 2019).

Criada em 2015 por um consórcio de especialistas, a classificação molecular do CCR, conhecida como CMS (do inglês, *Consensus Molecular Subtypes*), surgiu com a finalidade de resolver as inconsistências encontradas nas diversas classificações propostas para o CCR baseadas na expressão gênica, além de fornecer as bases para sua futura aplicação na prática clínica (LYNCH & MURPHY, 2016; GUINNEY *et al.*, 2015). Este consórcio propôs a classificação do CCR em 4 subtipos moleculares: CMS1 (instabilidade de microssatélites, 14%), apresenta hipermutação, instabilidade de microssatélite e forte ativação da resposta imunológica; CMS2 (canônico, 37%), subtipo de padrão epitelial com ativação das vias de sinalização WNT (*wingless/integrated*) e MYC (*MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor*); CMS3 (metabólico, 13%), também de padrão epitelial, mas com desregulação metabólica; e CMS4 (mesenquimal, 23%), apresenta ativação de TGF- β (*transforming growth factor beta*), invasão estromal e angiogênese (LYNCH & MURPHY, 2016; GUINNEY *et al.*, 2015).

Outra importante forma de descrição do tumor ao diagnóstico é a graduação histológica. Nela, o patologista avalia o grau de diferenciação das células que compõe a amostra tumoral, podendo ser de baixo grau, quando as células se apresentam bem e/ou moderadamente diferenciadas, e de alto grau, quando as células se encontram pouco diferenciadas ou indiferenciadas (ASCO, 2018).

O imuno-escore, uma forma complementar e mais recente para a classificação do CCR, está fundamentado na influência do sistema imunológico adaptativo no desenvolvimento tumoral. Para sua avaliação e determinação, é levada em consideração a densidade de duas populações de células T citotóxicas, TCD8+ e TCD3+, em duas regiões tumorais, o *bulk*, ou massa tumoral, e o *front*, ou margem invasiva (ANGELL, 2019; ZEITOUN *et al*, 2019). O escore varia de “i0”, quando a amostra avaliada apresenta baixa densidade de células TCD8+ e TCD3+ no *bulk* e no *front*, a “i4” que representa uma alta densidade dos dois tipos celulares nas duas regiões analisadas. Imuno-escores mais altos tendem a indicar taxas de sobrevida geral e livre de doença mais elevadas (ANGELL *et al*, 2019; ZEITOUN *et al*, 2019).

Assim, o imuno-escore pode ser considerada como um potencial fator preditivo em pacientes com CCR (ANGELL e GALON, 2013; ANITEI *et al*, 2014).

1.3. A carcinogênese do câncer colorretal

O processo de desenvolvimento do CCR, ou sua carcinogênese, pode levar de 5 a 10 anos (LYALL *et al*, 2006). Ele tem o seu início na transformação do epitélio colorretal normal (células epiteliais glandulares) e resulta no adenocarcinoma colorretal *in situ* (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011; LYALL *et al*, 2006). Esta neoplasia pode tornar-se invasiva e atingir outras camadas da parede intestinal, bem como outros órgãos, diretamente ou por metástase (SUN *et al*, 2013). Durante este processo, que apresenta origem monoclonal e ocorre em múltiplas etapas, há ativação de proto-oncogenes e inibição de genes supressores tumorais, seja por mutações de ponto, alterações cromossômicas estruturais ou numéricas, ou alterações epigenéticas (MÁRMOL *et al*, 2017; Sun *et al*, 2014; TAKAYAMA *et al*, 2006; STEWÉNIUS *et al*, 2005; FEARON e VOGELSTEIN, 1990).

Duas vias principais para a carcinogênese do CCR foram descritas até o momento: a via de instabilidade cromossômica (CIN), relacionada à Síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), e a via de instabilidade de microssatélite (MSI), observada nos casos de Câncer Colorretal Hereditário Não Polipose (HNPCC) ou Síndrome de Lynch (MÁRMOL *et al*, 2017; TAKAYAMA *et al*, 2006; FEARON e VOGELSTEIN, 1990).

Primeiramente proposta por Fearon e Vogelstein em 1990, a via de instabilidade cromossômica (CIN) compreende a via clássica de desenvolvimento adenoma-carcinoma (Figura 2). Esta via é a mais comum para a carcinogênese em CCR e está associada a 65-70% dos casos esporádicos.

Inicialmente, em pólipos adenomatosos benignos, ocorre a inativação da via de sinalização APC/ β -catenina, devido à perda cromossômica em 5q, onde se localiza o gene *APC* (*APC regulator of WNT signaling pathway*). Esta inativação permite a continuidade da via de sinalização Wnt, o acúmulo de β -catenina citoplasmática e sua translocação para o núcleo, onde promove a transcrição de inúmeros oncogenes envolvidos na promoção da proliferação celular (MÁRMOL *et al*, 2017; CAETANO,

2016; TARIQ & GHAS, 2016; SUN *et al*, 2013; TAKAYAMA *et al*, 2006; FEARON e VOGELSTEIN, 1990).

A etapa a seguir é caracterizada pelo estágio adenomatoso desta carcinogênese. Nela, ocorrem mutações em *KRAS* (*KRAS proto-oncogene, GTPase*), observadas em 30 a 40% dos casos de CCR. Estas mutações provocam um aumento na ativação da cascata de sinalização RAS, acarretando o crescimento tumoral pela transição epitélio-mesênquima (TARIQ & GHAS, 2016).

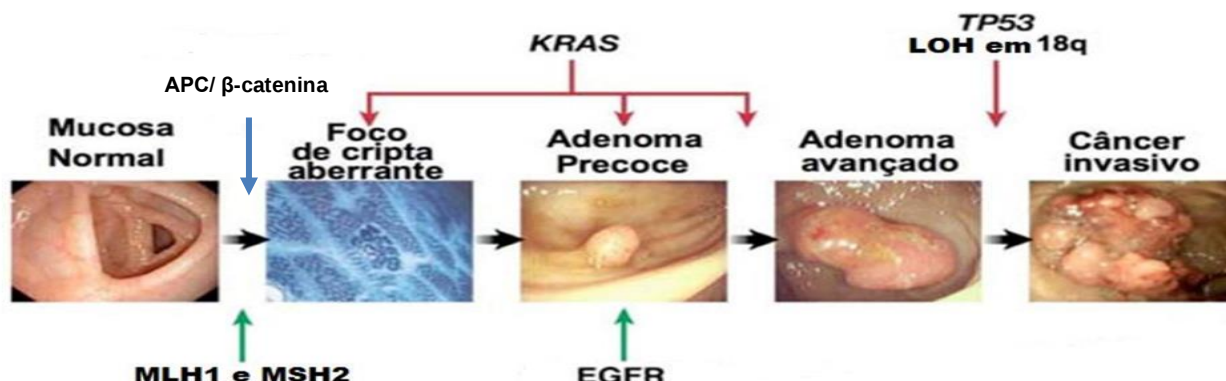
A passagem final para adenocarcinoma transcorre por perdas cromossômicas em 7p e 18q, levando, respectivamente, a alterações na proteína p53 e na via de sinalização DCC (*DCC netrin 1 receptor*)/SMAD4 (*SMAD family member 4*), o que contribui para o aumento do potencial replicativo das células tumorais (MÁRMOL *et al*, 2017; CAETANO, 2016; SUN *et al*, 2013; TAKAYAMA *et al*, 2006; FEARON e VOGELSTEIN, 1990).

A via de instabilidade de microssatélites (MSI) representa cerca de 15% dos casos de CCR, estando 3% associados à Síndrome de Lynch e sendo, portanto, de origem hereditária. Esta via se caracteriza por apresentar um fenótipo hipermutável, devido a ocorrência de inúmeras sequências repetitivas curtas ao longo do genoma, os microssatélites (CORTES-CIRIANO *et al*, 2017; FEARON e VOGELSTEIN, 1990; TAKAYAMA *et al*, 2006; TARIQ & GHAS, 2016). Tais mutações ocorrem como consequência da atividade alterada de enzimas envolvidas do processo de reparo por excisão de bases de DNA (MMR, do inglês, *DNA mismatch repair*), tais como MSH2 (*mutS homolog 2*), MLH1 (*mutL homolog 1*), PMS1 (*PMS1 homolog 1, mismatch repair system component*), PMS2 (*PMS1 homolog 2, mismatch repair system component*) e MSH6 (*PMS1 homolog 2, mismatch repair system component*).

Em casos esporádicos, estas alterações podem ocorrer devido a mutações somáticas nestes genes, metilação do promotor de *MLH1*, inativação epigenética do gene *MSH2* e reduzida regulação destes genes por microRNAs (CORTES-CIRIANO *et al*, 2017; BOLAND & GOEL, 2010; TAKAYAMA *et al*, 2006; FEARON e VOGELSTEIN, 1990).

Indivíduos que apresentam CCR com MSI têm prognósticos ligeiramente melhores quando comparados àqueles que não apresentam MSI, bem como uma resposta diferente aos quimioterápicos (BOLAND & GOEL, 2010).

Figura 2. Sequência de desenvolvimento adenoma-adenocarcinoma via instabilidade cromossômica.



Legenda: Sequência adenoma-carcinoma, onde em um primeiro momento há o desenvolvimento de focos de criptas aberrantes a partir de uma mucosa epitelial colônica normal, por consequência de alterações na via de sinalização APC/β-catenina e nas proteínas MLH1 e MSH2. Em seguida, há o aparecimento de um adenoma precoce, resultante de alterações em KRAS e seu avanço para um adenoma avançado em decorrência das alterações em KRAS e EGFR (*epidermal growth factor receptor*). Por fim, a perda cromossômica em 18q leva à perda de p53 e sua função, características da transição adenoma avançado para tumores invasivos.

Fonte: Reproduzido de Takayama *et al*, 1998, por Pino e Chung, 2010, e readaptado.

Embora até o momento estas sejam as principais vias descritas, estudos vêm demonstrando rotas alternativas para o desenvolvimento do CCR, dentre elas alterações na via de sinalização TGF-β (*transforming growth factor-beta*)/SMAD4, via serrilhada e via de mecanismos epigenéticos (MÁRMOL *et al*, 2017; SUN *et al*, 2013; TAKAYAMA *et al*, 2006).

Na primeira, a via de sinalização TGF-β/SMAD4, em situações normais há a ligação entre TGF-β e TGFBRII (*transforming growth factor beta 2*), levando à formação do complexo TGFBR1 (*transforming growth factor beta 1*). Este é responsável por fosforilar SMAD2 (*SMAD family member 2*) que, por sua vez, se liga ao componente SMAD4 (MÁRMOL *et al*, 2017; SUN *et al*, 2013; TAKAYAMA *et al*, 2006). Todo o complexo é translocado, então, para o núcleo a fim de induzir a expressão e ação das proteínas P15 (*cyclin dependent kinase inhibitor 2B*) e P21 (*cyclin dependent kinase inhibitor 1A*), que levam à inibição de ciclinas, essenciais para a manutenção do ciclo celular. Consequentemente, há a interrupção do crescimento celular (MÁRMOL *et al*, 2017; SUN *et al*, 2013; TAKAYAMA *et al*, 2006).

Mutações nos componentes proteicos envolvidos nesta via de sinalização levam a sua inativação, e vêm sendo observadas na carcinogênese do CCR. Cerca de 16 a 25% dos casos apresentam mutações em SMAD4 e 6% em SMAD2, enquanto mutações em TGFBR2 são observadas em tumores positivos para MSI (MÁRMOL *et al*, 2017; TAKAYAMA *et al*, 2006). Estas duas alterações são ocorrentes na transição adenoma para adenocarcinoma (MÁRMOL *et al*, 2017; SUN *et al*, 2013; TAKAYAMA *et al*, 2006).

A via serrilhada apresenta lesões adenomatosas com características de pólipos hiperplásicos, bem como aspectos citológicos de adenomas convencionas (LEGGETT e WHITEHALL, 2010; SNOVER, 2010; TAKAYAMA *et al*, 2006). Estima-se que cerca de 30 a 50% dos casos que apresentam essa via de desenvolvimento, apresentam também MSI, em sua maior parte MSI-L (baixa instabilidade de microssatélites). Quanto aos casos classificados como MSI-H (alta instabilidade de microssatélites), estes frequentemente se caracterizam por possuir metilação aberrante do gene *MLH-1* e perda de sua função (LEGGETT e WHITEHALL, 2010; SNOVER, 2010; TAKAYAMA *et al*, 2006).

Outra via alternativa para o desenvolvimento do CCR é a via dos mecanismos epigenéticos, sendo uma delas o fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP). Nela, há a hipermetilação de regiões ricas em CpG localizadas na extremidade 5', levando ao consequente silenciamento das regiões gênicas presentes nestas porções, como em *P16* (*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*), *MGMT* (*O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*), *ESR1* (*estrogen receptor 1*), *APC* e *COX-2* (*mitochondrially encoded cytochrome c oxidase II*) (LEGGETT e WHITEHALL, 2010; SNOVER, 2010; TAKAYAMA *et al*, 2006). O gene *PRKN* é também descrito como um dos genes alvos da hipermetilação em CCR, o que leva a alterações na sua expressão (LA COGNATA e CAVALLARO, 2016). Além destes já citados, um alvo importante de hipermetilação é o gene *MLH-1*, levando a um fenótipo de MSI-H (LEGGETT e WHITEHALL, 2010; SNOVER, 2010; TAKAYAMA *et al*, 2006).

Muito embora as vias de carcinogênese do CCR sejam classificadas em grupos distintos, é possível observar associações entre elas em um mesmo caso, por exemplo, as alterações na via TGF- β /SMAD4 e a via de sinalização WNT (*Wnt family member*) (TAKAYAMA *et al*, 2006). Nesta, há interação direta entre as proteínas

SMAD e LEF-1 (*lymphoid enhancer binding factor 1*), uma componente da via WNT, acarretando no desenvolvimento do CCR (TAKAYAMA *et al*, 2006).

1.4. Abordagens terapêuticas empregadas em CCR

Uma maior disponibilidade de opções terapêuticas para o CCR, principalmente terapias farmacológicas sistêmicas, vem contribuindo para o aumento da sobrevida dos pacientes (MCGEECHAN *et al*, 2019; VENOOK *et al*, 2017; SARTORE-BIANCHI *et al.*, 2017; SCHMIDT *et al*, 2011). A combinação de diferentes quimioterápicos e sua associação ao uso de anticorpos monoclonais ampliam ainda mais as possibilidades disponíveis (VENOOK *et al*, 2017). A decisão sobre a melhor opção para cada paciente deve levar em consideração diversos fatores, entre os quais o estadiamento tumoral (VENOOK *et al*, 2017).

Entretanto, a ressecção cirúrgica e as terapias convencionais, quimioterapia e radioterapia, nas formas neoadjuvante (antes da ressecção cirúrgica) e/ou adjuvante (no tratamento pós-cirúrgico) ainda são as mais amplamente prescritas em CCR (LEE *et al.*, 2017; SA *et al.*, 2017; FEMAMA, 2016).

A neoadjuvância é uma abordagem indicada e bem estabelecida em casos de câncer de reto médio e baixo como tratamento prévio e complementar ao procedimento definitivo, a ressecção cirúrgica (GARAJOVÁ *et al*, 2011; van der VALK *et al*, 2018). Considerada um procedimento padrão para casos locorregionais mais avançados de pacientes que não apresentam contraindicações clínicas, consiste no emprego de quimioterápicos em conjunto com a radioterapia (GARAJOVÁ *et al*, 2011; MAGRI *et al*, 2016; van der VALK *et al*, 2018). Esta combinação tem demonstrado sua efetividade na regressão de tumores primários, bem como na resposta completa em cerca de 20-25% dos casos (PINHO, 2007; van der VALK *et al*, 2018). Ainda, proporciona maior radiosensibilidade, uma vez que os tecidos não apresentam fibrose cirúrgica, e redução no tamanho tumoral, com aumento da ressecabilidade e das taxas de preservação esfinteriana (MAGRI *et al*, 2016; PINHO, 2007). Quando comparada à terapia adjuvante, a neoadjuvância demonstra maior efetividade no aumento das taxas de sobrevida livre de recidiva e em minimizar a toxicidade (GARAJOVÁ *et al*, 2011).

Contudo, embora distintas quanto as suas indicações e aplicabilidade, a neoadjuvância e adjuvância têm efeitos semelhantes a nível celular. Neste sentido, a ação citotóxica dos quimioterápicos e da radiação sobre as células tumorais provoca danos ao DNA e à maquinaria celular, com o potencial de levar à apoptose ou à necrose de uma parte do tecido afetado (KRYSKO *et al*, 2012; ZITVOGEL *et al*, 2008). Uma parcela dos pacientes apresenta tumores que desenvolvem resistência a estes tratamentos convencionais. Vários estudos têm investigado os mecanismos envolvidos nesta resistência. Scherr *et al*, em 2016, observaram aumento na expressão da proteína BCL2L1 (*BCL2 like 1*) em CCR e sugeriram este aumento como um mecanismo influente na origem e desenvolvimento deste câncer (SCHERR *et al*, 2016). Ainda, Wu *et al*, em 2014, notaram que uma maior expressão de BCL2L1 estava associada a piores respostas ao tratamento convencional para o CCR com o quimioterápico 5-fluorouracil (WU *et al*, 2014).

Outro fenômeno observado em resposta às terapias convencionais é a liberação de sinais DAMP (do inglês *damage-associated molecular patterns*) que podem ser reconhecidos, dependendo de sua qualidade, pelo sistema imunológico. Assim, peptídeos liberados no processo de apoptose podem gerar uma resposta imunológica adaptativa eficaz contra as células transformadas. Os mecanismos envolvidos, à semelhança daqueles de resistência, estão sendo investigados, especialmente em relação as suas potenciais aplicações em imunoterapia.

Como resultados destas investigações surgem três abordagens terapêuticas: ACT (do inglês *adoptive T cell therapy*), anticorpos e vacinas antitumorais (LYNCH & MURPHY, 2016; RAVAL *et al*, 2014).

A primeira, ACT, objetiva superar a tolerância imunológica pela inoculação de células T externas manipuladas, podendo ser estes linfócitos de infiltrados tumorais expandidos e ativados, células T modificadas para a expressão de receptores de células T (TCR) específicos, e células T projetadas para a expressão de um receptor resultante da fusão de um anticorpo e um receptor de antígenos (KOIDO *et al*, 2013; LYNCH & MURPHY, 2016; RAVAL *et al*, 2014).

A segunda, anticorpos antitumorais, consiste na inoculação de anticorpos monoclonais específicos para determinados antígenos expressos por células tumorais, como é o caso das proteínas CD20 e HER-2. Para linfoma de células B que expressam CD20 e câncer de mama positivo para expressão de HER-2, este já é

considerado um tratamento padrão pela utilização dos fármacos rituximab e trastuzumab, respectivamente (LYNCH e MURPHY, 2016; RAVAL *et al*, 2014; KOIDO *et al*, 2013).

As vacinas antitumorais visam ativar uma resposta imunológica a fim de eliminar células tumorais ou prevenir o seu aparecimento (LYNCH & MURPHY, 2016; RAVAL *et al*, 2014). O primeiro caso se refere a um tratamento empregado em indivíduos que já apresentam câncer, e consiste na apresentação de antígenos tumorais; o segundo se refere a um método preventivo, através da inoculação de vírus oncogênicos atenuados. Deste modo, é possível prevenir a contaminação por suas formas ativas, que possuem o potencial de se inserirem no genoma e causarem alterações importantes que podem levar ao desenvolvimento de múltiplos tipos de câncer, como, por exemplo, câncer cervical e carcinoma hepatocelular (LYNCH & MURPHY, 2016; RAVAL *et al*, 2014).

Os resultados da imunoterapia não são promissores em CCR e apenas pacientes que apresentam MSI-H parecem se beneficiar desta terapia (BOLAND & MA, 2017; LYNCH e MURPHY, 2016). O imuno-escore surge como uma ferramenta alternativa para selecionar pacientes com CCR para imunoterapia, uma vez que considera o perfil imunológico do microambiente tumoral (ANITEI *et al*, 2014; ANGELL & GALON, 2013).

1.5. Biomarcadores

A identificação de novos biomarcadores é importante para a evolução da clínica do CCR.

Os biomarcadores podem ser definidos como estruturas biológicas (proteínas, glicolipídios, carboidratos, metabólitos, DNA ou RNA), cujas variações de constituição e expressão podem ser associadas a condições específicas (ISAAC *et al*, 2017; LECH *et al*, 2016; KING, 2007). Eles podem ser classificados em biomarcadores de diagnóstico, prognóstico, risco e indicação de tratamento.

Em câncer, os biomarcadores podem ser úteis desde a identificação de lesões iniciais até a estratificação dos pacientes em grupos de risco, o que contribui para um

prognóstico individualizado e uma conduta clínica mais eficaz (LECH *et al*, 2016; ÁLVAREZ-CHAUVER *et al*, 2014).

Em CCR, o diagnóstico para Síndrome de Lynch ocorre pela identificação da perda de expressão dos marcadores de MSI (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2). Ainda, o aumento de expressão do gene *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*), que codifica um fator pró-angiogênico, indica pior prognóstico (SIDERIS & PAPAGRIGORIADIS, 2014). Mutações nos genes *BRAF* (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*) igualmente indicam pior prognóstico em CCR, bem como, assim como mutações nos genes *NRAS* (*NRAS proto-oncogene, GTPase*), *KRAS* e *PIK3CA*, são considerados fatores preditivos para a resposta ao tratamento com inibidores EGFR (CAP, 2014; SIDERIS & PAPAGRIGORIADIS, 2014). Alguns biomarcadores têm o potencial de indicar a sensibilidade do tumor às abordagens terapêuticas, de acordo com os seus níveis de expressão. Assim, o seu emprego resulta em uma seleção mais apropriada de tratamentos para os pacientes, e, conseqüentemente, contribui para uma melhora em sua qualidade de vida. É o caso do gene *PTEN*, cuja perda de expressão em casos metastáticos, leva estes pacientes a não apresentarem benefício ao tratamento com cetuximab (CAP, 2014; ISAAC *et al*, 2017; LECH *et al*, 2016; KING, 2007).

Assim, a identificação de novos biomarcadores em CCR pode otimizar as práticas da medicina personalizada, uma vez que podem ser empregados em diagnósticos, estadiamentos, prognósticos, estratificação de grupos de risco e indicação de tratamentos mais acurados e específicos para cada paciente (ISAAC *et al*, 2017).

1.6. Expressão de parkina, APC, APEX1, BCL2L1, CD36 e p53 em câncer

Resistência à apoptose, proliferação contínua, evasão de supressores tumorais, indução de angiogênese, invasão angiolímfática, metástase, desregulação energética celular e escape da resposta imunológica são características comuns a mais de 100 doenças distintas designadas genericamente “câncer”. Os mecanismos que originam estas características, sejam eles genéticos ou epigenéticos, diferem nestas doenças e conferem a heterogeneidade etiológica e de comportamento

biológico observada no câncer, mesmo quando são considerados tumores oriundos de um mesmo órgão (HANAHAHAN & WEINBERG, 2011; INCA, 2019).

Como resultado das alterações genéticas e epigenéticas, ocorrem variações na expressão das proteínas das células transformadas. As proteínas cujas expressões e influência em CCR foram investigadas no presente estudo podem ser classificadas como oncoproteínas, codificadas por proto-oncogenes, ou proteínas supressoras tumorais, codificadas por genes supressores tumorais. Situações onde as células apresentam ciclo celular normal, são caracterizadas pelo equilíbrio da expressão e ação destes proto-oncogenes e genes supressores tumorais, garantindo à estas células funcionamento apropriado, ou seja, que elas apresentem homeostasia. Quando, porém, há a sobre-expressão destes oncogenes aliada a supressão de genes supressores tumorais, este equilíbrio é quebrado, contribuindo para o desenvolvimento do câncer (JOSHI & PRESS, 2018; HAYES, 2012; GREENE *et al*, 2008; HAITES, 2001).

Os proto-oncogenes são potenciais fatores carcinogênicos e compreendem genes que codificam proteínas envolvidas principalmente nos processos de promoção da proliferação celular, ativação transcricional, transdução de sinais e regulação da apoptose. Sua contribuição para a carcinogênese se deve a alterações, tais como mutações de ponto, amplificação e rearranjos, que levam a ganho de função para as proteínas por estes genes codificadas. Este ganho de função pode ser tanto quantitativo, que se caracteriza pelo aumento da expressão de um produto inalterado, ou qualitativa, quando há a expressão inalterada de um produto modificado (JOSHI & PRESS, 2018; HAYES, 2012; GREENE *et al*, 2008; HAITES, 2001).

Os genes supressores tumorais codificam proteínas cruciais no processo de regulação negativa do ciclo celular, principalmente por sua interrupção na fase G1 e promoção da apoptose. Consequentemente, estes genes agem no controle da proliferação celular. Na tumorigênese, porém, eles perdem sua função devido a mutações em seus alelos, o que faz as células apresentarem crescimento e proliferação anormais (CLARK & PAZDERNIK, 2016; KRASIN & DAVIDOFF, 2012; LAM & SCHMIDT, 2012; LEVINE *et al*, 2008).

São exemplos de oncoproteínas: a BRAF, que em cerca 50% dos casos de melanoma humano apresentam alterações em sua estrutura clássica causadas por mutações no gene que a codifica (LARKIN *et al*, 2014); e a PIK3CA

(*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*), para a qual foram observadas, em diversos tumores, uma série de mutações na subunidade catalítica de suas isoformas (MAJEWSKI *et al*, 2015). Entre as proteínas supressoras tumorais, estão a p53, codificada pelo gene supressor tumoral *TP53* (*tumor protein p53*), considerado o gene mais frequentemente mutado em neoplasias humanas (GIACOMELLI *et al*, 2017; JOERGER e FERSHT, 2010); e a PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), cuja redução ou perda de expressão pode ser associada a uma variedade de tumores (ZHANG *et al*, 2013).

Neste contexto, especificamente em CCR, novas oncoproteínas e proteínas supressoras tumorais estão sendo estudadas para melhor caracterizar a progressão tumoral, bem como identificar a sua influência sobre o prognóstico dos pacientes com este câncer e seu uso como biomarcadores. Dentre elas estão as proteínas parkina (da SILVA-CAMARGO *et al*, 2018; POULOGIANNIS *et al*, 2010), APC (DOW *et al*, 2015; LEE *et al*, 2009; POULOGIANNIS *et al*, 2010), APEX1 (*apurinic/aprimidinic endodeoxyribonuclease 1*) (KIM *et al*, 2013; KIM *et al*, 2019), BCL2L1 (CHO *et al*, 2017; LIZÁRRAGA-VERDUGO *et al*, 2020; SILLARS-HARDEBOL *et al*, 2011), CD36 (*CD36 molecule*) (DRURY *et al*, 2020; FANG *et al*, 2019; ZHANG *et al*, 2019) e p53 (LI *et al*, 2015; MUNRO *et al*, 2005).

A parkina é codificada pelo gene supressor tumoral *PRKN* (*parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase*), ou *PARK2*, localizado em 6q26. A parkina é uma proteína citoplasmática da família RBR (do inglês *ring-between-ring*) que abrange múltiplas proteínas E3 ubiquitina ligase. Ela pode ser encontrada expressa em uma variedade de tecidos, por exemplo, cérebro, córtex, mesencéfalo, cerebelo, músculo esquelético, coração e testículos (LA COGNATA *et al*, 2015; SEIRAF *et al*, 2015). Componente de um complexo multiproteico, a parkina é responsável por mediar, em condições normais, a marcação de substratos proteicos citosólicos, nucleares e mitocondriais para degradação proteossomal pelo processo de poli-ubiquitinação (NCBI, 2019; SEIRAF *et al*, 2015). A auto-ubiquitinação de parkina é possível e ocorre em resposta a sua ligação covalente à proteína SUMO-1 (*small ubiquitin like modifier 1*), embora venha sendo observado que o aumento de expressão desta última não acarrete o aumento da degradação de parkina (WALDEN & MARTINEZ-TORRE, 2012). Ainda, a parkina participa do processo de regulação mitocondrial, no qual possui uma

importante atuação na mitofagia, pela degradação seletiva de mitocôndrias despolarizadas e/ou danificadas (SEIRAFI *et al*, 2015).

Estudos recentes vêm demonstrando o envolvimento do gene *PRKN* na carcinogênese do CCR, sendo observado que a perda de heterozigose do *PRKN* correlacionada a mutações em *APC* contribui para uma aceleração no desenvolvimento de adenomas intestinais (POULOGIANNIS *et al*, 2010). Além disso, este estudo demonstrou que quando o *APC* se encontrava suprimido e o *PRKN* sobre-expresso, havia uma inibição da proliferação celular. Assim, foi proposto que estes dois genes estariam envolvidos na via da carcinogênese colorretal, que no seu início apresenta a supressão do gene *APC*, o que levaria à haploinsuficiência do gene *PRKN* (POULOGIANNIS *et al*, 2010). Outro estudo realizado também com CCR, mostrou que os dois genes estariam correlacionados, sendo observada uma correlação positiva entre a expressão das proteínas APC e parkina, com a expressão concomitante destas duas proteínas em células de mucosa neoplásica de adenocarcinoma colorretal. Ainda foi proposto que a expressão da proteína parkina tenha um potencial valor prognóstico e uma possível função protetora na evolução desta neoplasia (da SILVA-CAMARGO *et al*, 2018). Outros estudos indicaram a importância do gene *PRKN* em outras neoplasias, como em tumores de ovário e de pulmão (DUAN *et al*, 2019; KLIMCZAK *et al*, 2016). Em câncer epitelial de ovário foi observada associação entre uma das variáveis germinativas de *PRKN* com suscetibilidade a esta neoplasia, e sugerindo, dessa forma, que combinações alélicas deste gene podem levar os pacientes a apresentarem um fenótipo de risco (KLIMCZAK *et al*, 2016). Em um estudo realizado com carcinoma de pulmão de células pequenas, foi proposto que o gene *PRKN* está envolvido na regulação negativa no desenvolvimento e progressão tumoral, uma vez que em testes *in vitro* e *in vivo* foi observado que a sobre-expressão deste gene leva a uma redução no crescimento, migração, invasão celular e metástase, bem como promove a apoptose pela inibição da via de sinalização EGFR/AKT (*AKT serine/threonine kinase 1*) /MTOR (*mechanistic target of rapamycin kinase*) (DUAN *et al*, 2019).

Uma importante alteração epigenética para o gene *PRKN*, a metilação, vem sendo também descrita como um mecanismo ocorrente no desenvolvimento tumoral. Em 2006, Agirre *et al* observaram metilação anormal de *PRKN* em linhagens celulares e células primárias de leucemia linfoblástica aguda e leucemia mielóide crônica, bem

como sua associação com um decréscimo na expressão de seu mRNA (AGIRRE *et al*, 2006). Em um outro estudo, realizado em 2019 por Wahabi *et al*, foi proposta a inativação de *PRKN* por hipermetilação como um indicador de sobrevida em pacientes com câncer de mama avançado, uma vez que aquelas pacientes que apresentaram metilação aberrante de *PRKN* apresentaram, também, uma menor sobrevida. Ainda, os pesquisadores observaram que a maior parte das pacientes que compuseram a amostra (68%), não apresentavam expressão de *PRKN*. Corroborando com este achados, em 2018, Bhat *et al* observaram em amostras de pacientes com CCR uma maior expressão do gene *PRKN* em amostras de tecido colônico não tumoral em comparação com amostras tumorais, e propuseram uma associação entre a hipermetilação de *PRKN* com o estadiamento clínico-patológico apresentado pelos pacientes, sendo que aqueles pacientes classificados em estádios III e IV apresentaram maiores níveis de hipermetilação deste gene quando comparados aqueles que apresentaram estádios I e II (BHAT *et al*, 2018).

Considerada uma supressora tumoral e a “guardiã do genoma humano”, a proteína p53 é descrita na carcinogênese do CCR e possui um papel importante na regulação da parkina, e vice-versa. A p53 é um fator de transcrição responsável por promover, em situações de estresse celular, a expressão de genes envolvidos nos processos de interrupção do ciclo celular e promoção da apoptose e senescência (LIU *et al*, 2015; LIU *et al*, 2014; ZHANG *et al*, 2011). Além disso, ela está envolvida na inibição do efeito Warburg, um mecanismo apresentado por células tumorais para produção de ATP por glicólise aeróbica, a partir do aumento da captação de glicose por estas células. Este fenômeno pode ocorrer mesmo em presença de oxigênio e mitocôndrias funcionais (LIBERTI e LOCASALE, 2016; LIU *et al*, 2014; ZHANG *et al*, 2011). E, embora a glicólise aeróbica seja um mecanismo menos eficaz de produção de ATP, a sua ocorrência gera metabólitos secundários para a biossíntese macromolecular, algo essencial para o rápido crescimento e proliferação celular (LIU *et al*, 2014). Neste contexto, a p53 foi descrita na inibição deste mecanismo pela ação da parkina, sendo que o aumento da transcrição do gene *PRKN* pela ação de p53 leva à reversão do efeito Warburg e consequente restauração da respiração mitocondrial. Ainda, o aumento de expressão de parkina por p53 leva à sua ação como antioxidante (ZHANG *et al*, 2011).

Contudo, quando analisado outro modelo de estudo, em doença de Parkinson, é observado entre parkina e p53 um efeito oposto ao anteriormente descrito. Neste modelo, a proteína parkina vem sendo proposta como envolvida no controle da transcrição gênica, de modo a suprimir a expressão de p53. Este processo, porém, não ocorre por meio de sua ação como ubiquitina ligase, de modo que é possível supor que a parkina possua função no controle transcricional (da COSTA *et al*, 2009; WALDEN & MARTINEZ-TORRE, 2012).

Outra função importante descrita para a proteína parkina é a regulação do metabolismo de lipídios e do transporte destes do meio extracelular para o meio intracelular. A regulação do transporte de lipídeos ocorre por efeitos dependentes do papel da parkina como um ubiquitina E3-ligase relacionada a proteína transportadora de lipídeos CD36, sendo que a parkina age de modo a mono-ubiquitinar esta última, levando, conseqüentemente, a sua estabilização e aumento de sua ação (KIM *et al.*, 2011; NCBI, 2019).

A proteína CD36, codificada pelo gene de mesmo nome e localizado em 7q21.11, tem sido proposta como uma indicadora de metástase. Foi observado que o aumento na absorção de ácidos graxos livres via CD36 leva ao aumento na transição epitélio-mesenquimal em carcinoma hepatocelular, e que esta transição seria um importante mecanismo de progressão desta neoplasia (NATH *et al*, 2015). Também foi observada uma correlação negativa entre CD36 e o prognóstico de pacientes com glioblastoma (HALE *et al*, 2014). Em um estudo tendo como modelo animal camundongos com câncer de mama que apresentavam obesidade induzida por dieta, foi observado que a via de sinalização LPA (*lipoprotein a*)/PKD-1 (*protein kinase D1*) - CD36 estimulava o remodelamento microvascular (YUAN *et al*, 2017). Utilizando este mesmo modelo animal, foi observado em camundongos com carcinoma de células escamosas orais que a sobre-expressão de CD36 aumentava o potencial de metástase destas células para os linfonodos, bem como sua expressão se encontrava mais elevada em locais de metástase. Além disso, os pesquisadores observaram que sua inibição e sobre-expressão levavam, respectivamente, à inibição e sobre-expressão de outros genes envolvidos no processo metastático de metabolização de lipídeos, tais como *EPHA2* (*eph receptor A2*), *SOX9* (*SRY-box transcription factor 9*), *CPT1A* (*carnitine palmitoyltransferase 1A*) e *CPT2* (*carnitine palmitoyltransferase 2*) (PASCUAL *et al*, 2017). Em CCR, foi observado em um estudo recente que a sobre-

expressão de CD36 está associada com a progressão desta neoplasia, bem como a sua inibição leva a diminuição da proliferação e sobrevivência de células primárias de CCR (DRURY *et al*, 2018).

Ainda, o gene *PRKN* pode controlar a expressão dos genes *BCL2L1* e *APEX1*. O primeiro, que codifica para a oncoproteína BCL2L1, também conhecida como BCL-XL, se localiza no cromossomo 20q11.21 e pertence à família das proteínas BCL-2. Esta família é subdividida em três grupos, sendo eles: *pro-survival BCL-2 like proteins*, o único grupo anti-apoptótico desta família proteica e no qual se enquadra a proteína BCL2L1; *multi BH-domain pro-apoptotic BAX (BCL2 associated X, apoptosis regulator)/BAK (BCL2 antagonist/killer 1) proteins* e *pro-apoptotic BH3-only proteins*. A ação antiapoptótica da BCL2L1, bem como de todas as proteínas de seu grupo, consiste na prevenção da ativação de BAX e BAK, proteínas pró-apoptóticas pertencentes ao terceiro grupo citado anteriormente (DELBRIDGE *et al*, 2015; GONG *et al.*, 2017). Isso ocorre através da ligação da BCL2L1 a estas proteínas, protegendo assim a integridade da membrana mitocondrial externa, de modo a prevenir a sua permeabilização às moléculas pró-apoptóticas responsáveis pela ativação da cascata caspase e, conseqüentemente, prevenindo a destruição celular (DELBRIDGE *et al*, 2015; GONG *et al.*, 2017). Assim, a sua ação em tumores consiste principalmente em prevenir a morte celular programada, um importante mecanismo para a sobrevivência tumoral (DELBRIDGE *et al*, 2015; GONG *et al.*, 2017).

A amplificação da expressão do gene BCL2L1 vem sendo observada em determinados tipos de tumores, tais como: câncer de pulmão, câncer de mama, tumores de células grandes dos ossos e linfomas (BEROUKHIM *et al*, 2010; DELBRIDGE *et al*, 2015; GONG *et al.*, 2017; KARCZMAREK-BOROWSKA *et al*, 2006; KELLY *et al*, 2012; SMITH *et al*, 2006; TONON *et al*, 2005).

Quanto ao *APEX1*, localizado em 14q11.2, este codifica para a proteína APEX1, também conhecida como APE1, expressa em uma grande variedade de tecidos, como, por exemplo, ovário, endométrio, medula óssea, tireoide e bexiga (NCBI, 2019). A APEX1 está envolvida no processo de reparo de excisão de bases de DNA nuclear e mitocondrial, crucial para o funcionamento e sobrevivência celular. A APEX1 é uma das principais endonucleases envolvidas neste processo que ocorre em resposta a danos no DNA, gerados tanto por fatores endógenos, quanto por fatores exógenos, e prevenindo, deste modo, o acúmulo de lesões e,

consequentemente, a morte celular (SCOTT *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017; TELL *et al.*, 2009). A proteína APEX1 vem também sendo descrita como uma importante participante na atividade redox, atuando na regulação de determinados fatores transcricionais, como STAT3 (*signal transducer and activator of transcription-3*), HIF-1 α (*hypoxia inducible factor-1 alpha*), e NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), responsáveis por promoverem a transcrição de genes envolvidos nos processos de crescimento, proliferação, migração, invasão e sobrevivência celulares (SCOTT *et al.*, 2016; SHAH *et al.*, 2017; TELL *et al.*, 2009).

Considerando células tumorais, a sobre-expressão desta proteína foi observada em uma variedade de tumores, tais como: câncer de próstata, câncer pancreático, câncer de ovário, carcinoma de células grandes de pulmão e tumores malignos da bainha dos nervos periféricos (SHAH *et al.*, 2017).

Uma vez, portanto, que o CCR apresenta no Brasil índices crescentes de incidência, prevalência e mortalidade, bem como demonstra em determinados casos resistência aos tratamentos convencionais, é importante que estudos sejam realizados com a finalidade de identificar biomarcadores mais eficientes para a determinação prognóstica e de risco. Isto permitiria abordagens clínicas personalizadas e específicas, através da identificação e estratificação de grupos de risco e tratamento, contribuindo assim para o aumento da sobrevida livre de doença e da qualidade de vida destes pacientes.

Neste contexto, o presente trabalho buscou replicar e ampliar o estudo anterior (da SILVA-CAMARGO *et al.*, 2018), correlacionando a expressão de parkina e de outras proteínas, APC, APEX1, BCL2L1, CD36 e p53, em amostras de pacientes com CCR, com fatores prognósticos e evolução clínica destes pacientes. APEX1, BCL2L1 e CD36 são alvos de ubiquitinação pela parkina (GONG ET AL., 2017; KIM ET AL., 2011; SCOTT ET AL., 2016), enquanto APC e p53, já descritas na carcinogênese colorretal, vêm sendo associadas à parkina (da COSTA *et al.*, 2009; da SILVA-CAMARGO *et al.*, 2018; POULOGIANNIS *et al.*, 2010; WALDEN & MARTINEZ-TORRE, 2012; ZHANG *et al.*, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar a expressão imunoistoquímica de parkina, APC, APEX1, BCL2L1, CD36 e p53 em CCR, a fim de selecionar potenciais novos biomarcadores de estratificação de risco e prognóstico para esta doença.

2.2. Objetivos específicos

- a) Descrever características clínico-patológicas e a sobrevida global dos pacientes com CCR que compõe a amostra;
- b) Avaliar os padrões de expressão proteica tecidual das proteínas parkina, APC, APEX1, BCL2L1, CD36 e p53 em amostras parafinadas selecionadas da massa tumoral (*bulk* tumoral) e frente invasiva (*front*) de CCR;
- c) Classificar os pacientes que compõem a amostra quanto à instabilidade de microssatélites;
- d) Pesquisar a correlação entre os padrões de expressão das proteínas estudadas;
- e) Investigar a associação entre os padrões de expressão das proteínas encontrados com características clínico-patológicas e sobrevida global dos pacientes com CCR que compõe a amostra, de modo a avaliar o seu papel como potenciais biomarcadores de prognóstico;
- f) Investigar a associação entre as características clínico-patológicas e sobrevida global dos pacientes com CCR que compõe a amostra.

3. MÉTODOS

3.1. Amostras estudadas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, sob o protocolo de número 2.504.578 (Anexo 1).

Foram analisadas 211 amostras parafinadas de CCR arquivadas no Instituto Pontagrossense de Gastroenterologia, Ponta Grossa, Paraná, coletadas entre os anos de 2010 a 2015, de pacientes que foram operados pelo mesmo grupo de cirurgia oncológica.

Para a análise de cada caso referente aos estádios T2, T3 e T4, foram selecionadas amostras referentes às regiões correspondentes ao *bulk* tumoral, que compreende a região central do tumor, e ao *front*, que se refere à frente invasiva, ou seja, à área tumoral limítrofe (Figura 3). Para os casos mais precoces, estágio T1, não foi possível fazer a distinção entre as duas regiões tumorais. Portanto, amostras T1 foram consideradas como *bulk*. A separação das amostras em *bulk* e *front* permitiu uma visão geral e exploratória do que ocorre na área infiltrativa do tumor (*front*), bem como em seu núcleo central (*bulk*). Ainda assim, não é possível desconsiderar a heterogeneidade tumoral, que pode ocorrer até em uma mesma região, como é o caso do *front*, que pode apresentar grupos celulares isolados da massa tumoral principal (STOAKES, 2019). Esses grupos celulares ou *buddings* se caracterizam por apresentarem propriedades distintas do restante do tumor (OZER *et al*, 2020).

As amostras utilizadas no presente estudo foram obtidas a partir de procedimento cirúrgico, sendo colectomia total (n: 4, 1,8%), colectomia parcial (n: 200, 94,7%) ou amputação anorretal (n: 1, 0,47%). Apenas duas amostras foram obtidas a partir de biópsia (0,94%). Os demais pacientes não apresentaram informações quanto ao procedimento cirúrgico (n: 4, 1,8%).

Todos os casos de neoplasia colorretal diagnosticados no período de 2010 a 2015 registrados no banco de dados do laboratório Patologia Médica de Ponta Grossa foram incluídos. A seguir, foram excluídos os casos de pacientes com prontuário médico incompleto ou que não apresentavam este prontuário e casos de polipose

familiar (com a finalidade de excluir casos familiares, uma vez que estes apresentam etiologia distinta dos casos esporádicos, alvos deste estudo).

As características clínico-patológicas e sobrevida global foram obtidas a partir dos prontuários dos pacientes.

As características clínico-patológicas estudadas foram:

- ✓ sexo: masculino e feminino;
- ✓ idade ao diagnóstico: em anos, bem como idade baseada nos critérios de Bethesda, com ponto de corte em 50 anos (ACS, 2018);
- ✓ classificação histológica: adenocarcinoma mucinoso, adenocarcinoma tubular e carcinoma de células em anel de sinete. Esta classificação foi realizada a partir de análise de peça cirúrgica de acordo com o “Protocolo para o exame de espécimes de pacientes com carcinoma primário de cólon e reto” (KAKAR, S. *et al*, 2017);
- ✓ estadiamento T: T1/T2, T3 e T4;
- ✓ estadiamento N: N0 e N1/N2;
- ✓ topografia: o local anatômico comprometido pelo tumor primário, podendo ser (1) ceco, (2) cólon ascendente e ângulo hepático, (3) cólon transversos, (4) ângulo esplênico e cólon descendente, (5) sigmoide e junção reto-sigmóide, e (6) reto, alto ou médio/baixo;
- ✓ graduação tumoral: pouco e bem/moderadamente diferenciado;
- ✓ tamanho tumoral: foi considerado o maior eixo deste em milímetros (mm);
- ✓ realização ou não de tratamento neoadjuvante;
- ✓ presença ou ausência de metástase ao diagnóstico;
- ✓ metástase até a data da última consulta ou óbito, presença ou ausência.

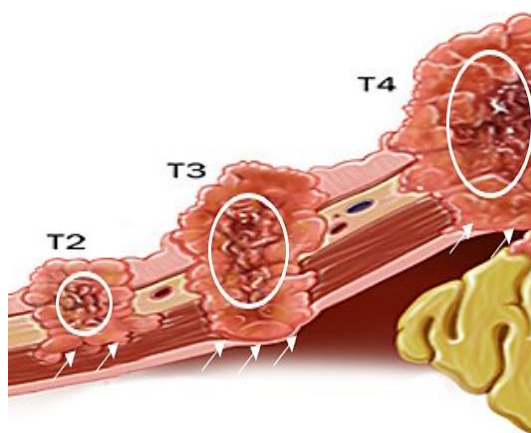
Quanto à sobrevida, esta foi determinada levando-se em consideração o tempo de seguimento em anos a partir do diagnóstico até a data da última consulta ou de óbito de cada indivíduo que compões a amostra.

Em razão de parte dos pacientes terem sido submetidos a tratamento neoadjuvante e levando-se em consideração que o tratamento pode interferir nas características do tumor, os pacientes foram subdivididos em dois grupos, sem tratamento neoadjuvante e com tratamento neoadjuvante, e foram analisados separadamente.

O tratamento neoadjuvante, como mencionado, é empregado em casos de tumor primário localizado no reto médio ou baixo. O principal benefício desta forma de tratamento é a qualidade de sobrevida que proporciona aos pacientes, uma vez que reduz o tamanho tumoral, aumenta as taxas de ressecabilidade e evita, na maior parte dos casos, a necessidade de retirada do esfíncter durante a cirurgia (MAGRI *et al*, 2016; PINHO, 2007).

No presente estudo, 17 dos 24 pacientes submetidos a este tratamento apresentaram tumores com topografia de reto médio ou baixo. Destes, 15 pacientes receberam quimioterapia e radioterapia, enquanto 2 casos (79 e 91 anos de idade) apenas quimioterapia ou radioterapia. Para outros 5 casos não havia registro claro da localização do tumor como reto alto ou baixo, mas pela conduta do serviço foi possível assumir que não se tratava de reto alto. Entre estes 5 pacientes, 4 receberam quimioterapia e radioterapia e um paciente (73 anos de idade) foi submetido apenas a quimioterapia neoadjuvante. Os dois casos remanescentes são de tumores no sigmóide e na junção reto-sigmóide, sendo um deles submetido à quimioterapia neoadjuvante (estadiamento: T4b N1a), enquanto o outro recebeu quimioterapia e radioterapia neoadjuvantes (sem informações quanto ao estadiamento). Quanto ao grupo composto por pacientes sem tratamento neoadjuvante (n=187), 13 apresentaram tumor primário no reto, sendo 11 casos registrados como reto alto e 2 casos sem registro específico.

Figura 3. Localização e caracterização das regiões amostradas.



Legenda: O *bulk* tumoral ou a região central do tumor está indicada pelos círculos; o *front* invasivo ou a região limítrofe do tumor está indicada pelas setas.

Referência: adaptado de Endocolono, 2019.

3.2. Preparo histológico

De modo a otimizar as análises das amostras dos 211 pacientes que compuseram este estudo, blocos de microarranjos de tecidos (TMA – do inglês *tissue microarray*) foram confeccionados, totalizando 12 blocos de TMA para cada região tumoral.

Inicialmente foram confeccionadas as lâminas histológicas a partir dos blocos de parafina previamente selecionados do Instituto Pontagrossense de Gastroenterologia.

Para tanto, a primeira etapa consistiu na microtomia destes blocos doadores, ou seja, cortes histológicos sequenciais de 4µm com a utilização de um micrótomo (Leica RM 2145) e uma navalha descartável (Leica perfil alto) e deposição do material em lâminas de vidro para histologia (Precision Glass Line®). Estas lâminas foram mantidas em estufa a 60°C para secarem. A seguir foram coradas em hematoxilina-eosina (HE) e analisadas ao microscópio óptico para seleção e delimitação das áreas a serem retiradas e incluídas na preparação dos TMAs. A seleção das regiões foi realizada com a finalidade de incluir uma amostra da região de *bulk* tumoral e uma amostra da frente invasiva, conforme descrito no tópico “Amostras estudadas”.

A etapa seguinte consistiu na organização de um mapa em plano cartesiano para definição da localização de cada amostra no TMA. Neste plano, para cada bloco foram determinadas 20 amostras tumorais divididas em 4 colunas e cinco linhas (com exceção dos blocos 7 e 11). Assim, para cada região avaliada, *bulk* ou *front*, foram confeccionados 12 blocos e 12 lâminas quem continham todas as amostras estudadas (Figura 4).

Com a utilização de uma broca trefina Neodent® cilíndrica, de 3 mm de diâmetro, acoplada a uma caneta-pino-chave e a um motor de suspensão de 130 watts, da marca Bethil®, foi feita a retirada das amostras das áreas previamente selecionadas. Essas amostras foram retiradas da broca com o auxílio de uma guia e posicionadas em uma caixa identificada de acordo com o mapa de localização. Em seguida, os fragmentos foram transferidos das caixas identificadas e posicionados em

formas metálicas para confecção dos blocos receptores, obedecendo a ordem do mapa de localização (Figura 5).

Ainda, em cada bloco de TMA confeccionado, uma amostra de tecido hepático não tumoral foi adicionada em uma localização fixa, de modo a possibilitar a orientação da sequência de amostras, bem como servir como controle positivo.

Com os blocos de TMA finalizados, foi realizada a microtomia com cortes histológicos sequenciais de 4µm de espessura em micrótomo Leica RM 2145. Após secagem em estufa a 60°C, as lâminas de vidro contendo os cortes histológicos foram coradas pela técnica de imunoistoquímica, com a utilização de anticorpos específicos a fim de tornar visível a expressão das proteínas de interesse (Figura 5).

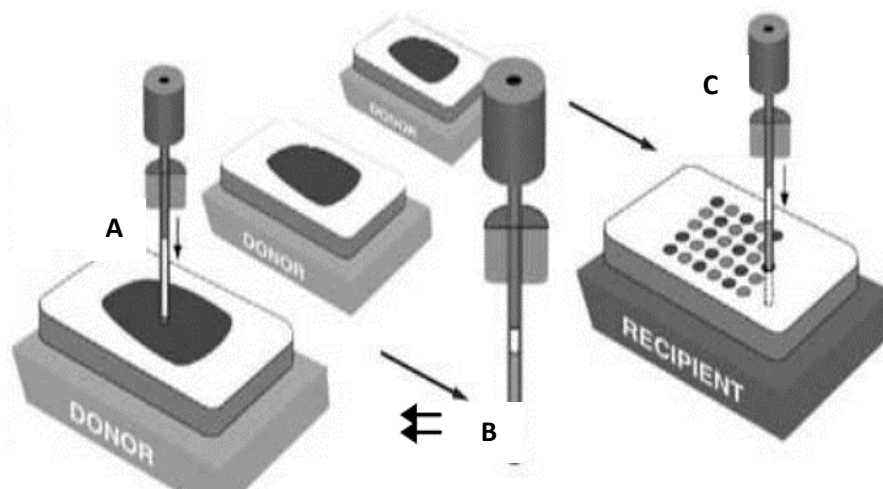
Figura 4. Bloco receptor e lâmina de microarranjos de tecidos.



Legenda: (à esquerda) lâmina de TMA corada pelo método de imunoistoquímica; (à direita) bloco receptor de TMA finalizado

Fonte: a autora, 2018.

Figura 5. Confeção dos microarranjos de tecidos (TMA).



Legenda: (a) bloco doador, dos quais são retiradas as amostras; (b) broca cilíndrica empregada na retirada e transferência das amostras; (c) bloco receptor, cuja localização das amostras é previamente definida por um mapa em plano cartesiano.

Referência: adaptado de Giltnane e Rimm, 2004.

3.3. Preparo imunoistoquímico

Para o preparo imunoistoquímico, os cortes histológicos foram submetidos à desparafinação por 5 minutos em uma cuba contendo xilol PA aquecido. Esse procedimento foi repetido por 3 vezes. As lâminas foram, então, submetidas à desidratação com 3 banhos sucessivos de álcool etílico absoluto, de 1 minuto cada, e à reidratação com água por 5 minutos. Para recuperação antigênica, as lâminas foram mergulhadas em recuperador tampão citrato (pH 6,0 ou tampão Tris-EDTA pH 9,0) Imuno Retrivel (Dako®) em cuba de banho-maria a 99° C por 20 min. Por fim, foram resfriadas em temperatura ambiente.

Uma solução contendo álcool metílico e H₂O₂ PA foi utilizada para o bloqueio da peroxidase endógena. A seguir, as lâminas foram incubadas com os anticorpos para as proteínas estudadas (#anti-Parkin antibody [PRK8] ab77924, #anti-APC antibody, #anti-APE1 antibody ab105081, #anti-Bcl-XL antibody ab45002, anti-CD36, #anti-P53DO-7, #anti-human MutS Protein Homolog 2, #anti-human MutL Protein Homolog 1, #anti-human MutS Protein 6 e #anti-human Postmeiotic Segregation

Increased 2) nas diluições adaptadas para melhores resultados (respectivamente, 1:100, 1:200, 1:1000, 1:100, 1:100,1:200 e, para os marcadores de instabilidade de microsatélites, prontos para utilização) em câmara úmida, submetida a temperaturas entre 2 e 8°C, durante a noite (Tabela 3).

Tabela 3. Informações dos anticorpos empregados nos testes imunoistoquímicos.

Proteína	Anticorpo	Diluição	Marca
Parkin	anti-Parkin	1:100	Abcam
APC	anti-APC	1:200	RabMAb
APEX1	anti-APEX1	1:1000	Abcam
BCL2L1	anti-BCL2L1	1:100	Abcam
CD36	anti-CD36	1:100	Abcam
p53	anti-p53	1:200	BioSB
MLH1	anti-MLH1	prontos para utilizar	Dako
MSH2	anti-MSH2	prontos para utilizar	Dako
MSH6	anti-MSH6	prontos para utilizar	Dako
PMS2	anti-PMS2	prontos para utilizar	Dako

Legenda:CD36: *CD36 molecule*; BCL2L1: *BCL2L1 BCL2 like 1*; APEX1: *apurinic/aprimidinic endodeoxyribonuclease 1*; APC: *adenomatous polyposis coli*; p53: *tumor protein P53*; MLH1: *mutL homolog 1*; MSH2: *mutS homolog 2*; MSH6: *mutS homolog 6*; PMS2: *PMS1 homolog 2, mismatch repair system component*.

Para a revelação, foi adicionado o complexo DAB + substrato (tampão para diluição do DAB) sobre as lâminas e a contra-coloração realizada com hematoxilina de Harris, seguida de desidratação com banhos de álcool etílico 100% e clarificação com xilol PA. Para a montagem das lâminas permanentes foi utilizada a resina histológica própria para microscopia (Entellan, Merck®).

Para efeito de controle positivo, para cada proteína avaliada, uma lâmina contendo um corte de tecido hepático não tumoral (de acordo com as informações acerca de reação disponíveis nas bulas para cada anticorpo) foi incluída em uma bateria de testes. Em relação ao controle negativo, para este foi confeccionada, para

cada marcador, uma lâmina apresentando omissão do anticorpo secundário. Assim, foi possível avaliar a funcionalidade de cada anticorpo empregado neste estudo.

O preparo das lâminas histológicas e os ensaios imunoistoquímicos foram realizados no Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR.

3.4. Leitura das lâminas de imunoistoquímica

Para análise da expressão das proteínas avaliadas no presente estudo, três métodos de análise foram aplicados, (1) morfometria, que permite uma análise quantitativa e mais precisa da expressão proteica tecidual na área analisada; (2) escore de *Allred*, que, embora também analise a distribuição, porém de modo não tão preciso quanto à morfometria, este método tem o diferencial de avaliar a intensidade de expressão (não observada na análise morfométrica), bem como se trata de um método de análise mais ágil; e (3) para análise dos MSI, MSH2 e MSH6, em se tratando de proteínas nucleares, estas foram analisadas quanto à presença ou ausência de expressão na região nuclear.

3.4.1. Análise morfométrica

Para a avaliação da expressão das proteínas parkina, APC, BCL2L1 e CD36 foi empregada a análise por morfometria. Esta técnica permite a descrição quantitativa da área de expressão das proteínas. Assim, as lâminas submetidas à imunoistoquímica foram inicialmente analisadas através do Axio Scan.Z1®. Neste equipamento, utilizando a objetiva de 40x, foram capturadas imagens de áreas representativas das regiões tumorais *bulk* e *front*, perfazendo um total de 10-15 imagens por região, e de 20-30 imagens por caso. Assim, para cada marcador foram obtidas cerca de 6.330 imagens para otimização, totalizando deste modo cerca de 25.320 imagens para os quatro marcadores avaliados por esse método de análise.

Para otimização das imagens, foi empregado o *software* Adobe Photoshop CS6 v 13.0®, para a retirada das áreas de estroma não neoplásico e áreas em branco (vazias) contidas nas imagens, de modo que fossem selecionadas apenas as áreas

tumorais. Esse processo é necessário uma vez que é possível encontrar as proteínas estudadas também nas áreas estromais, de modo que a não retirada destas áreas afetaria os resultados da análise morfométrica.

A análise da expressão das proteínas foi realizada por análise morfométrica com auxílio do software Image Pro Plus® pela ferramenta morfometria de cores, na qual são analisadas três cores: castanho, característica da imunopositividade da reação entre a proteína estudada e o anticorpo específico; azul, característica da imunonegatividade para esta reação; e branca, característica das áreas retiradas conforme citado anteriormente (estromais e brancas). A máscara confere a cor vermelha às áreas castanhas, amarela, às áreas azuis e verde, às áreas brancas. Ao final, o programa fornece automaticamente os micrômetros quadrados do total de áreas coradas pelas diferentes cores. Os dados foram organizados em planilhas para análise estatística.

Para cada amostra das regiões tumorais (*bulk* e *front*) foi obtido o percentual médio de área positiva de todas as imagens como sendo o total de área positiva (vermelha) em micrômetros quadrados dividido pela soma deste com o total de área negativa (amarela) em micrômetros quadrados (equação 1).

Equação 1

$$\text{Percentual de área positiva} = \frac{\text{Total de área positiva } (\mu\text{m}^2)}{\text{Total de área positiva } (\mu\text{m}^2) + \text{total de área negativa } (\mu\text{m}^2)}$$

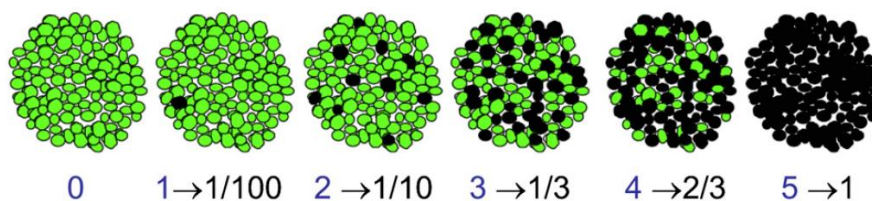
3.4.2. Escore de Allred

Para a avaliação da expressão das proteínas APEX1, p53 e parkina foi empregada a análise por escore de *Allred* adaptada para esta neoplasia, com o auxílio de um microscópio óptico em objetiva de 40X. Esta análise consiste em, sob a supervisão e auxílio de um médico patologista experiente, estabelecer para cada amostra (caso) um escore cuja somatória leva em consideração a extensão da área tumoral positiva para a expressão do marcador (0-5) e a intensidade dessa expressão

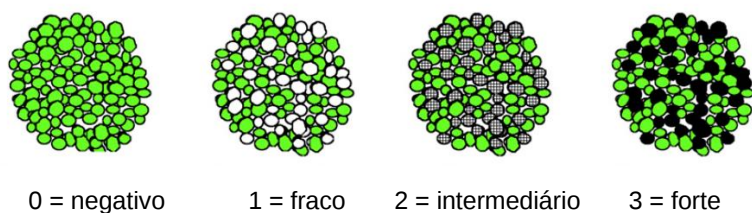
(0-3), e cuja soma total, portanto, pode ser de 0 a 8 (Figura 6). Esses resultados foram organizados em planilhas para análise estatística.

Figura 6. Escore de *Allred*.

A) Escore de distribuição (1 a 5)



B) Escore de intensidade (1 a 3)



C) Escore total = distribuição + intensidade (1 a 8)

Legenda: Metodologia de calculo do escore Allred. A cor verde identifica células não marcadas, enquanto as cores cinza, cinza escuro e preto identificam as células marcadas pela expressão proteica em intensidades diferentes. (A) Série em que a intensidade da marcação é constante (ao máximo) e a proporção de marcação aumenta da esquerda para a direita. (B) Série em que a proporção de células marcadas é constante, porém a intensidade de marcação aumenta da esquerda para a direita. Escore de distribuição: 0 = sem núcleos positivos; 1 = 0-1% de núcleos positivos; 2 = 1-10% de núcleos positivos; 3 = 10-33% de núcleos positivos; 4 = 33-66% de núcleos positivos; 5 = acima de 66% de núcleos positivos. Escore de intensidade: 0 = expressão negativa da proteína, 1 = intensidade de expressão fraca da proteína, 2 = intensidade de expressão intermediária da proteína, 3 = intensidade de expressão forte da proteína. O escore total se dá pela soma de dos escores de distribuição e intensidade = 0-8. **Fonte:** adaptado de CHOUDHURY *et al.*, 2010.

3.4.3. Análise de instabilidade de microssatélites

A expressão das proteínas MSH2 e MSH6 nas lâminas de imunoistoquímica foi classificada como positiva (coloração castanha) ou negativa (coloração azul). Foi utilizado o microscópio Olympus BX40® para se observar as lâminas em objetivas de 4x, 10x e 40x. Cada amostra que compunha um caso foi analisada e a presença de ao menos uma área positiva classificou o caso como positivo e a ausência de área positiva o classificou como negativo para o anticorpo em questão. Com relação às proteínas MSH2 e MSH6 quando se encontravam alteradas foi observada coloração azul, ou seja, imunonegatividade.

3.5. Análise estatística

Os resultados de variáveis quantitativas foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Variáveis categóricas foram descritas por frequências e percentuais. Para a comparação de dois grupos definidos por fatores clínicos, em relação às variáveis relativas aos marcadores, foi considerado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Mais de dois grupos foram comparados usando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Para a comparação de três grupos quanto à idade, foi usado o modelo de análise da variância (ANOVA) com um fator. Para avaliação da associação entre duas variáveis quantitativas, foram estimados coeficientes de correlação de Spearman. O tempo de sobrevida foi descrito por curvas de Kaplan-Meier. Para a análise de associação de variáveis com a sobrevida, foram ajustados modelos de Regressão de Cox e usado o teste de Wald para avaliação das variáveis incluídas nos modelos. A medida de associação estimada foi a hazard ratio para as quais foram apresentados intervalos de confiança de 95%. Valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística. Para a análise foi utilizado o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.

4. RESULTADOS

4.1. Características clínico-patológicas

Os pacientes deste estudo foram subdivididos em dois grupos, conforme tenham sido submetidos a tratamento neoadjuvante ou não. Os dados clínico-patológicos foram obtidos de seus prontuários (Tabelas 4 e 5). O número amostral oscilou entre as variáveis devido à ausência de informações para alguns casos.

Assim, o grupo não submetido ao tratamento neoadjuvante não apresentou diferença em relação ao sexo (100 mulheres e 87 homens) e média de idade igual a $63,7 \pm 13,3$ anos; a maioria, apresentou tumores do subtipo histológico adenocarcinoma tubular ($n=160$, 86%), localizados na região do sigmóide ou na junção reto-sigmóide ($n=104$, 57,8%) e com grau histológico bem diferenciado ($n=173$, 94%). Os estádios ao diagnóstico de maior frequência foram o T3 ($n=93$, 54,7%) e o N1/N2 ($n=115$, 68,5%). Ainda, a maior parte dos pacientes não apresentou metástase o diagnóstico ($n=134$, 81,2%), nem durante o tempo de seguimento ($n=134$, 81,2%).

As características do grupo submetido ao tratamento neoadjuvante foram semelhantes, em sua maioria: equilíbrio na proporção sexual (11 mulheres e 13 homens) e média de idade igual a $64,5 \pm 12,4$ anos; a maioria também apresentou adenocarcinomas tubulares ($n=21$, 87,5%) e graduação bem diferenciada ($n=22$, 95,7%). Os estádios ao diagnóstico de maior frequência foram o T3 ($n=10$, 52,6%) e N1/N2 ($n=10$, 52,6%). Quanto às variáveis relacionadas a metástase, a maior parte dos pacientes não apresentou metástase ao diagnóstico ($n=22$, 91,7%), nem durante o tempo de seguimento ($n=18$, 78,3%).

E, estando de acordo com o esperado, a localização de maior frequência foi no reto médio e baixo ($n=17$, 70,8%). Contudo, ainda que a terapia neoadjuvante seja recomendada apenas em casos de câncer na topografia citada, 2 casos (8,3%) deste grupo corresponderam a tumor primário na localização do sigmóide ou na junção reto-sigmóide.

Por outro lado, a média de tamanho dos tumores dos pacientes que receberam neoadjuvância foi menor, $39,8 \pm 22,1$, do que aquela dos que não receberam, $58,2 \pm 28,0$. Este resultado é coerente com o objetivo desta abordagem

de tratamento, uma vez que ela visa diminuir o tamanho tumoral antes do procedimento cirúrgico.

Tabela 4. Características clínico-patológicas quantitativas dos pacientes com CCR analisados.

Variável	Tratamento neoadjuvante							
	Não				Sim			
	n	média ± s	mínimo	máximo	n	média ± s	mínimo	máximo
Idade (anos)	187	63,7 ± 13,3	21	94	24	64,5 ± 12,4	44	91
Tamanho do tumor (mm)	184	58,2 ± 28,0	10	165	24	39,8 ± 22,1	10	90

Legenda: n: número amostral.

Tabela 5. Características clínico-patológicas categóricas dos pacientes com CCR analisados.

Variável		Tratamento neoadjuvante			
		Não		sim	
		N	%	n	%
Sexo	feminino	100	53,5	11	45,8
	masculino	87	46,5	13	54,2
Idade (Bethesda)	≤ 50	26	13,9	4	16,7
	> 50	161	86,1	20	83,3
Classificação histológica	adenocarcinoma tubular	160	86,0	21	87,5
	adenocarcinoma mucinoso	21	11,3	3	12,5
	carcinoma de células em anel de sinete	5	2,7	-	-
Graduação	pouco diferenciado	11	6,0	1	4,3
	bem/moderadamente diferenciado	173	94,0	22	95,7
Estadiamento T	T1/T2	15	8,8	3	15,8
	T3	93	54,7	10	52,6
	T4	62	36,5	6	31,6
Estadiamento N	N0	53	31,5	9	47,4
	N1/N2	115	68,5	10	52,6
Topografia	ceco	12	6,7	-	-
	cólon ascendente/ângulo hepático	24	13,3	-	-
	cólon transverso	11	6,1	-	-
	ângulo esplênico/cólon descendente	16	8,9	-	-
	sigmóide/junção reto-sigmóide	104	57,8	2	8,3
	reto alto	11	6,1	-	-
	reto médio e baixo	-	-	17	70,8
	reto sem especificação	2	1,1	5	20,8
Metástase ao diagnóstico	Não	134	81,2	22	91,7
	Sim	31	18,8	2	8,3
Metástase após diagnóstico	Não	110	67,1	18	78,3
	Sim	54	32,9	5	21,7

Legenda: n: número amostral.

4.2. Sobrevida global

A maior parte dos pacientes, 66,5%, não foi a óbito; tenham sido submetidos a tratamento neoadjuvante (58,3%) ou não (67,6%) (Tabela 6). A sobrevida global foi calculada tendo como base o tempo de seguimento (*follow-up*) dos pacientes em anos, sendo, para os casos que não foram a óbito, a partir da data do diagnóstico até o registro da última consulta, e, para os casos de óbito, até a data deste em anos (Tabela 7).

A sobrevida global, considerando o período aqui avaliado, foi maior entre os pacientes que receberam tratamento neoadjuvante, $3,83 \pm 2,00$ anos, quando comparada aos que não receberam, $3,24 \pm 2,48$ anos. Os óbitos não relacionados ao CCR foram 49 (28,3%) no grupo não submetido e 7 (30,4%) no grupo submetido ao tratamento neoadjuvante (Tabela 8).

Tabela 6. Óbitos entre os pacientes com CCR analisados.

Variável	Tratamento neoadjuvante			
	Não		Sim	
	N	%	N	%
Não-óbito	119	67,6	14	58,3
Óbito	57	32,4	10	41,7

Legenda: n: número amostral.

Tabela 7. Tempo de seguimento (em anos) dos pacientes com CCR analisados.

Variável	Tratamento neoadjuvante									
	Não					Sim				
	n	média $\pm$ s	mediana	mínimo	máximo	n	média $\pm$ s	mediana	mínimo	máximo
Todos	176	$3,24 \pm 2,48$	2,85	0,003	9,38	24	$3,83 \pm 2,00$	4,38	0,011	6,48
Não-óbito	119	$4,01 \pm 2,37$	4,19	0,011	9,38	14	$4,55 \pm 1,62$	4,96	0,85	6,48
Óbito	57	$1,62 \pm 1,87$	1,24	0,003	8,56	10	$2,82 \pm 2,12$	3,01	0,011	5,86

Legenda: n: número amostral.

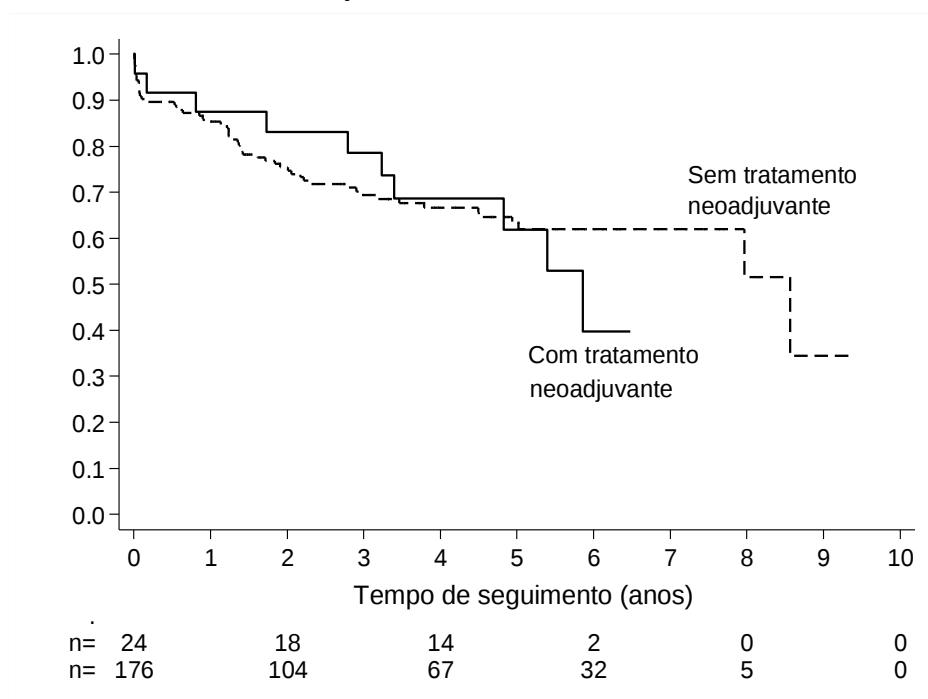
Tabela 8. Número de óbitos relacionados ao CCR observados durante o seguimento.

Óbito relacionado ao CCR	Tratamento neoadjuvante			
	Não		sim	
	n	%	N	%
Sim	124	71,7	16	69,6
Não	49	28,3	7	30,4

Legenda: n: número amostral.

Os tempos de sobrevida para os dois grupos estão representados em curvas de Kaplan-Meier (Figura 7). Foram considerados censurados os casos que não morreram, para eles o tempo de seguimento equivale ao período entre o diagnóstico e a última consulta registrada.

Figura 7. Tempo de seguimento (em anos) para os casos de CCR submetidos e não submetidos a tratamento neoadjuvante.



Legenda: n: número amostral (no grupo sem tratamento neoadjuvante: n= 176; e no grupo com tratamento neoadjuvante: n= 24).

4.3. Expressão proteica

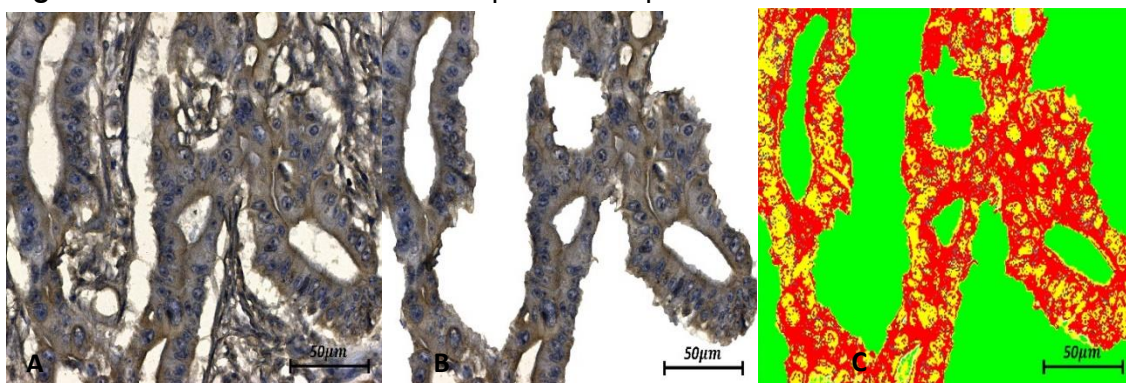
4.3.1. Expressão de parkina, APC, BCL2L1 e CD36

A análise morfométrica foi empregada para o estudo da expressão das proteínas parkina (Figura 8), APC (Figura 9), BCL2L1 (Figura 10) e CD36 (Figura 11). As quatro proteínas apresentam padrão de expressão citoplasmática, e para todas foi possível observar expressão tecidual nas amostras de CCR estudadas. A seguir, são apresentadas algumas das imagens capturadas em objetiva de 20X das amostras tumorais após ensaio imunoistoquímico com os anticorpos específicos (Figuras 8a, 9a, 10a e 11a), do resultado do processo de otimização das imagens (Figuras 8b, 9b, 10b e 11b), o qual permite uma análise específica das regiões tumorais de interesse, e do resultado da aplicação da máscara de morfometria (Figuras 8c, 9c, 10c e 11c).

A partir da análise morfométrica foram calculados os valores correspondentes à expressão das proteínas parkina, APC, BCL2L1 e CD36 nas regiões tumorais *bulk* e *front* (Tabela 9). A expressão das proteínas no *bulk* e *front* foram comparadas nos tumores que apresentavam as duas regiões, ou seja, completos (Tabela 10). O número amostral variou entre as proteínas e regiões tumorais analisadas devido a perdas de material durante as etapas de confecção das lâminas e imunoistoquímica.

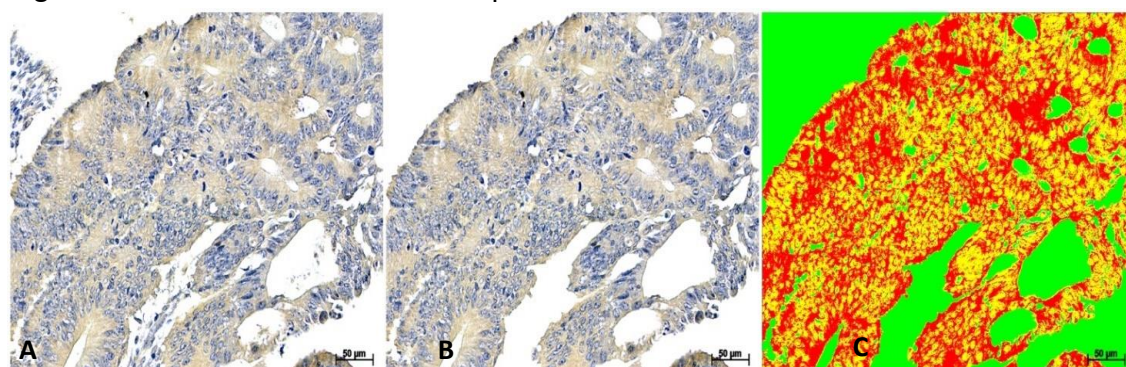
No grupo sem neoadjuvância, a expressão de parkina ($p < 0,001$), BCL2L1 ($p < 0,001$) e CD36 ($p < 0,001$) foi maior nas amostras de *front* invasivo, e de APC ($p < 0,001$) no *bulk* tumoral. Nas amostras dos pacientes submetidos ao tratamento neoadjuvante, apenas BCL2L1 ($p = 0,003$) e CD36 ($p = 0,003$) apresentaram maior expressão no *front* invasivo. Não houve diferença estatística na expressão de parkina e APC nas das regiões tumorais.

Figura 8. Análise morfométrica da expressão de parkina em amostra CCR.



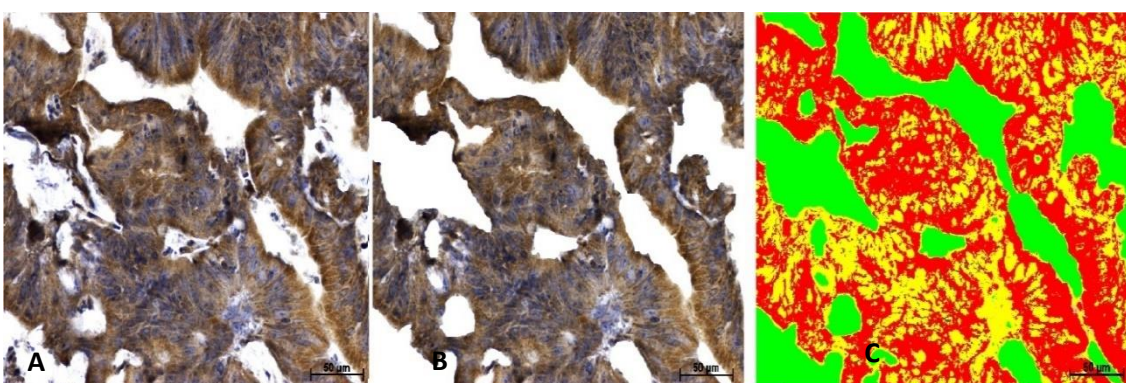
Legenda: a. Imagem microscópica em objetiva de 20X de uma amostra corada com o anticorpo anti-Parkin em lâmina. b. Imagem otimizada com o auxílio do software Adobe Photoshop CS6 v 13.0®. c. Imagem após aplicação da máscara morfométrica, onde vermelho representa as áreas imunopositivas, amarelo as áreas imunonegativas e verde as áreas brancas.

Figura 9. Análise morfométrica da expressão de APC em amostra de CCR.



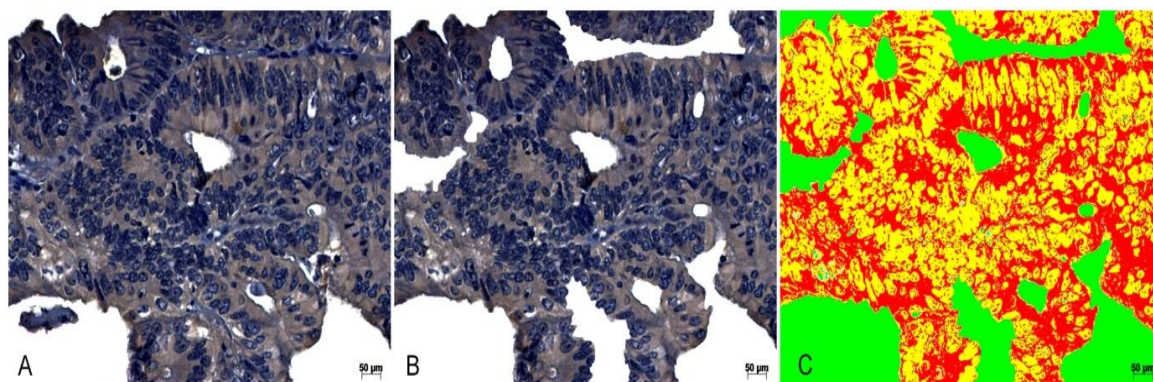
Legenda: a. Imagem microscópica em objetiva de 20X de uma amostra corada com o anticorpo anti-APC em lâmina. b. Imagem otimizada com o auxílio do software Adobe Photoshop CS6 v 13.0®. c. Imagem após aplicação da máscara morfométrica, onde vermelho representa as áreas imunopositivas, amarelo as áreas imunonegativas e verde as áreas brancas.

Figura 10. Análise morfométrica da expressão de BCL2L1 em amostra de CCR.



Legenda: a. Imagem microscópica em objetiva de 20X de uma amostra corada com o anticorpo anti-BCL2L1 em lâmina. b. Imagem otimizada com o auxílio do software Adobe Photoshop CS6 v 13.0®. c. Imagem após aplicação da máscara morfométrica, onde vermelho representa as áreas imunopositivas, amarelo as áreas imunonegativas e verde as áreas brancas.

Figura 11. Análise morfométrica da expressão de CD36 em amostra de CCR.



Legenda: a. Imagem microscópica em objetiva de 20X de uma amostra corada com o anticorpo anti-CD36 em lâmina. b. Imagem otimizada com o auxílio do software Adobe Photoshop CS6 v 13.0®. c. Imagem após aplicação da máscara morfométrica, onde vermelho representa as áreas imunopositivas, amarelo as áreas imunonegativas e verde as áreas brancas.

Tabela 9. Expressão das proteínas parkina, APC, BCL2L1 e CD36 avaliadas por morfometria nas amostras de CCR estudadas.

Tratamento neoadjuvante	Proteína	Região	n	média ± s	mínimo	máximo
não	parkina	<i>bulk</i>	135	12,6 ± 10,0	0,3	49,8
		<i>front</i>	131	16,7 ± 12,7	0,3	62,2
		completa	106	14,4 ± 8,8	1,8	45,3
	APC	<i>bulk</i>	135	29,3 ± 18,1	0,9	77,9
		<i>front</i>	146	21,1 ± 19,8	0,0	69,7
		completa	115	24,3 ± 14,9	1,7	70,3
	BCL2L1	<i>bulk</i>	175	9,4 ± 13,5	0,0	64,1
		<i>front</i>	159	48,3 ± 20,0	1,5	81,9
		completa	152	29,3 ± 11,6	1,1	62,0
	CD36	<i>bulk</i>	168	9,5 ± 10,3	0,1	47,4
		<i>front</i>	153	26,0 ± 14,9	2,8	77,7
		completa	142	17,4 ± 10,0	1,5	46,4
sim	parkina	<i>bulk</i>	9	11,8 ± 12,2	2,7	42,8
		<i>front</i>	9	24,0 ± 12,6	7,5	47,2
		completa	5	16,4 ± 10,5	7,9	33,3
	APC	<i>bulk</i>	14	29,3 ± 18,9	7,0	64,6
		<i>front</i>	15	23,9 ± 18,2	0,2	54,1
		completa	9	23,4 ± 9,8	13,7	42,9
	BCL2L1	<i>bulk</i>	19	14,9 ± 20,2	0,2	61,1
		<i>front</i>	15	49,4 ± 18,3	5,0	68,3
		completa	13	31,4 ± 16,0	2,6	62,7
	CD36	<i>bulk</i>	16	9,3 ± 8,1	0,6	24,9
		<i>front</i>	15	30,9 ± 15,1	10,9	56,0
		completa	10	17,7 ± 8,4	7,8	32,0

Legenda: n: número de amostras; *bulk*: região central do tumor; *front*, área tumoral limítrofe (invasiva); completa: área total do tumor, incluindo *bulk* e *front* (calculada apenas quando estas duas regiões estavam presentes no tumor).

Tabela 10. Comparação da expressão, nas regiões *bulk* e *front*, das proteínas parkina, APC, BCL2L1 e CD36 avaliadas por morfometria nas amostras de CCR estudadas.

Tratamento neoadjuvante	Proteína	Região	n	média ± s	Mínimo	máximo	P
não	parkina	<i>Bulk</i>	107	12,3 ± 10,0	0,3	49,8	<0,001
		<i>Front</i>	107	16,7 ± 12,3	0,3	56,6	
	APC	<i>Bulk</i>	115	28,6 ± 17,9	0,9	77,9	<0,001
		<i>Front</i>	115	19,9 ± 19,4	0,0	67,8	
	BCL2L1	<i>Bulk</i>	151	9,6 ± 13,4	0,0	57,5	<0,001
		<i>Front</i>	151	48,6 ± 20,1	1,5	81,9	
	CD36	<i>Bulk</i>	142	8,8 ± 9,8	0,1	47,4	<0,001
		<i>Front</i>	142	26,0 ± 14,9	2,8	77,7	
sim	parkina	<i>Bulk</i>	5	14,9 ± 15,9	2,7	42,8	0,893
		<i>Front</i>	5	17,9 ± 9,4	7,5	28,9	
	APC	<i>Bulk</i>	9	24,1 ± 15,1	7,0	56,8	0,767
		<i>Front</i>	9	22,6 ± 16,0	0,2	54,1	
	BCL2L1	<i>Bulk</i>	13	15,3 ± 19,7	0,2	57,6	0,003
		<i>Front</i>	13	47,6 ± 18,8	5,0	68,3	
	CD36	<i>Bulk</i>	11	10,6 ± 8,6	0,6	24,9	0,003
		<i>Front</i>	11	27,4 ± 13,9	10,9	56,0	

Legenda: n: número de amostras, *bulk*: região central do tumor; *front*, área tumoral limítrofe (invasiva); valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística para o teste não-paramétrico de Wilcoxon.

4.3.2. Expressão de parkina, APEX e p53

Escores de *Allred* foram adaptados e calculados correspondentes à expressão das proteínas parkina, APEX1 e p53 nas regiões tumorais *bulk* e *front* (Tabela 11). Ao contrário da parkina, que, como mencionado anteriormente, apresenta expressão citoplasmática, as proteínas APEX1 e p53 são proteínas nucleares. Deste modo, a expressão destas foi observada e analisada apenas na região nuclear das células tumorais.

Apenas para parkina são apresentadas as frações, distribuição e intensidade, do Escore de *Allred*, além do total, que corresponde à soma dos dois anteriores. A expressão das proteínas no *bulk* e *front* foram comparadas para os casos completos

que apresentavam as duas regiões (Tabela 12). O número amostral variou entre as proteínas e regiões tumorais analisadas devido a perdas de material durante as etapas de confecção das lâminas e imunoistoquímica.

No grupo sem neoadjuvância, a expressão de parkina (distribuição, $p < 0,004$; total, $p < 0,014$) e APEX1 (total, $p < 0,006$) foram maiores nas amostras de *front* invasivo, enquanto p53 apresentou expressão semelhante do *bulk* e *front*. No grupo com neoadjuvância, não foram observadas diferenças na expressão das proteínas nas duas regiões tumorais avaliadas.

Tabela 11. Expressão das proteínas parkina, APEX1 e p53 avaliadas por Escore de *Allred* nas amostras de CCR estudadas.

Tratamento neoadjuvante	Proteína	Escore de <i>Allred</i>	Região	n	média	mínimo	máximo
não	parkina	distribuição	<i>bulk</i>	143	2,8	0	5
		intensidade	<i>bulk</i>	133	1,6	1	3
		Total	<i>bulk</i>	143	4,3	0	8
		distribuição	<i>front</i>	142	3,3	0	5
		intensidade	<i>front</i>	140	1,6	1	5
		Total	<i>front</i>	142	4,8	0	8
	APEX1	Total	<i>bulk</i>	139	4,7	2	8
		Total	<i>front</i>	142	5,2	2	8
	p53	Total	<i>bulk</i>	177	6,6	0	8
		Total	<i>front</i>	164	6,7	0	8
sim	parkina	distribuição	<i>bulk</i>	13	3,5	1	5
		intensidade	<i>bulk</i>	13	1,8	1	3
		Total	<i>bulk</i>	13	5,2	2	8
		distribuição	<i>front</i>	11	3,5	1	5
		intensidade	<i>front</i>	11	1,9	1	4
		Total	<i>front</i>	11	5,4	2	7
	APEX1	Total	<i>bulk</i>	12	5,8	3	8
		Total	<i>front</i>	15	6,1	3	8
	p53	Total	<i>bulk</i>	20	7,2	5	8
		Total	<i>front</i>	17	7,2	6	8

Legenda: n: número amostral; *bulk*: região central do tumor; *front*, área tumoral limítrofe (invasiva).

Tabela 12. Comparação da expressão, nas regiões *bulk* e *front*, das proteínas parkina, APEX1 e p53 avaliadas por Escore de *Allred* nas amostras de CCR estudadas.

Tratamento neoadjuvante	Proteína	Escore de <i>Allred</i>	Região	n	Média	mínimo	máximo	<i>p</i>
não	Parkina	distribuição	<i>bulk</i>	123	2,7	0	5	0,004
		distribuição	<i>front</i>	123	3,3	0	5	
		intensidade	<i>bulk</i>	115	1,6	1	3	0,763
		intensidade	<i>front</i>	115	1,5	1	3	
		Total	<i>bulk</i>	123	4,2	0	8	0,014
		Total	<i>front</i>	123	4,8	0	8	
	APEX1	Total	<i>bulk</i>	113	4,7	2	8	0,006
		Total	<i>front</i>	113	5,2	2	8	
	p53	Total	<i>bulk</i>	158	6,6	0	8	0,760
		Total	<i>front</i>	158	6,7	0	8	
sim	Parkina	distribuição	<i>bulk</i>	7	3,3	1	5	0,465
		distribuição	<i>front</i>	7	3,6	1	5	
		intensidade	<i>bulk</i>	7	1,6	1	2	0,715
		intensidade	<i>front</i>	7	1,9	1	4	
		Total	<i>bulk</i>	7	4,9	2	7	0,686
		Total	<i>front</i>	7	5,4	2	7	
	APEX1	Total	<i>bulk</i>	10	5,5	3	7	0,610
		Total	<i>front</i>	10	6,1	3	8	
	p53	Total	<i>bulk</i>	15	7,1	5	8	0,575
		Total	<i>front</i>	15	7,3	6	8	

Legenda: n: número amostral; *bulk*: região central do tumor; *front*, área tumoral limítrofe (invasiva); valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística para o teste não-paramétrico de Wilcoxon.

4.3.3. Expressão MSH2 e MSH6

A expressão das proteínas nucleares MSH2 e MSH6 nas lâminas de imunoistoquímica foi classificada como positiva (coloração castanha) ou negativa (coloração azul). Na tabela abaixo (Tabela 13), estão apresentados os dados obtidos para a expressão das duas proteínas, para os dois grupos estudados.

Tabela 13. Expressão das proteínas MSH2 e MSH6 nas amostras de CCR estudadas.

Tratamento neoadjuvante	Proteínas	Classificação	N	%
Não	MSH2	Negativo	41	23,2
		Positivo	136	76,8
	MSH6	Negativo	28	15,7
		Positivo	150	84,3
sim	MSH2	Negativo	1	5,0
		Positivo	19	95,0
	MS H6	Negativo	2	10,0
		Positivo	18	90,0

Legenda: n: número amostral.

4.4. Correlação de expressão entre as proteínas estudadas

Para avaliar se as proteínas estudadas variam em sua expressão, seja no *bulk* ou no *front*, de acordo com a expressão de cada uma das outras proteínas avaliadas, os resultados de expressão obtidos, por morfometria e Escore de *Allred*, foram comparados 2 a 2 e coeficientes de Spearman foram calculados (Tabela 14, apenas os resultados com $p < 0,05$ são mostrados).

As correlações encontradas nas amostras dos pacientes não submetidos ao tratamento neoadjuvante foram todas fracas.

Por outro lado, nas amostras dos pacientes que foram submetidos à neoadjuvância, foi possível observar, no *bulk* tumoral, boa correlação positiva entre CD36 e parkina (distribuição: $p = 0,015$; $r = 0,71$; total: $p = 0,037$; $r = 0,63$) e APEX1 e parkina (distribuição: $p = 0,023$; $r = 0,67$; intensidade: $p = 0,033$; $r = 0,64$; total: $p = 0,012$; $r = 0,73$). No *front*, APC e parkina (distribuição: $p = 0,004$; $r = 0,85$) apresentaram correlação positiva forte, enquanto CD36 e parkina (distribuição: $p = 0,021$; $r = 0,71$) e APEX1 e p53 ($p = 0,002$; $r = 0,76$) exibiram correlações mais moderada.

Quando considerados os casos completos (dados não apresentados), ou seja, a média de expressão proteica de cada caso que apresentou análise para *bulk*

e *front*, observou-se boa correlação negativa entre as proteínas BCL2L1 e CD36 ($p = 0,016$; $r = -0,77$).

Tabela 14. Correlação entre a expressão das proteínas parkina, APC, APEX1, BCL2L1, CD36 e p53 nas regiões *bulk* e *front* das amostras de CCR estudadas.

Tratamento neoadjuvante	Comparação		n	r	p
sim	CD36 <i>bulk</i>	x parkina distribuição <i>bulk</i>	11	0,71	0,015
	CD36 <i>bulk</i>	x parkina total <i>bulk</i>	11	0,63	0,037
	APEX1 total <i>bulk</i>	x parkina distribuição <i>bulk</i>	11	0,67	0,023
	APEX1 total <i>bulk</i>	x parkina intensidade <i>bulk</i>	11	0,64	0,033
	APEX1 total <i>bulk</i>	x parkina total <i>bulk</i>	11	0,73	0,012
	APC <i>front</i>	x parkina distribuição <i>front</i>	9	0,85	0,004
	CD36 <i>front</i>	x parkina distribuição <i>front</i>	10	0,71	0,021
	APEX1 total <i>front</i>	x p53 total <i>front</i>	14	0,76	0,002

Legenda: n: número amostral; *bulk*: região central do tumor; *front*, área tumoral limítrofe (invasiva); r: coeficiente de correlação de Spearman; valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística; apenas os resultados com $p \leq 0,05$ são mostrados.

4.5. Associação entre a expressão das proteínas estudadas e fatores clínico-patológicos dos pacientes não submetidos ao tratamento neoadjuvante

A associação entre as proteínas estudadas e as variáveis clínico-patológicas foi investigada para avaliar se a expressão destas proteínas varia de acordo com as características do paciente e da biologia do tumor (Tabelas 14, 15 e 16, apenas os resultados com $p \leq 0,05$ são mostrados).

4.5.1. Fatores clínico-patológicos categóricos

Considerando a expressão das proteínas no *bulk* tumoral, foi encontrada associação entre parkina e idade (Bethesda) (distribuição: $p = 0,020$; total: $p = 0,008$):

a parkina está mais expressa em pacientes com mais de 50 anos; parkina e estadiamento T (distribuição: $p = 0,011$; intensidade: $p = 0,024$; total: $p = 0,005$): a parkina está mais expressa e de forma mais intensa em T1/T2; APEX1 e tipo histológico ($p = 0,001$): a APEX1 está mais expressa em adenocarcinoma mucinoso; e BCL2L1 e o estadiamento T ($p = 0,015$): a BCL2L1 está mais expressa em T1/T2 (Tabela 15, apenas os resultados com $p \leq 0,05$ são mostrados).

Em relação à expressão no *front*, foi observada associação entre a expressão de APC e o tipo histológico ($p = 0,009$): a APC está mais expressa em adenocarcinoma tubular; e APEX1 e as variáveis tipo histológico ($p = 0,008$) e graduação ($p = 0,032$): a APEX1 está mais expressa em adenocarcinomas mucinosos e pouco diferenciados (Tabela 15, apenas os resultados com $p \leq 0,05$ são mostrados).

Para os casos completos, que apresentavam amostras nas duas regiões tumorais, foi calculada, para cada caso, a média de expressão proteica. Com base nestes dados (não mostrados), foi encontrada associação entre a expressão de parkina e as variáveis idade (Bethesda) ($p = 0,030$): parkina é mais expressa em pacientes com mais de 50 anos; e sexo ($p = 0,045$), com maior expressão da parkina em pacientes do sexo feminino.

Não foram encontradas associações significativas entre as proteínas estudadas e estadiamento N ou metástase. Ainda, em particular, as proteínas MSH2 e MSH6 não apresentaram associação relevante com tipo histológico, graduação, sexo, idade, estadiamento T, estadiamento N ou metástase. A variável topografia não apresentaram número amostral suficiente para comparação com estas proteínas.

Tabela 15. Associação da expressão das proteínas estudadas e fatores clínico-patológicos categóricos, considerando as amostras de CCR dos casos sem tratamento neoadjuvante.

Variável		*Proteína	n	média	p
Tipo histológico	adenocarcinoma tubular	APC <i>front</i>	122	23,3	0,009
	adenocarcinoma mucinoso		19	11,2	
	adenocarcinoma tubular	APEX1 total <i>bulk</i>	120	4,5	0,001
	adenocarcinoma mucinoso		14	6,1	
Graduação	adenocarcinoma tubular	APEX1 total <i>front</i>	121	5,1	0,008
	adenocarcinoma mucinoso		17	6,2	
	pouco diferenciado	APEX1 total <i>front</i>	8	6,5	0,032
	bem/moderadamente diferenciado		132	5,1	
Idade (Bethesda)	≤50	parkina distribuição <i>bulk</i>	19	2,0	0,020
	>50		124	2,9	
	≤50	parkina escore <i>bulk</i>	19	3,1	0,008
	>50		124	4,4	
Estadiamento T	T1/T2	BCL2L1 <i>bulk</i>	15	17,2	0,015
	T3		89	6,7	
	T4		54	9,3	
	T1/T2	parkina distribuição <i>bulk</i>	15	3,9	0,011
	T3		74	2,6	
	T4		37	2,7	
	T1/T2	parkina intensidade <i>bulk</i>	15	2,0	0,024
	T3		69	1,6	
	T4		34	1,5	
	T1/T2	parkina total <i>bulk</i>	15	5,9	0,005
	T3		74	4,1	
	T4		37	4,1	
Topografia	ceco	p53 total <i>front</i>	9	6,1	0,050
	cólon ascendente/ângulo hepático		21	6,1	
	cólon transverso		10	6,6	
	ângulo esplênico/cólon descendente		16	6,1	
	sigmóide/junção reto-sigmóide		92	7,1	
	reto alto		10	6,2	

Legenda: *nome da proteína analisada, tipo de análise: morfométrica (quando há omissão de especificação) e Escore de *Allred* (distribuição, intensidade e total), região analisada (*bulk*, região central do tumor, ou *front*, área tumoral limítrofe); n: número amostral; o tipo histológico carcinoma em células de anel de sinete não foi analisado devido ao número reduzido de casos com esta classificação; valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística; apenas os resultados com $p \leq 0,05$ são mostrados.

4.5.2. Fatores clínico-patológicos quantitativos

Coeficientes de correlação de Spearman foram calculados para avaliar se a expressão das proteínas estudadas varia de acordo com a idade (em anos) e tamanho tumoral (mm). Todas as correlações encontradas foram fracas.

Para avaliar a associação entre as estas mesmas variáveis e a expressão das proteínas MSH2 e MSH6, foi aplicado o teste t de Student. Houve associação entre o tamanho tumoral e as duas proteínas (MSH2: $p = 0,004$; MSH6: $p = <0,001$). A média de tamanho dos tumores foi maior na ausência de expressão destas proteínas (Tabela 16).

Tabela 16. Associação entre a expressão de MSH2 e MSH6 e o tamanho tumoral (mm), considerando as amostras de CCR dos casos sem tratamento neoadjuvante.

Proteína	Classificação	n	Tamanho tumoral			
			Média	mínimo	máximo	p
MSH2	Negativo	41	68,3 ± 27,0	14	150	0,004
	Positivo	133	55,1 ± 27,0	14	165	
MSH6	Negativo	28	72,3 ± 25,2	35	150	<0,001
	Positivo	147	55,4 ± 27,2	10	165	

Legenda: n: número amostral; valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística para o teste estatístico t de Student.

4.6. Análise de fatores associados à sobrevida nos pacientes não submetidos ao tratamento neoadjuvante

A fim de investigar a influência das proteínas parkina, APC, APEX1, BCL2L1, CD36 e p53, bem como dos fatores clínico-patológicos, na sobrevida dos pacientes com CCR não submetido ao tratamento neoadjuvante, foi calculado o HR (*hazard ratio*) (Tabela 17; apenas os resultados com $p \leq 0,05$ são mostrados). Houve associação entre a sobrevida destes pacientes e o estadiamento T, a metástase ao diagnóstico e a metástase durante o seguimento. Contudo, não foi observada

quaisquer associações entre a sobrevida dos pacientes e a expressão das proteínas estudadas.

Para a variável estadiamento T4, o valor estimado de HR foi de 10,6 com intervalo de confiança de 95% dado por: 1,42 a 78,8, indicando que o diagnóstico em estádios T4 confere aos pacientes risco HR de óbito aumentado em 10,6%. Em relação a variável metástase ao diagnóstico, o valor estimado de HR foi de 3,00 com intervalo de confiança de 95% dado por: 1,64 a 5,49, indicando, por sua vez, que a presença de metástase ao diagnóstico confere aos pacientes risco HR de óbito aumentado em 3%. Quanto a variável metástase, o valor estimado de HR foi de 4,06 com intervalo de confiança de 95% dado por: 2,3 a 7,16, o que indica, por sua vez, que a presença de metástase ao longo do tempo seguimento confere aos pacientes risco HR de óbito aumentado em 4,06%.

Tabela 17. Associação entre sobrevida e as variáveis clínico-patológicas para os casos sem tratamento neoadjuvante.

variável	classificação	N	HR	taxa de óbito	p	IC 95%	
						limite inferior	limite superior
Estadiamento T	T1/T2	14		1 (7,1)			
	T3	90	4,92	24 (26,7)	0,119	0,66	36,5
	T4	59	10,6	27 (45,8)	0,021	1,42	78,8
Metástase ao diagnóstico	não	134		36 (26,9)			
	sim	30	3,00	16 (53,3)	<0,001	1,64	5,49
Metástase	não	110		23 (20,9)			
	sim	53	4,06	30 (56,6)	<0,001	2,3	7,16

Legenda: HR: *hazard ratio*; valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística; IC: intervalo de confiança; apenas os resultados com $p \leq 0,05$ são mostrados.

4.7. Associação entre a expressão das proteínas estudadas e fatores clínico-patológicos dos pacientes submetidos ao tratamento neoadjuvante

Não foi possível investigar a associação entre as proteínas estudadas, incluindo MSH2 e MSH6, para a maioria das variáveis clínico-patológicas categóricas, pelo número amostral insuficiente.

Entretanto, foram testadas as variáveis sexo e topografia para parkina, APC, APEX1, BCL2L1, CD36 e p53 e os resultados não foram significativos. Para as proteínas MSH2 e MSH6 foram testadas as variáveis tipo histológico, idade (Bethesda), estadiamento N, topografia e metástase ao diagnóstico, também não houve associação significativa.

Considerando as variáveis quantitativas, foi observada correlação moderada negativa entre o tamanho tumoral (mm) e a expressão no *bulk* de BCL2L1 ($p = 0,029$; $r = -0,50$) e de APEX1 ($p = 0,043$; $r = -0,59$) (Tabela 18, apenas os resultados com $p \leq 0,05$ são mostrados).

Não foi notada correlação entre a variável idade (em anos) e quaisquer das proteínas analisadas.

As proteínas MSH2 MSH6 não apresentaram número amostral suficiente para a análise com as variáveis quantitativas.

Tabela 18. Correlação entre as proteínas estudadas e o tamanho tumoral (mm), considerando as amostras de CCR dos casos com tratamento neoadjuvante.

Comparações	n	R	p
tamanho tumor x *BCL2L1 <i>bulk</i>	19	-0,50	0,029
tamanho tumor x APEX1 total <i>bulk</i>	12	-0,59	0,043

*nome da proteína analisada, tipo de análise: morfométrica (quando há omissão de especificação) e Escore de *Allred* (distribuição, intensidade e total), região analisada (*bulk*, região central do tumor, ou *front*, área tumoral limítrofe); n: número amostral; r: coeficiente de correlação de Spearman; valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística; apenas os resultados com $p \leq 0,05$ são mostrados.

4.8. Análise de fatores associados à sobrevida no grupo submetido ao tratamento neoadjuvante

A fim de investigar a influência das proteínas parkina, APC, APEX1, BCL2L1, CD36 e p53, bem como dos fatores clínico-patológicos sobre a sobrevida global dos pacientes que compõem o grupo com tratamento neoadjuvante, foi calculado o HR (*hazard ratio*). No entanto, nenhuma das variáveis categóricas apresentou número amostral suficiente para a aplicação de teste estatístico. Quanto às variáveis quantitativas, estas não apresentaram resultados com significância estatística. Porém, quando avaliada a expressão das proteínas estudadas, foi encontrada correlação entre a expressão de APC em amostras de *front* e a sobrevida global ($p = 0,036$), indicando que a expressão desta proteína nesta região poderia ser um fator protetor em pacientes que foram submetidos previamente a tratamento neoadjuvante (Tabela 19).

Tabela 19. Associação entre sobrevida e a expressão de APC no *front* invasivo nos casos com tratamento neoadjuvante.

Variável	HR	mediana (mínimo -máximo)		P	IC 95%	
		Não óbito	Óbito		limite inferior	limite superior
APC <i>front</i>	0,94	33,7 (16,9 - 49,8)	15,3 (0,2 - 54,1)	0,036	0,89	0,99

Legenda: HR: *hazard ratio*; *front*: região de *front* invasivo; IC: intervalo de confiança; valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística.

4.9. Comparação entre os grupos sem e com tratamento neoadjuvante em relação a expressão das proteínas

Para avaliar se houve associação entre a realização do tratamento neoadjuvante e a expressão das proteínas parkina, APC, APEX1, BCL2L1, CD36, p53, MSH2 e MSH6, foi aplicado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Houve associação entre a neoadjuvância a expressão de APEX1 no *bulk* tumoral ($p = 0,025$)

e uma tendência no *front* ($p = 0,053$), sendo que os pacientes que foram submetidos à neoadjuvância apresentaram níveis mais elevados de APEX1 (Tabela 20). Quanto as demais proteínas, estas não apresentaram associações significativas.

Tabela 20. Avaliação da associação entre o tratamento neoadjuvante e a expressão da proteína APEX1.

	Neoadjuvância	n	média ± s	mínimo	máximo	<i>p</i>
APEX1 total <i>bulk</i>	Não	139	4,7 ± 1,7	2,0	8,0	0,025
	Sim	12	5,8 ± 1,4	3,0	8,0	
APEX1 total <i>front</i>	Não	142	5,2 ± 1,7	2,0	8,0	0,053
	Sim	15	6,1 ± 1,8	3,0	8,0	

Legenda: n: número amostral; HR: *hazard ratio*; *front*: região de *front* invasivo; IC: intervalo de confiança; valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística.

5. DISCUSSÃO

5.1. APEX1

Quando analisados os dois grupos individualmente, a proteína APEX1 apresentou maior expressão no *front* de amostras de pacientes sem tratamento neoadjuvante ($p = 0,006$), enquanto não houve diferença em sua expressão nas amostras de pacientes com tratamento neoadjuvante em relação às regiões tumorais. Este achado condiz com a sua função como potencial oncoproteína envolvida na progressão tumoral, uma vez que o *front* compreende a região infiltrativa do câncer, e sugere, desse modo, que a maior expressão de APEX1 nessa região esteja eventualmente contribuindo para a progressão tumoral (DELBRIDGE *et al*, 2015; GONG *et al.*, 2017; HALE *et al*, 2014; NATH *et al*, 2015; SCOTT *et al.*, 2016; SHAH *et al*, 2017; TELL *et al*, 2009; YUAN *et al*, 2017).

Contudo, quando comparados os dois grupos avaliados nesse estudo, a APEX1 foi mais expressa em amostras de pacientes submetidos ao tratamento neoadjuvante. Os resultados indicaram associação entre a expressão de APEX1 no *bulk* tumoral ($p = 0,025$) e a neoadjuvância, além de sugerir o mesmo para a expressão no *front* ($p = 0,053$).

Esta proteína está associada a processos de promoção de crescimento, proliferação, migração, invasão e sobrevivência celulares pela regulação de fatores de transcrição, como STAT3, HIF-1 α , e NF- κ B (SCOTT *et al.*, 2016; SHAH *et al*, 2017; TELL *et al*, 2009). Em carcinoma hepatocelular, foi demonstrado que a maior expressão de APEX1 pode levar a um pior prognóstico, uma vez que a sua expressão aumentada estava associada a menor sobrevida geral e livre de doença, bem como à resistência às terapias com sorafenib e anti-PD-1 (*anti-programmed death 1*) (CAO *et al*, 2020). Em osteossarcoma, a amplificação do gene *APEX1* foi fortemente correlacionada com a recorrência local e/ou metástase (YANG *et al*, 2010).

Levando em consideração que o tratamento neoadjuvante provoca danos à maquinaria celular e ao DNA e que APEX1 é uma endonuclease cuja ação ocorre em resposta a estes danos (SCOTT *et al.*, 2016; SILVA *et al*, 2017; TELL *et al*, 2009; ZITVOGEL *et al*, 2008), é possível sugerir que a expressão mais elevada desta

proteína nestes pacientes esteja ocorrendo em resposta aos danos celulares provocados pelo tratamento, e tendo como consequência a prevenção da morte celular.

Ainda em relação ao grupo com tratamento neoadjuvante, foi observada correlação entre APEX1 e a variável tamanho tumoral. Considerando células tumorais, APEX1 vem sendo descrita por apresentar expressão elevada em uma variedade de tumores, tais como: câncer de próstata, câncer pancreático, câncer de ovário, carcinoma de células grandes de pulmão e tumores malignos da bainha dos nervos periféricos (SHAH *et al*, 2017). Além disso, como mencionado anteriormente, ela atua na regulação de determinados fatores de transcrição responsáveis por promoverem a transcrição de genes envolvidos no desenvolvimento tumoral (SCOTT *et al.*, 2016; SHAH *et al*, 2017; TELL *et al*, 2009). Nossos achados demonstram o oposto, uma vez que uma correlação negativa foi observada entre as duas variáveis em amostras de pacientes com tratamento neoadjuvante ($p = 0,043$; $r = -0,059$), e sugerindo, desse modo, um potencial efeito do tratamento sobre a expressão dessa proteína.

Em um estudo realizado por Scott e colaboradores em 2016, foi descrita em amostras teciduais de glioblastoma a correlação inversa entre a expressão de APEX1 e parkina, apresentando a APEX1 níveis de expressão mais elevados na ausência de parkina (SCOTT *et al*, 2016). Neste mesmo estudo, os pesquisadores demonstraram que a atividade de parkina e PINK1 em situação de estresse mitocondrial e oxidativo, levou a um decréscimo significativo na expressão de APEX1, uma vez que esta proteína é alvo de poli-ubiquitinação por parkina (SCOTT *et al*, 2016). Por outro lado, a deleção de 41 aminoácidos residuais na região N-terminal de APEX1 teve como consequência a sua não degradação, e indicando, desse modo, que a ação da parkina na poli-ubiquitinação de APEX1 ocorre diretamente na região N-terminal desta proteína (SCOTT *et al*, 2016).

Contudo, no presente estudo a APEX1 apresentou correlação positiva forte com a distribuição, intensidade e escore de parkina no *bulk* tumoral de amostras de pacientes com tratamento neoadjuvante (distribuição: $p = 0,023$; $r = 0,67$; intensidade: $p = 0,033$; $r = 0,64$; escore: $p = 0,012$; $r = 0,73$). Assim, é possível sugerir nesta população que a expressão de parkina apresente variações em resposta a expressão de APEX1 a fim de promover a sua degradação. A APEX1, por sua vez, pode se

encontrar eventualmente acumulada e na forma mutante, de modo a impedir a sua poli-ubiquitinação e, conseqüentemente, a sua degradação.

Considerando o grupo sem tratamento neoadjuvante, foi encontrada associação entre a variável subtipo histológico e a expressão de APEX1. Quanto a APEX1, esta apresentou maiores níveis de expressão em amostras do subtipo adenocarcinoma mucinoso nas duas profundidades avaliadas (*bulk*: $p = 0,001$; *front*: $p = 0,008$).

Menos frequente que o subtipo convencional ou tubular, o adenocarcinoma mucinoso se caracteriza por apresentar mais de 50% do seu volume tumoral composto por mucina extracelular, bem como graduação pouco diferenciada e pior prognóstico em casos de estabilidade de microssatélites (MSS), quando comparado aos subtipos não-mucinosos (FLEMING *et al*, 2012). Tal prognóstico pode ser explicado com base em estudos que demonstram a associação do subtipo adenocarcinoma mucinoso e a ocorrência de metástases e risco de óbito. Hugén e colaboradores em 2014, observaram em seu estudo diferenças no padrão metastático dos subtipos adenocarcinoma tubular, adenocarcinoma mucinoso e adenocarcinoma de células em anel de sinete, sendo que estes últimos apresentaram de forma mais frequente metástases para múltiplos sítios, quando comparados com a sua contraparte convencional (HUGEN *et al*, 2014). Ainda, em um estudo de revisão sistemática e meta-análise publicado em 2012 por Verhulst e colaboradores, foi observado que pacientes com MSS que apresentaram CCR de subtipo adenocarcinoma mucinoso mostraram um aumento de 2 a 8% no risco de óbito (VERHULST *et al*, 2011).

Desse modo, uma vez que a amplificação da expressão proteica de APEX1 vem sendo proposta como associada com piores desfechos em uma variedade de neoplasias (YANG *et al*, 2010), a maior expressão desta em amostras deste subtipo de pior prognóstico condiz com o que vem sendo observado para esta proteína em outros estudos. Reforçando esta hipótese, em amostras de frente invasiva dos casos sem tratamento neoadjuvante, foi encontrada associação da proteína APEX1 e a graduação, estando esta proteína mais expressa em amostras pouco diferenciadas e, portanto, de pior prognóstico ($p = 0,032$).

5.2. Parkina

Proposta como uma proteína supressora tumoral, a parkina vem sendo investigada quanto a essa função em uma variedade de estudos e tipos de câncer. Wahabi *et al*, por exemplo, propuseram em carcinoma de mama o gene *PRKN* como um potencial biomarcador prognóstico, uma vez que sua inativação por metilação esteve correlacionada a um pior prognóstico nestes casos (WAHABI *et al*, 2019). Ainda, em um estudo realizado com carcinoma de pulmão de células pequenas, foi observado em modelos *in vitro* e *in vivo* que o aumento da expressão do gene *PRKN* teve como consequência a redução no crescimento, migração, invasão celular e metástase, bem como promoveu a apoptose pela inibição da via de sinalização EGFR/AKT (*AKT serine/threonine kinase 1*) /MTOR (*mechanistic target of rapamycin kinase*) (DUAN *et al*, 2019). Entretanto, em um outro estudo, foi demonstrado *in vitro* e *in vivo* efeitos positivos resultantes do nocaute de *PRKN* em amostras de carcinoma de pulmão, como, por exemplo, a diminuição da proliferação e migração celular (PARK *et al*, 2019). Nesta pesquisa, o nocaute de *PRKN* levava, principalmente, à redução do desenvolvimento tumoral pelo bloqueio da degradação da proteína p21, diretamente envolvida no processo de interrupção do ciclo celular (PARK *et al*, 2019).

No presente estudo, a proteína parkina teve sua expressão aumentada em amostras do *front* por morfometria ($p = <0,001$) e escore de *Allred* (distribuição: $p = 0,004$; escore total: $p = 0,014$) no grupo sem tratamento neoadjuvante, sugerindo, desse modo, um papel para esta proteína no processo de progressão tumoral, mesmo que esse papel não esteja elucidado e nossos dados não permitam concluir sobre essa questão.

Contudo, quando analisamos o papel da parkina em amostras de *bulk* tumoral, onde ela se encontra menos expressa, no grupo que não foi submetido previamente a neoadjuvância, foi possível observar uma maior expressão dessa proteína por escore de *Allred* em amostras de estadiamento T1/T2, ou seja, em casos iniciais e menos agressivos da doença (distribuição: $p = 0,011$; intensidade: $p = 0,024$; escore total: $p = 0,005$). Desse modo, é possível sugerir que a expressão de parkina é mais elevada em etapas mais precoces na carcinogênese colorretal e que a diminuição na sua expressão, por sua vez, é uma ocorrência de etapas mais avançadas. Em resumo,

a diminuição na expressão de parkina pode eventualmente contribuir para a progressão tumoral.

Estendendo essas análises para as outras variáveis clínico-patológicas e neste mesmo grupo, foi observada associação com a idade (Bethesda), estando a parkina por escore de *Allred* mais expressa em pacientes com mais de 50 anos (distribuição: $p = 0,020$; escore total: $p = 0,008$). Corroborando com este dado, foi observada correlação positiva fraca entre a sua distribuição e escore total no *bulk* e a idade ao diagnóstico (distribuição: $p = 0,022$; $r = 0,19$; escore: $p = 0,046$; $r = 0,17$). Este achado condiz com um estudo anterior publicado por da Silva-Camargo e colaboradores, em que foi observada uma associação entre a idade e a sobrevida de pacientes com adenocarcinoma colorretal, e tendo como ponto de corte a parkina (da SILVA-CAMARGO *et al*, 2018). Neste estudo, pacientes que apresentavam mais de 45 anos ao diagnóstico, apresentaram também níveis de parkina tecidual mais elevados e uma maior sobrevida geral (da SILVA-CAMARGO *et al*, 2018).

5.3. CD36

Estudos realizados com a finalidade de investigar o papel da CD36 em diversos tipos de câncer em humanos, vêm propondo esta proteína como uma importante indicadora de metástase, estando ela envolvida na transição epitélio-mesenquimal em carcinoma hepatocelular, e no remodelamento vascular de camundongos com câncer de mama, bem como correlacionada a um pior prognóstico em pacientes com glioblastoma (HALE *et al*, 2014; NATH *et al*, 2015; YUAN *et al*, 2017). Em CCR, foi observado em um estudo recente que o aumento da expressão de CD36 está associada com a progressão desta neoplasia, bem como a sua inibição leva a diminuição da proliferação e sobrevivência de células primárias de CCR (DRURY *et al*, 2018).

Corroborando com tais achados, pudemos observar que CD36 apresentou, de fato, maior expressão no *front*, quando comparado com o *bulk* tumoral, nos dois grupos avaliados (sem neoadjuvância: $p = <0,001$; com neoadjuvância: $p = 0,003$). É interessante mencionar, ainda, uma correlação positiva, embora fraca, entre a CD36 e o tamanho tumoral em amostras de frente invasiva, onde ela se encontra mais

expressa, em pacientes sem tratamento neoadjuvante ($p = 0,000$; $r = 0,29$). Tais achados sugerem um possível envolvimento dessa proteína na progressão deste câncer, estando ela mais expressa na região invasiva e, portanto, envolvida na infiltração tumoral.

Ainda, no grupo com tratamento neoadjuvante, podemos observar correlação positiva forte entre distribuição e escore de parkina e CD36 nas duas profundidades tumorais (distribuição *bulk*: $p = 0,015$; $r = 0,71$; distribuição frente: $p = 0,021$; $r = 0,71$; escore *bulk*: $p = 0,037$; $r = 0,63$). É possível explicar este achado ao observar outros modelos experimentais. Em camundongos submetidos a dietas com altos teores de gordura e colesterol, Kim e colaboradores observaram que aqueles camundongos que expressavam parkina selvagem apresentaram um aumento nos seus níveis hepáticos, bem como um aumento na expressão de proteínas transportadoras de lipídios, entre elas a CD36, quando comparados àqueles que expressavam parkina -/-. Ainda, neste mesmo estudo, a reconstituição da expressão de parkina em camundongos parkina -/- levou não apenas ao aumento da sua expressão, mas também à restauração da captação de ácidos graxos e aumento da expressão de CD36 (KIM *et al*, 2011). E tal interação entre as duas proteínas ocorre pela mono-ubiquitinação de CD36 pela parkina, o que leva a estabilização nos seus níveis proteicos (KIM *et al*, 2011).

5.4. APC

Considerando o fato de que a proteína APC é uma das primeiras a estarem mutadas no processo de carcinogênese do CCR, ela é proposta como tendo papel crucial na homeostase do epitélio colônico (MORIN, 2019). Isso se deve a sua ação como potencial supressora tumoral, estando envolvida na regulação negativa da via de sinalização WNT/ β -catenina, uma via de sinalização conhecida por ter um importante papel no processo de tumorigênese pela transcrição de oncogenes (AGHABOZORGI *et al*, 2019; MORIN, 2019).

No presente estudo, o perfil de expressão da APC foi como esperado, no grupo sem tratamento neoadjuvante, estando esta proteína mais expressa em amostras de *bulk* tumoral e indicando uma diminuição na sua expressão no desenvolvimento tumoral ($p = <0,001$).

A histopatologia apresentada pelos tumores colorretais vem sendo proposta como um importante fator prognóstico, e podendo, inclusive, influenciar na ocorrência de diferentes desfechos (FLEMING *et al*, 2012; VERHULST *et al*, 2011). O subtipo histológico adenocarcinoma tubular, ou adenocarcinoma convencional, se caracteriza por apresentar produção anormal de glândulas que acometem a camada submucosa e, posteriormente, podem atingir camadas intestinais mais profundas e tecidos circundantes (ONCOLEX, 2015). Em sua maior parte (~80%), apresenta graduação bem ou moderadamente diferenciada, e estes casos apresentam, no geral, melhor prognóstico e desfecho quando comparados aos demais, que apresentam graduação pouco diferenciada (~20%) (ONCOLOEX, 2015). E, como mencionado anteriormente, este subtipo apresenta no geral melhores prognósticos e desfechos quando comparado a sua contraparte mucinosa (FLEMING *et al*, 2012; HUGEN *et al*, 2014; VERHULST *et al*, 2011).

No presente estudo, a proteína supressora tumoral APC demonstrou estar mais expressa em amostras de subtipo histológico adenocarcinoma tubular, ou adenocarcinoma convencional, do *bulk* tumoral, região também em que a APC se encontra mais expressa, no grupo sem tratamento neoadjuvante ($p = 0,009$). Assim, nossos achados sugerem que a maior expressão da proteína APC está associada a um melhor prognóstico em pacientes com CCR. Isso pode ser explicado com base em sua função como reguladora negativa da via de sinalização Wnt/ β -catenina, pela ação de APC na degradação da proteína β -catenina. Tal ação impede a continuidade dessa via de sinalização que, quando não interrompida, leva a transcrição de vários oncogenes (AGHABOZORGI *et al*, 2019; MORIN, 2019).

Estudos recentes vêm demonstrando uma importante relação entre os genes *PRKN* e *APC*. Poulogiannis *et al* em 2010 propuseram que a perda de heterozigose em *PRKN* correlacionada com mutação em *APC* contribui para uma aceleração no desenvolvimento de adenoma intestinal (POULOGIANNIS *et al*, 2010). Ainda, foi observado neste estudo que quando o *APC* se encontrava suprimido e o *PRKN* sobre-expresso, houve uma inibição da proliferação celular. Deste modo, os pesquisadores propuseram que os dois genes estariam envolvidos na via da carcinogênese colorretal, que tem como ponto inicial a supressão do gene *APC*, e que este poderia levar a haploinsuficiência do gene *PRKN* (POULOGIANNIS *et al*, 2010). Nossos achados de um estudo anterior realizado também com CCR, indicaram que os dois

genes estariam correlacionados, sendo observada uma correlação positiva entre a expressão das proteínas APC e parkina, e que esta expressão ocorre de modo concomitante em células de mucosa neoplásica de adenocarcinoma colorretal (da SILVA-CAMARGO *et al*, 2018).

Estando de acordo com o que vem sendo proposto em literatura para as duas proteínas, nossos achados demonstram correlação positiva forte entre APC e distribuição de parkina em amostras de frente invasiva dos casos com tratamento neoadjuvante ($p = 0,004$; $r = 0,85$). Tais resultados sugerem que as duas proteínas estejam envolvidas em uma mesma via de sinalização na carcinogênese colorretal.

Ainda, neste mesmo grupo, a APC no *front* apresentou correlação com a sobrevida global destes pacientes. Pacientes que expressaram maiores níveis de APC apresentaram também uma maior sobrevida ($p = 0,036$; $HR = 0,94$), e sugerindo, desse modo, um efeito protetor da proteína APC em pacientes com CCR submetidos a tratamento prévio ao procedimento cirúrgico. É possível propor que esse tratamento tenha selecionado clones com maior expressão de APC, mas isto, por si só, não explica o envolvimento com a sobrevida. Anteriormente, nossos achados sugeriram uma correlação positiva entre a expressão de APC e parkina, e como já mencionado, uma correlação positiva entre estas mesmas proteínas foi descrita previamente em amostras de adenocarcinoma colorretal em um estudo conduzido por da Silva-Camargo e colaboradores.

E embora não tenha sido observada qualquer associação entre a expressão de parkina e a sobrevida destes pacientes, esta hipótese não pode ser descartada, uma vez que o número amostral nesse grupo foi limitado, bem como as características apresentadas por este podem, eventualmente, ter influenciado nos resultados.

A terapia neoadjuvante, por sua vez, não demonstrou ser, no presente estudo, um fator determinante na sobrevida dos pacientes. Contudo, e como mencionado anteriormente, os benefícios de sua utilização são mais abrangentes, tendo efeito sobre a qualidade de vida dos indivíduos, uma vez que proporciona o aumento das taxas de ressecabilidade e de preservação esfinteriana (MAGRI *et al*, 2016; PINHO, 2007). E isso é notado no presente estudo, uma vez que dos 24 pacientes submetidos ao tratamento neoadjuvante, apenas um recorreu a amputação anorretal.

5.5. BCL2L1

Envolvida no processo de inibição da apoptose, a proteína BCL2L1 vem sendo investigada e o aumento de sua expressão associada a uma variedade de tumores, tais como o câncer de pulmão, câncer de mama, tumores de células grandes dos ossos e linfomas (BEROUKHIM *et al*, 2010; DELBRIDGE *et al*, 2015; GONG *et al*, 2017; KARCZMAREK-BOROWSKA *et al*, 2006; KELLY *et al*, 2012; SMITH *et al*, 2006; TONON *et al*, 2005). Em CCR, a expressão desta proteína vem sendo associada ao ganho de função do cromossomo 20q e, conseqüentemente, a alterações na biologia desta neoplasia (SILLARS-HARDEBOL *et al*, 2011). Ainda para esta neoplasia, a sua inibição *in vitro* em linhagens celulares silenciadas para SOX9, leva, conseqüentemente, ao aumento das taxas de apoptose (LIZÁRRAGA-VERDUGO *et al*, 2020).

De acordo com o que vem sendo proposto para a BCL2L1, esta apresentou, nos dois grupos avaliados, maior expressão no *front*, quando comparado com o *bulk* tumoral, e indicando, desse modo, o aumento de sua expressão na área infiltrativa do tumor (sem neoadjuvância: $p = <0,001$; com neoadjuvância: $p = 0,003$).

Quando observado o *bulk* tumoral, no grupo sem tratamento neoadjuvante foi encontrada associação entre a proteína BCL2L1 e o estadiamento T, estando ela mais expressa em amostras de estádios T1/T2 ($p = 0,015$). Isto sugere um papel da BCL2L1 em fases mais precoces da carcinogênese colorretal.

Por outro lado, quando observamos a região de *bulk* tumoral do grupo com tratamento neoadjuvante, foi observada correlação negativa entre a expressão de BCL2L1 e o tamanho tumoral ($p = 0,029$; $r = -0,50$), e sugerindo que a expressão desta proteína é inversamente proporcional ao tamanho tumoral. Este achado sugere, deste modo, um papel ou ação diferente do que vem sendo proposto para a BCL2L1, no *bulk* tumoral, bem como um possível envolvimento de outras proteínas correlacionadas à BCL2L1 nessa profundidade de invasão. Contudo, nossos dados não nos permitem elucidar este fato.

5.6. p53

Quando avaliada a proteína p53 no presente estudo, foi possível observar que a expressão desta foi semelhante no *bulk* tumoral e na frente invasiva dos pacientes que compuseram os dois grupos avaliados.

A proteína p53 é descrita como um fator de transcrição responsável por promover, em situações de estresse celular, a expressão de genes envolvidos nos processos de interrupção do ciclo celular e promoção da apoptose e senescência. Em CCR, a perda cromossômica em 18q e, conseqüentemente, a perda de função de p53, é bem descrita como um dos mecanismos envolvidos na progressão adenoma-adenocarcinoma (LIU *et al*, 2015; LIU *et al*, 2014; ZHANG *et al*, 2011).

E estando de acordo com o que vem sendo descrito e observado para esta proteína, foi possível observar para a p53 associação com a topografia em amostras de frente invasiva do grupo sem tratamento neoadjuvante, estando esta proteína expressa em níveis mais elevados em amostras de adenocarcinoma colorretal primário localizados na região do sigmóide/junção reto sigmóide ($p = 0,050$). Estudos prévios já demonstraram que, em casos mais avançados que apresentam metástase, e cujos tumores primários se localizam no lado esquerdo (sigmóide e junção reto-sigmóide estão inclusos nesse grupo) apresentavam melhores prognósticos quando comparados a tumores primários do lado direito (HOLCH *et al*, 2017; LOUPAKIS *et al*, 2015). Isso ocorre, uma vez que tais pacientes apresentavam taxas superiores de sobrevida geral e sobrevida livre de progressão, bem como melhores desfechos (HOLCH *et al*, 2017; LOUPAKIS *et al*, 2015). Desse modo, é possível sugerir que a maior expressão de p53 em pacientes não submetidos a neoadjuvância, está associada a um fator de melhor prognóstico.

E quando consideramos o grupo com tratamento neoadjuvante, a supressora tumoral p53 apresentou correlação positiva com a oncoproteína APEX1 no *front* ($p = 0,002$; $r = 0,76$). E considerando as funções antagônicas das duas proteínas, isso pode ser explicado com base em duas hipóteses:

(1) Estudos prévios vêm demonstrando a ocorrência de mutações e conseqüente acúmulo de p53 em CCR, levando inclusive a piores prognósticos e desfechos (LI *et al*, 2015, MULLER & VOUSDEN, 2014; WILLIAMS *et al*, 2019). Neste caso a ocorrência de mutações do tipo *missense* no que é considerado um *hot spot*

para tais, e sendo ainda esta região um domínio de ligação, leva a proteína p53 mutante a apresentar ganho de função, algo característico de oncogenes e oncoproteínas (LI *et al*, 2015, MULLER & VOUSDEN, 2014; WILLIAMS *et al*, 2019). Williams *et al*, demonstraram que pacientes com CCR submetidos a tratamento adjuvante que expressavam p53 (p53+) apresentavam uma menor sobrevida livre de doença quando comparados com aqueles que não expressavam essa mesma proteína (p53-). E quando considerados os pacientes que foram submetidos apenas a ressecção cirúrgica, não houve diferença entre aqueles que expressavam p53+ e p53-, sugerindo, portanto, um benefício desta última abordagem para os indivíduos que apresentam sobre-expressão de p53 (WILLIAMS *et al*, 2019).

(2) Uma vez que a neoadjuvância acarreta danos ao DNA e à maquinaria celular (KRYSKO *et al*, 2012; ZITVOGEL *et al*, 2008), é possível sugerir que a endonuclease APEX1 tem os seus níveis elevados, e vice-versa, de acordo com a necessidade de reparo ao DNA. Enquanto a p53, por sua vez, tem os seus níveis elevados, e vice-versa, como resposta ao estresse celular provocado por tais danos resultantes do tratamento. Contudo, em se tratando de um fator de transcrição, a proteína p53 promove nessas situações a transcrição de genes envolvidos nos processos de interrupção do ciclo celular, apoptose e senescência (LIU *et al*, 2015; LIU *et al*, 2014; ZHANG *et al*, 2011). Assim, ambas as proteínas estariam apresentando níveis de expressão concomitantes em resposta a um mesmo estímulo, porém, com desfechos antagônicos. Ainda, deve-se levar em consideração que o anticorpo utilizado neste estudo é capaz de detectar a proteína p53 tanto em sua forma selvagem, quanto em sua forma mutante. Assim, eventuais mutações poderiam acarretar em sua maior expressão e consequente acúmulo, bem como em um funcionamento não adequado.

5.7. MSH2 e MSH6

Descritas por formarem entre si heterodímeros, as proteínas MSH2 e MSH6 apresentam como função, juntamente com as proteínas MLH1 e PMS2, o reparo por excisão de bases de DNA de sequências mal pareadas. Mutações em seus genes podem levar a perda de sua expressão, bem como a formação de proteínas truncadas

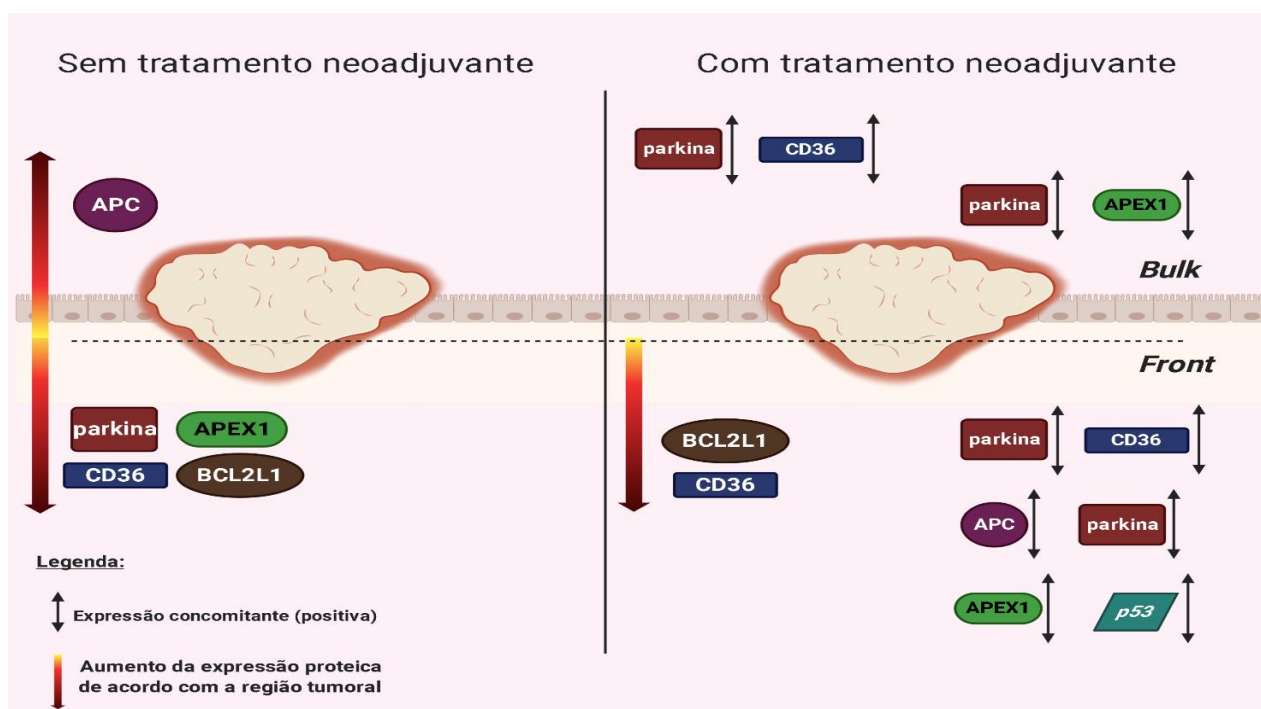
e não funcionais, e estando diretamente envolvidas no desenvolvimento tumoral, principalmente de casos hereditários (BOLAND & GOEL, 2010; CORTES-CIRIANO *et al*, 2017; FEARON e VOGELSTEIN; TAKAYAMA *et al*, 2006, YUAN *et al*, 2015). Corroborando com o proposto em literatura para as duas proteínas, no grupo sem tratamento neoadjuvante prévio, nossos achados demonstraram associação entre elas e a variável tamanho tumoral, sendo que tumores com maiores médias de tamanho foram aqueles que apresentaram MSH2 e MSH6 negativas (MSH2: $p = 0,004$; MSH6: $p = <0,001$), e sugerindo, desse modo, que a perda na expressão destas proteínas leva à contribuição para a proliferação e progressão tumoral.

5.8. Sobrevida global no grupo sem tratamento neoadjuvante

Quando analisamos os pacientes que não foram submetidos ao tratamento neoadjuvante prévio, observamos associação entre a sobrevida e fatores de pior prognóstico. Neste grupo, pacientes que apresentaram estádios T4, ou seja, em fase em que já há o comprometimento da serosa (ASCO, 2018), apresentaram HR de 10,6, com um limite mínimo de 1,42 e limite máximo de 78,8 ($p = 0,021$). A ocorrência de metástase ao diagnóstico e/ou metástase durante o tempo de seguimento, também demonstrou ser um importante parâmetro que influencia na sobrevida dos pacientes deste grupo. Quando o diagnóstico era realizado já em presença de metástase, independentemente da localização, ou seja, quando o tumor primário colônico ou retal se instalou em outro sítios ou órgãos (ASCO, 2018), o HR foi de 3, com um limite mínimo de 1,64 e limite máximo de 5,49 ($p = <0,001$). Nos casos em que a metástase foi identificada já ao diagnóstico ou no decorrer do tempo de seguimento, estes pacientes por consequência também tiveram seu risco de óbito aumentado, com um HR de 4,06, limite mínimo de 2,3 e limite máximo de 7,16 ($p = <0,001$).

Na figura abaixo (Figura 12), estão resumidos, para os dois grupos estudados, os achados para as associações entre as proteínas analisadas e as regiões tumorais avaliadas, bem como as correlações observadas entre estas mesmas proteínas.

Figura 12. Expressão e correlação das proteínas estudadas no *bulk* e *front* dos grupos sem e com tratamento neoadjuvante



Fonte: O autor, 2020 (criado com BioRender.com)

6. CONCLUSÕES

Os grupos que compuseram a população deste estudo apresentaram, em sua maioria, características semelhantes entre si. Além disso, foi possível observar individualmente para cada grupo, que os pacientes apresentaram entre si considerável heterogeneidade.

Foi possível concluir também que as proteínas parkina, APEX1, BCL2L1 e CD36 se encontram mais expressas em amostras de *front*, enquanto a proteína APC em amostras de *bulk* tumoral, e a proteína p53 não apresentou diferença na sua expressão nas regiões tumorais. Ainda, é possível concluir que há correlação entre as proteínas que compõe o estudo, de modo a sugerir uma participação destas em uma mesma via de sinalização.

Podemos concluir que a expressão de APEX1 e CD36 está associada a determinados indicadores de pior prognóstico em ambos os grupos estudados, enquanto as proteínas APC, p53, MSH2 e MSH6 estão relacionadas a fatores de melhor prognóstico. Além disso, a expressão de parkina é mais elevada em pacientes com mais de 50 anos.

Quanto à sobrevida, é possível propor que a maior expressão da proteína APC em pacientes submetidos a tratamento prévio a cirurgia se configura um fator protetor nestes, levando a um menor risco de óbito e, portanto, maior sobrevida geral.

7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Como fatores limitantes do presente estudo é possível citar:

- A amostragem foi limitada a uma região do sul do país;
- A perda de material nas fases de confecção de lâminas e testes imunoistoquímicos;
- Análise de prontuário, uma vez que não houve uniformidade nos padrões de classificação e nomenclatura das informações pelos diferentes serviços e seguimentos que forneceram as amostras, demandando a conferência dessas informações em outras plataformas;
- A pandemia do COVID-19 e o protocolo de isolamento social, que limitou o acesso as instalações da instituição e, portanto, dificultaram algumas das etapas de análise, como os testes imunoistoquímicos e leitura das lâminas dos marcadores MLH1 e PMS2, e checagem de prontuários no município de Ponta Grossa.

8. REFERÊNCIAS

- AGHABOZORGI, A. S.; BAHREYNI, A.; SOLEIMANI, A.; BAHRAMI, A.; KHAZAEI, M.; FERNS, G. A.; AVAN, A.; HASSANIAN, S. M. Role of adenomatous polyposis coli (APC) gene mutations in the pathogenesis of colorectal cancer; current status and perspectives. **Biochimie**, v. 157, p. 64-71, fevereiro de 2019.
- AGIRRE, X., ROMÁN-GÓMEZ, J.; VÁZQUEZ, I.; JIMÉNEZ-VELASCO, A.; GARATE, L.; MONTIEL-DUARTE, C.; ARTIEDA, P.; CORDEU, L. *et al.* Abnormal methylation of the common PARK2 and PACRG promoter is associated with downregulation of gene expression in acute lymphoblastic leukemia and chronic myeloid leukemia. **Cancer Genetics**, novembro de 2005.
- ALVAREZ-CHAUVER, P.; OTERO-ESTÉVEZ, O.; PÁEZ DE LA CADENA, M.; RODRÍGUEZ-BERROCAL, F. J. & MARTÍNEZ-ZORZANO, V. S. Proteomics for discovery of candidate colorectal cancer biomarkers. **World J Gastroenterol**, local de publicação, v. 20, n. 14, p. 3804-3824, 2014.
- American Cancer Society - Colorectal Cancer Risk Factors – 2019 - <
<https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>> - Acesso em 29 de junho de 2020.
- American Cancer Society - Colorectal Cancer Signs and Symptoms – 2018 - <
<https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/signs-and-symptoms.html>> - Acesso em 29 de junho de 2020.
- American Cancer Society - Colorectal Cancer Screening Tests – 2018 - <
<https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/screening-tests-used.html>> - Acesso em 30 de junho de 2020
- American Cancer Society - Colorectal Cancer Stages – 2018 - <
<https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>>. Acesso em: 25 de junho de 2020.
- American Cancer Society - Genetic Testing, Screening, and Prevention for People with a Strong Family History of Colorectal Cancer – 2018 -
<https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/causes-risks-prevention/genetic-tests-screening-prevention.html#references>. Acesso em 01 de julho de 2020.

- AMIN, M.B., EDGE, S., GREENE, F., BYRD, D.R., BROOKLAND, R.K., WASHINGTON, M.K., GERSHENWALD, J.E., COMPTON, C.C., HESS, K.R., SULLIVAN, D.C., JESSUP, J.M., BRIERLEY, J.D., GASPAR, L.E., SCHILSKY, R.L., BALCH, C.M., WINCHESTER, D.P., ASARE, E.A., MADERA, M., GRESS, D.M., MEYER, L.R. **AJCC Cancer Staging Manual**. 8^a ed. Suiça: Springer, 2018.
- American Society of Clinical Oncology - Colorectal Cancer: Stages – 2019 - <https://www.cancer.net/cancer-types/colorectal-cancer/stages>. Acesso em 12 de junho de 2020.
- ANGELL, H. K.; BRUNI, D.; BARRETT, J. C.; HERBST, R.; GALON, J. The Immunoscore: Colon Cancer and Beyond. **American Association for Cancer**, 2019.
- ANGELL, H.; GALON, J. From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. **Current Opinion in Immunology**, v.25, p 25:261–267, 2013.
- ANITEI, M.G.; ZEITOUN, G.; MLECNIK, B.; MARLIOT, F.; HAICHEUR, N.; TODOSI, A. M. *et al.* Prognostic and Predictive Values of the Immunoscore in Patients with Rectal Cancer. **Clin Cancer Res**; v. 20, n.7, abr 2014.
- BARTLEY, A; N.; HAMILTON, S. R.; ALSABEH, R.; AMBINDER, E. P.; BERNAN, M.; COLLINS, E.; FITZGIBBONS, P. L.; GRESS, D. M.; NOWAK, J. A.; SAMOWITZ, W. S.; ZAFAR, Y. Template for Reporting Results of Biomarker Testing of Specimens From Patients With Carcinoma of the Colon and Rectum. Versão: Colon and Rectum. **College of American Pathologists (CAP)**, dez. 2014.
- BEROUKHIM, R.; MERMEL, C. H.; PORTER, D.; WEI, G.; RAYCHAUDHURI, S.; DONOVAN, J.; BARRETINA, J.; BOEHM, J. S.; DOBSON, J. URASHIMA, M. HENRY, K. T. M. *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. **Nature**, v. 463, fev 2010.
- BHAT, Z. I.; KUMAR, B.; BANSAL, S.; NASEEM, A.; TIWARI, R.R.; WAHABI, K.; SHARMA, G. D.; RIZVI, A. Association of PARK2 promoter polymorphisms and methylation with colorectal cancer in North Indian population. **Gene**, v. 682, n. 15, p. 25-32, janeiro de 2019.
- BOLAND, P. M. & MA, W. W. Immunotherapy for Colorectal Cancer. **Cancers**, v. 9, n. 50, 2017.

- BOLAND, C. R. & GOEL, A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2073-2087, maio de 2010.
- BOSMAN, F.; CARNEIRO, F.; HRUBAN, R. H. & THEISE, N. D. **WHO classification of tumours of the digestive system**. 4ªed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2010.
- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R.L.; TORRE, R.A. & JEMAL, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **Ca Cancer J Clin.**, p. 1-31, 2018.
- CAO, L.; CHENG, H.; JIANG, Q.; LI, H.; WU, Z. APEX1 is a novel diagnostic and prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma. **Aging**, v. 12, n. 15, março 2020.
- CHO, S. Y.; HAN, J. W.; NA, D.; KANG, W.; LEE, A.; KIM, J.; LEE, J.; MIN, S.; KANG, J.; CHAE, J.; KIM, J.; PARK, H.; LEE, W. S.; LEE, C. A Novel Combination Treatment Targeting BCL-XL and MCL1 for KRAS/BRAF-mutated and BCL2L1-amplified Colorectal Cancers. **Mol Cancer Ther**; v. 16, n.10, p. 2178–90, 2017.
- CLARK, D. P. & PAZDERNIK, N. J. Cancer, **Biotechnology**, 2ª ed., 2016.
- KAKAR, S.; SHI, C.; BERHO, M. E.; DRIMAN, D. K.; FITZGIBBONS, P.; FRANKEL, W. L.; HILL, K. A.; JESSUP, J.; KRASINSKAS, A. M.; WASHINGTON, M. K. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and Rectum. Versão: Colon and Rectum. **College of American Pathologists (CAP)**. 2017.
- CORTES-CIRIANO, I.; LEE, S.; PARK, W. Y.; KIM, T. M.; PARK, P. J. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. **Nat. Commun.**, v. 8, 2017.
- da COSTA, C.A.; SUNYACH, C. GIAIME, E.; WEST, A.; CORTI, O.; BRICE, A.; SAFE, S.; ABOU-SLEIMAN, P. M.; WOOD, N. W.; TAKAHASHI, H.; GOLDBERG, M. S.; SHEN, J.; CHECLER, F. Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 11, novembro de 2009.
- da SILVA-CAMARGO, C.C.V.; SVOBODA BALDIN, R.K.; COSTACURTA POLLI, N.L.; AGOSTINHO, A.P.; OLANDOSK, M.; DE NORONHA, L & SOTOMAIOR,

- V.S. Parkin protein expression and its impact on survival of patients with advanced colorectal cancer. **Cancer Biol Med.**, v. 15, n. 1, p. 61-69, fev. de 2018.
- DELBRIDGE, A. R. D.; GRABOW, S.; BOUILLET, P.; ADAMS, J. M.; STRASSER, A. Functional antagonism between pro-apoptotic BIM and anti-apoptotic BCL-XL in MYC-induced lymphomagenesis. **Oncogene**, v.34, p. 1872–1876, 2015.
- DOW, L. E.; O'ROURKE, K. P.; SIMON, J.; TSCHAHARGANEH, D. F.; VAN ES, J. H.; CLEVERS, H.; LOWE, S. W. Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer. **Cell**, v. 161, n. 7, P. 1539-1552, junho de 2015.
- DRURY, J. M.; JAFARI, N; EVERS, B.M.; ZAYTSEVA, Y.Y. Abstract 1443: Overexpression of CD36 promotes tumorigenesis in colorectal cancer. **American Association for Cancer Research**, v. 78, p. 1443, 2018.
- DRURY, J.; RYCHAHOU, P. G.; HE, D.; JAFARI, N.; WANG, C.; LEE, E. Y.; WEISS, H. L.; EVERS, B. M.; ZAYTSEVA, Y.Y. Inhibition of Fatty Acid Synthase Upregulates Expression of CD36 to Sustain Proliferation of Colorectal Cancer Cells. **Front. Oncol.**, n. 10, n.118, 2020.
- DUAN, H.; LEI, Z.; XU, F.; PAN, T.; LU, D.; DING, P.; ZHU, C.; PAN, C.; ZHANG, S. PARK2 Suppresses Proliferation and Tumorigenicity in Non-small Cell Lung Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 9, ago 2019.
- FANG, Y.; SHEN, Z. Y.; ZHAN, Y. Z; FENG, X. C.; CHEN, K. L.; LI, Y. S.; DENG, H. J.; PAN, S. M.; WU, D. H.; DING, Y. CD36 inhibits β -catenin/c-myc-mediated glycolysis through ubiquitination of GPC4 to repress colorectal tumorigenesis. **Nature Communications**, v. 10, n. 3981, 2019.
- FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. **Cell**, v. 61, p. 759-767, jun 1990. Federação Brasileira de Instituições Filantrópicas de Apoio à Saúde da Mama. Tratamentos adjuvantes e neoadjuvante – 2016 - <https://www.femama.org.br/2018/br/noticia/tratamentos-adjuvantes-e-neoadjuvante?t=1557975871>. Acesso em 14 de out de 2019.
- FLEMING, M.; RAVULA, S.; TATISHCHEV, S.; WANG, H. L. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. **J Gastrointest Oncol.**, v. 3, v. 3, p. 153–173, set. 2012.
- GARAJOVÁ, I.; DI GIROLAMO, S.; de ROSA, F.; CORBELLI, J.; AGOSTINI, V.; BIASCO, G.; BRANDI, G.. Neoadjuvant Treatment in Rectal Cancer: Actual Status. **Chemotherapy Research and Practice**, set. 2011.

- GIACOMELLI, A.O; YANG, X.; LINTNER, R.E. *ET AL.* Mutational processes shape the landscape of P53 mutations in human cancer. **Nature Genetics**. Set. 2018.
- GREENE, K. L.; LI, L. C.; OKINO, S. T.; CARROLL, P. R. Molecular Basis of Prostate Cancer. **The Molecular Basis of Cancer**, p. 431-440, 2008.
- GONG, YONGXING *ET AL.* Pan-Cancer Analysis Links PRKN to BCL2L1-Dependent Control Apoptosis. **Neoplasia**, v. 19, n. 2, fev. de 2017.
- GUINNEY J, DIENSTMANN R, WANG X, *ET AL.* The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. **Nat Med.**, v. 21, n. 11, p.1350-6, mês 2015.
- HAITES, N. Oncogenes. **Elsevier Science Ltd.**, 2001.
- HALE, J. S. *et al.* Cancer Stem Cell-Specific Scavenger Receptor CD36 Drives Glioblastoma Progression. **Stem Cells**, p. 1746–1758, 2014.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell Press**, v. 100, p. 57-70, 2011.
- HAYES, T. G. Oncology. **Medical Secrets**, 5^a ed., p. 449-485, 2012.
- HOLCH, J. W.; RICARD, I.; STINTZING, S.; MODEST, D. P.; HEINEMANN, V. The relevance of primary tumour location in patients with metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of first-line clinical trials. **European Journal of Cancer**, v. 70, p. 87-98, janeiro de 2017.
- HUGEN, N.; van de VELDE, C. J. H.; de WILT, J. H. W.; NAGTEGAAL, I. D. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. **Annals of Oncology**, v. 25, n. 3, p. 651-657, março de 2014.
- IACOPETTA, B. Are there two sides to colorectal cancer? *Int J Cancer*, n. 101, p.403-408, 2002.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Colorretal. Rio de Janeiro: INCA, 2018.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2018.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Câncer: O que é câncer? Rio de Janeiro: INCA, 2019.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2020.

- JESSUP, J.M.; GOLDBERG, R.M.; ASARE, E.A *ET AL.* Colon and Rectum in Amin MB (editor-in-chief). *AJCC Cancer Staging Manual*, 8th Edition. **Springer Nature**, 2017; Chapter 20: pag 251-74.
- JOERGER, A.C. & FERSHT, A.R. The Tumor Suppressor p53: From Structures to Drug Discovery. **Cold Spring Harb Perspect Bio**, v. 2, 2010.
- JOHNSON, C.M.; WEI, C.; ENSOR, J.E.; *ET AL.* Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. **Cancer Causes Control**, v.24, p. 1207-22, mês 2013.
- JOSHI, H. & PRESS, M. F. Molecular Oncology of Breast Cancer. **The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases**, 5^a ed., p. 282-307, 2018.
- KARCZMAREK-BOROWSKA, B.; FILIP, A.; WOJCIEROWSKI, J.; SMOLEN, A.; KOROBIOWICZ, E.; KORSZEN-PILECKA, I.; ZDUNEK, M. Estimation of prognostic value of Bcl-xL gene expression in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 51, p. 61—69, 2006.
- KELLY, P. N.; GRABOW, S.; DELBRIDGE, A. R. D.; ADAMS, J. M. STRASSER, A. Prophylactic treatment with the BH3 mimetic ABT-737 impedes Myc-driven lymphomagenesis in mice. **Cell Death and Differentiation**, v. 20, p. 57–63, 2013.
- KIM, K.Y.; STEVENS, M.V.; AKTER, M.H.; RUSK, S.E.; HUANG, R.J.; COHEN, A.; NOGUCHI, A.; SPRINGER, D.; BOCHAROV, A.V.; EGGERMAN, T.L.; SUEN, D.F.; YOULE, R.J.; AMAR, M.; REMALEY, A.T.; SACK, M.N. Parkin is a lipid-responsive regulator of fat uptake in mice and mutant human cells. **J Clin Invest**, v. 121, n 9, p. 3701-3712, 2011.
- KIM, M. H.; KIM, H. B.; YOON, S. P.; LIM, S. C.; CHA, M. J.; JEON, Y. J.; PARK, S. G.; CHANG, I. Y.; YOU, H. J. Colon cancer progression is driven by APEX1-mediated upregulation of Jagged. **J Clin Invest.**, v. 123, n. 8, p. 3211-3230, 2013.
- KIM, H. B.; HIM, H. J.; LEE, H. J.; PARK, J, H.; PARK, S. G. Evaluation and Clinical Significance of Jagged-1-activated Notch Signaling by APEX1 in Colorectal Cancer. **Anticancer Res**, v. 40, n. 4, p. 1897-1904, abril 2020.
- KIN, S. M. & YOULE, R. J. The accumulation of misfolded proteins in the mitochondrial matrix is sensed by PINK1 to induce PARK2/Parkin-mediated mitophagy of polarized mitochondria. **Autophagy**, v. 9, n. 11, p. 1750-1757, nov 2013.
- KING, T. C. Neoplasia. In **Elsevier's Integrated Pathology**. Cincinnati: Elsevier, p. 111-143, 2007.

- KLIMCZAK, P. F.; VENTURY, D. H.; FAUCZ, F. R.; SETTAS, N.; DE SOUZA, C. M.; SOTOMAIOR, V. S. Association of a PARK2 germline variant and epithelial ovarian cancer in a Southern Brazilian population. **Oncology**, v. 9, n. 2, p. 101–105, 2016.
- KOIDO, S.; OHKUSA, T.; HOMMA, S.; NAMIKI, Y.; TAKAKURA, K.; SAITO, K.; ITO, Z.; KOBAYASHI, H.; KAJIHARA, M.; UCHIYAMA, K.; ARIHIRO, S.; ARAKAWA, H.; OKAMOTO, M.; GONG, J.; TAJIRI, H. Immunotherapy for colorectal cancer. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 46, p. 8531-8542, dez 2013.
- KRASIN, M. J. & DAVIDOFF, A. M. Principles of Pediatric Oncology, Genetics of Cancer, and Radiation Therapy. **Pediatric Surgery**, 7^a ed., p. 397-416, 2012.
- KRYSKO, D.V.; GARG, A.D.; KACZMAREK, A.; KRYSKO, O.; AGOSTINIS, P.; VANDENABEELE, P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 12, p. 860-752012, dez de 2012.
- LA COGNATA, V.; D'AGATA, V.; CAVALCANTI, F.; CAVALLARO, S. Splicing: is there an alternative contribution to Parkinson's disease? **Neurogenetics**, v. 16, n. 4, p. 245–263, out 2015.
- LAM, D. K. & Schmidt, B. L. Molecular Biology of Head and Neck Cancer: Therapeutic Implications. **Current Therapy In Oral and Maxillofacial Surgery**, p. 92-101, 2012.
- LARKIN, J.; ASCIERTO, P. A.; DRÉNO, B.; ATKINSON, V.; LISZKAY, G.; MAIO, M.; MANDALÀ, M.; DEMIDOV, L.; STROYAKOVSKIY, D.; THOMAS, L.; DE LA CRUZ-MERINO, L.; DUTRIAUX, C.; GARBE, C.; SOVAK, M. A.; CHANG, I.; CHOONG, N.; HACK, S. P.; MCARTHUR, G. A.; RIBAS, A. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutated Melanoma. **N Engl J Med**, v. 371, n. 20, 2014.
- LECH, G.; SŁOTWIŃSKI, R.; SŁODKOWSKI, M. & KRASNODEBSKI, I. W. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 5, pag. 1745–1755, fev. 2016.
- LEE, K.C.; CHUNG, K.C.; CHEN, H.H. *et al.* Prognostic factors of overall survival and cancer-specific survival in patients with resected early-stage rectal adenocarcinoma: a SEER-based study. **J Investig Med**, jul de 2017.
- LEGGET, B. & WHITEHALL, V. Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 138, p. 2088 –2100, 2010.

- LEVINE, A.J., HU, W.; FENG, Z. Tumor Suppressor Genes. The Molecular Basis of Cancer, 3^a ed., p. 31-38, 2008.
- LI, X. L.; ZHOU, J.; CHAN, Z. R.; CHNG, W. J. p53 mutations in colorectal cancer-molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. **World J Gastroenterol.**, v. 21, n. 1, p. 84–93, janeiro de 2015.
- LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? **Trends Biochem Sci.**, v. 41, n. 3, p. 211–218, mar 2016.
- LIU, J. ZHANG, C.; HU, W.; FENG, Z. Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. **Cancer Lett.**, 2014.
- LIU, Y.; ZHANG, X.; HAN, C.; WAN, G.; HUANG, X.; IVAN, C.; JIANG, D.; Rodriguez-Aguayo, C.; Lopez-Berestein, G.; RAO, P. H.; MARU, D. M.; PAHL, A.; HE, X.; SOOD, A. K.; ELLIS, L. M.; ANDERL, J.; LU, X. P53 loss creates therapeutic vulnerability in colorectal cancer. **Nature**, 2015.
- LIZÁRRAGA-VERDUGO, E.; RUIZ-GARCÍA, E.; LÓPEZ-CAMARILLO, C.; BERMÚDEZ, M.; AVENDAÑO-FÉLIX, M.; RAMOS-PAYÁN, R.; ROMERO-QUINTANA, G.; AYALA-HAM, A.; VILLEGAS-MERCADO, C.; PÉREZ-PLASENCIA, C.; AGUILAR-MEDINA, M. Cell Survival Is Regulated via SOX9/BCL2L1 Axis in HCT-116 Colorectal Cancer Cell Line. **Research Article**, 2020.
- LOUPAKIS, F.; YANG, D. YAU, L.; FENG, S.; CREMOLINI, C.; ZHANG, W.; MAUS, M. K. H.; ANTONIOTTI, C. *et al.* Primary Tumor Location as a Prognostic Factor in Metastatic Colorectal Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 3, março de 2015.
- LUO, C.; CEN, S.; DING, G.; WU, W. Mucinous colorectal adenocarcinoma: clinical pathology and treatment options. **Cancer Commun**, London, v.39, n.13, 2019.
- LYALL, M. S.; DUNDAS, S. R.; CURRAN, S. & MURRAY, G. I. Profiling markers of prognosis in colorectal cancer. **Clini Cancer Res**, v.12, n.4, p.1184-1191, 2006.
- LYNCH, D., MURPHY, A. The emerging role of immunotherapy in colorectal cancer. **Ann Transl Med**, v. 4, n. 16, ago 2016.
- MAGRI, K. D.; BIN, F. C.; FORMIGA, F. B.; MANZIONE, T. S.; GOMES, C. M. C. N.; CANDEÇÁRI, P. A. P.; ORTIZ, J. A.; KLUG, W. A.; NETO, J. M.; CAPELHUCHNIK, P. Impacto da terapia neoadjuvante na diminuição do estágio

- no adenocarcinoma de reto baixo: papel da ressonância magnética da pelve na determinação do estágio. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 43, n. 2, p. 102-109, 2016.
- MAJEWSKI, I. J.; NUCIFORO, P. MITTEMPERGHER, L.; BOSMA, A. J.; EIDTMANN, H.; HOLMES, E.; SOTIRIOU, C.; FUMAGALLI, D.; JIMENEZ, J.; AURA, C.; PRUDKIN, L.; DÍAZ-DELGADO, M. C.; DE LA PEÑA, L.; LOI, S.; ELLIS, C.; SCHULTZ, N.; DE AZAMBUJA, E.; HARBECK, N. PICCART-GEBHART, M.; BERNARDS, R.; BASELGA, J. PIK3CA Mutations Are Associated With Decreased Benefit to Neoadjuvant Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Targeted Therapies in Breast Cancer. **J Clin Oncol**, v. 33, n. 12, p. 1334–1339, abr. 2015.
- MÁRMOL, I.; SÁNCHEZ-DE-DIEGO, C.; PRADILLA DIESTE, A. *ET AL.* Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. **Int J Mol Sci.**, v. 18, n. 1, mês 2017.
- MCGEECHAN, G.; SWAINSTON, K.; CARTHY, N.; EBERHARDT, J.; BYRNES, K.; PATON, W.; MAGUIRE, R. Experiences of living with colorectal cancer as a chronic illness: A systematic review and qualitative synthesis. **British Psychosocial Oncology Society Conference**, Chester, 2019.
- MORIN, P. J. Colorectal cancer: the APC-lncRNA link. **JCI**, janeiro de 2019.
- MULLER, P. A. J.; VOUSDEN, K. H.; Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. **Cancer Cell**, v. 25, n. 3, p. 304-317, mar 2014.
- MUNRO, A. J.; LAIN, S.; LANE, D. P. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. **British Journal of Cancer**, v. 92, p. 434–444, 2005.
- NATH A. *et al.* Elevated uptake of free fatty acids via CD36 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. **Cancer Research**, v. 75, n. 15, 2015.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) - APEX1 apurinic/apyrimidinic endodeoxyribonuclease 1 [Homo sapiens (human)] – 2020 - <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/328>>. Acesso em 29 de abril de 2020.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) - CD36 CD36 molecule [Homo sapiens (human)] – 2020 -< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/948>>. Acesso em 2 de julho de 2020.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) - PRKN parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase [Homo sapiens (human)] – 2020 - <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5071>>. Acesso em 5 de julho de 2020.

- Oncology Encyclopedia (ONCOLEX) - About cancer in the colon/rectum - Histology of colon and rectum cancer – 2018 - < <http://oncolex.org/Colorectal-cancer/Background/Histology>>. Acesso em 20 de julho de 2020.
- OZER, S. P.; BARUT, S. G.; OZER, B.; CATAL, O.; SIT, M. The relationship between tumor budding and survival in colorectal carcinomas. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 65, n.12, 2020.
- PARK, C. H.; EUN, C. S.; e HAN, C. S. Intestinal microbiota, chronic inflammation, and colorectal cancer. **Intestinal Research**, v. 16, n. 3, p. 338-345, julho de 2018.
- PARK, K. R.; YUN, J. S., PARK, M. H.; JUNG, Y. Y.; YEO, I. J.; NAM, K. T.; KIM, H. D.; SONG, J. K.; CHOI, D. Y.; PARK, P. H.; HAN, S. B.; YUN, H. M., HONG, J. T. Loss of parkin reduces lung tumor development by blocking p21 degradation. **PLOS ONE**, maio 2019.
- PASCUAL, G. *et al.* Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. **Nature**, v. 541, n. 7635, p. 41–45, 2017.
- PINHO, M. Resposta completa à terapia neoadjuvante no câncer de reto: apenas sorte ou um resultado previsível? **Rev bras. colo-proctol.**, v.27, n.4, 2007.
- POULOGIANNIS G, MCINTYRE RE, DIMITRIADI M, *ET AL.* PARK2 deletions occur frequently in sporadic colorectal cancer and accelerate adenoma development in APC mutant mice. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 107, n. 34, p. 15145-50, 2010.
- RAVAL, R. R.; SHARABI, A. B.; WALKER, A. J.; DRAKE, C. G.; SHARMA, P. Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, p. 2-14, dez 2014.
- REX DK, BOLAND CR, DOMINITZ JA, *ET AL.* Colorectal Cancer Screening: Recommendations for Physicians and Patients From the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, v. 153, n. 1, p. 307-323, mês 2017.
- SA, S.; LI, J.; LI, X. *ET AL.* Development and validation of a preoperative prediction model for colorectal cancer T-staging based on MDCT images and clinical information. **Oncotarget**, v. 8, n. 33, p. 55308-55318, mês 2017.
- SARLI, L.; BADER, G.; IUSCO, D.; SALVEMINI, C.; di MAURO, D.; MAZZEO, A.; REGINA, G.; RONCORONI, L. The accumulation of misfolded proteins in the mitochondrial matrix is sensed by PINK1 to induce PARK2/Parkin-mediated

- mitophagy of polarized mitochondria. **European Journal of Cancer**, v., p. 272–27941, 2005.
- SARTORE-BIANCHI, A.; TRUSOLINO, L.; MARTINO, C. *ET AL.* Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. **Lancet Oncol.**, v. 17, p. 738-46, mês 2016.
- SCHERR, A. L.; GDYNIA, G.; SALOU, M.; RADHAKRISHNAN, P.; DUGLOVA, K. *et al.* Bcl-xL is an oncogenic driver in colorectal cancer. **Cell Death and Disease**, v. 7, 2016.
- SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; AZEVEDO e SILVA, G.; MENEZES, A. M.; MONTEIRO, C. A.; BARRETO, S. M.; CHOR, D.; MENEZES, P. R. Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: carga e desafios atuais. **The Lancet**, 2011.
- SCOTT, Timothy L. *et al.* Polyubiquitination of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 by Parkin. **Molecular Carcinogenesis**, 2016.
- SEIRAF, M.; KOZLOV, G.; GEHRING, K. Parkin structure and function. **FEBS Journal**, v. 282, p. 2076–2088, 2015.
- SHAH, F.; LOGSDON, D.; MESSMANN, R.A.; FEHRENBACHER, J. C.; FISHEL, M.L.; KELLEY, M.R. Exploiting the Ref-1-APE1 node in cancer signaling and other diseases: from bench to clinic. **NPJ Precis Oncol**, v. 1, 2017.
- SIDERIS, M. & PAPAGRIGORIADIS, S. Molecular Biomarkers and Classification Models in the Evaluation of the Prognosis of Colorectal Cancer. **ANTICANCER RESEARCH**, v. 34, p. 2061-2068, 2014.
- SILLARS-HARDEBOL, A. H.; CARVALHO, B.; BELIEN, J. A. M.; de WIT, M.; DIEMEN, P. M. D. V.; TIJSEN, M.; de WIEL, M. A. V.; PONTÉN, F.; FIJNEMAN, R. J. A.; MEIJER, J. A. BCL2L1 has a functional role in colorectal cancer and its protein expression is associated with chromosome 20q gain. **J Pathol**, v. 226, p. 442–450, 2012.
- SMITH, L. T.; MAYERSON, J.; NOWAK, N. J.; SUSTER, D.; MOHAMMED, N.; LONG, S.; AUER, H.; JONES, S.; MCKEEGAN, C.; YOUNG, G.; BOS, G.; PLASS, C.; MORRISON, C. 20q11.1 Amplification in Giant-Cell Tumor of Bone: Array CGH, FISH, and Association with Outcome. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 45, p. 57–966, 2006.

- SNOVER, D. C. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. **Human Pathology**, v. 42, p. 1-10, 2011.
- STAMOS, J. L.; WEIS, W. I. The b-Catenin Destruction Complex. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v. 5. 2013.
- STOAKES, S. F. What is Tumor Heterogeneity? **News Medical Life Sciences**, 2019.
- SUN, S.; KLEBANER, F.; TIAN, T. A new model of time scheme for progression of colorectal cancer. **BMC Systems Biology**, p. 8-21, dez 2014.
- TAKAYAMA, T.; MIYANISHI, K.; HAYASHI, T.; SATO, Y.; NIITSU, Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. **J Gastroenterol**, v.41, p. 185–192, 2006.
- TARIQ, K. & GHAS, K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. **Cancer Biol Med.**, v. 13, n. 1, p. 120-135, março de 2016.
- TELL, G.; QUADRIFOGLIO, F.; TIRIBELLI, C.; KELLEY, M. R. The Many Functions of APE1/Ref-1: Not Only a DNA Repair Enzyme. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.11, n. 3, 2009.
- TONON, G.; WONG, K. K.; MAULIK, G.; BRENNAN, C.; FENG, B.; ZHANG, Y.; KHATRY, D. B.; PROTOPOPOV, A.; YOU, M. J.; AGUIRRE, A. J.; MARTIN, E. S.; YANG, Z.; JI, H.; CHIN, L.; DEPINHO, R. A. High-resolution genomic profiles of human lung cancer. **PNAS**, vol. 102, no. 27, p.9625–9630, jul 2005.
- Van der VALK, M. J. M.; HILLING, D. E.; Bastiaannet, E.; Kranenbarg, E. M. K.; BEETS, G. L.; FIGUEIREDO, N. L.; HABRGAMA, A.; PEREZ, R. O.; RENEHAN, A. G.; van de VELDE, C. J. H. Long-term outcomes of clinical complete responders after neoadjuvant treatment for rectal cancer in the International Watch & Wait Database (IWWD): an international multicentre registry study. **The Lancet**, v. 391, n. 10139, p. 2537-2545, jun. 2018.
- VENOOK, A.P.; NIEDZWIECKI, A.; INNOCENTI, F.; FRUTH, B.; GREENE, C.; O'NEIL, B.H.; SHAW, J.E.; ATKINS, J.N.; HORVATH, L.E.; POLITE, B.N.; MEYERHARDT, J.A.; O'REILLY, E.M.; GOLDBERG, R.M.; HOCHSTER, H.S.; BLANKE, C.D.; SCHILSKY, R.L.; MAYER, R.J.; BERTAGNOLLI, M.M. & LENZ, H.J. Impact of primary (1^o) tumor location on overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of CALGB/SWOG 80405 (Alliance). **J Clin Oncol**, v. 34, mês 2016.

- VERHULST, J.; FERDINANDE, L.; DEMETTER, P.; CELEN, W. Mucinous subtype as prognostic factor in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 65, n. 5, 2012.
- WAHABI, K.; PERWEZ, A.; KAMARUDHEEN, S.; BHAT, Z. I.; MEHTA, A.; RIZVI, M. A. Parkin gene mutations are not common, but its epigenetic inactivation is a frequent event and predicts poor survival in advanced breast cancer patients. **BMC Cancer**, v. 19, n. 280, 2019.
- WALDEN, H.; MARTINEZ-TORRES, R. J. Regulation of Parkin E3 ubiquitin ligase activity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, p. 3053-3067, 2012.
- WILLIAMS, D. S.; MOURADOV, D.; BROWNE, C.; PALMIERI, M.; ELLIOTT, M. J.; NIGHTINGALE, R.; FANG, C. G.; LI, R.; MARIADASON, J. M.; FARAGUER, I.; JONES, I. T.; CHURILLOV, L.; TEBBUTT, N. C.; GIBBS, P.; SIEBER, O. M. Overexpression of P53 protein is associated with the lack of adjuvant chemotherapy benefit in patients with stage III colorectal cancer. **Modern Pathology**, 2019.
- WU, D. W.; HUANG, C. C.; CHANG, S. W.; CHEN, T. H.; LEE, H. Bcl-2 stabilization by paxillin confers 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer. **Cell Death & Differentiation**, v. 22, p.779–789, 2015.
- YANG, J.; YANG, D.; COGDELL, D.; DU, X.; LI, H.; PANG, Y.; SUN, Y.; HU, L.; SUN, B.; TRENT, J.; CHEN, K.; ZHANG, W. APEX1 Gene Amplification and Its Protein Overexpression in Osteosarcoma: Correlation with Recurrence, Metastasis, and Survival. **Research Article**, abril de 2010.
- YUAN, Y. *et al.* Diet-Induced Obesity Links to Breast Cancer Progression via LPA/PKD-1-CD36 Signaling Axis-Mediated Microvascular Remodeling. **American Heart Association, Inc.**, v. 37, n. 1, 2017.
- ZEITOUN, G.; EL SISSY, C.; KIRILOVSKY, A.; ANITEI, G.; TODOSI, A. M.; MARLIOT, F.; HAICHEUR, N.; LAGORCE, C.; BERGER, A.; ZINZINDOHOUE, F.; GALON, J.; SCRIPCARIU, V.; PAGÈS, F. The Immunoscore in the Clinical Practice of Patients with Colon and Rectal Cancers. **Chirurgia**, v.114, n. 2, mar-abr 2019.
- ZHANG, C.; LIN, M.; WU, R.; WANG, X.; YANG, B.; LEVINE, A. J.; HU, W.; FENG, Z. Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. **PNAS**, v. 108, n. 39, set. 2011.

- ZHANG, H. Y.; LIANG, F.; JIA, Z. L.; SONG, S. T.; JIANG, Z. F. PTEN mutation, methylation and expression in breast cancer patients. **Oncology Letters**, p. 161-168, 2013.
- ZITVOGEL, L.; APETOH, L.; GHIRINGHELLI, F.; KROEMER, G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. **Nat Rev Immunol.**, v. 8, n. 1, p. 59-73, jan. 2008.

9. ANEXO

Abaixo, segue o parecer consubstanciado emitido pelo CEPi (Anexo 1).

