

**IDENTIFICAÇÃO DE PERFIS IMUNO-
HISTOQUÍMICOS COMO PREDITORES DE
RESPOSTA COMPLETA À RADIOTERAPIA E
QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTES EM
ADENOCARCINOMAS
DE RETO**

PAULA MENDONÇA TAGLIETTI

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Samuel Aguiar Junior

**Co-Orientadora: Dra. Maria Dirlei Ferreira de
Souza Begnami**

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Taglietti, Paula Mendonça

Identificação de perfis imuno-histoquímicos como preditores de resposta completa à radioterapia e quimioterapia neoadjuvantes em adenocarcinomas de reto / Paula Mendonça Taglietti –São Paulo, 2013.

97p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Samuel Aguiar Junior

Descritores: 1. NEOPLASIAS RETAIS. 2. ADENOCARCINOMA
3. TERAPIA NEOADJUVANTE. 4. RADIOTERAPIA. 5.
QUIMIOTERAPIA. 6. IMUOISTOQUÍMICA.

“Eu não procuro saber as respostas,
procuro compreender as perguntas.”

Confúcio

DEDICATÓRIA

À Deus, que sempre esteve presente na minha vida e que me dá força diária para enfrentar todas as dificuldades.

A minha mãe e meu irmão que me ajudaram na formação do meu caráter e da minha personalidade.

Ao meu marido, Enzo Martins Taglietti, que me ajudou de forma compreensiva, me dando suporte emocional nas horas mais difíceis.

À Dra. Tereza Vilarino, que sempre foi uma pessoa importante me apoiando na realização de meus sonhos.

À Dra. Magaly Gemio Teixeira, a quem não posso deixar de agradecer, pois me deu todo o suporte médico nos momentos mais difíceis.

Ao Dr. Jorge Alberto Langbeck Ohana que foi como um pai para mim durante a faculdade, e me fez decidir pela coloproctologia.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Samuel Aguiar Junior, por ter me aceito como sua orientanda dentro dessa instituição de ensino e ter confiado em mim para realização dessa tese. Por sua dedicação para com os pacientes e com os seus orientandos.

À minha co-orientadora Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami por sua paciência e colaboração com a realização das imuno-histoquímica e por ter sido muito amiga, compreensiva e carinhosa em todos os momentos.

À Enfermeira Erika Santos, que me ajudou com a estatística dos meus dados, sendo extremamente importante para realização dessa tese.

Às secretárias da pós-graduação (Luciana, Ana) e especialmente a Vanusa, que me deu todas as informações necessárias para que eu pudesse me inscrever no mestrado, pois sem ela nada disso seria realidade nesse momento.

Ao arquivo da patologia, especialmente os funcionários, Willian e Fábio, que me ajudaram para realizar a identificação dos casos com separação de blocos de parafina e lâminas.

À equipe médica do Núcleo de Tumores Colorretais do A.C. Camargo Cancer Center, Prof. Dr. Ademar Lopes, Dr. Alexander Bressan, Dr. Celso Milani, Prof. Dr. Fábio de Oliveira Ferreira, Dr. Ranyell Spencer e Dr. Wilson Nakagawa.

À Biblioteca, onde passei bastante tempo durante a realização desse trabalho, tanto para coleta dos casos, como para realizar pesquisas bibliográficas. Onde fui muito bem acolhida por todos os funcionários.

Aos amigos que fiz especialmente, Carol, Mariana, Ana Paula, Guilherme, Tatiana, Samuel Spagnul e Celso. Obrigada a todos por terem me ajudado com os casos do trabalho ou pela paciência e carinho.

RESUMO

Taglietti MP. **Identificação de perfis Imuno-histoquímicos como preditores de resposta completa à radioterapia e quimioterapia neoadjuvantes em adenocarcinomas de reto.** São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

INTRODUÇÃO: A terapia neoadjuvante com radio e quimioterapia é atualmente aceita como o tratamento de escolha para pacientes com câncer retal em estádios II e III da doença. Vários marcadores moleculares têm sido testados como possíveis preditores de resposta ao tratamento neoadjuvante em carcinomas de reto. **OBJETIVOS:** Avaliar o papel das expressões Imuno-histoquímicas das proteínas dos genes de reparo do DNA (hMSH2, hMLH1, hMSH6 e hPMS2) e da Timidilato Sintetase como fatores preditivos de resposta patológica completa à radio e quimioterapia neoadjuvante em adenocarcinomas de reto. **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** Trata-se de um estudo observacional tipo caso controle, com coleta retrospectiva e prospectiva de dados, no período de 2007 a 2013, que avaliou 109 pacientes portadores de adenocarcinoma primário de reto, localizados até 8 cm da linha pectínea em estadio clínico T3 ou T4 ou N+. Os pacientes respondedores e não respondedores foram pareados por idade, sexo e distância em relação a linha pectínea. Foram avaliadas as biópsias dos tumores pré- tratamento neoadjuvante de 109 casos para verificar as expressões das proteínas dos genes de reparo do DNA (hMLH1, hMSH2, hPMS2 e hMSH6) e da Timidilato Sintetase através de exame de Imuno-histoquímica, conforme o protocolo do departamento de patologia do Hospital A.C Camargo. **RESULTADOS:** Dos 109 pacientes avaliados 57,8% eram do sexo masculino com média de idade de 60 anos, 56% dos tumores estavam localizados entre a borda anal e 4 cm da linha pectínea e 87,2% foram estadiados clinicamente como cT3; e N+ em 60% e M0 em 92,7%. Em relação à resposta patológica do tumor 20 indivíduos, ou seja 18,3% tiveram

resposta patológica completa após neoadjuvância. Ocorreu *downstaging* T em 63 casos (57,3%) e N em 53 (48,6%). A perda de expressão da timidilato ocorreu em 36 (33%) dos casos e das proteínas de reparo: 0,9% para MLH1, PMS2 e MSH6 e esteve presente em todos os casos de MSH2. **CONCLUSÃO:** A perda de expressão das proteínas de reparo apresentou associação significativa com a resposta patológica completa ($p=0,032$), no entanto a baixa frequência de defeito em sistema de reparo do DNA, determinado por imuno-histoquímica, limita o uso dessa ferramenta para predição de resposta ao tratamento neoadjuvante em carcinomas de reto. Além disso, a expressão imuno-histoquímica da Timidilato Sintetase não teve associação significativa com a resposta patológica completa ($p=0,599$).

SUMMARY

Taglietti MP. **[Identification of immunohistochemical profiles as predictors of complete response to neoadjuvant chemotherapy and radiotherapy in rectal adenocarcinomas]**. São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

INTRODUCTION: Neoadjuvant therapy with radiation and chemotherapy is now accepted as the treatment of choice for patients with rectal cancer stage II and III disease. Several molecular markers have been tested as possible predictors of pathological response. **OBJECTIVES:** To evaluate the role of immunohistochemical expression of DNA gene repair proteins (hMSH2, hMLH1, hPMS2 and hMSH6) and thymidylate synthase as predictors of complete response to neoadjuvant radiotherapy and chemotherapy in rectal adenocarcinomas. **CASUISTIC AND METHODS:** This was an observational case-control, with retrospective and prospective data, in the period of 2007-2013, we evaluated 109 patients with primary adenocarcinoma of the rectum, located at 8 cm of the dentate line; clinical stage T3 or T4 or N +. The patients responders and no responders were matched by age, sex and distance from the dentate line. Biopsies of the tumors (109 cases) were evaluated before neoadjuvant treatment for verifying the expression of DNA gene repair proteins (hMLH1, hMSH2, hMSH6 and hPMS2) and thymidylate synthase using immunohistochemistry examination, according to the protocol of the service of pathology at the Hospital AC Camargo. **RESULTS:** 109 patients were evaluated. 57.8% were male, mean age 60 years, 56% of tumors were located between the anal verge (BA) and 4 cm from the dentate line and 87.2% had clinical staging and CT3 N + 60 M0% and 92.7%. Regarding the pathological response of the tumors 18.3% had pathologic complete response after neoadjuvant therapy. Downstaging T happened in 63 cases (57.3%) and N in 53 (48.6%). Loss of expression of thymidylate occurred in 36 (33%) of cases, and DNA gene repair proteins: 0.9% hMLH1,

hMSH6 and hPMS2 and was present in all cases of hMSH2. **CONCLUSION:** Loss of expression of DNA gene repair proteins were significantly associated with complete pathological response ($p = 0.032$), however the low rate of defects in the DNA repair system, determined by immunohistochemistry, limits the use of this tool for prediction response to neoadjuvant treatment in rectal carcinomas. Furthermore, the immunohistochemical expression of thymidylate synthase had no significant association with pathological complete response ($p = 0.599$).

LISTA DE FIGURAS

Figuras 1a e 1b	Imuno-histoquímica para MSH6 em biópsia de adenocarcinoma.....	57
Figuras 2a e 2b	Imuno-histoquímica para MLH1 em biópsia de adenocarcinoma.....	57
Figura 3	Imuno-histoquímica para MSH2 em biópsia de adenocarcinoma.....	58
Figura 4	Imuno-histoquímica para PMS2 em biópsias de adenocarcinoma.....	58
Figuras 5a e 5b	Imuno-histoquímica para TS em biópsias de adenocarcinoma.....	59
Figuras 6a e 6b	Peça cirúrgica de paciente com adenocarcinoma de reto pós neoadjuvância, apresentando lesão ulcerada.....	59
Figuras 7a e 7b	Neoplasia de reto antes da neoadjuvância.....	60
Figuras 8a e 8b	Pós neoadjuvância com resposta completa.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição de pacientes conforme características sociodemográficas.....	34
Tabela 2	Estadiamento e avaliação clínica pré-neoadjuvância.....	35
Tabela 3	Vias de acesso e cirurgias realizadas.....	36
Tabela 4	Estadiamento pós-operatório.....	37
Tabela 5	Número de linfonodos dissecados e comprometidos.....	37
Tabela 6	Grau de diferenciação tumoral.....	37
Tabela 7	Classificação da resposta patológica à neoadjuvância (Dworak).....	38
Tabela 8	Imuno-histoquímica das biópsias pré neoadjuvância.....	39
Tabela 9	Associação entre a Classificação de resposta patológica de Dworak versus gênero.....	41
Tabela 10	Resposta Patológica (sem lesão / com lesão) versus gênero.....	42
Tabela 11	Associação entre idade e classificação de resposta patológica de Dworak.....	43
Tabela 12	Associação entre resposta patológica sem lesão/ com lesão versus idade acima ou abaixo de 50 anos.....	44

Tabela 13	Classificação de Dworak da resposta patológica versus distância da linha pectínea.....	45
Tabela 14	Distância da linha pectínea versus resposta patológica sem lesão/ com lesão.....	46
Tabela 15	Associação do CEA (antígeno carcinoembriônico) versus resposta patológica sem lesão / com lesão.....	47
Tabela 16	Invasão linfática versus resposta patológica sem lesão/ com lesão.....	48
Tabela 17	Estadiamento clínico agrupado cT1 e cT2/ cT3 e cT4 versus resposta patológica sem lesão / com lesão.....	49
Tabela 18	Estadiamento clínico N versus resposta patológica sem lesão/ com lesão.....	50
Tabela 19	Estadiamento clínico M versus resposta patológica (sem lesão/ com lesão).....	51
Tabela 20	Resposta clínica completa (endoscópica) e doença clínica residual versus resposta sem lesão / com lesão.....	52
Tabela 21	Estadiamento pós operatório N versus resposta patológica (sem lesão/ com lesão).....	53
Tabela 22	Expressão normal ou perda de expressão das proteínas de reparo do DNA versus resposta patológica sem lesão / com lesão.....	54
Tabela 23	Imuno TS versus classificação de resposta patológica de Dworak.....	55

Tabela 24	Imuno TS versus resposta patológica (sem lesão/ com lesão).....	56
------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

5-FU	5 fluourouracil
ACS	American Cancer Society
AINE	Anti-inflamatórias Não Esteróides
APR	amputação abdominoperineal do reto
CCR	Câncer colorretal
CEA	antígeno Carcinoembriogênico
COX	Ciclooxigenase
CRM	Margem Circunferencial
DAB	Diaminobenzidine
dTMP	Deoxitimidina Monofosfato
dUMP	Deoxiuridina Monofosfato
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
ETM	excisão total do mesorreto
EUA	Estados Unidos da América
Gy	Gray
HNPCC	Carcinoma Colorretal não polipóide hereditário
INCA	Instituto Nacional do Câncer do Brasil
LV	leucovorin
MSI	Instabilidade de Microsatélites
MSI-H	Alta frequência de Instabilidade de Microsatélites
N	Linfonodos
PBS	Phosphate- Buffered Saline
PCR	resposta patológica completa
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T	Tumor
TCLE	Termo de Consentimento Esclarecido
TEM	microcirurgia endoscópica transanal
TRG	Tumor Regression Grade

TS	Timidilato Sintetase
TSER	Timidilato Sintetase enhancer region
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
WRCF	World Cancer Research Found

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Classificação - TNM	17
1.2	Marcadores moleculares	18
2	OBJETIVO	25
2.1	Objetivo primário	25
2.2	Objetivo secundário.....	25
3	METODOLOGIA	27
3.1	Tipo de estudo.....	27
3.2	Origem dos pacientes e amostras	27
3.3	Crterios de incluso	27
3.4	Crterios de exclusão	28
3.5	Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).....	28
3.6	Diagnóstico, avaliação inicial e estadiamento	29
3.7	Coleta do material	29
3.7.1	Imuno-histoquímica	29
3.8	Análise estatística.....	31
3.9	Padronização do tratamento.....	31
3.10	Determinação da resposta patológica dos tumores.....	33
4	RESULTADOS.....	34
4.1	Análises das associações.....	40
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÃO	81
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

ANEXOS

Anexo 1 Escala de Resultados ou desempenho de Karnofsky-critérios (%)

Anexo 2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo 3 Termo de dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo 4 Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

Anexo 5 Questionário de Avaliação dos casos

Anexo 6 Protocolo do Serviço de Anatomia Patológica para reto após tratamento neoadjuvante.

1 INTRODUÇÃO

A Sociedade Americana de Câncer estima 102.480 casos de câncer colorretal (CCR), sendo destes 40.340 casos de câncer retal para o ano de 2013 e cerca de 50.830 mortes por CCR, correspondendo a 9% de todas as causas de morte nos Estados Unidos da América (EUA) (American Cancer Society-ACS 2012).

Excluindo os casos de câncer de pele, o CCR é o terceiro tumor mais frequentemente encontrado em homens e mulheres nos EUA, sendo o risco de desenvolver um CCR durante a vida variando de 1 a 20 (5,1%) (ACS 2012).

A incidência do CCR está aumentando em países onde o risco era considerado baixo, como o Japão e outros países asiáticos. Em países sabidamente com alto risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer a incidência apresenta uma estabilidade ou até mesmo um declínio, como é o caso dos países da Europa Ocidental, Norte Europeu, América do Norte, além da Austrália. O declínio ocorreu graças ao rastreamento para CCR, pois permite que pólipos sejam removidos precocemente, antes de se transformarem em câncer (ACS 2012).

Este declínio vem ocorrendo também nos EUA principalmente nas últimas duas décadas. De 2005 a 2009, a incidência diminuiu 4,1% ao ano em adultos com 50 anos ou mais e aumentou cerca de 1,1% ao ano entre os indivíduos com idade inferior a 50 anos. Já a taxa de mortalidade nesse

mesmo período diminuiu cerca de 2,4% ao ano em homens e 3,1% por ano em mulheres (ACS 2012).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para o ano de 2012 14.180 casos novos de câncer de cólon e reto em homens e 15.960 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 15 casos novos a cada 100 mil homens e 16 a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2011).

Um dos fatores de risco para o desenvolvimento do CCR é a história familiar de tumor de cólon e reto e a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino (como as poliposes adenomatosas), além de uma dieta com base em gorduras animais, baixa ingestão de frutas, vegetais e cereais, consumo excessivo de álcool e tabagismo. A idade também é considerada um fator de risco, uma vez que, tanto a incidência como a mortalidade, aumentam com o avançar da idade. Por outro lado, a prática de atividade física regular está associada a um baixo risco de desenvolvimento do câncer de cólon e reto (Ministério da Saúde 2011).

O índice de massa corpórea também está associado a um modesto aumento no risco para desenvolver CCR. *The World Cancer Research Found* (WRCF) relatou em 2007, que existe uma grande evidência entre obesidade e o desenvolvimento de CCR. Este estudo também sugeriu que a associação entre índice de massa corpórea poderá ser diferente entre o câncer de cólon, reto, e entre os gêneros (HARRISS et al. 2009).

Duas a três décadas atrás, o tratamento inicial do câncer do reto incluía o procedimento cirúrgico com 80% dos casos submetidos à amputação abdominoperineal com colostomia definitiva. Em alguns casos, se adicionava a radioterapia convencional que resultavam em extensas lesões de superfície cutânea e pouco efeito sobre a lesão. Já a quimioterapia era realizada com o uso somente apenas de o 5-fluorouracil, o qual quando utilizado no tratamento adjuvante provocava maior toxicidade devido à maior dose necessária (PINHO 2007).

Nos anos seguintes, o desenvolvimento de métodos de imagem como a ultra-sonografia endorretal e a ressonância magnética, além do aprimorarem as técnicas de radio e quimioterapia, levaram a uma progressiva melhora dos resultados (PINHO 2007).

Atualmente vários exames de imagem vêm sendo realizados, no sentido de avaliar a relação do tumor com a margem circunferencial, que é um fator importante para decidir a necessidade de tratamento neoadjuvante e determinar o prognóstico. Entre eles o ultrassom endorretal, a ressonância nuclear magnética (RNM), a tomografia computadorizada (TC) e a Tomografia por emissão de pósitron (PET/CT) (SAMME e SELVASEKAR 2011).

O tratamento do câncer de reto distal é multidisciplinar: incluindo a radioterapia, quimioterapia e cirurgia. Houve uma grande melhora no treinamento de procedimentos cirúrgicos e maior atenção às técnicas cirúrgicas nas últimas três décadas.

A excisão total do mesorreto (ETM) foi o princípio cirúrgico mais importante, introduzido por Heald et al. 1982, citado por HEALD e RYALL (1986, p.1480), pois o mesorreto poderá abrigar depósitos tumorais acima de 4 cm caudal do nível inferior do tumor. A ETM consiste na dissecação entre os planos visceral e parietal da fáscia endopélvica, confirmando a remoção dos linfonodos locorreionais contidos dentro do mesorreto, enquanto preserva os nervos autonômicos e controla a perda sanguínea. Vários estudos retrospectivos e de *coortes* têm mostrado que a ETM está associada à diminuição na frequência de recidiva local, como foi evidenciado no estudo de *Dutch TME Trial* (KAPITEIJN et al 2001)

A terapia neoadjuvante com radio e quimioterapia é atualmente aceita como o tratamento de escolha para pacientes com câncer retal em estadios II e III da doença (tumor invadindo outros órgãos ou estruturas (T4), e/ ou tumores com metástases para linfonodos regionais (PINHO 2007).

A radioterapia pré-operatória apresenta vários benefícios potenciais em relação à pós-operatória. Primeiro, o fato de que irá atuar em tecidos bem oxigenados, não submetidos a procedimentos cirúrgicos prévios. Segundo, o efeito de regressão tumoral e *downstaging*, diminuindo a frequência de cirurgias radicais. Terceiro, menor risco de dano ao intestino delgado, que poderá ser excluído mais facilmente do campo da radioterapia. Quarto, tecidos da área de anastomose estarão fora do campo da radioterapia, com menor risco de fístulas (RULE e MEYER 2012).

A superioridade da radio e quimioterapia pré-operatória foi demonstrada através do *German Rectal Cancer Trial* (CAO/ARO/AIO 94

trial), mostrando que a abordagem pré-operatória resultou em melhora do controle local, menor toxicidade, mas sem diferenças significativas nas taxas de sobrevida geral (Sauer et al, 2004 e Roedel et al 2011). A incidência de resposta completa varia de 10 a 30% e tem sido associada com uma diminuição da recorrência local, melhora da sobrevida livre de doença e aumento na preservação esfinteriana (KALADY et al 2009).

Nessa instituição foi realizado um estudo com 52 pacientes com câncer de reto médio e inferior submetidos a radio e quimioterapia neoadjuvantes, onde foi observado resposta patológica completa em 10 casos (19,2%). E entre esses 10 pacientes, 8 apresentaram recorrência local dentro de 3.7 a 8.8 meses, considerando um tempo de seguimento de 32.1 meses (NAKAGAWA et al. 2002).

Já no estudo de HABR-GAMA et al. (2004) com 265 pacientes portadores de adenocarcinomas de reto a sobrevida global e livre de doença em 10 anos foi de 97,7% e 84% respectivamente. 71 pacientes (26,8%) apresentaram resposta patológica completa após esquema de radio/quimioterapia neoadjuvante e, 2 (2,8%) pacientes do grupo em seguimento desenvolveram recorrência endoluminal após 56 e 64 meses após término da neoadjuvância. O mesmo grupo publicou posteriormente uma análise com tempo maior de seguimento e que ainda evidenciava uma taxa de resposta patológica de 27,5% sendo 5% de recidiva local e 6% de recorrência a distância no grupo observacional (HABR-GAMA 2006).

Alguns estudos têm avaliado fatores moleculares associados com a resposta à terapia neoadjuvante (radio e quimioterapia). DAS et al. (2007),

demonstraram em um grande estudo, que incluía 562 pacientes, que 108 (19%) apresentaram resposta completa. Nestes pacientes a distância tumoral menor que 5 cm da margem anal e a extensão circunferencial do tumor foram fatores significativamente associados com a ausência de resposta patológica completa.

Outros estudos examinaram o intervalo de tempo entre a terapia neoadjuvante e o tempo para a realização do procedimento cirúrgico. TULCHINSKY et al. (2008) mostraram que o intervalo 8 a 24 semanas estava associado com o aumento das taxas de resposta patológica completa. No entanto, STEIN et al. (2003) não observaram significante melhora entre pacientes operados com 4 a 8 semanas da aqueles com intervalo de 10 a 14 semanas. Acredita-se que um intervalo maior entre a terapia neoadjuvante e a realização do procedimento cirúrgico poderia resultar em maior número de respondedores completos, mas nem todos irão responder (KALADY et al. 2009).

As diferenças observadas na resposta patológica tumoral das terapias utilizadas podem não depender somente das próprias células cancerosas, mas também do microambiente tumoral. Os efeitos da radiação dependem da oxigenação adequada do tecido, liberação de agentes quimioterápicos através de um suprimento sanguíneo suficiente. É possível que a porção do tumor localizada próximo à submucosa, que é a camada mais vascularizada do trato gastrointestinal, responda melhor à que as outras partes do tumor localizadas próximo a tecidos menos vascularizados (DULDULAO et al. 2013).

O mesmos dados foram observados no estudo de JEONG et al. (2013), realizado com 153 pacientes que mostrou que o maior intervalo entre a neoadjuvância e a cirurgia foi associado com melhor resposta clínica tumoral, *downstaging* patológico e uma tendência não significativa de aumento da preservação esfinteriana. Contudo, muitos cirurgiões têm hesitado no tempo de demora da cirurgia além de 6 a 8 semanas, preocupados com o fato de que a fibrose pélvica induzida pela radiação poderá aumentar as dificuldades técnicas da cirurgia e os riscos de complicações cirúrgicas e recorrência locorregional. Outro achado nesse estudo foi que pacientes operados após um intervalo igual ou superior a 8 semanas tiveram *downstaging* linfonodal (N) significativamente maior do que aqueles operados há menos de 8 semanas, após radio e quimioterapia (46,7% vs 66,7%; $p=0,021$) (JEONG et al. 2013).

Análises univariadas mostraram que tumores grandes, estadio T4, com elevação dos marcadores tumorais, pouca diferenciação histológica, radioterapia isolada e tumores mucinosos são fatores indicadores de pobre resposta e regressão tumorais (QIU et al. 2011).

Foram realizados também estudos com esquemas de radioterapia de curso curto, que evidenciaram diferenças significantes em relação à regressão tumoral patológica e menores taxas de resposta patológica completa menor, quando comparados aos cursos longo. Porém, estudos mais recentes demonstraram que há um aumento nas taxas de resposta após sete semanas do término da radioterapia de curso curto com esterilização por volta de 12 semanas (HABR-GAMA et al. 2011).

Continuando a busca por regimes de radio e quimioterapia, que aumentam as taxas de resposta patológica completa, foram realizados estudos com agentes radiosensíveis e associações de quimioterápicos, além de esquemas diferentes de radioterapia.

O *Trial EORTC-22921* verificou a eficácia de acrescentar quimioterapia a radioterapia, com ou sem quimioterapia adjuvante. A adição da quimioterapia no mesmo momento do regime de tratamento, tanto pré-operatório ou pós-operatório, conferiu um benefício significativo em termos de controles locais. A radioterapia é fundamental para tratamento do câncer de reto, resultando em uma maior frequência de resposta patológica e melhor controle local. Contudo, não tem efeito nas metástases à distância. Estes achados implicam que o 5-FU age como um potente sensibilizador da radiação, mas não tem impacto significativo na erradicação de micrometástases (Bosset et al, 2006).

A capecitabina é uma pró-droga, que é convertida em 5-FU através da ação da timidine fosforilase. A demonstração definitiva da eficácia da capecitabina/radioterapia é similar ao 5-FU/radioterapia e tem sido provado através do NSABP-R-04 e *Margit German Trial* (ROH et al. 2011; HORISBERG et al. 2009).

A adição de uma segunda droga ao regime de 5-FU poderia melhorar as frequências das taxas de respostas patológicas completas. Esta observação levou ao ímpeto para estudar regimes de radio/quimioterapia, usando drogas adicionais ao 5-FU.

O estudo randomizado fase III, ACCORD 12/0405-Prodige 2, combinou oxaliplatina e fluouropirimidina concomitantemente a radioterapia. O estudo comparou radio/quimioterapia usando capecitabina + 45 Gy radioterapia/capecitabina + oxaliplatina (CAPEOX) + 50 Gy radioterapia. Foi evidenciado de forma surpreendente que a oxaliplatina utilizada como agente radiosensível, não apresentou um aumento significativo na resposta patológica completa e que por outro lado, levou a um aumento na toxicidade (GERARD et al. 2010).

The Italian Star Trial (Studio terapia adjuvante reto)-mostrou que adição de oxaliplatina ao esquema padrão de 5-FU significativamente aumentou a toxicidade, sem afetar a resposta tumoral local (ASCHELE et al. 2011).

Existem vários estudos fase I que combinaram a administração semanal de irinotecano e capecitabina com a radioterapia. Resultados da eficácia de estudos fase I/II sugerem que a combinação é ativa com ressecção R0, com uma frequência de 96-100% e pCR de 14-15%, similar aos resultados obtidos com oxaliplatina e também com a capecitabina isolada ou em combinação com a radioterapia. As principais toxicidades foram: diarreia (11- 32%) e leucopenia (25%) (FERNÁNDEZ-MARTOS et al. 2012).

Um estudo fase III – *Advanced Rectal Study with Standard Therapy or a Novel Agent* (ARISTOLE), total mesorectal excision and long term evaluation) – está sendo realizado para comparar radio/quimioterapia com

capecitabina versus tratamento novo com irinotecano + capecitabina (FERNÁNDEZ-MARTOS et al. 2012).

O resultado da adição do cetuximabe ao regime radio/quimioterapia baseado no 5-FU, são ainda mais desapontadores. As análises de estudos anteriores indicaram uma frequência de pCR de menos de 10% para terapia combinada comparado com 15 a 30% para regimes isolados com 5-FU (KOSINSKI et al. 2012).

Mais recentemente, WEISS et al. (2010) tentou utilizar a associação de 5-FU, oxaliplatina e cetuximab para aumentar a resposta, no entanto, foi observado que de forma contrária ao esperado, houve uma diminuição da resposta e um aumento na progressão tumoral. Isso pode ser decorrente de uma interação subaditiva entre as três drogas como refletido pela diminuição da pCR (9 vs 16%) (HABR-GAMA et al. 2011).

Como tratamento pré-operatório no câncer de reto, o uso de Bevacizumab tem sido investigado em uma grande quantidade de “trials” e parece ser seguro e factível com efeitos benéficos na normalização vascular, com respostas promissoras em pequenos estudos, como no estudo de VELENIK et al. 2011) que relatou a eficácia da adição do bevacizumab a radio + capecitabina em 61 pacientes com câncer retal. Nesta investigação 13,3% dos casos alcançaram uma pCR, e T, N e regressão geral foi de 46,7; 65% e 75% dos casos, respectivamente. KENNECKE et al. (2012) relatou uma pCR similar de 18,4% após tratamento triplo com bevacizumab, capecitabina, oxaliplatina e radioterapia (DELLAS et al. 2013).

Uma estratégia de tratamento neoadjuvante usando FOLFOX (leucovorin, 5-FU e oxaliplatina) e bevacizumabe sem associação com esquema de radioterapia tem sido relatada recentemente. Resultados preliminares mostraram pCR de 27%, o que é comparável com os regimes de radio/quimioterapia padrão (KOSINSKI et al. 2012).

HABR-GAMA et al. (2011) vem conduzindo um estudo usando ciclos de quimioterapia adicionais, não apenas durante o curso da radioterapia, mas também durante o intervalo entre o término da radioterapia e o procedimento cirúrgico. Os pacientes são tratados com bolus de 5- FU e leucovorim em ciclos de 3 dias a cada 21 dias, num total de 6 ciclos durante um período de 15 semanas (6 de radioquimioterapia e 9 semanas entre o término da terapia neoadjuvante e a cirurgia. Nesse estudo os resultados preliminares com um número limitado de pacientes resultou em uma taxa de resposta patológica completa de mais de 60%.

MOHIUDDIN et al. (2009) relataram o fato de um problema histórico de alta recorrência local (pélvica) pós cirúrgica (20 – 30%) não é mais a causa da pobre sobrevida nesses pacientes, pois a frequência de recorrência local pós terapia neoadjuvante (radio e quimioterapia) seguida da cirurgia são menores que 10%, especialmente após a utilização da técnica de excisão total do mesoreto (TME). Contudo, o problema permanece nos altos índices de metástases a distância (30- 35%) nessa doença. Além disso, relata que a sobrevida geral permanece inalterada.

A resposta de um adenocarcinoma de reto a radio e quimioterapia está limitada a um definido grupo de pacientes, para os demais estaria

apenas prolongando um tratamento cirúrgico definitivo até o término da terapia neoadjuvante com mínimos benefícios.

Quando optado por realizar o procedimento cirúrgico, a ressecção anterior com anastomose primária é realizada como procedimento padrão nos casos de câncer de reto. No entanto, apresenta um risco significativo de morbidade pós-operatória, como: fístulas anastomóticas, incontinência fecal, tenesmo e *soiling*, impacto ao longo do tempo nas funções anorretal, urinária e sexual. Pode ocorrer também uma mortalidade de 2 a 8%, podendo chegar a 30% em 6 meses nos indivíduos com idade superior a 85 anos. Já para alguns pacientes com câncer de reto distal é impossível preservar o esfíncter e a amputação abdominoperineal (APR) com colostomia definitiva será realizada (BÖKKERINK et al. 2011; GLYNNE-JONES e HUGHES 2012).

O *Dutch Rectal Cancer Trial* também demonstrou que comparado a ressecção anterior, a amputação abdominoperineal resultou num aumento significativo para o risco de envolvimento da margem circunferencial (CRM) de 26,5% versus 12,6% ($P < 0,001$); frequências altas de perfuração tumoral e pior sobrevida (KAPITEIJN et al 2001).

Em paralelo, foi observado que a margem de ressecção distal poderá ser reduzida para 10mm, através da combinação de novas estratégias cirúrgicas, tais como ressecção interesfinctérica e anastomose coloanal, que tem levado a um aumento significativo nos procedimentos de preservação esfinteriana (CEELEN 2012).

Portanto, a realização da microcirurgia transanal endoscópica (TEM) com excisão local após terapia neoadjuvante, pode representar uma opção

terapêutica para os casos que necessitam de ressecções radicais com suas altas morbidades, ou no caso de pacientes que se neguem a realização de uma colostomia definitiva (ARAUJO et al. 2011).

Contudo, a excisão local pode levar a um aumento na recorrência local e comprometer a sobrevida do paciente, quando comparado com a cirurgia radical, exceto para os tumores T1, que apresentam um baixo risco. Pois nestes casos a presença de metástases nos linfonodos varia de 6 a 14%, enquanto nos T2 é de 17 a 23% e nos T3 de 49 a 66% (BÖKKERINK et al. 2011). Outra desvantagem do TEM é que também apresenta uma morbidade pós-operatória significativa e uma readmissão de aproximadamente 30%, geralmente devido a dor retal secundária a deiscência da ferida.

A estratégia não cirúrgica adotada em pacientes que alcançaram regressão tumoral completa pós tratamento neoadjuvante, evita o risco da morbi-mortalidade cirúrgica e as sequelas de uma ressecção abdominoperineal. Porém, devido a falta de clareza, essa conduta poderá falhar em 15% dos pacientes no primeiro ano de seguimento e gerar a incerteza de eficácia à longo prazo, principalmente para os estadios clínicos T3-T4 (GLYNNE-JONES e HUGHES 2012).

Os defensores desta conduta relatam que os pacientes, cujo câncer já tenha apresentado regressão clínica completa, poderão se beneficiar de não serem submetidos a uma cirurgia radical. E que a radioterapia sozinha poderá alcançar a longo prazo o controle do câncer de reto, mas isso tem

sido usado apenas para pacientes altamente selecionados com CCR pequenos e em estádios iniciais (GLYNNE-JONES e HUGHES 2012).

Pacientes considerados respondedores completos durante o exame de proctoscopia e biópsias, não serão imediatamente operados, sendo encaminhados para visitas mensais com a realização de exames físicos, toque retal, proctoscopia, biópsias e dosagem do nível sérico do antígeno carcinoembriogênico (CEA). TC de abdome e pelve e raio X de tórax devem ser realizados a cada 6 meses durante o primeiro ano de seguimento. Pacientes com regressão completa sustentada por pelo menos 12 meses são considerados estadio 0. Durante o segundo e terceiro anos após tratamento, os pacientes são recomendados a seguir acompanhamentos clínicos a cada 2 meses e 6 meses, respectivamente (HABR-GAMA et al. 2004).

O mais difícil é definir a resposta como uma resposta patológica completa, pois existe uma falta de consenso em como classificar histologicamente os graus de regressão (MACGREGOR et al. 2012).

As classificações de regressão tumoral patológica pós tratamento neoadjuvante podem guiar decisões clínicas, estratégias cirúrgicas, terapias neoadjuvantes e taxas de sobrevida a longo prazo.

MANDARD et al. em 1994, propôs usar uma medida na classificação dos espécimes de carcinoma de células escamosas de esôfago após radio/quimioterapia neoadjuvantes. O *Tumor regression grade* (TRG) foi utilizado como uma medida de resposta tumoral patológica ao tratamento neoadjuvante. Classificado em 5 categorias: TRG1-regressão completa a

TRG5-sem regressão, baseados na presença de células cancerosas residuais e o grau de fibrose.

DWORAK et al. (1997) definiram um sistema de graduação da resposta tumoral patológica após terapia neoadjuvante. A regressão tumoral foi graduada de 0 a 4, sendo GR 0 sem regressão e GR 4 regressão tumoral completa.

DWORAK et al. (1997) observaram que dependendo do volume da massa tumoral residual e da extensão macroscópica, seriam necessários de 4 a 33 blocos de parafina representativos do tumor para encontrar células tumorais viáveis e realizar um estadiamento histopatológico adequado.

Em seguida foi desenvolvido um sistema de classificação-*Rectal Regression Grade* (RCRG) (WELLER et al 2002) que simplificou a graduação em 3 níveis:

- RCRG1- o tumor é ausente ou apenas focos microscópicos tumorais persistem;
- RCRG2- fibrose marcante, mas com tumor macroscópico ainda presente;
- RCRG3- pequena quantidade ou ausência de fibrose na presença de abundante tumor macroscópico.

O RCRG1 e 2 foram considerados como representantes da regressão tumoral

A classificação mais recente publicada, foi a do *Royal College of Pathologists*, que categorizou os tumores de acordo com a resposta patológica da seguinte forma: ausência de células tumorais, mínimos

resíduos tumorais ou sem regressão tumoral marcante (WILLIAMS et al. 2007).

No estudo de VALLBÖHMER et al. (2012), quatro sistemas de graduações de resposta foram avaliados:

- a) Sociedade Japonesa de Câncer Colorretal;
- b) Junker-Müller;
- c) Dworak;
- d) Cologne.

Os autores demonstraram que não houve impacto prognóstico em nenhuma das classificações utilizadas para uso clínico.

Acredita-se que os principais fatores que contribuem para não termos um sistema de protocolo padronizado para a avaliação da resposta tumoral patológica é o fato de que estas análises das respostas patológicas são muito subjetivas e que os linfonodos, que são os fatores mais importantes para o prognóstico, não têm sido incluídos nos sistemas de avaliação de regressão tumoral.

A interpretação dos achados histológicos relacionados à resposta patológica no envolvimento linfonodal é mais difícil. Modificações fibróticas focais podem ser vistas em linfonodos sem radio/quimioterapia. No entanto, nódulos fibróticos esparsos e pequena quantidade de células linfóides ou mudanças fibróticas com substâncias mucinosa obviamente demonstram efeitos terapêuticos (DWORAK et al. 1997).

A neoadjuvância com radio/quimioterapia tem sido associada a uma diminuição no estadio patológico do tumor e o estadio linfonodal em torno de

60% dos pacientes tratados. Além disso, tem sido observada uma redução no número de linfonodos examinados nos espécimes cirúrgicos das proctocolectomias de pacientes tratados com terapia neoadjuvante (AMAJOY et al. 2013).

Acredita-se que nem todos os espécimes cirúrgicos vão conter 12 linfonodos após neoadjuvância, como recomenda a *American Joint Committee on Cancer* e a *International Union Against Cancer*. Contudo, a presença de menor número de linfonodos não deve ser associado ao uso irregular das técnicas dos cirurgiões ou dos patologistas (AMAJOYI et al. 2013).

1.1 CLASSIFICAÇÃO – TNM

Estadio 0 - Tis N0 M0
Estadio I -T1, T2N0 M0
Estadio IIA - T3N0 M0
Estadio IIB - T4aN0 M0
Estadio IIC - T4bN0 M0
Estadio IIIA -T1, T2N1/N1C M0
T1 N2a
Estadio IIIB - T3, T4a N1/N1C - M0
T2-T3N2a M0
T1-T2 N2b M0
Estadio IIIC T4a N2a M0
T3-T4a N2b M0
T4b N1-2 M0
Estadio IVA - qualquer T qualquer NM1a
Estadio IVB - qualquer T qualquer NM1b

Fonte: EDGE et al. (2010)

1.2 MARCADORES MOLECULARES

A presença ou a ausência de expressão de marcadores moleculares específicos podem estar associados a regressão tumoral exibindo resposta patológica completa. Vários marcadores moleculares têm sido testados como possíveis preditores de resposta patológica pós neoadjuvância, incluindo enzimas envolvidas no metabolismo das fluoropirimidinas, oncogenes, genes de supressão tumoral e diferentes componentes da via de apoptoses.

- **Timidilato Sintetase**

Uma das moléculas alvo de maior importância para ação do 5-FU, pois é a responsável pela a proliferação celular. TS catalisa a metilação da deoxiuridina monofosfato (dUMP) via 5,10 metilenotetrahidrofolato para formar deoxitimidina monofosfato (dTMP). 5-FU é convertido em um metabólito ativo, 5-fluoro – 2'deoxiuridina 5'monofosfato, que forma um complexo estável com a TS, e que inibe a atividade desta enzima, levando a parada do ciclo celular e morte celular. Correlações inversas tem sido descritas entre o aumento da expressão da TS ou níveis de RNAm nos tumores e a efetividade do uso de 5-FU (ARRABUZI et al. 2013).

Três polimorfismos no gene da TS tem sido identificados como estando associados aos níveis da expressão do RNAm da TS e resistência a quimioterapia baseada no 5-FU. O primeiro polimorfismo – TS 'enhancer region' (TSER) é um único 'tanden repeat' imediatamente após o códon ATG

de iniciação, contendo (2R) ou (3R) 28 pares de bases repetidas que podem influenciar a transcrição ou tradução da TS. O genótipo 3R/3R tem sido associado ao aumento da expressão do gene e/ou da proteína da TS no câncer colorretal e tem sido apontado como capaz de prever sobre a pobre evolução clínica dos pacientes com quimioterapia baseada no 5-FU comparado com os genótipos 2R/2R e 2R/3R (STOEHLMACHER et al. 2008).

Este polimorfismo é relacionado com a eficácia do gene de transcrição desse processo. A eficiência na transcrição desse gene com dupla repetida é menor que o gene com tripla repetida.

O segundo polimorfismo é um funcional G> C *Single nucleotide polymorphism* (SNP) presente no segundo repetido dos alelos 3R. A eficiência da transcrição dos alelos 3R (C) é similar ao dos alelos 2R. Finalmente o terceiro polimorfismo é a deleção de um par de base 6 (6-bp) no nucleotídeo 1494 na região 3' não tradutora, que tem sido associado com a diminuição na estabilidade RNAm e menor expressão intratumoral da TS (ARRABUZI et al. 2013).

Portanto o genótipo da TS apresenta maior capacidade de prever regressão tumoral e sobrevida. Pacientes com 2R/3R mostram uma tendência em ter maior regressão do T (tumor) e do N (linfonodos), como também bom TRG (grau de regressão tumoral), mas sem significância estatística (HUR et al. 2011).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que aumento no número das 'tandem repeat' tem levado ao aumento na expressão da TS e sua atividade.

TSER3 homozigoto parece estar associado com uma menor resposta à neoadjuvância baseada no 5-FU para pacientes com CCR.

VILLAFRANCA et al. (2001), examinou 65 pacientes com câncer retal tratados com 5-FU pré-operatórios. Pacientes com 'genótipo TSER 3/3 apresentaram taxas de regressão tumoral de apenas 22%, comparado com 60% nos pacientes com TSER 2/2 ou TSER 2/3.

SPINDLER et al. (2007) incluiu amostras de sangue de 60 pacientes com tumores retais localmente avançado tratado com radio/quimioterapia concomitantes. Pacientes com genótipo TS 2/2 tiveram uma maior resposta patológica completa do que aqueles com 2/3 ou genótipo 3/3 (PAÉZ et al. 2011).

É importante esclarecer que a expressão da proteína TS é mais convincente como um marcador preditivo de resposta clínica nos casos de CCR metastático. Vários estudos têm mostrado que a alta expressão TS nas metástases está associada a falta de resposta clínica ao tratamento com 5-FU.

AGUIAR JÚNIOR et al. (2005) estudaram 114 pacientes com câncer colorretal em estádios II e III e observaram que a expressão da TS poderia ser usada para identificar ou selecionar pacientes para protocolos de quimioterapia adjuvantes, porém não foi um fator prognóstico independente para sobrevida.

No estudo de ÖHRLING et al. (2012), 716 pacientes com câncer de cólon foram avaliados quanto ao status das proteínas dos genes de reparo do DNA e a expressão da TS. Eles mostraram que a análise combinada

destes marcadores pode melhorar a predição de resposta ao 5-FU nos casos de câncer de cólon estadio III.

- **Proteínas dos Genes de Reparo do DNA**

Outros marcadores utilizados como preditores de resposta ao tratamento neoadjuvante são as proteínas dos genes de reparo do DNA e a instabilidade de microssatélites. Até o momento cinco genes foram descritos como sendo capazes de sintetizar proteínas com função de reparo do DNA, denominados respectivamente como hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 e hMSH6. Estas proteínas possuem a capacidade de remover um segmento do DNA, contendo uma alteração na sequência de bases e inserir um novo segmento contendo a sequência certa. Uma das características dos tumores com deficiência das proteínas dos genes de reparo é a instabilidade dos microssatélites, como um erro espontâneo na replicação do DNA que não poderá ser reparado (PINHO e ROSSI 1999).

A instabilidade de microssatélites é um dos marcadores mais promissores, representando a heterogeneidade do câncer colorretal. Tumores esporádicos com alta frequência de instabilidade de microssatélites são associados a inativação epigenética de MLH1 através da hipermetilação do seu promotor em um conjunto de ilhas de CpG com fenótipo metilador em MSH2 e MSH6, representando uma pequena porcentagem. Enquanto que na síndrome de Lynch observamos mutações germinativas em MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 (HONG et al. 2012).

Embora 85% dos CCR esporádicos se desenvolvam através da via de instabilidade cromossômica, aproximadamente 15-20% são caracterizados por instabilidade de microsátélites e apresentam distintos fenótipos clínicos e patológicos. Os CCR com alta frequência de instabilidade de microsátélites são predominantemente localizados no cólon proximal, apresentam pobre diferenciação histológica, tumores mucinosos, acentuado infiltrado linfocitário peritumoral e conteúdo do DNA diplóide (HONG et al. 2012).

O significado prognóstico da instabilidade de microssatélites (MSI) no câncer de cólon esporádico tem sido bem estabelecido. Em geral tumores com MSI têm seguimento oncológico relativamente favorável e esses tumores apresentam uma pobre resposta a quimioterapia baseada em 5-FU comparado com os tumores estáveis (DU et al. 2013).

LYNCH et al. (2009), relataram que a alta instabilidade de microssatélites está associado a um melhor prognóstico clínico geral e por estadió clínico, e este prediz uma resposta pior a quimioterapia adjuvante para ambos os estadios II e III para o câncer colorretal. Apenas uma minoria dos CCR atualmente respondem aos regimes do 5-FU, e a deficiência a deficiência das proteínas dos genes de reparo tem sido apontada como um marcador de pobre resposta.

Recente metanálise, incluindo 31 estudos de CCR validados com MSI-H (alta frequência de instabilidade de microsátélites) de estadios I-IV tinham não apenas melhor sobrevida geral com *odds ratio* (OR) de 0,6(95% CI, 0,53-0,69), mas também melhor sobrevida livre de doença, com um OR

de 0,58 (95% CI, 0,47-0,72) que MSS/MSI-L, CCR são comparáveis ao presente estudo (HONG et al. 2012).

MENG et al. (2007), demonstrou que MSI pode não ser preditivo da evolução favorável no câncer de reto, diferente do que ocorre no cólon. Já no estudo de DU et al. (2013), que avaliaram 316 casos submetidos a neoadjuvância com radioterapia, a instabilidade de microsatélites não mostrou significativa associação com a regressão tumoral, sugerindo que MSI é caracterizada por radio sensibilidade nos casos *in vitro*, não sendo aplicável *in vivo*.

Outros estudos evidenciaram que tumores com alta instabilidade de microsatélites apresentam maior frequência de resposta completa, quando comparados com aqueles com estabilidade de microsatélites. CHARARA et al. (2004) também demonstraram que alguns casos com instabilidade de microsatélites, apresentam perda da expressão de proteínas dos genes de reparo e são considerados fatores preditivos de uma melhor resposta ao tratamento neoadjuvante com 5-FU, CPT-11 e radioterapia.

O teste imunohistoquímico para MLH1 e MSH2 é um teste rápido, com custo efetivo e confiável capaz de detectar a maioria dos tumores colorretais com deficiência das proteínas de reparo (LAUZA et al. 2006).

Alguns estudos têm mostrado que a análise imuno-histoquímica de MLH1 e MSH2 tem uma forte correlação com o fenótipo de MSI, determinado por PCR. A sensibilidade para detectar MSI com imuno-histoquímica é de 80-95% e a especificidade tem alcançado 100% (ÖHRLING et al. 2010).

A perda da atividade dessas proteínas dos genes de reparo torna o organismo relativamente resistente aos efeitos de componentes tóxicos que danificam o DNA, tais como os agentes alquilantes (KARRAN e BIGNAMI 1994).

Recentemente, GARCIA AGUILAR et al. (2011) relatam que quatro marcadores moleculares mais prevalentes entre os pacientes sem resposta patológica completa foram a mutação do KRAS e do p53 e o polimorfismo de MHTFR C677T [TT] e CCND1G870A [AA]. Essas combinações de marcadores tem uma validade de mais de 70% e um valor preditivo de 97-100%, predizendo que esses pacientes apresentando essas mutações ou polimorfismos, não irão alcançar uma resposta patológica completa.

O gene MTHFR é encontrado na enzima que catalisa a conversão de 5,10-MTHF, forma circulante do folato. O 5,10- MTHF é usado pela timidilato sintetase (TS) na conversão da deoxiuridilato a deoxitimidilato, importantes para a síntese do DNA. Redução da atividade da MTHF poderá aumentar a quantidade de 5,10- MTHF disponível pela enzima da timidilato sintetase, aumentando os efeitos inibitórios da TS, como o do 5-FU, nos indivíduos apresentando esse polimorfismo.

Portanto, a descoberta de biomarcadores específicos poderão prever a resposta patológica ao tratamento neoadjuvante, bem como auxiliar, como um instrumento complementar, na seleção de pacientes potencialmente candidatos a tratamento exclusivo por radioterapia e quimioterapia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar o papel das expressões Imuno-histoquímicas das proteínas dos genes de reparo do DNA (hMSH2, hMLH1, hMSH6 e hPMS2) e da Timidilato Sintetase como fatores preditivos de resposta patológica completa à radio e quimioterapia neoadjuvante em adenocarcinomas de reto.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Avaliar a taxa de frequência da perda de expressão das proteínas dos genes de reparo do DNA em adenocarcinomas de reto submetidos a tratamento neoadjuvante.

Avaliar se existe associação significativa entre resposta clínica completa e resposta patológica completa.

Avaliar se existe associação significativa entre resposta patológica completa versus incompleta ou níveis de resposta conforme a classificação de Dworak e variáveis clínicas tipo: sexo, idade (considerando pacientes acima ou abaixo de 50 anos), distância do tumor em relação à linha pectínea, estadiamento clínico pré

neoadjuvância T, N, M, antígeno carcinoembriônico sérico (CEA), estadiamento clínico pós operatório ypN, invasão linfática tumoral e os marcadores de proteínas dos genes de reparo do DNA (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) e a TS.

3 METODOLOGIA

3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional tipo caso controle, com coleta retrospectiva e prospectiva de dados.

3.2 ORIGEM DOS PACIENTES E AMOSTRAS

Os pacientes foram identificados a partir de uma coorte retrospectiva, prospectiva e consecutiva de portadores de adenocarcinoma de reto admitidos no Núcleo de Tumores Colorretais do A.C.Camargo Cancer Center, candidatos a tratamento neoadjuvante com radioquimioterapia. Essa coorte vem sendo construída e seguida desde 2007 e foram incluídos pacientes tratados e operados até fevereiro de 2013. Destes, 109 casos foram avaliados, sendo 22 prospectivos a partir de agosto de 2011.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- 1 Pacientes portadores de adenocarcinoma primário de reto localizado até 8 cm da linha pectínea.
- 2 Estadio clínico T3 ou T4 ou N+;
- 3 Índice de Karnofsky maior que 70% (anexo 1)

- 4 Contagem de leucócitos maior que 3.500/ mm³, neutrófilos maior que 1.500/ mm³ e de plaquetas maior que 100.000/ mm³; creatinina sérica abaixo de 1,5 mg/ dl; dosagem sérica de bilirrubinas dentro dos limites da normalidade e de transaminases até duas vezes o valor normal e ausência de sinais de insuficiência cardíaca que impossibilitem o tratamento com o 5 FU.

3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- 1 Pacientes previamente submetidos a qualquer tratamento para o câncer do reto;
- 2 Recusa em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), para os casos prospectivos (Anexo 2).
- 3 Ausência de material disponível para a realização das reações Imuno-histoquímicas.

3.5 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 2) foi utilizado para os 22 casos obtidos prospectivamente. Para os casos retrospectivos foi realizado um termo de dispensa do TCLE (Anexo 3).

3.6 DIAGNÓSTICO, AVALIAÇÃO INICIAL E ESTADIAMENTO

Todos os pacientes foram submetidos à anamnese e exame físico locorregional, que incluía retoscopia rígida, com determinação exata da distância entre o limite distal do tumor e a linha pectínea. Durante a retoscopia foi realizada biópsia do tumor (Figuras 7 a e 7b)

Para o estadiamento clínico foram solicitados: ressonância magnética da pelve, tomografia computadorizada do abdome superior, radiografia simples do tórax e dosagem sérica de antígeno carcinoembriogênico (CEA).

3.7 COLETA DO MATERIAL

Durante a realização da retoscopia rígida, foram colhidos um número mínimo de 4 fragmentos apenas das áreas tumorais com pinça de biópsia. Os materiais coletados foram fixados em formalina tamponada para posterior inclusão em parafina e estudo anatomopatológico.

3.7.1 Imuno-histoquímica

Para o estudo das proteínas dos genes de reparo e da timidilato sintetase foi realizado exame Imuno-histoquímico, conforme o protocolo do serviço de patologia do A.C.Camargo Cancer Center.

Secções de tecido do material coletado fixado em formalina tamponada emblocado em parafina foram submetidos: a desparafinização e hidratação dos cortes histológicos: três banhos em xilol (5 minutos cada),

quatro banhos de álcool, lavagem por cinco minutos em água corrente. Recuperação antigênica na Pascal (Câmara de Pressão) em solução Citrato pH 6,0 à 125°C (30 segundos após atingir 125°C e pressão entre 20 e 25 psi) e lavagem em água corrente por 5 minutos. Bloqueio da atividade da peroxidase endógena: três banhos de cinco minutos cada com Peróxido de Hidrogênio 10 volumes; lavagem em PBS (phosphate- buffered saline); bloqueio de proteínas: 20 minutos com Bloqueador de Proteínas (DAKO).

Em seguida, foram incubados com anticorpos primários, anti MSH6 (clone 44, BD), MSH2 (clone Fe11, Calbiochem), MLH1 (clone G168-728, BD), PMS2 (clone A-16-4, BD) e anti TS (clone TS106, DAKO) por duas horas à temperatura ambiente em câmara úmida; lavagem em PBS; incubação com anticorpo secundário (Novolink Polímero) por 30 minutos (Ta); lavagem em PBS; incubação com polímero (Novolink Polímero-Novocastra) por 30 minutos (Ta); 11- lavagem em PBS.

Posteriormente, foram revelados com o uso do cromógeno diaminobenzidine (DAB) por cinco minutos (Kit Liquid DAB+Substrate Chromogen System; Dako Cytomation, Carpinteria, California); lavagem em água corrente; contra coloração com Hematoxilina de Harris por dois minutos; lavagem em água corrente por cinco minutos; desidratação em álcool, xilol e montagem em meio permanente.

As análises dos anticorpos pesquisados foram realizadas em microscópio óptico comum, sendo considerados positivos os casos com qualquer quantidade de células tumorais exibindo marcação nuclear

semelhante à marcação do tecido não neoplásico ou linfócitos peritumorais (Figuras 1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5a e 5b)

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados clínicos foram coletados a partir de uma amostra consecutiva, de acordo com a demanda do serviço, sendo posteriormente transcritos em ficha padronizada e digitados em computador para gerenciamento do banco de dados. A confecção do banco de dados e as análises foram feitas no programa estatístico “SPSS 17.0 for Windows”.

Após a construção do banco de dados foram determinadas as frequências simples das variáveis. Os testes de associação entre as variáveis foram determinados por qui-quadrado e Fisher. Foram consideradas significativas as diferenças com erro alfa menores que 5% ($p < 0,05$).

3.9 PADRONIZAÇÃO DO TRATAMENTO

Após o diagnóstico e estadiamento dos tumores, todos os pacientes foram submetidos ao tratamento neoadjuvante.

A radioterapia foi realizada até dose total de 5040 cGy com fracionamento diário de 180 cGy, em campos, cinco vezes por semana, sendo 4500cGy na pelve, incluindo o sítio primário e drenagem linfática, seguido por *boost* de 540cGy em 3 frações.

Para quimioterapia concomitante à radioterapia foi utilizado 5-fluorouracil na dose de 1g por m² ao dia durante 5 dias, em infusão contínua de 120 horas, na primeira e na quinta semanas de radioterapia.

Quatro semanas após o término da radioterapia, foi realizada nova retoscopia sem biópsia para avaliação clínica da resposta (Figuras 8a e 8b). A cirurgia foi realizada no período de seis a oito semanas após o término do tratamento neoadjuvante (Figuras 6a e 6b). A cirurgia obedeceu aos princípios clássicos de tratamento oncológico. Resumidamente, a ligadura dos pedículos arterial foi efetuada a 1,0cm acima da emergência da artéria mesentérica inferior da aorta e a veia mesentérica inferior foi ligada na altura do ligamento de Treitz.

A Excisão total do mesorreto foi realizada completamente até o assoalho pélvico, mantendo-se a integridade da fáscia própria do reto e com preservação da inervação autonômica pélvica sempre que possível. Nos tumores localmente avançados, que ultrapassaram os limites da fáscia própria do reto, foi realizada a extensão lateral da ressecção, além da fáscia endopélvica, para se obter margens radiais negativas. Para os tumores mais distais, foi obedecido a margem distal de 1,0cm, considerando-se a medida antes do tratamento neoadjuvante. Todos os pacientes foram submetidos à ileostomia ou colostomia de proteção. Foi facultada a via de acesso convencional ou laparoscópica.

3.10 DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA PATOLÓGICA DOS TUMORES

Foram considerados como respondedores somente os casos em que houve ausência de neoplasia residual no exame anatomopatológico da peça operatória, ou seja, resposta patológica completa. Na presença de células tumorais em qualquer quantidade ou proporção, tanto na parede do reto como em linfonodos, o caso foi considerado como não respondedor.

Para avaliação da resposta patológica pós neoadjuvância nas peças cirúrgicas foi utilizado o sistema de classificação de regressão tumoral de Dworak (DWORAK et al. 1997), que avalia a resposta de acordo com a relação entre a quantidade de fibrose e células tumorais viáveis. No entanto, em nosso estudo a resposta patológica foi graduada de acordo com a relação entre a quantidade de células tumorais viáveis em relação a quantidade de fibrose como descrito no estudo de BERTOLINI et al. (2007).

Portanto, a resposta foi graduada em: 1- ausência de lesão residual, 2- presença de até 25% de células tumorais viáveis, 3- entre 26 a 50% de células tumorais viáveis e 4- acima de 50% de células tumorais viáveis

4 RESULTADOS

Foram avaliados cerca de 170 indivíduos de forma prospectiva e retrospectiva tratados no A.C.Camargo Cancer Center, em São Paulo, no período de janeiro de 2007 a fevereiro de 2013, destes apenas 109 apresentavam os critérios de inclusão e lâminas ou blocos de parafinas com material suficiente para a realização do estudo Imuno-histoquímico e a análise da resposta patológica completa, dos quais 22 casos foram avaliados de forma prospectiva.

Dos 109 pacientes estudados, 63(57,8%) eram do sexo masculino e 46 (42,2%) feminino. A idade média de idade dos indivíduos foi de 60 anos, com uma variação de mínimo de 28 e máximo de 93 (Tabela1).

Tabela 1 - Distribuição de pacientes conforme características sociodemográficas

CARACTERÍSTICAS	FREQ. ABSOLUTA(N)	FREQ. RELATIVA (%)
Sociodemográficas		
SEXO		
MASCULINO	63	57,8
FEMININO	46	42,2
IDADE		
Média	60	
Mínimo	28	
Máximo	93	
TOTAL	109	100

Quanto à localização do tumor, 61 (56%) eram localizados entre a borda anal e a 4 cm da linha pectínea e em 48 casos (44%) o tumor estava localizado entre 4,1 a 8 cm da linha pectínea.

Em relação ao estadiamento clínico pré-neoadjuvância foram considerados: cT2 em 2 casos (1,8%); cT3 em – 95 casos (87,2%); cT4 em 9 casos (8,3%) e cTx em 3 casos (2,7%). O N (linfonodos regionais)- N0 em 39 casos (35,8%), N+ em 66 casos (60,6%) e Nx em 4 casos (3,7%). O M (metástases à distância)- M0 em 101 casos (92,7%) e M1 em 8 indivíduos (7,3%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Estadiamento e avaliação clínica pré-neoadjuvância.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	FREQ. ABSOLUTA(N)	FREQ. RELATIVA (%)
Localização do tumor		
Reto 0 a 4, 0 cm	61	56
Reto 4,1 a 8 cm	48	44
Estadiamento Tc		
cT2	2	1,8
cT3	95	87,2
cT4	9	8,3
cTx	3	2,7
Estadiamento N		
N0	39	35,8
N+	66	60,6
Nx	4	3,7
Estadiamento M		
M0	101	92,7
M1	8	7,3
TOTAL	109	100

A via de acesso utilizada nas cirurgias foi aberta em 91 casos (83,5%) e laparoscópica em 17 (15,6%) e indeterminada em 1 caso (0,9%). O tipo de cirurgia realizada foi ressecção anterior baixa com preservação esfinteriana em 72 (66,1%), amputação abdominoperineal do reto em 32 (29,4%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Vias de acesso e cirurgias realizadas.

	FREQ. ABSOLUTA(N)	FREQ. RELATIVA (%)
VIA DE ACESSO		
ABERTA	91	83,5
LAPAROSCOPICA	17	15,6
9 (SEM DADOS)	1	0,9
CIRURGIAS		
Ressecção anterior baixa	72	66,1
Amputação abdomino- perineal	32	29,4
Ressecção Alargada	5	4,6
TOTAL	109	100

O estadiamento pós-operatório desses indivíduos foi avaliado através do exame histopatológico da peça cirúrgica, onde foram considerados:

ypT0 em 24 casos (22%), ypT1 em 11 (10,1%), ypT2 em 30 (27,5%) e ypT3 em 37 (33,9%)

ypN0 em 90 casos (82,6%), ypN1 em 18 (16,5%) e ypN2 em 1 (0,9%) (Tabela 4).

O número de linfonodos dissecados conforme o espécime cirúrgico variou de um máximo de 42 e um mínimo de 1, com uma média de 13,38. Já o número de linfonodos comprometidos apresentou um mínimo de 0 e máximo de 6, com média de 0,31 (Tabela 5).

O grau de diferenciação observado na peça cirúrgica desses indivíduos foi de: bem diferenciado em 3 casos (2,8%), moderadamente diferenciado em 74 (67,9%), pouco diferenciado em 2 (1,8%) (Tabela 6).

Tabela 4 - Estadiamento pós-operatório

CARACTERÍSTICAS	FREQ. ABSOLUTA(N)	FREQ. RELATIVA (%)
ESTADIAMENTO YPT		
YPT0	24	22
YPT1	11	10,1
YPT2	30	27,5
YPT3	37	33,9
YPT4	7	6,4
ESTADIAMENTO YPN		
ypN0	90	82,6
ypN1	18	16,5
ypN2	1	0,9
TOTAL	109	100

Tabela 5 - Número de linfonodos dissecados e comprometidos

	MÍNIMO	MÉDIA	MÁXIMO
DISSECADOS	1	13,38	42
COMPROMETIDOS	0	0,31	6

Tabela 6 - Grau de diferenciação tumoral.

	FREQ. ABSOLUTA(N)	FREQ. RELATIVA (%)
BEM DIFERENCIADO	3	2,8
MODERADAMENTE DIFERENCIADO	74	67,9
POUCO DIFERENCIADO	2	1,8
OUTROS	30	27,5
TOTAL	109	100

Quando avaliada a resposta patológica pós neoadjuvância utilizando o sistema de classificação de regressão tumoral de Dworak (DWORAK et al. 1997), que utiliza uma graduação entre fibrose e a presença de células tumorais viáveis, foi utilizado nesse estudo a resposta em porcentagens conforme utilizado no estudo de BERTOLINI et al. (2007). No entanto, essa resposta patológica foi graduada de acordo com a presença de células tumorais viáveis e não em relação a fibrose.

E foi verificado que 20 casos (18,3%) não apresentavam lesão, ou seja, sem células tumorais viáveis, portanto com resposta patológica completa. Apresentaram até 25% de células viáveis em 53 casos (48,6%), entre 26 e 50% de células viáveis 19 casos (17,4%) e acima de 50% de células viáveis em 17 (15,6%) (Tabela 7).

Tabela 7 - Classificação da resposta patológica à neoadjuvância (Dworak).

	FREQ. ABSOLUTA(N)	FREQ. RELATIVA (%)
AUSÊNCIA DE LESÃO RESIDUAL	20	18,3
ATÉ 25% DE CÉLULAS VIÁVEIS	53	48,6
26 A 50% DE CÉLULAS VIÁVEIS	19	17,4
> 50% DE CÉLULAS VIÁVEIS	17	15,6
TOTAL	109	100

O *downstaging* do tumor (T) após neoadjuvância ocorreu em 63 pacientes (57,8%) e 43 casos (39,4%) não apresentaram regressão e em 2,8% indeterminado. O *downstaging* dos linfonodos regionais (N) ocorreu em 53 (48,6%) indivíduos após neoadjuvância e sem regressão em 54 (49,5%) não mostraram regressão e indeterminado em 1,8%.

Quando avaliado a expressão Imuno-histoquímica das proteínas dos genes de reparo do DNA e da timidilato sintetase nas biópsias pré-neoadjuvância, foram encontradas perda de expressão de hMLH1, hPMS2 e hMSH6 em apenas 1 caso (0,9%). Para a Timidilato Sintetase (TS) observou-se perda de expressão em 36 (33%) casos e em 73 indivíduos (67%) expressão estava presente (Tabela 8).

Tabela 8 - Imuno-histoquímica das biópsias pré neoadjuvância

	FREQ. ABSOLUTA(N)	FREQ. RELATIVA (%)
MLH1		
POSITIVO	108	99,1
NEGATIVO 1	1	0,9
PMS2		
POSITIVO	108	99,1
NEGATIVO	1	0,9
MSH2		
POSITIVO	109	100
MSH6		
POSITIVO	108	99,1
NEGATIVO	1	0,9
TS		
POSITIVO	73	67
NEGATIVO	36	33
TOTAL	109	100

4.1 ANÁLISES DAS ASSOCIAÇÕES

Nesse estudo verificamos as associações entre o grau de regressão tumoral (Classificação de Dworak) e algumas variáveis clínicas como gênero (Tabela 9), idade (até 50 e maior que 50 anos) (Tabela 11) e distância em relação a linha pectínea (Tabela 13), bem como com os marcadores tumorais: MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 e a Timidilato Sintetase (Tabela 23), no entanto não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre essas variáveis.

Outras análises realizadas foram realizadas entre os grupos de respondedores e não respondedores, verificando se havia alguma associação com as variáveis sexo (Tabela 10), idade (acima ou abaixo de 50 anos) (Tabela 12), distância em relação a linha pectínea (Tabela 14), o estadiamento clínico pré neoadjuvância T, N e M (Tabelas 17,18 e 19); CEA (Tabela 15), estadiamento pós operatório ypN (Tabela 21), invasão tumoral linfática (Tabela 16) e os marcadores utilizados: proteínas de reparo do DNA. MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 (Tabela 22) e a Timidilato Sintetase (Tabelas 24). E também não houve significância estatística. No entanto, quando avaliamos os 2 indivíduos que apresentaram perda da expressão das proteínas de reparo (1 paciente com perda de expressão em MLH1 e PMS2 e o outro com perda de expressão em MSH6), verificamos que 100% destes pacientes tiveram resposta patológica completa (Tabela 22) e essa associação foi significativa ($p=0,032$). Observamos também que a resposta clínica endoscópica, a presença de doença residual clínica e a resposta

patológica da peça apresentaram associação estatística significativa ($p=0,09$) (Tabela 20).

Tabela 9 - Associação entre a Classificação de resposta patológica de Dworak versus gênero.

CLASSIFICAÇÃO DE DWORAKA				
	SEM LESÃO	ATÉ 25% CELS VIÁVEIS	26 A 50%	> 50%
SEXO				
MASCULINO				
(N)FREQ.ABSOLUTA	8	35	11	9
(%)FREQ.RELATIVA	12,7	55,6	17,5	14,3
FEMININO				
(N)FREQ.ABSOLUTA	12	18	8	8
(%)FREQ.RELATIVA	26,1	73,9	17,4	17,4
TOTAL				
(N)FREQ.ABSOLUTA	20	53	19	17
(%)FREQ.RELATIVA	18,3	48,6	17,4	15,6
Teste chi- quadrado				
	Valor	Df	Asymp.sig(2-sided)	
Person chi- quadrado	4,237 ^a	3	,237	
Likelihood ratio	4,228	3	,238	
Linear- by- linear association	,155	1	,693	
N° de casos válidos	109			
a.0 célula (0%) tem esperado conter menos que 5. O mínimo esperado é 7.17.				

Tabela 10 - Resposta Patológica (sem lesão / com lesão) versus gênero.

	SEM LESÃO	COM LESÃO	TOTAL		
SEXO					
MASCULINO					
(N)	8	55	63		
(%)	12,7	87,3	100		
FEMININO					
(N)	12	34	46		
(%)	26,1	73,9	100		
TOTAL					
(N)	20	89	109		
(%)	18,3	81,7	100		
Teste chi- quadrado					
	Valor	Df	Asymp sig (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1- sided)
Person chi- quadrado	3,181 ^a	1	,074		
Correção continuidade	2,350	1	,125		
Likelihood ratio	3,145	1	,076		
Teste de fisher exato				,085	,063
Associação linear- linear	3,152	1	0,76		
Nº de casos válidos	109				

a. 0 célula (0%) tem esperado conter menos que 5. O mínimo esperado é 8,44.

Tabela 11 - Associação entre idade e classificação de resposta patológica de Dworak.

CLASSIFICAÇÃO DE DWORAK				
	SEM LESÃO	ATÉ 25% CELS VIÁVEIS	26 A 50%	> 50%
IDADE				
ATÉ 50 ANOS				
(N)	2	16	4	1
(%)	8,7	69,6	17,4	4,3
> + =50 ANOS				
(N)	18	37	15	16
(%)	20,9	43	17,4	18,6
TOTAL				
(N)	20	53	19	17
(%)	18,3	48,6	17,4	15,6
Teste chi- quadrado				
	Valor	Df	Asymp.sig(2-sided)	
Person chi- quadrado	6,475 ^a	3	,091	
Likelihood ratio	7,247	3	,064	
Linear- by- linear association	,539	1	,463	
N° de casos válidos	109			

a. 3 células (37,5%) tem esperado conter menos que 5. O mínimo esperado é 3,59.

Tabela 12 - Associação entre resposta patológica sem lesão/com lesão versus idade acima ou abaixo de 50 anos.

	SEM LESÃO	COM LESÃO	TOTAL		
IDADE					
ATÉ 50 ANOS					
(N)	2	21	23		
(%)	8,7	91,3	100		
> OU =50 ANOS					
(N)	18	68	86		
(%)	20,9	79,1	100		
TOTAL					
(N)	20	89	109		
(%)	18,3	81,7	100		
Teste chi- quadrado					
	Valor	Df	Asymp sig (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1- sided)
Person chi- quadrado	1,813 ^a	1	,178		
Correção continuidade	1,088	1	,297		
Likelihood ratio	2,076	1	,150		
Teste de fisher exato				,234	,147
Associação linear- linear	1,796	1	,180		
Nº de casos válidos	109				

a. 1 célula (25%) tem esperado conter menos que 5. O mínimo esperado é 4,22.

Tabela 13 - Classificação de Dworak da resposta patológica versus distância da linha pectínea.

CLASSIFICAÇÃO DE DWORAK				
	SEM LESÃO	ATÉ 25% CELS VIÁVEIS	26 A 50%	> 50%
Distância				
L.P0-4cm				
(N)	11	29	7	14
(%)	18	47,5	11,5	23
4,5- 8 cm				
(N)	9	24	12	3
(%)	18,8	50	25	6,2
TOTAL				
(N)	20	53	19	17
(%)	18,3	48,6	17,4	15,6
Teste chi- quadrado				
	Valor	Df	Asymp.sig(2-sided)	
Person chi- quadrado	7,664 ^a	3	,053	
Likelihood ratio	8,173	3	,043	
Linear- by- linear association	1,268	1	,260	
N° de casos válidos	109			
a- 0 células(.0%) com expectativa de ter menos que 5 %.Mínimo esperado de 7.49.				

Tabela 14 - Distância da linha pectínea versus resposta patológica sem lesão/ com lesão.

	SEM LESÃO	COM LESÃO	TOTAL		
Distância da LP0 a 4 cm					
(N)	11	50	61		
(%)	18	82	100		
4,1 a 8cm(N					
(N)	9	39	48		
(%)	18,8	81,2	100		
TOTAL					
(N)	20	89	109		
(%)	18,3	81,7	100		
Teste chi- quadrado					
	Valor	Df	Asymp sig (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1- sided)
Person chi- quadrado	,009 ^a	1	,923		
Correção continuidade	,000	1	1,000		
Likelihood ratio	,009	1	,924		
Teste de fisher exato				1,000	,558
Associação linear- linear	,009	1	,924		
Nº de casos válidos	109				
a- 0células(,0%) tem esperado conter menos que 5. O mínimo esperado é 8,81.					

Tabela 15 - Associação do CEA (antígeno carcinoembriônico) versus resposta patológica sem lesão / com lesão.

	SEM LESÃO	COM LESÃO	TOTAL		
MENOR QUE 10					
(N)	14	64	78		
(%)	17,9	82,1	100		
MAIOR QUE 10					
(N)	6	25	31		
(%)	19,4	80,6	100		
TOTAL					
(N)	20	89	109		
(%)	18,3	81,7	100		
Teste chi- quadrado					
	Valor	Df	Asymp sig (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1- sided)
Person chi- quadrado	,029 ^a	1	,864		
Correção continuidade	,000	1	1,000		
Likelihood ratio	,029	1	,865		
Teste de fisher exato				1,000	,531
Associação linear- linear	,029	1	,865		
Nº de casos válidos	109				

a. 0 células (0%) tem esperado conter menos que 5. O mínimo esperado é 5,69.

Tabela 16 - Invasão linfática versus resposta patológica sem lesão/com lesão

	SEM LESÃO	COM LESÃO	TOTAL		
Invasão linfática					
SIM					
(N)	1	4	5		
(%)	20	80	100		
Não					
(N)	19	85	104		
(%)	18,3	81,7	100		
TOTAL					
(N)	20	89	109		
(%)	18,3	81,7	100		
Teste chi- quadrado					
	Valor	Df	Asymp sig (2-sided)	Exact Sig (2-S)	Exact.Sig (1-S)
Person chi- quadrado	,010 ^a	1	,922		
Correção de continuidade(b)	,000	1	1,000		
Likelihood ratio	,009	1	,923		
Fisher's Exact Test				1,000	,645
Nº de casos válidos	109				

a. 2 células (50%) tem esperado conter menos que 5. O mínimo esperado é 0,92

Tabela 17 - Estadiamento clínico agrupado cT1 e cT2/ cT3 e cT4 versus resposta patológica sem lesão / com lesão.

	SEM LESÃO	COM LESÃO	TOTAL		
cT1 e cT2					
(N)	1	2	3		
(%)	33,3	66,7	100		
cT3 e cT4					
(N)	18	85	103		
(%)	17,5	82,5	100		
TOTAL					
(N)	19	87	106		
(%)	100	100	100		
Teste chi- quadrado					
	Valor	Df	Asymp sig (2-sided)	Exact Sig (2-S)	Exact.Sig (1-S)
Person chi- quadrado	,498 ^a	1	,480		
Correção de continuidade(b)	,000	1	1,000		
Likelihood ratio	,423	1	,515		
Fisher's Exact Test				,451	,645
Associação linear- linear	,494	1	,482		
Nº de casos válidos	106				

a. 2 células (50%) tem esperado conter menos que 5. O mínimo esperado é,54.

Tabela 18 - Estadiamento clínico N versus resposta patológica sem lesão/com lesão.

	SEM LESÃO	COM LESÃO	TOTAL		
Estadiamento N					
N0					
(N)	7	32	39		
(%)	17,9	82,1	100		
N1					
(N)	12	54	66		
(%)	18,2	81,8	100		
TOTAL					
(N)	19	86	105		
(%)	18,1	81,9	100		
Teste chi- quadrado					
	Valor	Df	Asymp sig (2-sided)	Exact.Sig (2-S)	Exact Sig(1-S)
Person chi- quadrado	,001 ^a	1	,976		
Correção de continuidade(b)	,000	1	1,000		
Likelihood ratio	,001	1	,976		
Fisher's Exact Test				1,000	,597
Associação linear- linear	,001	1	,976		
Nº de casos válidos	105				

a. 0 célula (0%) tem esperado conter menos que 5. O mínimo esperado é 7,06.

Tabela 19 - Estadiamento clínico M versus resposta patológica (sem lesão/ com lesão)

	SEM LESÃO	COM LESÃO	TOTAL		
Estadiamento M					
M0					
(N)	19	82	101		
(%)	18,8	81,2	100		
M1					
(N)	1	7	8		
(%)	12,5	87,5	100		
TOTAL					
(N)	20	89	109		
(%)	18,3	81,7	100		
Teste chi- quadrado					
	Valor	Df	Asymp sig (2-sided)	Exact.Sig (2-S)	Exact Sig(1-S)
Person chi- quadrado	,197 ^a	1	,657		
Correção de continuidade(b)	,000	1	1,000		
Likelihood ratio	,215	1	,643		
Fisher's Exact Test				1,000	,549
Associação linear- linear	,195	1	,659		
Nº de casos válidos	109				

a. 1 célula tem esperado conter menos que 5. O mínimo esperado é 1,47.

Tabela 20 - Resposta clínica completa (endoscópica) e doença clínica residual versus resposta sem lesão / com lesão.

SEM LESÃO		COM LESÃO		TOTAL	
Resposta clínica completa					
(N)	7	10	17		
(%)	41,2	58,8	100		
Doença clínica residual					
(N)	9	67	76		
(%)	11,8	88,2	100		
TOTAL					
(N)	16	77	93		
(%)	17,2	82,8	100		
Teste chi- quadrado					
	Valor	Df	Asymp sig (2-sided)	Exact.Sig (2-S)	Exact Sig(1-S)
Person chi- quadrado	8,392 ^a	1	,004		
Correção de continuidade(b)	6,459	1	,011		
Likelihood ratio	7,067	1	,008		
Fisher's Exact Test				,009	,009
Associação linear- linear	8,302	1	,004		
Nº de casos válidos	93				

a. 1 célula (25%) tem esperado conter menos que 5. O mínimo esperado é 2,92.

Tabela 21 - Estadiamento pós operatório N versus resposta patológica (sem lesão/ com lesão)

	SEM LESÃO	COM LESÃO	TOTAL
Estadiamento			
patológico N			
ypN0			
(N)	19	71	90
(%)	21,1	78,9	100
ypN1			
(N)	1	17	18
(%)	5,6	94,4	100
ypN2			
(N)	0	1	1
(%)	0	100	100
TOTAL			
(N)	20	89	109
(%)	18,3	81,7	100
Teste chi- quadrado			
	Valor	Df	Asymp sig (2-sided)
Person chi- quadrado	2,649 ^a	2	,266
Likelihood ratio	3,407	2	,182
Associação linear- linear	2,572	1	,109
Nº de casos válidos	109		

a- 3 células (50%) tem esperado conter menos que 5. O mínimo esperado é 0,18.

Tabela 22 - Expressão normal ou perda de expressão das proteínas de reparo do DNA versus resposta patológica sem lesão / com lesão.

	SEM LESÃO	COM LESÃO	TOTAL		
Expressão normal das proteínas de reparo					
(N)	18	89	107		
(%)	16,8	83,2	100		
Perda de expressão					
(N)	2	0	2		
(%)	100	0	100		
TOTAL					
(N)	20	89	109		
(%)	18,3	81,7	100		
Teste chi- quadrado					
	Valor	Df	Asymp sig (2-sided)	Exact.Sig (2-S)	Exact Sig(1-S)
Person chi- quadrado	9,066 ^a	1	,003		
Correção de continuidade(b)	4,364	1	,037		
Likelihood ratio	6,953	1	,008		
Fisher's Exact Test				,032	,032
Nº de casos válidos 109					

a.2 células tem esperado conter menos que 5. O mínimo esperado é,3

Tabela 23 – Imuno-Histoquímica TS versus classificação da resposta patológica (Dworak)

CLASSIFICAÇÃO DE DWORAK				
	SEM LESÃO	ATÉ 25% CELS VIÁVEIS	26 A 50%	> 50%
Imuno-histoquímica TS				
Positivo				
(N)	12	34	13	14
(%)	16,4	46,6	17,8	19,2
Negativo				
(N)	8	19	6	3
(%)	22,2	52,8	16,7	8,3
TOTAL				
(N)	20	53	19	17
(%)	18,3	48,6	17,4	15,6
Teste chi- quadrado				
	Valor	Df	Asymp.sig(2-sided)	
Person chi- quadrado	2,466 ^a	3	,481	
Likelihood ratio	2,660	3	,447	
Nº de casos válidos	109			
a- 0 células (0%) espera-se conter menos que 5. O mínimo esperado é 5,61.				

Tabela 24 - Imuno- histoquímica TS versus resposta patológica (sem lesão/ com lesão)

SEM LESÃO		COM LESÃO		TOTAL	
Imuno	histoquímica				
TS					
POSITIVO					
(N)	12	61		73	
(%)	16,4	83,6		100	
Negativo					
(N)	8	28		36	
(%)	22,2	77,8		100	
TOTAL					
(N)	20	89		109	
(%)	18,3	81,7		100	
Teste chi- quadrado					
	Valor	Df	Asymp sig (2-sided)	Exact Sig (2-S)	Exact.Sig (1-S)
Person chi- quadrado	,538 ^a	1	,463		
Correção de continuidade(b)	,222	1	,638		
Likelihood ratio	,526	1	,468		
Fisher's Exact Test				,599	,314
Nº de casos válidos	109				

a. 0 célula (,0%) tem esperado conter menos que 5. O mínimo esperado é 6,61.

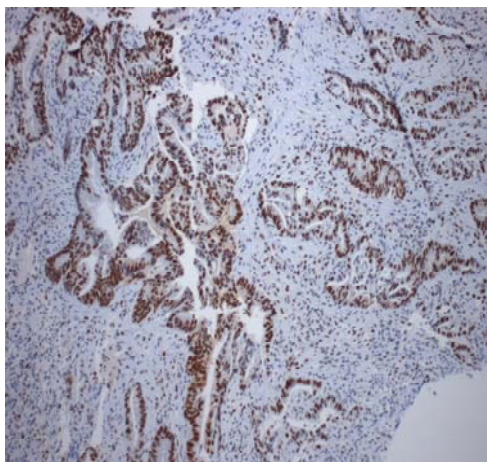
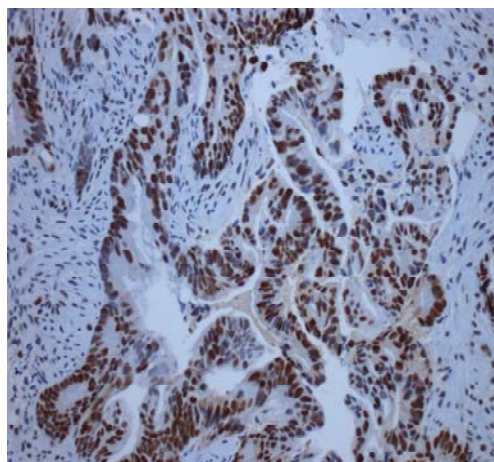
Figura 1a**Figura 1b**

Figura 1 - Imuno-histoquímica para MSH6 em biópsia de adenocarcinoma. Observa-se marcação nuclear forte nas células neoplásicas (aumento original, 10x na **figura a** e 20x na **figura b**)

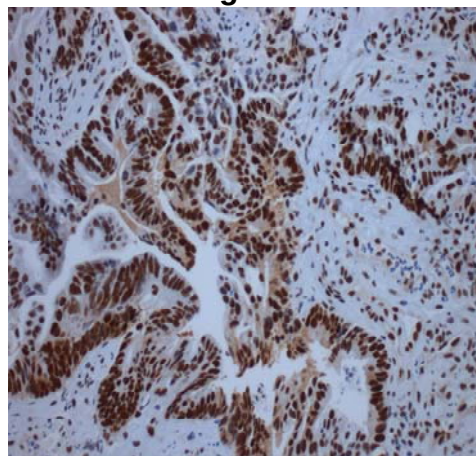
Figura 2a**Figura 2b**

Figura 2 - Imuno-histoquímica para MLH1 em biópsia de adenocarcinoma. Observa-se marcação nuclear forte nas células neoplásicas (aumento original, 10x na **figura a** e 20 x na **figura b**)

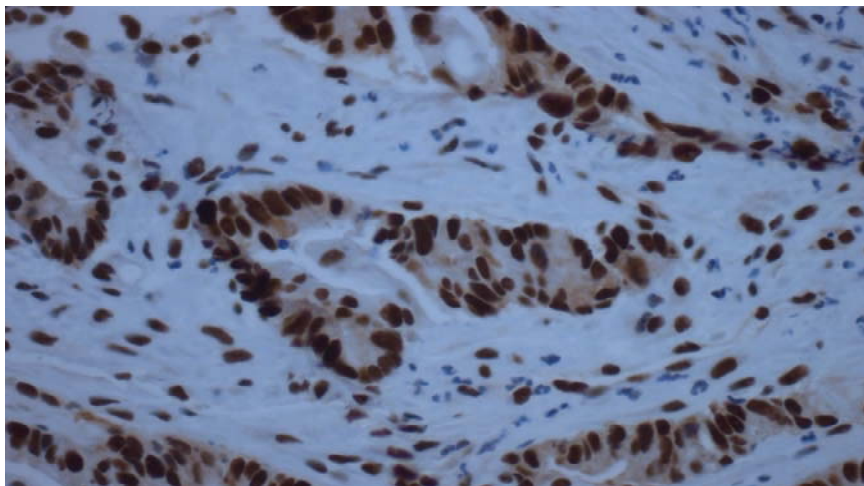


Figura 3 - Imuno-histoquímica para MSH2 em biópsia de adenocarcinoma. Observa-se marcação nuclear forte nas células neoplásicas e nos linfócitos do estroma adjacente (aumento original, 20x)

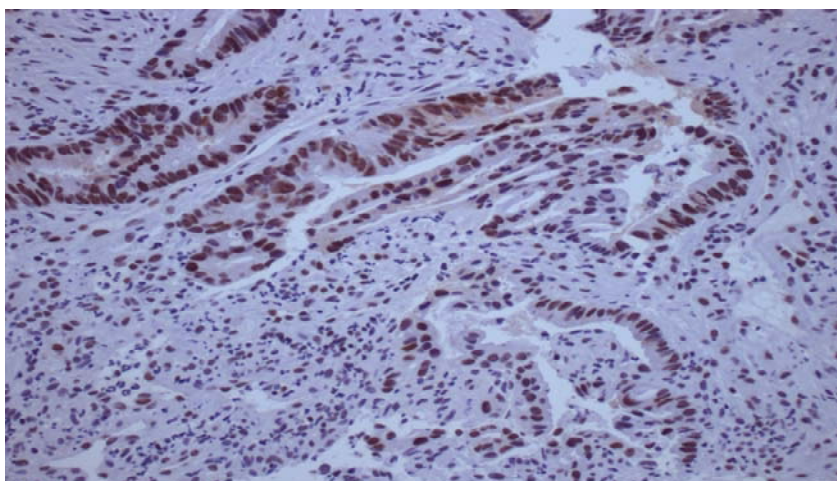


Figura 4 - Imuno-histoquímica para PMS2 em biópsias de adenocarcinoma. Observa-se marcação nuclear forte em células neoplásicas e em linfócitos do estroma adjacente (Aumento original, 10x).

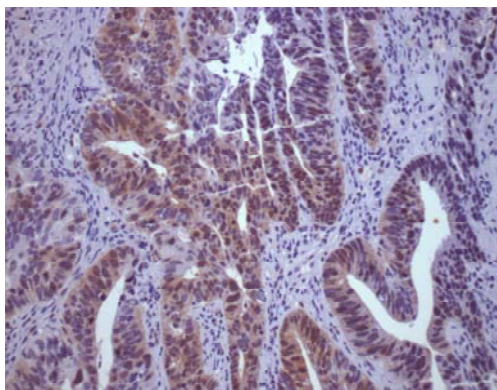
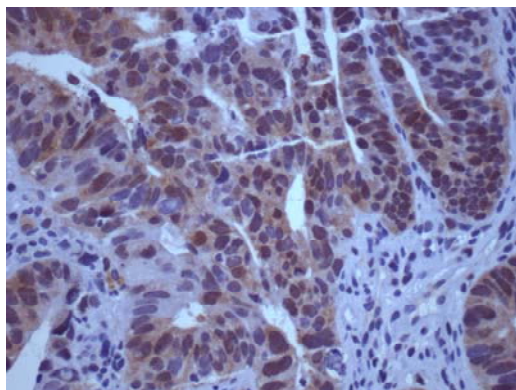
Figura 5a**Figura 5b**

Figura 5 - Imuno-histoquímica para TS em biópsias de adenocarcinoma. Observa-se a marcação nuclear forte citoplasmática e nuclear em células neoplásicas. (Aumento original 10x na **figura a** e 20x na **figura b**).

Figura 6a**Figura 6b**

Figura 6 (a e b) - Peça cirúrgica de paciente com adenocarcinoma de reto pós neoadjuvância, apresentando lesão ulcerada.

Figura 7a**Figura 7b****Figura 7 (a e b) - Neoplasia de reto antes da neoadjuvância****Figura 8a****Figura 8b****Figura 8 (a e b) - Pós neoadjuvância com resposta completa**

5 DISCUSSÃO

O câncer de reto representa cerca de 10% dos casos de câncer por ano. Acomete homens e mulheres com aproximadamente a mesma frequência, geralmente com a idade variando de 50 a 80 anos e com uma incidência crescente com a idade (COLOMBINO et al. 2002). 90% dos casos são diagnosticados em indivíduos com 50 anos ou mais (ACS 2013). Na metanálise de MARTIN et al. (2012), também os indivíduos apresentavam uma média de idade de 60 anos e 65% eram homens.

Diferenças significantes em relação ao sexo foram observadas no estudo de PARK et al. (2010), onde 79% (85/108) dos pacientes eram homens e (21%) 23/108 eram mulheres e a média de idade observada foi de 59,7+/- 11,8(31-80). Caso semelhante ocorreu no estudo de KUO et al. (2012), onde 38% (63/166) eram mulheres e (62%)103/166 eram homens, com idade variando de 24-80 e média de 57,3 anos. Os nossos dados estão de acordo com a literatura, apresentando um discreto predomínio do sexo masculino e com média de idade de 60 anos.

A distância média observada do tumor em relação a margem anal, medida através da proctoscopia rígida, segundo a metanálise de Martin et AL. (2012), foi de 53,6 mm. Já no estudo de PARK et al. (2010), onde foram avaliados 108 pacientes no período de 2004 a 2008, 89% apresentavam o tumor localizado até 5cm BA, e 11% dentro de 10 cm da BA. No nosso

estudo observamos que a maioria dos casos (56%) apresentavam tumor localizado entre a borda anal e 4 cm da linha pectínea.

DAS et al. (2007), que avaliaram 562 pacientes entre 1989 e 2004, mostraram que os pacientes com distância tumoral inferior a 5 cm da borda anal apresentaram uma melhor resposta patológica após neoadjuvância.

Quando avaliado o estadiamento clínico pré-operatório este dado foi documentado em 11 de 16 estudos avaliados na metanálise de MARTIN et al. (2012), e em 3 foi relatado que todos os pacientes tinham doença em estadio II/III, sem subclassificação. Entre os estudos que descreveram o estadio TNM, 34,1% dos pacientes eram estadio clínico II e 64,8 estadio III.

Outro fato encontrado foi que a resposta clínica endoscópica e a presença de doença residual clínica foram estatisticamente significativos com relação a resposta patológica da peça. O mesmo achado foi demonstrado no estudo de Kuo et al 2011, um estudo retrospectivo que avaliou a taxa de predição de resposta patológica completa através de re-biópsia, imagem de RNM e colonoscopia e verificou que foram de 21,4%; 33,3% e 53,8% respectivamente e que quando combinado os achados da colonoscopia com os da re- biópsia a taxa de predição foi de 77,8% ($p=0,09$). No entanto, a ausência de lesão residual ao exame proctológico não exclui a persistência de doença microscópica, mesmo com mucosa normal e que a re- biópsia apresenta um valor preditivo negativo de 21,4% (Kuo et al, 2011). No estudo de Guillem et al 2005, também foi verificado que o exame do toque retal apresenta uma acurácia de predição de apenas 21% para os pacientes com resposta clínica completa.

Foi realizado um estudo prévio nessa instituição, onde foram avaliadas as características de 129 pacientes tratados com adenocarcinoma de reto médio e inferior localmente avançados, estadiados clinicamente (MRI) como T3, T4 e qualquer N ou qualquer T com N+ e foi verificado que os achados clínicos são muito fracos para predizer resposta patológica à radio e quimioterapia neoadjuvante e que apesar da abordagem endoscópica de resposta pela retoscopia ter mostrado significativa associação com a resposta patológica completa, o valor preditivo foi fraco (TAGLIETTI et al. 2013).

Já a via de acesso e o tipo de cirurgia observado na análise dos casos é concordante com os dados da literatura, pois encontramos 83,5% de indivíduos operados por via aberta (convencional) e 66,1% submetidos à ressecção anterior baixa com preservação esfinteriana, que é considerada atualmente como o procedimento padrão para esses tumores. A amputação foi realizada em 32 casos (29,4%); e a ressecção alargada em 5 (4,6%). Esses dados vão em concordância com a metanálise de MARTIN et al. (2012), em que o procedimento de preservação esfinteriana foi realizado em 73,4% dos pacientes, 22,7 % foram submetidos a amputação abdomino-perineal do reto e 3,9% submetidos a procedimentos alternativos (Hartmann, exenteração pélvica, proctocolectomia total, ressecção anterior com bolsa ileal e excisão transanal). O mesmo foi verificado no estudo de CAPIRCI et al. (2008) onde a preservação esfinteriana ocorreu em 73% dos casos, amputação abdominoperineal do reto (AAPR) em 22% e endoscópica em 5%. Já no estudo de KUO et al. (2012), 81,3% foram

submetidos a retossigmoidectomia com anastomose, 6% com ressecção interesfincteriana e anastomose coloanal e 18 casos (10,8%) com AAPR.

A via laparoscópica utilizada em nosso estudo apresenta resultados semelhantes quando comparado com a cirurgia aberta em relação a segurança, margem de ressecção e superiores na comparação com a recuperação cirúrgica da cirurgia aberta no estudo de Color II (VAN DER PAS et al. 2013).

O mesmo foi observado no estudo *Comparasion of open versus Laparoscopic Surgery for Mid and Low Rectal Cancer after Neoadjuvant Chemoradiotherapy* (COREAN) estudo controlado randomizado, utilizado para verificar a segurança e eficácia da cirurgia laparoscópica comparado com a cirurgia aberta para câncer de reto médio e distal após radio e quimioterapia pré-operatória. Este mostrou que a laparoscopia é factível e não aumenta os riscos oncológicos a curto tempo de seguimento, desfecho predito pela avaliação da positividade da margem circunferencial e qualidade macroscópica da excisão total do mesoreto (KANG et al. 2010).

No estudo de VOLPATO e KOCH (2008), no que se refere ao estadiamento T, a distribuição encontrada foi percentualmente próxima àquela encontrada em outros artigos, nos quais a maior parte dos pacientes encontrava-se em estadio T3.

A determinação histológica da profundidade de invasão tumoral e o grau de invasão tumoral são alguns dos parâmetros histopatológicos mais importantes relacionados ao prognóstico do CCR, embora a extensão da infiltração serosa e a invasão venosa por células cancerosas tenham sido

detectadas como fatores de mau prognóstico no câncer de reto e não de cólon (VOLPATO e KOCH 2008).

O grau de diferenciação tumoral nas peças operatórias mais frequentemente observado nos casos foram os tumores moderadamente diferenciados em 74 indivíduos (67,9%), pouco diferenciados em 1,8%(2) e bem diferenciados em 3 (2,8%). Houve também predomínio de tumores moderadamente diferenciados no estudo de PARK et al. (2010), onde 53% (57/108) eram moderadamente diferenciados, 40% bem diferenciados (43/108) e 5 (5%) pobremente diferenciados.

No estudo de VOLPATO e KOCH (2008), o grau de diferenciação tumoral observado foi: 76 adenocarcinomas bem diferenciados (52,8%), 56 moderadamente diferenciados (38,9%), 6 pouco diferenciados (4,2%) e os 6 restante serão adenocarcinomas mucinosos. A distribuição do grau de diferenciação tumoral nas peças operatórias dos pacientes nesse estudo de VOLPATO e KOCH (2008) foi semelhante a encontrada por LUPINACCI et al. (2003), onde avaliou indivíduos com câncer colorretal com idade abaixo e acima de 40 anos de idade.

No que se refere ao grau de diferenciação tumoral, existe uma clara associação entre esse e o estadio do tumor no momento da ressecção. O estadio tumoral e os tumores pouco diferenciados estão associados, sendo esses tumores mais avançados na ocasião da ressecção do que os tumores bem diferenciados.

Tumores indiferenciados e pouco diferenciados foram associados a uma maior extensão local, invasão de vasos e linfonodos, além de maior

risco de recidiva e metástases hepáticas, atribuindo-se a esses um prognóstico mais reservado. Portanto, quanto mais indiferenciado o tumor, pior será seu prognóstico. Por outro lado, tumores bem diferenciados respondem melhor à terapêutica adjuvante e têm velocidade de crescimento mais lenta, podendo ser detectados ainda em fases precoces (VOLPATO e KOCH 2008).

O número de linfonodos dissecados são dados importantes no sentido de informar a radicalidade da ressecção cirúrgica, no entanto, isso tem se tornado discutível, devido a dificuldade de análise histopatológica dos linfonodos após neoadjuvância.

No estudo de CAPIRCI et al. (2008) observamos que foram analisados uma média de 8,7 linfonodos e com uma mediana de 7. Outro estudo, o de WONG et al. (1999) obteve diferentemente uma média de 17 gânglios ressecados na peça operatória do CCR, e 38,6% dos pacientes tinham pelo menos 1 linfonodo positivo, sugerindo, que quanto maior o número de gânglios dissecados maior a probabilidade de encontrarmos linfonodos positivos.

As metástases ganglionares são um outro fator importante avaliado na peça de ressecção do CCR. Sua importância vem do fato de que a linfadenectomia associada à ressecção do CCR é reconhecida desde 1908, quando Miles demonstrou que há uma tendência à recidiva tumoral na região de drenagem linfática do reto.

DUKES e BUSSEY (1958) por sua vez, concluíram que as metástases ganglionares representam o fator prognóstico de maior importância no que

diz respeito à recorrência e sobrevida no CCR. Quando presente após terapia neoadjuvante, são ainda maior fator prognóstico no câncer de reto, superadas apenas pela margem de ressecção circunferencial.

LAUZA et al. (2006) demonstraram que a análise de um pequeno número de linfonodos regionais pode resultar em um sub-estadiamento de tumores classificados como N0 e gânglios maiores que 3mm de diâmetro deveriam ser considerados metastáticos pela classificação TNM, razão pela qual alguns pacientes sem metástases linfonodais têm recorrência pós-operatória ou desenvolvem metástases.

Estudos recentes têm mostrado que a neoadjuvância com radio/quimioterapia tem sido associada a uma diminuição no estadiamento patológico para T (tumor) e para o estado nodal em torno de 60% daqueles tratados. Além disso, existe uma redução dos linfonodos nos espécimes das procto-colectomias de pacientes tratados com terapia neoadjuvante.

Devido a isso, acredita-se que nem todos os espécimes vão conter 12 linfonodos em pacientes após neoadjuvância, como recomenda a *American Joint Committee on Cancer* e a *International Union Against Cancer*. E que este achado de menor número de linfonodos não é causado por uso irregular das técnicas dos cirurgiões ou dos patologistas (AMAJOI et al. 2013).

Já a metanálise de RAHBARI et al. (2012), relata que embora a recomendação de guidelines atuais recomendem um número mínimo de 12 linfonodos avaliados para se ter certeza de uma análise patológica adequada, nossas análises demonstraram que o valor prognóstico da detecção de moléculas de células tumorais, sendo independente da

quantidade de linfonodos. Por isso, técnicas de análise de linfonodos sentinela deveriam ser uma estratégia eficiente para melhorar o estadiamento de pacientes com uma doença nodal negativa.

A regressão tumoral do tumor primário foi semi-quantitativamente determinado pela quantidade de células tumorais viáveis versus a quantidade de fibrose, variando de ausência de efeitos após tratamentos à resposta completa, sem a presença de células tumorais identificadas, como foi descrito por DWORAK et al. (1997) TRG0 (Tumor regression grade 0)- foi definido como tumor sem regressão, TRG1- regressão pequena (tumor dominante com fibrose em $\leq 25\%$ da massa tumoral), TRG2- regressão moderada (tumor dominante com fibrose em 26-50% da massa tumoral), TRG3- boa regressão (mais que 50% de regressão tumoral) e TRG4- regressão total (sem a presença de células tumorais, apenas uma massa fibrótica).

De acordo com nossos dados podemos dizer que TRG4, ou seja sem lesão ocorreu em 18,3% dos indivíduos após neoadjuvância com radio/quimioterapia. TRG3, em 48,6%, TRG2, em 17,4% e TRG1 em 15,6% (DWORAK et al. 1997).

Após radio/quimioterapia pré-operatória, a terapia induzindo efeitos de downsizing” tem sido descrito amplamente como um fator prognóstico importante. Muitos pacientes apresentam resposta patológica local moderada com a presença de células residuais tumorais com infiltração (ypT2/3). Este grupo de pacientes com resposta intermediária é de particular interesse, uma vez que representa uma vasta subcategoria, cujo

prognóstico é difícil de se classificar. Dentro desse grupo de transgressão da parede retal e de infiltração do compartimento mesoretal ($\geq$ ypT3) existe uma distinção com impacto desconhecido no prognóstico. Subclassificação de ypT3 no câncer retal tem se tornado um fator de risco confiável para recorrência do câncer em pacientes submetidos a cirurgia primária, mas essa relevância prognóstica após radio/quimioterapia ainda está pouco definida (SPRENGER et al. 2010)

De acordo com SPRENGER et al. (2010), o estado linfonodal residual é capaz de prever de forma mais importante a evolução individual em respondedores intermediários a radio/quimioterapia pré-operatória. Além disso, o estadió ypT e a graduação tumoral tornam-se fatores auxiliares adicionais. Estudos clínicos futuros para terapia adjuvante deveriam ser baseados nas sinopses de parâmetros clínicos patológicos.

Na nossa análise observamos que a taxa de resposta patológica completa (pCR) está de acordo com os estudos de DAS et al. (2007) um estudo que avaliou 562 pacientes entre 1989 e 2004 e que 108 (19%) apresentaram resposta patológica completa, onde 20% tinham apenas doença residual microscópica na peça cirúrgica e 61% apresentaram doença residual macroscópica.

Os mesmos resultados foram confirmados na metanálise de MARTIN et al. (2012), onde a média de pCR foi de 24,4 (variando de 10,3 a 91,3%). Já nos estudos europeus a ypCR variou de 11-16% e mais recentemente alguns estudos randomizados fase IIb mostraram ypCR variando de 24-36% (CAPIRCI et al. 2008).

Já TULCHINSKY et al. (2008) evidenciaram que aumentando o intervalo entre a neoadjuvância e a cirurgia para mais que 7 semanas melhoraram a pCR para 35% comparado com 17% quando eram submetidos a cirurgia após 7 semanas. Similarmente KALADY et al. (2009) encontraram que aumentando o intervalo para mais de 8 semanas estava associado com maior frequência de pCR e melhora no controle local e da sobrevida geral.

HABR-GAMA (2006) advogam por outro lado, uma política expectante para pacientes com pCR após neoadjuvância com radio e quimioterapia. Contudo, quando essa abordagem falha, a sobrevida é significativamente comprometida por uma recidiva sistêmica.

Downstaging do tumor (T) ocorreu em 57% na análise de DAS et al. (2007) sendo semelhante ao nosso estudo. Já na avaliação de PARK et al. (2010), que avaliou 108 pacientes no período de 2004 a 2008 o *downstaging* ocorreu em 64/108 indivíduos (59%). Outro estudo de TOPOVA et al. (2011) mostrou que de 121 pacientes (69,5%) mostraram modificação no estadió. Destes, 19 pacientes (15,7%), mostraram mudança na categoria do T (tumor) apenas, 74 (61,2%) casos mostraram modificações nas categorias T e N. Os 28 pacientes remanescentes (23,1%) mostraram mudança na categoria do N, apenas.

Recorrência tumoral na pélvis (pré-sacral, paredes da pelve ou anastomoses) foram consideradas recorrências locais e diagnosticadas por uma combinação de anormalidades clínicas, histopatológicas, bioquímicas e radiológica. Recorrência fora da pelve foi considerada à distância.

Na metanálise de MARTIN et al. (2012) tumores com pCR completa apresentaram 4 vezes menos chance em desenvolver recidiva local quando comparado com os respondedores incompletos. Recidiva à distância ou metástases foram observadas em 8,7 % dos pacientes que tiveram uma pCR, com uma média de seguimento de 55,5 meses. Uma pCR foi associada com uma diminuição em 4 vezes na chance de desenvolver recidiva à distância (OR 0,23, 0,11 a 0,47; $P < 0,001$). Caso semelhante foi verificado no estudo de CAPIRCI et al. (2008) onde apenas 1,2% apresentaram recidiva pélvica e 8,9% com metástases à distância

MAAS et al. (2010) publicaram um estudo comparativo sobre a evolução oncológica dos pacientes com ou sem pCR (resposta patológica completa). A taxa de sobrevida livre de doença em 5 anos nos pacientes com pCR foi de 83,3% comparado com 65,6% dos respondedores incompletos. A recorrência local em 5 anos foi de 2,8% versus 9,7% e a frequência de metástases à distância foi de 11,2% versus 25,2%. Estes achados foram similares aos encontrados no estudo de MARTIN et al. (2012).

O desafio está em identificar aqueles pacientes com verdadeira pCR (resposta patológica completa) que poderiam ser poupados da cirurgia radical, e similarmente pacientes com pCR que deveriam se beneficiar com a quimioterapia adjuvante para minimizar o risco subsequente de recidiva local ou à distância.

De acordo com MARTIN et al. (2012) a pCR está associada com uma evolução oncológica a longo prazo excelente, praticamente erradicando

recidiva local e alcançando menores frequências de recidiva à distância com altas taxas de sobrevida geral e sobrevida livre de doença.

De forma contrária PUCCIARELLI et al. (2004) não encontraram benefício na sobrevida associado com pCR. Outro estudo, realizado por ONAITIS et al. (2001) também não demonstrou uma vantagem na sobrevida de 30 pacientes que tiveram resposta completa, porém a interpretação desses dados foi limitado devido a um seguimento de 27 meses. O mesmo ocorreu no primeiro estudo que também teve um seguimento relativamente curto de 40 meses.

Alguns estudos retrospectivos têm investigado o papel preditivo e prognóstico nos tumores colorretais de vários marcadores moleculares envolvidos na proliferação, apoptose, neoangiogênese, proteínas de reparo do DNA, metabólitos do 5-fluorouracil. Estes estudos têm produzido resultados conflitantes, e vários estudos vem sendo conduzidos no câncer de reto.

Um mecanismo molecular que está frequentemente envolvido no desenvolvimento e progressão de algumas malignidades humanas, incluindo o câncer colorretal, é representado por erros de replicação celular. Tumores com proteínas de reparo do DNA não funcionantes apresentam uma instabilidade de microsátélites, que é caracterizada por pequenas inserções ou deleções dentro de pequenas “tandem repeats” no DNA quando comparadas com o DNA normal correspondente. Instabilidade de microsátélites têm sido demonstrado em pacientes com carcinoma colorretal não polipóide hereditário (HNPCC). A frequência de instabilidade de

microsatélites (MSI) vem sendo relatado como variando de 10 a 20% nos carcinomas de cólon esporádicos e de aproximadamente 75% nos tumores de pacientes com HNPCC (COLOMBINO et al. 2002).

Embora a instabilidade de microsatélites (MSI) seja característica de tumores com Síndrome de Lynch (LS), este pode ser encontrado em cerca de 15% de grupos não selecionados de CCR. Destes 20 a 25% representam Síndrome de Lynch e 75% a 80% são esporádicos, causados por metilação, induzindo o silenciamento de MLH1 (LYNCH et al. 2009).

A instabilidade de microsatélites (MSI), especialmente no câncer de cólon esporádico é comumente visto nos tumores proximais e tem sido relatado em estudos prévios como um fator prognóstico favorável no câncer de cólon (OHRLING et al. 2010).

Em nossa casuística, apenas 1,8% dos pacientes apresentou perda de expressão das proteínas de reparo do DNA. Embora pareça haver uma possível associação entre a perda de expressão das proteínas de reparo e a resposta patológica completa, o número de casos foi muito pequeno em nossa casuística (MLH1 – ausente em 0,9%, PMS2- ausente em 0,9%, MSH6- ausente em 0,9%, MLH1 e PMS2 no mesmo paciente) para predizer uma resposta patológica. Portanto, a baixa frequência de defeito em sistemas de reparo do DNA, pode limitar o uso dessa ferramenta para predição de resposta a tratamento neoadjuvante em carcinomas de reto.

A incidência de MSI-H tem sido relatado estar abaixo de 10% nos cânceres de reto, enquanto 15 a 20% no câncer de cólon são MSI-H (HONG et al. 2012). Embora o estudo de COLOMBINO et al. (2002) tenha

relatado 19% de MSI-H para câncer retal com uma pequena amostra de 91 casos, a incidência de instabilidade foi detectada em frequências maiores nos pacientes da Sardenia na Itália em comparação com aqueles originados de outras áreas no sul da Itália. Já no estudo de NILBERT et al. (1999) a frequência de MSI foi de 2%.

E essa frequência de MSI parece diminuir de forma decrescente no sentido de tumores localizados no cólon proximal/ transverso para os localizados no cólon distal e reto. Apesar de sua baixa prevalência no câncer retal, MSI tem sido associada com a presença de mutações nas duas principais proteínas de reparo-hMLH1 e hMSH2 (COLOMBINO et al. 2002)

O estudo de NILBERT et al. (1999), também analisou a instabilidade de microssatélite em uma série consecutiva de 165 pacientes com câncer de reto e destes apenas 3 (2%) apresentaram MSI. Este achado estava de acordo com LOTHE et al (1993) que encontraram MSI em 1/105 casos de câncer de reto.

O estudo de HONG et al. (2012), mostrou que MSI- H foi menos frequente no câncer retal que no câncer de cólon e que a história familiar dos pacientes com câncer colorretal foi mais frequente em MSI-H com câncer retal que MSS/MSI- L (20% versus 4,0%; $P= 0,011$).

A MSI no câncer retal, em contraste com o câncer colônico, parece ser um fator prognóstico adverso. Isto pode ser relacionado com uma alta frequência dos cânceres associados à síndrome de Lynch nos tumores de reto MSI- H (instabilidade de microssatélites com alta frequência) e /ou o

efeito da radiação e da quimioterapia no câncer associado com Lynch ou tumores MSI-H em geral (SAMOWITZ et al. 2009).

O estudo de SHIN et al. (2013), também utilizou a instabilidade de microsátélites como preditor de sensibilidade à radioterapia. No entanto, essa relação não foi demonstrada, pois estes estudos envolveram coortes pequenas ($n < 100$), onde o número de câncer retal com MSI é esperado ser baixo. Contudo há evidências moleculares de que as proteínas dos genes de reparo do DNA possam ter um papel importante na resposta à radioterapia e que o fenótipo MSI, contribui para o processo molecular nas células expostas à radioterapia, pois as lesões causadas pela radiação à nível celular iniciam um complexo molecular de resposta aos danos do DNA, através de vias que levam a parada do ciclo celular, reconstituindo a lesão e se esse sistema falhar ocorrerá a apoptose (SHIN et al. 2013).

Pacientes com tumores MSI-H tendem a ser diagnosticados em estadio inicial e tem uma sobrevida geral mais longa que aqueles com tumores apresentando estabilidade de microsátélites. Uma metanálise estimou um risco relativo para sobrevida geral associado com MSI de 0,65 (95% intervalo confiança 0,59 - 0,71) (POPAT et al. 2005). Em adição, outros estudos tem sugerido que a sensibilidade a quimioterapia é afetada pelo status MSI. Notavelmente, foi relatado que tumores com resposta a regime fluorouracil (FU) variaram de acordo com o status MSI (RIBIC et al. 2003). Contudo, essa observação não tem sido sempre consistente, e outros estudos tem relatado dados conflitantes com pacientes com tumores MSI-H, que apresentam evolução similar ou melhor com tratamentos

baseados em 5-FU, comparado com aqueles tumores MI estáveis (HEMMINKI et al. 2000; ELSALEH et al. 2000). Além disso, o impacto do status MSI não tem sido amplamente avaliado no câncer retal, que é sabido ter uma frequência mais baixa de tumores MSI-H que o câncer cólon (HONG et al. 2012).

No estudo de HONG et al. (2012), quando focamos o câncer retal, a implicação de MSI como um marcador prognóstico não é clara. Um estudo prévio relatou que MSI-H (alta frequência de instabilidade de microssatélites) foi fortemente associado com melhor sobrevida livre de doença e sobrevida geral no câncer de reto (COLOMBINO et al. 2002). Contudo, outros estudos indicaram que MSI não foi um fator prognóstico (MENG et al. 2007), ou foi um pobre fator prognóstico no câncer retal (SAMOWITZ et al. 2009). Esta discrepância pode ser devido a diferenças étnicas, semelhante ao observado no estudo de COLOMBINO et al. (2002) com 19% de MSI, onde houve uma frequência alta de MSI na população estudada que era formada por moradores de uma região da Sardenha na Itália.

Duas técnicas (imuno-histoquímica e instabilidade de microssatélites) vem sendo usadas como ferramentas de *rastreamento* para identificação de HNPCC e essas técnicas apresentam equivalência em prever mutações germinativas sendo a imuno-histoquímica (IHC) superior nos casos de mutação de MSH6 (SHIA 2008).

A IHC, que foi utilizada para nossa análise, é mais disponível (acessível) e em geral menos cara, sendo capaz de detectar

especificamente os genes mutados. Suas principais limitações são o fato de poderem ser reduzidas pela experiência do patologista, não ocorrendo nesse estudo, pois os testes foram realizados por patologistas extremamente experientes. Outro fator importante é que vem sendo utilizada como primeira escolha para *rastreamento* no sentido de identificar pacientes para testes genéticos. Outra limitação importante da IHC é que se tiverem pequenas amostras de biópsias, poderão ter uma interpretação não confiável, algo que também não ocorreu nesse estudo, pois quando apresentaram amostras insuficientes os casos foram excluídos (SHIA 2008).

No teste da IHC os anticorpos são comercialmente disponíveis para MSH2, MSH6, MLH1 e PMS2. Apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 95% para detecção das proteínas de reparo do DNA, mas necessita uma experiência por parte dos patologistas.

No entanto, a técnica de instabilidade de microsatélites não deverá ser abandonada, pois pode ser utilizada para confirmação em situações onde a IHC é normal e ainda onde existem suspeitas clínicas, ou que a IHC seja inconclusiva. Este exame permanece também como uma ferramenta significativa para descobrir novas anormalidades das proteínas de reparo do DNA.

Entre as principais limitações da IHC, não podemos deixar de citar é a baixa sensibilidade ao MLH1. Contudo, como demonstrado em estudos recentes, isto é revertido pela adição de PMS2 ao painel de anticorpos (LYNCH et al. 2009).

Outro marcador avaliado através da imuno-histoquímica, foi a enzima TS, que é o principal alvo de ação do 5-FU. Ela fornece timidilato para síntese do DNA, levando a proliferação celular. Uma correlação inversa entre os altos níveis de expressão da TS ou níveis de RNAm nos tumores e a efetividade do 5-FU tem sido descrito (JOHNSTON et al. 1995; LENZ et al. 1998). Contudo, esses resultados não são consistentes, especialmente durante os estadios iniciais do câncer colorretal (ARRABUZI et al. 2013).

A análise realizada no nosso estudo baseou-se na identificação da presença ou não de expressão da Timidilato Sintetase (TS) na biópsia pré-neoadjuvância esse marcador molecular poderia predizer uma resposta patológica completa (pCR), porém não apresentou significância estatística quando avaliamos a relação entre a TS e os respondedores completos versus incompletos e nem quando tentamos avaliar entre os indivíduos que tiveram *downstaging* T, N e TN com a presença ou ausência da TS.

Em dois estudos realizados por JAKOB et al. (2005) mostraram que a alta expressão do gene ou da proteína da TS estavam associados com uma pobre resposta pelos tumores retais à neoadjuvância com radio e quimioterapia baseada no 5-FU. Em contraste os estudos (NEGRI et al. 2008; KIKUCHI et al. 2009; PAÉZ et al. 2011) que encontraram uma maior porcentagem de resposta tumoral com altos níveis da TS, como avaliado pela imuno-histoquímica (ARRABUZI et al. 2013).

Embora altas expressões da TS pareçam predizer pobre resposta, os resultados diferem consideravelmente. Enquanto alguns estudos mostram um benefício da terapia com 5-FU em tumores com alta expressão de TS

(KIKUCHI et al. 2009; CARLOMAGNO et al. 2010), outros descrevem o oposto (JAKOB et al. 2004 e 2005). Por outro lado, alguns não acharam uma clara associação entre a expressão da proteína TS e a resposta tumoral ao 5-FU (ARRABUZI et al. 2013)

Quando avaliados os resultados da imuno-histoquímica para TS, muitos usaram um *escore* de marcação com 4 ou 5 na graduação da escala. Outros sub-categorizaram a coloração como focal ou difusa. Enquanto dois estudos (ALLEGRA et al. 2003; JOHNSTON et al. 2003) não encontraram significância entre a coloração de TS e a evolução clínica dos pacientes, outros mostraram que a coloração difusa de TS estava associada a um melhor prognóstico. Contudo, as características da coloração não estavam consequentemente sendo usadas para atribuir o nível de expressão. Portanto, as diferenças nos níveis de expressão são diferentes nos diversos estudos. A existência de tal variabilidade suporta a necessidade de uma avaliação uniforme da expressão através da Imuno-histoquímica (JAKOB et al. 2005).

Não podemos deixar de relatar o fato de que a presença da TS observada pela imuno-histoquímica sofre também a interferência do polimorfismo observado no gene desses pacientes. Três principais polimorfismos genéticos no gene que codifica a TS têm sido descritos, e eles estão associados com a eficiência da tradução e a altos níveis da TS. O que foi verificado no estudo de PAÉZ et al. (2011), em que, uma alta frequência de resposta, foi observada nos genótipos 3R/3R da TS, 59% em 3*/3 versus 35% em 2*/2* e 2*/3*; $p=.013$. Ou seja, o polimorfismo do

genótipo da TS poderá ajudar a identificar os pacientes com câncer de reto, estadio II/III, com uma provável melhor evolução, após tratamento pré-operatório concomitante com radio e quimioterapia.

6 CONCLUSÃO

- 1 A perda de expressão das proteínas de reparo apresentou associação significativa com resposta patológica completa ($p=0,032$)
- 2 Apesar da associação significativa em nossa casuística, a baixa frequência de defeito em sistema de reparo de DNA, determinado por imuno-histoquímica, limita o uso dessa ferramenta para predição de resposta a tratamento neoadjuvante em carcinomas de reto.
- 3 A expressão imuno-histoquímica da Timidilato Sintetase não teve associação com a resposta patológica completa ($p=0,599$)

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ACS] American Cancer Society. **Gastrointestinal carcinoid tumors**. Last Revised: 11/2/2012. Available from: <URL:<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003102-pdf.pdf>> [2013 maio 12]

[ACS] American Cancer Society. **Cancer facts and figures 2011**. Available from: <URL:http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiology_surveillance/document/ACSPC-029771.pdf> [2012 set 12].

Aguiar S Jr, Lopes A, Soares FA, Rossi BM, Ferreira FO, Nakagawa WT, Carvalho AL, Filho WJ. Prognostic and predictive value of thymidilate synthase expression in patients with non metastatic colorectal cancer. **Eur J Surg Oncol** 2005;31(8):863-8.

Allegra CJ, Park S, Colangelo LH, et al. Prognostic value of thymidilate synthase, ki-67, and p53 in patients with Dukes'B and C colon cancer: a National Cancer institute- National Surgical Adjuvant Brest and Bowel Project collaborative study. **J Clin Oncol** 2003; 21:241-50.

Amajoyi R, Lee Y, Recio PJ, Kondylis PD. Neoadjuvant therapy for rectal cancer decreases the number of lymph nodes harvested in operative specimens. **Am J Surg** 2013; 205:289-92; discussion 292.

Araujo SE, Bammann RH, Seid VE, Nahas SC, Nahas CS, Cecconello I. Neoadjuvant chemoradiation therapy followed by curative transanal endoscopic microsurgery (TEM) for rectal cancer complicated by major suture dehiscence: avoiding ileostomy through hyperbaric oxygen therapy. **Int J Colorrectal Dis** 2011; 26:1359-61.

Arrabuzi V, Suárez J, Guerrero D, et al. Prognostic significance of thymidylate synthetase polymorphisms in rectal cancer patients treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. **Colorectal Dis** 2013; 15:428-35.

Aschele C, Cionini L, Lonardi S, et al. Primary tumor response to preoperative chemoradiation with or without oxaliplatin in locally advanced rectal cancer: pathologic results of the STAR- 01 randomized phase III trial. **J Clin Oncol** 2011; 29:2773-80.

Bertolini F, Bengala C, Losi L, et al. Prognostic and predictive value of baseline and posttreatment molecular marker expression in locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2007; 68:1455-61.

Bökkerink GM, de Graaf EJ, Punt CJ, et al. The CARTS study: chemoradiation therapy for rectal cancer in the distal rectum followed by organ-sparing transanal endoscopic microsurgery. **BMC Surg** 2011; 11:34.

Bosset JF, Collette L, Calais G, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. **N Engl J Med** 2006; 355:1114-23.

Ceelen WP. Progress in rectal cancer treatment. **ISRN Gastroenterol** 2012; 2012:648183.

Charara M, Edmonston TB, Burkholder S, et al. Microsatellite status and cell cycle association markers in rectal cancer patients undergoing a combined regimen of 5-FU and CPT-11 chemotherapy and radiotherapy. **Anticancer Res** 2004; 24:3161-8.

Capirci C, Valentini V, Cionini L, et al. Prognostic value of pathologic complete response after neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer: long- term analysis of 566 ypCR patients. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2008; 72:99-107.

Carlomagno C, Pepe S, D'Armiento FP et al. Predictive factors of complete response to neoadjuvante chemoradiotherapy in patients with rectal cancer. **Oncology** 2010; 78:369-75.

Colombino M, Cossu A, Manca A, et al. Prevalence and prognostic role of microsatellite instability in patients with rectal carcinoma. **Ann Oncol** 2002; 13:1447-53.

Das P, Skibber JM, Rodriguez-Bigas MA, et al. Predictors of tumor response and downstaging in patients who receive preoperative chemoradiation for rectal cancer. **Cancer** 2007; 109:1750-5.

Dedemadi G, Wexner SD. Complete response after neoadjuvant therapy in rectal cancer: to operate or not to operate? **Dig Dis** 2012; 30(Suppl 2):109-17.

Dellas K, Höhler T, Reese T, et al. Phase II trial of preoperative radiochemotherapy with concurrent bevacizumab, capecitabine and oxaliplatin in patients with locally advanced rectal cancer. **Radiat Oncol** 2013; 8:90.

Dionisi F, Musio D, Raffeto N, et al. Preoperative intensified radiochemotherapy for rectal cancer: experience of a single institution. **Int J Colorrectal Dis** 2011; 26:153-64.

Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemoterapy. **Int J Colorrect Dis** 1997; 12:19-23.

Du C, Zhao J, Xue W, Dou F, Gu J. Prognostic value of microsatellite in sporadic locally advanced rectal cancer following neoadjuvant radiotherapy. **Histopathology** 2013; 62:723-30.

Dukes CE, Bussey HJR. The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. **Br J Cancer** 1958; 12:309-20

Duldulao MP, Lee W, Streja L, et al. Distribution of residual cancer cells in the bowel wall after neoadjuvant chemoradiation in patients with rectal cancer. **Dis Colon Rectum** 2013; 56:142-9.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7^a ed. New York: Springer-Verlag, 2010. Colon and rectum; p.143-59.

Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, et al. Association of tumor site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. **Lancet** 2000; 355:1745-50.

Fernández-Martos C, Nogué M, Cejas P, Moreno-García V, Machancoses AH, Feliu J. The role of capecitabine in locally advanced rectal cancer treatment. **Drugs** 2012; 72:1057-73.

Garcia-Aguilar J, Chen Z, Smith DD, et al. Identification of a biomarker profile association with resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in rectal cancer. **Ann Surg** 2011; 254:486-92; discussion 492-3.

Gerard JP, Azria D, Gourgou-Bourgade S. Comparison of two neoadjuvant chemoradiotherapy regimens for locally advanced rectal cancer: results of the phase III Trial ACCORD 12/0405- Prodigé 2. **J Clin Oncol** 2010; 28:1638-44.

Glynne-Jones R, Hughes R. Critical appraisal of the “wait and see” approach in rectal cancer for clinical complete responders after chemoradiation. **Br J Surg** 2012; 99:897-909.

Habr-Gama A, Perez RO, Nadalin W, et al. Operative versus nonoperative treatment for stage 0 distal rectal cancer following chemoradiation therapy: long-term results. **Ann Surg** 2004; 240:711-7.

Habr-Gama A. Assessment and management of the complete clinical response of rectal cancer to chemoradiotherapy. **Colorectal Dis** 2006; 8 Suppl 3:21-4.

Habr-Gama, Perez RO, São Julião GP, Proscurshim I, Gama-Rodrigues J. The need for effective radiosensitizing agents: experience in patients with complete pathological response. **Anti-Cancer Drugs** 2011; 22:308-10.

Harriss DJ, Atkinson G, George K, et al. Lifestyle factors and colorectal cancer risk: systematic review and meta-analysis of associations with body mass index. **Colorectal Dis** 2009; 11:547-63.

Heald RJ, Ryall RD. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. **Lancet** 1986; 28:1479-82.

Hemminki A, Mecklin JP, Järvinen H, Aaltonen LA, et al. Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. **Gastroenterology** 2000; 119: 921-8.

Hong SP, Min BS, Kim TI, et al. The differential impact of microsatellite instability as a marker of prognosis and tumor response between colon cancer and rectal cancer. **Eur J Cancer** 2012; 48:1235-43.

Horisberg K, Treschl A, Mai S, et al. Cetuximab in combination with capecitabine, irinotecano, and radiotherapy for patients with locally advanced rectal cancer: results of phase II Margit trial. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2009;74:1487-93.

Huerta S. Critical concepts in the oncogenesis of adenocarcinomas of the rectum. **Crit Rev Oncog** 2012a; 17:323-9.

Huerta S. New directions in the preoperative management of adenocarcinomas of the rectum. **Crit Rev Oncog** 2012b; 17:393-6.

Hur H, Kang J, Kim NK, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism affects the response to preoperative 5-fluorouracil chemoradiation therapy in patients with rectal cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2011; 81:669-76.

Jakob C, Liersch T, Meyer W, et al. Immunohistochemical analysis of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, and dihydropyrimidine dehydrogenase in rectal cancer (cUICC II/III). correlation with histopathologic tumor regression after 5-fluorouracil- based long- term neoadjuvant chemoradiotherapy. **Am J Surg Pathol** 2005; 29:1304-9.

Jakob C, Liersch T, Meyer W et al. Immunohistochemical analysis of thymidilate synthase, thymidine phosphorylase, and dihydropyrimidine dehydrogenase in rectal cancer (cUICC II/ III): correlation with histopathologic tumor regression after 5 fluorouracil based long term neoadjuvante chemoradiotherapy. **Am J Surg Pathol** 2005; 29:1304-9.

Jeong DH, Lee HB, Hur H, Min BS, Baik SH, Kim NK. Optimal timing of surgery after neoadjuvant chemoradiation therapy in locally advanced rectal cancer. **J Korean Surg Soc** 2013; 84:338-45.

Johnston PG, Benson AB 3rd, Catalano P, et al. Thymidilate synthase protein expression in primary colorectal cancer: lack of correlation with outcome and response to fluorouracil in metastatic disease sites. **J Clin Oncol** 2003; 21:815-9.

Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, et al. Thymidylate Synthase gene and protein expression correlate and are associate with response to 5 FU in human colorectal and gastric tumors. **Cancer Res** 1995; 55:1407-12.

Kalady MF, de Campos-Lobato LF, Stocchi L, et al. Predictive factors of pathologic complete response after neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. **Ann Surg** 2009; 250:582-9.

Kang SB, Park JW, Jeong SY, et al. Open versus laparoscopic surgery for mid or low rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy (COREAN trial): short- term outcomes of an open label randomized controlled trial. **Lancet Oncol** 2010; 11:637-45.

Kapiteijn E, Conie, Mariejnen, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. **N Engl J Med** 2001; 345:638-46.

Karran P, Bignami M. DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability. **Bioessays** 1994; 16:833-9.

Kennecke H, Berry S, Wong R, et al. Preoperative bevacizumab, capecitabine, oxaliplatin and radiation among patients with locally advanced or low rectal cancer: phase II trial. **Eur J Cancer** 2012; 48:37-45.

Kikuchi M, Mikami T, Sato T, et al. High Ki67, Bax and Thymidylate synthase expression well correlates with response to chemoradiation therapy in locally advanced rectal cancers: proposal of logistic model for prediction. **Br J Cancer** 2009; 101:116-23.

Kim DW, Kim DY, Kim TH, et al. Is T classification still correlated with lymph node status after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer? **Cancer** 2006; 106:1694-700.

Kirzin S, Lo Dico R, Portier G, Pocard M. What is established contribution of laparoscopy in the treatment of rectal cancer? **J Visc Surg** 2012; 149:371-9.

Kosinski L, Habr-Gama A, Ludwing K, Perez R. Shifting concepts in rectal cancer management: a review of contemporary primary rectal cancer treatment strategies. **CA Cancer J Clin** 2012; 62:173-302.

Kuo LJ, Chiou JF, Tai CJ, et al. Can we predict pathologic complete response before surgery for locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiation therapy? **Int J Colorrectal Dis** 2012; 27:613-21.

Lauza G, Gafà R, Santini A, Maestri I, Guerzoni L, Cavazzini L. Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcomes in stage II and III colorectal cancer patients. **J Clin Oncol** 2006; 24:2359-67.

Lenz HJ, Hayashik, Salonga D, et al. p53 point mutations and thymidylate synthase messenger RNA levels in disseminated colorectal cancer: an analysis of response and survival. **Clin Can Res** 1998; 4:1243-50.

Lipworth L, Bender TJ, Rossi M, et al. Dietary vitamin D intake and cancers of the colon and rectum: a case- control study in Italy. **Nutr Cancer** 2009; 61:70-5.

Lothe RA, Peltomäki P, Meling GI, et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. **Cancer Res** 1993, 53:5849-52.

Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, rastreamento, differential diagnosis, and medico legal ramifications. **Clin Genet** 2009; 76:1-18.

Lupinacci RM, Campos FG, Araújo SE, et al. Análise comparativa das características clínicas, anátomo-patológica e sobrevida entre pacientes com câncer colo-retal abaixo e acima de 40 anos de idade. **Rev Bras Coloproct** 2003; 23:155-62.

Maas M, Nelemans PJ, Valentini V, et al. Long Term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data. **Lancet Oncol** 2010; 11:835-44.

MacGregor TP, Maughan TS, Sharma RA. Pathological grading of regression following neoadjuvant chemoradiation therapy: the clinical need is now. **J Clin Pathol** 2012; 65:867-71.

Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma: clinicopathologic correlations. **Cancer** 1994; 73:2680-6.

Martin ST, Heneghan HM, Winter DC. Systematic review and meta – analysis of outcomes following pathological complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer. **Br J Surg** 2012; 99:918-28.

Meng WJ, Sun XF, Tian C, et al. Microsatellite instability did not predict individual survival in sporadic stage II and III rectal cancer patients. **Oncology** 2007; 72:82-8.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2012 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Mohiuddin M, Mohiuddin MM, Marks J, Marks G. Future directions in neoadjuvant therapy of rectal cancer: Maximizing pathological complete response rates. **Cancer Treat Rev** 2009; 35:547-52.

Nakagawa WT, Rossi BM, de O Ferreira F, et al. Chemoradiation instead of surgery to treat mid and low rectal tumors: is it safe? **Ann Surg Oncol** 2002; 9:568-73.

Negri FV, Campanini N, Camisa R, et al. Biological predictive factors in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy or radiotherapy. **Br J Cancer** 2008; 98:143-7.

Nilbert M, Plank M, Fernebro E, Borg A, Johnson A. Microsatellite instability is rare in rectal carcinomas and signifies hereditary cancer. **Eur J Cancer** 1999; 35:942-5.

Onaitis MW, Noone RB, Fields R, et al. Complete response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer does not influence survival. **Ann Surg Oncol** 2001; 8:801-6.

Öhrling K, Edler D, Hallström M, Ragnhammar P. Mismatch repair protein expression is an independent prognostic factor in sporadic colorectal cancer. **Acta Oncol** 2010; 49:797-804.

Öhrling K, Karlberg M, Edler D, et al. A combined analysis of mismatch repair status and thymidylate synthase expression. In stage II and III colon cancer. **Clin Colorectal Cancer** 2013; 12:128-35.

Paéz D, Salazar J, Paré L, et al. Pharmacogenetic study in rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy: polymorphisms in thymidylate synthase, epidermal growth factor receptor, GSTP1, and DNA repair genes. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2011; 81:1319-27.

Park YJ, Oh BR, Lim SW, et al. Clinical significance of tumor regression grade in rectal cancer with preoperative chemoradiotherapy. **J Korean Soc Coloproctol** 2010; 26:279-86.

Peeters KC, Kapiteijn E, van de Velde CJ, Dutch ColoRectal Cancer Group. Managing rectal cancer: The Dutch experience. **Colorectal Dis** 2003; 5:423-6.

Pinho M, Rossi BM. Câncer colorretal: modelo ideal para a compreensão da carcinogênese. In: Rossi BM, Pinho M, editores. **Genética e biologia molecular para o cirurgião**. São Paulo: Lemar; 1999. p.143-72.

Pinho M. Resposta completa à terapia neoadjuvante no câncer de reto: apenas sorte ou um resultado previsível? **Rev Bras Colo-Proctol** 2007; 27:474-8.

Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. **J Clin Oncol** 2005; 23:609-18.

Popek S, Tsikitis VL. Neoajuvant vs adjuvant pelvic radiotherapy for locally advanced rectal cancer: wich is superior?. **World J Gastroenterol** 2011; 17:848-54.

Pucciarelli S, Toppan P, Friso ML, et al. Complete pathologic response following preoperative chemoradiation therapy for middle to lower rectal cancer is not a prognostic factor for a better outcome. **Dis Colon Rectum** 2004; 47:1798-807.

Qiu HZ, Wu B, Xiao Y, Lin GL. Combination of differentiation and T stage can predict unresponsiveness to neoadjuvant therapy for rectal cancer. **Colorrectal Dis** 2011; 13:1353-60.

Rahbari NN, Bork U, Motschall E, et al. Molecular detection of tumor cells in regional lymph node is associated with disease recurrence and poor survival in node- negative colorectal cancer: a systematic review and meta- analysis. **J Clin Oncol** 2012; 30:60-70.

Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite- instability status as a predictor of benefit from fluorouracil – based adjuvant chemotherapy for colon cancer. **N Engl J Med** 2003; 349:247- 57.

Roedel C, Becker H, Fietkau R, et al. Preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy with 5-fluorouracil and oxaliplatin versus 5-fluorouracil alone in locally advanced rectal cancer: First results of the German CAO/ARO/AIO-04 randomized phase III trial [abstract] **J Clin Oncol** 2011; 29:LBA3505. [Presented at 2011 ASCO Annual Meeting, 2011 June 3-7; Chicago (II)].

Roh MS, Yothers GA, O'Connell MJ, et al. The impact of capecitabine and oxaliplatin in the preoperative multi- modality in patients with carcinoma of

the rectum: NSABP R-04 [abstract] **J Clin Oncol** 2011; 29:A3503. [Presented at 2011 ASCO Annual Meeting, 2011 June 3-7; Chicago (IL)].

Ruder EH, Laiyemo AO, Graubard BI, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Cross AJ. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer risk in a large, prospective cohort. **Am J Gastroenterol** 2011; 106:1340-50.

Rule W, Meyer J. Current status of radiation therapy for the management of rectal cancer. **Crit Rev Oncog** 2012; 17:331-43.

Samme A, Selvasekar CR. Current trends in staging rectal cancer. **World J Gastroenterol** 2011; 17:828-34.

Samowitz WS, Curtin K, Wolff RK, Tripp SR, Caan BJ, Slattery ML. Microsatellite instability and survival in rectal cancer. **Cancer Causes Control** 2009; 20:1763-8.

Sauer R, Becker H, Hohenberger W, et al: Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. **N Engl J Med** 2004; 351:1731-1740.

Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for rastreamento colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. **J Mol Diagn** 2008; 10:293-300.

Shin JS, Tut TG, Yang T, Lee CS. Radiotherapy response in microsatellite instability related rectal cancer. **Korean J Pathol** 2013; 47:1-8.

Spindler KL, Nielsen JN, Lindebjerg J, et al. Germline polymorphisms may act as predictors of response to preoperative chemoradiation in locally advanced T3 rectal tumors. **Dis Colon Rectum** 2007; 50:1363-9.

Sprenger T, Rothe H, Jung K, et al. Stage II/III rectal cancer with intermediate response to preoperative radiochemotherapy: Do we have indications for individual risk stratification? **World J Surg Oncol** 2010; 8:27.

Stein DE, Mahmoud NN, Anné PR, et al. Longer time interval between completion of neoadjuvant chemoradiation and surgical resection does not improve downstaging of rectal carcinoma. **Dis Colon Rectum** 2003; 46:448-53.

Stoehlmacher J, Goekkurt E, Mogck U, et al. Thymidylate synthase genotypes and tumor regression in stage II/III rectal cancer patients after neoadjuvant fluorouracil-based chemoradiation. **Cancer Lett** 2008; 272:221-5.

Tan BR, Thomas F, Myerson RJ, et al. Thymidylate synthase genotype-directed neoadjuvant chemoradiation for patients with rectal adenocarcinoma. **J Clin Oncol** 2011; 29:875-83.

Taglietti PM, Aguiar S, Jr, Divino PHA, et al. Role of clinical variables for predicting pathologic response to neoadjuvant chemoradiation in locally advanced rectal cancer [abstract]. **J Clin Oncol** 2013; 31(suppl)Ae14691. [Presented at 2013 ASCO Annual Meeting, 2013 May 31 - June 04, Chicago-IL.

Tveit KM, Guren T, Glimelius B, et al. Phase III trial of cetuximab with continuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX) versus FLOX alone in first line treatment of metastatic colorectal cancer: the NORDIC – VII study. **J Clin Oncol** 2012; 30:1755-62.

Topova L, Hellmich G, Puffer E, et al. Prognostic value of tumor response to neoadjuvant therapy in rectal carcinoma. **Dis Colon Rectum** 2011; 54:401-11.

Trakamsanga A, Ithimakin S, Weiser MR. Treatment of locally advanced rectal cancer: controversies and questions. **World J Gastroenterol** 2012; 18:5521-32.

Tulchinsky H, Shmueli E, Figer A, Klausner JM, Rabau M. An Interval >7 weeks between neoadjuvant therapy and surgery improves pathologic complete response and disease free survival in patients with locally advanced rectal cancer. **Ann Surg Oncol** 2008; 15:2661-7.

Vallböhmer D, Bollschweiler E, Brabender J, et al. Evaluation of histological regression grading systems in the neoadjuvant therapy of rectal cancer: do they have prognostic impact?. **Int J Colorrectal Dis** 2012; 27:1295-301.

Van der Pas MHGM, Haglind E, Cuesta MA, et al. Laparoscopic versus open surgery for rectal cancer (COLOR II): short- term outcomes of a randomized, phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2013; 14:210-8.

Velenik V, Ocvirk J, Music M, et al. Neoadjuvant capecitabine,radiotherapy, and bevacizumab (CRAB) in locally advanced rectal cancer: results of an open-label phase II study. **Radiat Oncol** 2011; 6:105.

Villafranca E, Okruzhnov Y, Dominguez MA, et al. Polymorphisms of the repeat sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. **J Clin Oncol** 2001; 19:1779-86.

Volpato MG, Koch KS. Fatores de mau prognóstico nas peças operatórias de pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico do câncer colorretal. **Rev Bras Coloproctol** 2008; 28:414-24.

Weiss C, Arnold D, Dellas K. Preoperative radiotherapy of advanced rectal cancer with capecitabine and oxaliplatin with or without cetuximab; a pooled analysis of three prospective phase I – II trials. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2010; 78:472-8.

Weller JM, Warrem BF, Mortensen NJ, et al. Quantification of histologic regression of rectal cancer after irradiation: a proposal for a modified staging system. **Dis Colon Rectum** 2002; 45:1051-6.

Williams JT, Quirke P, Shepherd NA. **Dataset for Colorectal Cancer**. 2nd ed. London: The Royal College of Pathologists, 2007. (Update September 2007). <URL:<http://www.rcpath.org/resources/rcpath/migrated%20resources/Documents/G/G049-Colorectal-Dataset-sep-07.pdf>> [2012 maio 12].

Wong BJH, Severino R, Honnebier MB, et al. Number of nodes examined and staging accuracy in colorectal carcinoma. **J Clin Oncol** 1999; 17:2896-900.

Anexo 1 - A Escala de resultados ou desempenho de Karnofsky-critérios (%)

Apto para atividades normais e trabalho; nenhum cuidado especial é necessário.	100	Normal; nenhuma queixa; nenhuma evidência de doença.
	90	Capacitado para atividades normais. Pequenos sinais e sintomas.
	80	Atividade normal com esforço. Alguns sinais e sintomas de doença.
Inapto para o trabalho; apto para viver em casa e cuidar de muitas de suas necessidades. As quantidades de assistência e suporte necessários são bastante variáveis.	70	Cuidados para si, incapaz para seguir com atividades normais ou trabalho ativo.
	60	Requer ajuda ocasional, porém apto a cuidar de muitas de suas necessidades pessoais
	50	Requer ajuda considerável e freqüente assistência médica ou especializada.
Inapto para cuidar de si mesmo; requer cuidados hospitalares ou equivalentes especializado; doença pode estar progredindo rapidamente.	40	Incapacitado; requer cuidado especial e assistência.
	30	Severamente incapacitado; admissão hospitalar é indicada, mas a morte não é iminente
	20	Muito doente; admissão hospitalar é necessária, necessitando de terapia e cuidados intensivos
	10	Moribundo; processo de fatalidade progredindo rapidamente.
	0	Morte

Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro por meio deste termo, que concordo em participar na pesquisa, referente ao projeto intitulado – “Identificação de perfis Imuno-histoquímicos como preditores de resposta à radioterapia e quimioterapia neoadjuvantes em adenocarcinomas de reto”, desenvolvido pelo Dr. Samuel Aguiar Junior (pesquisador responsável). A quem poderei contatar/ consultar a qualquer momento que julgar necessário através do endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211, liberdade, São Paulo – SP- CEP: 01509-010, telefone: (11) 2189-5000, e-mail: samuel.aguiar@hcancer.org.br.

Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres humanos da Fundação Antônio Prudente – Hospital do Câncer – A.C.Camargo/SP pelo telefone (11)2189-5000, ramais 2069 ou 5020. De segunda- feira à quinta - feira das 7h às 18h e sexta – feira das 7 horas às 16 horas.

Fui informado dos objetivos estritamente acadêmicos do estudo, que é de avaliar o papel da expressão Imuno-histoquímica de Timidilato Sintetase; e das proteínas de reparo de DNA como fatores preditivos de resposta a radio e quimioterapia neoadjuvante em adenocarcinomas de reto.Podemos dizer de uma forma mais simples que o objetivo do estudo é avaliar características dos tumores do reto distal,e através destas sugerir quem irá responder ou respondeu melhor aos esquemas de radio e quimioterapia.

Trata-se de um estudo observacional caso controle com coleta prospectiva retrospectiva dos dados, onde serão incluídos 100 pacientes com adenocarcinoma de reto até 8 cm da linha pectínea, com estadios T3, T4 ou N+, índice de Karnofsky maior que 70%,contagem de leucócitos maior que 3.500/mm³, neutrófilos maior que 1.500/ mm³ e de plaquetas maior que 100.000/ mm³; creatinina sérica abaixo de 1,5 mg/ dL; dosagem sérica de

bilirrubinas dentro do limite da normalidade e de transaminases até duas vezes o valor normal; sinais de insuficiência cardíaca que impeçam o uso de 5FU.

Para os casos retrospectivos será feita avaliação através de prontuários e lâminas de parafina já coletadas que serão submetidos a exame Imuno-histoquímico. Para os prospectivos os pacientes serão submetidos a anamnese e exame locorregional que incluirá retoscopia rígida, com determinação exata da distância entre o limite distal do tumor e a linha pectínea e coleta de biópsia (antes da radio e quimioterapia) que serão encaminhados para exame de Imuno-histoquímica.

A finalidade de descobrir específicos biomarcadores baseia-se no sentido de prever uma resposta tumoral e prevenir uma significativa proporção de pacientes a serem desnecessariamente expostos aos efeitos da radio e quimioterapia.

Afirmo que aceito participar por minha própria vontade, sem receber qualquer incentivo financeiro ou ter qualquer ônus e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa. Portanto, não será cobrado nada, não haverá gastos e nem riscos na sua participação. Não estão previstos ressarcimentos ou indenizações. Não há nenhum risco, prejuízo, desconforto ou lesões que podem ser provocados pela pesquisa.

Fui também esclarecido (a) de que os usos das informações por mim oferecidas estão submetidos às normas éticas destinadas à pesquisa envolvendo seres humanos, da Comissão Nacional Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde.

Minha colaboração se fará de forma anônima por meio de entrevistas, exames, coleta de materiais e análise de meu prontuário. A ser gravada a partir da assinatura desta autorização. O acesso e a análise dos dados coletados se farão apenas pelo(a) pesquisador(a) e/ ou por seu(s) orientador(es)/coordenador(es). Seu nome não será utilizado em qualquer fase da pesquisa o que garante o seu anonimato.

Fui informado(a) de que posso me retirar desse estudo/ pesquisa/ programa a qualquer momento, sem prejuízo para o meu acompanhamento ou sofrer quaisquer sanções ou constrangimentos.

Atesto o recebimento de uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme recomendações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do participante: _____

Assinatura do pesquisador (a): _____

Assinatura do(a) testemunha: _____

Anexo 3 - Termo de dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido



TERMO DE DISPENSA DO CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

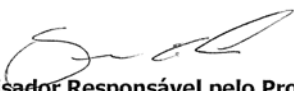
Referente à análise do projeto de pesquisa intitulado: "Identificação de perfis imunoistoquímicos como preditores de resposta à radioterapia e quimioterapia neoadjuvantes em adenocarcinomas de reto".

Eu, Samuel Aguiar Júnior, CRM-SP: 84495, Pesquisador Responsável pelo presente Projeto de Pesquisa a ser conduzido na Fundação Antonio Prudente - Hospital A C Camargo localizado Rua Professor Antonio Prudente, 211 – Departamento de Anatomia Patológica – São Paulo – SP, 01509-900, por este termo, solicito ao Comitê de Ética desta instituição a **dispensa** do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em razão desta pesquisa apresentar caráter retrospectivo, por se tratar de amostras já coletadas e arquivadas no Departamento de Anatomia Patológica, sem nenhuma interferência sobre tratamento ou prognóstico dos pacientes já tratados. Comprometo-me:

- a preservar a privacidade dos sujeitos de pesquisa cujos dados serão coletados;
- que as informações serão utilizadas única e exclusivamente para a execução do projeto em questão;
- que as informações somente serão divulgadas de forma anônima, não sendo usadas iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificar o sujeito da pesquisa.

Esperando ter atendido satisfatoriamente às exigências desse Comitê, aguardamos retorno.

Atenciosamente,

XXXX 
Pesquisador Responsável pelo Projeto
Data: ____/____/____

Anexo 4 - Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 10 de abril de 2012.

Ao
Dr. Samuel Aguiar Júnior

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1620/11

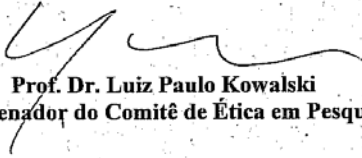
“Identificação de perfis imunoistoquímicos como preditores de resposta à radioterapia e quimioterapia neoadjuvantes em adenocarcinomas de reto”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 27/03/2012, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 29/11/2011, aprovaram a realização do estudo em referência, datado de 18 de dezembro de 2011, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração sobre plano de recrutamento dos sujeitos de pesquisa, circunstâncias e responsáveis pela obtenção do TCLE;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido (material armazenado);
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Cirurgia Pélvica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cirurgia Pélvica.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 06 meses.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 5 - Questionário de Avaliação dos casos

Questionário de Avaliação

Nome:

RGH

Idade

Sexo:

Data da biopsia:

Número da biopsia 1

Número da biopsia 2

Distância LP: ☐ 0 a 4 cm ☐ 4,5 a 8cm ☐ acima de 8 cm

CEA:

Exame de Estadiamento Locorregional: ☐ TC ☐ RNM

Estadiamento: T ☐ cT1 ☐ cT2 ☐ cT3 ☐ cT4

N ☐ No ☐ N+

M ☐ M0 ☐ M1

Data de início da Radioterapia:

Tipo de Equipamento e planejamento: ☐ AI conformacional ☐ AI Convencional ☐ IMRT

Dose total de Rxt: ☐ 45 Gy ☐ 50,4 Gy ☐ 54 Gy ☐ não completou tt

Esquema de Qt concomitante: ☐ 5- Fu em bolus ☐ 5- Fu infusional ☐ Xelox

Data do término da Rxt:

Grau de toxicidade ☐ nenhuma ☐ grau 1 ☐ grau 2 ☐ grau 3 ☐ grau 4 ☐ grau 5

Completou neoadjuvância ☐ sim ☐ não

Avaliação da resposta clínica e endoscópica: ☐ Sem resp ☐ Resp parcial

☐ Resp Completa

CEA após neoadjuvância:

Queda do CEA:

Data da cirurgia :

Via de Acesso: () aberta () videolaparoscópica

Tipo de cirurgia: () amputação abdominoperineal () Ressecção alargada

() Ressecção anterior baixa com preservação

Complicação: () sim () não

Tipo de Complicação:

Número do Anatomo Patológico:

Estadiamento da peça cirúrgica: () yp T1 () ypT2 () ypT3 () ypT4

() ypN0 () ypN1

Número de LNs dissecados

Número de LNs comprometidos

Grau de Diferenciação: () pouco () moderada () Bem

Classificação de Dwuorak

Downstaging T () sim () não

Downstaging N () sim () não

Quimioterapia adjuvant () sim () não

Esquema de Qxt:

Recidiva () não () local () à distância

Data da recidiva:

Status da última informação: () vivo sem doença () vivo com recidiva

() óbito por outra causa () óbito por câncer () perdido de vista

Anexo 6 - Protocolo do Serviço de Anatomia Patológica para reto após tratamento neoadjuvante.

MACROSCOPIA

RETO APÓS TRATAMENTO NEOADJUVANTE

Número do caso:

1- Procedimento realizado: Retosigmoidectoma: _ / Outros: _

2- Medidas da peça:

Comprimento da peça: _

Diâmetro proximal: _

Diâmetro distal: _

Espessura da parede: _

3- Avaliação do mesoreto posterior:

Lisa: _

Irregular focal: _

Intensa irregularidade com visualização da m.própria: _

4- Lesão:

Localização: _

Tumor não visualizado: _ / Tamanho da área de fibrose/Ulceração: _

Tamanho do tumor: _

Forma: Exofítica: _ / Vegetante: _ / Plana: _ / Infiltrativa: _ / Ulcerada / Outro: _

Contorno: Bem delimitado: _ / Mal delimitado: _ / Outro: _

Aos cortes a lesão/área fibrótica apresenta-se:

Firme: _ / Amolecida: _ / Esbranquiçada: _ / Acastanhada: _ / Outro: _

Profundidade de invasão: _ cm

até Parede intestinal _ / gorsura mesoretal: _ / Fáscia mesoretal: _

Distância da lesão à margem proximal: _ cm

Distância da lesão à margem distal: _ cm

Distância da lesão à margem radial: _ cm

Perfuração: Sim: _ / Não: _

5- Mucosa adjacente não neoplásica:

Pregueamento preservado: _ / Achatada: _ / Acastanhada: _

Pólipos: Sim: _ / Não: _ Divertículos: Sim: _ / Não: _

Área de isquemia: Sim: _ / Não: _

6- Linfonodos dissecados:

Quantidade: _

Medida do maior: _

Firme elástico: _ / Endurecido: _ / Acastanhado: _ / Esbranquiçado

7- Mapa macroscópico

A_: Margem proximal

A_: Margem distal

A_: Margem radial

AA/A_: Tumor/Área fibrótica

A_: Mucosa não neoplásica

A_: Linfonodos

ORIENTAÇÕES PARA MACROSCOPIA DE CÓLO E RETO

A- Orientação do espécime/Macroscopia:

Em caso de retosigmoidectomia, é facilmente identificável o reto com a porção do mesoreto. A transição do sigmóide com o reto é caracterizada pela fusão das tênias com o músculo longitudinal da parede retal.

B- Fixação:

A melhor maneira de realizar a macroscopia de espécimes de intestino é após a fixação, e para tanto o ideal é que se realize a abertura da peça ainda a fresco no sentido longitudinal conforme explicado abaixo, e faça sua fixação colocando a peça aberta em suporte (isopor ou cortiça) utilizando-se grampas, clips ou alfinetes.

C- Descrição macroscópica da superfície externa:

A superfície externa mesoretal deve ser analisada quanto a sua integridade e/ou irregularidades, perfurações, observadas em sua face anterior e posterior.

A excisão completa do mesoreto está relacionada a prevenção de recorrência local e sobrevida maior. A avaliação patológica do espécime é uma forma de avaliar a qualidade de ressecção cirúrgica do espécime, e deve ser classificada como:

Completa: Superfície lisa do mesoreto e/ou apenas irregularidade discreta da superfície e/ou ausência de defeitos na superfície maiores que 5mm.

Parcialmente completa: Irregularidades na superfície do mesoreto maiores que 5mm, mas nunca chegando à muscular própria.

Incompleta: Defeito no mesoreto chegando até a camada muscular própria.

D- Medir:

Deve-se medir o comprimento do espécime, assim como o diâmetro proximal e distal. Deve-se também medir a espessura da parede intestinal. Não é necessário medir a porção de tecido adiposo que acompanha a peça.

E- Secção da peça:

A peça deve ser aberta longitudinalmente pela face anterior. A face do mesoreto abaixo da deflexão do peritônio deve ser pintada com tinta Nankin. Deve-se examinar a mucosa para identificação da área tumoral e/ou área fibrótica/ulcerada, sendo somente esta área seccionada transversalmente a intervalos seriados de 2-3 mm no sentido proximal-distal de forma a se visualizar a lesão com relação à sua margem radial. Tumores até 4,0 cm devem ter no mínimo 4 cortes de representação histológica. Tumores maiores acrescenta-se 1 corte por cm adicional. Na ausência de tumor macroscópico, toda a área suspeita deve ser representada.

F- Descrição da lesão

Deve-se tentar identificar a localização da lesão e a medida nos três eixos. Como trata-se de lesões submetidas a tratamento radio/quimioterápico, pode não haver lesão residual, então deve-se relatar área de fibrose/ulceração. Deve-se descrever a forma do tumor (exofítica/Vegetante/Plana/Infiltrativa/Ulcerada), contorno (bem delimitado/mal delimitado). Descrever a característica da lesão ou da área fibrótica aos cortes (firme/amolecida/esbranquiçada/acastanhada), Descrever a medida da profundidade de invasão, e o limite anatômico (até parede intestinal/subserosa/serosa/além da serosa). Deve-se medir a distância da lesão às margens proximal e distal.

G- Mucosa não neoplásica:

Deve-se avaliar a mucosa não neoplásica para presença de lesões precursoras, com pólipos, e para lesões predisponente ao câncer, com as doenças inflamatórias intestinais. Deve-se procurar também a presença de divertículos e alterações isquêmicas. A descrição dos achados deve começar sempre no sentido proximal-distal. Cortes longitudinais são melhores que os transversos para representar a mucosa intestinal. Deve-se sempre representar área de mucosa não neoplásica.

H- Coleta para banco de tumor:

Para coleta de fragmento para o banco de tumor deve abrir a peça conforme especificado acima. Fragmento representativo da lesão tumoral e da mucosa não neoplásica devem ser coletados. Deve-se tomar o cuidado de não lavar a peça

antes da coleta devido a possibilidade de contaminação. Deve-se também tomar o cuidado de não usar o mesmo bisturi e a mesma pinça para coletar o material tumoral e o neoplásico.

I- Representação histológica:

São seis itens essenciais a serem representados histologicamente: (i) a lesão conforme especificado acima; ii) mucosa não neoplásica; iii) margem proximal; iv) margem distal; v) margem radial e vi) linfonodos.

J- Margens cirúrgicas proximal e distal:

As margens cirúrgicas podem ser representadas em cortes transversais.

K- Margem radial:

O reto não apresenta revestimento seroso, portanto, radialmente, o espécime de ressecção representa uma verdadeira margem de partes. Deve-se incluir a margem onde o tumor mais se aproxima da margem radial. Cuidado especial deve ser dado para os implantes em mesoreto, os quais também devem ser observados e relatados em relação à margem radial.

M- Linfonodos:

Linfonodos devem ser dissecados da gordura mesorectal através da palpação. A gordura deve ser extensivamente dissecada. O mínimo de linfonodos aceitável para correto estadiamento é de 12-15 linfonodos. Se for dissecado um número abaixo do número mínimo de linfonodos acometidos para se considerar N2b (hoje 7), na prática clínica é considerado Nx. Mesmo em espécimes pós quimioterapia, em que o número de linfonodos pode ser menor, deve-se achar mais que 12. Para cada linfonodo dissecado, uma fatia deste deverá ser incluída para o exame macroscópico. Se este for pequeno pode ser incluído sem ser cortado. Se for intermediário, corta-se ao meio e inclui-se uma fatia (um dos lados); se grande, deverá ser fatiado, e avaliado macroscopicamente a presença de área suspeita. Se houver área suspeita esta deverá ser representada. Se não houver, área de uma fatia central deverá ser utilizada. Todos os linfonodos dissecados devem ser submetidos a análise microscópica.

Documentação fotográfica:

Deve ser feita documentação fotográfica da peça após abertura longitudinal anterior e dos cortes transversais da área tumoral.

ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MANEJO DOS ESPÉCIMES DE RESSECÇÃO DE MESORETO.

* Reproduzido do Partiff JR et al. The total mesorectal excision specimen for rectal cancer: a review of its pathological assessment. J Clin Pathol 2007

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE RESSECÇÃO DO MESORETO:

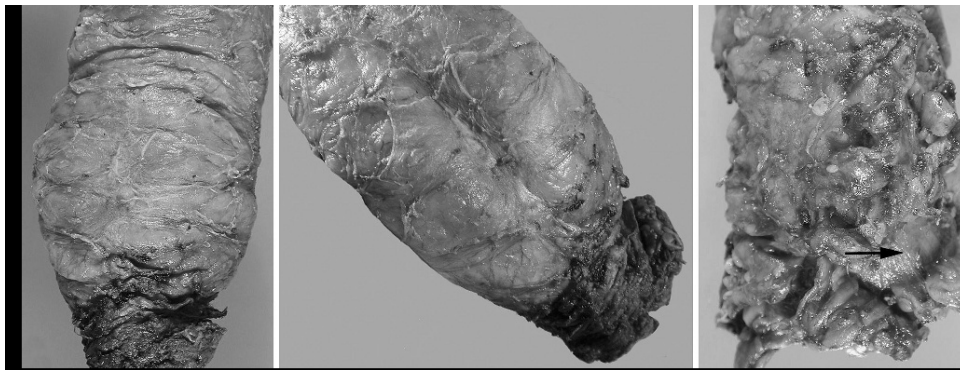


Figure 1 (A, B) Examples of complete mesorecta. The external surface appears smooth, without defects. Wispy fibres on the surface are a clue that dissection occurred within a fascial plane. There is adequate bulk, without coning. A midline cleft or groove, the “rectal buttocks”, seen posteriorly in B, is a normal anatomical landmark and a characteristic of a complete mesorectum. (C) Example of an incomplete mesorectum. The external surface is ragged and the bulk is minimal. There are deep defects, exposing the muscularis propria (arrow).

IDENTIFICAÇÃO DO MESORETO ANTERIOR

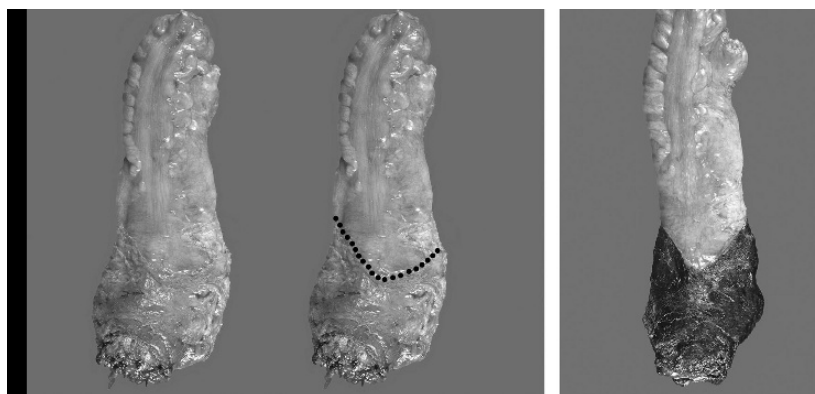


Figure 2 The anterior CRM consists of a narrow band of non-peritonealised surface, below the peritoneal reflection, which occurs more inferiorly compared to the posterior side; this bare area is inked prior to fixation.



Figure 3 The posterior CRM consists of a long, triangular, non-peritonealised surface, typically protected by a greater degree of soft tissue compared to the anterior CRM; this bare area is inked prior to fixation.

SECÇÃO DA PEÇA NO SENTIDO LONGITUDINAL ANTERIOR



Figure 4 After inking the entire CRM (non-peritonealised bare area) both anteriorly and posteriorly, the proximal and distal segments are opened anteriorly to allow fixation, while the tumour-containing segment is left intact.

SECÇÃO LONGITUDINAL DA PEÇA

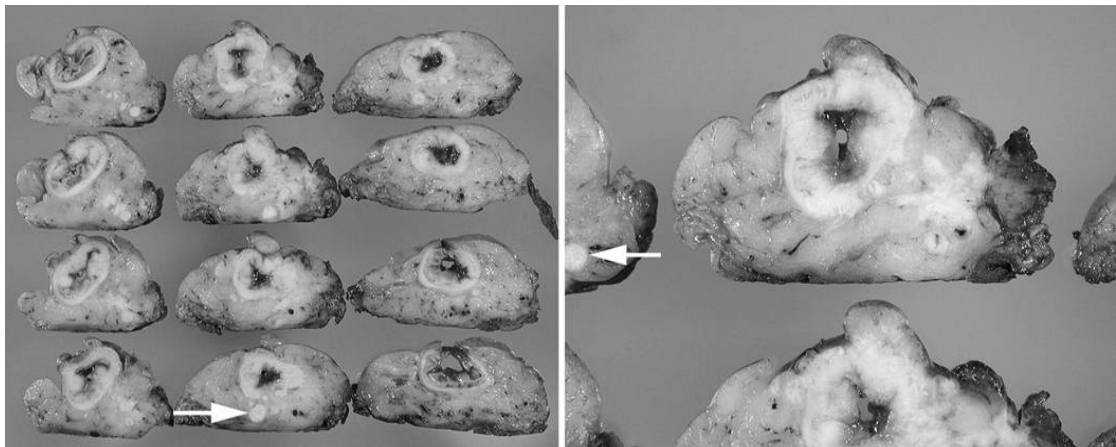


Figure 5 Two examples of transversely sectioned slices laid out for inspection and blocking. Cancer may involve the mesorectum as either continuous or discontinuous tumor deposits. It is important to measure the closest distance of these deposits to the CRM, as well as the closest distance of any grossly positive lymph nodes to the CRM (arrow), as a distance of <1 or 2 mm in either case, constitutes a positive CRM.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:

1. American College of Pathologists. Protocol for the Examination of Specimens from Patients with Primary Carcinoma of the Colon and Rectum. 2009
2. Jass RJ et al. Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma. Virchows Arch (2007) 450:1-13
3. Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma. Am J Clin Pathol 2008;129:13-23
4. The Washington manual of Surgical Pathology 2008
5. Lester surgical pathology.
6. Surgical Pathology Dissection: An Illustrated guide, second edition. Pathology dissection.
7. Manual de laudos padronizados da Sociedade Brasileira de Patologia
8. Partiff JR et al. The total mesorectal excision specimen for rectal cancer: a review of its pathological assessment. J Clin Pathol 2007.

MICROSCOPIA

Produto de retosigmoidectomia:

* Adenocarcinoma moderadamente diferenciado, ulcerado.

- . Medida da neoplasia: _ cm.
- . Localização da lesão: Reto
- . Profundidade da infiltração:
- . Invasão vascular sanguínea:
- . Invasão vascular linfática:
- . Invasão perineural:
- . Margens cirúrgica proximal:
- . Margem cirúrgica distal:
- . Margem cirúrgica radial:

* Avaliação de resposta patológica pós tratamento neoadjuvante:

- . Células viáveis constituem totalidade da lesão
- . Células viáveis constituem mais que 50% da lesão
- . Células viáveis constituem entre 25 e 50% da lesão
- . Células viáveis constituem menos que 25% da lesão
- . Ausência de células viáveis

* Mucosa adjacente:

Foram dissecados _ linfonodos do tecido adiposo adjacente, sendo que todos encontram-se livres de neoplasia (0/_). Ausência de extravasamento capsular.

Nota:

1- Será realizada a pesquisa de mutação do gene K-ras.

2- Foi solicitada a realização de estudo Imuno-histoquímico para a pesquisa da expressão dos genes de reparo do DNA.