

ESTUDO DE EXPRESSÃO PROTEICA DE CDX2 E COX2 (*PTGS2*) EM CÂNCER COLORRETAL METASTÁTICO

Álvaro Manuel de Carvalho Caldas

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente como
requisito parcial para obtenção do título de Doutor
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Rachel P Riechelmann

São Paulo

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

CALDAS, ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS.

ESTUDO DE EXPRESSÃO PROTEICA DE CDX2 E COX2 (PTGS2) EM CÂNCER COLORRETAL METASTÁTICO. / ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS CALDAS. São Paulo, 2023.

107f.

Tese de Doutorado - Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Rachel P Riechermann.

1. CDX2, 2. COX2, 3. Câncer colorretal metastático

CDU 616

Elaborado por

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

Folha de aprovação

Nome: Álvaro Manuel de Carvalho Caldas

Título: ESTUDO DE EXPRESSÃO PROTEICA DE CDX2 E COX2 (PTGS2) EM CÂNCER
COLORRETAL METASTÁTICO

Aprovado em: 27 de Novembro de 2023

Banca Examinadora

Orientador: Dra. Rachel P Riechelmann

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Dr. Samuel Aguiar Junior

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Dr. João Paulo da Silveira Nogueira Lima

Instituição: Faculdade de Medicina do ABC.

Membro da banca: Dr. Daniel de Iracema Gomes Cubero

Instituição: Escola Paulista de Medicina, EPM UNIFESP

Membro da banca: Dra. Nora Manoukian Forones

APOIO FINANCEIRO

Este estudo obteve uma doação independente do Laboratório Farmacêutico Amgen Brasil que permitiu a compra de anticorpos para a análises de imunoistoquímica (IHC) e custeio para a preparação de microarranjos de tecido (TMA).

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais

À minha esposa, Luciana,

Aos meus filhos, Tomás e Laís

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Rachel P Riechelmann agradeço pela confiança e oportunidade de ingressar neste programa, bem como pela sua experiência, conhecimento, disponibilidade e orientação clara e abrangente.

Ao colega Dr. Warley Nunes, patologista, pelo trabalho cuidadoso e judicioso junto a seleção e marcação das lâminas e leituras do TMA;

Ao laboratório de Imunohistoquímica e todo o seu time pela organização de todo o material e confecção dos TMAs;

Aos colegas Dra. Marcelle Cesca e Dr. Rodrigo Taboada do departamento de Oncologia Clínica, (Grupo de tumores gastrointestinais) pelas contribuições valorosas. Ao Ronald Tamborelli (Setor administrativo) pelo suporte operacional e administrativo ;

Aos colegas do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE) agradeço pela colaboração e pelo total apoio, em especial ao grupo de estatística (Janaína Naiara Germando e Bárbara Beltrame Bettim; bem como Rafael Vanhoz Ribeiro, pelo suporte em relação ao banco de dados RedCap);

À Secretaria da Pós graduação do A.C.Camargo Cancer Center (Luciana Pitombeiras e equipe) pelo suporte e apoio durante o desenvolvimento do estudo;

Aos pacientes pois nos inspiram a buscar incessantemente por avanços diagnósticos e terapêuticos para as gerações atuais e futuras.

RESUMO

Caldas, AMC. **Estudo de expressão proteica de COX2 (PTGS2) em câncer colorretal metastático.**

[Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2023.

A perda de expressão do gene supressor de tumores *CDX2* (fator de transcrição homeótico tipo caudal 2) está associada a resultados desfavoráveis em câncer colorretal em estágio inicial. No entanto, o seu valor prognóstico no contexto de outros biomarcadores prognósticos em câncer colorretal metastático (CCRm) é desconhecido. Superexpressão da proteína ciclooxygenase-2 (*COX2*) foi relatada em câncer colorretal avançado. No entanto, a relação entre *CDX2* e *COX2* em CCRm permanece indeterminada. Nosso objetivo foi avaliar a sua expressão em tumores de CCRm de uma coorte clinicamente caracterizada bem como o seu impacto na sobrevida global (SG) e na sobrevida livre de progressão (SLP) na primeira linha de tratamento. Dentre 720 pacientes consecutivos com CCRm, 346 apresentavam amostras tumorais apropriadas para montagem de microarranjos de tecidos e análises de imuno-histoquímica. Dados clínicos e de sobrevida foram avaliados retrospectivamente. A perda de expressão de *CDX2* foi detectada em 27 (7,8%) amostras, enriquecidas em tumores pouco diferenciados (20%; $p < 0,01$) e naqueles com a variante *BRAF* p.V600E (40%; $p < 0,01$). A maioria dos tumores (93,4%) expressou *COX2*. Amostras negativas para *COX2* foram mais comuns em CCRm pouco diferenciados. Em análises não ajustadas, a mediana da SG ($p < 0,001$) e a mediana da SLP ($p < 0,05$) foram inferiores para pacientes com tumores *CDX2*-negativos em comparação com tumores *CDX2*-positivos. Em conclusão, a perda de *CDX2* mostrou uma associação significativa com CCRm pouco diferenciado e o alelo *BRAF* p.V600E, sendo um marcador prognóstico de piora da sobrevida global.

Descritores: *CDX2*; *COX2*; *BRAF*; câncer colorretal metastático; quimioterapia

ABSTRACT

Caldas, AMC. **A study on CDX2 and COX2 (*PTGS2*) protein expression in metastatic colorectal cancer.** [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2023.

INTRODUCTION: Lack of expression of the tumor suppressor gene CDX2 associates with poor outcomes in early stage colorectal cancer. Yet its prognostic value in the context of other prognostic biomarkers in metastatic CCR (CCRm) is unknown. Overexpressed cyclooxygenase-2 (COX2), encoded by the prostaglandin-endoperoxide synthase 2 gene has been reported in advanced CCR. However, CDX2 and COX2 relationship in CCRm remains undetermined. We aimed to assess their expression in CCRm tumors from a clinically characterized cohort and their influence on overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in first line. **METHODS:** Demographic and clinical data from mCRC were retrospectively analyzed. Appropriate tumor samples were collected for tissue microarray and analyzed by immunohistochemistry. **RESULTS:** Three hundred and forty six mCRC were included. Loss of CDX2 expression was detected in 27 (7.8%) samples, enriched in poorly differentiated tumors (20%; $p<0.01$) and in those with the BRAF p.V600E variant (40%; $p<0.01$). Most tumors (93.4%) expressed COX2. COX2-negative samples were enriched in poorly differentiated CCRm. In unadjusted analyses, median OS ($p<0.001$) and median PFS ($p<0.05$) were inferior for patients with CDX2-negative versus CDX2-positive tumors. **CONCLUSION:** Loss of CDX2 was significantly associated with poorly differentiated CCRm and BRAF p.V600E allele and a prognostic marker of worse OS.

Keywords:: CDX2; COX2; BRAF; Metastatic Colorectal Cancer; Chemotherapy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	1
Figura 2.....	4
Figura 3.....	5
Figura 4.....	6
Figura 6.....	19
Figura 7.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....	18
Tabela 2.....	22
Tabela 3.....	32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FU	5-fluorouracil
AJCC	American joint committee on cancer
Anti-EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
Anti-VEGFR	Fator de crescimento endotelial antivasculard
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BRAF	Human gene that encodes a protein called B-Raf
CC	Câncer de cólon
CCR	Câncer colorretal
CCRm	Câncer colorretal metastático
CDX2	Fator de transcrição homeótico tipo caudal 2
CEA	Antígeno Carcinoembrionário
ChT	Quimioerapia
CIMP	Fenótipo metilador de ilha CpG
CIN	Instabilidade cromossômica
COX2	Ciclooxigenase 2 COX2
CRCSC	The Colorectal Cancer Subtyping Consortium
CSM	Consensos de subtipos moleculares
CTCs	Células tumorais circulantes
ctDNA	DNA tumoral circulante
dMMR	Deficiência de reparo de bases mal emparelhadas
ESMO	European Society for Medical Oncology
FDG-PET	2-[F]fluoro-2-deoxi-D-glicose - tomografia por emissão de pósitrons
FFPE	Fixado em formalina, embebido em parafina
FISH	Hibridização in situ fluorescente
Genes APC	Genes APC (APC regulator of Wnt pathway);
GLOBOCAN	Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence
HER2	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HNPCC	Câncer colorretal hereditário não poliposo
HPCC	Câncer colorretal hereditário poliposo
HR	Razão de Risco
IC	Intervalo de Confiança

ICIs	Inibidores de checkpoint imunológico
IHC	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KRAS	Gene homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten
mAb	Anticorpo monoclonal
MedGen	Medical Genetics (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/medgen).
MLH1	MutL homolog 1
MMR	Reparo de bases mal emparelhadas
MSH2	MutS homolog 2
MSH6	MutS homolog 6
MSI	Instabilidade de microssatélites
Mut	Mutado
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NOTCH3	Gene que codifica para o receptor 3 de NOTCH
NRAS	Gene homólogo do neuroblastoma viral RAS
NTRK	Receptor da tropomiosina quinase B
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OR	Odds Ratio
ORR	Taxa de resposta objetiva
PG	Prostaglandina
PMS2	PMS1 homolog 2, mismatch repair system component
PTGS2	Prostaglandina endoperóxido sintase-2
QT	Quimioterapia
RNM	Ressonância nuclear magnética
RT	Radioterapia
SCNA	Alterações no número de cópias somáticas;
SG	Sobrevida Global
SLP	Sobrevida livre de progressão
TGF	Fator transformador de crescimento
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TP53	Proteína tumoral p53
TR	Taxa de resposta
WT	Tipo selvagem;

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1 Epidemiologia.....	1
1.2 Aspectos embriológicos e anatômicos do cólon e reto relevantes para a classificação CCR.....	3
1.3 Aspectos moleculares e patogênese do CCR.....	6
1.4 Estadiamento do CCR.....	9
1.5 Biomarcadores e CCRm.....	10
1.6 Tratamento do CCRm.....	12
1.6.1 Tratamento para o grupo de pacientes CCRm – “Adequados”.....	13
1.6.1.1 Manejo da doença ressecável/potencialmente ressecável.....	13
1.6.1.2 Pacientes CCRm candidatos a citorredução.....	14
1.6.1.3 Abordagem terapêutica com tratamentos locais.....	14
1.6.2 Tratamento da doença avançada e metastática sem potencial de conversão (“Inadequados”).....	15
1.6.2.1 Anti-EGFR Versus Anti-VEGF na primeira linha do CCRm.....	17
1.6.2.2 Terapia de primeira linha em CCRm dMMR/MSI-H e mutação BRAF V600E.....	18
1.7 O fator de transcrição CDX2 em CCR e CCRm.....	20
1.8 CDX2, COX2, inflamação e CCRm.....	24
1.9 Racional do Estudo.....	27
2. Objetivos do estudo.....	29
3. Discussão.....	31
4. Considerações finais.....	38
5. Conclusões.....	40
6. Referências bibliográficas.....	41
7. Manuscrito submetido à publicação.....	61
8. Anexos.....	100
Apendice.....	105

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

O carcinoma colorretal (CCR) é a segunda causa mais comum de mortalidade por câncer em países ocidentais e uma das principais causas de câncer no mundo. Globalmente, o CCR representa o terceiro tipo de câncer mais comum em homens e o segundo mais frequente em mulheres (Figura 1). Entretanto, a incidência varia de acordo com características demográficas (Siegel et al., 2023). Em 2020, houve mais de 1,9 milhões de novos casos de CCR e mais de 930.000 mortes relacionadas. Projeções atuais estimam que o impacto do CCR aumente para 3,2 milhões de novos casos e 1,6 milhões de mortes por ano até 2040 (Morgan et al., 2023).

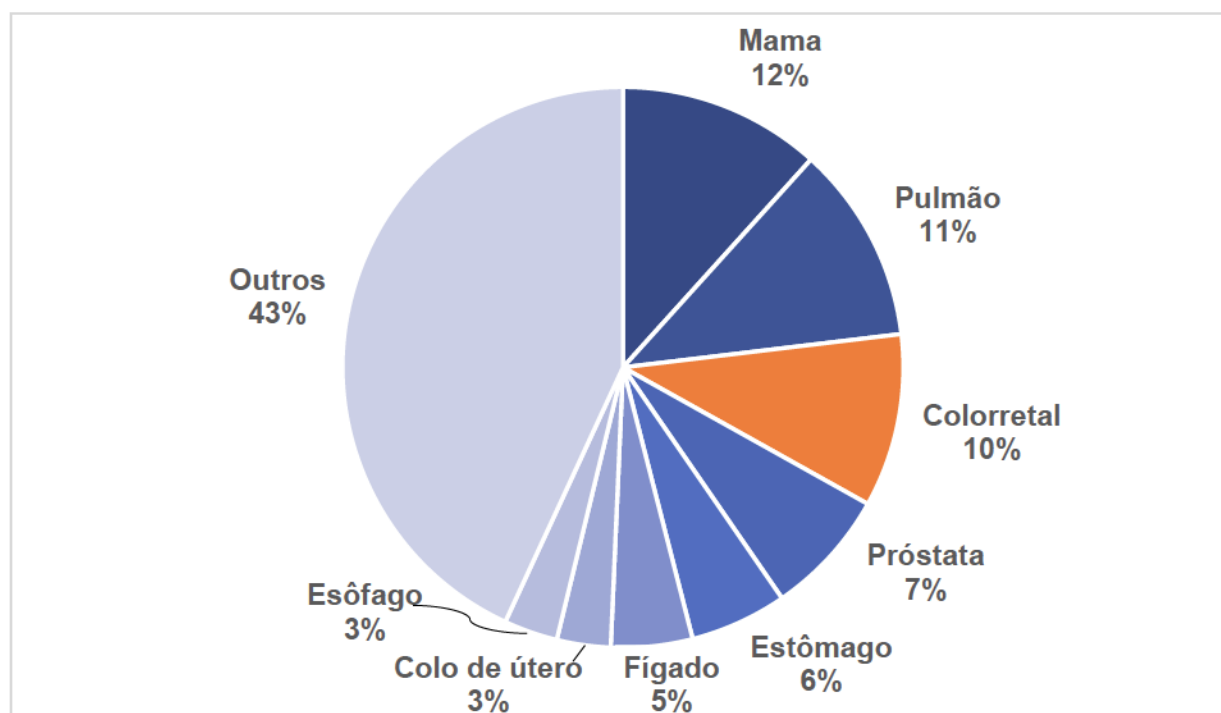


Figura 1: Incidência de câncer colorretal no mundo, não considerando câncer de pele não melanoma. Fonte: Modificado de: Globocan (https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf).

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA, Rio de Janeiro, RJ), o número estimado para o Brasil de casos novos de CCR, a cada ano do triênio de 2023 a 2025, é 45.630, correspondendo a um risco estimado de 21,1 casos por 100 mil habitantes, sendo 21.970 casos entre homens e 23.660 entre mulheres (Ministério da Saúde, Brasil, 2023). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CCR ocupa a segunda posição entre os tipos de câncer mais frequentes no Brasil (Santos et al., 2023).

A taxa de mortalidade por CCR tem diminuído em todo o mundo nos últimos anos. Este declínio pode ser atribuído aos avanços na detecção precoce, melhores opções de tratamento e maior conscientização sobre a importância do rastreamento do CCR. Esforços como campanhas de saúde pública promovendo exames regulares, modificações no estilo de vida e avanços na tecnologia médica contribuíram para prognósticos melhores para pacientes com CCR. No entanto, é importante observar que existem variações regionais.

Chama à atenção um fenômeno agravante observado mais recentemente. Um estudo da *American Cancer Society* (Atlanta, GA) mostrou que, no momento do diagnóstico, indivíduos com menos de 55 anos correspondiam a 11% de todos os pacientes com CCR em 1995, passando a 20% em 2019 (Siegel et al., 2023). Isso pode indicar possivelmente um aumento à exposição dos jovens a fatores de risco ambientais em idade precoce.

Os principais fatores de risco para CCR esporádico podem ser classificados como modificáveis ou não modificáveis. Idade avançada, sexo masculino e história familiar são fatores imutáveis. Fatores modificáveis são aqueles em que o próprio indivíduo pode reduzir sua exposição, como ao sedentarismo, obesidade, consumo regular de álcool e tabaco, baixo consumo de fibras, frutas, vegetais e carnes magras e exposição a radiações, por exemplo, raios X e gama (Santos et al., 2023). Lesões específicas do cólon e reto podem constituir fatores de risco, fazendo com que a instituição do tratamento classifique-as como fatores modificáveis. Por esta razão, a colonoscopia está geralmente indicada como triagem a partir de 45 anos de idade

(Davidson et al., 2021). A detecção precoce de pólipos neoplásicos e polipectomia associada permitem classificar essas lesões pré-malignas como fator de risco modificável (Kang & Zhang, 2022).

O CCR familiar ou hereditário não é uma única doença, mas um grupo de patologias com componente genético e fenótipo clinicamente diferenciado. Ele se classifica em CCR hereditário com (HPCC) ou sem polipose (HNPCC), constituindo síndromes com herança autossômica dominante, compreendendo cerca de 3% a 5% e 1,7% a 4,2% do total de casos de CCR, respectivamente. As síndromes HNPCC são associadas com variantes de DNA inativadoras de genes de reparo de mal emparelhamento do DNA (MMR, do inglês, *DNA mismatch repair*): a síndrome de Lynch (MEDGEN#1633554)¹, a síndrome de Muir-Torré (MEDGEN#231157) e a síndrome de Turcot tipo I (MEDGEN#1748029). As síndromes HPCC compreendem principalmente polipose adenomatosa familiar (FAP; MEDGEN#46010); síndrome de Gardner (MEDGEN#6547), polipose juvenil coli (MEDGEN#366828), síndrome de Peutz-Jeghers (MEDGEN#18404), síndrome de Cowden (MEDGEN#5420) e síndrome de Turcot tipo II (MEDGEN#830869).

1.2 Aspectos embriológicos e anatômicos do cólon e reto relevantes para a classificação de CCR

A configuração anatômica do esôfago, estômago, intestino delgado, fígado, pâncreas e intestino grosso é estabelecida a partir da quarta semana de desenvolvimento embrionário, através de uma sequência de evaginações, alongamentos, dobramentos e dilatações do intestino primitivo que se encontra com as extremidades cranial e caudal em fundo cego. O

¹ MedGen: Medical Genetics (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/medgen>).

desenvolvimento anatômico avança por meio da proliferação celular, crescimento e morfogênese (Sanderson IR, 1999).

O intestino primitivo é dividido em três porções que dão origem a órgãos específicos do trato gastrointestinal (GI): (i) o intestino anterior é o precursor da faringe, esôfago, estômago, fígado, vesícula biliar, pâncreas e a porção cranial do duodeno; (ii) o intestino médio dá origem à porção caudal do duodeno, jejuno, íleo, cólon ascendente e dois terços do cólon transverso; e (iii) o intestino posterior é o precursor do terço distal do cólon transverso, cólon descendente, sigmoide, reto e seio urogenital. A anatomia colorretal inclui a área da válvula ileocecal até o ânus (Salimoglu et al., 2020). A partir dessa visão embrionária da organogênese do cólon e reto, diz-se que o cólon direito (ceco, porção ascendente e dois terços proximais do cólon transverso) e o cólon esquerdo (terço distal do cólon transverso, porção descendente, sigmoide e reto) têm origens embrionárias e suprimentos vasculares diferentes (Figura 2; Li & Lai, 2009).

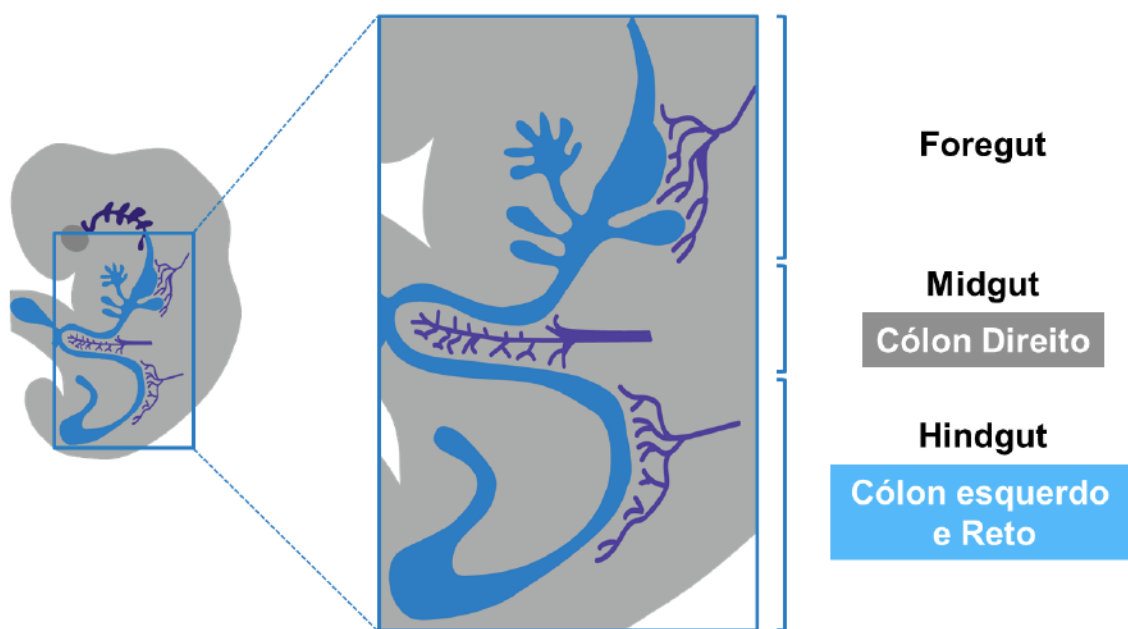


Figura 2: Origens embrionárias do cólon direito e cólon esquerdo/reto; Fonte: Adaptado de Li & Lai, 2009.

Conforme o processo de maturação avança, a superfície mucosa do intestino aumenta rapidamente e se dobra para formar vilosidades. Como regra geral, a maturação tende a ocorrer ao longo dos eixos craniocaudal e proximodistal. Cada etapa do desenvolvimento pode ser influenciada por uma variedade de processos, incluindo predisposição genética; o relógio biológico; mecanismos regulatórios celulares, neurais e hormonais; e o ambiente (Sanderson IR, 1999) que inclui a microbiota (Lim et al., 2015). Ao nível celular, esses mecanismos provavelmente são regulados pelos genes homeóticos (Hox), interações célula a célula, interações epitélio-mesenquimais e fatores de transcrição. Inicialmente ocorre a determinação do programa específico de uma região intestinal (isto é, regiões anterior, média ou posterior do intestino primitivo) para então se dar a diferenciação detalhada dentro dessa região (Horb & Slack, 2001).

O CCR pode se desenvolver em diferentes locais ao longo do cólon e reto. Embora as taxas relatadas variem, os tumores do cólon esquerdo e do reto combinados são mais comuns do que os do cólon direito (Figura 3; Brenner et al., 2012).

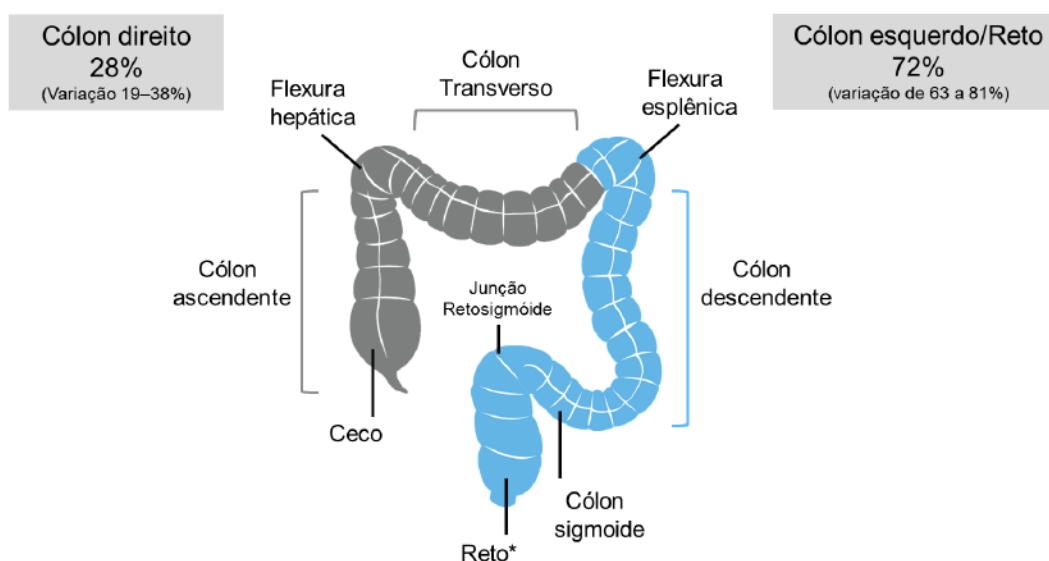


Figura 3: Anatomia do cólon e reto e percentual de incidência da lateralidade do tumor; Fonte: Adaptado de (Iacopetta, 2002).

1.3 Aspectos moleculares e patogênese do CCR

O CCR é uma doença heterogênea e vários modelos de classificação foram propostos, resumidos na Figura 4 (Bae et al., 2016; Guinney et al., 2015).

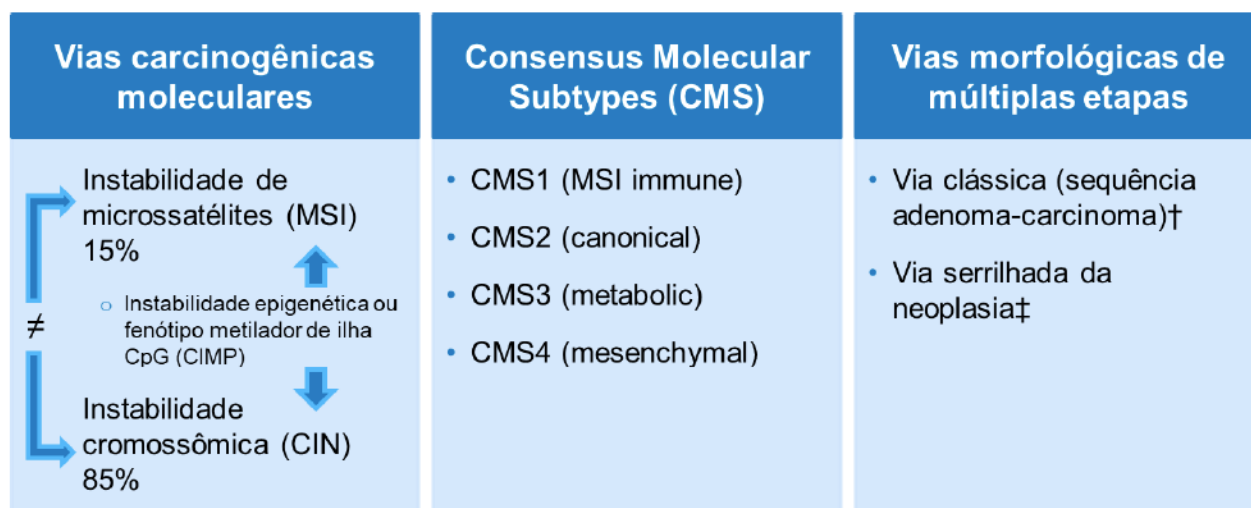


Figura 4: CCR: modelos convencionais de classificação molecular e morfológica. Fonte: (Bae et al., 2016; Guinney et al., 2015).

A via clássica é a sequência adenoma-carcinoma do CCR, que representa a acumulação progressiva de alterações genéticas somáticas levando à transição do tecido colônico ou retal para pólipos adenomatosos, com subsequente inativação de genes supressores de tumor (*APC*, *TP53*, *NRAS* e *KRAS2*) e desenvolvimento do CCR esporádico. Pólipos adenomatosos compõem dois terços de todos os pólipos no cólon e são as lesões precursoras mais comuns do CCR. Do ponto de vista histológico, os adenomas convencionais são categorizados em subtipos histológicos tubulares, tubulovilosos ou vilosos (Kuipers et al., 2015). Em contraste, a via serrilhada alternativa é desencadeada por mutações ativadoras em *BRAF* (proto-oncogene cinase de serina/treonina B-Raf) e/ou inativação de genes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) de

² Genes *APC* (*APC regulator of Wnt pathway*); *TP53* (*Tumor protein p53*), *NRAS* (*NRAS protooncogene GTPase*), *KRAS* (*KRAS protooncogene GTPase*).

³ Genes *MLH1* (*MutL homolog 1*), *MSH2* (*MutS homolog 2*), *MSH6* (*MutS homolog 6*), *PMS2* (*PMS1 homolog 2, mismatch repair system component*).

reparo de mal emparelhamento do DNA (MMR, do inglês, *DNA mismatch repair*) que implica instabilidade de microssatélites (MSI), um marcador molecular do efeito das mutações desses genes. Deficiências de proteínas codificadas por genes MMR podem ser detectadas por imunistoquímica com anticorpos específicos em tecido tumoral. Quando na sequência codificadora de proteínas, erros de MMR podem causar deslocamento da fase de leitura traducional. Pólipos neoplásicos serrilhados incluem adenomas serrilhados tradicionais e lesões serrilhadas sésseis, também conhecidos como adenomas ou pólipos serrilhados sésseis. As lesões serrilhadas sésseis são o tipo mais comum de pólipos serrilhados pré-malignos e estão predominantemente localizadas no cólon direito (Nakanishi et al., 2019; Shuford et al., 2020).

Outro modelo proposto é o das vias carcinogênicas moleculares, exemplificado por um conjunto com três vias principais: (i) instabilidade de microssatélites (MSI), (ii) fenótipo metilador de ilha CpG (CIMP) e (iii) instabilidade cromossômica (CIN). A via MSI é caracterizada por alterações no número de repetições de nucleotídeos de locos genômicos de microssatélites e mutações subsequentes, inativadoras de genes supressores de tumores ou genes relacionados a tumores. Tumores da síndrome de Lynch e um pequeno percentual de CCR esporádicos (2-3%) têm níveis elevados de MSI (MSI-alto). No entanto, suas lesões pré-malignas se desenvolvem por diferentes vias morfológicas de múltiplos estágios. Os tumores da síndrome de Lynch seguem a via clássica e têm lesões pré-malignas de adenoma tubular ou tubuloviloso. CCR esporádicos MSI-alto têm lesões pré-malignas de adenoma serrilhado sésil que se desenvolvem pela via de neoplasia serrilhada e posteriormente sofrem inativação associada à hipermetilação de *MLH1* adquirindo altos níveis de MSI (Bae et al., 2016).

A via CIMP consiste na hipermetilação generalizada de citosinas de ilhas CpG, um tipo de promotor de genes que com frequência têm expressão constitutiva. Logo, essa via, que representa importante alteração epigenética, causa a inativação de genes que deveriam se manter ativos, como genes supressores de tumores (Bae et al., 2016). A via CIN apresenta

alterações no número e na estrutura dos cromossomos e outras alterações genéticas, como amplificação de protooncogenes e pontos de quebra cromossômica em genes supressores de tumores. As vias CIN e MSI são mutuamente excludentes; no entanto, a via CIMP se sobrepõe às vias MSI e CIN (Bae et al., 2016).

Um consórcio internacional foi organizado para resolver inconsistências entre as classificações de CCR baseadas em expressão gênica, tendo sido propostos quatro subtipos moleculares de consenso baseados em análises globais do transcriptoma tumoral, que se encontram resumidos na Figura 5 (Guinney et al., 2015).

The Colorectal Cancer Subtyping Consortium (CRCSC)

Estudo baseado em multicóortes

- ✓ Incluiu mais de 4.000 amostras em 30 coortes de pacientes
- ✓ As coortes precisavam ter dados de expressão genética

CMS1 (14%)

MSI imune

- Cólon direito, feminino
- MSI, CIMP alto, hipermutação
- BRAF Mut,
- Ativação imunológica
- Pior sobrevida após recorrência



CMS2 (37%)

Canônico

- Cólon esquerdo
- MSS, CIN, BRAF WT, TP53 Mut
- SCNA alto
- Epitelial
- Ativação da via Wnt/Myc
- Melhor sobrevida após recorrência

CMS3 (13%)

Metabólico

- KRAS Mut
- Epitelial
- Status MSI misto, SCNA e CIMP baixo

CMS4 (23%)

Mesenquimal

- Infiltração estromal
- Ativação da via TGFβ, superexpressão de NOTCH3
- Pior SLP & SG

Não classificado (13%)

Padrões heterogêneos

Figura 5: Quatro consensos de subtipos moleculares (CMS1-4) classificados de acordo com mutações em genes específicos. Mut: mutado; WT: tipo selvagem; SCNA: Somatic copy number alterations; NOTCH3: gene que codifica para o receptor 3 de NOTCH; SLP: sobrevida livre de progressão; SG: sobrevida global. TGF: transforming growth factor; Demais acrônimos já citados no texto. Fonte: Adaptado de The Colorectal Cancer Subtyping Consortium (CRCSC); Guinney et al., 2015).

Quando analisadas em contexto à associação dos locais anatômicos do CCR, cólon direito e cólon esquerdo, os fenótipos clínicos e moleculares estabelecidos pelos quatro CMS adicionam considerável heterogeneidade ao tema, uma vez que eles também diferem em desfechos clínicos, microbioma e resposta ao tratamento com grande impacto na prática clínica (Testa et al., 2018). Apesar de se tratar de um sistema de classificação robusto para o CCR, com clara plausibilidade biológica e dever ser considerado a base para futura estratificação clínica e intervenções direcionadas baseadas em subtipos, tem, entretanto, elevados complexidade e custo, limitações para a adoção na prática clínica (Testa et al., 2018), razões pelas quais vem perdendo a relevância.

1.4 Estadiamento de CCR

CCR é, em geral, clinicamente silencioso, exceto na doença avançada que pode se manifestar por complicações como sangramento ou obstrução intestinal e peritonite (Sawicki et al., 2021). Aproximadamente 22% dos CCRs são metastáticos ao diagnóstico inicial e cerca de 70% dos pacientes eventualmente desenvolverão recidiva metastática. Pacientes com CCR metastático (CCRM) apresentam em geral pior prognóstico, com taxa de sobrevida relativa de 5 anos de 14%, em comparação a 71% e 90% para aqueles com CCR regional e localizado (Wang et al., 2020). Os principais sítios de metástases são o fígado (75%), pulmões (15%), ossos (5%) e sistema nervoso central (5%). Cerca de 20% dos pacientes são diagnosticados com metástase hepática sincrônica (Vatandoust et al., 2015; Wang et al., 2020).

Após o diagnóstico de CCRM, além de um histórico médico completo e exame físico, deve ser realizado um hemograma completo e testes laboratoriais bioquímicos, incluindo o antígeno carcinoembrionário (CEA) e, opcionalmente, os níveis do antígeno carboidrato (CA 19-9).

O estadiamento do CCR segue o estadiamento TNM (tumor-linfonodo-metástase) do *American Joint Committee on Cancer (AJCC, American College of Surgeons, Chicago IL)* e é realizado principalmente com técnicas de imagem, geralmente tomografia computadorizada (TC)

com contraste do tórax para exclusão de metástase pulmonar, abdômen e pelve para exclusão de doença hepática e ou peritoneal. Avaliações complementares importantes incluem ultrassonografia do abdômen e pelve, preferencialmente com agentes de contraste específicos ou ressonância nuclear magnética (RNM). Esta é a escolha em caso de metástases hepáticas de origem colorretal passíveis de tratamento local para definição com acurácia do número e localização das metástases (Kuipers et al., 2015).

A mesma técnica radiológica deve ser utilizada no início e na avaliação da resposta após a terapia. Uma tomografia por emissão de pósitrons com 2-[F]fluoro-2-deoxi-D-glicose (FDG-PET) pode ser útil, especialmente em pacientes com marcadores tumorais elevados sem evidência de doença metastática ou para se definir a extensão da doença metastática em metástases potencialmente ressecáveis (Cervantes et al., 2023).

1.5 Biomarcadores e CCRm

Avanços significativos têm sido alcançados no tratamento personalizado de pacientes com CCRm (Piawah & Venook, 2019). Embora alterações genéticas específicas sejam importantes para orientar a terapia direcionada ao alvo molecular, elas não são suficientes para determinar o desfecho clínico de um paciente. Uma nova abordagem emergente enfatiza que a biologia intrínseca das células no CCR deve ser considerada juntamente com os perfis moleculares de tumores individuais (Di Nicolantonio et al., 2021). Além disso, a compreensão recente de biomarcadores com implicações clínicas no CCR refratário tem ajudado na escolha de melhores decisões terapêuticas e otimização de resultados para pacientes que recebem agentes biológicos (Baraibar et al., 2020). Como exemplo, as mutações em genes RAS no CCRm são consideradas preditores negativos de resposta a anticorpos monoclonais (mAb) anti-EGFR (Cremolini et al., 2017; Tejpar et al., 2017). Outro exemplo da importância de uma abordagem diagnóstica molecular mais abrangente é a detecção da variante *BRAF* p.V600E, associada à hiperativação da via EGFR, sendo um fator de pior prognóstico em CCRm (Sanz-Garcia et al.,

2017). Para tanto, a inibição combinada de BRAF e via RAS-RAF-MEK-ERK é necessária para se controlar a resistência adaptativa devido a alças de retroalimentação mediada pela atividade EGFR específica de CCR (Di Nicolantonio et al., 2021).

A identificação de MMR deficiente (dMMR) em CCRm seleciona pacientes que podem se beneficiar de inibidores de checkpoint imunológico. Assim, atualmente, testes para status de MMR, éxons 2, 3 e 4 de *NRAS* e *KRAS* e alteração p.V600E no gene *BRAF* têm sido recomendados no momento do diagnóstico de CCRm, devido à sua relevância para a seleção da terapia de primeira linha (Cervantes et al., 2023).

Mais recentemente, amostras de tumores CCRm mostraram amplificação genômica do gene do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (*HER2*) (Sartore-Bianchi et al., 2016). A detecção da proteína por imunoistoquímica (IHC) ou a hibridização in situ fluorescente (FISH) de cromossomos tem sido recomendada para tumores com RAS selvagem, contribuindo para identificar pacientes que podem se beneficiar do bloqueio de *HER2* (Cervantes et al., 2023).

Embora as fusões de genes *NTRK*⁴ (*NTRK1*, *NTRK2* ou *NTRK3*) sejam raras em CCRm, com incidência inferior a 0,5%, quando possível se recomenda sua avaliação por IHC e confirmação por sequenciamento de nova geração (NGS) do DNA tumoral (Cervantes et al., 2023). Em pacientes com progressão da doença após pelo menos duas linhas de tratamento, a detecção de fusões de *NTRK* pode influenciar a escolha terapêutica de inibidores de TRK recém-aprovados (Cervantes et al., 2023).

De forma prática, a lateralidade tumoral tornou-se relevante para melhor compreensão dos resultados de estudos clínicos com agentes terapêuticos já disponíveis para o tratamento do CCRm. A lateralidade primária do tumor já era reconhecida como um biomarcador prognóstico

⁴ *NTRK* (*Neurotrophic receptor tyrosine kinase*).

no CCRm (Boeckx et al., 2017; Holch et al., 2017), passando a ser considerada um marcador preditivo relevante para a resposta à terapia anti-EGFR, como para tumores com RAS tipo-selvagem do cólon esquerdo quando comparados aos tumores do lado direito (Holch et al., 2017). No entanto, a base molecular dessa resposta diferencial ainda não é completamente compreendida e, embora cólon direito e esquerdo tenham diferentes origens embrionárias, a classificação com base na lateralidade do tumor tende a ser considerada demasiadamente simplificada, pois os subtipos moleculares se manifestariam mais como um *continuum* (Loree et al., 2018).

1.6 Tratamento do CCRm

Em CCRm, uma combinação de características clinicopatológicas, aspectos da biologia do tumor e comorbidades do paciente constitui a base convencional para a avaliação do prognóstico e orientação das decisões de tratamento (Van Cutsem et al., 2016). A cura não é possível para a maioria dos pacientes com CCRm, embora alguns pacientes que tenham envolvimento limitado de órgãos distantes (particularmente restrito ao fígado e/ou pulmão) possam ser curados com cirurgia ou aqueles pacientes com CCRm MSI-alto que experimentam resposta completa aos inibidores de checkpoint imune. Para outros, a quimioterapia associada ou não a agentes biológicos é a opção mais apropriada. Esta última abordagem não cura o CCRm, mas pode melhorar os sintomas e prolongar a vida. Há casos em que ambos, quimioterapia e cirurgia, são recomendados.

De acordo com as últimas diretrizes do *European Society for Medical Oncology* (ESMO, Lugano, Suíça) para o tratamento da doença avançada e metastática, os pacientes podem ser estratificados em duas grandes categorias: (1) aqueles adequados à alguma abordagem terapêutica, clínica e ou cirúrgica (“Adequados”); ou (2) aqueles considerados inadequados (“Inadequados”). Objetivos de tratamento para pacientes em boas condições de saúde (“Adequados”) diferem de acordo com diferentes cenários agrupados em: (a) cura, geralmente

alcançada por meio de cirurgia, nos casos de CCRm localizada, no fígado, pulmão e outros órgãos de forma isolada; (b) alcance de uma boa resposta e redução do tamanho do tumor com quimioterapia (QT), permitindo o tratamento com intenção curativa em doença inicialmente inoperável, isto é, aqueles potencialmente candidatos à citorredução, e (c) melhora dos sintomas relacionados ao tumor, com o objetivo de retardar a progressão e prolongar a sobrevida em doença metastática, bem como manutenção da qualidade de vida, ou seja, pacientes inelegíveis ao tratamento cirúrgico definitivo (Cervantes et al., 2023).

1.6.1 Tratamento para o grupo de pacientes CCRm – “Adequados”

1.6.1.1 Manejo da doença ressecável/potencialmente ressecável

A ressecção cirúrgica de metástases hepáticas de origem colorretal (CRLM), desde que seja possível realizá-la com margens livres de tumor (R0), representa um tratamento com potencial curativo, com taxas de sobrevida em cinco anos variando de 20% a 45%. Os critérios para ressecabilidade R0 das CRLMs dependem de critérios técnicos e considerações oncológicas (prognósticas), levando em consideração a expertise da equipe multidisciplinar envolvida. Em alguns casos, técnicas ablativas como a ablação térmica (AT) ou a radioterapia estereotóxica corporal (SBRT) podem ser adicionadas à cirurgia para garantir um tratamento completo ou servir como uma alternativa à ressecção, especialmente quando a cirurgia não é viável devido à fragilidade do paciente ou à localização anatômica desfavorável das metástases (Cervantes et al., 2023).

O tratamento perioperatório com a combinação de leucovorina (LV), 5-fluorouracil (5-FU) e oxaliplatina (FOLFOX), administrado durante um período de três meses antes e após a cirurgia, em pacientes CRLM que são candidatos à ressecção cirúrgica, mas apresentam fatores prognósticos desfavoráveis, demonstrou resultados positivos. Essa abordagem pode ser considerada como um padrão de cuidado nesses casos, com base nos achados do estudo EORTC 40983 (Nordlinger et al., 2008).

1.6.1.2. Pacientes CCRm candidatos a citorredução

A maioria dos pacientes inicialmente possui uma doença metastática que não é apropriada para ressecção com intenção curativa. Neste caso, é determinante que sejam selecionados pacientes com metástases passíveis de ressecção e aqueles com doença inicialmente não passível de ressecção, mas que poderiam se tornar candidatos à ressecção após uma resposta significativa à terapia sistêmica. O objetivo, portanto, do tratamento nesse contexto é transformar uma doença inicialmente não ressecável em uma que possa ser removida cirurgicamente. As taxas de sobrevida mediana após a ressecção são de duas a três vezes maiores do que em pacientes tratados exclusivamente com terapia sistêmica, havendo potencial para cura (Cervantes et al., 2023; Osterlund et al., 2021).

No CCRm potencialmente ressecável, a terapia de conversão está indicada e consiste da adição uma terapia alvo direcionada a um agentes citotóxicos combinados em terapia dupla ou tripla é o tratamento preconizado. A ressecção das metástases deve ser realizada tão logo a sua redução seja considerada tecnicamente possível, uma vez que a administração desnecessariamente prolongada de QT pode levar ao aumento da toxicidade hepática e, portanto, maior morbidade pós-operatória (Cervantes et al., 2023).

1.6.1.3 Abordagem terapêutica com tratamentos locais

A abordagem terapêutica com tratamentos locais vai depender se a intensão é curativa ou não. Dentre inúmeras opções terapêuticas, a escolha dependerá ainda de fatores como o número e a localização das metástases, o estado geral do paciente. Dentre elas figuram: ressecção cirúrgica de lesões metastáticas; ablação por radiofrequência (RFA); ablação por micro-ondas; radioterapia estereotóxica corporal (SBRT); crioablação; terapia de radiação interna seletiva (SIRT); quimioterapia localizada (Cervantes et al., 2023).

1.6.2 Tratamento da doença avançada e metastática sem potencial de conversão (“Inadequados”)

O tratamento do paciente com a doença avançada ou metastática deve levar em consideração a melhor abordagem individualizada considerando-se diversos fatores, tais como características do: (i) tumor em relação à apresentação clínica (volume, localização e biologia do tumor); (ii) paciente, como idade, capacidade funcional, função dos órgãos, comorbidades, atitude, expectativas e preferências; e (iii) tratamento, incluindo perfil de toxicidade, flexibilidade na administração do tratamento, fatores socioeconômicos e qualidade de vida (Cervantes et al., 2023).

O tratamento de primeira linha do CCRm geralmente inclui agentes citotóxicos associados ou não a terapias biológicas direcionados tais como os agentes direcionados contra o EGFR (cetuximabe e panitumumabe) ou contra a via do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (bevacizumabe) (Cervantes et al., 2023).

O 5-FU (5-FLUOROURACIL) é a base do tratamento do CCRm, podendo ser usado como agente único especialmente em pacientes frágeis ou associado à oxaliplatina (FOLFOX) ou irinotecano (FOLFIRI), igualmente eficazes, com objetivo de alcance de uma melhora taxa de resposta e a sobrevida (Cervantes et al., 2023; de Gramont et al., 2000; J. Y. Douillard et al., 2000). A escolha destas combinações se dá com base nos diferentes perfis de toxicidade na primeira linha que podem se somar à uma terapia biológica buscando-se melhora da eficácia. Outros agentes quimioterápicos como a capecitabina podem ser combinados, tendo a combinação com oxaliplatina (CAPOX) menor perfil de toxicidade quando comparado a outros quimioterápicos (Fuchs et al., 2007).

Terapias combinadas com mais de dois agentes quimioterápicos, triplas (FOLFOXIRI), demonstram melhores taxas de resposta e sobrevida em comparação a FOLFIRI, embora às custas de maiores efeitos colaterais, o que limita a sua aplicabilidade a pacientes com boa

condição de saúde e sem comorbidades significativas (Cervantes et al., 2023; Stintzing et al., 2016).

Cetuximabe e panitumumabe (mAb anti-EGFR) demonstraram eficácia em diferentes linhas de tratamento no CCRm, tanto na monoterapia quanto combinados à quimioterapia (QT), ambos com perfis de toxicidade cutânea semelhantes e clinicamente manejáveis (Van Cutsem et al., 2007, 2009). A existência de mutações em genes RAS está relacionada à resistência aos anticorpos monoclonais anti-EGFR, sendo, portanto, seu uso desaconselhado neste contexto. Desta forma, é fundamental avaliar o status mutacional ampliado de genes RAS antes de considerar o uso de qualquer um desses agentes (Bokemeyer et al., 2015; Cervantes et al., 2023; J.-Y. Douillard et al., 2013).

No cenário do tratamento de primeira linha, uma avaliação retrospectiva da combinação FOLFIRI-cetuximabe revelou que apenas os pacientes que não apresentavam mutações no éxon 2 do gene *KRAS* experimentaram uma redução significativa no risco de progressão da doença, uma melhoria na sobrevida global e um aumento na taxa de resposta em comparação àqueles que receberam apenas o tratamento FOLFIRI. Esse achado foi posteriormente corroborado em uma análise mais ampla que considerou as mutações no gene *RAS* como um todo (Estudo Crystal) (Cervantes et al., 2023; Van Cutsem et al., 2015).

Analisando uma população de pacientes com CCRm em tratamento com FOLFOX, com ou sem panitumumabe, observou-se na subpopulação com *KRAS* não mutado (wt) uma melhora estatisticamente significativa tanto na sobrevida livre de progressão (SLP) quanto na sobrevida global (SG) com a administração de FOLFOX4 e panitumumabe. Uma análise expandida do status do gene RAS, que englobou mutações nos éxons 2, 3 e 4 de *KRAS*, éxons 2, 3 e 4 de *NRAS*, bem como a presença da variante *BRAF* V600E, confirmou a eficácia da combinação FOLFOX-panitumumabe na subpopulação com *KRAS* não mutado (Estudo PRIME);(Cervantes et al., 2023; J. Y. Douillard et al., 2014; J.-Y. Douillard et al., 2013).

A combinação de cetuximabe e oxaliplatina no cenário de primeira linha também foi explorada pelo estudo TAILOR, de fase III, demonstrando melhor taxa de resposta objetiva (TR), sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida global (SG) na população com *RAS* não mutado (wt) (Qin et al., 2018).

A localização do tumor é um fator importante ao decidir o uso de mAbs anti-EGFR em tumores com *RAS* não mutado. O benefício dos mAbs anti-EGFR é muito relevante em tumores do lado esquerdo, com aumento significativo na TR e prolongamento relevante de SLP e SG (Arnold et al., 2017; Cervantes et al., 2023). Em tumores do lado direito, não é observado benefício em relação a SLP e SG com a adição de cetuximabe ou panitumumabe, exceto um aumento numérico (mas não significativo) nas taxas de resposta. Por esse motivo, uma combinação dupla ou tripla com bevacizumabe é a opção preferida para pacientes com tumores do lado direito, independentemente do status mutacional *RAS* (Cervantes et al., 2023).

No contexto do tratamento de primeira linha do CCRm, um esquema terapêutico comumente utilizado e eficaz envolve a combinação de QT com o agente antiangiogênico bevacizumabe, que é um inibidor seletivo de VEGF-A. Entre os efeitos adversos mais frequentemente associados aos agentes antiangiogênicos, estão o aumento da pressão arterial e proteinúria. Menos comuns, porém, incluem a ocorrência de trombose arterial, um maior risco de sangramentos, perfuração intestinal e atraso na cicatrização de feridas (Cervantes et al., 2023).

1.6.2.1 Anti-EGFR Versus Anti-VEGF na primeira linha do CCRm

Para determinar qual terapia direcionada (estratégia Anti-EGFR ou Anti-VEGF) deve oferecer o maior benefício em potencial quando combinada com QT, no cenário de primeira linha, quatro ensaios clínicos importantes exploraram essas combinações: o estudo FIRE-3, o CALGB/SWOG 80405, o estudo PEAK e, mais recentemente, o estudo PARADIGM, apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Principais estudos comparando combinações com agentes Anti-EGFR Versus Anti-VEGF na primeira linha de tratamento do CCRm. Fonte: Adaptado de (Cervantes et al., 2023).

Estudo	População CCRM/ KRAS/exon 2 wt	Significância dos desfechos avaliados (Sim/Não)		
		Análise primária	Análise post- hoc ou estendidas	Análises Subsequentes
FIRE-3 Fase III	FOLFIRI + bevacizumabe x FOLFIRI + Cetuximabe	Braço Cetuximabe TR - Não SLP - Não SG - Sim	Braço Cetuximabe TR - Sim Redução precoce do tumor - Sim Profundidade de resposta - Sim	
CALGB/SWOG 80405 Fase III	Cetuximabe ou bevacizumabe, + FOLFOX ou FOLFIRI	SLP - Não SG - Não	Análise expandida RAS Braço Cetuximabe: TR - Sim SLP - Não SG - Não	Retrospectiva KRAS-wt/ Lado esquerdo Braço Cetuximabe: SG - Sim SLP – Sim Lado direito Bevacizumabe SG - Sim
PEAK Fase II	mFOLFOX6 + Panitumumabe ou mFOLFOX6 + Bevacizumabe	RAS-wt Braço Panitumumabe SLP- Sim	Braço Panitumumabe SG - Sim	
PARADIGM Fase III	(KRAS/NRAS) wild-type mFOLFOX6 + Panitumumabe ou mFOLFOX6 + Bevacizumabe		Braço Panitumumabe Lado esquerdo SG – Sim	

1.6.2.2 Terapia de primeira linha em CCRM dMMR/MSI-H e mutação *BRAF*

V600E

A atividade da imunoterapia de bloqueio do *anti-programmed cell death protein 1* (PD-1) foi demonstrada em pacientes com CCRM com status dMMR e MSI alto (MSI-H). Em um ensaio clínico pivotal de fase III (Estudo KEYNOTE-177), 307 pacientes com mCCR dMMR/MSI-H não tratados previamente foram randomizados para receber pembrolizumabe (administrado até a progressão da doença ou por um máximo de dois anos) ou terapia padrão (quimioterapia mais agentes direcionados, de acordo com a escolha do investigador). O pembrolizumabe demonstrou

melhora no desfecho primário de SLP. Um benefício na SG, não foi observado, provavelmente devido ao crossover que permitiu que 60% dos pacientes que progrediram recebessem um inibidor de checkpoint imune (Diaz et al., 2022).

A presença de mutações no gene *BRAF* V600E está associada a um prognóstico desfavorável em CCRm, e as terapias atuais têm demonstrado menor eficácia nesses pacientes. Novas estratégias que bloqueiam a via de sinalização BRAF mostraram atividade preliminar, mas nenhuma delas foi aprovada ainda como tratamento de primeira linha (Cervantes et al., 2023). As diversas opções terapêuticas disponíveis na primeira linha do CCRm se encontram resumidas na Figura 6.

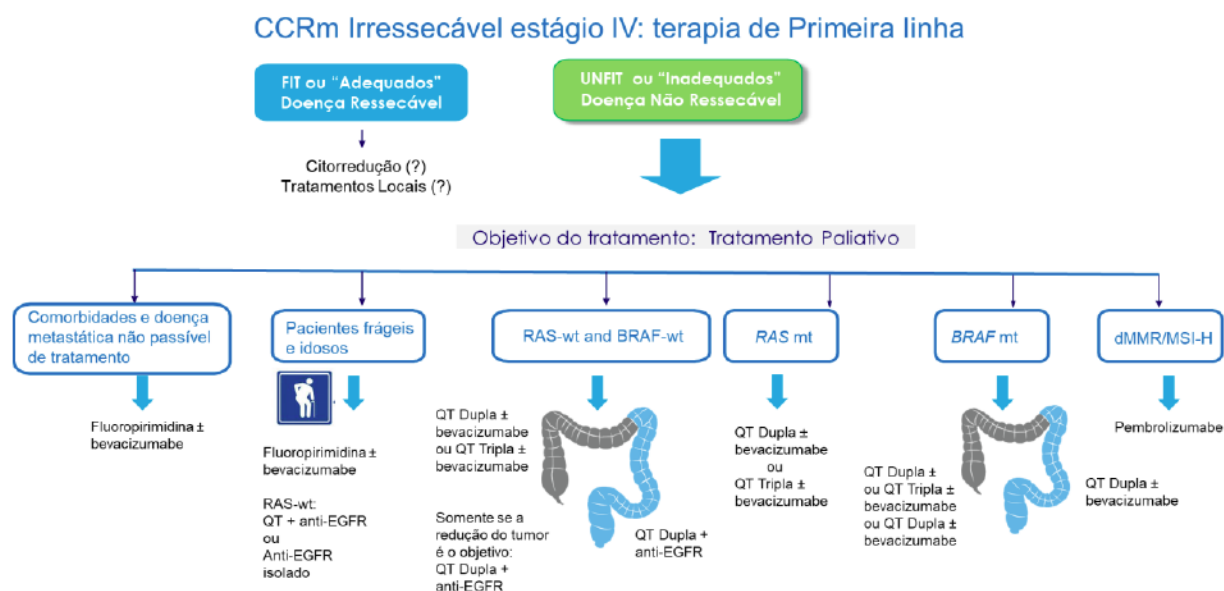


Figura 6: Visão geral das opções terapêuticas disponíveis na primeira linha do CCRm. Fonte: Adaptado de (Cervantes et al., 2023).

Mesmo diante desse cenário e da identificação de múltiplos biomarcadores prognósticos e preditivos e assinaturas genéticas tumorais, ainda não está claro como a expressão de muitos desses biomarcadores se correlaciona ou é modulada pela quimioterapia e agentes biológicos, afetando potencialmente a resposta ao tratamento (Maurel & Postigo, 2015). Portanto, a identificação e compreensão de potenciais biomarcadores prognósticos de evolução da doença,

bem como preditivos de resposta terapêutica são de importância fundamental para uma abordagem individualizada do paciente. Afinal, os biomarcadores têm o potencial de alterar os algoritmos de diagnóstico e tratamento, selecionando e otimizando as intervenções terapêuticas mais adequadas a um amplo espectro de pacientes.

Apesar de todas as conquistas terapêuticas, a maioria dos pacientes com CCRm ainda tem um prognóstico reservado. Assim, a busca por novos biomarcadores é necessária para refinar o prognóstico e prever a resposta, notadamente com métodos rotineiros e de baixo custo atraentes.

1.7 O fator de transcrição CDX2 em CCR e CCRm

Diferentes biomarcadores prognósticos e/ou preditivos emergentes encontram-se sob avaliação em CCRm (Zygulska & Pierzchalski, 2022). Dentre eles, o fator de transcrição homeótico tipo caudal 2 (CDX2), uma proteína codificada pelo gene *CDX2* (13q12.2; OMIM #600297)⁵, desempenha um papel essencial no desenvolvimento embrionário, diferenciação e manutenção de epitélio do cólon e tem função supressora tumoral ao controlar a transcrição de um número de genes responsáveis pela proliferação, migração e carcinogênese (Chawengsaksophak et al., 2004; Gao et al., 2009; R. J. Guo et al., 2004; James et al., 1994; Macdonald & Struhl, 1986; Silberg et al., 2000). A detecção imunoistoquímica da expressão de CDX2 é reconhecida como um biomarcador diagnóstico clinicamente útil no CCR, especialmente nos casos metastáticos em que a origem do tumor é desconhecida (Barbareschi et al., 2003; Kaimaktchiev et al., 2004; Werling et al., 2003).

Uma frequência variável de perda de expressão de CDX2 tem sido observada no CCR.

⁵ OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>).

O exato mecanismo que controla a perda da expressão é pouco conhecido. Metilação de citosinas do promotor e desacetilação de histona são dois mecanismos epigenéticos que podem regular a expressão gênica, modificando a acessibilidade do DNA à maquinaria transcricional. Esses mecanismos podem levar ao silenciamento do gene ou diminuição da expressão. Há evidências que sugerem que alterações epigenéticas levando ao silenciamento epigenético de CDX2 se dê por meio desses mecanismos, podendo contribuir para a perda de sua expressão em certos subtipos de tumores colorretais incluindo aqueles que seguem a via serrilhada (Graule et al., 2018).

No CCRm, a prevalência de perda de CDX2 varia de 2,8% a 48% (Tabela 2), chegando a 67% em uma coorte com mutação em *BRAF* V600E (Loupakis et al., 2019). Essa variabilidade pode ser explicada, entre outros, pelos diferentes métodos de avaliação da negatividade do CDX2. Alguns estudos consideraram apenas a ausência de expressão de CDX2 pela IHC, outros também consideraram negativo se expressão nuclear fraca em menos de 10% das células tumorais e um utilizou um escore considerando o nível de intensidade e a porcentagem de células tumorais expressando CDX2, categorizando em baixo, expressão intermediária e alta. Portanto, uma avaliação padronizada do CDX2 é necessária antes de sua avaliação como marcador prognóstico.

A perda da expressão de CDX2 está associada a um mau prognóstico no CCR inicial (Dalerba et al., 2016; Hansen et al., 2018; Tomasello et al., 2018). Da mesma forma, evidências acumuladas sugerem ser um fator prognóstico ruim também no cenário metastático. A primeira evidência, em uma população ocidental, foi uma análise retrospectiva de 66 pacientes com CCRm sem expressão de CDX2 comparados a uma coorte pareada por idade cujos tumores expressavam CDX2. Após o ajuste para covariáveis, observou-se uma SG mediana menor para pacientes com CDX2 negativo em CCRm (taxa de risco [HR] 4,52, IC 95% 2,50-8,17, $p < 0,0001$) (Zhang et al., 2017), (Tabela 2).

Tabela 2. CDX2 como biomarcador de pior prognóstico em CCRm. Fonte: (Zhang et al. 2017) (Aasebø et al., 2020) (Soares et al., 2020) (Loupakis et al, 2019) (Bruun et al., 2018) (Neumann et al, 2020) (Bae et al, 2015) (Baba et al, 2009).

Estudo	(N) Pacientes	Perda de CDX2	SG Univariada (HR, 95% CI, <i>p</i>)	SG Multivariada (HR, 95% CI, <i>p</i>)
Zhang et al. 2017)	66	5.6%	4.04, 95% IC 2.49-6.54, <i>p</i> < 0.0001	4.52, 95% IC 2.50-8.17, <i>p</i> < 0.0001
Aasebø et al. (2020)	452	19%	1.93, 95% IC 1.52-2.46, <i>p</i> < 0.001	1.50, 95% IC 1.05-2.15, <i>p</i> < 0.027
Soares et al. (2020)	125	30.4%	2.27, 95% IC 1.37-3.85, <i>p</i> = 0.002	-
Loupakis et al. (2019)	155 <i>BRAF</i> <i>mt</i>	67.4%	1.72, 95% IC 1.03-2.86, <i>p</i> = 0.036	1.92, 95% IC 0.94-4.00, <i>p</i> = 0.07
Bruun et al. (2018)	212	15%	3.96, 95% IC 2.50-6.28, <i>p</i> < 0.0001	2.38, 95% IC 1.26-4.48, <i>p</i> = 0.0074
Neumann et al. (2018)	387	2.8%	2.5, <i>p</i> = 0.008*	-
Bae et al. (2015)	42	5.9%	-	1.72, 95%CI: 1.04-2.85, <i>P</i> = 0.034
Baba et al. (2009)	85	48%	3.39, 95% IC 1.87-6.16, <i>p</i> < 0.0001	-

CDX2, homeobox 2 tipo caudal; *mt*, mutado; OS, sobrevida global; HR, Razão de risco; IC, intervalo de confiança; *p*, valor *p*.

* inclui M0 e não há dados de SG para M1 – SG reduzida para o estágio IV (*p* < 0,001)

Em uma coorte populacional escandinava com 452 casos de CCRm, a perda da expressão de CDX2 tumoral associou-se a pior sobrevida. As medianas de SLP e SG para pacientes recebendo quimioterapia de primeira linha foram menores quando não havia expressão tumoral de CDX2 (Aasebø et al., 2020). Pacientes com CCRm e perda de CDX2 receberam quimioterapia de primeira linha por menos tempo, foram mais propensos a progressão imediata na terapia de primeira linha e submetidos a menos quimioterapia de segunda linha e cirurgia secundária do que aqueles com expressão tumoral de CDX2 (Aasebø et al., 2020). Além disso, uma grande série avaliou o valor prognóstico de CDX2 de acordo com o estágio da doença, e o valor prognóstico ruim foi limitado ao estágio IV (212 pacientes) (Bruun et al., 2018) . Outra série com 125 pacientes com CCRm também evidenciou que a positividade de CDX2 se correlaciona com um menor risco de morte (HR 0,44, IC 95% 0,26-0,73, *p* = 0,002) (Soares et al., 2020), (Tabela 2).

É importante ressaltar que o efeito prognóstico do CDX2 também foi investigado na presença de outros biomarcadores prognósticos conhecidos. Dados indicam uma relação com redução da sobrevida, diferenciação pobre do tumor, localização proximal, MSI, CIMP e variantes patogênicas em *BRAF*, notadamente a variante p.V600E (Baba et al., 2009; Bae et al., 2015, 2016; Dalerba et al., 2016; Lugli et al., 2008; Tarazona et al., 2020; Tomasello et al., 2018; Zlobec et al., 2010). No entanto, o valor prognóstico independente da regulação negativa do CDX2 no CCR ainda está em debate. Poucos relatos abordaram apenas a expressão de CDX2 e seus potenciais valores prognósticos e preditivos em CCRm (Aasebø et al., 2020; B. Y. Zhang et al., 2017b). Embora existam discrepâncias entre diferentes séries, a regulação negativa de CDX2 é comumente correlacionada com mutação em *BRAF*, pouca diferenciação e instabilidade de microssatélites (Aasebø et al., 2020; Bae et al., 2015; Olsen et al., 2016). A perda da expressão de CDX2 também foi considerada um marcador de mau prognóstico em pacientes CCR com alto conteúdo de estroma (Sandberg et al., 2019). No estudo de base populacional, a ausência de expressão de CDX2 manteve-se como um marcador independente de mau prognóstico (Aasebø et al. 2020). Por outro lado, outras séries também demonstraram uma correlação significativa da perda de CDX2 com MSI e a presença de mutações em *BRAF*, embora não pudessem ser independentes como biomarcador prognóstico (Neumann et al., 2018).

A mutação em *BRAFFV600E* confere um prognóstico significativamente pior para o CCRm, independentemente das características clínico-patológicas associadas (Seligmann et al., 2017). Em uma coorte citada anteriormente, a perda de CDX2 estava presente em 19% no geral, mas em 53% nos casos com a mutação *BRAFFV600E* (Aasebø et al., 2020). Neste estudo, pacientes com CCRm *BRAFFV600E* mutado e CDX2 expresso apresentaram SG mediana (21 meses) comparável a de pacientes com tumores com variante *BRAF V600E* (27 meses). Em uma série com 155 casos de CCRm exclusivamente com mutação *BRAFFV600E*, a perda de CDX2 se manteve como um fator de prognóstico desfavorável, conferindo uma pior sobrevida (SG) (HR =

1,72, IC 95% 1,03-2,86, $p = 0,036$) (Loupakis et al., 2019). Em resumo, poucos estudos avaliaram a expressão de CDX2 como um marcador prognóstico em pacientes com CCRm e mutação *BRAFV600E*; no entanto, a expressão tumoral de CDX2 parece se manter como um fator de mau prognóstico

1.8 CDX2, COX2, inflamação e CCRm

Como visto, a perda da expressão do supressor tumoral CDX2, seus potenciais valores prognósticos e preditivos em CCRm e sua correlação com outros biomarcadores potenciais são de grande interesse.

A inflamação crônica é um fator de risco conhecido para o desenvolvimento e desfecho do CCR (Itzkowitz & Yio, 2004). Existem alterações extensas nos níveis séricos de citocinas em CCRm (Kantola et al., 2012). Mediadores inflamatórios foram relacionados à regulação da expressão de CDX2 por meio de mecanismos não completamente compreendidos. A perda da expressão de CDX2 tem sido associada à inflamação intestinal como um repressor a montante de moléculas-chave na cascata de sinalização inflamatória. A expressão reduzida de CDX2 em uma linhagem celular de câncer de cólon humano aumentou a resposta inflamatória mediada por NF- κ B, aumentando a expressão de ciclooxigenase 2 (COX2) (S. P. Kim et al., 2004), proteína codificada pelo gene *PTGS2* (do inglês, prostaglandin-endoperoxidase synthase 2; 1q31.1; OMIM#600262). A superexpressão de COX2 mostrou uma associação direta significativa com estágios avançados de CCR (S. H. Kim et al., 2018).

COX2 catalisa a conversão do ácido araquidônico livre em prostaglandina (PG) H₂, o precursor de outras prostaglandinas e tromboxanos. Esses compostos são importantes reguladores da proliferação celular, angiogênese, função imunológica e inflamação, podendo contribuir para o desenvolvimento e progressão da neoplasia (Greenhough et al., 2009). COX2 previne a apoptose gerando PGE₂ e PGI₂ antiapoptóticas e reduzindo o substrato pró-apoptótico ácido araquidônico (Cutler et al., 2003; Ruan & So, 2014).

Uma das formas para superexpressão de COX2 é a ligação reduzida de CDX2 a NF- κ B. Essa associação proteína-proteína é suficiente para comprometer a ativação do promotor *PTGS2* por NF- κ B (Mutoh et al., 2007). NF- κ B, se associado à citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral alfa, tem atividade reprimida sobre o promotor de *CDX2* diminuindo assim a quantidade de proteína CDX2 produzida (S. P. Kim et al., 2004). Portanto, a inflamação pode ser regulada negativamente pela proteína CDX2 e, por outro lado, o promotor de *CDX2* pode ser reprimido por certas citocinas, reduzindo a transcrição desse gene (Coskun et al., 2011). No entanto, a relação entre ambos os marcadores, CDX2 e COX2, na patogênese do CCRm permanece indeterminada.

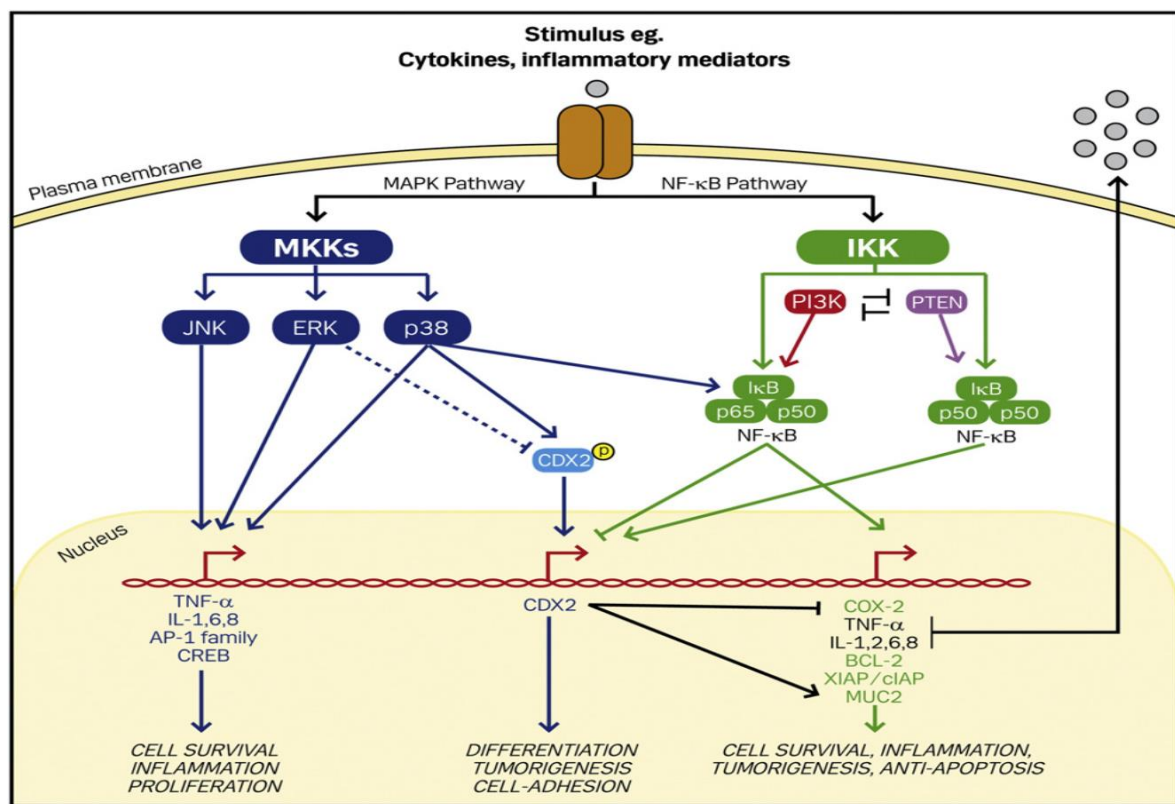


Figura 7: Regulação da expressão de *CDX2* por mediadores inflamatórios. Fonte: (Coskun et al., 2011).

Uma implicação entre inflamação, expressão de CDX2 e tumorigênese tem sido observada em outros modelos clínicos relevantes, mais especificamente em dois clássicos exemplos de

metaplasia gastrointestinal: a metaplasia gástrica intestinal e o esôfago de Barrett, ambos considerados fatores de risco para o adenocarcinoma gástrico e câncer de esôfago, respectivamente. Em ambos, o microambiente de inflamação crônica provocada pela infecção por *Helicobacter pylori* no estômago e refluxo de ácido-bile para o esôfago, a expressão ectópica de CDX2 precedeu a metaplasia, sendo considerada a causa para ambos os processos de substituição do epitélio original em colunar de fenótipo intestinal (Colleypriest et al., 2010; Joo et al., 2016; Stairs et al., 2010). De forma interessante, a regulação da expressão do gene *CDX2* em linhagens de células de câncer do esôfago de tipo escamoso (M. Z. Guo et al., 2007) e de adenocarcinoma gástrico (Yuasa et al., 2005) foi governada por mecanismos epigenéticos de silenciamento, resultando na redução anormal da expressão de CDX2, como promotor na carcinogênese.

Em modelos de doenças inflamatórias intestinais (colite ulcerativa e doença de Crohn), conhecidos fatores de risco para o desenvolvimento de CCR (Itzkowitz & Yio, 2004), Coskun e cols. (2014) observaram uma redução da expressão de CDX2 no epitélio intestinal de pacientes com colite ulcerativa inversamente correlacionada com o nível de TNF- α . Os autores relatam o envolvimento de CDX2 na “ativação cruzada” entre o TNF- α e a via de sinalização Wnt, o que pode ser importante para a compreensão da ligação entre a inflamação intestinal e a tumorigênese (Coskun, 2014).

Embora a superexpressão de COX2 tenha mostrado uma associação significativamente direta com a recorrência do CCR (S. H. Kim et al., 2018; Tomozawa et al., 2000) e estágios avançados do CCR (H. Zhang & Sun, 2002), seu significado prognóstico geral no CCR permanece obscuro (Peng et al., 2013). Mais recentemente, a ausência de CDX2 foi correlacionada ao aumento da infiltração de macrófagos e ativação de vias pró-inflamatórias no epitélio intestinal (Chewchuk et al., 2021), mas o impacto da infiltração de células imunes no tumor primário de pacientes com CCRm não está claramente estabelecido. No entanto, o papel

dos linfócitos e macrófagos infiltrados no tumor de pacientes com CCRm tem mostrado ser benéfico em subconjuntos específicos de pacientes, o que indica que a relação entre as vias inflamatórias e o prognóstico no CCR avançado é complexa e dependente do contexto/estágio (Aasebø et al., 2022). O contexto imunológico do microambiente tumoral de CCRm alterado por agentes citotóxicos e terapias alvo que influenciam o prognóstico adiciona outra camada de complexidade a ser totalmente elucidada (Moretto et al., 2020).

Na última década, agentes anti-inflamatórios não esteroidais especialmente a aspirina e o celecoxibe, têm sido extensamente estudados por seus potenciais efeitos quimiopreventivos e complementares ao tratamento de neoplasias colorretais e gástricas. De maneira geral, dois resultados podem ser inferidos. Primeiro, o uso quimiopreventivo de anti-inflamatórios não esteroidais em pacientes com suscetibilidade genética (polipose adenomatosa familiar e síndrome de Lynch) ao CCR pode ser uma estratégia eficaz para reduzir o risco de desenvolvimento do câncer. Em segundo lugar, a coadministração de anti-inflamatórios não esteroidais com agentes quimioterapêuticos no tratamento do câncer gástrico pode melhorar os escores relacionados à sobrevida, bem como à qualidade de vida de pacientes. No entanto, estudos adicionais com grande número de pacientes são necessários para preencher a lacuna entre estudos de mecanismo de ação e evidências clínicas (Ozleyen et al., 2023).

1.9 Racional do Estudo

Os dados da literatura científica indicam que novas pesquisas em diferentes coortes de pacientes são necessárias para validar os achados e pesquisar a associação prognóstica de outros fatores com CDX2. A hipótese de trabalho do presente estudo foi que a proteína CDX2 não é um fator prognóstico independente, mas associado a outras características de mau prognóstico que possam influenciar a resposta terapêutica e ou identificar padrões de resistência

à mesma, consequentemente agregando um maior entendimento ao complexo cenário diagnóstico e terapêutico do CCRm.

2. OBJETIVOS DO ESTUDO

O objetivo geral do presente estudo foi investigar a expressão dos genes *CDX2* e *PTGS2* (*COX2*) em amostras tumorais de pacientes com CCRm e sua associação com lateralidade de apresentação do tumor, proficiência das proteínas relacionadas aos genes de reparo (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*), mutações nos genes *KRAS*, *BRAF* e *NRAS* e resistência ao tratamento com agentes anti-EGFR.

Trata-se de um estudo observacional, retrospectivo (por análise de prontuário) de pacientes com CCR e estadiamento patológico IV (CCRm) que foram tratados no serviço de Oncologia Clínica do A.C.Camargo Cancer Center, no período de 01/01/2015 a 31/12/2017, associado à uma análise da expressão proteica por imunoistoquímica.

Os objetivos específicos foram classificados em primários e secundários.

Objetivos específicos, primários:

- Avaliar a frequência e tipos de mutações somáticas nos genes *KRAS*, *BRAF* e *NRAS* e expressão da proteína *CDX2* e *COX2* e sua relação com a proficiência das proteínas expressas pelos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*, em amostras CCRm já obtidas de ressecção cirúrgica da neoplasia primária ou biópsia de metástase;
- Avaliar o prognóstico dos pacientes portadores desses tumores, através do desfecho de sobrevida global (SG).

Objetivos específicos, secundários:

- Avaliar o prognóstico dos pacientes portadores desses tumores, classificando-se o tempo até a falha do tratamento (TTF) e taxas de respostas terapêuticas;
 - Correlacionar a presença ou ausência de expressão de *CDX2* e *COX2* em CCRm (positiva/negativa) e a resposta à terapia anti-EGFR para pacientes com alelos do tipo selvagem para *KRAS*, *BRAF* e *NRAS*.
-

Medidas de desfechos:**Primários**

- Frequência da expressão proteica de CDX2 e COX2 por imunoistoquímica em CCRm (positiva/negativa);
- Frequência e características das mutações em *KRAS* [éxons 2, 3 e 4 de *KRAS* (códon 12, 13, 59, 61, 117 e 146), *NRAS* [éxons 2, 3 e 4 de *NRAS* (códon 12, 13, 59, 61 e 117)], *BRAF* [éxon 15 de *BRAF* (códon 600)] e proficiência das proteínas relacionadas aos genes de reparo (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*);
- Sobrevida global (SG) em pacientes com CCRm positivo ou negativo para CDX2 ou COX2 para CCRm (*KRAS*, *BRAF* e *NRAS* de tipo selvagem). A SG foi definida como o tempo decorrido a partir do diagnóstico da doença metastática até o óbito por qualquer causa.

Secundários

- Tempo até a falha do tratamento (TTF) em pacientes com CCRm de acordo com expressão de CDX2 e COX2 durante o tratamento de primeira linha (agentes anti-EGFRs, quimioterapia, entre outros), para CCRm (*KRAS*, *BRAF* e *NRAS* de tipo selvagem). TTF foi definido como o intervalo de tempo decorrido desde o início da terapia (D1C1) até a descontinuação do tratamento de primeira linha por qualquer motivo, incluindo doença progressiva (definida no prontuário), toxicidade do tratamento e óbito;
-

3. DISCUSSÃO

Nesta série retrospectiva de mais de 350 casos, a perda de expressão (IHC) de CDX2 foi detectada em 7,8% das amostras de CCRm e foi significativamente associada a tumores pouco diferenciados e tumores com a variante somática *BRAF* p.V600E. Mais de 90% dos tumores expressava COX2, sendo a ausência de expressão de COX2 mais comumente observada em CCRm pouco diferenciados. Em análises não ajustadas, a SG e a SLP medianas foram significativamente inferiores para pacientes com tumores CDX2-negativos em comparação com tumores CDX2-positivos.

Dentre sete trabalhos que avaliaram a expressão de CDX2 por IHC de espécimes tumorais de pacientes com CCRm, quatro a avaliaram na neoplasia colorretal primária (Aasebø et al., 2020; Loupakis et al., 2019; Neumann et al., 2018; B. Y. Zhang et al., 2017b) e três abordaram a expressão de CDX2 em metástases hepáticas (Shigematsu et al., 2018; Tóth et al., 2018) ou pulmonares (Ampollini et al., 2017).

Em todos os ensaios, CDX2 foi testado por IHC embora com diversos clones e diluições de anticorpos. Amostras de tumores primários ou metástases foram analisadas. Na maioria dos casos, o CDX2 foi dicotomizado em positivo ou negativo, com base em sua expressão em células tumorais, tendo sido observada entre estudos uma enorme heterogeneidade na definição de perda de CDX2. A porcentagem de expressão de CDX2 foi quantificada em cinco ensaios e sendo apenas relatada como presente ou ausente em dois. Todos os estudos tinham critérios predefinidos para definir a perda de CDX2. A Tabela 3 resume os métodos de análise de CDX2 nos diferentes estudos e a proporção de ausência de expressão encontrada em cada um deles.

Tabela 3: Métodos para análise de CDX2. Fonte: (Caldas et al, 2023) (Aasebø et al., 2020) (Loupakis et al., 2019) (Neumann et al., 2018) (Shigematsu et al., 2018) (Tóth et al., 2018) (Ampollini et al., 2017) (B. Y. Zhang et al., 2017b).

Estudo	Desenho/população do estudo	Material para análise CDX2	N	Método de análise CDX2	Definição de perda de CDX2	Perda de CDX2
Caldas, 2023	Retrospectivo CCRm,	Tumor primário arquivado e/ou tecidos de metástase - TMA	364	IHC Anticorpo monoclonal anti-CDX2 (EPR2764Y), Abcam (Cambridge, UK)	% CDX2+ nuclear: < 10% ou ausente: negativo ≥ 10%: positivo	7.8%
Aasebø, 2020	Prospectivo CCRm	Bloco tumoral FFPE de tumor primário ou metástases - TMA	452	IHC Anticorpo monoclonal de camundongo CDX2, NCL-CDX2, Leica Biosystems/Novocastra; 1:50	% de coloração de fração nuclear: < 10%: perda > 10%: expressão	19%
Loupakis, 2019	Retrospectivo CCRm, ^{V600E} BRAF mutation	Tumor primário arquivado e/ou tecidos de metástase - TMA	155	IHC % de células tumorais CDX2+ em cada intensidade: 0, +1 (fraca), +2 (moderada) ou +3 (forte)	Pontuação H: * 0-24: baixo 25-120: intermediário 121-300: alto	32.6% baixo 34.8% interm
Neumann, 2018	Prospectivo (FIRE-3 cohort), CCRm Retrospectivo control group, CCRm vs non-CCRm	FFPE amostras de tecido (FIRE) Amostras FFPE arquivadas (controle)	603	IHC Anticorpo monoclonal de coelho CDX2, clone EPR2764y, Medac; 1:50.	% CDX2+ nuclear: < 10% ou ausente: negativo ≥ 10%: positivo	2.8% (FIRE) 9.0% (controle)
Shigematsu, 2018	Retrospectivo CCRm Metastectomy hepática	Amostras cirúrgicas de metastectomy hepática - TMA	396	IHC Anticorpo monoclonal CDX2, clone DAK-CDX2, DAKO; 1:100.	% CDX2+ nuclear: < 50% ou ausente: baixo ≥ 50%: alto	9.1% baixo
Toth, 2018	Retrospectivo CCRm Metástases hepáticas biopsiadas	Tecido arquivado de metástases hepáticas - TMA	83	IHC CDX2 clone EPR2764Y, Thermo Fisher Scientific, Inc.; 1:200	% de coloração em células tumorais: <10%: pontuação 0 11%-75%: pontuação 1 > 75%: pontuação 2	38,55% pontuação 0 16,87% pontuação 1
Ampollini, 2017	Retrospectiv CCRm	Seções de tecido de tumor primário e metástase pulmonar	77	IHC CDX2 clone EPR2A64Y, Roche	Sem detalhes Negativo Positivo	0% (CCRm) 4,3% (não CCRm)
Zhang, 2016	Caso-controle CCRm	Tecido tumoral arquivado	145	IHC	Expressão CDX2: Ausente: negativo Presente: positivo	5.6%

N: número de pacientes incluídos na análise CDX2; CDX2: Homeobox 2 tipo caudal; CCRm: câncer colorretal metastático; FFPE: fixado em formalina e embebido em parafina;

TMA: microarranjo tumoral; IHQ: imunoistoquímica; +: positivo; intermediário: intermediário.

* Pontuação H = (% de células tumorais CDX2+ no nível +1 x 1) + (% de células tumorais CDX2+ no nível +2 x 2) + (% de células tumorais CDX2+ no nível +3 x 3)

** Curva ROC para seleção de um valor limite para expressão de CDX2 em metástases linfonodais

Dentre os estudos que avaliaram CDX2 em sítios primários de CCRm, nenhum relatou diferenças significativas na idade do paciente entre os grupos que expressam ou não expressam CDX2. Um estudo revelou a perda de CDX2 com mais frequência em tumores de pacientes femininas do que masculinos (41/66 vs. 35/79; $P < 0,03$ (B. Y. Zhang et al., 2017b). Metástases de tumores CDX2-negativos foram menos frequentes do que de tumores CDX2-positivos quando

ocorreram apenas no fígado (26/66 vs. 55/79, $P < 0,0002$ (B. Y. Zhang et al., 2017b); 14/87 vs. 104/365, $P < 0,02$ Aasebø et al., 2020); ou pulmões (14/87 vs. 99/365, $P < 0,04$ (Aasebø et al., 2020), enquanto a metástase linfonodal distante foi mais comum em tumores que não expressam CDX2 (31/66 vs. 13/79, $P < 0,0001$ (B. Y. Zhang et al., 2017b); 37/87 vs. 94/365, $P < 0,003$ (Aasebø et al., 2020). O relato de Neumann et al. (2018) nas amostras do estudo FIRE3 e um grupo de caso-controle pareado para metástases distantes (M0M1) revelou um número limitado de casos com perda de expressão de CDX2 (14/503 e 9/100, respectivamente) e nenhum aumento significativo na metástase sincronicas de tumores negativos para CDX2 (11/392 e 3/50 para os grupos FIRE3 e M0M1, respectivamente (Neumann et al., 2018).

A taxa de perda de CDX2 foi significativamente maior em tumores primários do lado direito quando comparada a tumores que expressam CDX2 em dois estudos (36/66 vs. 27/79, $P < 0,01$ (B. Y. Zhang et al., 2017b); e 52/87 vs. 125/365, $P < 0,001$ (Aasebø et al., 2020).

Em outro estudo, o papel do CDX2 como marcador prognóstico foi avaliado em um grande conjunto de CCRm com a mutação *BRAF* V600E, majoritariamente localizado em cólon direito (115/155), como esperado (Tie & Desai, 2015); e a lateralidade não foi classificada de acordo com a expressão de CDX2 (Loupakis et al., 2019). Além disso, no estudo de Neumann et al. (2019), 100% das amostras do grupo M0M1 eram do segmento do cólon direito, prejudicando a análise da lateralidade do tumor (Neumann et al., 2018). Em nosso estudo, embora o percentual da perda da expressão de CDX2 tenha sido numericamente relevante em quase o dobro para amostras do cólon direito quando comparada ao colón esquerdo/reto [10 amostras (11.5%) vs 17 amostras (6.6%)], respectivamente, não foi detectada uma diferença estatisticamente significativa, talvez devido frequência reduzida deste subgrupo de pacientes (7,8%).

A classificação histopatológica de tumores com a perda da expressão de CDX2 foi mais comumente de alto grau (pouco diferenciado) do que em tumores que expressam CDX2 (36/66 vs. 27/79, $P < 0,01$ (B. Y. Zhang et al., 2017b); e 37/87 vs. 57/365, $P < 0,001$ (Aasebø et al.,

2020). Um enriquecimento não significativo de tumores de alto grau (IV) foi observado entre aqueles com perda de CDX2 (10/13 e 3/9 dos grupos FIRE3 e M0M1, respectivamente (Neumann et al., 2018). Essa associação também foi observada no nosso estudo.

Aasebø e cols (2020) relataram associação significativa entre perda de CDX2 e MSI (21/87 vs. 14/365, $P < 0,001$). A maioria dessas amostras apresentou adicionalmente mais mutações *BRAF* p.V600E do que tumores que expressavam CDX2 (18/87 vs. 12/365, $P < 0,001$). Em contraste, as alterações de *KRAS* foram detectadas com mais frequência em tumores com expressão de CDX2 (16/87 vs. 163/365, $P < 0,001$ (Aasebø et al., 2020). Em ambos os grupos (FIRE3 e M0M1) no estudo de Neumann et al (2019), o fenótipo MSI alto e *BRAF* estavam significativamente aumentados em tumores com perda de CDX2 (3/11 vs. 3/474, $P < 0,0001$ e 5/9 vs. 0,10/91, $P < 0,0001$ para MSI; e 4/14 vs. 26/473, $P < 0,0001$ e 6/9 vs. 8/91, $P < 0,0001$, para mutação *BRAF*, respectivamente para os grupos FIRE3 e M0M1). No estudo de Zhang et al (2017), comparação entre o grupo completo de tumores positivos para CDX2 (N=79) e um subconjunto de tumores negativos para CDX2 que foram testados para alterações genéticas *BRAF*, *RAS* ou *RAF* (34/66) não revelou nenhuma correlação entre a perda de expressão de CDX2 e variantes patogênicas nesses genes (B. Y. Zhang et al., 2017b).

Cinquenta e uma amostras de metástases pulmonares de neoplasia CCRm avaliadas por IHC foram positivas para CDX2 (Ampollini et al., 2017), portanto, não informativas para comparações clínico-patológicas em nossa revisão. A análise da expressão de CDX2 de 396 metástases hepáticas revelou 36 amostras com baixos níveis dessa proteína marcadora. Este grupo foi mais associado à classificação histológica pouco diferenciada (5/36 vs. 13/360, $P < 0,02$; (Shigematsu et al., 2018). Este estudo não revelou nenhuma diferença na idade ou sexo do paciente, nem na localização do tumor no local primário ou no local de recorrência de metástase, embora o número de órgãos recorrentes tenha sido significativamente maior em tumores com CDX2 pouco expresso do que com alta expressão de CDX2 (11/28 vs. 25/ 232

amostras com recorrências em pelo menos dois locais de órgãos, $P < 0,0001$ (Shigematsu et al., 2018). O fenótipo dMMR foi mais frequente em metástases hepáticas negativas para CDX2 em comparação com amostras positivas para CDX2 (8/36 vs. 6/360, $P < 0,001$ (Shigematsu et al., 2018). Um estudo adicional sobre a expressão de CDX2 em metástase hepática de CCRm revelou uma alta taxa de perda de CDX2 (32/83) e uma associação de correlação inversa entre a expressão de CDX2 e o tamanho do tumor de metástase entre 71 amostras ($P=0,04$; Tóth et al., 2018). O nosso estudo não revelou diferença significativa entre a expressão de CDX2 e o local da recorrência de metástase possivelmente, mais uma vez, devido a frequência reduzida do subgrupo de pacientes com perda da expressão de CDX2 (7,8%).

Expressão de CDX2 e desfechos de sobrevida durante tratamentos sistêmicos para CCRm

Detalhes sobre a expressão de CDX2 e desfechos de sobrevida durante o tratamento sistêmico para CCRm são discutidos no artigo (Capítulo 7).

Em pacientes que receberam Bevacizumabe na primeira linha a mediana de SG foi inferior para aqueles que apresentavam CCRm com perda da expressão de CDX2 ($N=10$) em comparação com aqueles com CCRm CDX2-positivos ($N = 115$): mediana de 18 vs. 48 meses, respectivamente (teste de Mantel-Cox log-rank, $p = 0,016$) e para *BRAF* V600E em comparação com *BRAF* wt, mediana de 64,9 vs 107 meses (teste de Mantel-Cox log-rank, $p = 0,005$). Já em relação aos pacientes que receberam um agente anti-EGFR na primeira linha (Cetuximabe ou Panitumumab), associado a uma quimioterapia dupla, não houve uma diferença estatística significativa na SG entre pacientes que apresentavam uma perda da expressão de CDX2 ($N=4$) em comparação com aqueles com CCRm CDX2-positivos ($N = 43$): mediana de 0 vs. 49 meses, respectivamente (teste de Mantel-Cox log-rank, $p = 0,527$), nem entre aqueles com *KRAS* mut em comparação com *KRAS* wt, mediana de 49 vs 103 meses (teste de Mantel-Cox log-rank, $p = 0,13$). Em ambos os casos a baixa frequência de amostras tumorais com perda de expressão de

CDX2, correlacionada com os fatores acima, pode ter contribuído para uma perda da robustez deste dado, não reportado em resultados (Capítulo 7).

Expressão de CDX2 e prognóstico após metastasectomia para CCRm

Dados sobre prognóstico de CDX2 e metastasectomia em pacientes com CCR estavam disponíveis em dois estudos retrospectivos. No entanto, um estudo envolvendo 54 pacientes com histórico de metastasectomia pulmonar e um grupo de controle não metastático (23 pacientes) não tinha poder estatístico para examinar o papel prognóstico do CDX2. A ausência de expressão de CDX2 esteve ausente no grupo de metastasectomia, mesmo ao examinar as amostras do tumor primário e do pulmão, e foi detectada em apenas um paciente do grupo controle (4,3%) (Ampollini et al., 2017).

Um estudo mais robusto, com uma amostra de 396 pacientes submetidos a metastasectomia hepática potencialmente curativa, foi conduzido em um único centro japonês. CDX2-baixo foi considerado quando $< 50\%$ das células tumorais tinham expressão nuclear positiva para CDX2 e foi encontrado em 9,1% dos tumores. O CDX2-baixo foi associado a uma sobrevida livre de doença mediana de 5,8 meses pior (HR 2,45, IC 95% 1,55-3,86) e uma sobrevida global inferior de 70,7 meses (HR 1,53, IC 95% 1,03-2,26). Esse impacto prognóstico negativo foi mantido após o ajuste para possíveis fatores de confusão na análise multivariada. O CDX2-baixo não influenciou no padrão de local da recorrência (predominante no fígado para CDX2-baixo e alto), mas o número de locais recorrentes foi superior no grupo baixo (39,3% vs 10,9% ≥ 2 locais recorrentes; $p < 0,001$). Nem o CDX2 baixo nem o alto foi preditivo para o benefício da quimioterapia nesses pacientes com metastasectomia (Shigematsu et al., 2018).

Expressão de COX2

O presente estudo, até onde sabemos, é a maior análise de imuno-histoquímica da expressão de COX2 em CCRm e o primeiro a avaliar sua correlação com os níveis de proteína CDX2.

Descrevemos altos níveis de proteína COX2 em CCRm (93,4%). Em coortes com diferentes estágios de CCR, pelo menos 60% dos tumores metastáticos expressam fortemente COX2 (Albasri et al., 2018; Elzagheid et al., 2013; Ogino et al., 2008; Soumaoro et al., 2004).

O estudo no qual nos baseamos para o nosso ponto de corte para coloração do COX2 examinou sua expressão no CCR, CCRm e mucosa normal (Soumaoro et al., 2004). Semelhante às amostras de CCR do referido estudo, tivemos quase 80% das amostras com intensidade da coloração moderada (pontuação 2) a forte (pontuação 3) [Capítulo 7; Figura 3]. Como as amostras COX2-positivas são definidas por uma soma de pontuação de pelo menos 3 em 7, a maioria dos tumores foi positiva [Capítulo 7; Tabela 3]. Mesmo que não tivéssemos adotado a extensão da coloração para COX2 como um padrão, teríamos classificado 80% das amostras como positivas apenas de acordo com a intensidade da coloração (Capítulo 7; Figura 3). Em seu estudo, enquanto apenas uma em dez amostras de mucosa normal era positiva para COX2, todos as metástases hepáticas (N = 16) e 92% (N = 23/25) dos linfonodos metastáticos eram positivos, em comparação com 71% dos tumores primários, dos quais 6% (17/288) eram grau IV (Soumaoro et al., 2004). Curiosamente, em sua análise, 45% das amostras tinham marcação extensa (pontuação 4), enquanto em nossa amostra, composta exclusivamente de tumores de grau IV, 86,4% tinham marcação extensa (76 – 100%), correspondendo a quase 93% das amostras positivas. Portanto, em comparação com amostras de grau II e III, a extensão da coloração de COX2 deve ser a melhor variável para se avaliar o CCRm. Desta forma, a extensão da coloração de COX2 deve ser considerada o parâmetro adequado para avaliações comparativas entre os graus da doença no CCR.

Diferentes estudos relataram medianas de SG maiores entre pacientes com CCR cujos tumores foram negativos para a proteína COX2 (Kosumi et al., 2019; Kunzmann et al., 2013; Mahmoud et al., 2014; Negi et al., 2019; Peng et al., 2013; Soumaoro et al., 2004).

Em nosso estudo, a ausência de diferença significativa entre os dois grupos, seja para a SG ou para a SLP, deve-se principalmente ao estágio da doença associado a altos níveis de COX2, o que reduz o tamanho do grupo COX2-negativo (Capítulo 7; Tabela 3). Em contraste, outros estudos abordaram comumente coortes com estágios variados da doença do CCR (Albasri et al., 2018; Al-Maghrabi et al., 2012; Elzagheid et al., 2013; S. H. Kim et al., 2018; Kosumi et al., 2019; Mahmoud et al., 2014; Negi et al., 2019; Ogino et al., 2008; Roelofs et al., 2014; Soumaoro et al., 2004; Xie et al., 2019).

Observou-se um enriquecimento significativo de tumores pouco diferenciados entre as amostras COX2-negativas (Capítulo 7; Tabela 3). Importante afirmar que no entanto, as amostras de CCRm de grau 3 com baixa expressão de COX2 não se sobrepunham àquelas que com perda de CDX2 (Capítulo 7; Tabela 2), pois 100% das amostras de grau 3 no último grupo expressavam COX2 (Capítulo 7; Tabela 3). Em outras séries, o status de expressão de COX2 não foi significativamente diferente entre os graus do tumor (Elzagheid et al., 2013; Soumaoro et al., 2004), e uma possível explicação para nosso achado pode residir no fato de que a correlação observada pode estar influenciada por outros fatores desconhecidos.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, nossos resultados sobre a relevância clínica de CDX2 em extensa coorte clinicamente caracterizada corroboram-no como um biomarcador prognóstico no CCRm ao evidenciar a perda de sua expressão como um fator de pior prognóstico para SG. Nossos dados conferem validade a este biomarcador para uso rotineiro integrado à prática clínica para a distinção de casos que potencialmente mereçam uma abordagem terapêutica clínica mais agressiva, embora isso não exclua a necessidade de uma investigação mais aprofundada de sua validade em futuros estudos clínicos prospectivos. Para tanto, seria interessante avaliar sua viabilidade enquanto score prognóstico de estratificação em estudos clínicos prospectivos

visando avaliar o seu real benefício ao expor esses casos a terapias mais agressivas, como a terapia tripla, por exemplo. Além disso, análise de CDX2 pode ser incorporada a ensaios clínicos prospectivos, individualmente ou em combinação com biomarcadores novos e/ou existentes, explorando potenciais sinergias, seu valor como biomarcador preditivo de resposta também no cenário do CCRm. Custo e facilidade na execução são certamente fatores favoráveis a esta integração na prática clínica e de pesquisa.

Em relação à análise metodológica para avaliação de COX2, propomos que a extensão da marcação de COX2 se sobreponha à intensidade da coloração como uma variável ideal para análise da expressão da COX2 no CCR em estudos futuros.

O presente estudo teve limitações inerentes ao seu desenho retrospectivo. A forte expressão de COX2 em nossa coorte limitou a avaliação de sua correlação com CDX2 e parâmetros demográficos, clínicos e moleculares. Não pudemos explorar inteiramente a relação entre o estado de expressão de CDX2, a taxa de resposta objetiva e resposta a terapias específicas de primeira linha, em particular os agentes anti-EGFR, um dos objetivos do estudo. Fatores limitantes a essa abordagem foram a dificuldade de obtenção das imagens e o número limitado de amostras tumorais com perda da expressão de CDX2 no subgrupo de pacientes que receberam algum agente anti-EGFR como terapia de primeira linha na casuística avaliada.

5. CONCLUSÕES

A perda de expressão do CDX2 em CCRm foi associada a um maior risco de morte e progressão após o tratamento de primeira linha, tumores pouco diferenciados e a variante *BRAF* p.V600E. Embora na ausência da variante *BRAF* p.V600E, a falta da proteína CDX2 também estivesse associada a uma SG inferior, a perda de CDX2 não se destacou como um preditor independente. COX2 foi altamente expresso em mCRC. A falta de expressão de COX2 associou-se a CRCm pouco diferenciado. O pequeno número de casos CDX2 negativos limitou análises de associação entre resposta a anti-EGFRs ou outras terapias.

6. REFERÊNCIAS

- Aasebø, K., Bruun, J., Bergsland, C. H., Nunes, L., Eide, G. E., Pfeiffer, P., Dahl, O., Glimelius, B., Lothe, R. A., & Sorbye, H. (2022). Prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes and macrophages in relation to MSI, CDX2 and BRAF status: a population-based study of metastatic colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer*, 126(1). <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01586-5>
- Aasebø, K., Dragomir, A., Sundström, M., Mezheyeuski, A., Edqvist, P. H., Eide, G. E., Ponten, F., Pfeiffer, P., Glimelius, B., & Sorbye, H. (2020). CDX2: A Prognostic Marker in Metastatic Colorectal Cancer Defining a Better BRAF Mutated and a Worse KRAS Mutated Subgroup. *Frontiers in Oncology*, 10(February). <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00008>
- Albasri, A. M., Elkablawy, M. A., Hussainy, A. S., Yousif, H. M., & Alhujaily, A. S. (2018). Impact of cyclooxygenase-2 over-expression on the prognosis of colorectal cancer patients an experience from western Saudi Arabia. *Saudi Medical Journal*, 39(8). <https://doi.org/10.15537/smj.2018.8.22837>
- Al-Maghrabi, J., Buhmeida, A., Emam, E., Syrjänen, K., Sibiany, A., Al-Qahtani, M., & Al-Ahwal, M. (2012). Cyclooxygenase-2 expression as a predictor of outcome in colorectal carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 18(15), 1793–1799. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i15.1793>
- Ampollini, L., Gnetti, L., Goldoni, M., Viani, L., Faedda, E., Campanini, N., Caruana, P., Crafa, P., Negri, F., Pucci, F., Leonardi, F., Ventura, L., Balestra, V., Braggio, C., Bocchialini, G., Del Rio, P., Silini, E. M., Carbognani, P., & Rusca, M. (2017). Pulmonary metastasectomy for colorectal cancer: Analysis of prognostic factors affecting survival. *Journal of Thoracic Disease*, 9(Suppl 12), S1282–S1290. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.07.100>
-

- Arnold, D., Lueza, B., Douillard, J. Y., Peeters, M., Lenz, H. J., Venook, A., Heinemann, V., Van Cutsem, E., Pignon, J. P., Tabernero, J., Cervantes, A., & Ciardiello, F. (2017). Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. *Annals of Oncology*, 28(8). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx175>
- Baba, Y., Noshio, K., Shima, K., Freed, E., Irahara, N., Philips, J., Meyerhardt, J. A., Hornick, J. L., Shivdasani, R. A., Fuchs, C. S., & Ogino, S. (2009). Relationship of CDX2 loss with molecular features and prognosis in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(14). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0401>
- Bae, J. M., Kim, J. H., & Kang, G. H. (2016). Molecular subtypes of colorectal cancer and their clinicopathologic features, with an emphasis on the serrated neoplasia pathway. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 140(5). <https://doi.org/10.5858/arpa.2015-0310-RA>
- Bae, J. M., Lee, T. H., Cho, N. Y., Kim, T. Y., & Kang, G. H. (2015). Loss of CDX2 expression is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients. *World Journal of Gastroenterology*, 21(5). <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i5.1457>
- Baraibar, I., Ros, J., Mulet, N., Salvà, F., Argilés, G., Martini, G., Cuadra, J. L., Sardo, E., Ciardiello, D., Tabernero, J., & Élez, E. (2020). Incorporating traditional and emerging biomarkers in the clinical management of metastatic colorectal cancer: an update. In *Expert Review of Molecular Diagnostics* (Vol. 20, Issue 7). <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1782194>
- Barbareschi, M., Murer, B., Colby, T. V., Chilosi, M., Macri, E., Loda, M., & Doglioni, C. (2003). CDX-2 homeobox gene expression is a reliable marker of colorectal adenocarcinoma metastases to the lungs. *American Journal of Surgical Pathology*, 27(2). <https://doi.org/10.1097/00000478-200302000-00001>
-

- Boeckx, N., Koukakis, R., de Beeck, K. O., Rolfo, C., Van Camp, G., Siena, S., Tabernero, J., Douillard, J. Y., André, T., & Peeters, M. (2017). Primary tumor sidedness has an impact on prognosis and treatment outcome in metastatic colorectal cancer: Results from two randomized first-line panitumumab studies. *Annals of Oncology*, 28(8). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx119>
- Bokemeyer, C., Köhne, C. H., Ciardiello, F., Lenz, H. J., Heinemann, V., Klinkhardt, U., Beier, F., Duecker, K., Van Krieken, J. H., & Tejpar, S. (2015). FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 51(10). <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.04.007>
- Brenner, H., Bouvier, A. M., Foschi, R., Hackl, M., Larsen, I. K., Lemmens, V., Mangone, L., & Francisci, S. (2012). Progress in colorectal cancer survival in Europe from the late 1980s to the early 21st century: The EURO CARE study. *International Journal of Cancer*, 131(7). <https://doi.org/10.1002/ijc.26192>
- Bruun, J., Sveen, A., Barros, R., Eide, P. W., Eilertsen, I., Kolberg, M., Pellinen, T., David, L., Svindland, A., Kallioniemi, O., Guren, M. G., Nesbakken, A., Almeida, R., & Lothe, R. A. (2018). Prognostic, predictive, and pharmacogenomic assessments of CDX2 refine stratification of colorectal cancer. *Molecular Oncology*, 12(9). <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12347>
- Cervantes, A., Adam, R., Roselló, S., Arnold, D., Normanno, N., Taïeb, J., Seligmann, J., De Baere, T., Osterlund, P., Yoshino, T., & Martinelli, E. (2023). Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up ☆. *Annals of Oncology*, 34(1), 10–32. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.003>
-

- Chawengsaksophak, K., De Graaff, W., Rossant, J., Deschamps, J., & Beck, F. (2004). *Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0401654101
- Chewchuk, S., Jahan, S., & Lohnes, D. (2021). Cdx2 regulates immune cell infiltration in the intestine. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95412-w>
- Colleypriest, B. J., Farrant, J. M., Slack, J. M. W., & Tosh, D. (2010). The role of Cdx2 in Barrett's metaplasia. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 38, Issue 2). <https://doi.org/10.1042/BST0380364>
- Coskun, M. (2014). The role of CDX2 in inflammatory bowel disease. *Danish Medical Journal*, 61(3).
- Coskun, M., Troelsen, J. T., & Nielsen, O. H. (2011). The role of CDX2 in intestinal homeostasis and inflammation. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1812, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.11.008>
- Cremolini, C., Antoniotti, C., Moretto, R., Masi, G., & Falcone, A. (2017). First-line therapy for mCRC-the influence of primary tumour location on the therapeutic algorithm. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 14, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.219>
- Cutler, N. S., Graves-Deal, R., LaFleur, B. J., Gao, Z., Boman, B. M., Whitehead, R. H., Terry, E., Morrow, J. D., & Coffey, R. J. (2003). Stromal production of prostacyclin confers an antiapoptotic effect to colonic epithelial cells. *Cancer Research*, 63(8).
- Dalerba, P., Sahoo, D., Paik, S., Guo, X., Yothers, G., Song, N., Wilcox-Fogel, N., Forgó, E., Rajendran, P. S., Miranda, S. P., Hisamori, S., Hutchison, J., Kalisky, T., Qian, D., Wolmark, N., Fisher, G. A., van de Rijn, M., & Clarke, M. F. (2016). CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 374(3), 211–222. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506597>
-

- Davidson, K. W., Barry, M. J., Mangione, C. M., Cabana, M., Caughey, A. B., Davis, E. M., Donahue, K. E., Doubeni, C. A., Krist, A. H., Kubik, M., Li, L., Ogedegbe, G., Owens, D. K., Pbert, L., Silverstein, M., Stevermer, J., Tseng, C. W., & Wong, J. B. (2021). Screening for Colorectal Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. In *JAMA - Journal of the American Medical Association* (Vol. 325, Issue 19). <https://doi.org/10.1001/jama.2021.6238>
- de Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., Papamichael, D., Le Bail, N., Louvet, C., Hendler, D., De Braud, F., Wilson, C., Morvan, F., & Bonetti, A. (2000). Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 18(16). <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.16.2938>
- Di Nicolantonio, F., Vitiello, P. P., Marsoni, S., Siena, S., Tabernero, J., Trusolino, L., Bernards, R., & Bardelli, A. (2021). Precision oncology in metastatic colorectal cancer — from biology to medicine. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 18, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00495-z>
- Diaz, L. A., Shiu, K. K., Kim, T. W., Jensen, B. V., Jensen, L. H., Punt, C., Smith, D., Garcia-Carbonero, R., Benavides, M., Gibbs, P., de la Fourchardiere, C., Rivera, F., Elez, E., Le, D. T., Yoshino, T., Zhong, W. Y., Fogelman, D., Marinello, P., & Andre, T. (2022). Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high or mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer (KEYNOTE-177): final analysis of a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet Oncology*, 23(5). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(22\)00197-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(22)00197-8)
- Douillard, J. Y., Cunningham, D., Roth, A. D., Navarro, M., James, R. D., Karasek, P., Jandik, P., Iveson, T., Carmichael, J., Alakl, M., Gruia, G., Awad, L., & Rougier, P. (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone. as first-line treatment for
-

metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet*, 355(9209).
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02034-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02034-1)

Douillard, J. Y., Siena, S., Cassidy, J., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., Humblet, Y., Bodoky, G., Cunningham, D., Jassem, J., Rivera, F., Kocáková, I., Ruff, P., Błasińska-Morawiec, M., Šmakal, M., Canon, J. L., Rother, M., Oliner, K. S., Tian, Y., ... Sidhu, R. (2014). Final results from PRIME: Randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*, 25(7).
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdu141>

Douillard, J.-Y., Oliner, K. S., Siena, S., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., Humblet, Y., Bodoky, G., Cunningham, D., Jassem, J., Rivera, F., Kocáková, I., Ruff, P., Błasińska-Morawiec, M., Šmakal, M., Canon, J. L., Rother, M., Williams, R., Rong, A., ... Patterson, S. D. (2013). Panitumumab–FOLFOX4 Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer . *New England Journal of Medicine*, 369(11). <https://doi.org/10.1056/nejmoa1305275>

Elzagheid, A., Emaetig, F., Alkikhia, L., Buhmeida, A., Syrjanen, K., El-Faitori, O., Latto, M., Collan, Y., & Pyrhonen, S. (2013). High cyclooxygenase-2 expression is associated with advanced stages in colorectal cancer. *Anticancer Research*, 33(8).

Fuchs, C. S., Marshall, J., Mitchell, E., Wierzbicki, R., Ganju, V., Jeffery, M., Schulz, J., Richards, D., Soufi-Mahjoubi, R., Wang, B., & Barrueco, J. (2007). Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: Results from the BICC-C study. *Journal of Clinical Oncology*, 25(30).
<https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.3357>

Gao, N., White, P., & Kaestner, K. H. (2009). Establishment of Intestinal Identity and Epithelial-Mesenchymal Signaling by Cdx2. *Developmental Cell*, 16(4), 588–599.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.02.010>

- Graule, J., Uth, K., Fischer, E., Centeno, I., Galván, J. A., Eichmann, M., Rau, T. T., Langer, R., Dawson, H., Nitsche, U., Traeger, P., Berger, M. D., Schnüriger, B., Hädrich, M., Studer, P., Inderbitzin, D., Lugli, A., Tschan, M. P., & Zlobec, I. (2018). CDX2 in colorectal cancer is an independent prognostic factor and regulated by promoter methylation and histone deacetylation in tumors of the serrated pathway. *Clinical Epigenetics*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0548-2>
- Greenhough, A., Smartt, H. J. M., Moore, A. E., Roberts, H. R., Williams, A. C., Paraskeva, C., & Kaidi, A. (2009). The COX-2/PGE2 pathway: Key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. In *Carcinogenesis* (Vol. 30, Issue 3). <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp014>
- Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., De Reyniès, A., Schlicker, A., Soneson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., Bot, B. M., Morris, J. S., Simon, I. M., Gerster, S., Fessler, E., De Sousa .E Melo, F., Missiaglia, E., Ramay, H., Barras, D., ... Tejpar, S. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*, 21(11). <https://doi.org/10.1038/nm.3967>
- Guo, M. Z., House, M. G., Suzuki, H., Ye, Y., Brock, M. V., Lu, F., Liu, Z., Rustgi, A. K., & Herman, J. G. (2007). Epigenetic silencing of CDX2 is a feature of squamous esophageal cancer. *International Journal of Cancer*, 121(6). <https://doi.org/10.1002/ijc.22828>
- Guo, R. J., Eun, R. S., & Lynch, J. P. (2004). The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer. In *Cancer Biology and Therapy* (Vol. 3, Issue 7). <https://doi.org/10.4161/cbt.3.7.913>
- Hansen, T. F., Kjær-Frifeldt, S., Eriksen, A. C., Lindebjerg, J., Jensen, L. H., Sørensen, F. B., & Jakobsen, A. (2018). Prognostic impact of CDX2 in stage II colon cancer: results from two
-

- nationwide cohorts. *British Journal of Cancer*, 119(11). <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0285-5>
- Holch, J. W., Ricard, I., Stintzing, S., Modest, D. P., & Heinemann, V. (2017). The relevance of primary tumour location in patients with metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of first-line clinical trials. *European Journal of Cancer*, 70. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.10.007>
- Horb, M. E., & Slack, J. M. W. (2001). Endoderm specification and differentiation in *Xenopus* embryos. *Developmental Biology*, 236(2). <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0347>
- Iacopetta, B. (2002). Are there two sides to colorectal cancer? In *International Journal of Cancer* (Vol. 101, Issue 5). <https://doi.org/10.1002/ijc.10635>
- Itzkowitz, S. H., & Yio, X. (2004). Inflammation and cancer - IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: The role of inflammation. In *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* (Vol. 287, Issues 1 50-1). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00079.2004>
- James, R., Erler, T., & Kazenwadel, J. (1994). Structure of the murine homeobox gene *cdx-2*. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *Journal of Biological Chemistry*, 269(21), 15229–15237. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)36596-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)36596-1)
- Joo, M. K., Park, J. J., & Chun, H. J. (2016). Impact of homeobox genes in gastrointestinal cancer. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 22, Issue 37). <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i37.8247>
- Kaimaktchiev, V., Terracciano, L., Tornillo, L., Spichtin, H., Stoios, D., Bundi, M., Korcheva, V., Mirlacher, M., Loda, M., Sauter, G., & Corless, C. L. (2004). The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. *Modern Pathology*, 17(11). <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800205>
-

- Kang, H. A., & Zhang, Y. (2022). Modifiable and non-modifiable risk factors associated with early-onset colorectal cancer: Analysis of the National Health Interview Survey. *Journal of Clinical Oncology*, 40(16_suppl). https://doi.org/10.1200/jco.2022.40.16_suppl.e15528
- Kantola, T., Klintrup, K., Väyrynen, J. P., Vornanen, J., Bloigu, R., Karhu, T., Herzig, K. H., Näpänkangas, J., Mäkelä, J., Karttunen, T. J., Tuomisto, A., & Mäkinen, M. J. (2012). Stage-dependent alterations of the serum cytokine pattern in colorectal carcinoma. *British Journal of Cancer*, 107(10). <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.456>
- Kim, S. H., Ahn, B. K., Paik, S. S., & Lee, K. H. (2018). Cyclooxygenase-2 expression is a predictive marker for late recurrence in colorectal cancer. *Gastroenterology Research and Practice*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7968149>
- Kim, S. P., Park, J. W., Lee, S. H., Lim, J. H., Jang, B. C., Lee, S. H., Jang, I. H., Freund, J. N., Suh, S. Il, Mun, K. C., Song, D. K., Ha, E. M., Lee, W. J., & Kwon, T. K. (2004). Homeodomain protein CDX2 regulates COX-2 expression in colorectal cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.01.020>
- Kosumi, K., Hamada, T., Zhang, S., Liu, L., da Silva, A., Koh, H., Twombly, T. S., Mima, K., Morikawa, T., Song, M., Nowak, J. A., Nishihara, R., Saltz, L. B., Niedzwiecki, D., Ou, F. S., Zemla, T., Mayer, R. J., Baba, H., Ng, K., ... Ogino, S. (2019). Prognostic association of PTGS2 (COX-2) over-expression according to BRAF mutation status in colorectal cancer: Results from two prospective cohorts and CALGB 89803 (Alliance) trial. *European Journal of Cancer*, 111, 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.01.022>
- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., van de Velde, C. J. H., & Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), 15065. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
-

- Kunzmann, A. T., Murray, L. J., Cardwell, C. R., McShane, C. M., McMenamin, Ú. C., & Cantwell, M. M. (2013). PTGS2 (Cyclooxygenase-2) expression and survival among colorectal cancer patients: A systematic review. In *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* (Vol. 22, Issue 9, pp. 1490–1497). <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-0263>
- Li, F. Y., & Lai, M. De. (2009). Colorectal cancer, one entity or three. In *Journal of Zhejiang University: Science B* (Vol. 10, Issue 3). <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820273>
- Lim, E. S., Zhou, Y., Zhao, G., Bauer, I. K., Droit, L., Ndao, I. M., Warner, B. B., Tarr, P. I., Wang, D., & Holtz, L. R. (2015). Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nature Medicine*, 21(10). <https://doi.org/10.1038/nm.3950>
- Loree, J. M., Pereira, A. A. L., Lam, M., Willauer, A. N., Raghav, K., Dasari, A., Van Morris, K., Advani, S., Menter, D. G., Eng, C., Shaw, K., Broaddus, R., Routbort, M. J., Liu, Y., Morris, J. S., Luthra, R., Meric-Bernstam, F., Overman, M. J., Maru, D., & Kopetz, S. (2018). Classifying colorectal cancer by tumor location rather than sidedness highlights a continuum in mutation profiles and consensus molecular subtypes. *Clinical Cancer Research*, 24(5). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2484>
- Loupakis, F., Biason, P., Prete, A. A., Cremolini, C., Pietrantonio, F., Pella, N., Dell'Aquila, E., Sperti, E., Zichi, C., Intini, R., Dadduzio, V., Schirripa, M., Bergamo, F., Antoniotti, C., Morano, F., Cortiula, F., De Maglio, G., Rimassa, L., Smiroldo, V., ... Fassan, M. (2019). CK7 and consensus molecular subtypes as major prognosticators in V600E BRAF mutated metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 121(7), 593–599. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0560-0>
- Lugli, A., Tzankov, A., Zlobec, I., & Terracciano, L. M. (2008). Differential diagnostic and functional role of the multi-marker phenotype CDX2/CK20/CK7 in colorectal cancer stratified by
-

mismatch repair status. *Modern Pathology*, 21(11).
<https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.117>

Macdonald, P. M., & Struhl, G. (1986). A molecular gradient in early *Drosophila* embryos and its role in specifying the body pattern. *Nature*, 324(6097), 537–545.
<https://doi.org/10.1038/324537a0>

Mahmoud, A. S., Umair, A., Azzeghaiby, S. N., Alqahtani, F. H., Hanounah, S., & Tarakji, B. (2014). Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in colorectal adenocarcinoma: An immunohistochemical and histopathological study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(16), 6787–6790. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.16.6787>

Maurel, J., & Postigo, A. (2015). Prognostic and Predictive Biomarkers in Colorectal Cancer. From the Preclinical Setting to Clinical Practice. *Current Cancer Drug Targets*, 15(8).
<https://doi.org/10.2174/156800961508151001102822>

Moretto, R., Corallo, S., Belfiore, A., Rossini, D., Boccaccino, A., Lonardi, S., Centonze, G., Morano, F., Germani, M. M., Loupakis, F., Morelli, L., Urbani, L., Brich, S., Marmorino, F., Prisciandaro, M., Aprile, G., Fassan, M., Cillo, U., Cattaneo, L., ... Cremolini, C. (2020). Prognostic impact of immune-microenvironment in colorectal liver metastases resected after triplets plus a biologic agent: A pooled analysis of five prospective trials. *European Journal of Cancer*, 135, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.04.045>

Morgan, E., Arnold, M., Gini, A., Lorenzoni, V., Cabasag, C. J., Laversanne, M., Vignat, J., Ferlay, J., Murphy, N., & Bray, F. (2023). Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut*, 72(2), 338–344.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327736>

- Mutoh, H., Hayakawa, H., Sakamoto, H., & Sugano, K. (2007). Homeobox protein CDX2 reduces Cox-2 transcription by inactivating the DNA-binding capacity of nuclear factor- κ B. *Journal of Gastroenterology*, 42(9). <https://doi.org/10.1007/s00535-007-2088-y>
- Nakanishi, Y., Diaz-Meco, M. T., & Moscat, J. (2019). Serrated Colorectal Cancer: The Road Less Travelled? In *Trends in Cancer* (Vol. 5, Issue 11). <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.09.004>
- Negi, R. R., Rana, S. V., Gupta, V., Gupta, R., Chadha, V. D., Prasad, K. K., & Dhawan, D. K. (2019). Over-expression of Cyclooxygenase-2 in colorectal cancer patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 20(6). <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.6.1675>
- Neumann, J., Heinemann, V., Engel, J., Kirchner, T., & Stintzing, S. (2018). The prognostic impact of CDX2 correlates with the underlying mismatch repair status and BRAF mutational status but not with distant metastasis in colorectal cancer. *Virchows Archiv*, 473(2), 199–207. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2360-y>
- Nordlinger, B., Sorbye, H., Glimelius, B., Poston, G. J., Schlag, P. M., Rougier, P., Bechstein, W. O., Primrose, J. N., Walpole, E. T., Finch-Jones, M., Jaeck, D., Mirza, D., Parks, R. W., Collette, L., Praet, M., Bethe, U., Van Cutsem, E., Scheithauer, W., & Gruenberger, T. (2008). Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *The Lancet*, 371(9617). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60455-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60455-9)
- Ogino, S., Kirkner, G. J., Nosho, K., Irahara, N., Kure, S., Shima, K., Hazra, A., Chan, A. T., Dehari, R., Giovannucci, E. L., & Fuchs, C. S. (2008). Cyclooxygenase-2 expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(24), 8221–8227. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1841>
-

- Olsen, J., Eiholm, S., Kirkeby, L. T., Espersen, M. L. M., Jess, P., Gögenür, I., Olsen, J., & Troelsen, J. T. (2016). CDX2 downregulation is associated with poor differentiation and MMR deficiency in colon cancer. *Experimental and Molecular Pathology*, 100(1). <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.11.009>
- Osterlund, P., Salminen, T., Soveri, L. M., Kallio, R., Kellokumpu, I., Lamminmäki, A., Halonen, P., Ristamäki, R., Lantto, E., Uutela, A., Osterlund, E., Ovissi, A., Nordin, A., Heervä, E., Lehtomäki, K., Räsänen, J., Murashev, M., Aroviita, L., Jekunen, A., ... Isoniemi, H. (2021). Repeated centralized multidisciplinary team assessment of resectability, clinical behavior, and outcomes in 1086 Finnish metastatic colorectal cancer patients (RAXO): A nationwide prospective intervention study. *The Lancet Regional Health - Europe*, 3. <https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2021.100049>
- Ozleyen, A., Yilmaz, Y. B., Donmez, S., Atalay, H. N., Antika, G., & Tumer, T. B. (2023). Looking at NSAIDs from a historical perspective and their current status in drug repurposing for cancer treatment and prevention. In *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* (Vol. 149, Issue 5). <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04187-8>
- Peng, L., Zhou, Y., Wang, Y., Mou, H., & Zhao, Q. (2013). Prognostic Significance of COX-2 Immunohistochemical Expression in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of the Literature. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058891>
- Piawah, S., & Venook, A. P. (2019). Targeted therapy for colorectal cancer metastases: A review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer. In *Cancer* (Vol. 125, Issue 23, pp. 4139–4147). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/cnrcr.32163>
- Qin, S., Li, J., Wang, L., Xu, J., Cheng, Y., Bai, Y., Li, W., Xu, N., Lin, L. Z., Wu, Q., Li, Y., Yang, J., Pan, H., Ouyang, X., Qiu, W., Wu, K., Xiong, J., Dai, G., Liang, H., ... Liu, T. (2018).
-

- Efficacy and tolerability of first-line cetuximab plus leucovorin, fluorouracil, and oxaliplatin (FOLFOX-4) versus FOLFOX-4 in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer: The open-label, randomized, phase III TAILOR trial. *Journal of Clinical Oncology*, 36(30). <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.78.3183>
- Roelofs, H. M. J., te Morsche, R. H. M., van Heumen, B. W. H., Nagengast, F. M., & Peters, W. H. M. (2014). Over-expression of COX-2 mRNA in colorectal cancer. *BMC Gastroenterology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-230X-14-1>
- Ruan, D., & So, S. P. (2014). Prostaglandin E2 produced by inducible COX-2 and mPGES-1 promoting cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Life Sciences*, 116(1). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.07.042>
- Salimoglu, S., Kilinc, G., & Calik, B. (2020). Anatomy of the colon, rectum, and anus. In *Colon Polyps and Colorectal Cancer: Second Edition*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57273-0_1
- Sandberg, T. P., Sweere, I., van Pelt, G. W., Putter, H., Vermeulen, L., Kuppen, P. J., Tollenaar, R. A. E. M., & Mesker, W. E. (2019). Prognostic value of low CDX2 expression in colorectal cancers with a high stromal content – a short report. *Cellular Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s13402-019-00436-0>
- Sanderson IR. (1999). *Development of the Gastrointestinal Tract* (Sanderson IR, Ed.; C Decker Inc.).
- Santos, M. de O., Lima, F. C. da S. de, Martins, L. F. L., Oliveira, J. F. P., Almeida, L. M. de, & Cancela, M. de C. (2023). Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 69(1). <https://doi.org/10.32635/2176-9745.rbc.2023v69n1.3700>
-

- Sanz-Garcia, E., Argiles, G., Elez, E., & Tabernero, J. (2017). BRAF mutant colorectal cancer: Prognosis, treatment, and new perspectives. In *Annals of Oncology* (Vol. 28, Issue 11). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx401>
- Sawicki, T., Ruszkowska, M., Danielewicz, A., Niedźwiedzka, E., Arłukowicz, T., & Przybyłowicz, K. E. (2021). A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/cancers13092025>
- Seligmann, J. F., Fisher, D., Smith, C. G., Richman, S. D., Elliott, F., Brown, S., Adams, R., Maughan, T., Quirke, P., Cheadle, J., Seymour, M., & Middleton, G. (2017). Investigating the poor outcomes of BRAF-mutant advanced colorectal cancer: Analysis from 2530 patients in randomised clinical trials. *Annals of Oncology*, 28(3). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw645>
- Shigematsu, Y., Inamura, K., Yamamoto, N., Mise, Y., Saiura, A., Ishikawa, Y., Takahashi, S., & Kanda, H. (2018). Impact of CDX2 expression status on the survival of patients after curative resection for colorectal cancer liver metastasis 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis. *BMC Cancer*, 18(1), 3–8. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4902-8>
- Shuford, R. A., Cairns, A. L., & Moaven, O. (2020). Precision approaches in the management of colorectal cancer: Current evidence and latest advancements towards individualizing the treatment. *Cancers*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/cancers12113481>
- Siegel, R. L., Wagle, N. S., Cercek, A., Smith, R. A., & Jemal, A. (2023). Colorectal cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. <https://doi.org/10.3322/caac.21772>
-

- Silberg, D. G., Swain, G. P., Eun Ran Suh, & Traber, P. G. (2000). Cdx1 and Cdx2 expression during intestinal development. *Gastroenterology*, 119(4), 961–971. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.18142>
- Soares, A., Rodrigues, D., Cipriano, E., Tavares, A., Vilaca, M., Silva, D., Santos, J., Mesquita, A., Salgado, M., Sottomayor, C., & Almeida, R. (2020). P-143 Lack of expression of CDX2: Prognostic biomarker in stage IV colorectal cancer. *Annals of Oncology*, 31. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.04.225>
- Soumaoro, L. T., Uetake, H., Higuchi, T., Takagi, Y., Enomoto, M., & Sugihara, K. (2004). Cyclooxygenase-2 expression: A significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 10(24). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0653>
- Stairs, D. B., Kong, J., & Lynch, J. P. (2010). Cdx genes, inflammation, and the pathogenesis of intestinal metaplasia. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 96, Issue C). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381280-3.00010-5>
- Stintzing, S., Modest, D. P., Rossius, L., Lerch, M. M., von Weikersthal, L. F., Decker, T., Kiani, A., Vehling-Kaiser, U., Al-Batran, S. E., Heintges, T., Lerchenmüller, C., Kahl, C., Seipelt, G., Kullmann, F., Stauch, M., Scheithauer, W., Held, S., Giessen-Jung, C., Moehler, M., ... Heinemann, V. (2016). FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a post-hoc analysis of tumour dynamics in the final RAS wild-type subgroup of this randomised open-label phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 17(10). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30269-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30269-8)
- Tarazona, N., Gimeno-Valiente, F., Gambardella, V., Huerta, M., Roselló, S., Zuniga, S., Calon, A., Carbonell-Asins, J. A., Fontana, E., Martinez-Ciarpaglini, C., Eason, K., Rentero-Garrido, P., Fleitas, T., Papaccio, F., Moro-Valdezate, D., Nyamundanda, G., Castillo, J., Espí, A., Sadanandam, A., ... Cervantes, A. (2020). Detection of postoperative plasma circulating
-

tumour DNA and lack of CDX2 expression as markers of recurrence in patients with localised colon cancer. *ESMO Open*, 5(5). <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2020-000847>

Tejpar, S., Stintzing, S., Ciardiello, F., Tabernero, J., Van Cutsem, E., Beier, F., Esser, R., Lenz, H. J., & Heinemann, V. (2017). Prognostic and predictive relevance of primary tumor location in patients with ras wild-type metastatic colorectal cancer retrospective analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 trials. *JAMA Oncology*, 3(2). <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.3797>

Testa, U., Pelosi, E., & Castelli, G. (2018). Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells. In *Medical sciences (Basel, Switzerland)* (Vol. 6, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/medsci6020031>

Tie, J., & Desai, J. (2015). Targeting BRAF mutant metastatic colorectal cancer: clinical implications and emerging therapeutic strategies. In *Targeted Oncology* (Vol. 10, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s11523-014-0330-0>

Tomasello, G., Barni, S., Turati, L., Ghidini, M., Pezzica, E., Passalacqua, R., & Petrelli, F. (2018). Association of CDX2 Expression With Survival in Early Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. In *Clinical Colorectal Cancer* (Vol. 17, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2018.02.001>

Tomozawa, S., Tsuno, N. H., Sunami, E., Hatano, K., Kitayama, J., Osada, T., Saito, S., Tsuruo, T., Shibata, Y., & Nagawa, H. (2000). Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 83(3), 324–328. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1270>

Tóth, C., Sükösd, F., Valicsek, E., Herpel, E., Schirmacher, P., & Tiszlavicz, L. (2018). Loss of CDX2 gene expression is associated with DNA repair proteins and is a crucial member of

the Wnt signaling pathway in liver metastasis of colorectal cancer. *Oncology Letters*, 15(3).
<https://doi.org/10.3892/ol.2018.7756>

Van Cutsem, E., Cervantes, A., Adam, R., Sobrero, A., Van Krieken, J. H., Aderka, D., Aranda Aguilar, E., Bardelli, A., Benson, A., Bodoky, G., Ciardiello, F., D'Hoore, A., Diaz-Rubio, E., Douillard, J. Y., Ducreux, M., Falcone, A., Grothey, A., Gruenberger, T., Haustermans, K., ... Arnold, D. (2016). ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*, 27(8).
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdw235>

Van Cutsem, E., Köhne, C.-H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C.-R., Makhson, A., D'Haens, G., Pintér, T., Lim, R., Bodoky, G., Roh, J. K., Folprecht, G., Ruff, P., Stroh, C., Tejpar, S., Schlichting, M., Nippgen, J., & Rougier, P. (2009). Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 360(14).
<https://doi.org/10.1056/nejmoa0805019>

Van Cutsem, E., Lenz, H. J., Köhne, C. H., Heinemann, V., Tejpar, S., Melezínek, I., Beier, F., Stroh, C., Rougier, P., Han Van Krieken, J., & Ciardiello, F. (2015). Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 33(7). <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4812>

Van Cutsem, E., Peeters, M., Siena, S., Humblet, Y., Hendlisz, A., Neyns, B., Canon, J. L., Van Laethem, J. L., Maurel, J., Richardson, G., Wolf, M., & Amado, R. G. (2007). Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy- refractory metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25(13). <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.08.1620>

Vatandoust, S., Price, T. J., & Karapetis, C. S. (2015). Colorectal cancer: Metastases to a single organ. *World Journal of Gastroenterology*, 21(41). <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i41.11767>

- Wang, J., Li, S., Liu, Y., Zhang, C., Li, H., & Lai, B. (2020). Metastatic patterns and survival outcomes in patients with stage IV colon cancer: A population-based analysis. *Cancer Medicine*, 9(1). <https://doi.org/10.1002/cam4.2673>
- Werling, R. W., Yaziji, H., Bacchi, C. E., & Gown, A. M. (2003). CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: An immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *American Journal of Surgical Pathology*, 27(3). <https://doi.org/10.1097/00000478-200303000-00003>
- Xie, R., Yang, Y., Zhang, H., Liu, H., Guo, J., Qin, H., Ma, Y., Goel, A., Li, X., & Wei, Q. (2019). C-Myb and its effector COX-2 as an indicator associated with prognosis and therapeutic outcome in colorectal cancer. *Journal of Cancer*, 10(7). <https://doi.org/10.7150/jca.27261>
- Yokota, T., Ura, T., Shibata, N., Takahari, D., Shitara, K., Nomura, M., Kondo, C., Mizota, A., Utsunomiya, S., Muro, K., & Yatabe, Y. (2011). BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 104(5), 856–862. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.19>
- Yuasa, Y., Nagasaki, H., Akiyama, Y., Sakai, H., Nakajima, T., Ohkura, Y., Takizawa, T., Koike, M., Tani, M., Iwai, T., Sugihara, K., Imai, K., & Nakachi, K. (2005). Relationship between CDX2 gene methylation and dietary factors in gastric cancer patients. *Carcinogenesis*, 26(1). <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh304>
- Zhang, B. Y., Jones, J. C., Briggler, A. M., Hubbard, J. M., Kipp, B. R., Sargent, D. J., Dixon, J. G., & Grothey, A. (2017a). Lack of Caudal-Type Homeobox Transcription Factor 2 Expression as a Prognostic Biomarker in Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 16(2), 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.09.003>
- Zhang, B. Y., Jones, J. C., Briggler, A. M., Hubbard, J. M., Kipp, B. R., Sargent, D. J., Dixon, J. G., & Grothey, A. (2017b). Lack of Caudal-Type Homeobox Transcription Factor 2
-

Expression as a Prognostic Biomarker in Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 16(2), 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.09.003>

Zhang, H., & Sun, X. F. (2002). Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with advanced stages of colorectal cancer. *American Journal of Gastroenterology*, 97(4). [https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(02\)03981-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9270(02)03981-3)

Zlobec, I., Terracciano, L., Jass, J. R., & Lugli, A. (2007). Value of staining intensity in the interpretation of immunohistochemistry for tumor markers in colorectal cancer. *Virchows Archiv*, 451(4). <https://doi.org/10.1007/s00428-007-0466-8>

Zygulska, A. L., & Pierzchalski, P. (2022). Novel Diagnostic Biomarkers in Colorectal Cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23020852>

7. MANUSCRITO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

Original Research

Loss of *CDX2* and high *COX2 (PTGS2)* expression in metastatic colorectal cancer

Álvaro M C Caldas¹, Warley A Nunes², Rodrigo Taboada¹, Marcele G Cesca¹, Janaína N Germano³, Rachel P Riechelmann¹.

(1) Department of Clinical Oncology, (2) Department of Pathology, and (3) Statistic Group at the International Research Center (CIPE); A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo 01509-900, Brazil

Corresponding author: Rachel P. Riechelmann, M.D., PH.D.

Dr. Rachel P. Riechelmann MD, PhD

Department of Clinical Oncology A.C. Camargo Cancer Center

Rua Antônio Prudente 211, São Paulo, Brazil, 01509-010

Phone: +55 11 21895000, ext: 2777

rachel.riechelmann@accamargo.org.br

Abstract (200 words)

Lack of expression of the tumor suppressor gene *CDX2* associates with poor outcomes in early stage colorectal cancer. Yet its prognostic value in the context of other prognostic biomarkers in metastatic CRC (mCRC) is unknown. Overexpressed cyclooxygenase-2 (COX2) has been reported in advanced CRC. However, *CDX2* and COX2 relationship in mCRC remains undetermined. We aimed to assess their expression in mCRC tumors from a clinically characterized cohort and their influence on overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in first line. Among 720 consecutive mCRC patients, 346 had tumor samples appropriate for tissue microarray (TMA) assembly and immunohistochemistry (IHC) analyses. Clinical and survival data were retrospectively assessed. Loss of *CDX2* expression was detected in 27 (7.8%) samples, enriched in poorly differentiated tumors (20%; $p<0.01$) and in those with the *BRAF* p.V600E variant (40%; $p<0.01$). Most tumors (93.4%) expressed COX2. COX2-negative samples were enriched in poorly differentiated mCRC. In unadjusted analyses, median OS ($p<0.001$) and median PFS ($p<0.05$) were inferior for patients with *CDX2*-negative versus *CDX2*-positive tumors. In conclusion, loss of *CDX2* was significantly associated with poorly differentiated mCRC and *BRAF* p.V600E allele and a prognostic marker of worse OS.

Keywords: *CDX2*; COX2; *BRAF*; Metastatic colorectal cancer; chemotherapy

Introduction

Significant advances have been achieved towards personalized treatment for patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) (Piawah & Venook, 2019). While specific gene alterations are important to guide targeted therapy, they are not sufficient to determine a patient's clinical outcome. For instance, while *RAS* mutations in mCRC are negative predictors of response to anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibodies (mAb) (Cremolini et al., 2017; Tejpar et al., 2017), we still lack more accurate predictors of benefit to anti-EGFR agents.

The *BRAF* p.V600E variant, which hyperactivates the EGFR pathway, is a strong negative prognostic factor in mCRC (Sanz-Garcia et al., 2017). Nevertheless, combined *BRAF* and *KRAS* inhibition is required in order to control adaptive resistance due to feedback loops mediated by CRC-specific EGFR activity (Di Nicolantonio et al., 2021). The identification of deficient mismatch repair (dMMR) in mCRC, ascertained by laboratorial identification of DNA microsatellite instability (MSI) in tumors, selects patients who may benefit from immune checkpoint inhibitors. Thus, nowadays testing for MMR status, *KRAS*, *NRAS* exons 2, 3 and 4, and *BRAF* p.V600E gene alterations has been recommended at the time of mCRC diagnosis, due to its relevance for first-line therapy selection (Cervantes et al., 2023). More recently genomic amplification of the human epidermal growth factor receptor 2 (*HER2*) gene (Sartore-Bianchi et al., 2016) has been recommended for wild-type *RAS* tumors, contributing to identify patients who may benefit from *HER2* blockade (Cervantes et al., 2023). Although *NTRK* fusions are rare in mCRC, TRK inhibitors are also recommended as a targeted therapy (Cervantes et al., 2023). Notwithstanding, despite all achievements, most patients with mCRC are still incurable. Thus, investigation of new biomarkers is needed to refine prognosis and response prediction, notably with routine methods and appealing low cost.

There are currently several emerging prognosis and/or predictive biomarkers under evaluation in mCRC (Patel et al., 2019). Among them, the caudal-type homeobox transcription factor 2 (CDX2), a protein encoded by the *CDX2* gene (13q12.2; OMIM #600297), plays an essential role in the development and differentiation of intestinal epithelium, regulating the expression of intestine-specific genes, many of them associated with cell proliferation, migration and tumorigenesis (Chawengsaksophak et al., 2004; Gao et al., 2009; Guo et al., 2004; James et al., 1994; Macdonald & Struhl, 1986; Silberg et al., 2000). Loss of *CDX2* function associates with oncogenesis, a property of tumor suppressor genes (Coskun et al., 2011). A variable rate of low CDX2 amount has been observed in non-metastatic CRC. It appears to correlate with inferior survival, tumor poor differentiation, proximal location, MSI, CpG island methylator phenotype and *BRAF* pathogenic variants, notably the p.V600E variant (Baba et al., 2009; Bae et al., 2015; Dalerba, Sahoo, & Clarke, 2016; Lugli et al., 2008; Tarazona et al., 2020; Tomasello et al., 2018; Zlobec et al., 2010). However, the independent prognostic value of CDX2 downregulation in CRC is still under debate. Few reports have solely addressed CDX2 expression and its potential prognostic and predictive values in mCRC (B. Y. Zhang et al., 2017; Aasebø et al., 2020). Thus, further investigation in different patient cohorts is necessary to validate these findings and to investigate the prognostic association of other factors with CDX2.

Chronic inflammation is a known risk factor for the development and outcome of CRC (Itzkowitz & Yio, 2004). CDX2 loss has been linked to intestinal inflammation as an upstream regulator of key molecules in the inflammatory signaling cascade. Reduced CDX2 in a human colon cancer cell line has been demonstrated to enhance NF- κ B-mediated inflammatory response, upregulating the expression of cyclooxygenase 2 (COX2) protein, encoded by the prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (*PTGS2*) gene (1q31.1; OMIM #600262). COX2 catalyzes the conversion of free arachidonic acid to prostaglandin (PG) H₂, the precursor of other prostaglandins and thromboxanes. These compounds are important regulators of cell

proliferation, angiogenesis, immune function and inflammation, which may contribute to the development and progression of neoplasia (Greenhough et al., 2009). Although COX2 overexpression has shown a significantly direct association with CRC recurrence (Tomozawa et al., 2000; Kim et al., 2018) and advanced CRC stages (H. Zhang & Sun, 2002), its overall prognostic significance in CRC remains unclear (Peng et al., 2013).

Here, we aimed at better understanding the role of CDX2 and COX2 biomarkers on the clinical outcomes of patients with mCRC and their associations with other known prognostic factors in CRC. For that, we retrospectively assessed a clinically characterized cohort of mCRC patients from a large comprehensive cancer center, and prospectively classified the expression of CDX2 and COX2 in tissue microarray of mCRC tumor samples.

Subjects and methods

Patient selection and Study Design

This was a retrospective longitudinal study, which aimed to evaluate the immunohistochemistry (IHC) expression of both CDX2 and COX2 proteins in colorectal tumor samples and their effect on patients' overall survival. The study was conducted in accordance with the 'International Conference on Harmonization Good Clinical Practice' protocol guidelines as well as applicable local laws and regulatory requirements. The study was reviewed and approved by the Research Ethics Committee of the AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil (CAAE 06432819.2.0000.5432; <http://plataformabrasil.saude.gov.br>). This retrospective, single-center cohort study had data available for 720 patients with mCRC. Inclusion criteria were: adult patients treated at AC Camargo Cancer Center (São Paulo, Brazil) with metastatic disease diagnosed between January 2015 and December 2019, and with available tumor tissues from primary tumor and/or metastatic lesions suitable for analysis according to information provided by the Department of Pathology. Exclusion criteria were patients with insufficient tumor tissues for

CDX2/COX2 analysis, and scant available clinical history (e.g., patients consulted for second opinion).

The primary endpoint was overall survival (OS) of mCRC patients according to the tumor expression status of CDX2 or COX2. Secondary endpoints were: progression-free survival, frequency of CDX2 and COX2 protein expression by IHC in mCRC (positive/negative); to investigate associations between CDX2 and COX2 protein expression and tumor-related factors such as, presence of *KRAS*, *BRAF* or *NRAS* mutations [*KRAS* exons 2, 3 and 4 (codons 12, 13, 59, 61, 117 and 146), *BRAF* exon 15 (codon 600), and *NRAS* exons 2, 3 and 4 (codons 12, 13, 59, 61 and 117)]; proficiency of proteins related to repair genes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*); tumor sidedness and cell differentiation.

Clinical data collected from patients' electronic medical records were entered and stored in a data collection form developed within the Research Electronic Data Capture software (REDCap, Vanderbilt University, Nashville TN; REDCap data bank 2664/19 at CIPE/A.C. Camargo Cancer Center). The following data were collected and analyzed: age at the diagnosis of mCRC, gender, family history of colorectal neoplasia, known hereditary syndrome, co-morbidities (only those requiring pharmacological treatment), tumor location (right colon defined as localized tumor from ascending colon to splenic flexure), morphology, grade, date of mCRC diagnosis, location of metastases, genotypes for *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *KRAS*, *BRAF* and *NRAS* genes; classification of protein proficiencies related to DNA repair genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*; type and date of initiation of first-line chemotherapy regimen with or without a biologic agent, date of metastatic disease progression after first-line chemotherapy (with or without a biologic agent), number of chemotherapy cycles, date of last follow-up visit, and date of death.

Tissue microarray, CDX2 and COX2 immunohistochemistry

Hematoxylin and eosin (H&E)-stained representative tumor samples were reviewed by a senior pathologist who selected a subset for microarray assembly. Paraffin-embedded tissue

blocks retrieved from the primary tumor (79.8%) or metastatic lesion (20.2%) had to provide two one-mm diameter spots for capture. For each tumor, two independent tissue cores from distinct areas of the same lesion were sectioned. Each spot represented viable tissue of invasive neoplasia for construction of a tissue microarray (TMA) for each marker employed in this study. Tissue microarray (TMA) assembly was performed according to standards used in the Human Protein Atlas (Kampf et al., 2012).

Immunohistochemistry (IHC) was performed using the anti-CDX2 (EPR2764Y), anti-COX2 (SP21) or anti-cytokeratin 19 (A53-B/A2.26) antibodies from Abcam (Cambridge, UK), on an automated platform (Ventana Benchmark, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland), following the manufacturer's instructions. A qualified normal human term placenta tissue was used as internal control for each slide.

Stained tissue was morphologically evaluated at forty- and a hundred-fold magnification. Subjective scoring of CDX2 signal intensity was performed at two-hundred magnification in a blinded fashion (Dalerba, Sahoo, Paik, et al., 2016). Immunoreactivity was assigned as a score based on the percentage of positive tumor cells over total tumor cells (proportion of positivity) ranging from zero to 100%. The recommendation for general IHC interpretation of CRC markers is to consider the percentage of positive cells as the only scoring parameter (Zlobec et al., 2007). Thus, positivity, but not intensity, of CDX2 IHC staining was taken into account. Loss of CDX2 expression (CDX2-negative) was defined as tumors with the malignant epithelial component completely lacking CDX2 expression or showing a scattered, faint nuclear staining in a minority fraction of cancer cells (weak staining). CDX2-positive samples were all tumors with malignant epithelial component displaying widespread nuclear expression of CDX2 (moderate staining) or having a strong staining in a majority of cancer cells (strong staining). When CDX2 scores were discordant between the two TMA tumor cores, the highest score was considered.

After all slide sections were scanned by the pathologist, a score was assigned to COX2 staining, which considered both staining intensity and extent of stained area. The staining intensity was scored as zero (negative), 1 (weak), 2 (medium) or 3 (strong). The extent of staining was scored as 0 (0%), 1 (1 to 25%), 2 (26 to 50%), 3 (51 to 75%) or 4 (76 to 100%), according to the proportion between stained areas and the whole tumor area, as proposed (Soumaoro et al., 2004). The sum of the intensity and extent score was used as the final staining score (0 to 7). For statistical analysis, tumors having a final staining score ≥ 3 were considered COX2-positive (Soumaoro et al., 2004)

Statistics considerations

Initially, a descriptive analysis of the variables was performed, in which the absolute (n) and relative (%) frequency distributions were presented for the qualitative variables, and the main summary measures, such as the mean, standard deviation, median, minimum and maximum values, for quantitative variables. To assess the association between qualitative variables, the chi-square test or Fisher's exact test were used when appropriate. To compare qualitative variables in relation to the distribution of quantitative variables, the non-parametric Mann-Whitney test was used. OS was calculated from the date of C1D1 of first-line treatment until the date of death from any cause. PFS was considered the time from the date of C1D1 treatment to radiological progression, or death from any cause. The Kaplan-Meier estimator was used to estimate the overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) curves, and the groups were compared using the log-rank test.

Univariate and multivariate Cox proportional hazards models were created to adjust the effects of independent variables on the primary endpoint of OS. The independent variables used were CDX2 expression (positive vs. negative), *BRAF* (p.V600E variant vs. wild-type allele) and tumor sidedness (right vs. left/rectum). Variables from the univariate model were incorporated into the multivariate Cox proportional hazard model if $P < 0.20$. Statistical analysis was performed by

SPSS software (Version 28, IBM, Armonk NY) and free software R (Version 4.1.3, R Foundation, Vienna, Austria). Two-tailed $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Study Subjects

Among 720 mCRC patients selected for initial assessment, 346 had tumor tissues appropriate for tissue microarray (TMA) assembly. The remaining had either no viable tumor tissues ($N = 291$; i.e., scant biopsy material) or upon stained scoring evaluation there was no viable stained image or tumor was missing ($N = 83$). Therefore, this study analyzed demographic data and tissue samples of 346 mCRC patients that had been treated at our institution from 2015 to 2019. The characteristics of patients are summarized in Table 1.

The median OS for all patients ($N = 346$) was 51 months (31.3 - 70.7). The median PFS in first-line chemotherapy (with or without a monoclonal antibody) was 11 months (9.7 - 12.3). Information on first-line treatment was available for 331 patients. Among them, 135 patients (40.9%) received only FOLFOX (folinic acid, 5-fluorouracil and oxaliplatin) or FOLFIRI (folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan) and 119 patients (35.9%) had a combination of FOLFOX or FOLFIRI plus bevacizumab. (Figure 1; Table 1).

CDX2 and COX2 expression in mCRC

All 346 patients had CDX2 expression status ascertained on tissue. The classification of CDX2 staining (Figure 2) disclosed 27 patients (7.8%) whose tumors lacked CDX2 expression and 319 (92.2%) with CDX2-positive tumors. There were no significant differences for age or gender according to CDX2 tumor expression (Table 2).

Histological examination of tumors from 319 patients classified 7.2%, 76.3% and 8.7% of the samples respectively in grades 1 (well differentiated), 2 (moderately differentiated), and 3 (poorly differentiated) (Table 2). There was a significant association between grade-3 tumors and

loss of CDX2 expression (Table 2). Most tumors were resected from the left side/rectum (N = 257, 74.7%) as compared to the right side (N = 87, 25.3 %) of the colon. The CDX2 expression status was not significantly associated with tumor sidedness (Table 2).

All CRC samples in our cohort had been genotyped for the *KRAS* or *NRAS* genes. CDX2-positive or CDX2-negative status were equally represented in tumors with wild-type (N = 178, 51.4%) or mutated (N = 168, 48.6%) *KRAS* or *NRAS*. The *BRAF* genotypes ascertained to tumors from 180 patients disclosed a more significant representation of the p.V600E variant among CDX2-negative tumors, detected in six (40%) of them as compared to nine (60%) CDX2-positive samples (Table 2). The mismatch repair deficiency phenotype classified as high microsatellite instability in nine (3.2%) tumor samples, and did not show association with the CDX2 staining status (Table 2). No significant association was found between the CDX2 expression status and metastatic sites (Table 2).

COX2 expression was evaluated in 332 out of 346 tumor samples (Figure 2). COX2-positive tumors encompassed the majority (93.4%) of samples (Table 3), and the staining was extensive in most of them (86.4%, Figure 3). COX2-negative tumors were enriched in poorly differentiated tumors when compared to COX2-positive tumors (Table 3). Although this histological grading (3) was also associated with CDX2-negative tumors, no correlation was found between the COX2 staining status and CDX2 loss, or with any other variable. All tumors that lacked CDX2 expression or had the *BRAF* p.V600E variant were positive for COX2 expression (Table 3).

Overall Survival (OS) and Progression Free Survival (PFS) of mCRC patients

At a median follow-up time of 51 months, the median OS was inferior for patients with CDX2-negative tumors (N = 27) when compared with those with CDX2-positive CRC (N = 319): median 30 vs. 53 months, respectively (Mantel-Cox log-rank test, $p = 0.008$; Figure 4A). Inferior OS was also observed for patients with CDX2-negative (N = 8) compared to CDX2-positive (N = 157) tumors when adjusted to exclude samples with the *BRAF* p.V600E variant (median 18 vs. 103

months, respectively; Mantel-Cox log-rank test, $p = 0.043$; Figure 4B). No OS difference was observed between COX2-negative ($N = 22$) and -positive ($N = 309$) sample patients ($p = 0.14$; Figure 4C). Irrespectively of CDX2 or COX2 expressions, there was a significant OS difference between mCRC patients with *BRAF* p.V600E variant ($N = 15$) and those with the wild-type allele ($N = 164$) (median 17 and 103 months, respectively, Mantel-Cox log-rank test, $p = 0.0001$; Figure 4D). Multiple Cox regression analysis performed to adjust for prognostic covariates (*BRAF* genotype and tumor sidedness) disclosed a significant decrease in OS for patients with the p.V600E variant ($p = 0.029$) but not with loss of CDX2 expression (Table 4).

The median PFS in first-line therapy was significantly inferior for those with CDX2-negative ($N = 23$) compared to CDX2-positive ($N = 282$) tumors (8 vs. 12 months; Mantel-Cox log-rank test, $p = 0.023$; Figure 5A). When we stratified by tumor sidedness, PFS in first-line was significantly inferior for those located on the right side ($N = 76$) compared to left side/rectal ($N = 228$) tumors (7 vs. 12 months; Mantel-Cox log-rank test, $p = 0.002$; Figure 5B). A significant difference was also found for mCRC patients with *BRAF* p.V600E variant ($N = 12$, red) compared to those wild-type allele tumors ($N = 148$, blue), (6 vs. 12 months; Mantel-Cox log-rank test, $p = 0.021$, Figure 5C). COX2 expression status revealed no effect in PFS ($p > 0.05$; Figure 5D).

Discussion

In a cohort of clinically characterized patients with mCRC 7.8% of samples lacked CDX2 expression. CDX2-negative samples were significantly associated with the *BRAF* p.V600E variant and poorly differentiated histology. Median OS and PFS were significantly inferior for patients with CDX2-negative versus CDX2-positive tumors, even after excluding tumors with the *BRAF* p.V600E allele. CDX2 expression was not associated with tumor sidedness. Tumors overexpressed COX2 but it had no influence on patients' OS.

The CDX2 expression status has a variable prevalence in mCRC. In unselected mCRC, the frequency of CDX2 loss varies from 2.8% to 48% (Baba et al., 2009; Neumann et al., 2018). This variability may be explained, among other reasons, by differences in the threshold of CDX2-negative samples. While some studies classified as negative the complete absence of CDX2 IHC expression (B. Y. Zhang et al., 2017b), other studies considered samples as negative when there was weak nuclear expression in less than 10% tumor cells (Dalerba, Sahoo, & Clarke, 2016). One report employed a score combining the intensity level and the percentage of tumor cells expressing CDX2, categorizing samples with low, intermediate and high expression levels (Nolte et al., 2017). In our study, CDX2-negative samples had none or weak nuclear staining in up to 10% of tumor cells, whereas CDX2-positive tumors had moderate or strong staining (Figure 2).

In our cohort the histopathological classification of grade 3 was more frequent in CDX2-negative tumors (20%) than expected (7.8%; $p < 0.01$), as observed by previous studies and linked to a poor prognosis in mCRC (Aasebø et al., 2020; Baba et al., 2009; Bae et al., 2015; Graule et al., 2018; Singh et al., 2022; B. Y. Zhang et al., 2017b). However, since grade-3 tumors comprised 9.4% ($N = 30$) of the total sample, grade-3 CDX2-negative tumors corresponded to six samples of our cohort. This significant enrichment though with a limited number of samples was also observed in other studies (Shigematsu et al., 2018) (Neumann et al., 2018).

We found a significant enrichment in the *BRAF* p.V600E variant in CDX2-negative samples when compared to CDX2-positive samples (40% vs. 60%, respectively; Table 2). A significant association has been reported between CDX2 loss and *BRAF* p.V600E (Baba et al., 2009; Bae et al., 2015; Neumann et al., 2018; Aasebø et al., 2020) or MSI (Neumann et al., 2018; Aasebø et al., 2020). A low number of mCRC samples from our study presented high MSI (9/346), and no correlation was found between high MSI or *NRAS/KRAS* mutations and CDX2 expression levels (Table 2). As for *KRAS* alterations some studies found *KRAS* mutations more frequently in tumors

with CDX2 expression (Aasebø et al., 2020), while other studies did not (B. Y. Zhang et al., 2017b).

BRAF p.V600E and loss of CDX2 might cooperate in promoting CRC tumorigenesis. In a cohort of mCRC *BRAF V600E* samples, 67% had low to intermediate intensity of CDX2 staining (Loupakis et al., 2019). Mouse models with *Cdx2* null and *Braf* p.V600E alleles develop intestinal tumors with serrated phenotype and synergistic gene expression effects, such as a hundred-fold increase in the amount of the gastric epithelium marker Anx10a protein (Sakamoto et al., 2017).

. The rate of CDX2 loss was significantly increased in right-sided primary tumors when compared to CDX2-expressing tumors from two studies (B. Y. Zhang et al., 2017b; (Aasebø et al., 2020). However, in our study, we could not observe this association, potentially due to our smaller sample.

CDX2 and mCRC clinical outcomes

In early stage CRC, the lack of CDX2 expression has been associated with poor patient prognosis and limited OS in different studies (Dalerba, Sahoo, Paik, et al., 2016; Hansen et al., 2018; Tomasello et al., 2018). In a subgroup of patients with high-risk stage-II CRC, loss of CDX2 was proposed as a predictive biomarker for treatment benefit from adjuvant chemotherapy (Dalerba, Sahoo, Paik, et al., 2016). In our casuistic, loss of CDX2 expression in mCRC was associated with a higher risk of death, even when wild-type *BRAF* samples were separately assessed. Patients with CDX2-negative tumors additionally had a faster progression on first-line treatment than those with tumors that expressed CDX2. Lack of CDX2 was a poor prognostic factor for mCRC in other retrospective studies. (Zhang et al. 2017) (Aasebø et al., 2020)(Bruun et al., 2018) (Soares et al., 2020) (Aasebø et al., 2020).

Importantly, the prognostic effect of CDX2 has been investigated in the presence of other known prognostic biomarkers. *BRAF* p.V600E variant confers significantly worse prognosis for mCRC

independently of associated clinic-pathological features (Seligmann et al., 2017) (Tran et al., 2011). Although there are discrepancies among different series, CDX2 down-regulation is commonly correlated with the *BRAF* p.V600E variant (Aasebø et al., 2020; Bae et al., 2016; Olsen et al., 2016), as we observed. When multiple Cox regression analysis was employed to adjust for covariates, reduced OS was observed for patients with the *BRAF* p.V600E variant but not with CDX2 loss (Table 4), demonstrating that in our cohort the lack of CDX2 was not an independent outcome predictor or that our study lacked power to detect this association. Other studies identified the absence of expression of CDX2 as an independent poor prognostic marker in mCRC (Aasebø et al., 2020; Loupakakis et al., 2019; Sandberg et al., 2019). Similarly to other studies, we observed that loss of CDX2 expression was associated with a significantly higher risk of progression after first-line treatment. (Aasebø et al., 2020; B. Y. Zhang et al., 2017a)

The present study is to our knowledge the largest IHC analysis of COX2 expression in mCRC, and the first one to assess its correlation with CDX2 protein levels. In cohorts with mixed stages of CRC, at least 60% of metastatic tumors highly expressed COX2 (Albasri et al., 2018; Elzagheid et al., 2013; Ogino et al., 2008; Soumaoro et al., 2004). The study on which we based our COX2 staining cutoff examined its expression in CRC, mCRC, and normal mucosa (Soumaoro et al., 2004). Similar to their CRC samples, we had nearly 80% of the samples with moderate (score 2) to strong (score 3) staining (Figure 3). While in other series, COX2 expression was not significantly different among tumor grades (Soumaoro 2004, Elzagheid et al., 2013), a significant enrichment of poorly differentiated tumors was observed among COX2-negative samples in our study. Different studies reported higher OS rates among CRC patients whose tumors are negative for COX2 protein (Kosumi et al., 2019; Mahmoud et al., 2014; Negi et al., 2019; Soumaoro et al., 2004; Kunzmann et al., 2013 ; Peng et al., 2013). In our study, the lack of significant difference between the two groups for either OS or PFS is probably compromised by the small number of COX2- negative samples.

The present study had some limitations, many of which inherent to its retrospective designs. We could not fully explore the relationship between CDX2 expression status and overall response rate and response to specific first-line therapies. This would be of particular interest for anti-EGFR agents. Finally, the strong expression of COX2 in our cohort limited the assessment of its correlation with CDX2 and demographic, clinical and molecular parameters.

Immunohistochemical detection of CDX2 expression is recognized as a clinically useful diagnostic biomarker in CRC specially in those metastatic cases where tumor origin is unknown (Baba et al., 2009; Kaimaktchiev et al., 2004; Werling et al., 2003). Our results corroborate the clinical relevance of CDX2 status as a prognostic biomarker in mCRC and we think it should be routinely integrated into clinical practice. Furthermore, It should be certainly incorporated into prospective clinical trials alone or in combination to new and/or existing biomarkers exploring potential synergies and its value as a predictive biomarker also in the mCRC setting.

Conclusions

Loss of CDX2 expression in mCRC was associated with a higher risk of death and progression after first-line treatment, poor differentiated tumors and the *BRAF p.V600E* variant. Although in the absence of the *BRAF p.V600E* variant, the lack of CDX2 protein was also associated with inferior OS, loss of CDX2 did not stand as an independent predictor. COX2 was highly expressed in mCRC. Lack of COX2 expression associated with poorly differentiated mCRC.

Funding

An independent grant from Amgen Brazil has enabled tumor tissues handling, lab equipment, and IHC analyses. AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil provided resources for statistical analysis, data collection and database assembly, and staff support for regulatory processes.

Author contributions

Acknowledgments

References

- Aasebø, K., Dragomir, A., Sundström, M., Mezheyeuski, A., Edqvist, P. H., Eide, G. E., Ponten, F., Pfeiffer, P., Glimelius, B., & Sorbye, H. (2020). CDX2: A Prognostic Marker in Metastatic Colorectal Cancer Defining a Better BRAF Mutated and a Worse KRAS Mutated Subgroup. *Frontiers in Oncology*, 10(February). <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00008>
- Albasri, A. M., Elkablawy, M. A., Hussainy, A. S., Yousif, H. M., & Alhujaily, A. S. (2018). Impact of cyclooxygenase-2 over-expression on the prognosis of colorectal cancer patients an experience from western Saudi Arabia. *Saudi Medical Journal*, 39(8). <https://doi.org/10.15537/smj.2018.8.22837>
- Al-Maghrabi, J., Buhmeida, A., Emam, E., Syrjänen, K., Sibiany, A., Al-Qahtani, M., & Al-Ahwal, M. (2012). Cyclooxygenase-2 expression as a predictor of outcome in colorectal carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 18(15), 1793–1799. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i15.1793>
- Ampollini, L., Gnetti, L., Goldoni, M., Viani, L., Faedda, E., Campanini, N., Caruana, P., Crafa, P., Negri, F., Pucci, F., Leonardi, F., Ventura, L., Balestra, V., Braggio, C., Bocchialini, G., Del Rio, P., Silini, E. M., Carbognani, P., & Rusca, M. (2017). Pulmonary metastasectomy for colorectal cancer: Analysis of prognostic factors affecting survival. *Journal of Thoracic Disease*, 9(Suppl 12), S1282–S1290. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.07.100>
-

- Baba, Y., Nosho, K., Shima, K., Freed, E., Irahara, N., Philips, J., Meyerhardt, J. A., Hornick, J. L., Shivdasani, R. A., Fuchs, C. S., & Ogino, S. (2009). Relationship of CDX2 loss with molecular features and prognosis in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(14). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0401>
- Bae, J. M., Lee, T. H., Cho, N. Y., Kim, T. Y., & Kang, G. H. (2015). Loss of CDX2 expression is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients. *World Journal of Gastroenterology*, 21(5). <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i5.1457>
- Baraibar, I., Ros, J., Mulet, N., Salvà, F., Argilés, G., Martini, G., Cuadra, J. L., Sardo, E., Ciardiello, D., Tabernero, J., & Élez, E. (2020). Incorporating traditional and emerging biomarkers in the clinical management of metastatic colorectal cancer: an update. In *Expert Review of Molecular Diagnostics* (Vol. 20, Issue 7). <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1782194>
- Bruun, J., Sveen, A., Barros, R., Eide, P. W., Eilertsen, I., Kolberg, M., Pellinen, T., David, L., Svindland, A., Kallioniemi, O., Guren, M. G., Nesbakken, A., Almeida, R., & Lothe, R. A. (2018). Prognostic, predictive, and pharmacogenomic assessments of CDX2 refine stratification of colorectal cancer. *Molecular Oncology*, 12(9). <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12347>
- Cervantes, A., Adam, R., Roselló, S., Arnold, D., Normanno, N., Taïeb, J., Seligmann, J., De Baere, T., Osterlund, P., Yoshino, T., & Martinelli, E. (2023). Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up ☆. *Annals of Oncology*, 34(1), 10–32. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.003>
- Chawengsaksophak, K., De Graaff, W., Rossant, J., Deschamps, J., & Beck, F. (2004). *Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0401654101
-

- Chewchuk, S., Jahan, S., & Lohnes, D. (2021). Cdx2 regulates immune cell infiltration in the intestine. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95412-w>
- Coskun, M., Troelsen, J. T., & Nielsen, O. H. (2011). The role of CDX2 in intestinal homeostasis and inflammation. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1812, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.11.008>
- Cremolini, C., Antoniotti, C., Moretto, R., Masi, G., & Falcone, A. (2017). First-line therapy for mCRC-the influence of primary tumour location on the therapeutic algorithm. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 14, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.219>
- Cutler, N. S., Graves-Deal, R., LaFleur, B. J., Gao, Z., Boman, B. M., Whitehead, R. H., Terry, E., Morrow, J. D., & Coffey, R. J. (2003). Stromal production of prostacyclin confers an antiapoptotic effect to colonic epithelial cells. *Cancer Research*, 63(8).
- Dalerba, P., Sahoo, D., Paik, S., Guo, X., Yothers, G., Song, N., Wilcox-Fogel, N., Forgó, E., Rajendran, P. S., Miranda, S. P., Hisamori, S., Hutchison, J., Kalisky, T., Qian, D., Wolmark, N., Fisher, G. A., van de Rijn, M., & Clarke, M. F. (2016). CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 374(3), 211–222. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506597>
- Di Nicolantonio, F., Vitiello, P. P., Marsoni, S., Siena, S., Tabernero, J., Trusolino, L., Bernards, R., & Bardelli, A. (2021). Precision oncology in metastatic colorectal cancer — from biology to medicine. In *Nature Reviews Clinical Oncology* (Vol. 18, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00495-z>
- Elzagheid, A., Emaetig, F., Alkikhia, L., Buhmeida, A., Syrjanen, K., El-Faitori, O., Latto, M., Collan, Y., & Pyrhonen, S. (2013). High cyclooxygenase-2 expression is associated with advanced stages in colorectal cancer. *Anticancer Research*, 33(8).
-

- Gao, N., White, P., & Kaestner, K. H. (2009). Establishment of Intestinal Identity and Epithelial-Mesenchymal Signaling by Cdx2. *Developmental Cell*, 16(4), 588–599. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.02.010>
- Graule, J., Uth, K., Fischer, E., Centeno, I., Galván, J. A., Eichmann, M., Rau, T. T., Langer, R., Dawson, H., Nitsche, U., Traeger, P., Berger, M. D., Schnüriger, B., Hädrich, M., Studer, P., Inderbitzin, D., Lugli, A., Tschan, M. P., & Zlobec, I. (2018). CDX2 in colorectal cancer is an independent prognostic factor and regulated by promoter methylation and histone deacetylation in tumors of the serrated pathway. *Clinical Epigenetics*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0548-2>
- Greenhough, A., Smartt, H. J. M., Moore, A. E., Roberts, H. R., Williams, A. C., Paraskeva, C., & Kaidi, A. (2009). The COX-2/PGE2 pathway: Key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. In *Carcinogenesis* (Vol. 30, Issue 3). <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp014>
- Guo, R. J., Eun, R. S., & Lynch, J. P. (2004). The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer. In *Cancer Biology and Therapy* (Vol. 3, Issue 7). <https://doi.org/10.4161/cbt.3.7.913>
- Hansen, T. F., Kjær-Frifeldt, S., Eriksen, A. C., Lindebjerg, J., Jensen, L. H., Sørensen, F. B., & Jakobsen, A. (2018). Prognostic impact of CDX2 in stage II colon cancer: results from two nationwide cohorts. *British Journal of Cancer*, 119(11). <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0285-5>
- Itzkowitz, S. H., & Yio, X. (2004). Inflammation and cancer - IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: The role of inflammation. In *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* (Vol. 287, Issues 1 50-1). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00079.2004>
-

- James, R., Erler, T., & Kazenwadel, J. (1994). Structure of the murine homeobox gene *cdx-2*. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *Journal of Biological Chemistry*, 269(21), 15229–15237. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)36596-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)36596-1)
- Kaimaktchiev, V., Terracciano, L., Tornillo, L., Spichtin, H., Stoios, D., Bundi, M., Korcheva, V., Mirlacher, M., Loda, M., Sauter, G., & Corless, C. L. (2004). The homeobox intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. *Modern Pathology*, 17(11). <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800205>
- Kampf, C., Olsson, I., Ryberg, U., Sjöstedt, E., & Pontén, F. (2012). Production of tissue micro arrays, immunohisto chemistry staining and digitalization within the human protein atlas. *Journal of Visualized Experiments*, 63. <https://doi.org/10.3791/3620>
- Kantola, T., Klintrup, K., Väyrynen, J. P., Vornanen, J., Bloigu, R., Karhu, T., Herzig, K. H., Näpänkangas, J., Mäkelä, J., Karttunen, T. J., Tuomisto, A., & Mäkinen, M. J. (2012). Stage-dependent alterations of the serum cytokine pattern in colorectal carcinoma. *British Journal of Cancer*, 107(10). <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.456>
- Kim, N. K., Park, J. K., Shin, E., & Kim, Y. W. (2014). The combination of nuclear factor kappa B, cyclo-oxygenase-2 and vascular endothelial growth factor expression predicts poor prognosis in stage II and III colorectal cancer. *Anticancer Research*, 34(11).
- Kim, S. H., Ahn, B. K., Paik, S. S., & Lee, K. H. (2018a). Cyclooxygenase-2 expression is a predictive marker for late recurrence in colorectal cancer. *Gastroenterology Research and Practice*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7968149>
- Kosumi, K., Hamada, T., Zhang, S., Liu, L., da Silva, A., Koh, H., Twombly, T. S., Mima, K., Morikawa, T., Song, M., Nowak, J. A., Nishihara, R., Saltz, L. B., Niedzwiecki, D., Ou, F. S., Zemla, T., Mayer, R. J., Baba, H., Ng, K., ... Ogino, S. (2019). Prognostic association of PTGS2 (COX-2) over-expression according to BRAF mutation status in colorectal cancer:
-

- Results from two prospective cohorts and CALGB 89803 (Alliance) trial. *European Journal of Cancer*, 111, 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.01.022>
- Loupakis, F., Biason, P., Prete, A. A., Cremolini, C., Pietrantonio, F., Pella, N., Dell'Aquila, E., Sperti, E., Zichi, C., Intini, R., Dadduzio, V., Schirripa, M., Bergamo, F., Antoniotti, C., Morano, F., Cortiula, F., De Maglio, G., Rimassa, L., Smiroldo, V., ... Fassan, M. (2019). CK7 and consensus molecular subtypes as major prognosticators in V600E BRAF mutated metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 121(7), 593–599. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0560-0>
- Lugli, A., Tzankov, A., Zlobec, I., & Terracciano, L. M. (2008). Differential diagnostic and functional role of the multi-marker phenotype CDX2/CK20/CK7 in colorectal cancer stratified by mismatch repair status. *Modern Pathology*, 21(11). <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.117>
- Macdonald, P. M., & Struhl, G. (1986). A molecular gradient in early Drosophila embryos and its role in specifying the body pattern. *Nature*, 324(6097), 537–545. <https://doi.org/10.1038/324537a0>
- Mahmoud, A. S., Umair, A., Azzeghaiby, S. N., Alqahtani, F. H., Hanouneh, S., & Tarakji, B. (2014). Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in colorectal adenocarcinoma: An immunohistochemical and histopathological study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(16), 6787–6790. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.16.6787>
- Moretto, R., Corallo, S., Belfiore, A., Rossini, D., Boccaccino, A., Lonardi, S., Centonze, G., Morano, F., Germani, M. M., Loupakis, F., Morelli, L., Urbani, L., Brich, S., Marmorino, F., Prisciandaro, M., Aprile, G., Fassan, M., Cillo, U., Cattaneo, L., ... Cremolini, C. (2020). Prognostic impact of immune-microenvironment in colorectal liver metastases resected after
-

- triplets plus a biologic agent: A pooled analysis of five prospective trials. *European Journal of Cancer*, 135, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.04.045>
- Mutoh, H., Hayakawa, H., Sakamoto, H., & Sugano, K. (2007). Homeobox protein CDX2 reduces Cox-2 transcription by inactivating the DNA-binding capacity of nuclear factor- κ B. *Journal of Gastroenterology*, 42(9). <https://doi.org/10.1007/s00535-007-2088-y>
- Negi, R. R., Rana, S. V., Gupta, V., Gupta, R., Chadha, V. D., Prasad, K. K., & Dhawan, D. K. (2019). Over-expression of Cyclooxygenase-2 in colorectal cancer patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 20(6). <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.6.1675>
- Neumann, J., Heinemann, V., Engel, J., Kirchner, T., & Stintzing, S. (2018). The prognostic impact of CDX2 correlates with the underlying mismatch repair status and BRAF mutational status but not with distant metastasis in colorectal cancer. *Virchows Archiv*, 473(2), 199–207. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2360-y>
- Nolte, S., Zlobec, I., Lugli, A., Hohenberger, W., Croner, R., Merkel, S., Hartmann, A., Geppert, C. I., & Rau, T. T. (2017). Construction and analysis of tissue microarrays in the era of digital pathology: a pilot study targeting CDX1 and CDX2 in a colon cancer cohort of 612 patients. *Journal of Pathology: Clinical Research*, 3(1), 58–70. <https://doi.org/10.1002/cjp2.62>
- Ogino, S., Kirkner, G. J., Nosho, K., Irahara, N., Kure, S., Shima, K., Hazra, A., Chan, A. T., Dehari, R., Giovannucci, E. L., & Fuchs, C. S. (2008). Cyclooxygenase-2 expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(24), 8221–8227. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1841>
- Olsen, J., Eiholm, S., Kirkeby, L. T., Espersen, M. L. M., Jess, P., Gögenür, I., Olsen, J., & Troelsen, J. T. (2016). CDX2 downregulation is associated with poor differentiation and MMR deficiency in colon cancer. *Experimental and Molecular Pathology*, 100(1). <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.11.009>
-

- Patel, J. N., Fong, M. K., & Jagosky, M. (2019). Colorectal cancer biomarkers in the era of personalized medicine. In *Journal of Personalized Medicine* (Vol. 9, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/jpm9010003>
- Peng, L., Zhou, Y., Wang, Y., Mou, H., & Zhao, Q. (2013). Prognostic Significance of COX-2 Immunohistochemical Expression in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of the Literature. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058891>
- Piawah, S., & Venook, A. P. (2019). Targeted therapy for colorectal cancer metastases: A review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer. In *Cancer* (Vol. 125, Issue 23, pp. 4139–4147). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/cncr.32163>
- Roelofs, H. M. J., te Morsche, R. H. M., van Heumen, B. W. H., Nagengast, F. M., & Peters, W. H. M. (2014). Over-expression of COX-2 mRNA in colorectal cancer. *BMC Gastroenterology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-230X-14-1>
- Ruan, D., & So, S. P. (2014). Prostaglandin E2 produced by inducible COX-2 and mPGES-1 promoting cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Life Sciences*, 116(1). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.07.042>
- Sakamoto, N., Feng, Y., Stolfi, C., Kurosu, Y., Green, M., Lin, J., Green, M. E., Sentani, K., Yasui, W., McMahon, M., Hardiman, K. M., Spence, J. R., Horita, N., Greenson, J. K., Kuick, R., Cho, K. R., & Fearon, E. R. (2017). BRAFV600E cooperates with CDX2 inactivation to promote serrated colorectal tumorigenesis. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.20331>
- Sandberg, T. P., Sweere, I., van Pelt, G. W., Putter, H., Vermeulen, L., Kuppen, P. J., Tollenaar, R. A. E. M., & Mesker, W. E. (2019). Prognostic value of low CDX2 expression in colorectal cancers with a high stromal content – a short report. *Cellular Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s13402-019-00436-0>
-

- Sanz-Garcia, E., Argiles, G., Elez, E., & Tabernero, J. (2017). BRAF mutant colorectal cancer: Prognosis, treatment, and new perspectives. In *Annals of Oncology* (Vol. 28, Issue 11). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx401>
- Sartore-Bianchi, A., Trusolino, L., Martino, C., Bencardino, K., Lonardi, S., Bergamo, F., Zagonel, V., Leone, F., Depetris, I., Martinelli, E., Troiani, T., Ciardiello, F., Racca, P., Bertotti, A., Siravegna, G., Torri, V., Amatu, A., Ghezzi, S., Marrapese, G., ... Siena, S. (2016). Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 17(6). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)00150-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)00150-9)
- Seligmann, J. F., Fisher, D., Smith, C. G., Richman, S. D., Elliott, F., Brown, S., Adams, R., Maughan, T., Quirke, P., Cheadle, J., Seymour, M., & Middleton, G. (2017). Investigating the poor outcomes of BRAF-mutant advanced colorectal cancer: Analysis from 2530 patients in randomised clinical trials. *Annals of Oncology*, 28(3). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw645>
- Shigematsu, Y., Inamura, K., Yamamoto, N., Mise, Y., Saiura, A., Ishikawa, Y., Takahashi, S., & Kanda, H. (2018). Impact of CDX2 expression status on the survival of patients after curative resection for colorectal cancer liver metastasis 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis. *BMC Cancer*, 18(1), 3–8. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4902-8>
- Silberg, D. G., Swain, G. P., Eun Ran Suh, & Traber, P. G. (2000). Cdx1 and Cdx2 expression during intestinal development. *Gastroenterology*, 119(4), 961–971. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.18142>
-

- Singh, J., Ng, R., Dubashi, B., Maroju, N. K., Ganesan, P., Matta, K. K., Charles, I., & Kayal, S. (2022). Pattern of expression of CDX2 in colorectal cancer and its role in prognosis. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 18(9). https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_1723_20
- Soares, A., Rodrigues, D., Cipriano, E., Tavares, A., Vilaca, M., Silva, D., Santos, J., Mesquita, A., Salgado, M., Sottomayor, C., & Almeida, R. (2020). P-143 Lack of expression of CDX2: Prognostic biomarker in stage IV colorectal cancer. *Annals of Oncology*, 31. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.04.225>
- Soly, W., Zhanjie, L., Lunshan, W., & Xiaoren, Z. (2009). NF- κ B signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. In *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology* (Vol. 6, Issue 5). <https://doi.org/10.1038/cmi.2009.43>
- Soumaoro, L. T., Uetake, H., Higuchi, T., Takagi, Y., Enomoto, M., & Sugihara, K. (2004). Cyclooxygenase-2 expression: A significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 10(24). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0653>
- Tarazona, N., Gimeno-Valiente, F., Gambardella, V., Huerta, M., Roselló, S., Zuniga, S., Calon, A., Carbonell-Asins, J. A., Fontana, E., Martinez-Ciarpaglini, C., Eason, K., Rentero-Garrido, P., Fleitas, T., Papaccio, F., Moro-Valdezate, D., Nyamundanda, G., Castillo, J., Espí, A., Sadanandam, A., ... Cervantes, A. (2020). Detection of postoperative plasma circulating tumour DNA and lack of CDX2 expression as markers of recurrence in patients with localised colon cancer. *ESMO Open*, 5(5). <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2020-000847>
- Tejpar, S., Stintzing, S., Ciardiello, F., Tabernero, J., Van Cutsem, E., Beier, F., Esser, R., Lenz, H. J., & Heinemann, V. (2017). Prognostic and predictive relevance of primary tumor location in patients with ras wild-type metastatic colorectal cancer retrospective analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 trials. *JAMA Oncology*, 3(2). <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.3797>
-

- Tomasello, G., Barni, S., Turati, L., Ghidini, M., Pezzica, E., Passalacqua, R., & Petrelli, F. (2018). Association of CDX2 Expression With Survival in Early Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. In *Clinical Colorectal Cancer* (Vol. 17, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2018.02.001>
- Tomozawa, S., Tsuno, N. H., Sunami, E., Hatano, K., Kitayama, J., Osada, T., Saito, S., Tsuruo, T., Shibata, Y., & Nagawa, H. (2000). Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 83(3). <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1270>
- Tran, B., Kopetz, S., Tie, J., Gibbs, P., Jiang, Z. Q., Lieu, C. H., Agarwal, A., Maru, D. M., Sieber, O., & Desai, J. (2011). Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer*, 117(20). <https://doi.org/10.1002/cncr.26086>
- Werling, R. W., Yaziji, H., Bacchi, C. E., & Gown, A. M. (2003). CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: An immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *American Journal of Surgical Pathology*, 27(3). <https://doi.org/10.1097/00000478-200303000-00003>
- Xie, R., Yang, Y., Zhang, H., Liu, H., Guo, J., Qin, H., Ma, Y., Goel, A., Li, X., & Wei, Q. (2019). C-Myb and its effector COX-2 as an indicator associated with prognosis and therapeutic outcome in colorectal cancer. *Journal of Cancer*, 10(7). <https://doi.org/10.7150/jca.27261>
- Zhang, B. Y., Jones, J. C., Briggler, A. M., Hubbard, J. M., Kipp, B. R., Sargent, D. J., Dixon, J. G., & Grothey, A. (2017a). Lack of Caudal-Type Homeobox Transcription Factor 2 Expression as a Prognostic Biomarker in Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 16(2), 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.09.003>
-

- Zhang, B. Y., Jones, J. C., Briggler, A. M., Hubbard, J. M., Kipp, B. R., Sargent, D. J., Dixon, J. G., & Grothey, A. (2017b). Lack of Caudal-Type Homeobox Transcription Factor 2 Expression as a Prognostic Biomarker in Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 16(2), 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.09.003>
- Zhang, H., & Sun, X. F. (2002). Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with advanced stages of colorectal cancer. *American Journal of Gastroenterology*, 97(4). [https://doi.org/10.1016/S0002-9270\(02\)03981-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9270(02)03981-3)
- Zlobec, I., Bihl, M. P., Schwarb, H., Terracciano, L., & Lugli, A. (2010). Clinicopathological and protein characterization of BRAF- and K-RAS-mutated colorectal cancer and implications for prognosis. *International Journal of Cancer*, 127(2). <https://doi.org/10.1002/ijc.25042>
- Zlobec, I., Terracciano, L., Jass, J. R., & Lugli, A. (2007). Value of staining intensity in the interpretation of immunohistochemistry for tumor markers in colorectal cancer. *Virchows Archiv*, 451(4). <https://doi.org/10.1007/s00428-007-0466-8>
-

Tables

Table 1: Treatment history of patients with mCRC stratified by tumor and CDX2 expression

Drug/Composites of first-line chemotherapy	Number of patients	Tumor samples	
		CDX2-negative	CDX2-positive
Total	331	27 (8.2%)	304 (91.8%)
FOLFOX/FOLFIRI	135 (40.9%)	7 (5.2%)	128 (94.8%)
Doublet + Bevacizumab	119 (35.9%)	8 (6.7%)	111 (93.3%)
Doublet + Anti-EGFR	47 (13.9%)	4 (8.7%)	43 (91.3%)
CAPOX (Capecitabine and Oxaliplatin)	8 (2.4%)	3 (37.5%)	5 (62.5%)
Triplet	7 (2.1%)	2 (28.6%)	5 (71.4%)
Other	16 (4.8%)	3 (18.7%)	13 (81.3%)

Data presented as n (%).

FOLFIRI: folinic acid, 5-fluorouracil, irinotecan; FOLFOX: folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin; FOLFOXIRI: folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan; NA: not applicable.

Table 2: Patient and tumor characteristics according to CDX2 expression (positive or negative) in mCRC)

Patient and tumor characteristics	Patients with analyzed CDX2 expression	CDX2 expression status		CDX2 status comparison
		Negative CDX2	Positive CDX2	P value
Total number	346	27 (7.8%)	319 (92.2%)	
Median age at diagnosis of metastatic disease (95% CI)	59.7 (30 – 88)	58.7 (34 – 86)	59.7 (30 – 88)	1.00 ^a
Male	185 (53.5%)	14 (8%)	171 (92%)	1.00 ^a
Female	161 (46.5%)	13 (8%)	148 (92%)	
Histology	319	23 (7.2%)	296 (92.8%)	
Tumor grade 1	25 (7.8%)	3 (12%)	22 (88%)	0.007 ^a
Tumor grade 2	264 (82.8%)	14 (5.3%)	250 (94.7%)	
Tumor grade 3	30 (9.4%)	6 (20%)	24 (80%)	
Tumor sidedness	344	27 (7.8%)	317 (92.2%)	
Right sided	87 (25.3%)	10 (11.5%)	77 (88.5%)	0.187 ^a
Left sided / Rectum	257 (74.7%)	17 (6.6%)	240 (93.4%)	
Tumor genetics				
<i>BRAF</i>	180	14 (7.8%)	166 (92.2%)	
Wild-type	165 (91.7%)	8 (4.8%)	157 (95.2%)	0.0002 ^a
p.V600E variant	15 (8.3%)	6 (40%)	9 (60%)	
<i>KRAS</i> or <i>NRAS</i>	346	27 (7.8%)	319 (92.2%)	
Wild-type	178 (51.4%)	15 (8.4%)	163 (91.6%)	0.807 ^a
Mutated	168 (48.6%)	12 (7.1%)	156 (92.9%)	
MMR	279	15 (5.4%)	264 (94.6%)	
MSS	270 (96.8%)	14 (5.2%)	256 (94.8%)	0.396 ^a
High MSI	9 (3.2%)	1 (11.1%)	8 (88.9%)	
Sites of metastasis at diagnosis	346	27 (7.8%)	319 (92.2%)	
Liver	153 (44.2%)	12 (7.8%)	141 (92.2%)	0.287 ^a
Peritoneum	74 (21.4%)	8 (10.8%)	66 (89.2%)	
Lung	59 (17.1%)	1 (1.7%)	58 (98.3%)	
Non regional lymph nodes	34 (9.8%)	3 (8.8%)	31 (91.2%)	
Bone	2 (0.6%)	0	2 (100%)	
Other	24 (6.9%)	3 (12.5%)	21 (87.5%)	

Data presented as n (%).

^achi-square test;

MMR: mismatch repair; MSS: microsatellite stability; MSI: microsatellite instability.

Table 3: Patient and tumor characteristics according to COX2 expression (positive or negative in mCRC)

Patient and tumor characteristics	Patients with analyzed COX2 expression	COX2 expression status		COX2 status comparison
		Negative COX2	Positive COX2	<i>P</i> value
Total number	332	22 (6.6%)	310 (93.4%)	
Median age at diagnosis of metastatic disease (95% CI)	59.5 (30 – 88)	58.6 (32 – 85)	59.5 (30 – 88)	
Male	177 (53.3%)	12 (6.8%)	165 (93.2%)	1.00 ^a
Female	155 (46.7%)	10 (6.5%)	145 (93.5%)	
CDX2 expression status	332	22 (6.6%)	310 (93.4%)	
CDX2-negative	26 (7.8%)	0 (0.0%)	26 (100%)	0.238 ^a
CDX2-positive	306 (92.2%)	22 (7.2%)	284 (92.8%)	
Histology	307	21 (6.8%)	286 (93.2%)	
Tumor grade 1	24 (7.8%)	2 (8.3%)	22 (91.7%)	0.042 ^a
Tumor grade 2	255 (83.1%)	14 (5.5%)	241 (94.5%)	
Tumor grade 3	28 (9.1%)	5 (17.9%)	23 (82.1%)	
Tumor sidedness	330	22 (6.7%)	308 (93.3%)	
Right sided	82 (24.8%)	4 (4.9%)	78 (95.1%)	0.622 ^a
Left sided / Rectum	248 (75.2%)	18 (7.3%)	230 (92.7%)	
Tumor genetics				
<i>BRAF</i>	176	5 (2.8%)	171 (97.2%)	
Wild-type	161 (91.5%)	5 (3.1%)	156 (96.9%)	1.0 ^a
p.V600E variant	15 (8.5%)	0 (0%)	15 (100%)	
<i>KRAS</i> or <i>NRAS</i>	332	22 (6.6%)	310 (93.4%)	
Wild-type	172 (51.8%)	8 (4.7%)	164 (95.3%)	0.201 ^a
Mutated	160 (48.2%)	14 (8.8%)	146 (91.2%)	
MMR	268	19 (7.1%)	249 (92.9%)	
MSS	259 (96.6%)	18 (6.9%)	241 (93.1%)	0.489 ^a
High MSI	9 (3.4%)	1 (11.1%)	8 (88.9%)	
Sites of metastasis at diagnosis	332	22 (6.6%)	310 (93.4%)	
Liver	146 (44%)	11 (7.5%)	135 (92.5%)	0.77 ^a
Peritoneum	72 (21.7%)	4 (5.6%)	68 (94.4%)	
Lung	56 (16.9%)	4 (7.2%)	52 (92.8%)	
Non regional lymph nodes	33 (9.9%)	3 (10.1%)	30 (90.9%)	
Bone	2 (0.6%)	0 (0.0%)	2 (100%)	
Other	23 (6.9%)	0 (0.0%)	23 (100%)	

Data presented as n (%).

^achi-square test;

MMR: mismatch repair; MSS: microsatellite stability; MSI: microsatellite instability.

Table 4: CDX2 - Cox regression analysis for overall survival (OS), both cohorts (n = 346 in multiple analysis)

Parameter	Univariate analyses		Multiple analyses	
	HR (95% CI)	P value	HR (95% CI)	P value
CDX2				
Positive	1 (reference)	0.010	1 (reference)	0.48
Negative	1.980 (1.178 – 3.327)		1.443 (0.525-3.967)	
BRAF				
Wild-type	1 (reference)	<0.001	1 (reference)	0.03
p.V600E	3.617 (1.807-7.242)		3.07 (1.125-8.377)	
Tumor sidedness				
Left/rectum	1 (reference)	0.011	1 (reference)	0.94
Right	1.588 (1.112 -2.268)		0.974 (0.49-1.937)	

Figure legends

Figure 1: Plot of the frequency of combined first-line chemotherapy of 331 mCRC patients.

Figure 2: Immunohistochemical staining images of caudal-type homeobox 2 (CDX2) and cyclooxygenase 2 (COX2) of mCRC tumor tissue microarray. (A) CDX2 staining was defined as CDX2-negative tumors in which the malignant epithelial component completely lack CDX2 expression (negative) or show a scattered, faint nuclear staining (weak, $\leq 10\%$) in a minority fraction of cancer cells. (B) COX2 staining intensity was negative (score 0), weak (1), moderate or strong (3). Scale bar: 100 μm . Original magnification $\times 100$.

Figure 3: Bubble plot distribution of the COX2 staining in 332 mCRC samples. COX2 final score was the sum of COX2 staining intensity and extent scores. The staining intensity score was defined as zero (negative), 1 (weak), 2 (moderate) or 3 (strong). The staining extent score was classified as zero (0%), 1 (1% - 25%), 2 (26% - 50%), 3 (51% - 75%) or 4 (76% - 100%).

Figure 4: Kaplan-Meier estimates for OS curves. (A) Inferior OS for CDX2-negative (N = 27, blue) and CDX2-positive (N = 319, red) patients. (B) Lower OS for CDX2-negative (N = 7, blue) compared to CDX2-positive (N = 157, red) patients without the *BRAF* p.V600E variant. (C) Similar OS between COX2-negative (N = 22, blue) and COX2-positive (N = 309, red). (D) Significant OS difference for mCRC patients - *BRAF* p.V600E variant (N = 15, red) and wild-type allele (N = 164, blue). Mantel-Cox log-rank test significant ($p < 0.05$) for (A), (B) and (D).

Figure 5: Kaplan-Meier estimates for PFS curves. (A) Significant difference for CDX2-negative (N = 23, blue) compared to CDX2-positive (N = 282, red) tumors (Mantel-Cox log-rank test significant ($p < 0.05$)). (B) Significant difference for right sided (N = 76, red) compared to left/rectal (N = 228, blue) tumors (Mantel-Cox log-rank test significant ($p < 0.002$)). (C) Significant difference for mCRC patients - *BRAF* p.V600E variant (N = 12, red) compared to wild-type allele (N = 148,

blue) (Mantel-Cox log-rank test significant ($p < 0.021$)). (D) No difference between COX2-negative (blue) and COX2-positive (red) patients.

Figures

Figure 1

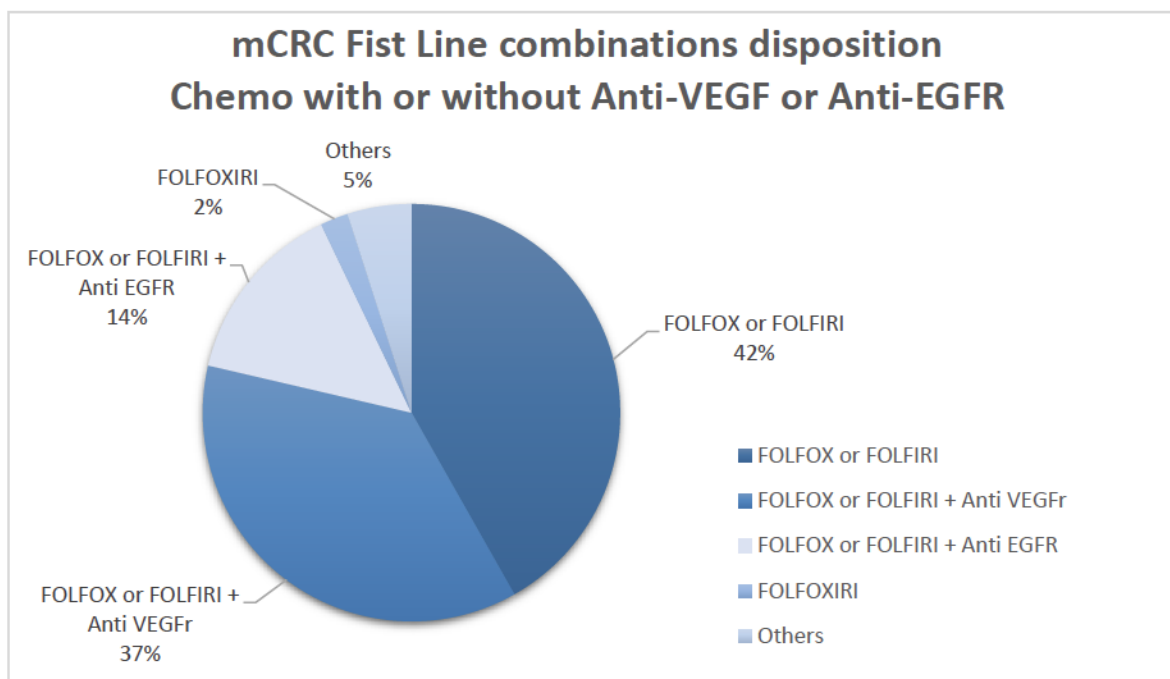


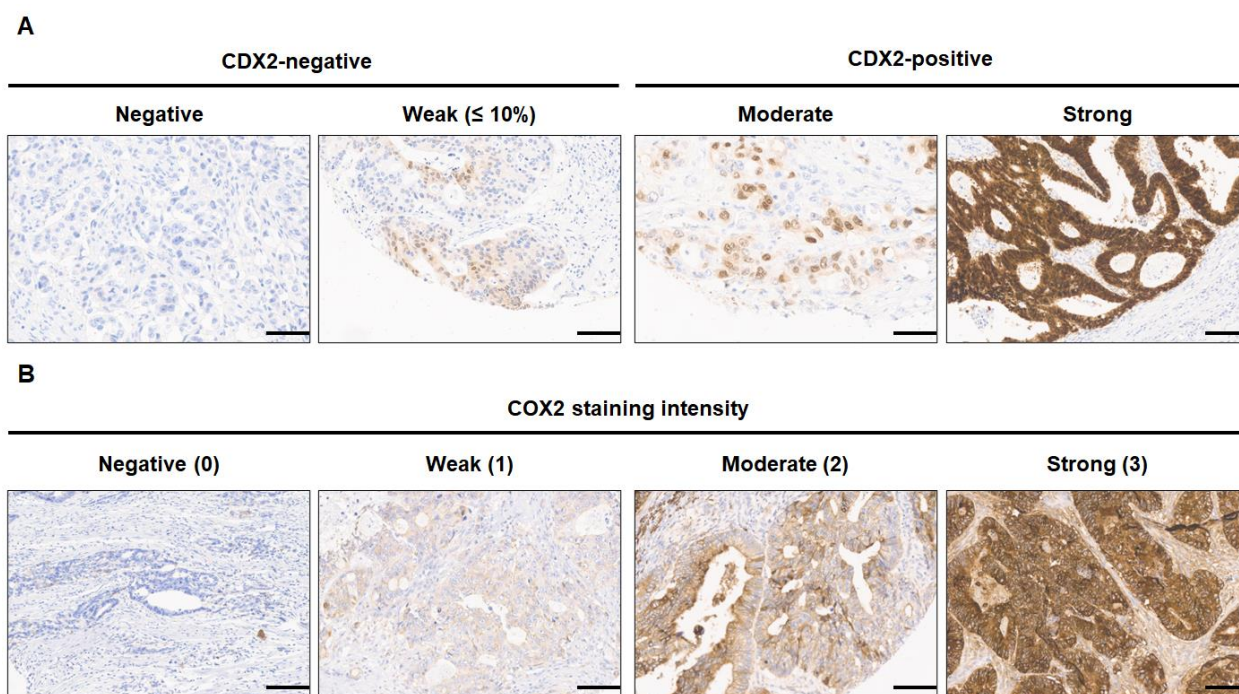
Figure 2

Figure 3

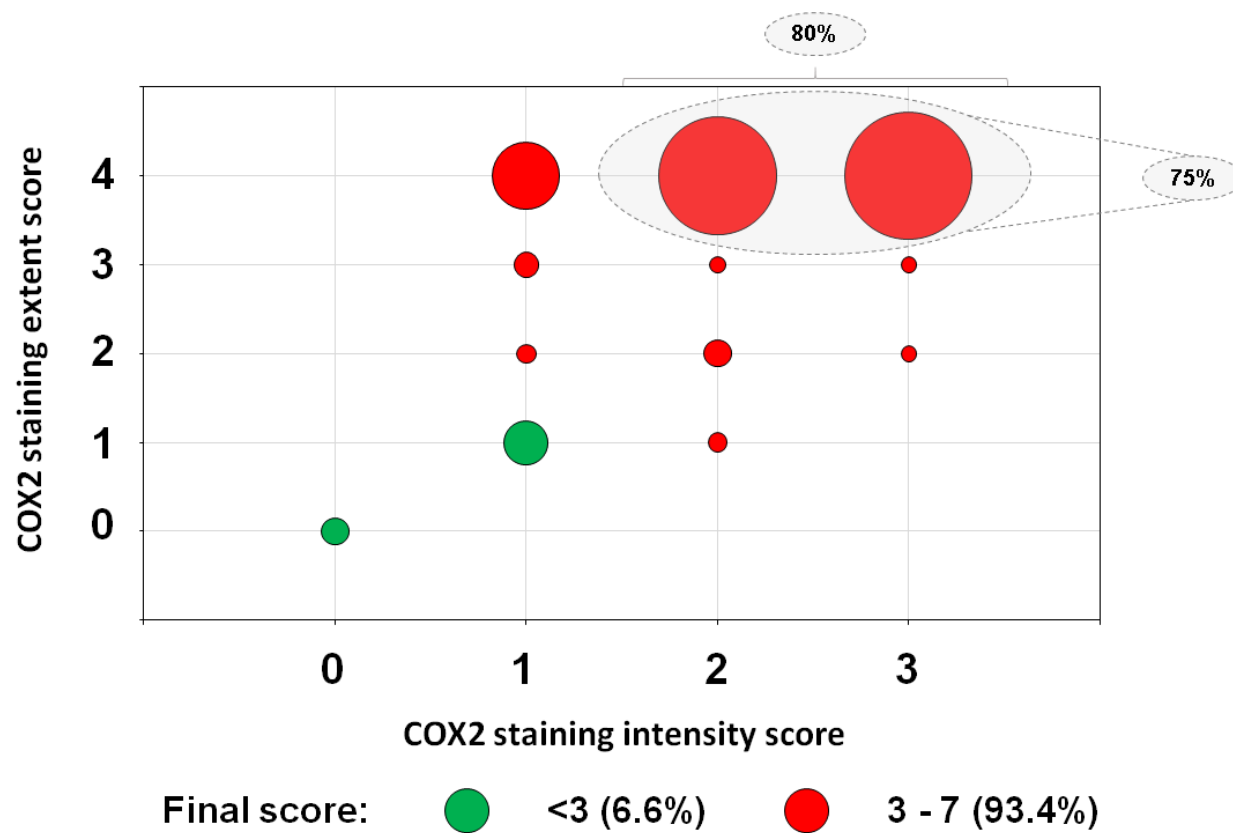


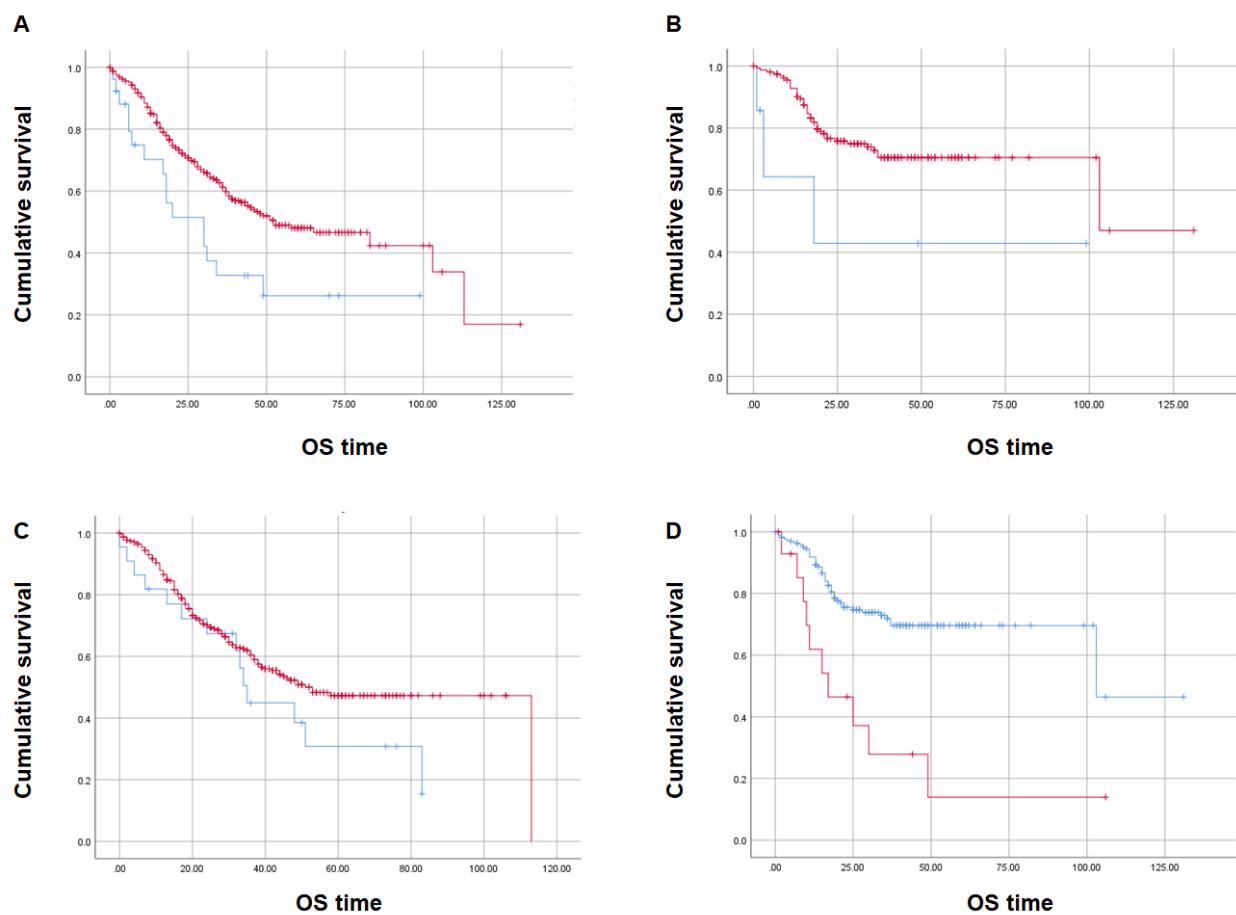
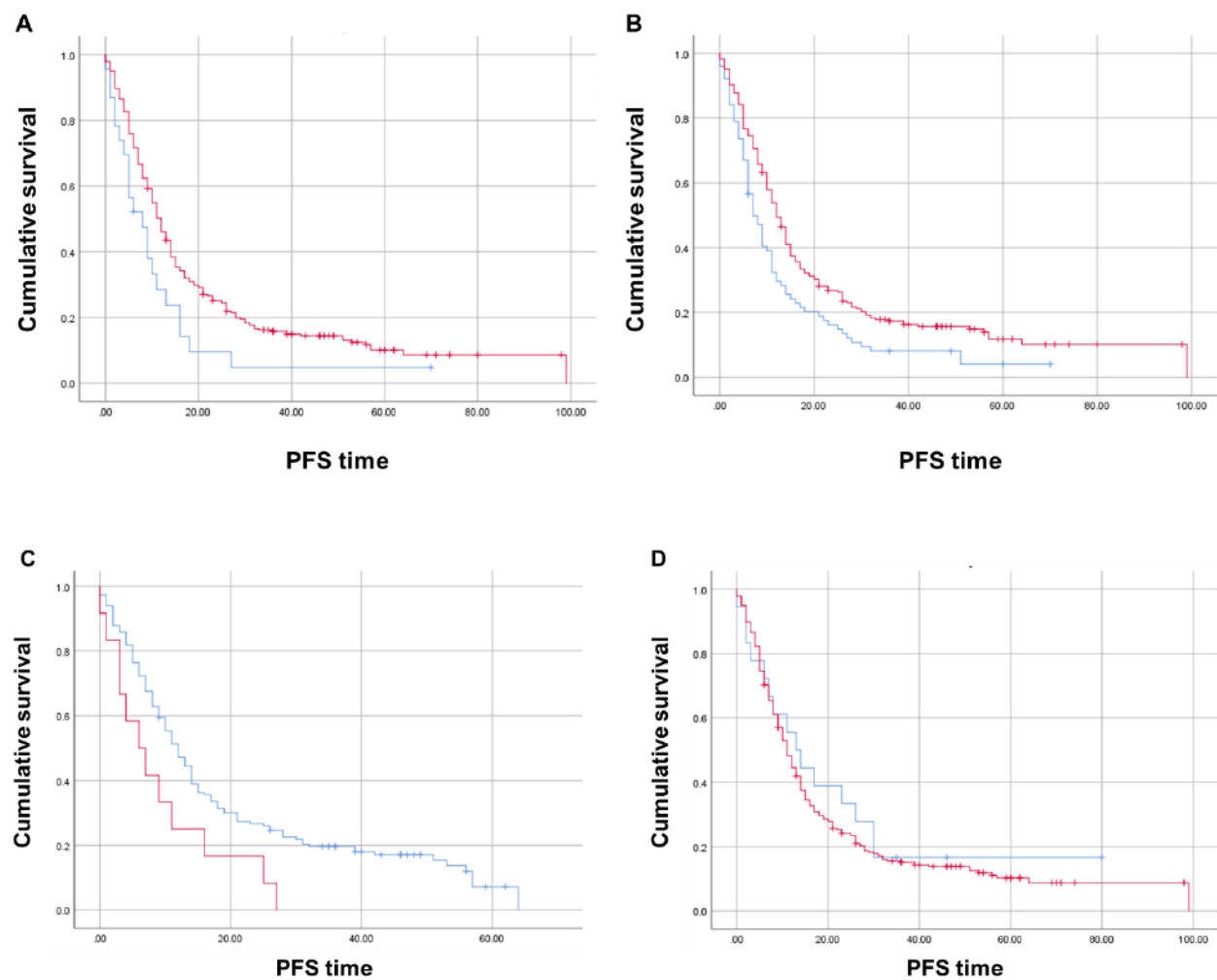
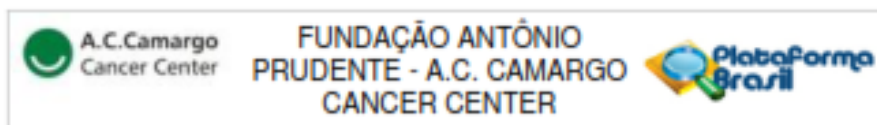
Figure 4

Figure 5



8. ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão de CDX2 como biomarcador prognóstico e preditivo de resposta terapêutica para câncer colorretal metastático (CCRM)

Pesquisador: Rachel Simões Pimenta Riechelmann

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 05432819.2.0000.5432

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE

Patrocinador Principal: AMGEN BIOTECNOLOGIA DO BRASIL LTDA.
FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE

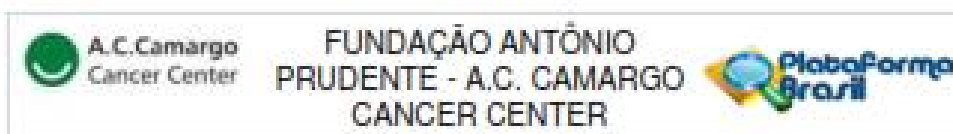
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.255.454

Apresentação do Projeto:

O câncer colorretal (CCR) é uma das principais causas de câncer no mundo. Desta forma, a identificação e compreensão de potenciais biomarcadores prognósticos de evolução da doença, bem como preditivos de resposta terapêutica, são de importância fundamental para uma abordagem individualizada do paciente e alcance de um sucesso terapêutico. Regimes de quimioterapia convencional de primeira linha combinada a agentes moleculares dirigidos a alvos específicos, como o receptor (R) para o fator de crescimento epidérmico (EGF) - anti-EGFR - para casos sem mutação nos genes KRAS e NRAS, podem alcançar taxas de resposta terapêutica acima de 50% em pacientes com CCR metastático (CCRM). Entretanto, após dois anos de tratamento, menos de 10% permanecem livres de doença. Desta forma, a identificação e compreensão de potenciais biomarcadores prognósticos de evolução da doença, bem como preditivos de resposta terapêutica são de importância fundamental para uma abordagem individualizada do paciente e alcance de um sucesso terapêutico. O CDX2 é um fator de transcrição com papéis fundamentais no desenvolvimento, diferenciação e manutenção do epitélio do cólon e parece desempenhar uma função na supressão tumoral, ao controlar a transcrição de um número de genes responsáveis pela proliferação, migração e carcinogênese no trato gastrointestinal. Recentemente, demonstrou-se uma correlação significativa entre a ausência da expressão de CDX2 e pior sobrevida livre de doença em CCR de estágio II. O objetivo geral deste projeto de pesquisa é investigar a expressão

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_hcancer@accamargo.org.br



Continuação do Protocolo: 3.220.454

do gene CDX2 em pacientes com CCRm e sua correlação com lateralidade de apresentação do tumor, mutações nos genes MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, KRAS, BRAF e NRAS e resistência a agentes anti-EGFR. Trata-se de um estudo observacional, coorte retrospectivo, de pacientes com neoplasia de cólon e estadiamento patológico IV, que foram tratados no serviço de Oncologia Clínica do A.C. Camargo Cancer Center, em um período de três anos (2015 a 2017).

Palavras chave: Câncer Colorretal Metastático, CDX2, Prognóstico, Preditivo, Mutação, Anti-EGFR.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral do presente estudo é investigar a expressão do gene CDX2 em pacientes com CCRm e sua associação com lateralidade de apresentação do tumor, proficiência das proteínas relacionadas aos genes de reparo (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2), mutações nos genes KRAS, BRAF e NRAS e resistência ao tratamento com agentes anti-EGFR.

Os objetivos específicos foram classificados em primários e secundários.

. **Objetivos específicos, primários:**

Avaliar a frequência e tipos de mutações somáticas nos genes MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, KRAS, BRAF e NRAS e expressão da proteína CDX2 em amostras CCRm, já obtidas de ressecção cirúrgica da neoplasia primária ou biópsia de metástase.

. **Objetivos específicos, secundários:**

Avaliar o prognóstico dos pacientes portadores desses tumores, classificando-se SG, TTP e taxas de respostas terapêuticas;

Correlacionar a presença ou ausência de expressão de CDX2 em CRCm (positiva/negativa) e a resposta à terapia anti-EGFR para pacientes com alelos do tipo selvagem para KRAS, BRAF e NRAS.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Estima-se que a proteína CDX2 não seja um fator prognóstico independente, mas associado a outras características de mau prognóstico, que possam influenciar a resposta a agentes anti-EGFR e ou identificar padrões de resistência ao mesmo. Caso seja comprovada essa hipótese, o presente estudo agregará um maior entendimento ao complexo cenário diagnóstico e terapêutico do CCRm com benefício direto a todos os pacientes.

Há risco de perda de confidencialidade, mas faremos o possível para que os dados coletados dos prontuários dos pacientes não permitam a identificação dos mesmos. O laboratório Amgen (apoiador financeiro do projeto) não terá acesso aos dados clínicos ou resultados individuais da

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_hcancer@accamargo.org.br



FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE - A.C. CAMARGO
CANCER CENTER



Continuação do Parecer: 3.235.434

expressão proteica de CDX2.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de resposta às pendência apontadas pelo CEP. Todos os questionamentos foram respondidos adequadamente. As sugestões feitas pelo COPE foram também acatadas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As correções e complementações foram feitas e reapresentadas na brochura do Projeto de pesquisa, no "Formulário para Submissão", no AC projects e na Plataforma Brasil.

Recomendações:

Não há outras recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há outras pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Nota: Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses a partir desta data em relatório (modelo CEP).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PE_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1276315.pdf	14/03/2019 22:36:17		Aceito
Outros	CartaRespostaaoCEP.pdf	01/03/2019 00:48:40	ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS	Aceito
Outros	FormularioRevisado.pdf	01/03/2019 00:46:21	ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS	Aceito
Cronograma	CronogramaRevisado4anos.pdf	01/03/2019 00:45:40	ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	28/01/2019 13:17:08	ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS	Aceito
Outros	curriculo.jpeg	28/01/2019 16:22:31	ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS	Aceito
Outros	ciencia_oncologia.jpeg	28/01/2019 16:22:03	ALVARO MANUEL DE CARVALHO	Aceito

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

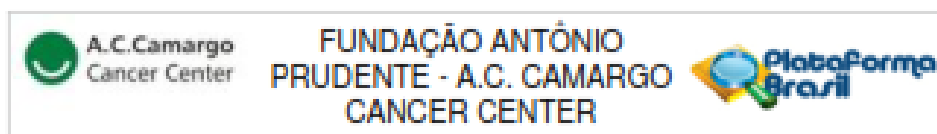
UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br

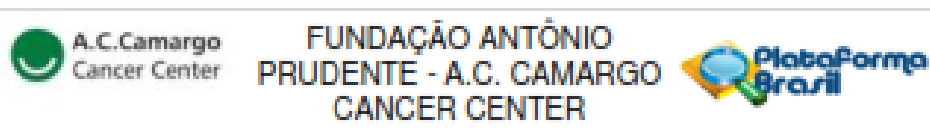


Continuação do Parecer: 3.255.454

Outros	ciencia_oncologia.jpeg	28/01/2019 16:22:03	CALDAS	Aceito
Outros	ciencia_anatomia.pdf	28/01/2019 16:21:46	ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS	Aceito
Outros	Orcamento_CDx2.pdf	28/01/2019 16:21:20	ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS	Aceito
Outros	dados_coletados.jpeg	28/01/2019 16:20:39	ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS	Aceito
Outros	termo_compromisso.jpeg	28/01/2019 16:20:11	ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS	Aceito
Outros	carta_2.jpeg	28/01/2019 16:19:05	ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS	Aceito
Outros	carta_1.jpeg	28/01/2019 16:18:48	ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS	Aceito
Outros	formulario.pdf	28/01/2019 16:09:53	ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biosseguro	Manuseio_MaterialBiológico_CDx2.pdf	28/01/2019 14:40:17	ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	INFRAESTRUTURA_CDx2.pdf	28/01/2019 14:19:51	ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS	Aceito
TCE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCE_CDx2.pdf	28/01/2019 14:18:47	ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS	Aceito
Cronograma	Cronograma_CDx2.jpeg	28/01/2019 14:02:58	ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS	Aceito
Brochura Pesquisa	Brochura_CDx2.doc	28/01/2019 14:00:04	ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS	Aceito
Folha de Rosto	FR_CDx2.pdf	28/01/2019 13:47:24	ALVARO MANUEL DE CARVALHO CALDAS	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
 Bairro: Liberdade CEP: 01.506-900
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)2189-5020 Fax: (11)2189-5020 E-mail: csp_hcancer@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 3.255.454

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 10 de Abril de 2019

Assinado por:
MICHELE CHRISTINE LANDEMBERGER
 (Coordenador(a))

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_hcancer@accamargo.org.br

APÊNDICE

Apêndice 1

Expressão do CDX2 vc outros biomarcadores

	Sample	CDX2	COX2	BRAF	KRAS	NRAS	MSI
3. 96 (RGH 11529620)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Negativo	1		Nao mutado (0)		
5. 108 (RGH 13660550)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Negativo	1		Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Não (0)
7. 111 (RGH 11633900)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Negativo	1		Mutado (1)	Nao mutado (0)	
41. 326 (RGH 15217120)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Negativo	1	Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Não (0)
51. 397 (RGH 14509820)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Negativo	1	Mutado V600E (1)	Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Não (0)
53. 426 (RGH 14531890)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Negativo	1	Mutado V600E (1)	Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Sim (1)
1. (RGH 15496530)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	1	Nao mutado (0)	Mutado (1)	Nao mutado (0)	Não (0)
9. 121 (RGH 12198930)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	1		Nao mutado (0)		
11. 135 (RGH 13194080)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	1		Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Não (0)
13. 154 (RGH 11433250)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	1		Mutado (1)	Nao mutado (0)	
15. 155 (RGH 13503620)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	1		Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	
17. 189 (RGH 14916440)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	1	Nao mutado (0)	Mutado (1)	Nao mutado (0)	Não (0)
19. 218 (RGH 13270150)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	Negativo		Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Não (0)
21. 225 (RGH 13547760)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	1		Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Não (0)
23. 226 (RGH 13797940)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	Negativo		Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	
25. 241 (RGH 13879660)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	1		Mutado (1)	Nao mutado (0)	Não (0)
27. 253 (RGH 8274030)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	Negativo		Mutado (1)	Nao mutado (0)	Não (0)
29. 265 (RGH 14214170)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo			Mutado (1)	Nao mutado (0)	Não (0)
31. 275 (RGH 14294100)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	Negativo		Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Não (0)
33. 278 (RGH 50025492)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	1	Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Não (0)
35. 281 (RGH 13660870)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	Negativo		Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	
37. 305 (RGH 3045978)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	1	Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Não (0)
39. 311 (RGH 14855270)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	1	Mutado V600E (1)	Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Não (0)
43. 353 (RGH 15417610)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	1	Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Não (0)
45. 383 (RGH 13895840)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	1		Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Não (0)
47. 385 (RGH 14486010)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	1	Mutado V600E (1)	Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Não (0)
49. 390 (RGH 14456100)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	1		Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Não (0)
55. 436 (RGH 14328900)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	1	Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Nao mutado (0)	Não (0)
57. 443 (RGH 14551420)	GH3 (pouco diferenciado) (3)	Positivo	1	Nao mutado (0)	N+F2:F30ao mutado (0)	Nao mutado (0)	
	Sample	CDX2	COX2	BRAF	KRAS	NRAS	MSI
	GH3 (pouco diferenciado) (3)	6	5	4	7	0	1
	GH3 (pouco diferenciado) (3)	23	23	8	22	27	20
	Ignorado	0	1	17	0	2	8

