



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA – CCEN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR – DBM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR – PPGBCM

INALDO DOS SANTOS CASADO CÂNDIDO

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E PROSPECÇÃO DAS
CICLINAS D1 E KI-67 NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE
PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL**

João Pessoa – PB

2023

INALDO DOS SANTOS CASADO CÂNDIDO

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E PROSPECÇÃO DAS
CICLINAS D1 E KI-67 NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE
PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Glaucia Veríssimo Faheina-Martins

João Pessoa – PB

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catálogo e Classificação

C217c Cândido, Inaldo dos Santos Casado.

Características clínico-patológicas e prospecção das Ciclinas D1 e Ki-67 no diagnóstico e prognóstico de pacientes com câncer colorretal / Inaldo dos Santos Casado Cândido. - João Pessoa, 2023.

81 f. : il.

Orientação: Glaucia Veríssimo Faheina-Martins.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Câncer colorretal. 2. Dados clínico-patológicos.
3. Imunohistoquímica. 4. Microscopia óptica. 5.
Associação significativa. I. Faheina-Martins, Glaucia
Verissimo. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.34-006(043)

INALDO DOS SANTOS CASADO CÂNDIDO

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E PROSPECÇÃO DAS
CICLINAS D1 E KI-67 NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE
PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL**

Dissertação de mestrado avaliada em: 15/12/2023.

Banca avaliadora:



Profa. Dra. Glauca Veríssimo Faheina Martins (DBM/CCEN/UFPB)

(Presidente)



Profa. Dra. Krystyna Gorlach Lira (DBM/CCEN/UFPB)

(membro interno)



Prof. Dr. Luís Fernando Marques Santos (DBM/CCEN/UFPB)

(membro externo)

Dedico este trabalho ao meu Deus, por ser a fonte de toda a minha força e dedicação, e aos meus pais e irmã por todo amor, apoio e suporte, tornando possível a conclusão de mais essa etapa. Tudo que faço e conquisto é por vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que Ele é e por tudo que Ele tem feito em minha vida.

Ao meu pai Ismaldo Cândido, por seu amor imensurável e total apoio.

A minha mãe Marilene Casado, por seu amor indizível e companheirismo.

A minha irmã Mirilene Casado, por seu amor fraternal e cumplicidade.

A toda minha família em geral, pelas orações e palavras de motivação.

Aos meus irmãos em Cristo da Igreja Evangélica Assembleia de Deus em Cuité-PB, assim como ao Pastor Adeilson e Missionária Maíza por suas orações.

A minha orientadora do mestrado Professora e Doutora Glaucia Veríssimo Faheina-Martins, por sua atenção, dedicação, paciência, compreensão, além dos muitos ensinamentos compartilhados ao longo destes dois anos. Agradeço por sempre me tratar bem, sempre preocupada com meu bem-estar, demonstrando ser muito mais que uma professora e orientadora, sendo um tipo de mãe no ambiente acadêmico.

A minha prima Nete, que abriu as portas de sua casa em João Pessoa, a fim de me receber durante o tempo de duração do mestrado, sendo uma mãe que Deus preparou para cuidar de mim no período que estive na capital. Minha sincera gratidão a ela e a toda sua família: Seus filhos Roniery e Ronielison, que para mim foram como verdadeiros irmãos, suas noras Karla e Jéssica, e seus netos Rhauan, Ana Beatriz, Ravi e Alice.

A equipe do Laboratório de Toxicologia e Genética do Câncer (TOXGEN) por todas as experiências vividas e somadas a minha carreira acadêmica.

A Professora Gabriela, por sua disposição e prontidão em me ajudar em tudo que solicitei, sempre muito educada com aqueles que lhe cercam.

A Alécia e Yasmim, por toda a parceria na realização dos experimentos e demais atividades do mestrado.

A Jeremias, Victória e Diogo, pelos bons e descontraídos momentos vividos durante o pouco tempo em que tivemos algum contato direto.

Ao Dr. Alexandre Rolim, por sua importante e significativa contribuição na execução deste projeto.

Ao Dr. Péricles, por sua brilhante e notável participação no projeto.

A Vânia e T.Cris (Técnicas de laboratório) pela ajuda oferecida e disponibilizada, sempre que necessária.

Aos Hospitais Napoleão Laureano e Universitário Lauro Wanderley, pela parceria firmada para a execução da pesquisa.

Ao Doutor e Professor Demétrius, pelo apoio oferecido.

Aos funcionários da Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal da Paraíba, na pessoa do Professor João. Também fazendo menção do recepcionista Seu Marques, Ludmila, Daniele, Virgínia e Eliseu.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Molecular, fazendo menção do Bosco, Dione, César e Geralda.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Também agradecendo a secretária Socorro, por sua ajuda.

A todos os professores, com quem tive a oportunidade de aprender.

A todos os colegas do mestrado, com quem tive o prazer de compartilhar algumas disciplinas.

Aos funcionários do Hospital Napoleão Laureano: Júnior e toda a equipe do SAME, além de Paulo e Joselita, que trabalham na farmácia do bloco cirúrgico. Agradeço pela maneira receptiva e cordial com que sempre fui tratado.

Aos irmãos da Congregação do Bairro Imaculada, pelas orações e bons momentos desfrutados.

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ - PB) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa, com aprovação no edital nº05/2020 PPSUS-FAPESQ, termo de outorga nº10/2021.

Aos membros da banca e ao revisor da dissertação, por todas as sugestões para o melhoramento do trabalho

A todos os amigos que ganhei e pessoas que tive a oportunidade de conhecer, durante o período que estive em João Pessoa.

Obrigado a todos!

“Ele dá força ao cansado, e aumenta as forças ao que não tem nenhum vigor. Os jovens se cansarão e se fatigarão, e os mancebos cairão, mas os que esperam no Senhor renovarão as suas forças; subirão com asas como águias; correrão, e não se cansarão; andarão, e não se fatigarão.”

(Isaías 40.29-31, Bíblia Sagrada).

RESUMO

O câncer colorretal (CCR), atualmente, é classificado como o terceiro câncer mais incidente em todo o mundo. Além disso, ocupa a quarta posição dentre as neoplasias que causam mais mortalidade no planeta. A Ciclina D1 é uma proteína que atua na regulação do ciclo celular, e, atualmente, tem sido apontada como possível marcador diagnóstico e prognóstico para o tratamento de certos tipos de câncer, inclusive o CCR. A proteína Ki-67 é um conhecido marcador de proliferação celular, e alguns estudos demonstram que a expressão elevada de Ki-67 pode servir como um biomarcador preditivo valioso para mau prognóstico em pacientes com CCR. O trabalho teve por objetivo avaliar a expressão da Ciclina D1 e Ki-67, em amostras de pacientes com câncer colorretal, pela técnica de imunohistoquímica, e correlacionar aos dados clínico-patológicos. Os dados clínicos de 66 pacientes (> 18 anos) diagnosticados com CCR foram coletados (CAAE: 5.017.299) através dos prontuários clínicos do Hospital Universitário Lauro Wanderley e Hospital Napoleão Laureano, ambos em João Pessoa - PB. Os blocos parafinados foram obtidos dos laboratórios de Patologia destes hospitais e processados por imunohistoquímica com anticorpos Anti-Ciclina D1 e Anti-Ki-67. As lâminas foram analisadas em microscopia óptica e foram categorizadas conforme as marcações: 0 (0%), 1 (\leq 10%), 2 (10-50%), 3 (50-80%) e 4 (> 80%). Foram consideradas negativas as expressões até 10% (0 e 1) e consideradas positivas as expressões acima de 10% (categorias 2, 3 e 4). Informações como gênero biológico, idade, cor, escolaridade, localização e tamanho do tumor, grau e tipo histológico, metástase em órgãos linfáticos e outros órgãos, estadiamento patológico e marcação do CEA de cada paciente foram levadas em consideração. Dos 66 pacientes envolvidos neste estudo, 63,6% apresentaram expressão positiva para Ciclina D1. Para a proteína Ki-67, 65,2% dos pacientes apresentaram expressão positiva. Houve forte associação entre a expressão positiva da Ciclina D1 e da Ki-67 ($p=0,001$). O presente trabalho verificou que a maioria dos casos de CCR, incluídos nesta pesquisa, apresentaram positividade para a expressão de Ciclina D1 e Ki-67. No entanto, não houve associação significativa entre a expressão de Ciclina D1 e de Ki-67 com as variáveis levadas em consideração neste estudo. Os resultados exibidos neste estudo não confirmam a Ciclina D1 e Ki-67 como marcadores que apontam para um bom ou mau prognóstico. Mais estudos sobre a interferência de marcadores moleculares em etapas do quadro clínico, como diagnóstico e prognóstico, de pacientes com CCR são necessários.

Palavras-chave: Amostras de pacientes, Dados clínico-patológicos, Imunohistoquímica, Blocos parafinados, Microscopia óptica e Associação significativa.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC), currently, is classified as the third most incident cancer in the world. In addition, it ranks fourth among the neoplasms that cause more mortality on the planet. Cyclin D1 is a protein that acts in the regulation of the cell cycle, and currently has been pointed out as a possible diagnostic marker and prognosis for the treatment of certain types of cancer, including CRC. The Ki-67 protein is a well-known marker of cell proliferation, and some studies demonstrate that elevated Ki-67 expression can serve as a valuable predictive biomarker for poor prognosis in patients with CRC. The objective of this study was to evaluate the expression of Cyclin D1 and Ki-67 in samples of patients with colorectal cancer, by immunohistochemistry technique, and correlate to clinical-pathological data. The clinical data of 66 patients (> 18 years) diagnosed with CRC were collected (CAAE: 5,017,299) through the clinical records of Lauro Wanderley University Hospital and Napoleão Laureano Hospital, both in João Pessoa - PB. The paraffin blocks were obtained from the pathology laboratories of these hospitals and processed by immunohistochemistry with antibodies Anti-Cyclin D1 and Anti-Ki-67. The slides were analyzed by optical microscopy and were categorized according to the markings: 0 (0%), 1 ($\leq 10\%$), 2 (10-50%), 3 (50-80%) and 4 ($> 80\%$). Expressions up to 10% (0 and 1) were considered negative and expressions above 10% (categories 2, 3 and 4) were considered positive. Information such as biological gender, age, color, schooling, location and size of the tumor, degree and histological type, metastasis in lymphatic organs and other organs, pathological staging and CEA marking of each patient were taken into account. Of the 66 patients involved in this study, 63.6% had positive expression for Cyclin D1. For Ki-67 protein, 65.2% of patients showed positive expression. There was a strong association between the positive expression of Cyclin D1 and Ki-67 ($p=0.001$). The present study found that most cases of CRC, included in this study, showed positivity for the expression of Cyclin D1 and Ki-67. However, there was no significant association between the expression of Cyclin D1 and Ki-67 with the variables taken into account in this study. The results shown in this study do not confirm Cyclin D1 and Ki-67 as markers that point to a good or bad prognosis. Further studies on the interference of molecular markers in clinical stages, such as diagnosis and prognosis, of patients with CRC are necessary.

Keywords: Patient samples, Clinical-pathological data, Immunohistochemistry, Paraffin blocks, Optical microscopy and Significant association.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Partes do cólon	22
Figura 2 – Modelo de câncer colorretal (adenoma, carcinoma e metástase)	26
Figura 3 – O ciclo celular	29
Figura 4 – Duplo papel da Ciclina D1	33
Figura 5 – Regulação da expressão de MKI67/Ki-67 durante o ciclo celular	36
Figura 6 – Expressão imunohistoquímica do antígeno Ciclina D1 em tecido de câncer colorretal.	51
Figura 7 – Expressão imunohistoquímica do antígeno Ki-67 em tecido de câncer colorretal.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características sociodemográficas e clínicas das amostras de pacientes com CCR (n=66)	47
Tabela 2 – Comparação da localização do tumor com metástase em outros órgãos nos casos de câncer colorretal	48
Tabela 3 – Comparação do estadiamento patológico com alguns parâmetros clínicos prognósticos dos casos de câncer colorretal	49
Tabela 4 – Comparação do marcador tumoral (CEA) com alguns parâmetros clínicos prognósticos dos casos de câncer colorretal	49
Tabela 5 – Expressão da proteína Ciclina D1 nos pacientes.	52
Tabela 6 – Comparação do nível da expressão de Ciclina D1, de acordo com parâmetros clínicos prognósticos dos casos de câncer colorretal	52
Tabela 7 – Expressão da proteína Ki-67 nos pacientes.	55
Tabela 8 – Comparação do nível da expressão de Ki-67, de acordo com parâmetros clínicos prognósticos dos casos de câncer colorretal	55
Tabela 9 - Comparação do nível da expressão de Ciclina D1 com o nível da expressão de Ki-67	56

LISTA DE ABREVIATURAS

CCR	Câncer colorretal
Proteína Rb	Proteína do retinoblastoma
DNA	Ácido desoxirribonucleico
TNM	Classificação dos Tumores Malignos
UICC	União Internacional para o Controle do Câncer
WCRF	Fundo Mundial de Pesquisa do Câncer
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
RNA	Ácido ribonucleico
CDKs	Quinases dependentes de ciclinas
CAK	Quinase ativadora de CDK
CKIs	Quinases inibidoras de CDKs
mRNA	RNA mensageiro
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
HULW	Hospital Universitário Lauro Wanderley
HNL	Hospital Napoleão Laureano
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
PAF	Polineuropatia amiloidótica familiar
CCHNP	Câncer colorretal hereditário não polipose
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
DAB	Diaminobenzidina
CEA	Antígeno carcinoembrionário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 Câncer	17
2.1.1 Definição	17
2.1.2 Carcinogênese	18
2.1.3 Classificação e estadiamento	19
2.2 Câncer colorretal	20
2.2.1 Cólon e reto	21
2.2.2 Epidemiologia do CCR	22
2.2.3 Neoplasia do cólon e reto	23
2.2.4 Fatores de risco	24
2.2.5 Suscetibilidade genética	25
2.2.6 Diagnóstico e prognóstico	26
2.2.7 Tratamento	27
2.3 O ciclo celular	28
2.3.1 Reguladores do ciclo celular	29
2.4 Marcadores	32
2.4.1 Ciclina D1	32
2.4.2 Ki-67	34
2.4.3 Marcadores em câncer	37
3. OBJETIVOS	40
3.1 Geral	40
3.2 Específicos	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Aspectos éticos	41
4.2 Coleta de dados clínicos e obtenção de amostras dos pacientes	41
4.3 Processamento e análises das amostras para imunohistoquímica	41
4.4 Análise estatística	43
4.5 Financiamento	43
5. RESULTADOS	45

5.1 Caracterização dos pacientes	45
5.2 Associações significativas	48
5.2.1 Localização do tumor	48
5.2.2 Estadiamento patológico	48
5.2.3 Marcador CEA	49
5.3 Avaliação da expressão das proteínas por imunohistoquímica	50
5.3.1 Expressão da Ciclina D1	50
5.3.2 Associações da expressão da Ciclina D1 com as características clínico-patológicas	52
5.3.3 Expressão de Ki-67	53
5.3.4 Associações da expressão de Ki-67 com as características clínico-patológicas	55
5.3.5 Associação entre a expressão de Ciclina D1 X Ki-67	56
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÃO	64
8. PERSPECTIVAS	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	78
ANEXO B – INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS	79
ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	80

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e no mundo, principalmente devido a sua alta taxa de mortalidade. Dentre as variações de cânceres mais comuns e incidentes estão o de pulmão, mama, colorretal e próstata (RIBEIRO *et al.*, 2023).

O câncer colorretal (CCR) tem atingido uma parcela significativa de homens e mulheres nos mais variados países e territórios. Hoje, está entre os tipos de câncer mais incidentes no ser humano (KANTH; INADOMI, 2021). No ano de 2020, 1,1 milhão de casos de câncer de cólon e reto foram registrados em homens, espalhados por todo o mundo, e 865 mil em mulheres. Os maiores índices de casos de câncer colorretal foram notificados no Centro, Norte e Sul da Europa, assim como também na Oceania (FERLAY *et al.*, 2020).

A estimativa para o presente triênio (2023 a 2025) é de aproximadamente 45.630 novos casos. Estima-se que sejam aproximadamente 23.660 para mulheres e 21.970 para homens atingidos por esta patologia nos próximos anos (INCA, 2022). Enquanto os números de casos aumentam, os estudos precisam acompanhar o mesmo ritmo.

Marcadores moleculares do câncer tem sido alvo de muitos estudos, em se tratando de compreender a importância e necessidade de encontrar soluções para uma problemática crescente a nível mundial (JESUS; OLIVEIRA, 2020).

Uma classe de proteínas totalmente envolvida nos processos que regem o ciclo celular é a formada pelas ciclinas. Dentre estas, é possível destacar a Ciclina D1 como aquela que auxilia na passagem da fase G1 para a fase S na divisão celular, através da fosforilação da proteína do retinoblastoma (Proteína Rb), câncer ocular raro que acomete o público infantil (RADENKOVIC *et al.*, 2021).

Quando se associa a Ciclina D1 ao desenvolvimento tumoral ou tumorigênese, esta proteína, fundamental para o avanço do ciclo celular, assume a posição de biomarcador, indicando em diversos casos um prognóstico ruim. Todavia, em trabalhos que focaram a ação desta proteína em indivíduos diagnosticados com câncer colorretal, os resultados são divergentes (WANGFJORD *et al.*, 2011; AL-MAGHRABI *et al.*, 2015; BABIC *et al.*, 2021).

Outra proteína envolvida no processo de proliferação celular é a Ki-67, já que sua expressão é bem evidenciada em células que estão em divisão celular. Tal proteína acabou sendo estudada como biomarcador para o câncer, a exemplo do câncer de mama, avaliando seu papel no diagnóstico e prognóstico dos pacientes (UXA *et al.*, 2021).

Em relação ao papel da proteína Ki-67 como biomarcador para casos de câncer colorretal, os resultados são discrepantes, uma vez que há trabalhos que destacam a ação de Ki-67 voltada para uma baixa sobrevida, enquanto que em outros uma estimativa favorável de sobrevida é visualizada (IVANECZ *et al.*, 2014; HAYASHI *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2019).

O presente trabalho busca analisar a importância das proteínas Ciclina D1 e Ki-67 como biomarcadores para pacientes diagnosticados com câncer colorretal, observando sua relevância no diagnóstico e prognóstico de tal neoplasia.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Câncer

2.1.1 Definição

O termo “câncer” é utilizado na literatura para definir uma proliferação desenfreada de células em alguma região do organismo, resultando no desenvolvimento de enfermidades de natureza maligna, já sendo registradas mais de cem variações deste tipo de enfermidade (INCA, 2022). O câncer apresenta-se como um forte obstáculo para o acréscimo da expectativa de vida em todo o planeta, ostentando dados estatísticos preocupantes, ocupando as primeiras colocações no ranking mundial das causas de mortalidade na espécie humana (SUNG *et al.*, 2021). Tal avanço em ritmo crescente está associado a fatores como, alterações no quesito demográfico, aumento expositivo do homem a condições que possam interferir diretamente na saúde e, conseqüentemente, no bem-estar. Neste ínterim, o custo dos procedimentos terapêuticos para tratar o câncer vem apresentando um aumento progressivo (WILD *et al.*, 2019).

Uma característica gritante deste tipo de doença é a velocidade absurda de replicação apresentada pelas células cancerígenas, além de um tom agressivo e indomável que reflete no surgimento de estruturas denominadas de tumores, que podem se manifestar em diversos pontos do indivíduo. A nomenclatura atribuída a um determinado tipo de câncer depende do local de origem da enfermidade: Carcinoma (tecido epitelial) e Sarcoma (tecido conjuntivo) (INCA, 2022).

Devido a rápida proliferação celular, visualizada nesse tipo de doença, a migração de um determinado ponto do corpo para outras regiões acaba sendo uma realidade vista em alguns casos, sendo denominada de metástase (SEFERBEKOVA *et al.*, 2023).

Do ponto de vista genético, tudo começa com a ativação de genes até então adormecidos no organismo. São os chamados “proto-oncogenes”. Estes são postos em atividade a partir de mutações genéticas dentro da célula. Após este evento, ocorre uma mudança na nomenclatura, passando a serem

conhecidos como “oncogenes”, na medida em que trabalham diretamente na transformação de células saudáveis em células doentes (WANG *et al.*, 2018).

2.1.2 Carcinogênese

A origem de um tipo de câncer no organismo é denominada de “carcinogênese” ou “oncogênese”. Não é um processo que acontece “da noite para o dia”, mas que leva um certo tempo para o estabelecimento definitivo da enfermidade no indivíduo, a partir da formação de estruturas tumorais visíveis a olho nu. Os chamados agentes cancerígenos ou carcinógenos são considerados os encarregados de acionarem a chave de ativação do desenvolvimento tumoral (INCA, 2022).

É possível destacar três estágios da carcinogênese: a) estágio de iniciação – marcado pela modificação genética, a partir da atuação dos agentes carcinógenos, alterando a ação de alguns genes; b) estágio de promoção – destaca-se a atividade dos “oncopromotores”, classe de agentes cancerígenos que atuam na transformação da célula saudável em uma célula maligna, através do contato direto, havendo paralisação da ação, caso tal contato seja interrompido; c) estágio de progressão – caracterizado pela proliferação desgovernada e inconversível de células geneticamente modificadas. Neste último estágio, a doença já se encontra em um estado de estabilidade no organismo, promovendo os sintomas iniciais no indivíduo. Os oncoaceleradores são os agentes responsáveis pelos estágios de iniciação e progressão (GUO; ZHOU; HU, 2022).

Dentro do material genético de uma célula considerada normal encontram-se os chamados proto-oncogenes que exercem uma ação reguladora em diversos mecanismos biológicos, tais como crescimento, transdução de sinais e transcrição. Os proto-oncogenes destacam-se pelo potencial de controle em eventos ligados à divisão de células em alguma área específica. Modificações em tais genes acabam ligando uma chave que os transforma em oncogenes nas células cancerígenas, colaborando assim para a proliferação celular descomedida, resultando na formação do câncer. Alguns exemplos de alterações que contribuem para a ativação dos oncogenes são:

mudança na configuração estrutural de uma proteína específica e erros de expressão proteica (KONTOMANOLIS *et al.*, 2020).

Dentre os processos que favorecem a ativação dos proto-oncogenes é importante destacar: alteração cromossômica, promovendo a translocação de um determinado proto-oncogene de um lugar para outro, podendo resultar no aumento da transcrição deste proto-oncogene; mutações específicas dentro do proto-oncogene; aumento quantitativo gênico, permitindo uma multiplicidade tanto do oncogene como da oncoproteína; e a adição de um gene hábil para induzir a transcrição numa região próxima ao proto-oncogene, possibilitando um aumento progressivo na expressão gênica (KONTOMANOLIS *et al.*, 2020).

A produção de células cancerosas ocorre em uma velocidade maior do que a registrada na divisão de células normais. Um acúmulo exacerbado destas células provoca uma espécie de invasão nos mais variados órgãos e tecidos do organismo, resultando no comprometimento da saúde do indivíduo. Tais células se mantêm vivas e bem nutridas através do processo conhecido por angiogênese, com a formação de vasos sanguíneos exclusivos para estes fins (INCA, 2022). Tais células apresentam uma habilidade de segregação do local de origem do tumor para outras regiões do organismo. Isso é permitido através do deslocamento pelos vasos sanguíneos e linfáticos até tecidos vizinhos e/ou distantes. O resultado de tal ação é o processo conhecido por colonização metastática ou metástases (SEFERBEKOVA *et al.*, 2023).

Há uma distinção clara entre as células saudáveis e cancerosas no tocante à funcionalidade, já que estas são menos especializadas. Por isso é possível visualizar, nos pacientes com câncer, a perda de funções dos órgãos acometidos por esta enfermidade (BONNAY *et al.*, 2020; INCA, 2022; LIU, PENG; WEI, 2022; RANGEL *et al.*, 2022).

Muitas das células tumorais, por meio do processo de seleção natural, vão se adaptando ao meio inserido, desenvolvendo resistência às drogas aplicadas no tratamento, caminhando dessa forma para estágios mais críticos, como é o caso da colonização metastática no organismo do paciente (NIIDA *et al.*, 2021).

2.1.3 Classificação e estadiamento

As chances de sobrevivência do acometido variam de acordo com o local de origem do câncer e com a capacidade de colonizar e invadir outros órgãos. Sendo assim, classificam-se os casos de câncer em estádios no intuito de examinar o nível de propagação. O estadiamento de um câncer revela, além do progresso e ampliação da enfermidade, a relação entre o tumor e o hospedeiro (KEUNG; GERSHENWALD, 2018).

Diversos são os critérios utilizados para classificar uma neoplasia. As variáveis utilizadas nesse caso são: região de origem, circunferência, capacidade invasiva, colonização metastática, histopatologia, sintomas, alterações no sistema, dentre outras (TSIKITIS *et al.*, 2014).

O Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos é o sistema de estadiamento mais usual, sendo recomendado pela União Internacional para o Controle do Câncer (UICC). O critério chave para este tipo de especificação é a dilatação em termos anatômicos da patologia. São levados em consideração os aspectos do tumor primário (T), atributos dos linfonodos do local onde é possível detectar um desenvolvimento tumoral (N) e a aparição ou não de metástases a curta e longa distância (M). Tais preceitos são graduados numericamente de T0 a T4, N0 a N3 e M0 a M1, respectivamente (CHEN *et al.*, 2021).

Em casos de câncer colorretal, o estadiamento anatomopatológico é considerado o tipo de variante mais interligada ao prognóstico, estando fundamentada no nível de invasão na parede intestinal do paciente, levando em consideração, também, a detecção ou não de metástases no indivíduo (LIMA *et al.*, 2019).

Também existe a possibilidade de reunir os casos de câncer em estádios classificados por algarismos romanos (I a IV), possuindo uma subclassificação em A e B, aferindo o ponto evolutivo da neoplasia (INCA, 2022).

2.2 Câncer colorretal

O câncer colorretal (CCR), atualmente, é classificado como o terceiro câncer mais incidente em todo o mundo. Além disso, ocupa a quarta posição no topo das neoplasias que causam mais mortalidade no planeta. O

desenvolvimento de metástases no fígado é uma característica visualizada em uma boa parte dos indivíduos com CCR, sendo taxada como o principal motivo que pode levar um paciente com este tipo de patologia a óbito (KITSEL *et al.*, 2023).

O CCR é uma neoplasia que atinge o cólon e o reto, ambos fazem parte do intestino grosso, e conseqüentemente do sistema digestório ou gastrointestinal. Tudo começa a partir de uma alteração na fisiologia celular, provocando um crescimento desordenado de células que resulta na formação de tumores (NIIDA *et al.*, 2021).

2.2.1 Cólon e reto

Para que haja a manutenção da vida, é necessário que ocorra um abastecimento de nutrientes no organismo. O ato da ingestão de alimentos é seguido da transformação química, resultando na quebra de partículas cada vez menores, para que assim os nutrientes sejam absorvidos e exerçam seu papel dentro do corpo. Este processo é denominado de digestão, sendo realizado pelo sistema digestório. As funções deste importante sistema vão desde a mastigação até a excreção residual, através das fezes, além da conversão química e absorção do material digerido (DANGELO; FATTINI, 2007).

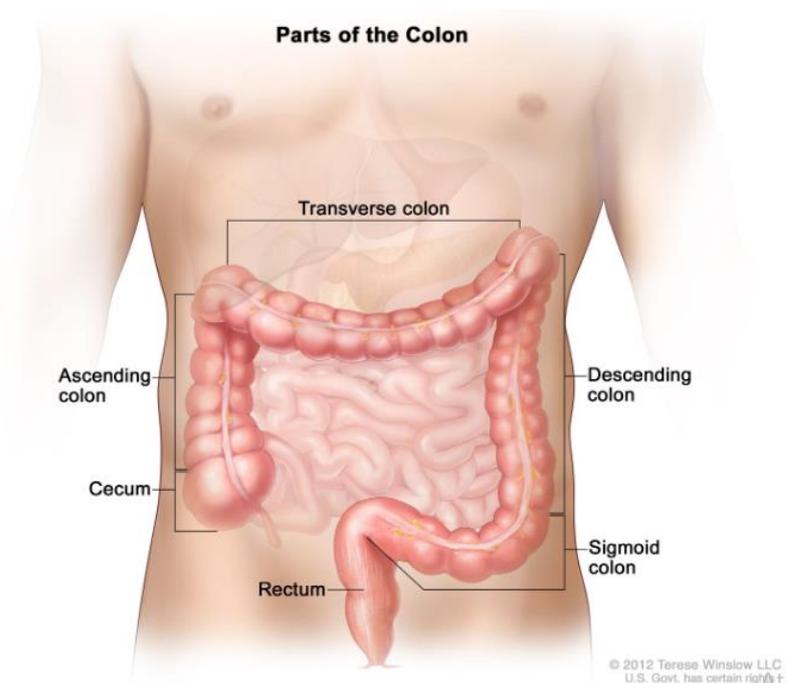
Um dos órgãos que constituem o sistema digestório é o intestino grosso, que é maior em circunferência do que o intestino delgado, compondo assim a parte terminal do canal alimentar. Ele é dividido basicamente em: ceco, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, cólon sigmóide e reto (DANGELO; FATTINI, 2007).

O cólon ascendente inicia o intestino grosso, especificamente com uma estrutura em forma de bolsa, denominada de ceco, que se encarrega de receber o bolo alimentar diretamente do intestino delgado e prossegue para o topo no sentido vertical, na região direita do abdome. Em seguida, encontra-se o cólon transverso, que passeia nas duas regiões (direita e esquerda). Posteriormente, localiza-se o cólon descendente, já que descende pelo lado esquerdo do abdome. Por fim, chega no cólon sigmoide, possuindo um formato

de “S”, que se une ao reto, desembocando no ânus (Figura 1) (MOORE; DALLEY, 2007).

Outra forma de divisão para o cólon consiste em classifica-lo em cólon direito e esquerdo. O primeiro partindo do ceco e estendendo-se até o cólon transverso. Já o segundo tem seu início do cólon descendente até o cólon sigmóide (BRAGA, 2020).

Figura 1 - Partes do cólon.



Fonte: TERESE WINSLOW LLC.

<https://www.teresewinslow.com/digestion/aoz6hzbz112a4qi1oikf6z6vyuu134>

Uma das funções do cólon está relacionada à capacidade de absorção de água e sal do bolo alimentar, que veio do intestino delgado para o intestino grosso. O resto residual, que fica após o percurso por todas as seções do cólon, é encaminhado para o reto. Através do ânus, as fezes são liberadas no processo denominado de evacuação. A estrutura muscular que rodeia o ânus, chamada de esfíncter, se encarrega de controlar a expulsão dos restos sólidos dos alimentos que não foram digeridos e absorvidos pelo organismo (DANGELO; FATTINI, 2007).

2.2.2 Epidemiologia do CCR

Em relação ao câncer colorretal, estima-se para o triênio de 2023 a 2025 que 45.630 novos casos surjam no cenário nacional (uma média de 21,10 pessoas por 100 mil habitantes). Deste número estimado, espera-se que a maioria dos casos (23.660) ocorram no público feminino e a outra parte (21.970) no público masculino, com uma diferença de quase dois mil casos entre os dois gêneros biológicos (INCA, 2022).

O câncer colorretal encontra-se na terceira posição entre os subtipos de câncer mais incidentes no território brasileiro. a região do Brasil, onde mais pessoas se tornam vítimas deste tipo de patologia é a Sudeste. A região Nordeste ocupa a quarta posição entre as regiões do Brasil onde homens e mulheres são mais atingidos pelo CCR (10,99 por 100 mil habitantes e 13,08 por 100 mil habitantes, respectivamente) (INCA, 2022).

O CCR assumiu um lugar de destaque no cenário atual, ocupando as primeiras posições de incidência das neoplasias mais comuns em homens e mulheres em todo o território mundial. Trazendo consigo uma probabilidade significativa de mortalidade e resistência, este tipo específico de câncer tem se levantado como um grave problema de saúde nos dias hodiernos (NIIDA *et al.*, 2021).

Algo ainda mais preocupante é o fato de que, nos últimos anos, jovens e adultos, entre 20 e 50 anos de idade, também vêm se tornando vítimas desse tipo de neoplasia (KANTH; INADOMI, 2021). Registros de decréscimos nos níveis de ocorrência do câncer colorretal em algumas localidades foram notificados, mediante a alteração no estilo de vida dos seus habitantes, optando por escolhas alimentares e comportamentais mais saudáveis (SUNG *et al.*, 2021).

2.2.3 Neoplasia do cólon e reto

Na estrutura anatômica do cólon é possível identificar um aglomerado de células denominado criptas. No interior de tais estruturas estão agindo as células-tronco do cólon. Devido à capacidade de autorrenovação das células-tronco, um tumor pode ser originado, em consequência de um conglomerado de células com algum tipo de modificação genética. Tumores formados a partir

da ação de uma célula-tronco são mais resistentes aos procedimentos terapêuticos comumente utilizados, a exemplo da quimioterapia. Quando uma cripta evolui, assumindo a forma de cripta aberrante, aumenta a chance de aparecimentos de pólipos adenomatosos benignos, que, com o passar dos tempos, pode progredir para um câncer colorretal. O termo “adenocarcinoma” é utilizado para definir um tumor maligno que pode atingir sítios do trato digestivo, a exemplo do cólon. Inicia-se a partir de uma pequena estrutura do tamanho de uma verruga, chamada pólipo, na superfície epitelial, exibindo um crescimento com o passar dos anos e evoluindo para o adenocarcinoma (LI *et al.*, 2023).

2.2.4 Fatores de risco

Dados de relatórios mais atualizados do Fundo Mundial de Pesquisa do Câncer (WCRF) apontam um crescimento de 7% na ocorrência de câncer causado por ingestão contínua de 10 gramas de álcool por dia. Em pessoas consideradas consumidoras leves de álcool, a chance de ocorrência da neoplasia diminui significativamente. O aumento no nível de consumo alcoólico contribui até para o aparecimento de lesões no cólon, colaborando negativamente para o estabelecimento de uma doença maligna nesta região do indivíduo (RUMGAY *et al.*, 2021).

A etiologia dos casos de CCR é variada, incluindo causas de ordem hereditária até mesmo fatos considerados imprevistos e infrequentes. Há quem associe o aumento da incidência do câncer colorretal com o nível de desenvolvimento da população, específico para cada nação. Quanto mais desenvolvido o país, maior o número de casos registrados de CCR. Hábitos alimentares do Ocidente, disseminados por todo o mundo, também ganham destaque nesta discussão (KANTH; INADOMI 2021).

A situação socioeconômica de um determinado país exerce um papel determinante na predisposição de indivíduos ao desenvolvimento do câncer colorretal. Países em situação transicional, resultado de aumento no Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), acabam exibindo um aumento na ocorrência de casos. Isto se deve ao fato de que, junto com tal aumento vem as mudanças comportamentais, associadas ao novo estilo de vida adotado. Alterações nos

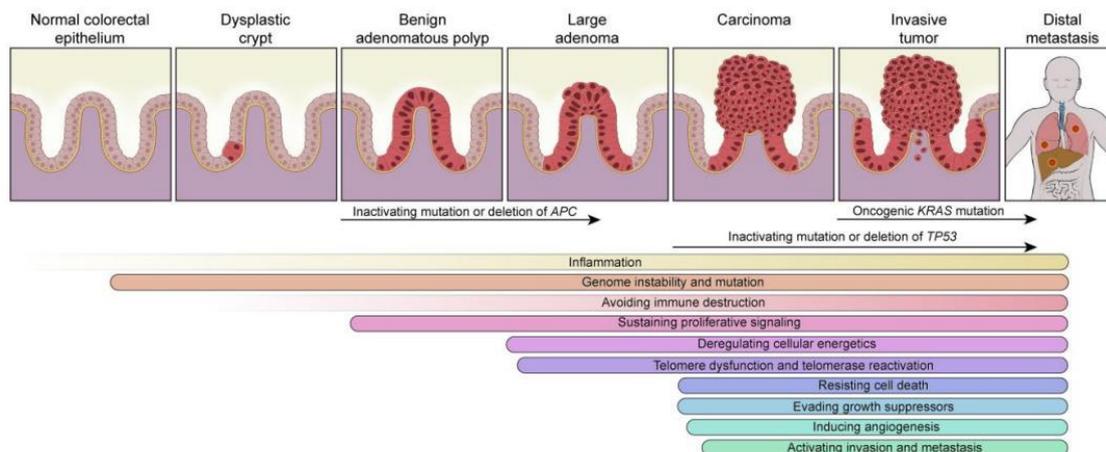
padrões alimentares e na rotina de atividades provocam um estado de vulnerabilidade no organismo e, conseqüentemente, aumentam a probabilidade de contrair uma enfermidade desta natureza. Alcoolismo, tabagismo, consumo excessivo de proteína animal são exemplos de práticas que favorecem o aumento de risco para o câncer colorretal. Em contrapartida, os riscos são reduzidos mediante a ingestão de alimentos ricos em cálcio e fibras, além do consumo de grãos (SUNG *et al.*, 2021).

Grande parte dos pacientes com câncer colorretal possui histórico familiar marcado por algum tipo de neoplasia. Inflamações na região intestinal levam ao surgimento a curto ou longo prazo, deste tipo de patologia. O estilo comportamental dos indivíduos reflete diretamente na predisposição ao desenvolvimento deste tipo de câncer. Ausência de atividades físicas, consumo de bebidas alcoólicas, tabagismo, dieta desregrada, são exemplos de comportamentos que contribuem para uma evolução tumoral (LI *et al.*, 2023).

2.2.5 Suscetibilidade genética

O aparecimento de uma adenocarcinoma é resultado de alterações genéticas em alguns genes, tais como APC e P53. Modificações moleculares são registradas como produto de tal desenvolvimento, a exemplo da perda de função dos telômeros e ruptura da dupla fita de DNA. Mutações no oncogene KRAS são visualizadas concomitantemente com a colonização metastática (Figura 2). Também são registrados outros tipos de mutações, classificadas como sendo de baixa frequência e reduzido perfil de transcrição, mas que contribui diretamente para a heterogeneidade dos casos de câncer colorretal. Algumas das alterações genéticas visualizadas em células cancerígenas do cólon ou reto são: metilação do DNA, alteração na configuração das histonas e controle dos eventos transcripcionais do RNA (LI *et al.*, 2023).

Figura 2 - Modelo de câncer colorretal (adenoma, carcinoma e metástase).



A evolução do câncer colorretal revela sua origem inicialmente como uma cripta aberrante, que vai se desenvolvendo e formando um pólio adenomatoso benigno, o qual evolui formando o carcinoma. Na medida em que o tumor vai se tornando invasivo, por meio da mutação do oncogene KRAS, a colonização metastática acaba sendo um fenômeno visível no paciente. (Fonte: LI, Jiexi *et al.* 2023).

Analisando o perfil genômico dos pacientes com câncer colorretal, é possível visualizar uma notável variação tumoral, marcada pelo acúmulo de alterações genéticas, que resultam na formação de aberrações no material genético, norteadas assim o início e evolução da enfermidade (KITSEL *et al.*, 2023).

2.2.6 Diagnóstico e prognóstico

Possíveis sintomas manifestados em indivíduos com suspeita de câncer colorretal são: sangramento no reto, dores na região do abdome, constipação ou prisão de ventre, como é popularmente conhecida, e diarreia. Destes, as dores e incômodos no abdome e a dificuldade na evacuação são os mais presentes em homens e mulheres com suspeita de câncer colorretal (HOLTEDAHL *et al.*, 2021).

Infelizmente, a maioria dos casos é diagnosticada em etapas críticas e avançadas, quando não há muito mais o que fazer. Nesse momento, é natural que a doença avance de uma forma agressiva. No entanto, o CCR pode ser

evitado, agindo da maneira correta ao se deparar com sinais estranhos no organismo, como uma anemia e prisão de ventre, procurando alternativas que visem driblar uma situação indesejável (KANTH; INADOMI 2021).

A colonoscopia é o procedimento mais usual no diagnóstico precoce do CCR e consiste na visualização do intestino grosso e delgado, sendo indicado para indivíduos que desenvolvem algum tipo de sintoma de natureza intestinal. Quanto mais cedo for detectado, menor a probabilidade de o indivíduo vir a óbito (KANTH; INADOMI 2021). Tal exame tem sido eficiente na detecção do câncer colorretal, quando recomendado pelo médico para alguém com suspeita de algum tipo de alteração na região do cólon e do reto. Todavia, o alto custo acaba afastando a clientela que, em alguns casos, se mantém resistente na submissão a tal exame (ZYGULSKA; PIERZCHALSKI, 2022).

Outras alternativas no rastreamento do câncer colorretal são constantemente estudadas por pesquisadores, que procuram tornar mais acessíveis os métodos de diagnóstico e tratamento do câncer colorretal. Os biomarcadores ganham destaque neste cenário, contribuindo para uma detecção precoce de alterações genéticas no indivíduo. Dentre os biomarcadores mais utilizados em casos de câncer colorretal estão as proteínas e os ácidos nucleicos, além das modificações na microbiota intestinal. Normalmente, esta detecção é feita a partir de materiais coletados dos pacientes, a exemplo de sangue, fezes, urina, muco e saliva. São realizados testes de quantificação de proteínas no sangue ou imunohistoquímica para verificar a presença de determinados antígenos em amostras de tecidos. Normalmente, em regiões onde é registrada a presença de lesões malignas, o nível de ácidos nucleicos circulantes multiplica significativamente. A facilidade de coletar e examinar o sangue o torna uma das ferramentas práticas para realização da triagem do CCR. Grande parte das células com anomalias genéticas, envolvidas no processo de carcinogênese, são eliminadas através dos efluentes biológicos a exemplo das fezes e urina. Este material é submetido à testes no intuito de verificar a presença de sangue oculto, utilizando técnica de imunquímica (ZYGULSKA; PIERZCHALSKI, 2022).

2.2.7 Tratamento

O primeiro passo para a obtenção de um tratamento terapêutico eficiente é a total compreensão do processo evolutivo da neoplasia em questão. Este é um ponto que não é exclusivo do CCR, mas dirigido para qualquer tipo de enfermidade. No entanto, apesar do avanço das informações e das pesquisas envolvendo patologias desta natureza, muitos pontos ainda necessitam ser esclarecidos em sua totalidade (KANTH; INADOMI, 2021).

Normalmente o procedimento cirúrgico para a remoção do tumor é invasivo, porém, já está sendo notificada uma evolução nas cirurgias, tornando o processo menos invasivo. A cirurgia não isenta o paciente dos riscos, que podem se manifestar em diferentes níveis de complicação. A quimioterapia, em combinação com a radioterapia, é comumente utilizada no tratamento de CCR (SINHA, 2021).

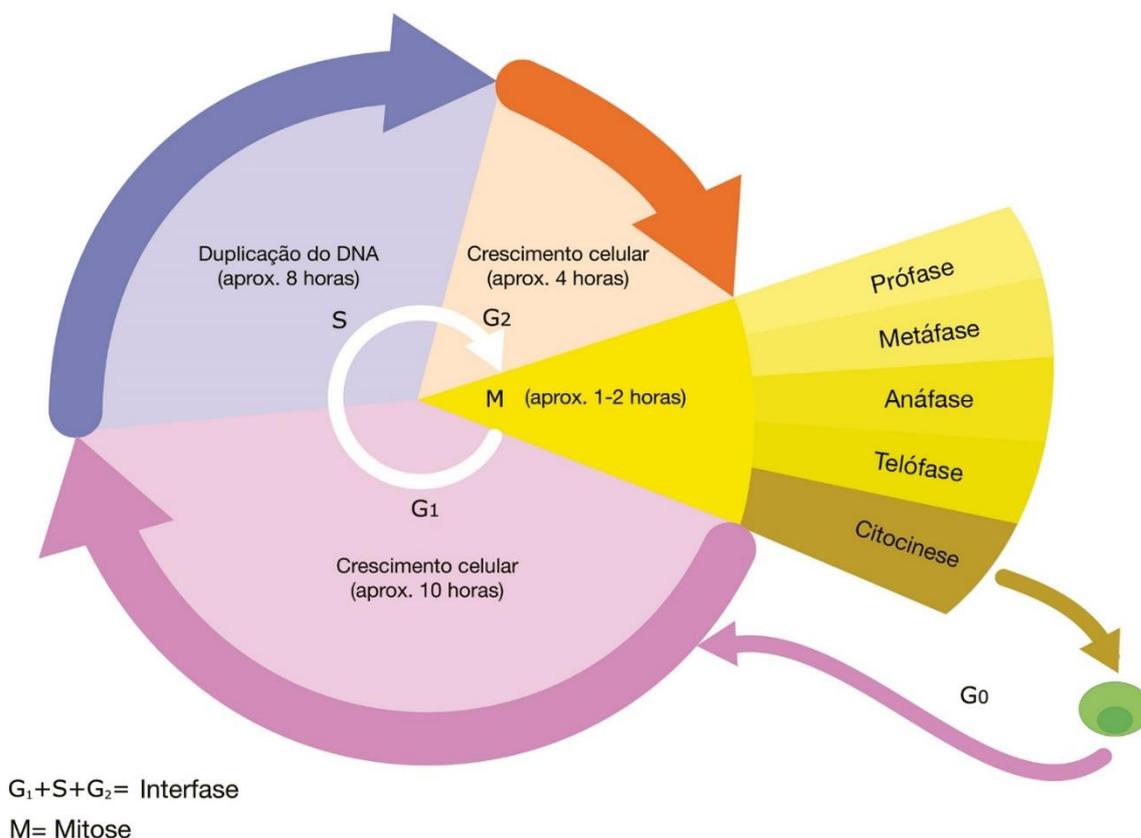
2.3 O ciclo celular

Uma célula duplica seu material, sinalizando a aptidão para dividir-se em um processo denominado de ciclo celular. O resultado de tal evento é a produção de duas células-filhas idênticas à célula mãe. Estudiosos dividiram este evento celular, de extrema importância para a manutenção da vida, em quatro fases: G1, S, G2 e M. Na fase G1, a célula inicia um movimento preparatório para uma subsequente divisão, através de um amontoado de estruturas fundamentais para esta ação. Na próxima etapa, S, ocorre a duplicação do material genético. Em G2 é registrado um intervalo de transição entre a duplicação e a divisão propriamente dita. Por fim, a fase M consiste no momento em que o material genético é direcionado, por meio da segregação do DNA, para as novas células que serão produzidas, coroando assim a divisão celular. Além disso, outra etapa importante a citar é a fase G0, conhecida por permitir a célula já dividida um repouso, após passar por todas as etapas relatadas anteriormente. Tal célula pode novamente ingressar no ciclo celular, como resultado da ação de fatores mitogênicos específicos (QIE; DIEHL, 2016; KCIUK *et al.*, 2022; SUSKI *et al.*, 2022).

O controle do ciclo celular fica a cargo de proteínas específicas, a exemplo das ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs). Estas, para

serem ativadas, precisam ligar-se a uma ciclina específica, em um sítio de ligação diferente do sítio ativo. Sendo assim, as ciclinas são reconhecidas como ativadoras alostéricas das CDKs. Os fatores de regulação da atividade e funcionalidade das CDKs incluem a parceria das quinases ligadas às ciclinas específicas, mecanismos de fosforilação e presença de proteínas que atuam inibindo as CDKs, a exemplo da família INK4, CIP e KIP (Figura 3) (QIE; DIEHL, 2016; TCHAKARSKA; SOLA, 2020; KCIUK *et al.*, 2022).

Figura 3: O ciclo celular.



Fonte: Allifer School.

<https://www.alliferschool.com/2020/05/sequencia-didatica-o-ciclo-celular.html>

2.3.1 Reguladores do ciclo celular

Proteínas do tipo quinases estão envolvidas em processos de extrema relevância para a manutenção da estrutura e saúde celular, a exemplo do envolvimento deste tipo de proteína na desconstrução do núcleo, na fase

mitótica, para a formação de dois novos núcleos iguais ao molde. Durante o processo divisório, CDKs acionadas na fase M fosforilam as nucleoporinas, favorecendo assim a desagregação do envelope nuclear e, conseqüentemente, a desmontagem do núcleo (ALBERTS *et al.*, 2017; COLAS, 2020).

Classificam-se quatro tipos de ciclinas em vertebrados, de acordo com o momento do ciclo celular em que ocorre a junção com uma quinase para desempenhar uma determinada função: G₁/S-ciclinas (ciclina E e Cdk2), S-ciclinas (ciclina A, Cdk2 e Cdk1), M-ciclinas (ciclina B e Cdk1) e G₁-ciclinas (ciclina D, Cdk4 e Cdk6). Em mamíferos são encontrados três tipos de ciclinas D – D1, D2 e D3 (ALBERTS *et al.*, 2017). Em células de animais é possível identificar no mínimo 10 tipos diferentes de ciclinas, sendo nomeadas por letras do alfabeto – A, B, C, etc (NELSON; COX, 2014).

Esta classe de proteínas está envolvida na regência do ciclo celular, sendo submetida a uma série de comandos extracelulares. A ação das CDKs está intrinsecamente associada à fosforilação de estruturas específicas, para que o ciclo celular aconteça de uma maneira satisfatória. As quinases são classificadas como heterodímeros que possuem duas subunidades distintas: uma denominada de reguladora, onde a ciclina se ligará, e outra conhecida por catalítica. Para que a proteína quinase esteja em seu estado ativo é necessário que haja a presença da ciclina. Do contrário, a proteína permanece em seu modo inativo (NELSON; COX, 2014; LUKASIK; ZALUSKI; GUTOWSKA, 2021).

A família de proteínas denominadas de CDKs é conhecida por sua participação meritória na direção do processo de divisão celular. Ao longo do ciclo celular, a atuação de tais proteínas registra níveis que passeiam nos dois extremos, interferindo na conformação de proteínas dentro da célula que são responsáveis por executar ações necessárias ao ciclo. Proteínas encarregadas de dirigir a condensação dos cromossomos são fosforiladas em um nível elevado, como consequência da ação de uma CDK na etapa de transição entre as fases G₂ e M. Já são conhecidas vinte CDKs, na espécie humana, e aproximadamente vinte e nove ciclinas (DING *et al.*, 2020; LUKASIK; ZALUSKI; GUTOWSKA, 2021; SUSKI *et al.*, 2022).

Quatro mecanismos de regulação controlam a ação das CDKs. São estes: a atividade de proteínas que inibem as CDKs, produção de CDK, assim como também de ciclinas, eliminação sob controle da subunidade ciclina e

fosforilação ou desfosforilação de CDKs. Para que o ciclo celular aconteça é necessário que ocorra a ativação ou desativação das CDKs em momentos oportunos (NELSON; COX, 2014).

A ação das CDKs interfere drasticamente no comportamento celular, policiando eventos como divisão, diferenciação e até mesmo quiescência (COLAS, 2020; DING *et al.*, 2020).

Algumas estruturas proteicas são incumbidas de promover o controle da ação das CDKs. Dentre elas estão as ciclinas, que recebem essa nomenclatura pelo resultado manifestado por elas ao final do ciclo celular – apresentam ciclos de síntese e degradação. Alterações nos graus de concentração das ciclinas depende da presença de complexos Ciclina/CDK ativos durante o ciclo celular (DULINSKA-LITEWKA *et al.*, 2022).

Em síntese, a participação das ciclinas no controle do ciclo celular ocorre da seguinte maneira: sinais extra e intracelulares atuam na ativação de G1-CDK. Esta coopera para a expressão dos genes que codificam G1/S-ciclinas e S-ciclinas. G1/S-CDKs influenciam na atuação das S-CDKs, que trabalham diretamente na duplicação cromossômica na fase S. Quando M-CDK é ativada, dá-se a largada das fases iniciais da mitose. Quando a fase M chega ao fim, a atividade das CDKs é suprimida, provocando uma fase de estabilidade para a célula (ALBERTS *et al.*, 2017).

No grupo das ciclinas D estão as ciclinas D1, D2 e D3. Elas associam-se com dois tipos de CDKs (CDK4 e CDK6), fosforilando a proteína do retinoblastoma (tipo raro de câncer ocular, que atinge o público infantil, tendo como sintomas o desenvolvimento de uma área branca e opaca na região da pupila, alteração na posição dos olhos, estrabismo e tremor nos olhos) e induzindo a passagem da fase G1 para S, no ciclo celular. A interferência no ciclo celular, por parte desta classe de proteínas, depende de critérios como disposição dos fatores de crescimentos e nutrientes, sem falar nos sinais de adesão, provenientes das integrinas (QIE; DIEHL, 2016).

Quando o complexo Ciclina/CDK está formado, a ciclina encaminha a CDK para proteínas-alvo que vão facilitar a execução de uma determinada ação. Sendo assim, tal complexo fosforila diversos tipos de proteínas-substrato (JAVED *et al.*, 2023).

A ativação da CDK por uma ciclina ocorre da seguinte forma: uma ciclina liga-se a uma CDK removendo uma alça proteica, encontrada no sítio de ligação na ausência da ciclina, e promovendo parcialmente a ativação da enzima em questão. A ativação plena acontece quando uma outra quinase, denominada quinase ativadora de CDK (CAK), se aproxima do complexo Ciclina/CDK e o fosforila, especificamente em um aminoácido localizado nas proximidades da região do sítio ativo. Segue-se uma alteração na configuração do complexo, necessária para a execução satisfatória da fosforilação em proteínas-alvo (JIRAWATNOTAI; DALTON; WATTANAPANITCH, 2020).

Proteínas envolvidas na inibição do complexo Ciclina/CDK são chamadas de proteínas inibidoras de CDK (CKIs). Tais proteínas se ligam ao complexo, promovendo uma mudança organizacional no corpo estrutural do sítio de ligação da quinase, e, conseqüentemente, inativando-o (KCIUK *et al.*, 2022; SUSKI *et al.*, 2022).

2.4 Marcadores

2.4.1 Ciclina D1

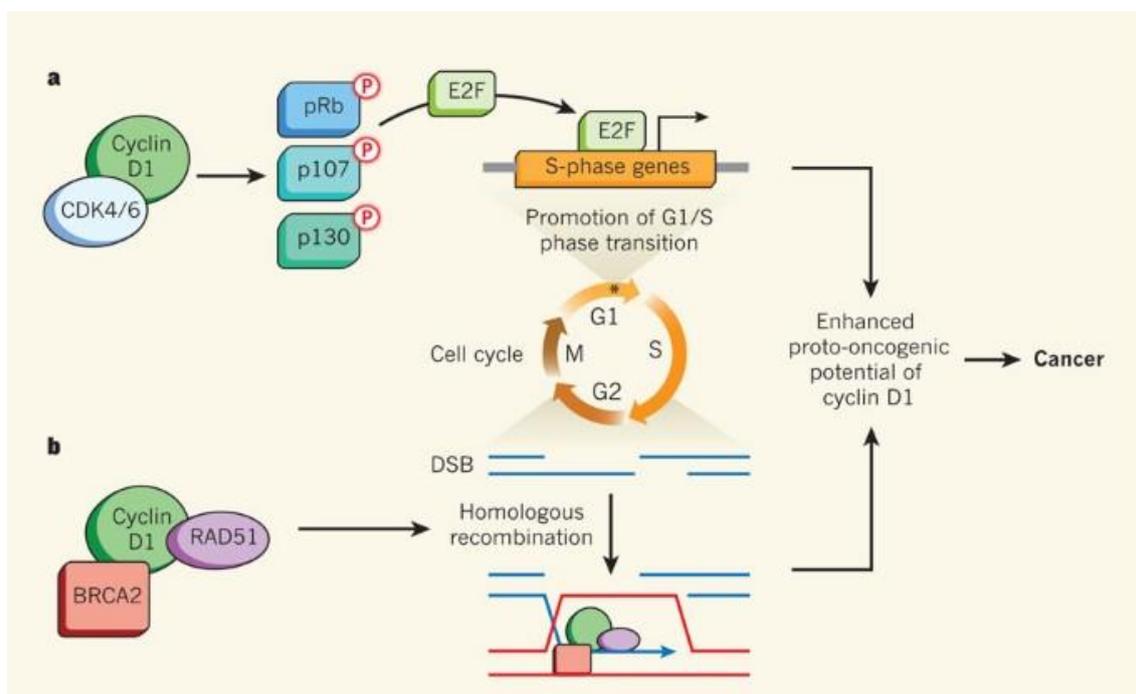
Uma função importante atribuída às ciclinas do tipo D é a capacidade proliferativa por meio de uma associação com uma CDK (CDK4 ou CDK6). Quando ocorre a ativação do complexo Ciclina D – CDK4/CDK6, verifica-se um desprendimento mais acelerado entre as etapas do ciclo celular, envolvendo quiescência, senescência e diferenciação (MUSGROVE *et al.*, 2011).

A Ciclina D1 é uma proteína codificada pelo gene do cromossomo 11q13, *CCND1* (também conhecido por *PRAD1*), que inclusive foi descoberto no final do século XX (HE *et al.*, 2017; CAO *et al.*, 2020; MONTALTO; AMICIS, 2020). Esta proteína tem sua funcionalidade associada a progressão do ciclo celular, uma vez que atua como reguladora na transição das fases G1 e S (HE *et al.*, 2017; CAO *et al.*, 2020; MONTALTO; AMICIS, 2020; MENG *et al.*, 2021). A superexpressão de *CCND1* resulta em uma redução do tempo total para completar o ciclo celular e, portanto, numa multiplicação de células em uma determinada região do organismo, atuando ativamente no processo de tumorigênese (Figura 4) (CAO *et al.*, 2020; JUN *et al.*, 2023).

A passagem de fase, por parte das células com o auxílio da Ciclina D1, acontece graças à fosforilação de uma proteína do retinoblastoma e, como consequência, ocorre a liberação dos chamados fatores de transcrição, como é o caso do E2F, que facilitam a transição de estágio no ciclo celular (HE *et al.*, 2017).

A Ciclina D1, quando ligada à enzima RAD51, colabora em conjunto com o gene BRCA2 para a instalação de um complexo que atua basicamente no reparo central de rupturas na cadeia dupla de DNA, através do processo de recombinação homóloga (Figura 4). Dessa forma, as funções da Ciclina D1 visualizadas no ciclo celular e no reparo do DNA favorecem uma associação de tal proteína ao desenvolvimento tumoral, tornando-a assim uma estrutura oncogênica, na medida em que são registrados altos níveis de expressão da Ciclina D1 em regiões tumorais (JIRAWATNOTAI *et al.*, 2011).

Figura 4: Duplo papel da Ciclina D1.



a. A Ciclina D1 atua em conjunto com as enzimas CDK4/CDK6, dando início à fosforilação da proteína do retinoblastoma e dos repressores transcricionais. Como resultado desta ação, os fatores de transcrição E2F são liberados, permitindo assim a promoção de fase no ciclo celular (G1 para S). b. A Ciclina D1 trabalhando em conjunto com a enzima RAD51 e com o gene BRCA2 instalam um complexo de reparo, que tem sua atuação focada nas quebras de cadeia dupla de DNA, por meio da recombinação homóloga.

Fonte: BARTEK, Jiri; LUKAS, Jiri, 2011.

Possuindo um peso molecular de 36 kDa, a Ciclina D1 é expressa pela grande maioria das células encontradas na espécie humana, com exceção das linhagens de células-tronco da medula óssea. Pode ser localizada tanto no núcleo como no citoplasma. Em conjunto com quinases dependentes de ciclinas, a Ciclina D1 forma um complexo de ação no núcleo das células, atuando na fosforilação de proteínas do retinoblastoma e anulando a ação repressora sobre o fator de transcrição EGF2. Dessa forma, genes de transcrição envolvidos na proliferação celular continuam desempenhando seus papéis de maneira cabal, e abrindo caminhos para o desenvolvimento indesejado de tumores (MONTALTO; AMICIS, 2020).

A superexpressão do gene que codifica a Ciclina D1 resulta numa produção precoce e desenfreada de células. Tal fato contribuiu para que a Ciclina D1 assumisse o posto de biomarcador para neoplasias, ao colaborar com a mudança fenotípica da célula, levando-a a assumir um comportamento considerado anormal (MAAHS *et al.*, 2007; FANG *et al.*, 2021).

Mitógenos e fatores de crescimento são razões importantes para a expressão elevada da CCND1, monitorando e dirigindo o processo de multiplicação (GO *et al.*, 2022).

2.4.2 Ki-67

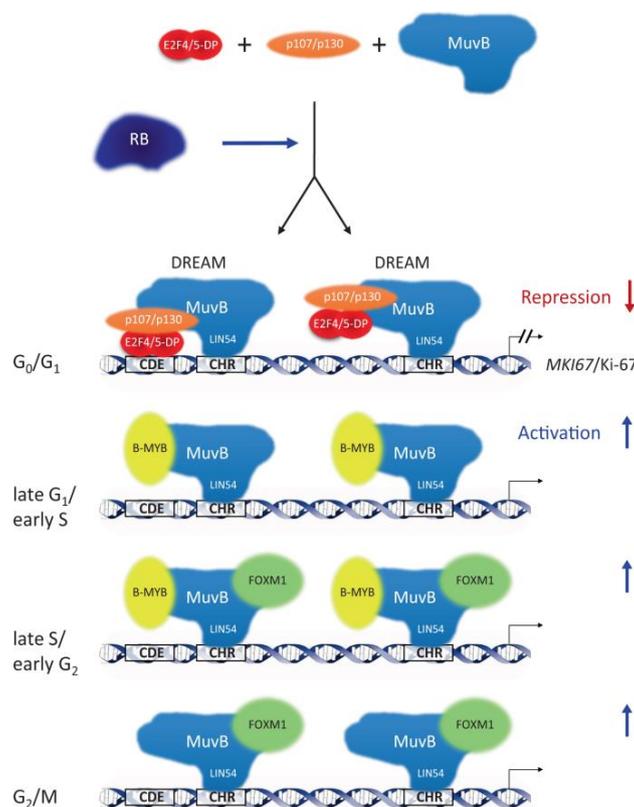
Um exemplo de marcador para casos de proliferação celular significativa, muito utilizado para identificar o desenvolvimento de determinadas enfermidades, é a proteína Ki-67 (Figura 5), sendo inicialmente detectada na forma de antígeno. Em 1983, Gerdes e demais colegas, fizeram a identificação do antígeno Ki-67, utilizando um anticorpo monoclonal. Os anticorpos produzidos em resposta a este antígeno tornaram-se, com o passar dos tempos, instrumentos utilizados para diagnosticar um paciente com câncer. Geralmente, a Ki-67 é bem expressa em células que estão em estágio de proliferação (G1, S, G2 e mitose), enquanto que sua ausência é notada em células que estão em estado de repouso (G0), sendo enxergada como importante na ação reguladora da produção de células (WEI *et al.*, 2018;

AHADI *et al.*, 2020; LIANG *et al.*, 2020; UXA *et al.*, 2021; ZENG *et al.*, 2021 ROSA, 2023).

A proteína não-histona Ki-67 tem sua expressão na forma de isoformas que pesam de 320 a 395 kDa. Estas isoformas são codificadas pelo gene humano MKI67, localizado no cromossomo 10q25-ter17, e resultam de variações do mRNA apresentando um diferencial no splicing. Tais estruturas atuam na segregação dos cromossomos mitóticos, quando ocorre a ruptura do núcleo. Ki-67 coopera para produzir a proteína pericromossômica, a partir de sua ligação com uma proteína fosfatase. Também trabalha tornando mais fácil a adesão dos cromossomos ao fuso mitótico. Possibilita movimento e cobertura aos cromossomos. Ademais, influenciam na estruturação da heterocromatina. A respeito do ciclo celular, Ki-67 se encarrega de eliminar do núcleo estruturas moleculares, como por exemplo, os ribossomos, após o processo mitótico. Em alguns casos, a redução dos níveis de Ki-67 resulta em atraso de entrada na fase S do ciclo celular. Estudos enfatizam a resistência que tal proteína apresenta no processo de carcinogênese (UXA *et al.*, 2021; ZENG *et al.*, 2021).

A expressão de Ki-67 é notada inicialmente em G1 de forma discreta, aumentando nas fases seguintes, atingindo seu topo na fase M. Baseados em resultados que apontam a relação da Ki-67 com o diâmetro do tumor e condições clínicas de cada indivíduo, esta proteína tem-se consagrado como um marcador molecular em etapas importantes (diagnóstico e prognóstico) de pacientes com alguma neoplasia. A expressão de Ki-67 é visualizada no núcleo ou em volta da estrutura nuclear, com o auxílio de um microscópio (WEI *et al.*, 2018; AHADI *et al.*, 2020; LIANG *et al.*, 2020; UXA *et al.*, 2021; ZENG *et al.*, 2021; ROSA, 2023).

Figura 5: Regulação da expressão de MKI67/Ki-67 durante o ciclo celular.



A repressão da transcrição das células nas fases G₀ e G₁ requer dois complexos repressores transcricionais que são identificados pelo termo “DREAM”, que se ligam a um sítio CDE e dois sítios CHR na região promotora do gene MKI67, por meio da proteína LIN54 do complexo MuvB. Os complexos MuvB associados às proteínas p107/p130 e fatores de transcrição E2F4/5-DP, junto com a ação indireta da proteína supressora do retinoblastoma, atuam no controle transcricional do gene MKI67, reprimindo a transcrição nas fases G₀ e G₁. O cenário muda quando acontece a dissociação de p107/p130 e E2F4/5-DP do complexo DREAM, proporcionando a ativação da transcrição na fase S. Ocorre a formação de dois novos complexos (B-MYB MuvB e FOXM1-MuvB) que trabalham na ativação da transcrição, ligados a dois sítios CHR na região promotora do gene MKI-67.

Fonte: UXA, Sigrid *et al.* 2021.

A importância e uso da Ki-67 para o diagnóstico de neoplasias são enfatizados por Mrouj *et al.* (2021) no processo de desenvolvimento tumoral, uma vez que silenciado o gene MKI67 o crescimento tumoral é afetado. Em pacientes com câncer de mama, através da técnica de imunohistoquímica, são avaliadas quatro estruturas: receptor de estrogênio, receptor de progesterona, HER2 e Ki-67. Todo câncer de mama passa por essa avaliação, porque

através desses quatro marcadores é possível fazer o diagnóstico, classificar o câncer, avaliar o prognóstico e o tipo de tratamento (UXA *et al.*, 2021).

Basicamente, a proteína Ki-67 sofre degradação pelo proteossoma ainda na fase G1 e no final do ciclo celular. Uma expressão exacerbada de E2F1 contribui significativamente para elevar os níveis de expressão gênica da Ki-67 (UXA *et al.*, 2021).

2.4.3 Marcadores em câncer

Quando ocorre a amplificação de genes denominados oncogenes, o processo conhecido por tumorigênese fica bem mais fácil de ser manifestado no organismo. A Ciclina D1 é um destes genes que são alvos de estudos de muitos pesquisadores (HE *et al.*, 2017)

Atuando na regulação do ciclo celular, favorecendo a transição da fase G1 para S, a Ciclina D1, ao adotar um comportamento alterado, incita o desenvolvimento de tumores. Alguns estudos já enfatizam uma expressão significativa de Ciclina D1, associada ao reaparecimento de carcinomas em sítios específicos do corpo (NAZAR *et al.*, 2020).

Fatores de crescimento interferem diretamente no comportamento da Ciclina D1, estimulando sua ação proliferativa através de diversas vias de sinalização intracelular (MONTALTO; AMICIS, 2020).

Vários processos contribuem para uma proliferação celular desenfreada, como por exemplo a ubiquitinação da Ciclina D1, uma vez que a ubiquitina se liga à molécula alvo com o objetivo de promover uma renovação ou destruição das estruturas marcadas, exorbitância desta proteína, desajuste no processo de transcrição, composição e ativação descomedida do complexo Ciclina/CDK. Em vista disso, o potencial oncogênico da Ciclina D1 passou a atrair a atenção de pesquisadores das mais variadas localidades, em virtude da vultosa relação entre expressão de Ciclina D1 e o desenvolvimento de diversas neoplasias, exemplificando câncer de mama e pulmão (MONTALTO; AMICIS, 2020).

Em pacientes com carcinomas de células escamosas da língua, o nível elevado de Ciclina D1 esteve relacionado a uma baixa sobrevida (GUIMARÃES, 2014). Já no caso do carcinoma epidermóide de boca, os pacientes não demonstraram relação direta entre a expressão de Ciclina D1

com os fatores preditivos da patologia. Neste caso, outros pontos incentivaram o desenvolvimento de metástase: embolias vasculares e estadiamento clínico (MAAHS *et al.*, 2007).

Em um estudo de pacientes com carcinomas papilíferos de tireoide, em quase todos os carcinomas foi notificada a expressão da Ciclina D1, mas, tal fato não possuiu ligação direta com as manifestações clínicas da doença (BARTOLOMEI *et al.*, 2022).

Já numa pesquisa sobre indivíduos com adenocarcinoma de próstata, foi registrado um aumento da expressão da Ciclina D1, associado principalmente a casos mais graves (PEREIRA, 2013).

Num estudo sobre câncer de mama, fazendo um comparativo entre os níveis de RNAm e os de proteína, resultado da expressão gênica da Ciclina D1, não foi registrada variação, fomentando a ideia de não-correlação da expressão com a colonização metastática (MAIA, 2014).

Pesquisadores utilizam a expressão gênica de Ki-67 como ferramenta para classificar o câncer de mama em subtipos específicos. Ainda sobre este tipo de câncer, uma significativa expressão de Ki-67 está comumente relacionada a uma maior probabilidade de recidiva, diminuindo as chances de sobrevida aos pacientes (LIANG *et al.*, 2020).

Afirmativas sobre a relação da expressão gênica de Ki-67 com o câncer colorretal ainda são contraditórias, uma vez que alguns estudos atribuem uma elevada expressão desta proteína a uma baixa sobrevida, enquanto outros fazem esta mesma associação, mas para uma sobrevida que é promissora para o paciente (LUO *et al.*, 2019).

Deve-se levar em consideração o papel relevante de Ki-67 em células do câncer, em altos níveis de expressão, na compreensão preditiva de alguns pontos como prognóstico, sobrevida e recidiva. Sobre a análise desta expressão em indivíduos com osteossarcoma, as conclusões divergem de um estudo para outro, tornando indefinido o real papel da Ki-67 no prognóstico dos pacientes com tal enfermidade (ZENG *et al.*, 2021).

Em indivíduos com câncer de próstata, a presença da expressão de Ki-67 nas células cancerígenas pode estar relacionada a um aumento na probabilidade de o paciente vir a óbito. Estudos recentes, confirmaram esta afirmativa, demonstrando a relação do aumento da expressão de Ki-67 com a

elevação no perigo de morte em pacientes com câncer de próstata (TOLLEFSON *et al.*, 2014; SHAHAIT *et al.*, 2018).

A expressão significativa de Ki-67 pode desempenhar um papel agressivo em pacientes com carcinoma escamoso pulmonar, sendo também associada à colonização metastática nos linfonodos em casos de carcinoma gástrico e câncer de mama, e ao aumento da chance de mortalidade em indivíduos com câncer de bexiga, mama e próstata (WEI *et al.*, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- ❖ Avaliar a expressão das proteínas Ciclina D1 e Ki-7, no adenocarcinoma colorretal e correlacionar com dados clínico-patológicos.

3.2 Específicos

- ❖ Fazer a caracterização sociodemográfica de pacientes com câncer colorretal do Hospital Universitário Lauro Wanderley e do Hospital Napoleão Laureano, em João Pessoa - PB;
- ❖ Analisar a expressão das proteínas Ciclina D1 e Ki-67 em amostras de câncer colorretal;
- ❖ Correlacionar a imunoexpressão de Ciclina D1 e Ki-67 com as características clinicopatológicas dos pacientes com câncer colorretal;
- ❖ Verificar a relação dos níveis do antígeno carcinoembrionário (CEA) com a imunoexpressão de Ciclina D1 e Ki-67;
- ❖ Identificar outras associações clínico-patológicas relevantes para o prognóstico dos pacientes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi desenvolvido após apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG (ANEXO I), sob parecer: 5.017.299.

4.2 Coleta de dados clínicos e obtenção de amostras dos pacientes

Foram selecionados casos de pacientes com câncer colorretal que foram atendidos no Hospital Universitário Lauro Wanderley – HULW (2018-2022) e no Hospital Napoleão Laureano – HNL (2022-2023), ambos no município de João Pessoa, Paraíba. Foram avaliados ao todo 66 pacientes, sendo 43 do HULW e 23 do HNL, submetidos a cirurgia eletiva ou cirurgias de urgência entre os anos de 2018 e 2023.

Foram excluídos do estudo pacientes com histórico de polineuropatia amiloidótica familiar (PAF), câncer colorretal hereditário não polipose (CCHNP), doença inflamatória intestinal – retocolite ulcerativa ou doença de Crohn, história de CCR sincrônico ou prévio, submetido a radio e/ou quimioterapia neoadjuvantes, com indisponibilidade de dados completos em prontuário médico.

Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos através de seus prontuários clínicos. Foram coletados dados referentes ao gênero biológico, idade, cor, escolaridade, localização do tumor (direito, esquerdo e reto), tamanho do tumor (maior ou menor que 5 cm), grau histológico (pouco, moderadamente e bem diferenciado), tipo histológico (tubular e misto), metástase em órgãos linfáticos e em outros órgãos, estadiamento patológico (grau 0 – IV) e níveis de expressão do CEA (abaixo ou acima de 4,0 ng/mL).

4.3 Processamento e análises das amostras para imunohistoquímica

Após a obtenção dos blocos de parafina, que contém o tumor primário dos pacientes. Foram realizados cortes de 4 µm e preparados conforme

protocolo descrito por REF., sumarizado a seguir. Os cortes foram adicionados em lâminas pré-tratadas com 10% de poli-L-lisina e deixados a 60°C por 24 h. Para retirar a parafina do tecido, foram realizados 3 banhos com xilol por 10 min, seguidos por reidratação com concentrações decrescentes de etanol (90, 80, 70%) por 3 min cada. Em seguida, as secções foram lavadas com água destilada.

A recuperação antigênica aconteceu por meio da digestão com tripsina, realizada depois do aquecimento a 37°C em uma solução de 0,1% de tripsina com 0,1% de cloreto de cálcio em pH 7,8. As lâminas foram incubadas na solução por 30 min a 37°C e, em seguida, lavadas com água destilada. A exposição aos antígenos em alta temperatura (100°C) foi realizada por incubação, com um tampão contendo 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) disposto em um ângulo de 45° em forno microondas, em potência média por cinco minutos e cinquenta segundos, seguido por oito minutos em baixa potência (Panasonic, forno de micro-ondas de 1.500W).

Após a recuperação dos sítios antigênicos, o bloqueio da peroxidase endógena foi continuado com H₂O₂ a 3%. Após 10 minutos de incubação, as lâminas foram lavadas com água destilada e com solução salina tamponada com fosfato (PBS) em pH 7,2. Os cortes foram incubados por uma hora com antígeno primário Anti-Ciclina D1 e Anti-Ki-67 biotinilados por 1 h, seguido de lavagem com PBS e incubação posterior com estreptavidina conjugada com peroxidase. Após 10 minutos de incubação, as lâminas foram lavadas em PBS e uma solução com diaminobenzidina (DAB). Após a lavagem em água destilada, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris e eosina por 15 segundos, lavadas em água e imersas em uma solução de amônia a 37 mM. Após o contra-coloração, as lâminas foram lavadas em água morna, seguidas de desidratação em concentrações crescentes de etanol (80%, 90% e puro, respectivamente) por três minutos em cada diluição. Após dois tratamentos por cinco minutos em xileno, as seções foram cobertas por finas lâminas montadas em bálsamo do Canadá.

As lâminas foram analisadas em microscopia óptica, com o objetivo de avaliar a expressão da Ciclina D1 e da proteína Ki-67. As lâminas são examinadas ao microscópio BX46 DA OLYMPUS nos aumentos de 100, 200 e

400x, pesquisando as células coradas e estimando o percentual (estimativa visual) em 10 campos de grande aumento (400x).

Para análise dos dados de imunohistoquímica, considerou-se como desfecho a positividade para Ciclina D1, e a positividade para Ki-67. Quanto maior a expressão de Ciclina D1 e Ki-67, maior é a coloração amarronzada evidenciada nas lâminas. Foi considerada uma expressão positiva para Ciclina D1 e Ki-67 aqueles pacientes que estiveram enquadrados nos níveis 2, 3 e 4. Já aqueles classificados na categoria 1 foram julgados exibindo uma expressão negativa para tais marcadores. Pacientes enquadrados na categoria 0 não apresentaram expressão para as proteínas Ciclina D1 e Ki-67. Para realizar a análise imunohistoquímica das lâminas histológicas, foi considerado uma média Cut Off (em concordância com o trabalho de Wang *et al.*, 2017 sobre P53), que serviu de parâmetro para classificar os pacientes em cinco categorias, de acordo com a porcentagem de expressão para os alvos do presente estudo (Ciclina D1 e Ki-67): 0 (0%), 1 ($\leq 10\%$), 2 ($\leq 50\%$), 3 ($\leq 80\%$) e 4 ($> 80\%$).

4.4 Análise estatística

A análise estatística foi feita com o auxílio do aplicativo IBM SPSS Statistics 22. Na análise univariada, foram estimadas as frequências absolutas e relativas para variáveis categóricas, média e desvio padrão para as variáveis quantitativas. Na análise bivariada foi realizado o teste de associação denominado de Qui-quadrado de Independência, a fim de verificar se duas variáveis categóricas são independentes ou não. No caso das variáveis com apenas duas possibilidades de respostas, o aplicativo fornece a opção de escolha do resultado, de acordo com a contagem mínima esperada (acima de 5 – Qui-quadrado de Pearson; abaixo de 5 – Exato de Fisher). As associações foram consideradas significativas quando o valor de $p < 0,05$.

4.5 Financiamento

A pesquisa fez parte de um projeto temático maior, financiado pela Fapesq (edital nº005/2020, termo de outorga nº 10/2021), intitulado:

“PROSPECÇÃO DE NOVOS MARCADORES DIAGNÓSTICOS PARA O CÂNCER COLORRETAL E CONTRIBUIÇÃO NA PREVENÇÃO DA MORTALIDADE POR ESTA DOENÇA NO SUS”, sendo o responsável a Profa. Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização dos pacientes

A distribuição do CCR foi maior em pacientes do gênero feminino, trinta e quatro (51,5%) contra trinta e dois do gênero masculino (48,5%). A média de idade dos pacientes acometidos foi de $67,09 \pm 12,1$ anos, variando entre 35 e 95 anos. Para facilitar a análise os pacientes foram separados em dois grupos, de acordo com a faixa etária: 1) jovem/adulto (pessoas com menos de 60 anos) e 2) idoso (público acima de 60 anos). No grupo 1 foram registrados treze pacientes (19,7%), enquanto que cinquenta e duas pessoas (78,8%) no grupo 2 (Tabela 1).

Em relação a cor da pele, seis pessoas (9,1%) se identificaram como sendo da cor branca, em contrapartida, um número significativo de cinquenta e um pacientes (77,3%) se identificou como sendo da cor parda. Neste estudo, nove pacientes (13,6%) não informaram a cor da pele (Tabela 1).

Com relação ao nível de escolaridade, vinte e nove (43,9%) pacientes não possuem ensino médio completo, entre analfabetos, alfabetizados com ensino fundamental incompleto, ensino fundamental completo e ensino médio incompleto. Outros doze pacientes (18,2%) informaram que possuem o ensino médio completo. E um número reduzido de quatro pacientes (6,1%) concluíram o ensino superior. Vinte e um pacientes deste estudo (31,8%) não informaram o nível de escolaridade (Tabela 1).

Sobre o local onde o tumor teve origem, vinte e nove pacientes (43,9%) receberam o diagnóstico de tumor no lado direito do intestino grosso, envolvendo uma ou mais das seguintes estruturas: ceco, cólon ascendente e cólon transverso. Trinta e um indivíduos (47%) foram diagnosticados com tumor no lado esquerdo do intestino grosso, atingindo uma ou mais das seguintes partes: cólon descendente e cólon sigmóide. Seis pacientes (9,1%) apresentaram tumor na região do reto.

Em relação ao tamanho do tumor, os pacientes que apresentaram o tumor com diâmetro menor que 5 cm foram vinte e um (31,8%), e aqueles em que a massa tumoral foi maior que 5 cm foram trinta e oito (57,6%). Esta

informação não foi encontrada em sete casos (10,6%) dos sessenta e seis envolvidos neste estudo (Tabela 1).

Sobre a colonização metastática para órgãos linfáticos, vinte e sete pacientes (40,9%) apresentaram a presença de metástase nestes locais, enquanto que em trinta e três casos (50%) não foi visualizada tal invasão. Esta informação não foi encontrada em seis (9,1%) dos sessenta e seis casos deste estudo (Tabela 1).

Em seis pacientes (9,1%) foram registradas metástases em outros órgãos diferentes do local de origem, enquanto que em cinquenta e cinco indivíduos (83,3%) tal colonização metastática não foi visualizada. Não foi encontrada esta informação em cinco (7,6%) do total de casos envolvidos neste estudo (Tabela 1).

Quanto ao grau histológico dos tecidos afetados. Apenas quatro (6,1%) pacientes apresentaram o tumor pouco diferenciado, enquanto cinquenta e oito (87,9%) foram moderadamente e/ou bem diferenciado. O grau histológico não foi encontrado nos prontuários de quatro pacientes (6,1%) (Tabela 1).

Segundo o tipo histológico identificado nos pacientes, cinquenta pacientes (75,8%) foram classificados como tecido tubular e quinze indivíduos (22,7%) foram classificados como misto. Em apenas um caso (1,5%) a informação não foi encontrada (Tabela 1).

Fazendo a determinação do estadiamento patológico dos pacientes, (0 a IV). Um paciente (1,5%) foi classificado no grau 0, sete pacientes (10,6%) foram agrupados no grau 1, vinte e sete pessoas (40,9%) se encaixaram no grau 2, vinte e um indivíduos (31,9%) tiveram grau 3, e dois pacientes (3%) foram diagnosticados no grau 4. Oito casos (12,1%) não foram classificados em nenhuma das categorias, de acordo com o nível da neoplasia (Tabela 1).

Sobre os níveis sanguíneos do marcador tumoral (CEA), foi feita uma divisão de pacientes que apresentaram uma concentração abaixo de 4,0 ng/mL e aqueles com concentrações acima (> 4,0 ng//mL). Do total de sessenta e seis pacientes, vinte (30,3%) foram classificados no primeiro grupo e vinte e um (31,8%) no segundo. Tal informação não foi encontrada no prontuário de vinte e cinco pacientes (37,9%) (Tabela 1).

As características clínico-patológicas estão agrupadas na Tabela 1.

Tabela 1: Características sociodemográficas e clínicas das amostras de pacientes com CCR (n=66).

CARACTERÍSTICAS	N	%
SEXO		
MASCULINO	32	48,5
FEMININO	34	51,5
IDADE		
> 60 anos	52	78,8
< 60 anos	13	19,7
N.I.	1	1,5
COR		
BRANCA	6	9,1
PARDA	51	77,3
N.I.	9	13,6
ESCOLARIDADE		
1º GRAU COMPLETO/ INCOMPLETO	29	43,9
2º GRAU COMPLETO	12	18,2
SUPERIOR	4	6,1
N.I.	21	31,8
LOCALIZAÇÃO		
LADO DIREITO	29	43,9
LADO ESQUERDO	31	47
RETO	6	9,1
TAMANHO DO TUMOR		
< 5,0 cm	21	31,8
> 5,0 cm	38	57,6
N.I.	7	10,6
METÁSTASE EM LINFONODOS		
AUSENTE	33	50
PRESENTE	27	40,9
N.I.	6	9,1
METÁSTASE EM OUTROS ÓRGÃOS		
AUSENTE	55	83,3
PRESENTE	6	9,1
N.I.	5	7,6
GRAU HISTOLÓGICO		
POUCO DIFERENCIADO	4	6,1
MODERADAMENTE/ BEM DIFERENCIADO	58	87,9
N.I.	4	6,1
TIPO HISTOLÓGICO		
TUBULAR	50	75,8
MISTO	15	22,7
N.I.	1	1,5
ESTADIAMENTO		
GRAU 0	1	1,5
GRAU I	7	10,6

GRAU II	27	40,9
GRAU III	21	31,9
GRAU IV	2	3
N.I.	8	12,1
MARCADOR CEA		
>4,0 ng/ml	21	31,8
<4,0 ng/ml	20	30,3
N.I.	25	37,9

N.I.: Não Informado.

Fonte: o autor.

5.2 Associações significativas

5.2.1 Localização do tumor

O teste de Qui-Quadrado de Independência mostrou que há associação entre localização do tumor e a ocorrência de metástases em outros órgãos ($p = 0,012$). Observou-se uma associação positiva nos pacientes que exibiram tumores no cólon esquerdo, uma vez que nestes indivíduos não foi detectada a presença de metástase em outros órgãos. Em contrapartida, os pacientes que desenvolveram metástases em outros órgãos apresentaram tumores primários no cólon direito e no reto.

A associação entre a localização do tumor e a presença de metástase em outros órgãos nos pacientes diagnosticados com câncer colorretal está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Comparação da localização do tumor com metástase em outros órgãos nos casos de câncer colorretal.

Variáveis	Localização do Tumor			p – valor
	Direito	Esquerdo	Reto	
Metástase em Outros Órgãos				
Ausente	24 (39,3)	28 (45,9)	3 (4,9)	*0,012
Presente	4 (6,6)	0 (0)	2 (3,3)	

*Qui-quadrado de Pearson.

Fonte: o autor.

5.2.2 Estadiamento patológico

As associações entre o estadiamento patológico e algumas características dos pacientes diagnosticados com câncer colorretal estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Comparação do estadiamento patológico com alguns parâmetros clínicos prognósticos dos casos de câncer colorretal.

Variáveis	ESTADIAMENTO PATOLÓGICO		
	Grau 0/ Grau 1/ Grau 2	Grau 3/ Grau 4	p – valor
Cor			
Branca	5 (10)	0 (0,0)	#0,016
Parda	18 (36)	27 (54)	
Metástase em Linfonodos			
Ausente	20 (35,1)	10 (17,5)	*0,002
Presente	7 (12,3)	20 (35,1)	

*Qui-quadrado de Pearson.

#Exato de Fisher.

Fonte: o autor.

O teste de Qui-Quadrado de Independência mostrou que há associação do estadiamento patológico com a cor da pele ($p = 0,016$) e com a presença de metástase em linfonodos ($p = 0,002$).

5.2.3 Marcador CEA

As associações entre o nível de marcação do CEA com algumas características dos pacientes diagnosticados com câncer colorretal estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Comparação do marcador tumoral (CEA) com alguns parâmetros clínicos prognósticos dos casos de câncer colorretal.

Variáveis	CEA		p – valor
	<4,0 ng/mL	>4,0 ng/mL	
Cor			
Branca	4 (11,1)	0 (0,0)	#0,031
Parda	12 (33,3)	20 (55,6)	
Metástase em Linfonodos			
Ausente	14 (38,9)	5 (13,9)	*0,021
Presente	6 (16,7)	11 (30,5)	

Estadiamento			
Grau 0, I, II	12 (33,3)	5 (13,9)	*0,086
Grau III e IV	8 (22,2)	11 (30,6)	

*Qui-quadrado de Pearson.

#Exato de Fisher.

Fonte: o autor.

O teste de Qui-Quadrado de Independência mostrou que há associação da marcação do CEA com a cor da pele ($p = 0,031$) e com a ocorrência de metástase em órgãos linfáticos ($p = 0,021$). Não foi verificada uma associação entre o estadiamento e o marcador tumoral, embora foi notada uma certa tendência para uma possível associação ($p = 0,086$).

5.3 Avaliação da expressão das proteínas por imunohistoquímica

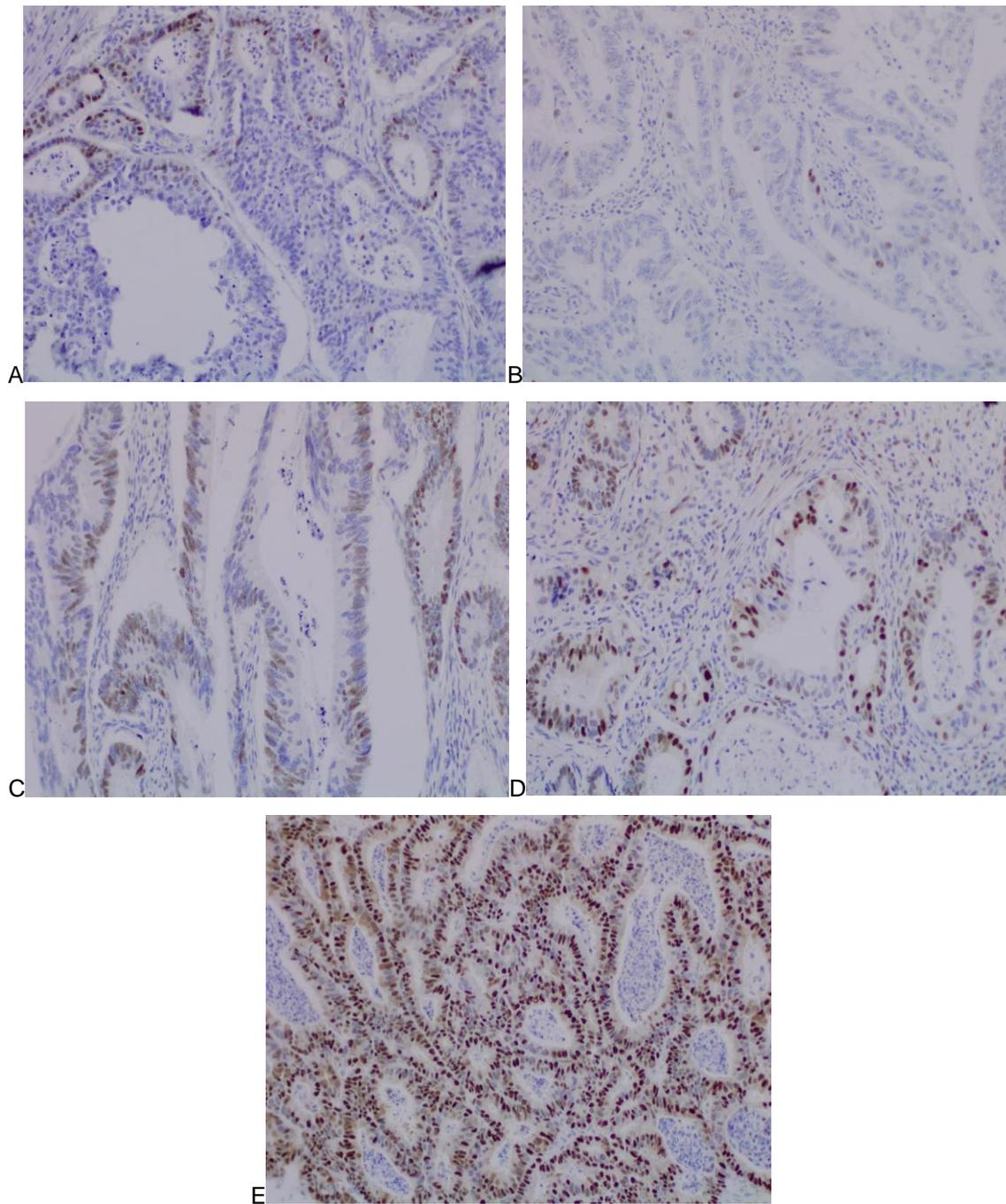
5.3.1 Expressão da Ciclina D1

Em 42 (63,6%) dos 66 cortes histológicos dos tecidos dos pacientes analisados, foi registrada a positividade para a expressão de Ciclina D1, enquanto que nos outros 24 (36,4%) não foi verificada tal expressão.

As expressões do antígeno Ciclina D1 nas lâminas de imunohistoquímica dos pacientes, de acordo com as porcentagens de expressão, estão descritas de uma forma geral na Tabela 5.

Nível 1 de expressão de Ciclina D1 foi encontrada em 22 pacientes (33,3%), nível 2 em 19 (28,8%), nível 3 em 19 (28,8%) e nível 4 em 4 (6,1%). Não foi encontrada expressão em 2 (3%) pacientes. A expressão da proteína Ciclina D1, nas cinco categorias estabelecidas, está ilustrada na Figura 6.

Figura 6: Expressão imunohistoquímica do antígeno Ciclina D1 em tecido de câncer colorretal.



A. Categoria 0 (0%). B. Categoria 1 ($\leq 10\%$). C. Categoria 2 ($\leq 50\%$). D. Categoria 3 ($\leq 80\%$). E. Categoria 4 ($> 80\%$). Todas as categorias com aumento de 400x. As células com o antígeno Ciclina D1 no estado de super expressão são visualizadas com a cor marrom.
Fonte: o autor.

Tabela 5. Expressão da proteína Ciclina D1 nos pacientes.

PROTEÍNA	NÍVEL DE EXPRESSÃO	N	%	MARCAÇÃO DE ANTÍGENO	N	%
Ciclina D1	0	2	3	negativa	24	36,4
	1	22	33,3			
	2	19	28,8	positiva	42	63,6
	3	19	28,8			
	4	4	6,1			

Fonte: o autor.

5.3.2 Associações da expressão da Ciclina D1 com as características clínico-patológicas

As associações entre a expressão da proteína Ciclina D1 com as características epidemiológicas dos pacientes diagnosticados com câncer colorretal estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6. Comparação do nível da expressão de Ciclina D1, de acordo com parâmetros clínicos prognósticos dos casos de câncer colorretal.

Variáveis	Expressão de Ciclina D1		
	Positiva n (%)	Negativa n (%)	p – valor
Localização			
Direito	20 (30,3)	9 (13,6)	*0,057
Esquerdo	16 (24,3)	15 (22,7)	
Reto	6 (9,1)	0 (0)	
Tamanho			
<5cm	13 (22)	8 (13,6)	*0,765
>5cm	25 (42,4)	13 (22)	
Metástase em Linfonodos			
Ausente	21 (35)	12 (20)	*0,957
Presente	17 (28,3)	10 (16,7)	
Metástase em Outros Órgãos			
Ausente	34 (55,7)	21 (34,4)	#0,404
Presente	5 (8,2)	1 (1,7)	
Grau Histológico			
Pouco diferenciado	2 (3,2)	2 (3,2)	#0,610
Moderadamente/	38 (61,3)	20 (32,3)	

Bem diferenciado			
Tipo Histológico			
Tubular	34 (52,3)	16 (24,6)	*0,297
Misto	8 (12,3)	7 (10,8)	
Estadiamento			
Grau 0/ Grau 1/ Grau 2	21 (36,2)	7 (12,1)	*0,086
Grau 3/ Grau 4	16 (27,6)	14 (24,1)	
Marcador CEA			
>4,0 ng/mL	16 (39)	5 (12,2)	*0,655
<4,0 ng/mL	14 (34,2)	6 (14,6)	

*Qui-quadrado de Pearson.

#Exato de Fisher.

Fonte: o autor.

O Teste do Qui-quadrado de Independência mostrou que não houve associação da marcação da Ciclina D1 com nenhuma das variáveis analisadas.

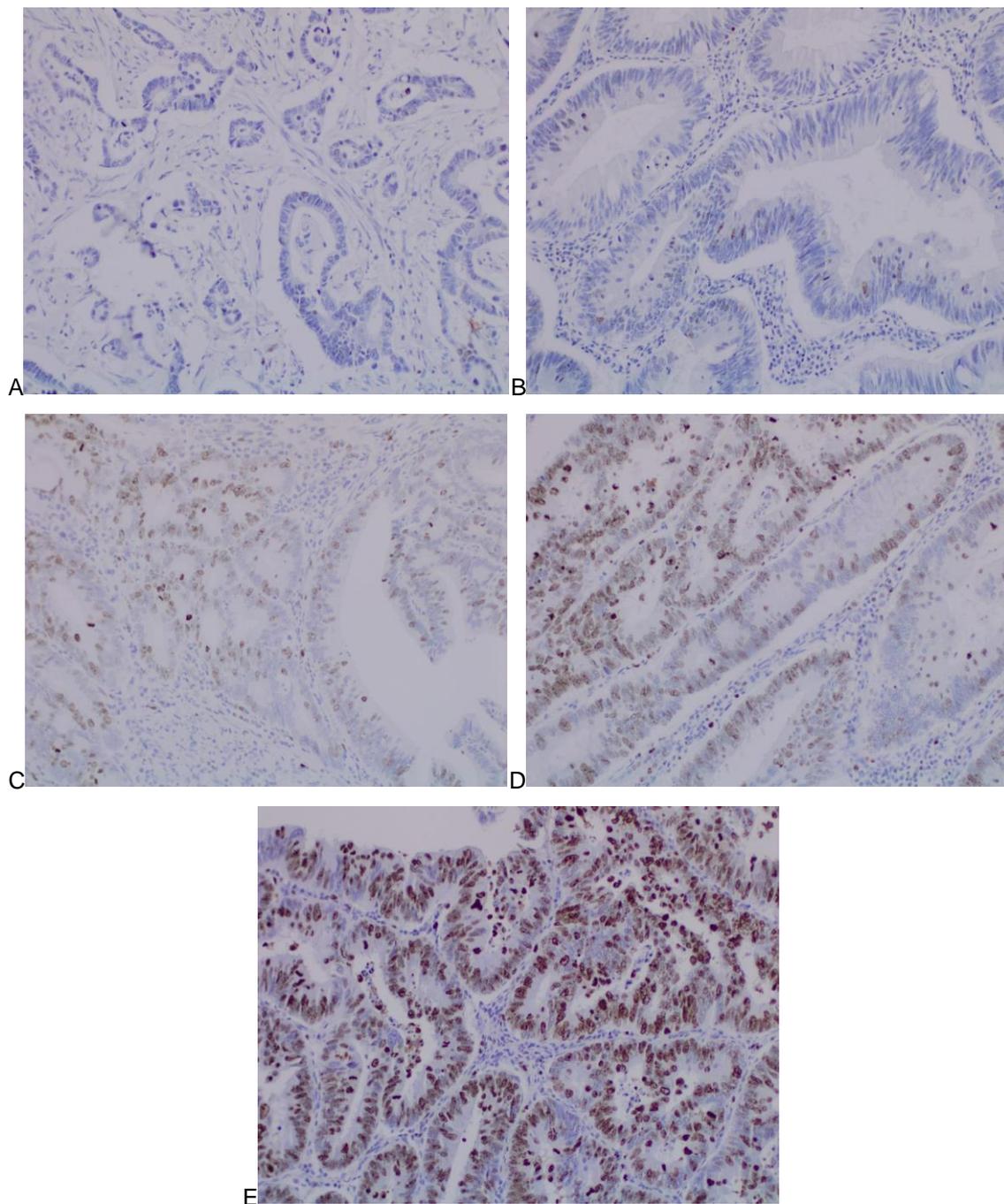
5.3.3 Expressão de Ki-67

Em 43 (65,2%) dos 66 cortes histológicos dos tecidos dos pacientes analisados, foi registrada a positividade para a expressão de Ki-67, enquanto que nos outros 23 (34,8%) não foi verificada tal expressão.

As expressões do antígeno Ki-67 nas lâminas de imunohistoquímica dos pacientes, de acordo com as porcentagens de expressão, estão descritas de uma forma geral na Tabela 7.

Nível 1 de expressão de Ki-67 foi encontrada em 22 pacientes (33,3%), nível 2 em 14 (21,2%), nível 3 em 15 (22,7%) e nível 4 em 14 (21,2%). Não foi encontrada expressão de Ki-67 em apenas um paciente. O grau de expressão tecidual da proteína Ki-67 está ilustrada na Figura 7.

Figura 7: Expressão imunohistoquímica do antígeno Ki-67 em tecido de câncer colorretal.



A. Categoria 0 (0%). B. Categoria 1 ($\leq 10\%$). C. Categoria 2 ($\leq 50\%$). D. Categoria 3 ($\leq 80\%$). E. Categoria 4 ($> 80\%$). Todas as categorias com aumento de 400x. As células com o antígeno Ki-67 no estado de super expressão são visualizadas com a cor marrom.
Fonte: o autor.

Tabela 7. Expressão da proteína Ki-67 nos pacientes.

ANTÍGENO	NÍVEL DE EXPRESSÃO	N	%	MARCAÇÃO DE ANTÍGENO	N	%
KI-67	0	1	1,5	NEGATIVA	23	34,8
	1	22	33,3			
	2	14	21,2	POSITIVA	43	65,2
	3	15	22,7			
	4	14	21,2			

Fonte: o autor.

5.3.4 Associações da expressão de Ki-67 com as características clínico-patológicas

As associações entre a expressão da proteína Ki-67 com as características epidemiológicas dos pacientes diagnosticados com câncer colorretal estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8. Comparação do nível da expressão de Ki-67, de acordo com parâmetros clínicos prognósticos dos casos de câncer colorretal.

Variáveis	Expressão de Ki-67		
	Positiva	Negativa	p – valor
Localização	n (%)	n (%)	
Direito	18 (27,3)	11 (16,6)	*0,171
Esquerdo	19 (28,8)	12 (18,2)	
Reto	6 (9,1)	0 (0)	
Tamanho			
<5cm	14 (23,7)	7 (11,9)	*0,890
>5cm	26 (44,1)	12 (20,3)	
Metástase em Linfonodos			
Ausente	23 (38,3)	10 (16,7)	*0,399
Presente	16 (26,7)	11 (18,3)	
Metástase em Outros Órgãos			
Ausente	34 (55,8)	21 (34,4)	#0,085
Presente	6 (9,8)	0 (0)	
Grau Histológico			
Pouco	1 (1,6)	3 (4,8)	#0,140

diferenciado			
Moderadamente/ Bem diferenciado	38 (61,3)	20 (32,3)	
Tipo Histológico			
Tubular	34 (52,3)	16 (24,6)	*0,297
Misto	8 (12,3)	7 (10,8)	
Estadiamento			
Grau 0/ Grau 1/ Grau 2	19 (32,8)	9 (15,5)	*0,534
Grau 3/ Grau 4	18 (31)	12 (20,7)	
Marcador CEA			
>4,0 ng/mL	17 (41,5)	4 (9,7)	*0,141
<4,0 ng/mL	12 (29,3)	8 (19,5)	

*Qui-quadrado de Pearson.

#Exato de Fisher.

Fonte: o autor.

O teste de Qui-Quadrado de Independência mostrou que não houve associação da marcação de Ki-67 com nenhuma das variáveis analisadas.

5.3.5 Associação entre a expressão de Ciclina D1 X Ki-67

Houve forte associação entre a expressão das proteínas Ciclina D1 e Ki-67 ($p = 0,001$).

A associação entre a expressão das proteínas está descrita na Tabela 9.

Tabela 9. Comparação do nível da expressão de Ciclina D1 com o nível da expressão de Ki-67.

Variáveis	Expressão de Ki-67		
	Positiva n (%)	Negativa n (%)	p – valor
Expressão de Ciclina D1			
Positiva n (%)	35 (53)	7 (10,6)	*0,001
Negativa n (%)	8 (12,1)	16 (24,3)	

*Qui-quadrado de Pearson.

Fonte: o autor.

6. DISCUSSÃO

Dentre os sessenta e seis pacientes inseridos neste trabalho, cinquenta e dois são considerados idosos. Akimoto e colaboradores (2021) ressaltam a incidência do CCR em um público considerado idoso, evidenciado no presente trabalho. No intuito de definir subtipos de CCR, eles utilizaram dois termos distintos para os pacientes mais jovens/adultos e pessoas acima dos 60 anos: CCR de início precoce e CCR de início tardio, respectivamente. Um crescimento no número de casos de CCR em indivíduos mais jovens (20 – 29 anos) ou na fase adulta (30 – 49 anos) já vem sendo registrado na literatura (KANTH; INADOMI, 2021).

Verificou-se a participação de treze pacientes em uma faixa etária adulta. Em sua pesquisa, Low e colaboradores (2020) também notificaram um avanço no número de ocorrências de CCR em indivíduos com menos de 60 anos, e também de mortalidade, nestes pacientes mais jovens. Dentre o montante de casos levados em consideração no seu estudo, foi registrada uma média de idade de 45 anos, sendo a maioria do sexo masculino. Semelhantemente, nossos resultados mostraram que a grande maioria dos pacientes, de cada um dos gêneros, já estão em uma faixa etária acima dos 60 anos, a média de idade dos pacientes do nosso estudo foi de $67,09 \pm 12,1$ anos, variando entre 35 e 95 anos.

Burnett-Hartman e colaboradores (2021) relataram em seu estudo um crescimento de casos de CCR em pacientes na fase jovem ou adulta nas últimas décadas. Tais autores expressam uma forte preocupação em relação a tal situação, uma vez que, esta enfermidade vem atingindo pessoas, agora já em diversas faixas etárias. Realmente, há uma necessidade de alerta sobre a incidência de CCR em indivíduos jovens ou adultos, baseada em dados recentes citados acima, já sendo o suficiente para gerar um despertar na população sobre o aumento dos cuidados preventivos a fim de evitar um problema indesejável como o CCR.

Neste trabalho, o número de pacientes do sexo masculino e sexo feminino foram bem próximos, com uma diferença de dois pacientes entre os gêneros biológicos. Akimoto e colaboradores (2021) enfatizam o aumento de casos de CCR tanto em indivíduos do sexo masculino quanto do sexo feminino

em diversos locais espalhados por todo o mundo. No entanto, em seus estudos, Gausman e colaboradores (2020) verificaram uma contagem crescente de casos de CCR, tanto de início precoce quanto de início tardio, em homens. A maioria destes pacientes do sexo masculino se declarando negros ou asiáticos e possuindo registros de CCR no contexto familiar. No estudo de Yu e Zhang (2020), 44,6% do número dos pacientes foram homens, enquanto que as mulheres representaram a maioria dos casos com uma porcentagem de 55,4%.

A grande maioria dos pacientes que participaram deste estudo se identificaram sendo da cor parda. Uma pequena minoria se apresentou sendo de cor branca. A grande maioria dos pacientes de cor parda não apresentaram altos níveis de escolaridade, possuindo apenas 1º grau completo ou incompleto. Lima e Villela (2021) analisaram em seu estudo que pacientes diagnosticados com câncer de cólon e de reto, em uma faixa etária idosa, que se declararam com cor preta ou parda e apresentando baixa escolaridade ou sendo analfabetos, experimentaram maiores dificuldades no acesso ao tratamento desta patologia.

O presente estudo expôs uma predominância de pacientes com CCR com ensino fundamental incompleto ou completo, enquanto que uma pequena porcentagem de indivíduos possui ensino superior. Kuo e colaboradores (2021) afirmaram em sua pesquisa que existe um impacto por parte do nível educacional sobre a ocorrência de câncer colorretal. Pacientes com ensino superior exibiram menor risco de desenvolvimento desta patologia em relação aos indivíduos com ensino fundamental. Este efeito provocado pela idade foi bem mais evidente nos casos abaixo dos 65 anos, ou seja, numa população mais recente e com mais acesso à educação. Dos 4 pacientes com ensino superior incluídos neste estudo, apenas um encontra-se abaixo dos 60 anos, enquanto que os outros três já desfrutam da fase idosa da vida.

Neste estudo, um total de sessenta pacientes foram diagnosticados com tumores na região do cólon, havendo uma discreta predominância para o cólon esquerdo. Segundo uma pesquisa desenvolvida por Gausman e colaboradores (2020), o CCR em indivíduos mais jovens ou na fase adulta foi visualizado principalmente nas regiões do cólon esquerdo e reto. Yu e Zhang (2020) detectaram em sua pesquisa que a maioria significativa dos pacientes

envolvidos no estudo (81,9%) apresentou câncer na região do cólon. Em contrapartida, uma minoria de 18,1% exibiu câncer na região do reto.

Yu e Zhang (2020) descrevem em seu trabalho que a maioria dos pacientes com CCR apresentaram uma estrutura tumoral com tamanho inferior a 6 cm. Os resultados do presente estudo trouxeram outra visão, já que a maioria dos casos desenvolveram tumores acima de 5 cm.

O presente estudo verificou uma certa equivalência de casos que apresentaram metástase em órgãos linfáticos e que não desenvolveram este tipo de invasão. Todavia, houve uma predominância de casos que não exibiram esta colonização metastática.

De acordo com Chen *et al.* (2021), um dos fatores preditivos para a avaliação de um paciente com CCR é o comprometimento dos linfonodos. Tal fator está intimamente relacionado a outros fatores como estadiamento patológico e grau histológico. Segundo eles, a sobrevida livre de até cinco anos foi mais evidenciada em pacientes que não apresentaram metástase em órgãos linfáticos. Cerca de 30 a 35% dos pacientes envolvidos, e que exibiram metástase em linfonodos, desenvolveram recidivas, principalmente nos três primeiros anos após a cirurgia de retirada do tumor. Estes autores afirmaram que quanto maior a quantidade de linfonodos comprometidos, pior é o prognóstico apresentado pelos pacientes com CCR.

A pesquisa de Resch e Langner (2013), gerou resultados semelhantes aos citados acima, uma vez que, a maioria dos casos que apresentaram metástase nos linfonodos exibiram pior prognóstico, resultando num quadro clínico antagônico. Eles enfatizaram a recomendação de análise mínima de 12 linfonodos, no momento da avaliação do sistema linfático, para garantir que informações sobre estadiamento e prognóstico sejam as mais acertadas possíveis, levando em consideração o fato de que a colonização metastática em linfonodos é um quesito definitivo no uso de quimioterapia como tratamento alternativo.

Os dados deste trabalho mostraram que a maioria significativa de casos de CCR não desenvolveram metástases em outros locais do organismo. Bhullar *et al.* (2019) afirmaram em sua pesquisa que metade dos casos de CCR (50%) que passaram pelo procedimento cirúrgico de retirada tumoral

exibiram metástases em um período de até 5 anos. Geralmente, os locais mais afetados foram órgãos linfáticos, fígado e pulmão.

A grande maioria dos casos deste estudo apresentaram um grau histológico moderadamente diferenciado ou bem diferenciado. Yamada *et al.* (2020) estudaram o impacto de características clínicas de pacientes com CCR nos efeitos terapêuticos de fluoropirimidinas, chegando a conclusão de que os pacientes com grau histológico pouco diferenciado apresentaram menores chances de sobrevivência global do que os indivíduos com grau histológico bem diferenciado.

Esta pesquisa registrou uma predominância do tipo histológico tubular nos pacientes recrutados. Jiang *et al.* (2023) mostraram em sua pesquisa, resultados que apontam para um decréscimo, visualizado nos últimos anos, de casos de câncer colorretal mucinosos em todas as faixas etárias.

A maioria dos pacientes com CCR estudados por Zhuang *et al.* (2021) foram enquadrados nos estágios III e IV, havendo uma maior prevalência de casos no estágio III. No presente estudo, a maioria dos pacientes diagnosticados com CCR no HNL e no HULW foram enquadrados nos estágios II e III, havendo uma prevalência de casos no estágio II. Tal resultado pode ser explicado pelo fato de que ainda existe uma deficiência no acesso à informação de saúde preventiva por parte de uma camada da população mais carente e com baixo nível de escolaridade.

Em relação às outras associações realizadas neste estudo, verificou-se uma associação significativa entre a marcação do CEA e a presença de metástase em linfonodos, mostrando que a presença do marcador CEA está relacionada à recidiva ou pior prognóstico. Gao *et al.* (2018) alegam que o antígeno carcinoembrionário (CEA) faz toda uma diferença quando analisado em pacientes com algum tipo de neoplasia. Os autores levaram em consideração valores de referência entre 0 – 3,40 ng/mL. Valores registrados acima desta média foram considerados como positivos. Eles perceberam que os pacientes com CEA positivo exibiram maiores chances de colonização metastática em linfonodos e outros órgãos. Diante disso, compreenderam a importância deste marcador tanto no diagnóstico, como no estadiamento patológico, a fim de proporcionar melhores caminhos que levem ao tratamento com respostas curativas.

Nesse trabalho, foi estabelecido como positivo a concentração acima de 4,0ng/mL. Houve uma semelhança na quantidade de casos com resultados abaixo ou acima de 4,0ng/mL, havendo uma maioria de casos com concentrações acima desta média, com diferença de um único paciente. Já os casos que não relataram o resultado deste exame superaram a quantidade de pacientes classificada em cada um dos dois grupos.

Não houve associação significativa entre a expressão de Ciclina D1 e os níveis elevados de CEA (> 4,0 ng/mL). Todavia, foi verificada uma possível associação (já que o valor de p foi um pouco maior que 0,05) entre a expressão de Ki-67 com os níveis elevados de CEA. A maioria dos pacientes com positividade para Ki-67 exibiram níveis do CEA acima de 4,0 ng/mL. Sun *et al.* (2022) destacaram que o CEA não é o exame mais adequado para a descoberta precoce de CCR ou detecção de uma colonização metastática, expondo algumas desvantagens, incluindo o custo elevado e uma percepção não clara sobre eventuais lesões no organismo. Em concordância, Hu *et al.* (2022) registraram que o CEA não se trata de um exame com alta especificidade, embora seja um biomarcador já bem estabelecido no tratamento e monitoramento de neoplasias em humanos. Em contrapartida, Primrose *et al.* (2014,) em seu estudo, enfatizaram a importância do CEA como biomarcador para ações como monitoramento e avaliação prognóstica em pacientes com CCR.

O presente trabalho verificou que, a maioria dos casos de CCR incluídos nesta pesquisa foram positivos para a marcação de Ciclina D1. Não houve associação significativa entre a expressão positiva de Ciclina D1 com as variáveis clínico-patológicas analisadas. O próprio número de pacientes envolvidos nesta pesquisa pode estar relacionado com essa não associação entre a proteína-alvo (Ciclina D1) e as características selecionadas, sendo, talvez, necessário aumentar o número amostral, a fim de que associações significativas sejam visualizadas.

Jun e colaboradores (2023) avaliaram a expressão de Ciclina D1 em um grupo de pacientes diagnosticados com CCR e perceberam uma maior expressividade desta proteína na região tumoral do que nas regiões consideradas saudáveis. A partir de seus resultados, eles concluíram que a Ciclina D1 se comportou como um marcador prognóstico positivo, atuando

como um agente preditor para situações como sobrevida global e sobrevida livre de progressão. Dessa forma, os pacientes que demonstraram uma positividade expressiva em relação à marcação de Ciclina D1 exibiram maiores chances de recuperação, uma vez que houve a possibilidade de detectar com antecedência uma condição tumoral no organismo, mediante a expressão elevada da Ciclina D1, proporcionando aos pacientes a oportunidade de retirar o tumor, antes que avançasse para níveis mais agravantes, principalmente em indivíduos mais jovens.

Em sua pesquisa, Yan, Jiang e Yang (2022) estudaram alguns biomarcadores para câncer colorretal, a exemplo da Ciclina D1. Nesse trabalho, quando superexpressa, esta proteína reduziu as chances de uma maior sobrevida global.

O presente trabalho verificou que, a maioria dos casos de CCR incluídos nesta pesquisa foram positivos para a marcação de Ki-67. Não houve associação significativa entre a expressão de Ki-67 com as variáveis clínico-patológicas analisadas.

Numerosas publicações ao longo dos anos têm discutido o papel da Ki-67 como um marcador de proliferação (MENON *et al.*, 2019; ANDRÉS-SÁNCHEZ; FISHER; KRASINSKA, 2022; KASPRZAK, 2023) e, portanto, como fator prognóstico em muitas doenças, principalmente o câncer incluindo o CCR. Luo *et al.* (2019), investigaram o potencial de Ki-67 como biomarcador para o câncer colorretal. Em sua revisão, eles visualizaram uma associação entre a alta expressão de Ki-67 e um prognóstico ruim em indivíduos diagnosticados com CCR. Com isso, estes autores confirmaram a importância da proteína Ki-67 assumindo o papel de biomarcador na predição de um mau prognóstico, incluindo baixa sobrevida livre, para os casos de CCR.

Zeng *et al.* (2021) realizaram um trabalho semelhante, em osteossarcoma, tumor maligno que atinge os ossos. Eles perceberam uma associação entre os elevados níveis de expressão de Ki-67 com a redução da sobrevida livre e o desenvolvimento de metástases em outros órgãos. Os autores destacaram o valor da proteína Ki-67 como biomarcador para o osteossarcoma.

Shahait *et al.* (2018) estudaram a expressão de Ki-67 em pacientes diagnosticados com câncer de próstata e que foram submetidos a uma cirurgia

de retirada deste órgão (prostatectomia radical). Eles atentaram para os níveis de expressão principalmente numa região conhecida por margem cirúrgica positiva (extensão tumoral no local de corte da cirurgia). Tal região prediz uma possível recidiva. Os autores verificaram que os pacientes que expressaram altos níveis de Ki-67 estavam mais suscetíveis a uma recidiva. Todavia, eles consideraram a necessidade de ampliar o número de pacientes envolvidos na pesquisa, para validar com precisão a afirmação anterior.

No caso do câncer de pulmão, conforme estudo desenvolvido por Wei *et al.* (2018), a expressão de Ki-67 foi mais evidente em pacientes com idade avançada, assim como em casos agrupados nos estágios III e IV. Pacientes que exibiram tumores maiores apresentaram maiores níveis de expressão de Ki-67. Em indivíduos diagnosticados com câncer de mama, de acordo com Liang *et al.* (2020), os altos níveis de expressão de Ki-67 visualizados em alguns pacientes esteve diretamente relacionado à diminuição da sobrevida livre. No estudo realizado por Ahadi *et al.* (2020), a proteína Ki-67 não foi importante no diagnóstico e prognóstico de pacientes com câncer gástrico.

Em um estudo sobre câncer de mama desenvolvido por Ding *et al.* (2020), os pacientes que foram submetidos a um tratamento com quimioterapia neoadjuvante, aplicado antes da retirada completa do câncer do indivíduo, e que exibiram expressão positiva para Ki-67, apresentaram uma elevação no risco de morte.

No presente estudo, voltado para o CCR, a maioria dos pacientes envolvidos exibiram positividade para a marcação de Ciclina D1 e Ki-67. Houve uma associação significativa entre as marcações destes dois antígenos nas amostras analisadas. Provavelmente, isto se deve ao fato de ambos estarem envolvidos no processo de proliferação e multiplicação celular, uma vez que atuam ativamente no controle do ciclo de divisão das células.

7. CONCLUSÃO

Este estudo contou com a participação de pacientes diagnosticados com CCR com média de idade de 67 anos. A maioria dos pacientes exibiram expressão positiva para Ciclina D1 e Ki-67. Não houve associação significativa entre a expressão positiva de Ciclina D1 e de Ki-67 com as variáveis clínico-patológicas analisadas, incluindo os níveis de CEA. Foi verificada uma associação significativa entre a expressão do CEA e a presença de metástase em linfonodos. Tal resultado mostrou que a presença do marcador CEA está relacionada à recidiva ou pior prognóstico, confirmando assim a importância deste marcador para avaliar a situação do paciente com algum tipo de neoplasia. Houve uma forte associação da expressão das proteínas Ciclina D1 e Ki-67, já que estão envolvidas no processo de proliferação, sendo provavelmente este o motivo desta correlação.

8. PERSPECTIVAS

Reunir dados de mais pacientes seria importante, a fim de consolidar os resultados obtidos, e assim, por exemplo, poder confirmar ou não a possível associação da marcação do CEA.

Os dados de pesquisa como esta são baseados em informações de prontuários preenchidos por profissionais da saúde. Como visto nesta pesquisa, muitos deles são incompletos, tornando algumas análises impossíveis. Desta forma, uma política visando melhoria no preenchimento dos dados seria bem-vinda.

REFERÊNCIAS

AHADI, Mahsa *et al.* The Expression of p53, CD44, Ki-67, and HER-2/neu Markers in Gastric Cancer and Its Association with Histopathological Indicators: A Retrospective Study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v. 21, p. 1607-1614, 2020. Disponível em: [10.31557/APJCP.2020.21.6.1607](https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.6.1607). Acesso em: 11 ago. 2023.

AKIMOTO, Naohiko *et al.* Rising incidence of early-onset colorectal cancer: a call for action. **Nature Reviews Clinical Oncology**. v. 18, n. 4, p. 230–243, 2021. Disponível em: [10.1038/s41571-020-00445-1](https://doi.org/10.1038/s41571-020-00445-1). Acesso em: 11 set. 2023.

ALBERTS, Bruce *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

AL-MAGHRABI, Jaudah *et al.* Immunoexpression of cyclin D1 in colorectal carcinomas is not correlated with survival outcome. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**. v. 3, n. 2, p. 62–67, 2015. Disponível em: [10.1016/j.jmau.2015.01.001](https://doi.org/10.1016/j.jmau.2015.01.001). Acesso em: 30 nov. 2023.

ANDRÉS-SÁNCHEZ, Nuria; FISHER, Daniel; KRASINSKA, Liliana. Physiological functions and roles in cancer of the proliferation marker Ki-67. **Journal of Cell Science**. v. 135, n. 11, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jcs.258932>. Acesso em: 01 dez. 2023.

BABIC, Aleksandra *et al.* Decreased ER β expression and high cyclin D1 expression may predict early CRC recurrence in high-risk Duke's B and Duke's C stage. **Journal of the Balkan Union of Oncology**. v. 26, n. 2, p. 536-543, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34077003/>. Acesso em: 08 ago. 2023.

BARTEK, Jiri; LUKAS, Jiri. Cyclin D1 multitasks. **Nature**. vol. 474, p. 171-172, 2011. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/474171a>. Acesso em: 01 dez. 2023.

BARTOLOMEI, Ivan José Paredes *et al.* ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DO BIOMARCADOR CICLINA D1 NOS CARCINOMAS PAPILÍFEROS DE TIREÓIDE E BÓCIOS MULTINODULARES. **SciELO Preprints**. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.4150>. Acesso em: 05 ago. 2022.

BHULLAR, D. S. *et al.* Biomarker concordance between primary colorectal cancer and its metástases. **EBioMedicine**. v. 40, p. 363–374, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.01.050>. Acesso em: 13 set. 2023.

BONNAY, François *et al.* Oxidative Metabolism Drives Immortalization of Neural Stem Cells during Tumorigenesis. **Cell**. v. 182, p. 1490–1507, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.039>. Acesso em: 04 out. 2023.

BRAGA, Lucélia Antunes Coutinho. **Avaliação do perfil de expressão gênica na lateralidade do câncer colorretal humano para um painel de marcadores e produção da proteína recombinante e anticorpos para tetraspanina**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto). Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2020.

BURNETT-HARTMAN, Andrea N. *et al.* An update on the epidemiology, molecular characterization, diagnosis, and screening strategies for early-onset colorectal cancer. **Gastroenterology**. v. 160, n. 4, p. 1041–1049, 2021. Disponível em: [10.1053/j.gastro.2020.12.068](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.12.068). Acesso em: 11 set. 2023.

CAO, Zhi *et al.* Differential Expression and Prognostic Value of Cytoplasmic and Nuclear Cyclin D1 in Prostate Cancer. **BioMed Research International**. v. 2020. p. 1-9. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2020/1692658>. Acesso em: 07 nov. 2022.

CHEN, Kabytto *et al.* Pathological Features and Prognostication in Colorectal Cancer. **Current Oncology**. v. 28, p. 5356-5383, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1718-7729/28/6/447>. Acesso em: 13 set. 2023.

COLAS, Pierre. Cyclin-dependent kinases and rare developmental disorders. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. v. 15, n. 203, 2020. Disponível em: <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13023-020-01472-y>. Acesso em: 04 out. 2023.

DANGELO, José Geraldo; FATTINI, Carlo Américo. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2007.

DING, Lei *et al.* The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**. v.21, n. 1960, 2020. Disponível em: [10.3390/ijms21061960](https://doi.org/10.3390/ijms21061960). Acesso em: 04 out. 2023.

DING, Yuqin *et al.* Impact on survival of estrogen receptor, progesterone receptor and Ki-67 expression discordance pre- and post-neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Plos One**. v.15, n. 4, 2020. Disponível em: [10.1371/journal.pone.0231895](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231895). eCollection 2020. Acesso em: 11 ago. 2023.

DULINSKA-LITEWKA, Joanna *et al.* The role of cyclins in the development and progression of prostate cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 155, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113742>. Acesso em: 04 out. 2023.

FANG, Li *et al.* The expression of microRNA-340 and cyclin D1 and its relationship with the clinicopathological characteristics and prognosis of lung cancer. **Asian Journal of Surgery**. v. 44, n. 11, p. 1363-1369, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.asjsur.2021.02.009>. Acesso em: 08 ago. 2023.

FERLAY, J. *et al.* Global cancer observatory: cancer today. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon, France, 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>. Acesso em: 01 dez. 2023.

GAO, Yanfeng *et al.* Evaluation of Serum CEA, CA19-9, CA72-4, CA125 and Ferritin as Diagnostic Markers and Factors of Clinical Parameters for Colorectal Cancer. **Scientific Reports**. v. 8, n. 2732, 2018. Disponível em: [10.1038/s41598-018-21048-y](https://doi.org/10.1038/s41598-018-21048-y). Acesso em: 23 set. 2023.

GAUSMAN, Valerie *et al.* Risk Factors Associated With Early-onset Colorectal Cancer. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**. v. 18, n. 12, p. 2752–2759, 2020. Disponível em: [10.1016/j.cgh.2019.10.009](https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.10.009). Acesso em: 11 set. 2023.

GO, Se-Il *et al.* Cyclin D1 Serves as a Poor Prognostic Biomarker in Stage I Gastric Cancer. **Current Issues in Molecular Biology**. v. 44, p. 1395-1406, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cimb44030093>. Acesso em: 30 jul. 2022.

GUIMARÃES, Eduardo Pereira. **Análise da expressão imunoistoquímica da ciclina d1 e do ki-67 no carcinoma de células escamosas de língua**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas). Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2014.

GUO, Zi; ZHOU, Guangming; HU, Wentao. Carcinogenesis induced by space radiation: A systematic review. **Neoplasia**. v. 32, n. C, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.100828>. Acesso em: 04 out. 2023.

HAYASHI, Hiromitsu *et al.* Prognostic value of Ki-67 expression in conversion therapy for colorectal liver-limited metastases. **American Journal of Cancer Research**. v. 5, n. 3, p. 1225-1233, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26046001/>. Acesso em: 30 nov. 2023.

HE, Qi *et al.* Clinicopathological and prognostic significance of cyclin D1 amplification in patients with breast cancer: a meta-analysis. **Journal of the Balkan Union of Oncology**. v. 22, n. 5, p. 1209-1216, set./out. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29135104/>. Acesso em: 07 nov. 2022.

HOLTEDAHL, Knut *et al.* Symptoms and signs of colorectal cancer, with differences between proximal and distal colon cancer: a prospective cohort study of diagnostic accuracy in primary care. **BMC Family Practice**. v. 22, n. 148, 2021. Disponível em: <https://bmcpimcare.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12875-021-01452-6>. Acesso em: 05 out. 2023.

HU, Mingchao *et al.* Circulating tumor cells in colorectal cancer in the era of precision medicine. **Journal of Molecular Medicine**. v. 100, p. 197–213, 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-021-02162-3>. Acesso em: 23 set. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2022.

IVANECZ, Arpad *et al.* Can we improve the clinical risk score? The prognostic value of p53, Ki-67 and thymidylate synthase in patients undergoing radical resection of colorectal liver metastases. **HPB (Oxford)**. v. 16, n. 3, p. 235–242, 2014. Disponível em: [10.1111/hpb.12089](https://doi.org/10.1111/hpb.12089). Acesso em: 30 nov. 2023.

JAVED, Aadil *et al.* The Regulation of Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases in the Development of Gastric Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 24, n. 2848, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24032848>. Acesso em: 04 out.2023.

JESUS, Joyce de Cassia Rosa de; OLIVEIRA, Carlos Jorge Rocha
MARCADORES MOLECULARES TUMORAIS. **Revista Brasileira de Ciências Biomédicas**. v. 1, n. 1, p. 43-49, 2020. Disponível em:
<https://doi.org/10.46675/rbcbm.v1i1.8>. Acesso em: 11 ago. 2022.

JIANG, Jiao *et al.* Epidemiologic characteristics and risk factors associated with overall survival for patients with mucinous colorectal cancer: A population-based study. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**. v. 15, n. 8, p. 1461-1474, 2023. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/1948-5204/full/v15/i8/1461.htm>. Acesso em: 11 set. 2023.

JIRAWATNOTAI, Siwanon; HU, Yiduo; MICHOWSKI, Wojciech *et al.* A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by interactome analyses in human cancers. **Nature**. vol. 474, n. 7350, p. 230-234, 2011. Disponível em: [10.1038/nature10155](https://doi.org/10.1038/nature10155). Acesso em: 01 dez. 2023.

JIRAWATNOTAI, Siwanon; DALTON, Stephen; WATTANAPANITCH, Methichit. Role of cyclins and cyclin-dependent kinases in pluripotent stem cells and their potential as a therapeutic target. **Seminars in Cell Developmental Biology**. v. 107, p. 63–71, 2020. Disponível em: [10.1016/j.semcdb.2020.05.001](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.05.001). Acesso em: 04 out. 2023.

JUN, Sun-Young *et al.* Prognostic Potential of Cyclin D1 Expression in Colorectal Cancer. **Journal of Clinical Medicine**. v. 12, n. 572, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcm12020572>. Acesso em: 20 set. 2023.

KANTH, Priyanka; INADOMI, John M. Screening and prevention of colorectal cancer. **The British Medical Journal**. v. 374, n. 1855, 2021. Disponível em: [10.1136/bmj.n1855](https://doi.org/10.1136/bmj.n1855). Acesso em: 31 jul. 2022.

KASPRZAK, Aldona. Prognostic Biomarkers of Cell Proliferation in Colorectal Cancer (CRC): From Immunohistochemistry to Molecular Biology Techniques. **Cancers**. v. 15, n. 18, p.1-49, 2023. Disponível em: [10.3390/cancers15184570](https://doi.org/10.3390/cancers15184570). Acesso em: 01 dez. 2023.

KCIUK, Mateusz *et al.* Cyclin-dependent kinases in DNA damage response. **BBA - Reviews on Cancer**. v. 1877, n. 3, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188716>. Acesso em: 04 out. 2023.

KEUNG, Emily Z.; GERSHENWALD, Jeffrey E. The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. **Expert Review Anticancer Therapy**. v. 18, n.

8, p. 775–784, 2018. Disponível em: 10.1080/14737140.2018.1489246. Acesso em: 04 out. 2023.

KITSEL, Yuliya *et al.* Colorectal Cancer Liver Metastases: Genomics and Biomarkers with Focus on Local Therapies. **Cancers**. v. 15, n. 1679, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers15061679>. Acesso em: 02 out. 2023.

KONTOMANOLIS, Emmanuel N. *et al.* Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. **Anticancer Reaserach**. v. 40, p. 6009-6015, 2020. Disponível em: 10.21873/anticanres.14622. Acesso em: 14 jul. 2023.

KUO, Wei-Yin *et al.* Impact of Socioeconomic Status on Cancer Incidence Risk, Cancer Staging, and Survival of Patients with Colorectal Cancer under Universal Health Insurance Coverage in Taiwan. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v. 18, n. 12164, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph182212164>. Acesso em: 17 set. 2023.

LI, Jiexi *et al.* Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. **Genes & Development**. v. 35, p. 787-820, 2023. Disponível em: 10.1101/gad.348226.120. Acesso em: 13 jul. 2023.

LIANG, Qin *et al.* Effect of Ki-67 Expression Levels and Histological Grade on Breast Cancer Early Relapse in Patients with Different Immunohistochemical-based Subtypes. **Scientific Reports**. v. 10, n. 7648, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-64523-1>. Acesso em: 11 ago. 2023.

LIMA, Jéssica F. de *et al.* CÂNCER COLORRETAL, DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO: REVISÃO DE LITERATURA. **Arquivos do MUDI**, v. 23, n. 3, p. 315-329, 2019. Disponível em: 10.4025/arqmudi.v23i3.51555. Acesso em: 17 jul. 2023.

LIMA, Mariana Araújo Neves; VILLELA, Daniel Antunes Maciel. Fatores sociodemográficos e clínicos associados ao tempo para o início do tratamento de câncer de cólon e reto no Brasil, 2006-2015. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 37, n. 5, 2021. Disponível em: 10.1590/0102-311X00214919. Acesso em: 23 set. 2023.

LIU, Jing; PENG, Yunhua; WEI, Wenyi. Cell cycle on the crossroad of tumorigenesis and cancer therapy. **Trends in Cell Biology**. v. 32, n. 1, p. 30–44, 2022. Disponível em: [10.1016/j.tcb.2021.07.001](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.07.001). Acesso em: 04 out. 2023.

LOW, Eric E. *et al.* Risk Factors for Early-Onset Colorectal Cancer. **Gastroenterology**. v. 159, p. 492–501, 2020. Disponível em: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(20\)30016-0/fulltext](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(20)30016-0/fulltext). Acesso em: 11 set. 2023.

LUKASIK, Pawel; ZALUSKI, Michal; GUTOWSKA, Izabela. Cyclin-Dependent Kinases (CDK) and Their Role in Diseases Development–Review. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, n. 2935, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22062935>. Acesso em: 04 out. 2023.

LUO, Zhao-Wen *et al.* Increased expression of Ki-67 is a poor prognostic marker for colorectal cancer patients: a meta analysis. **BMC Cancer**. v. 19, n. 123, 2019. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-019-5324-y>. Acesso em: 11 ago. 2023.

MAAHS, Gerson S. *et al.* Expressão de ciclina D1 e presença de metástase cervical de carcinoma epidermóide de boca. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. v. 73, n. 1, p. 93-100, 2007. Disponível em: [10.1016/s1808-8694\(15\)31128-9](https://doi.org/10.1016/s1808-8694(15)31128-9). Acesso em: 03 ago. 2022.

MAIA, Lorhenn Bryanda Lemes. **Análise da expressão gênica de CCND1 em carcinomas primários de mama**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração em Genética). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

MENG, Yiliang *et al.* CCT5 interacts with cyclin D1 promoting lung adenocarcinoma cell migration and invasion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 567, p. 222-229, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.04.105>. Acesso em: 30 set. 2022.

MENON, Sunil Sankunny *et al.* Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. **Clinica Chimica Acta**. v. 491, p. 39-45, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.01.011>. Acesso em: 01 dez. 2023.

MONTALTO, Francesca Ida; AMICIS, Francesca de. Cyclin D1 in Cancer: A Molecular Connection for Cell Cycle Control, Adhesion and Invasion in Tumor

and Stroma. **Cells**. v. 9, n. 12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells9122648>. Acesso em: 07 nov. 2022.

MOORE, Keith L.; DALLEY Arthur F. **Anatomia orientada para a clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MROUJ, Karim *et al.* Ki-67 regulates global gene expression and promotes sequential stages of carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 118, n. 10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.2026507118>. Acesso em: 11 ago. 2023.

MUSGROVE, Elizabeth A. *et al.* Cyclin D as a therapeutic target in cancer. **NATURE REVIEWS CANCER**. v. 11, p. 558-572, 2011. Disponível em: [10.1038/nrc3090](https://doi.org/10.1038/nrc3090). Acesso em: 24 abr. 2023.

NAZAR, Maryam *et al.* Immunohistochemical Expression of Cyclin D1 and Ki-67 in Primary and Metastatic Oral Squamous Cell Carcinoma. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v. 21, n. 1, p. 37-41, 2020. Disponível em: [10.31557/APJCP.2020.21.1.37](https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.1.37). Acesso em: 07 nov. 2022.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NIIDA, Atsushi *et al.* Modeling colorectal cancer evolution. **Journal of Human Genetics**. v. 66, p. 869–878, 2021. Disponível em: [10.1038/s10038-021-00930-0](https://doi.org/10.1038/s10038-021-00930-0). Acesso em: 31 jul. 2022.

O que é câncer? **INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: 23/05/2023.

Parts of the Colon. **TERESE WINSLOW LLC**. 2012. Disponível em: <https://www.teresewinslow.com/digestion/aoz6hzb112a4qi1oikf6z6vyzuo134>. Acesso em 21/10/2023.

PEREIRA, Renan Augusto. **Expressão de ciclina D1 em adenocarcinoma de próstata utilizando a técnica de imunohistoquímica**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências). Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

PRIMROSE, John N. *et al.* Effect of 3 to 5 years of scheduled CEA and CT follow-up to detect recurrence of colorectal cancer: the FACS randomized clinical trial. **Journal of the American Medical Association**. v. 311, n. 3, p. 263-270, 2014. Disponível em: [10.1001/jama.2013.285718](https://doi.org/10.1001/jama.2013.285718). Acesso em: 01 dez. 2023.

QIE, Shuo; DIEHL, J. Alan. Cyclin D1, Cancer Progression and Opportunities in Cancer Treatment. **Journal of Molecular Medicine**. v. 94, n. 12, p. 1313-1326, 2016. Disponível em: [10.1007/s00109-016-1475-3](https://doi.org/10.1007/s00109-016-1475-3). Acesso em: 07 nov. 2022.

RADENKOVIC, Sandra *et al.* Evaluation of Cyclin D1 expression by western blotting methods and immunohistochemistry in breast cancer patients. **Journal of Balkan Union of Oncology**. v. 26, n. 2, p. 475-482, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34076995/>. Acesso em: 08 ago 2023.

RANGEL, Michael *et al.* Autophagy and Tumorigenesis. **FEBS Journal**. v. 289, n. 22, p. 7177–7198, 2022. Disponível em: [10.1111/febs.16125](https://doi.org/10.1111/febs.16125). Acesso em: 04 out. 2023.

RESCH, Annika; LANGNER, Cord. Lymph node staging in colorectal cancer: Old controversies and recent advances. **World Journal of Gastroenterology**. v. 19, n. 46, p. 8515-8526, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3870496/>. Acesso em: 13 set. 2023.

RIBEIRO, Adeylson G. *et al.* Geographic variations in cancer incidence and mortality in the State of São Paulo, Brazil 2001–17. **Cancer Epidemiology**. v. 85, 2023. Disponível em: [10.1016/j.canep.2023.102403](https://doi.org/10.1016/j.canep.2023.102403). Acesso em: 11 ago. 2023.

ROSA, Stefano La. Diagnostic, Prognostic, and Predictive Role of Ki67 Proliferative Index in Neuroendocrine and Endocrine Neoplasms: Past, Present, and Future. **Endocrine Pathology**. v. 34, p. 79–97, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12022-023-09755-3>. Acesso em: 02 out. 2023.

RUMGAY, Harriety *et al.* Global burden of cancer in 2020 attributable to alcohol consumption: a population-based study. **The Lancet Oncology**. v. 22, n. 8, p. 1071-1080, 2021. Disponível em: [10.1016/S1470-2045\(21\)00279-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00279-5). Acesso em: 11 ago. 2023.

SEFERBEKOVA, Zaira *et al.* Spatial biology of cancer evolution. **Nature Reviews Genetics**. v. 24 p. 295–313, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00553-x>. Acesso em: 02 out. 2023.

SEQUÊNCIA DIDÁTICA: O CICLO CELULAR: INTERFASE E DIVISÃO CELULAR. **ALLIFER SCHOOL**. Disponível em: <https://www.alliferschool.com/2020/05/sequencia-didatica-o-ciclo-celular.html>. Acesso em: 01 dez. 2023.

SHAHAIT, Mohammed *et al.* Ki-67 expression predicts biochemical recurrence after radical prostatectomy in the setting of positive surgical margins. **BMC Urology**. v. 18, n. 13, 2018. Disponível em: <https://bmcurol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12894-018-0330-y>. Acesso em: 11 ago. 2023.

SINHA, R. Colorectal cancer. **Clinical Radiology**. v. 76, Elsevier, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crad.2021.09.003>. Acesso em: 31 jul. 2022.

SUN, Yulin *et al.* Noninvasive urinary protein signatures associated with colorectal cancer diagnosis and metastasis. **Nature Communications**. v. 13, n. 2757, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-30391-8>. Acesso em: 23 set. 2023.

SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. v. 71, n. 3, p. 209-249, maio/jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>. Acesso em: 06 jul. 2023.

SUSKI, Jan M. *et al.* Targeting Cell-cycle Machinery in Cancer. **Cancer Cell**. v. 39, n. 6, p. 759–778, 2021. Disponível em: [10.1016/j.ccell.2021.03.010](https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.03.010). Acesso em: 02 out. 2023.

TCHAKARSKA, Guergana e SOLA, Brigitte. The double dealing of cyclin D1. **Cell Cycle**. v. 19, n. 2, p. 163–178, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1706903>. Acesso em: 02 out. 2023.

TOLLEFSON, Matthew K. *et al.* Prostate cancer Ki-67 (MIB-1) expression, perineural invasion, and gleason score as biopsy-based predictors of prostate cancer mortality: The mayo model. **Mayo Clinic Proceedings**. v. 89, n. 3, p. 308–318, 2014. Disponível em: [doi: 10.1016/j.mayocp.2013.12.001](https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.12.001). Acesso em: 11 ago. 2023.

TSIKITIS, Vassiliki L. *et al.* Predictors of recurrence free survival for patients with stage II and III colon cancer. **BMC Cancer**. v. 14, n. 336, 2014. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-14-336>. Acesso em: 13 set. 2023.

UXA, Sigrid *et al.* Ki-67 gene expression. **Cell Death & Differentiation**. v. 28, p. 3357-3370, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00823-x>. Acesso em: 11 ago. 2023.

WANG, Li-Hui *et al.* Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: an Overview. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v. 51, n. 6, p.2647-2693, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000495956>. Acesso em: 12 jul. 2023.

WANG, Peng *et al.* The prognostic value of p53 positive in colorectal cancer: A retrospective cohort study. **Tumor Biology**. v. 39, n. 5, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1010428317703651>. Acesso em: 01 dez. 2023.

WANGEFJORD, Sakarias *et al.* Cyclin D1 expression in colorectal cancer is a favorable prognostic factor in men but not in women in a prospective, population-based cohort study. **Biology of Sex Differences**. v. 2, n. 10, 2011. Disponível em: [10.1186/2042-6410-2-10](https://doi.org/10.1186/2042-6410-2-10). Acesso em: 30 nov. 2023.

WEI, Dan-Ming *et al.* Augmented expression of Ki-67 is correlated with clinicopathological characteristics and prognosis for lung cancer patients: an updated systematic review and meta-analysis with 108 studies and 14,732 patients. **Respiratory Research**. v. 19, n. 150, 2018. Disponível em: <https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-018-0843-7>. Acesso em: 11 ago. 2023.

WILD, Christopher P. *et al.* Cancer Prevention Europe. **Molecular Oncology**. v. 13, p. 528-534, 2019. Disponível em: [10.1002/1878-0261.12455](https://doi.org/10.1002/1878-0261.12455). Acesso em: 06 jul. 2023.

YAMADA, Yasuhide *et al.* Impact of sex and histology on the therapeutic effects of fluoropyrimidines and oxaliplatin plus bevacizumab for patients with metastatic colorectal cancer in the SOFT trial. **Global Health and Medicine**. v. 2, n. 4, p. 240-246, 2020. Disponível em: [10.35772/ghm.2020.01050](https://doi.org/10.35772/ghm.2020.01050). Acesso em: 01 dez. 2020.

YAN, Hongfeng; JIANG, Fuquan; YANG, Jianwu. Association of β -Catenin, APC, SMAD3/4, Tp53, and Cyclin D1 Genes in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Genetics Research**. v. 2022, 2022. Disponível em: [10.1155/2022/5338956](https://doi.org/10.1155/2022/5338956). Acesso em: 20 set. 2023.

YU, Chaoran; ZHANG, Yujie. Establishment of prognostic nomogram for elderly colorectal cancer patients: a SEER database analysis. **BMC Gastroenterology**. v. 20, n. 347, 2020. Disponível em: <https://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12876-020-01464-z>. Acesso em: 13 set. 2023.

ZENG, Ming *et al.* The relationship between the expression of Ki-67 and the prognosis of osteosarcoma. **BMC Cancer**. v. 21, n. 210, 2021. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-021-07880-y>. Acesso em: 11 ago. 2023.

ZHUANG, Yan *et al.* Multi gene mutation signatures in colorectal cancer patients: predict for the diagnosis, pathological classification, staging and prognosis. **BMC Cancer**. v. 21, n. 380, 2021. Disponível em: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-021-08108-9>. Acesso em: 13 set. 2023.

ZYGULSKA, Aneta L.; PIERZCHALSKI, Piotr. Novel Diagnostic Biomarkers in Colorectal Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 23, n. 2, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23020852>. Acesso em: 13 jul. 2023.

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UFCG - CENTRO DE
FORMAÇÃO DE
PROFESSORES - CAMPUS DE
CAJAZEIRAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PROSPECÇÃO DE NOVOS MARCADORES DIAGNÓSTICOS PARA O CÂNCER COLORRETAL E CONTRIBUIÇÃO NA PREVENÇÃO DA MORTALIDADE POR ESTA DOENÇA NO SUS

Pesquisador: Glaucia Veríssimo Faheina Martins

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 38330920.0.1001.5575

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.474.467

Folha de Rosto	FOLHADEROSTO_PPSUS_Glaucia001.pdf	09/10/2020 11:13:29	Glaucia Veríssimo Faheina Martins	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPPSUS_2020_Diag_mol_cancer_colorretal_GlauciaFaheina_COMITE_CFP_02.pdf	22/09/2020 15:06:02	Glaucia Veríssimo Faheina Martins	Aceito
Orçamento	ORÇAMENTO_CEP_CFP_ProjGlaucia.docx	22/09/2020 15:05:39	Glaucia Veríssimo Faheina Martins	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	21/09/2020 23:38:56	Glaucia Veríssimo Faheina Martins	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMODECOMPROMISSODEDIVULGACAODERESULTADOS_CEP_CFP_ProjGlaucia_Deme_ok.pdf	21/09/2020 20:15:04	Glaucia Veríssimo Faheina Martins	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMODECOMPROMISSODOPESQUISADOR_CEP_CFP_ProjGlaucia_Deme_ok.pdf	21/09/2020 20:14:50	Glaucia Veríssimo Faheina Martins	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO_CEP_CFP_ProjGlaucia.docx	21/09/2020 06:40:55	Glaucia Veríssimo Faheina Martins	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO_CEP_CFP_ProjGlaucia.docx	21/09/2020 06:39:33	Glaucia Veríssimo Faheina Martins	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAJAZEIRAS, 18 de Dezembro de 2020

Assinado por:
Paulo Roberto de Medeiros
(Coordenador(a))

ANEXO B - INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

PROJETO: “PROSPECÇÃO DE NOVOS MARCADORES DIAGNÓSTICOS PARA O CÂNCER COLORRETAL E CONTRIBUIÇÃO NA PREVENÇÃO DA MORTALIDADE POR ESTA DOENÇA NO SUS”

Pesquisadora responsável: Prof.^a Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins

1. Data da cirurgia: ____/____/____

2. Nome do paciente: _____

3. CAD: _____

4. Numeração da amostra (PAC): _____

5. Sexo do paciente: F () M ()

6. Idade do paciente: _____

7. Localização do tumor:

- Reto () - cólon esquerdo () - cólon transversal () - cólon direito ()

8. Diferenciação do tumor:

- Alta () - moderada () - baixa () - não-diferenciado ()

9. Tamanho do tumor (cm)

- maior que 5 cm () - menor que 5 cm ()

10. Metástase para órgãos linfáticos

- Sim () - Não ()

11. Metástase para outros órgãos:

- Sim () - Não ()

Médico responsável pela coleta de dados

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar como voluntário (a) no estudo “**PROSPECÇÃO DE NOVOS MARCADORES DIAGNÓSTICOS PARA O CÂNCER COLORRETAL E CONTRIBUIÇÃO NA PREVENÇÃO DA MORTALIDADE POR ESTA DOENÇA NO SUS**”, coordenado pela professora Dra. Glaucia Veríssimo Faheina Martins e vinculado a UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE do CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE da UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE.

Sua participação é voluntária e você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade. Este estudo tem por objetivo coletar um pequeno fragmento de tecido que será retirado durante a cirurgia para identificação de marcadores moleculares tumorais que auxiliarão em diagnósticos mais rápidos e precisos, bem como a descoberta de novos tratamentos para câncer colorretal. Seu material ficará armazenado provisoriamente por tempo determinado apenas para realização dos ensaios propostos por esta pesquisa no Laboratório de Ensaios Toxicológicos e Genética do Câncer-TOXGEN da Universidade Federal de Campina Grande e se faz necessário porque o câncer colorretal tem grande incidência no Brasil e no mundo e apesar de existirem quimioterápicos efetivos, eles são muito tóxicos e não tem ação em alguns tumores, pois as células dos tumores se tornaram resistentes. Além disso, o diagnóstico inicial desta patologia está diretamente relacionado a grandes taxas de sobrevivência ao tratamento. A descoberta de novos alvos farmacológicos para esta patologia, como os canais iônicos Kv, que já são alvos farmacológicos para outras doenças, pode proporcionar a descoberta de nova terapias, bem como, diagnósticos moleculares diferenciais.

Caso decida aceitar o convite, você será submetido (a) ao(s) seguinte(s) procedimentos: Após a remoção de seu tecido durante a cirurgia, conforme já estava previsto pelo seu médico, vamos precisar de sua autorização para armazenar o tecido e possivelmente coletar uma amostra de qualquer outro material biológico conforme seu médico achar necessário. Os riscos envolvidos com sua participação são os mesmos já previstos no procedimento cirúrgico que já estava prescrito pelo seu médico, pois o mesmo ocorreria independente deste projeto, estamos apenas solicitando sua permissão para armazenar e utilizar parte deste material. Esse estudo tem o intuito de descobrir novos diagnósticos e tratamentos, com a sua participação sendo totalmente voluntária, podendo desistir a qualquer momento, sem penalidades, danos e prejuízos. Quanto aos riscos adicionais referentes ao constrangimento na abordagem, coleta de material ou vazamentos de informações de dados coletados, estes são possíveis, mas pretendemos minimizá-los, pois o projeto não visa constranger, inibir, desrespeitar, afrontar, mas sim contribuir com os novos diagnósticos e tratamento do câncer colorretal. Os pesquisadores se propõem a realizar identificação numérica das amostras evitando exposição de dados dos pacientes no manuseio das amostras em laboratório. Os benefícios da pesquisa serão: Os pacientes que cederão as amostras para o presente estudo receberão orientações sobre o que é o câncer colorretal, métodos de rastreamento e fatores de risco. Os participantes da pesquisa poderão contribuir para o desenvolvimento de testes diagnósticos mais eficientes e desenvolvimento de novos tratamentos. Os participantes não terão benefício pessoal direto através deste projeto, sendo sua participação voluntária e não-remunerada.

Todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de maneira que não permita a identificação de nenhum voluntário.

Se você tiver algum gasto decorrente de sua participação na pesquisa, você será ressarcido, caso solicite. Em qualquer momento, se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você poderá buscar o direito de ser indenizado.

Esta pesquisa atende às exigências das resoluções 466/2012 e 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), as quais estabelecem diretrizes e normas regulamentadoras para pesquisas envolvendo seres humanos.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Formação de Professores (CFP) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) é um colegiado interdisciplinar e independente de caráter consultivo, deliberativo e educativo, que tem como foco central defender os interesses e a integridade dos participantes voluntários de pesquisas envolvendo seres humanos e, conseqüentemente, contribuir para o desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Você ficará com uma via rubricada e assinada deste termo e qualquer dúvida a respeito desta pesquisa, poderá ser requisitada a Profa. Dra. Glaucia Veríssimo Faheina Martins, ou ao Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos - CEP/CFP/UFCG, cujos dados para contato estão especificados abaixo.

Dados para contato com o responsável pela pesquisa

Nome: Glaucia Veríssimo Faheina Martins

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

Endereço Pessoal: Rua: Elvira Cecília dos Santos, 190, Planalto das mansões, Cuité-PB.

Endereço Profissional: Sítio Olho D'água da Bica, bloco dos Professores, sala F19, térreo – Centro de Educação e Saúde (CES), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus Cuité.

Horário disponível: 8:00-12:00 E DE 14:00-18:00

Telefone: 3372-1900

Dados do CEP

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Formação de Professores da Universidade Federal de Campina Grande- CEP/CFP/UFCG, situado a rua Sergio Moreira de Figueiredo, s/n, Bairro: Casas Populares, Cajazeiras - PB; CEP: 58.900-000.

Email: cepcfpufcgcz@gmail.com

Tel: (83) 3532-2075

Declaro que estou ciente dos objetivos e da importância desta pesquisa, bem como a forma como esta será conduzida, incluindo os riscos e benefícios relacionados com a minha participação, e concordo em participar voluntariamente deste estudo.

LOCAL E DATA

Assinatura ou impressão datiloscópica do
voluntário ou responsável legal

Nome e assinatura do responsável pelo estudo