

NATALIA PERES MARTINEZ

CONTEÚDO TECIDUAL DE BETA CATENINA E E-
CADERINA RELACIONADO A FATORES
PROGNÓSTICOS NO CÂNCER DE CÓLON ESQUERDO

Bragança Paulista, 2012

NATALIA PERES MARTINEZ

CONTEÚDO TECIDUAL DE BETA CATENINA E E-
CADERINA RELACIONADO A FATORES
PROGNÓSTICOS NO CÂNCER DE CÓLON ESQUERDO

ORIENTADOR

Profa. DENISE GONÇALVES PRIOLLI

Dissertação apresentada no Curso de Pós-
Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da
Saúde da Universidade São Francisco para
obtenção do título de Mestre em Ciências da
Saúde

Bragança Paulista, 2012

WI 529
M337c

Martinez, Natalia Peres.

Conteúdo tecidual de beta Catenina e E-Caderina relacionado a fatores prognósticos no câncer de cólon esquerdo / Natalia Peres Martinez. -- Bragança Paulista, 2012.

87 p.

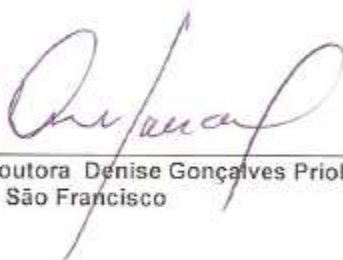
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Denise Gonçalves Priolli.

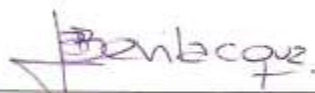
1. Carcinoma colorretal. 2. Beta Catenina.
3. E-Caderina. 4. Imunoistoquímica. 5. Prognóstico.
6. Processamento de imagem assistido por computador. I. Priolli, Denise Gonçalves. II. Título.



MARTINEZ, Natália Peres, "CONTEÚDO TECIDUAL DE BETA CATENINA E E-CADERINA RELACIONADO A FATORES PROGNÓSTICOS NO CÂNCER DE CÔLON ESQUERDO", Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e nove de Junho de 2012 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Professora Doutora Denise Gonçalves Prioli
Universidade São Francisco



Professor Doutor José Luiz Barbosa Bevilacqua
Universidade de São Paulo



Professora Doutora Patrícia de Oliveira Carvalho
Universidade São Francisco

À professora,
Denise Gonçalves Prioli

“(...) da necessidade que temos, educadoras e educadores, de viver, na prática, o reconhecimento óbvio de que nenhum de nós está só no mundo. Cada um de nós é um ser no mundo, com o mundo e com os outros.”

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra **IZILDA APARECIDA CARDINALLI** e Prof. Ms. **JOSÉ AIRES PEREIRA** pela análise histopatológica e técnicas histológicas realizadas durante o estudo;

Aos colegas, **ANA PAULA PIMENTEL SPADARI**, **CAMILA DE OLIVEIRA LOPES**, **DANILO TOSHIO KANO** e **FELIPE RODRIGUES MAXIMO** pelo auxílio às etapas experimentais envolvidas neste estudo;

Aos **PROFESSORES** e **FUNCIONÁRIOS** do programa pós graduação em ciências da saúde da Universidade São Francisco;

A **UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO** que me proporciona desde 1999 a formação e desenvolvimento necessários à construção não apenas de um alicerce intelectual mas afetivo sólido e que foi a porta para tantos que hoje felizmente tenho como parte da minha vida pessoal e profissional.

À Prof. Dra. **DENISE GONÇALVES PRIOLLI** que ao longo destes anos não me deixa esquecer que todos podemos ser um pouco melhores, que podemos fazer um pouco mais, que é possível se superar sempre e que nada pode ser mais importante do que os laços que criamos entre as pessoas.

A minha irmã **BRUNA PERES MARTINEZ**, por acreditar em mim, sempre.

Aos meus pais, **ANTÔNIO MARTINEZ FILHO** e **MARILISE PERES MARTINEZ** que são e serão eternamente àqueles em quem confio, a quem admiro, amo e respeito. Obrigada por toda sua dedicação e amor.

A **DEUS**, pela paz de espírito e serenidade necessários nos momentos difíceis da concretização deste trabalho.

RESUMO

A mensuração do conteúdo tecidual de proteínas do complexo caderina-catenina pode melhorar a compreensão dos mecanismos de proliferação e disseminação relacionados a fatores prognósticos da doença com vistas a terapêuticas mais racionais no tratamento do adenocarcinoma colorretal. **OBJETIVO:** O objetivo deste estudo é relacionar o “conteúdo” das proteínas de adesão celular, E-Caderina e beta Catenina, aos fatores prognósticos do adenocarcinoma do cólon esquerdo. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram estudados vinte e nove pacientes com adenocarcinoma de cólon esquerdo. O Estadiamento TNM e Grau histológico foram avaliados utilizando-se Hematoxilina-Eosina. As proteínas beta Catenina e E-Caderina foram imunocoradas com anticorpos monoclonais específicos. A expressão tecidual quantitativa (“conteúdo”) das proteínas de adesão, foi determinada por método de imagem assistida por computador. Os testes estatísticos adotaram nível de significância de 5%. **RESULTADOS:** Há correlação entre o “conteúdo” tecidual de beta Catenina e o estágio TNM ($p < 0,01$). Há quantidades progressivamente maiores de beta Catenina no tecido de pacientes com invasões mais profundas das camadas do cólon pelo tumor ($p = 0,03$), progressivo envolvimento linfonodal ($p = 0,05$), assim como em pacientes com metástase à distância ($p = 0,04$). Graus histológicos menos diferenciados estão relacionados a menor “conteúdo” de E-Caderina no tecido tumoral ($p = 0,01$). **CONCLUSÃO:** Há relação entre o “conteúdo” das proteínas de adesão celular, E-Caderina e beta Catenina, e fatores prognósticos do adenocarcinoma do cólon esquerdo.

Palavras chave: Carcinoma colorretal; beta Catenina; E-Caderina; Imunoistoquímica; processamento de imagem; assistido por computador; Prognóstico

ABSTRACT

Objective beta Catenin and E-Cadherin tissue content measure, could improve proliferation and dissemination mechanisms comprehension related to prognostic factors on colon cancer, aiming to implement more rational treatments for the disease. AIM: To investigate the relationship between beta Catenin and E-Cadherin tissue quantitative expression (“content”) to clinical prognostic factors in patients with left colon cancer. MATERIAL AND METHODS: Twenty-nine patients with left colon adenocarcinoma were studied. Diagnosis and histological variables related to adenocarcinoma prognosis were evaluated using hematoxylin-eosin. Beta Catenin and E-Cadherin were analyzed by immunohistochemistry with specific anti-beta-Catenin and anti-E-Cadherin monoclonal antibodies. Tissue quantitative expression (“content”) was determined by computer assisted image analysis method. Results were analyzed with statistical tests, adopting a significance level of 5%. RESULTS: There are correlations between beta Catenin tissue “content” and TNM stage ($p < 0.01$). There are progressively greater amounts of beta Catenin in patients with deeper invasion of the tumor in colon layers ($p = 0.03$), progressive lymph node involvement ($p = 0.05$), as well as in patients with distant metastasis ($p = 0.04$). Worse histological grades are related to lower “content” of E-Cadherin in tumor tissue ($p = 0.01$). CONCLUSION: Adhesion proteins E-Cadherin and beta Catenin cellular content relates to left colon adenocarcinoma prognoses factors.

Keywords: Colorectal carcinoma; beta Catenin; E-Cadherin; Immunohistochemistry; Image Processing; Computer-Assisted; Prognosis

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC – Complexo estreptavidina-biotina-peroxidase
Anti-IG – Anticorpo secundário biotinilado
APC – Adenomatous polyposis coli
CCR – Câncer colorretal
CI – Intervalo de confiança
CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CK1a – Proteína hipotética [*Branchiostoma floridae*]
CpG – *Cytosine-phosphate-Guanine*
DAB – Solução de diaminobenzidina
EUA – Estados Unidos da América
HE – Hematoxilina-Eosina
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
Gsk3 β – *Glycogen synthase kinase-3 beta*
INC – Instabilidade cromossômica
IMS – Instabilidade microssatélite
kDa – Kilodalton
K-ras – *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
MLH1 – *MutL Homolog 1*
MMP – Metaloproteinase
n – Número
p – Nível de significância
PBS – Solução tampão fosfato de sódio
pH – Potencial hidrogeniônico
PP2A – serine/threonine protein phosphatase 2A
RGB – *Red, green, blue*
TCF/LEF – *T cell factor/Lymphoid enhancing factor*
TIMPs – Inibidores teciduais de metaloproteinases
UICC – *American Joint Committee on Cancer*
USF – Universidade São Francisco

WNT – contração das palavras “*wingless*” e “*integration 1*”

° C – Graus Celsius

% – por cento

µm – micrometro

mM – micromolar

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Conteúdo de beta Catenina em relação ao gênero.....	42
Tabela 2. Conteúdo de beta Catenina em relação a idade.....	42
Tabela 3. Conteúdo de beta Catenina em relação ao grau histológico.....	42
Tabela 4. Conteúdo de beta Catenina em relação ao estágio TNM.....	43
Tabela 5. Conteúdo de beta Catenina em relação a profundidade de invasão tumoral na parede do cólon.....	44
Tabela 6. Conteúdo de beta Catenina em relação ao acometimento linfonodal.	45
Tabela 7. Conteúdo de beta Catenina em relação à presença de metástase à distância.....	46
Tabela 8. Conteúdo de beta Catenina em relação ao local de expressão.....	47
Tabela 9. Conteúdo de E-Caderina em relação ao gênero.....	48
Tabela 10. Conteúdo de E-Caderina em relação a idade.....	48
Tabela 11. Conteúdo de E-Caderina em relação ao grau histológico.....	48
Tabela 12. Conteúdo de E-Caderina em relação ao estágio TNM.....	49
Tabela 13. Conteúdo de E-Caderina em relação profundidade de invasão tumoral na parede do cólon.....	50
Tabela 14. Conteúdo de E-Caderina em relação ao acometimento linfonodal...	50
Tabela 15. Conteúdo de E-Caderina em relação a presença de metástase à distância.....	50
Tabela 16. Conteúdo de E-Caderina em relação ao local de expressão.....	51

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Via WNT. (Extraído de < www.cellsignal.com/reference/pathway/Wnt_beta_Catenin.html >).....	16
Figura 2. Sequência adenoma-carcinoma. Modelo proposto por Vogelstein e cols. para a sequência de mutações na evolução adenoma-carcinoma (Spies, 1999) (Extraído de http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/1999/161/html/1%20Einleitung.htm).....	17
Figura 3. Grupamento dos adenocarcinomas de cólon por Estádios.....	27
Figura 4. Casos excluídos.....	31
Figura 5. Padrão de adesão da imunocoloração proteica. E-Caderina citoplasmática (Magnificação de 400x).....	37
Figura 6. Padrão de adesão da imunocoloração proteica. E-Caderina membranosa (Magnificação de 400x)	38
Figura 7. Padrão de adesão da imunocoloração proteica. Beta Catenina membranosa (Magnificação de 400x)	38
Figura 8. Distribuição por gênero.....	41
Figura 9. Distribuição por idade.....	41
Figura 10. Conteúdo de beta Catenina nos estádios TNM.....	43
Figura 11. Conteúdo de beta Catenina e profundidade de invasão tumoral.....	44
Figura 12. Conteúdo de beta Catenina e acometimento linfonodal em adenocarcinoma colorretal.....	45
Figura 13. Conteúdo de beta Catenina e presença de metástase.....	46
Figura 14. Correlação do conteúdo de beta Catenina nos estádios TNM.....	47
Figura 15. Conteúdo de E-Caderina e grau histológico.....	49
Figura 16. Conteúdo de E-Caderina membranoso e citoplasmático.....	51

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	5
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1. Principais diferenças entre cólon direito e esquerdo.....	8
3.2. Adesão celular.....	11
3.2.1. Caderinas.....	12
3.2.1.1. A E-Caderina.....	12
3.2.2. Cateninas.....	13
3.2.2.1. A beta Catenina.....	13
3.2.3. O complexo caderina-catenina.....	14
3.3. A evolução do câncer colorretal.....	17
3.3.1. Iniciação.....	17
3.3.2. Promoção.....	18
3.3.3. Progressão.....	19
3.4. A E-Caderina e a beta Catenina na evolução do câncer colorretal.....	21
3.5. Classificação histopatológica do câncer colorretal.....	24
3.5.1. Graduação histopatológica.....	24
3.5.2. Estadiamento TNM.....	25
3.5.2.1. Classificação clínica.....	25
3.5.2.2. Classificação patológica (pTNM)	27
3.6 Processamento de imagem assistido por computador.....	27
4. MÉTODO.....	29
4.1. Adequação do projeto.....	30
4.2. Casuística.....	30
4.3. Estadiamento preoperatório.....	31
4.4. Preparo preoperatório	31
4.5. Técnica operatória.....	32
4.6. Exame histopatológico.....	32
4.7. Técnica de imunistoquímica (E-Caderina, beta Catenina e MLH-1).....	33
4.8. Análise histopatológica das lâminas imunocoradas.....	34
4.9. Determinação do Conteúdo das proteínas de adesão, beta Catenina e E-Caderina, no tecido neoplásico por processamento de imagem assistida por computador.....	35
4.10. Análise da expressão das proteínas de adesão beta Catenina e E-Caderina.....	36
4.11. Análise Estatística.....	39
5. RESULTADOS.....	40
5.1. Distribuição por gênero e idade.....	41
5.2. Quanto a beta Catenina.....	42
5.3. Quanto a E-Caderina.....	48
6. DISCUSSÃO.....	52
6.1 Quanto a epidemiologia do CCR.....	53
6.2. A importância da distinção entre os cólons.....	54
6.3. Quanto a relação das moléculas de adesão e o TNM.....	56

6.4. Quanto à relação das moléculas de adesão e os graus histológicos.....	57
6.5 Comentários Finais.....	59
7. CONCLUSÃO.....	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
9. ANEXOS.....	73
9.1. Anexo 1 – Dados individuais da amostra.....	74
9.2. Anexo 2 – Publicação.....	76
9.3. Anexo 3 – Prêmio.....	86

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Desde 1990 encontra-se bem estabelecido que o surgimento do câncer colorretal (CCR), a partir da mucosa cólica normal, é mediado por uma sequência de mutações em genes controladores da proliferação, diferenciação, adesão e apoptose celulares (Fearon e Vogelstein, 1990; Hamilton *et. al*, 2000).

O processo de carcinogênese tem início a partir da formação de clone de células mutantes que desenvolvem ganho proliferativo descontrolado, sendo necessário, para que a doença se dissemine, o descolamento da célula neoplásica do tumor primário, migração e, posteriormente, colonização de outros órgãos. A intensa capacidade de divisão e a perda de adesão celular possibilitam crescimento descontrolado e migração tumoral, facilitando a disseminação das células cancerosas para órgãos e tecidos (Hanahan e Weinberg, 2000). As células epiteliais normais da mucosa cólica se encontram intimamente aderidas umas as outras, bem como à lâmina basal, por meio de intrincado sistema de adesão celular, composto por grande número de proteínas. Neste sistema de adesão celular, o complexo caderina-catenina ocupa lugar de destaque (Tsanou, 2008).

A E-Caderina atua mediando interações célula-célula e célula matriz extracelular, mantendo, dessa forma, a integridade do tecido epitelial (Fujimori *et. al*, 2001). A beta Catenina apresenta importância capital na manutenção da integridade tecidual. Rearranjos genéticos da beta Catenina parecem contribuir na carcinogênese não apenas pela alteração na adesão celular, mas também por atuar como coativador transcricional, denotando assim a múltipla funcionalidade desta proteína (Fujimori *et. al*, 2001).

Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos na carcinogênese colorretal, ainda existem dúvidas se modificações na expressão das proteínas de adesão têm algum valor na doença. Há dúvidas se modificações do padrão de expressão de beta Catenina na célula neoplásica possa se tornar estratégia útil, capaz de prever a evolução do CCR. Alguns estudos têm demonstrado o valor prognóstico da beta Catenina citoplasmática, enquanto outros sugerem existir valor

prognóstico independente da beta Catenina nuclear (Maruyama *et. al*, 2000; Ougolkov *et. al*, 2002; Miyamoto *et. al*, 2004; Elzagheid *et. al*, 2008; Wanitsuwan *et. al*, 2008). Outra alteração nas moléculas de adesão que parece estar correlacionada ao prognóstico é a perda de função da E-Caderina. Estudos demonstram relação da E-Caderina com a diferenciação, tamanho do tumor, tipo histológico e metástase, mas os resultados permanecem inconsistentes (Pignatelli, 1993; Kanazawa *et al.*, 2002; Kojima *et al.*, 2004; Delektorskaya *et al.*, 2005; Elzagheid *et al.*, 2006; Onder *et. al*, 2008; Tsanou *et. al*, 2008).

É possível que os resultados conflitantes encontrados na literatura com relação ao valor prognóstico do complexo caderina-catenina no CCR estejam relacionados à falta de padronização, às diferentes técnicas imunoistoquímicas, bem como ao método de análise de dados obtidos a partir dos diferentes estudos. A maioria dos estudos determina o conteúdo das proteínas do complexo caderina-catenina de forma subjetiva, semiquantitativa, não empregando método que possibilite a quantificação tecidual de modo mais preciso. Da mesma forma, esses estudos analisam a expressão das proteínas em tumores do cólon e reto de forma conjunta, não considerando as diferenças na expressão de genes e proteínas nas células da mucosa cólica, quando se comparam tumores de cólon direito e esquerdo (Distler e Holt, 1997; Martinez *et al.*, 2008).

A procura por marcadores histológicos ou moleculares que permitam melhores critérios de seleção dos pacientes candidatos à terapia complementar é motivo de grande número de pesquisas. Contudo, nenhum dos marcadores estudados até o momento foi efetivamente incorporado como ferramenta capaz de melhorar tais critérios. A indicação do tratamento adjuvante geralmente é baseada em fatores de risco relacionados ao doente e ao estadiamento do tumor. A incapacidade de prevenir e controlar a disseminação das células neoplásicas ainda representa grande desafio. Apesar do diagnóstico precoce da metástase e da maior possibilidade de tratamento cirúrgico, grande número de pacientes com doença disseminada necessitará de alguma forma de tratamento complementar. No momento do diagnóstico, estima-se que 30% dos portadores de CCR já apresentem doença disseminada e que a disseminação

metastática no seguimento pós-operatório ocorra em mais de 40% dos pacientes operados com intenção curativa (Malheiros *et al.*, 2005; Neves *et al.*, 2005).

A mensuração do conteúdo tecidual (expressão quantitativa) das proteínas beta Catenina e E-Caderina com métodos precisos de análise, aliada a melhores critérios na seleção dos casos estudados, poderá trazer contribuição para a compreensão dos mecanismos de disseminação e possivelmente, marcador prognóstico da doença.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo é relacionar o conteúdo das proteínas de adesão celular, E-Caderina e beta Catenina, a fatores prognósticos do adenocarcinoma do cólon esquerdo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

Em 2012, cerca de 557.190 americanos morrerão de câncer. O câncer é a segunda causa de morte mais comum no mundo e contabilizou em 2008, 7,6 milhões, cerca de 13%, de todas as mortes nos Estados Unidos. Óbitos por câncer devem continuar a crescer além de 11 milhões em 2030 (Cancer Facts & Figures, 2012).

Tanto em homens como em mulheres, o CCR é a terceira neoplasia mais comumente diagnosticada e a terceira principal causa de morte por câncer. A incidência do CCR vem diminuindo nas últimas duas décadas, provavelmente devido ao rastreamento e a remoção de pólipos do cólon antes de sua transformação para câncer. Estima-se que em 2012 serão 103.170 novos casos de câncer de cólon nos Estados Unidos estimando-se uma mortalidade de 51.690 homens e mulheres por câncer de cólon e de reto (Cancer Facts & Figures, 2012).

A incidência e a taxa de mortalidade pelo CCR aumenta com a idade. Noventa por cento dos novos casos e 94% das mortes ocorrem em indivíduos com 50 anos ou mais sendo a incidência 35% a 40% maior em homens do que em mulheres e mais elevadas em afroamericanos (Cancer Facts & Figures, 2012). Estima-se que a cada cinco anos mais de dois milhões de novos casos de CCR sejam diagnosticados em todo o mundo (Boyle e Levin, 2008).

Homens e mulheres a partir dos 50 anos estão sob risco e devem ser rastreados para o CCR, resultando em detecção precoce e remoção de pólipos colorretais que podem tornar-se neoplásicos, além da detecção do próprio câncer em estágios iniciais, quando o tratamento é menos extenso e com maiores chances de cura (Cancer Facts & Figures, 2012).

3.1. Principais diferenças entre o cólon direito e esquerdo

Há anos se conhecem as diferenças na epidemiologia, comportamento clínico, aspectos histopatológicos quando se comparam tumores localizados nos cólons direito

e esquerdo (Distler e Holt,1997; Martinez *et al.*, 2008). A partir da década de noventa, começou-se a dedicar maior atenção ao se verificar a existência destas duas categorias de cânceres de cólon, além daquele localizado no reto (Buffill, 1990). Até então os tumores eram habitualmente subdivididos segundo sua localização em dois grandes grupos: câncer do cólon e câncer do reto. Os recentes avanços da biologia molecular vêm confirmando diferenças, mostrando que tumores localizados no cólon direito representam entidade distinta, com características clínicas e patológicas diferentes dos localizados no cólon esquerdo (Buffill,1990; Distler e Holt,1997; Obrand e Gordon, 1998; Gervaz *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2008; Boyle e Levin, 2008).

A origem embriológica do cólons direito e esquerdo são distintas. O cólon direito advém da estrutura embriológica denominada intestino médio, enquanto o cólon esquerdo se origina da estrutura denominada intestino posterior (Minoo *et al.*, 2010).

Os principais suprimentos arteriais colônicos são usualmente pareados a sua drenagem venosa. O cólon direito e o cólon esquerdo possuem vascularização distinta, sendo que o cólon direito tem sua irrigação assegurada por ramos da artéria mesentérica superior, enquanto o cólon esquerdo por ramos da artéria mesentérica inferior (Floch, 2004).

Sob o ponto de vista fisiológico, a absorção do sódio e da água se dá preferencialmente no cólon direito e diminui progressivamente em direção ao reto, onde a função fisiológica básica seria de armazenamento das fezes (Guyton, 1996).

A fermentação bacteriana produz ácidos graxos de cadeia curta principalmente no cólon direito onde são absorvidos passivamente (Iacopetta, 2002; Gervaz *et al.*, 2004; Li e Lai, 2009). Estudos recentes demonstram que os subtipos de mucinas são produzidos em concentrações inversas nas criptas do cólon quando se consideram os segmentos direito e esquerdo (Martinez *et al.*, 2008). Tais fatos podem apresentar importância na manutenção do processo inflamatório da mucosa intestinal, e, portanto na carcinogênese (Ribeiro *et al.*, 2008). Além disso, os sais biliares parecem estar associados ao risco aumentado de câncer colorretal e os mesmos estão em maior concentração no cólon direito (Gervaz *et al.*, 2004).

A partir do início da década de oitenta a literatura vem demonstrando modificação na incidência do CCR com aumento de aproximadamente 10% dos tumores localizados no cólon direito (Obrand *et al.*, 1998). O motivo desta crescente mudança, quando se comparam tumores proximais e distais, continua objeto de estudo, acreditando-se que possa estar relacionado à presença de mecanismos carcinogênicos distintos, assim como a maior facilidade do diagnóstico precoce e tratamento endoscópico de pólipos situados no cólon esquerdo (Buffill, 1990; Gervaz *et al.*, 2001; SEER, 2012).

Tumores do cólon esquerdo são frequentemente relacionados a sangramento vivo associado às evacuações, os pacientes tendem a apresentar obstipação intestinal, evacuações com fezes afiladas e muitas vezes acompanhadas de dor abdominal em cólica. A anemia hipocrômica microcítica, associada a sintomas como fraqueza e astenia, é mais frequentemente observada em pacientes com tumores de cólon direito com grandes dimensões e levam a perda oculta de sangue por tempo prolongado (Majumdar *et al.*, 1999).

Quando se comparam os aspectos histopatológicos das neoplasias localizadas no cólon direito nota-se que geralmente possuem crescimento exofítico, mais comumente são produtoras de muco, à citometria de fluxo apresentam padrão diplóide e encontram-se menos relacionadas à presença de pólipos, sendo geralmente consideradas neoplasias “de novo”. Em contraposição, tumores do cólon esquerdo possuem crescimento úlceroinfiltrativo ou estenosante, raramente são produtores de muco, à citometria geralmente são aneuplóides e se encontram mais frequentemente associados a pólipos adenomatosos (Pocard *et al.*, 1995). É possível também que diferenças fenotípicas se relacionem aos diferentes padrões genotípicos quando se comparam tumores localizados nos dois segmentos intestinais (Distler e Holt, 1997; Konishi *et al.*, 1999).

O epitélio mucoso do cólon esquerdo e direito no adulto pode ser distinguido pelo padrão de expressão gênica. Considera-se que mais de 1.000 genes são expressos de forma distinta no cólon descendente em comparação ao cólon ascendente (Glebov *et*

al., 2003). Tradicionalmente são descritos 2 tipos de instabilidade no CCR: instabilidade cromossômica (INC) e instabilidade microssatélite (IMS) (Jass, 2007). A instabilidade cromossômica foi caracterizada como sequência de acúmulo de alterações genéticas envolvendo ativação de oncogênes, como o gene K-RAS e inativação de genes supressores tumorais, como o p53, suscitando a conhecida sequência adenoma-carcinoma (Vogelstein *et al.*, 1988). A instabilidade microssatélite resulta de defeito na função de reparo do DNA associado à mutação genética, em síndromes familiares, e/ou metilação genética, nas formas esporádicas do tumor (Jass, 2007). Instabilidade epigenômica caracterizada pelo fenótipo metilador de ilhas CpG foi recentemente descrito como via alternativa para a tumorigênese associada a IMS em cânceres esporádicos devido a metilação do gene de reparo MLH1 (Herman *et al.*, 1998). Cânceres colorretais associados à INC e IMS apresentam padrão inverso de distribuição ao longo do intestino grosso. Diversos estudos demonstraram que tanto as formas familiares quanto as esporádicas de CRC associados à INC, tendem a ocorrer na parte distal do cólon, enquanto CRC associados à IMS têm preferência proximal, em ambas as formas, familiar e esporádica.

Quanto à expressão de beta Catenina e E-Caderina, tumores localizados no cólon direito diferem dos tumores do cólon esquerdo por terem menor expressão de beta Catenina nuclear. Quando comparados tumores de reto e cólon esquerdo, os tumores retais apresentam maiores expressões de E-Caderina (Gervaz *et al.*, 2001; Jass, 2007; Li e Lai, 2009).

3.2. Adesão celular

As junções aderentes são especializações de membranas que contém inúmeras proteínas.

E-Caderina, α -catenina, beta Catenina, e a p120 catenina são encontradas nas junções aderentes, sendo a união da caderina à catenina, complexo importante na manutenção desta adesão (Smith *et al.*, 2008; Tsanou, 2008).

3.2.1. Caderinas

As caderinas compreendem uma grande família de moléculas de adesão que estabelecem ligação entre as células por meio de interações homofílicas proteína-proteína. Podem ser subdivididas basicamente entre dois grandes grupos: caderinas clássicas e as caderinas desmossomais. As primeiras caracterizam-se por possuir domínio citoplasmático altamente conservado e pela capacidade de formar complexos por interações específicas com proteínas intracelulares denominadas cateninas. Por sua vez, as caderinas desmossomais, como o próprio nome indica, são proteínas transmembrana componentes dos desmossomos. A principal diferença com relação às caderinas clássicas é o fato de que o domínio citoplasmático não interage com as cateninas, mas sim com um diferente grupo de proteínas citoplasmáticas incluindo a desmoplaquina, placofilina e placoglobina (Rowlands *et al.*, 2000 ; Conacci-Sorrell *et al.*, 2003).

No grupo das caderinas clássicas encontram-se a E-caderina, caderina-N, caderina-P, caderina-6, caderina-II e outras. Já no grupo das caderinas desmossomais figuram as desmogleínas e as desmocolinas. Além destes dois grupos, podem-se encontrar, ainda, as protocaderinas como sendo uma subclasse da grande família das caderinas (Nollet *et al.*, 1999; Ramburan e Govender , 2002).

3.2.1.1. A E-Caderina

A E-Caderina, produto do gene CDH1, é membro da família das caderinas e determinada pelo cromossomo 16q24. Quando pesquisada no tecido epitelial normal, sua expressão está sistematicamente preservada, distribuída de forma homogênea na membrana celular (Ramburan e Govender, 2002; Delektorskaya *et al.*, 2005).

A E-Caderina é uma proteína de adesão cálcio dependente e é o principal componente das junções aderentes, facilitando, inclusive, a comunicação intercelular (Smith *et al.*, 2008). Duas moléculas que expressem caderinas da mesma classe em

sua superfície aderem-se entre si e mantêm-se firmes pelas interações mediadas por estas moléculas (van der Wurff *et al.*, 1997; Debruyne *et al.*, 1999). A E-Caderina também estabelece a tensão interfacial na borda entre as populações de células distintas (Batlle e Wilkinson, 2012).

3.2.2. Cateninas

A palavra catenina, do latim *catena*, que significa cadeia, (Ozawa *et al.*, 1989) reflete o fato de que algumas cateninas contribuem para a associação indireta das caderinas ao citoesqueleto de actina, como a própria beta Catenina (Abe e Takeichi, 2008). Membros da família das cateninas foram inicialmente isolados em complexo com domínios citoplasmáticos de caderinas nas junções célula-célula e essa relação é considerada um dos aspectos definitivos das cateninas. Suas funções neste contato são multifacetadas e continuam sendo objeto de estudos e discussões. (Ozawa *et al.*, 1989).

3.2.2.1. A beta Catenina

O gene determinante da beta Catenina se localiza no cromossomo 3p22. A beta Catenina é uma proteína de 92 kDa que é membro da superfamília "Armadiño", o qual possui em comum um domínio central constituído por 12 sequências de repetição de 42 resíduos de aminoácidos, requeridas para a interação com outras proteínas, que incluem as caderinas, APC e *T cell factor/Lymphoid enhancing factor* (TCF/LEF) (Lee *et al.*, 2003).

As funções da beta Catenina correlacionam-se não apenas a adesão celular, mas também ao estímulo de transcrição e, conseqüentemente de proliferação celular (Akiyama, 2000). Estas duas funções biológicas distintas da beta Catenina determinam sua localização celular. Como membro envolvido na adesão célula-célula se localiza na membrana citoplasmática e mantém a arquitetura tecidual, já aquela situada livre no

citoplasma, participa na sinalização, ligando-se ao *T cell factor/Lymphoid enhancing factor* (TCF/LEF), ativando sua função transcricional no núcleo, resultando na expressão de genes alvo (Marchenko *et al.*, 2004; Oloumi *et al.*, 2004).

3.2.3. Complexo caderina-catenina

A E-Caderina se apresenta direta ou indiretamente envolvida com as cateninas na adesão intercelular e formam juntas o denominado complexo caderina-catenina (Tsanou, 2008).

Quando as caderinas formam as junções aderentes, moléculas de beta Catenina são recrutadas do citoplasma para a região submembranar. Esta interação é fundamental para a organização do citoesqueleto da célula epitelial, bem como evita que a beta Catenina livre no citoplasma seja translocada para o núcleo (van der Wurff *et al.*, 1997; Debruyne *et al.*, 1999).

O complexo caderina-catenina compõe a via de sinalização WNT (Fig. 1). Quando a via WNT é ativada (*on state*), os níveis de beta Catenina aumentam transitoriamente no intracelular e a proteína é translocada para o núcleo, onde forma complexo com o TCF/LEF. Na ausência da ativação da sinalização WNT (*off state*) o conteúdo de beta Catenina é extremamente baixo no citoplasma e ela se encontra quase totalmente ligada às E-Caderinas nas junções aderentes. (Cell Signalling, 2010)

A degradação da beta Catenina é feita por meio de complexo coordenado pela *axin*, composto por grupo específico de proteínas, entre elas a CK1a Gsk3 β , o supressor tumoral APC e a PP2A (Smith *et al.*, 2008). Outra forma de controlar os níveis citoplasmáticos de beta Catenina, e conseqüentemente de influenciar na proliferação celular é a degradação controlada positivamente pelo produto do gene APC, sendo este, portanto, classificado como gene supressor de tumor (Bright-Thomas e Harget, 2003; Garcea *et al.*, 2003).

Em organismos adultos, a sinalização da via WNT regula a manutenção da célula progenitora da cripta intestinal e o controle do eixo cripta-vilos destas células. A via WNT é normalmente ativada pela interação de um ativador à receptores desta via. O evento definitivo na via WNT é o acúmulo de beta Catenina e subsequente translocação para o núcleo, onde exerce sua atividade de transcrição e proliferação celular (Smith *et al.*, 2008). Quando isto acontece, a beta Catenina atua como transativador de TCF/LEF, que induz a transcrição de diferentes genes que controlam a proliferação celular e a invasão tecidual (van der Wurff *et al.*, 1997; Debruyne *et al.*,1999).

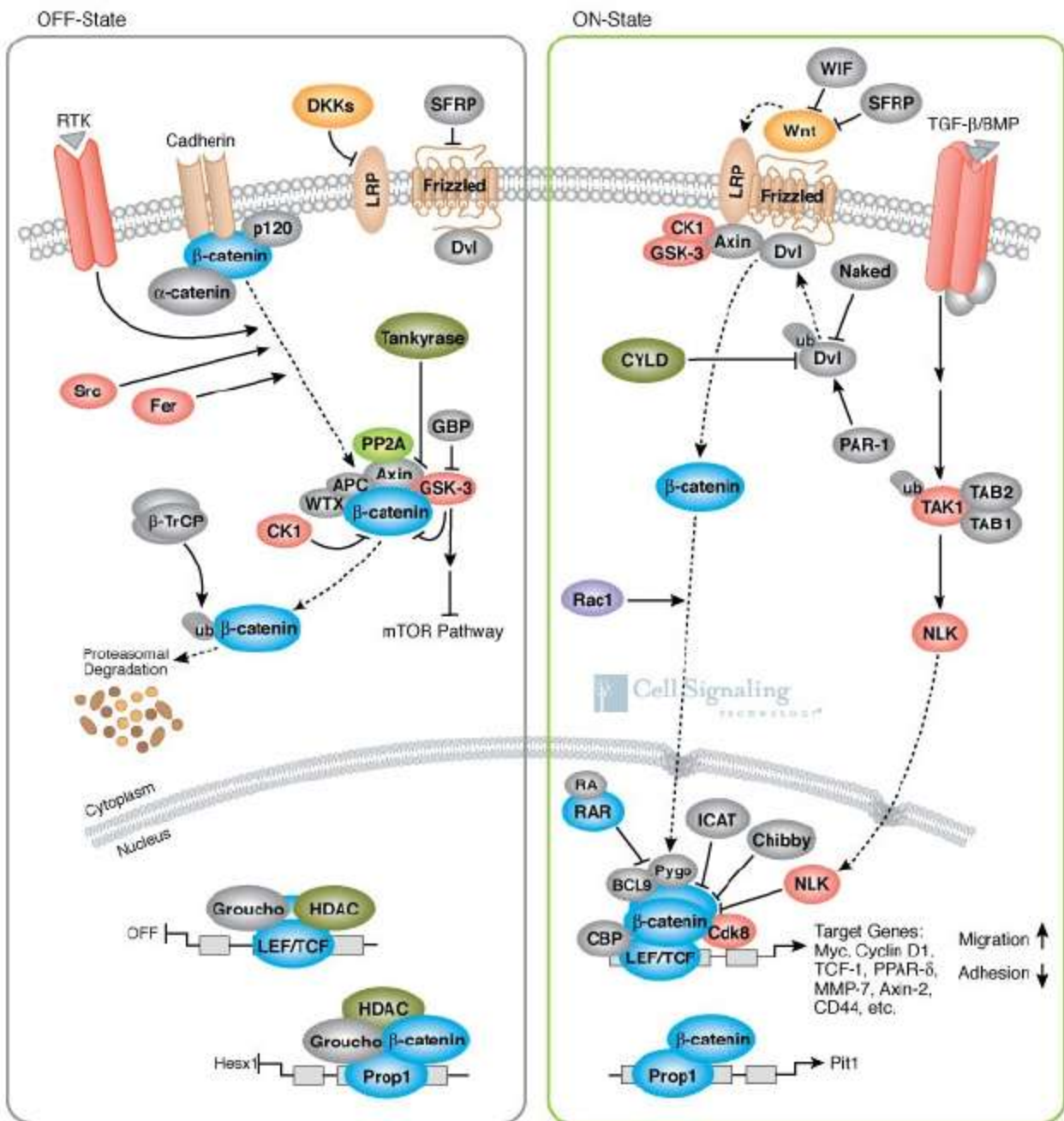


Figura 1. Via WNT. (Extraído de www.cellsignal.com/reference/pathway/Wnt_beta_Catenin.html)

3.3. A evolução do câncer colorretal

3.3.1. Iniciação

Cânceres são doenças caracterizadas pelo acúmulo de mutações no genoma de células que vão progressivamente aumentando em número em seus tecidos de origem. Estas mutações conferem às células vantagem proliferativa. Além disso, as células mutadas não mantêm arquitetura normal dos tecidos, levando progressivamente a disfunções. O conceito de acúmulo de mutações em cânceres foi descrito há duas décadas, enunciados em estudos epidemiológicos e em estudos sobre carcinogênese (Vogelstein *et. al*, 1988; Fearon e Vogelstein, 1990; Chammas e Novak, 2004).

Estudando o desenvolvimento do câncer colorretal, autores propuseram modelo onde o conceito de acúmulo progressivo de mutações foi ilustrado (Fig. 2) concretamente em uma linha de crescimento de adenomas, tumores benignos, para formas invasivas de adenocarcinoma (Vogelstein *et. al*, 1988; Fearon e Vogelstein, 1990).

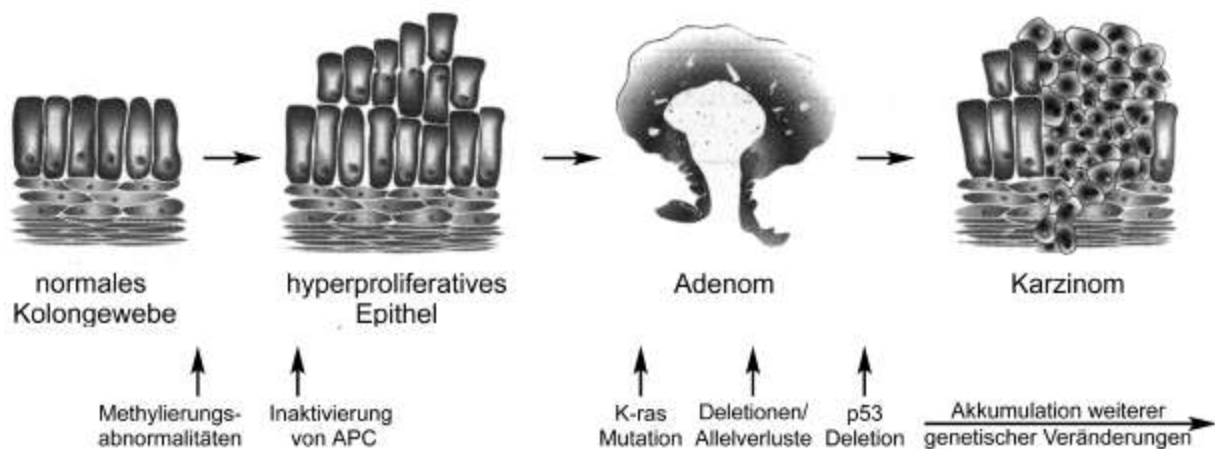


Figura 2. Sequência adenoma-carcinoma. Modelo proposto por Vogelstein e cols. para a sequência de mutações na evolução adenoma-carcinoma (Spies, 1999) (Extraído de http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/1999/161/html/1_%20Einleitung.htm)

Segundo o modelo proposto, a mutação inicial do gene APC, que exerce função reguladora na proliferação epitelial, resultaria em maior proliferação celular, levando ao surgimento de pequeno adenoma, lesão benigna originária de tecido epitelial do cólon. Segue-se a esta mutação o que se chama de hipometilação do DNA. O radical metila, alocado na cadeia de DNA anteriormente ao gene de interesse, funciona como bloqueio a leitura deste gene, logo, se ocorre hipometilação, há estímulo à expressão daquele gene que não estará bloqueado. Num segundo estágio, a ativação da proteína K-ras, proteína esta que determina o crescimento e diferenciação celular a partir de fatores extracelulares, estimularia ainda mais a proliferação, contribuindo para a evolução do adenoma inicial em adenoma intermediário. Num terceiro estágio, a mutação da proteína DCC, relacionada à adesão entre células, determina a perda da capacidade de aglutinação celular. Finalmente, há mutação da proteína p53 que, incapaz de sinalizar a necessidade do reparo celular ou a indução da morte programada, permite o acúmulo de mutações cromossomais, característica básica dos carcinomas (Fearon e Vogelstein, 1990). A alteração nessas vias conferem às células cancerosas os fenótipos cardinais da transformação maligna: capacidade de replicação infinita ou imortalização; autonomia de proliferação celular; insensibilidade a fatores antiproliferativos ou de diferenciação celular; resistência à morte celular induzida (apoptose) e indução sustentada à angiogênese (Hanahan e Weinberg, 2000).

3.3.2. Promoção

O estabelecimento e manutenção da organização tecidual requerem a formação de finas bordas entre distintas populações celulares. A manutenção de células aderidas também é necessária para a homeostase do tecido adulto e deficiências nesta adesão favorecem a disseminação metastática de células tumorais. Um dos mecanismos envolvidos relaciona-se a diferenças na adesão célula-célula, mediada pela E-Caderina, que estabelece tensão interfacial na borda entre populações de células distintas (Batlle e Wilkinson, 2012).

E-Caderina, beta Catenina e o produto do gene APC encontram-se envolvidos na via de sinalização WNT. Mutações no gene APC são comuns em neoplasias esporádicas, sendo encontradas em 65% a 70% dos cânceres. Frequências semelhantes são notadas em adenomas, sugerindo que a alteração seja inicial no processo de cancerização. E-Caderina, beta Catenina e o produto do gene APC estão envolvidos, de uma forma ou de outra, no desenvolvimento de todos os tumores do trato gastrointestinal. E-Caderina e APC funcionariam como produtos de genes supressores de tumor e a beta Catenina funcionaria como produto de oncogêne. As primeiras alterações celulares observadas quando do funcionamento inapropriado desta via é a proliferação celular descontrolada, caracterizando a fase proliferativa da neoplasia (Chammas e Novak, 2004).

3.3.3. Progressão

A metástase tumoral envolve dois processos independentes relevantes à adesão celular: destacamento da célula do tumor primário e invasão da célula em tecido a distância.

A adesão entre as células normais é forte e estável. Se a atividade das moléculas de adesão é suprimida, a célula tende a dissociar-se de seu tecido original. Por outro lado, a invasão do tumor a novos sítios pode estar relacionado a múltiplas moléculas de adesão, além de adesão mecânica dos tumores à capilares (Khoursheed, 2003).

Dados sugerem que a sinalização das junções aderentes interfere na sinalização vinda dos hemidesmosomos, junção especializada entre as células, membrana basal e matriz extracelular, presente em todos os epitélios. Os hemidesmosomos são complexos de moléculas que contêm, por exemplo, a alfa-6-beta-4 integrina. Esta molécula pertence a família de moléculas de adesão que integram os meios intra e extracelulares, daí serem chamadas de integrinas. De um lado a alfa-6-beta-4 integrina se liga a laminina, de outro, a proteínas do citoesqueleto. Esta organização é típica da

célula estacionária. A formação dos hemidesmosomos está coordenada com a formação das junções aderentes. Quando a membrana basal sofre alterações, por exemplo, proteólise ou degradação limitada, algumas moléculas presentes na membrana basal, que antes sinalizavam para a célula manter-se parada, nessa situação, expõem sítios que passam a sinalizar para a célula iniciar o processo de migração. Desta mudança do estado estacionário para o estado migratório, depreendem-se necessárias alterações do hemidesmosomo, que incluem o recrutamento de outras integrinas para a estrutura que não mais sinalizará o estado estacionário (Lohi *et al.*, 2000; Sordat *et al.*, 2000).

Pesquisas mostram que as diferentes moléculas envolvidas no processo de adesão e migração celular encontram-se em regiões muito próximas, nas membranas plasmáticas. Estas regiões são comparadas a plataformas. A função desta plataforma pode ser modificada, se houver alterações qualitativas das integrinas presentes. Estes achados, pela complexidade das estruturas supramoleculares que controlam a dinâmica de adesão, afirmam que a distribuição subcelular de cada um desses marcadores, é que terá significado funcional (Furuta *et al.*, 1988; Reeder *et al.*, 1998).

Outras moléculas presentes nessas plataformas são as tetraspaninas, proteínas de superfície que cruzam a membrana quatro vezes e que controlam negativamente a função migratória das integrinas e lipídios de membrana (Sordat *et al.*, 2002).

A migração celular dependerá da atenuação das interações célula-célula, além de remodelação da matriz extracelular por onde a célula deverá migrar. Na face anterior das células em migração, concentram-se as enzimas associadas à degradação da matriz extracelular. Além da mudança na resposta proliferativa, as células epiteliais que apresentam alterações na via da E-Caderina passam a expressar maior quantidade de colagenases, enzimas que degradam a matriz extracelular (Chammas e Brentani, 2002). É nesta face que se dá a ativação de pró-enzimas que ativam a cascata de degradação da matriz extracelular. Esta cascata se inicia com a impulsão do ativador do plasminogênio, que converte plasminogênio em plasmina. A plasmina, por sua vez, ativa as prometaloproteinasas, como as procolagenases, as progelatinases e as

proestromelina. Estas proenzimas encontram-se em estado latente na matriz extracelular. A expressão de enzimas que ativam as metaloproteinases, ou das metaloproteinases propriamente ditas, não é suficiente para definir o processo de invasão local. O sistema de degradação de matriz extracelular é também controlado por inibidores destas enzimas (TIMPs). É o balanço entre essas atividades enzimáticas que determinara a capacidade de invasão local do tumor (Chammas e Novak, 2004).

“A invasão celular leva à remodelação tecidual. Esta remodelação é acompanhada da liberação de uma série de fatores de crescimento presentes de forma latente na matriz extracelular e que, uma vez liberados, induzem respostas fisiológicas/patológicas, como a reação inflamatória. Vários componentes da reação inflamatória podem promover ou inibir o crescimento de tumores” (Chammas e Novak, 2004).

3.4. A E-Caderina e a beta Catenina na evolução do câncer colorretal

Têm-se demonstrado que modificações no complexo caderina-catenina estão presentes em vários tipos de tumores especialmente aqueles de caráter mais agressivo e com maior potencial metastático (Barth *et al.*, 1997; Beavon, 2000). Moléculas de adesão como as integrinas, E-Caderina, cateninas e CD44 parecem importantes no prognóstico de pacientes com câncer de cólon (Agnantis *et al.*, 2004). Tal potencial pode estar relacionado não apenas a adesão celular, mas a via de sinalização WNT. Proteínas de adesão são moléculas de fixação traduzidas a partir de genes relacionados não somente a formação do sistema de adesão intercelular, mas também a capacidade de induzirem a divisão celular estando, por isso, relacionadas à possibilidade de disseminação da neoplasia (Pignatelli, 1993; Maruyama *et al.*, 2000; Kanazawa *et al.*, 2002; Ougolkov *et al.*, 2002; Khoursheed *et al.*, 2003; Kojima *et al.*, 2004; Miyamoto *et al.*, 2004; Delektorskaya *et al.*, 2005; Jesus *et al.*, 2005; Elzagheid *et al.*, 2006; Elzagheid *et al.*, 2008; Henrik *et al.*, 2008; Onder *et al.*, 2008; Tsanou *et al.*, 2008; Wanitsuwan *et al.*, 2008).

A E-Caderina é determinada pelo cromossoma 16q24, região frequentemente perdida em doenças malignas. Quando pesquisada no tecido epitelial normal, sua expressão está sistematicamente preservada, distribuída de forma homogênea na membrana celular. Por outro lado, tem-se observado que há diminuição ou ausência da expressão da proteína E-Caderina em seu sítio normal na neoplasia colorretal (Ramburan e Govender, 2002; Delektorskaya *et al.*, 2005).

As células epiteliais do trato gastrointestinal têm características de epitélio especializado, apresentando tipicamente células polarizadas. Desta maneira, glicoproteínas produzidas por células do cólon são constitutivamente levadas para o pólo apical da célula. Uma das primeiras alterações observadas ao longo da progressão tumoral é a perda da capacidade de polarização das proteínas produzidas pelas células epiteliais. As moléculas que seriam secretadas ou acumuladas na luz intestinal passam também a ser direcionadas ao polo basal das células, facilitando sua difusão para o interstício, podendo ser encontradas na circulação (Priolli *et al.*, 2010). A perda da polarização celular está associada a alteração funcional das junções intercelulares. Os domínios apicais são separados fisicamente dos domínios basolaterais pelas junções oclusivas (junções do tipo *tight*) e pelas junções aderentes. A composição química da membrana destes dois domínios é diferente, devendo haver sistema de sinalização que identifique as vesículas de secreção e seus destinos, apical ou basolateral. Evidências indicam que as junções aderentes estão freqüentemente alteradas em células tumorais, podendo ser esta alteração o passo inicial para a perda de polarização (Chammas e Novak, 2004).

Estudo *in vitro* demonstrou que a perda da E-Caderina pode estar associada à disseminação e pior diferenciação em carcinoma colorretal. A transferência de E-Caderina para dentro de tumores humanos pouco diferenciados aumentou a polaridade celular e a coesão intercelular e inibiu a disseminação *in vitro*, enquanto a redução da expressão da E-Caderina em clones não invasivos resultou na aquisição de comportamento invasivo (Pignatelli *et al.*, 1993). Em 2006, autores sugeriram que a expressão da E-caderina pode ser utilizada como marcador de recorrência do adenocarcinoma colorretal e reafirmaram a perda da expressão da E-caderina nos

tumores colorretais menos diferenciados (Pignatelli *et al.*, 1993; Kanazawa *et al.*, 2002; Ramburan e Govender, 2002; Kojima *et al.*, 2004; Delektorskaya *et al.*, 2005; Elzagheid *et al.*, 2006; Onder *et al.*, 2008; Tsanou *et al.*, 2008) Tais achados contradizem trabalhos que não relacionam a expressão da E-Caderina com fatores morfológicos ou prognósticos no adenocarcinoma colorretal. (Nollet *et al.*, 1999; Ramburan e Govender 2002; Hahn-Strömberget. *et al.*, 2009).

O gene determinante da beta Catenina se localiza no cromossomo 3p22 em região do genoma humano frequentemente alterado em uma série de neoplasias malignas. No CCR, estudos têm mostrado que a mutação no gene beta Catenina pode resultar no acúmulo da proteína no citoplasma e núcleo da célula resultando em aumento da atividade transcricional (Lee *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2008).

Em 2004, foi demonstrado que o primeiro degrau para o desenvolvimento da neoplasia esporádica, além da perda do controle do gene APC, é a perda do complexo caderina-catenina (Frattoni, *et al.*, 2004). Mutações inativadoras no gene APC ou mutações ativas do gene beta Catenina resultam em falha na fosforilação da beta Catenina, com o seu acúmulo no citoplasma e ativação aberrante da via WNT (Smith *et al.*, 2008). A degradação da beta Catenina é controlada positivamente pelo produto do gene APC. Sua mutação ocorre quase sempre na transição da mucosa normal para adenomas de fase precoce, como sugerido no modelo de Fearon e Vogelstein (Fearon e Vogelsten, 1990). Sugere-se que esta seja uma alteração inicial no processo de cancerização (Bright-Thomas e Harget, 2003; Garcea *et al.*, 2003). As primeiras alterações celulares observadas quando do funcionamento inapropriado da via de sinalização WNT é a proliferação celular descontrolada (Bright-Thomas e Harget, 2003). Além da mudança na resposta proliferativa, as células epiteliais que apresentam alterações na E-Caderina passam a expressar maior quantidade de colagenases, enzimas que degradam a matriz extracelular, e facilitam o processo de invasão tecidual, mediada pelo equilíbrio das metaloproteinases e das TIMPs (Chammas e Brentani, 2002).

3.5. Classificação histopatológica do câncer colorretal

3.5.1. Gradação histopatológica

“Os termos diferenciação e anaplasia aplicam-se às células parenquimatosas das neoplasias. A diferenciação refere-se ao grau de semelhança entre as células parenquimatosas e células normais comparáveis, tanto ao nível morfológico quanto funcional. Por conseguinte, os tumores bem diferenciados são compostos de células que se assemelham às células normais maduras do tecido de origem da neoplasia. Os tumores pouco diferenciados ou indiferenciados possuem células não especializadas de aspecto primitivo. As neoplasias malignas variam desde células bem diferenciadas à células indiferenciadas. A falta de diferenciação ou anaplasia é considerada uma característica básica da transformação” (Cotran, 2000).

Na prática clínica, a gradação histológica do câncer colorretal é bastante subjetiva (Compton, 2003). Apesar disso, ela tem sido mostrada como fator prognóstico estágio-independente do câncer colorretal, por numerosas análises multivariadas (Compton, 2000a; Compton, 2000b; Henson, 1999), especialmente nos tumores de alto grau histológico (Compton, 2003).

O adenocarcinoma colorretal se desenvolve nas glândulas do intestino e são responsáveis por 95% dos tumores desta localização. Quanto ao grau de diferenciação, os tumores de cólon devem ser subdivididos em: grau 1, grau 2, grau 3 e grau 4, considerando-se a extensão da aparência glandular dos carcinomas, respectivamente, mais de 95%, de 50% a 95%, de 5% a 50% ou menos que 5% de estruturas glandulares (Coudry *et al.*, 2004; Hamilton and Aaltonen, 2000).

GX Grau de diferenciação não pode ser avaliado;

G1 Bem diferenciado;

G2 Moderadamente diferenciado;

G3 Pouco diferenciado;

G4 Indiferenciado;

3.5.2. Estadiamento TNM

Um dos sistemas de estadiamento mais utilizados na atualidade é o TNM publicado pela *American Joint Committee on Cancer* (UICC), tendo sido baseado no trabalho de Pierre Denoix e publicado em outubro de 1966 (Sobin e Wittekind, 2002).

3.5.2.1. Classificação clínica

A classificação clínica TNM pressupõe a avaliação do T, nível de penetração tumoral na parede intestinal do tumor primário; N, linfonodo regional comprometido e; M, presença ou ausência de metástase à distância, como se segue:

T – Tumor primário

TX O tumor primário não pode ser avaliado;

T0 Não há evidência de tumor primário;

Tis Carcinoma *in situ*: intra-epitelial ou invasão da lâmina própria;

T1 Tumor que invade a submucosa;

T2 Tumor que invade a muscular própria;

T3 Tumor que invade além da muscular própria, alcançando a subserosa ou os tecidos;

T4 Tumor que invade diretamente outros órgãos ou estruturas e/ou que perfura o peritônio visceral.

N – Linfonodos regionais

Nx Os linfonodos regionais não podem ser avaliados;

N0 Ausência de metástase em linfonodos regionais;

N1 Metástase em 1 a 3 linfonodos regionais;

N2 Metástase em 4 ou mais linfonodos regionais.

M – Metástase à distância

MX A presença de metástase à distância não pode ser avaliada;

M0 Ausência de metástase à distância;

M1 Metástase à distância.

Para o cólon descendente, admitem-se os seguintes linfonodos regionais a serem analisados: linfonodo cólico esquerdo e mesentérico inferior. Para o cólon sigmóide, interessam o sigmóide, cólico esquerdo, retal superior (hemorroidal), mesentérico inferior e retossigmóide. Metástases em linfonodos diferentes dos listados acima são classificados como metástases à distância.

3.5.2.2. Classificação patológica (pTNM)

O estadiamento patológico é derivado do exame anatomopatológico da peça operatória após ressecção do tumor. As categorias pT, pN e pM, correspondem às categorias T, N e M ao exame histopatológico.

Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1, T2	N0	M0
Estádio IIA	T3	N0	M0
IIB	T4	N0	M0
Estádio IIIA	T1, T2	N1	M0
IIIB	T3, T4	N1	M0
IIIC	Qualquer T	N2	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Figura 3. Grupamento dos adenocarcinomas de cólon por estádios

3.6. Processamento de imagem assistido por computador

Em 1992 foi apresentado em nosso meio método computadorizado que permite a avaliação quantitativa de estruturas microscópicas (Novelli, 1992). Autores se beneficiaram, como era o objetivo inicial do idealizador do método, quanto à pesquisa mais rápida e objetiva (Niporciukas, 1992; Novelli *et al.*, 1997; Priolli *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 2002a; Martinez *et al.* 2002b; Priolli *et al.*, 2003; Sthephani *et al.*, 2004; Priolli *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2011)

Baseado na análise de imagem assistida por computador foram estudados a cicatrização das anastomoses intestinais (Novelli *et al.*, 1997; Priolli *et al.*, 2003;

Sthephani *et al*, 2004), a superfície isquêmica de mucosa gástrica em cães submetidos à vagotomia (Martinez *et al.*, 2002a.; Martinez *et al.* 2002b), a utilização de anel biofragmentável em comparação a sutura manual em anastomose colo-cólica (Matos *et al.*, 1993) e a neovascularização da córnea de ratos (Niporciukas, 1992) e mais recentemente a quantificação de marcadores tumorais (Priolli *et al.*, 2003; Priolli *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2011).

Programas de análise computadorizada foram desenvolvidos por empresas específicas e atualmente estão disponíveis comercialmente, tal como o utilizado nesse estudo.

O método de análise de imagem auxiliado por computador foi descrito detalhadamente em estudo anterior (Novelli, 1992. Priolli, 1999).

4. MÉTODO

4. MÉTODO

4.1. Adequação do projeto

A realização desse estudo obedeceu todas as etapas previstas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco (USF) e as exigências da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde (Resolução CNS196/96). O estudo somente foi iniciado após autorização da USF e do CONEP.

4.2. Casuística

Dos 371 casos de câncer colorretal arrolados de casuística de nosso serviço, foram estudados 60 doentes consecutivos portadores de adenocarcinoma colorretal operados com intenção curativa entre setembro de 2008 e fevereiro de 2009 no Hospital Universitário São Francisco, Bragança Paulista.

Foram excluídos os portadores de adenocarcinoma de cólon direito e/ou reto, menores de 18 anos, pacientes submetidos a tratamento neoadjuvante e/ou os que apresentaram número de linfonodos ressecados menor que 12, além daqueles com história sugestiva de câncer colorretal hereditário, restando 29 doentes para a casuística de interesse.

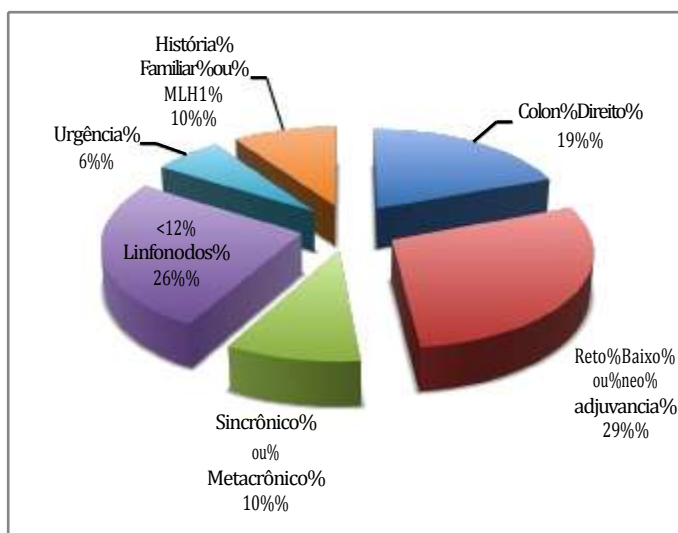


Figura 4. Casos excluídos

4.3. Estadiamento preoperatório

Os enfermos selecionados para o estudo foram submetidos ao estadiamento clínico, laboratorial e por exames de imagem segundo o protocolo de conduta do Grupo de Coloproctologia da Disciplina de Cirurgia Geral da Universidade São Francisco (Cordeiro *et al.*, 2001).

O estadiamento foi feito com base no exame clínico e proctológico completos, colonoscopia com biópsia e estudo histopatológico, enema opaco, radiografia do tórax, tomografia computadorizada de tórax e abdômen e/ou ultrassonografia abdominal.

4.4. Preparo preoperatório

Os doentes operados de forma eletiva foram submetidos ao preparo mecânico e biológico do intestino grosso. Na véspera da operação foi permitida dieta líquida sem resíduos e, 12 horas antes do procedimento o doente permaneceu em jejum.

O preparo mecânico foi feito com laxante osmótico (manitol 20%) diluído em suco de laranja e ingerido em intervalos de 10 minutos até que se completasse a

ingestão de 1 litro da solução, associado a enteroclistmas com fosfato sódico, quantos fossem necessários até o clareamento completo do líquido de excreção intestinal.

A redução do conteúdo bacteriano colorretal deu-se por meio de metronidazol em três doses de 400mg a cada 8 horas, iniciadas 24 horas antes do procedimento operatório.

4.5. Técnica operatória

Os doentes foram submetidos à anestesia geral a critério do Serviço de Anestesiologia. Depois de alcançar plano anestésico adequado, o acesso à cavidade abdominal foi realizado através de celiotomia mediana que se estendeu de acordo com a necessidade de acesso adequado a cada doente. A parede abdominal foi aberta por planos e as bordas da incisão protegidas pela fixação de compressas cirúrgicas.

Em seguida, realizou-se inventário da cavidade abdominal com o intuito de se confirmar a ressecabilidade do tumor e identificar metástases intracavitárias. Os doentes que apresentaram doença metastática no fígado foram submetidos à biópsia local para posterior confirmação histopatológica.

As ressecções seguiram o padrão das cirurgias oncológicas com dissecção da veia de drenagem seguida da ligadura da artéria correspondente à lesão antes da manipulação da neoplasia. A ligadura arterial distal ficou marcada com fio longo. A extensão necessária foi determinada pela necessidade de ablação dos linfonodos extramurais, os quais acompanham os vasos cólicos dos seguimentos acometidos.

4.6. Exame histopatológico

O estudo histopatológico dos doentes selecionados foi realizado por patologista experiente no diagnóstico de CCR, que não teve acesso aos demais aspectos do estudo.

Para a realização do estudo histopatológico todos os espécimes cirúrgicos, previamente fixados em solução de formalina a 10% foram incluídos em blocos de parafina. Três cortes de 4 μ m foram obtidos de cada bloco na periferia do tumor, para obtenção de áreas com e sem tumor, sendo corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) para diagnóstico anatomopatológico. A verificação de comprometimento neoplásico dos linfonodos ressecados foi avaliada por meio de cortes corados por HE. Quanto ao grau histológico os carcinomas foram classificados em bem diferenciados, moderadamente diferenciados, pouco diferenciados considerando a extensão da aparência glandular dos carcinomas.

Todos os doentes foram classificados de acordo com o estadiamento TNM (Sobin e Wittekind, 2002).

4.7. Técnica de imunistoquímica (E-Caderina, beta Catenina e MLH-1)

Para a realização do estudo imunistoquímico todos os espécimes previamente fixados em formol e incluídos em blocos de parafina foram submetidos a dois cortes adicionais de 4 μ m depositados em lâminas previamente salinizadas. As lâminas foram desparafinadas por três banhos sucessivos de 5 minutos em xilol e três banhos em etanol absoluto. A seguir, acondicionadas em recipiente próprio e submersas em solução tampão fosfato de sódio (PBS) 0,05M e pH 7,2 por 10 minutos. Foi realizado bloqueio das peroxidases endógenas pelo gotejamento de peróxido de hidrogênio 30 volumes a três por cento, em câmara úmida à temperatura ambiente durante 10 minutos, seguido de mais uma lavagem com PBS por 10 minutos. Terminada esta etapa, realizou-se a recuperação antigênica. As lâminas foram acondicionadas em cuba com solução de citrato 10mM, pH 6,0 e submetidas ao calor em banho-maria à temperatura de 35°C por período de 40 minutos e, ao final deste processo, deixadas

esfriar por 20 minutos em temperatura ambiente, sendo realizada lavagem com PBS por 5 minutos. As lâminas foram coradas por meio da técnica imunistoquímica com anticorpo monoclonal anti beta Catenina, anticorpo monoclonal anti-E-Caderina e anticorpo monoclonal anti-MLH1 (Sigma Chemical CO®, Saint Louis, EUA).

O complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (ABC - Dako Cytomation®, Copenhagen, Dinamarca) adaptado às condições laboratoriais foi utilizado. As lâminas foram incubadas com anticorpo específico diluído em albumina bovina (Sigma Chemical CO®, Saint Louis, EUA) durante 16 a 18 horas a 4°C. Em seguida, lavadas em tampão PBS, com três trocas de três a cinco minutos e incubadas com anticorpo secundário biotilado (anti-IG - Dako Cytomation®, Copenhagen, Dinamarca) diluído em albumina bovina durante 30 minutos à temperatura ambiente. Seguiram as etapas: lavagem em tampão PBS com três trocas de 5 minutos cada; incubação com o complexo ABC diluído em tampão Tris, durante 30 minutos à temperatura ambiente; lavagem em tampão PBS com três trocas de três a cinco minutos cada; revelação com solução de diaminobenzidina (DAB - Sigma Chemical CO®, Saint Louis, EUA) 0,6%, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,06%. As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada, contracoradas com hematoxilina de Harris por um minuto, e novamente lavadas em água corrente e água destilada.

O processo final de desidratação das lâminas obedeceu às seguintes passagens: etanol 80 %, etanol 90 %, etanol absoluto, xilol 1, xilol 2, xilol 3. Após o processo de imunocoloração as lâminas foram montadas com lamínula e resina.

4.8. Análise histopatológica das lâminas imunocoradas

A análise microscópica das lâminas foi realizada com o auxílio de microscópio óptico comum, com ajuda de lente objetiva de 100x e com magnificação final de 400x. A leitura de todas as lâminas foi realizada por patologista experimentado na interpretação imunistoquímica e que não teve acesso aos dados dos pacientes. A reação foi considerada positiva quando a expressão ocorreu de modo difuso, com pontos de

intensidades variáveis, e distribuição homogênea. Controles, positivo e negativo, foram adotados para garantir a qualidade das lâminas.

Foram avaliadas áreas em graus semelhantes de diferenciação de modo aleatório. A imunocoloração foi analisada de acordo com o conteúdo da imunorreação e localização predominante da expressão do antígeno beta Catenina e E-Caderina conforme descrito no item 4.10. A positividade do anticorpo anti-MLH1 foi utilizada apenas como critério de inclusão/exclusão de casos para o estudo.

4.9. Determinação do conteúdo das proteínas de adesão, beta Catenina e E-Caderina, no tecido neoplásico por processamento de imagem assistido por computador

O sistema de captação de imagem é composto por câmera Digital Color (Samsung® SCC 131), acoplada a microscópio (Nikon® (-photo-2-YSC), ligado a monitor (Dell®, 17 polegadas) e ao computador (Dell-Dimension®, processador Pentium 4, dual-core, 1.8 Mb, plataforma Windows XP®).

O processamento da imagem foi formado por níveis de cores e tonalidades distintas, permitindo a visibilização de estruturas.

A imagem da lâmina observada no monitor foi focalizada e em seguida captada por programa de aquisição de imagem. As imagens adquiridas foram congeladas e analisadas pelo sistema. A mensuração foi executada com aumento de 100X em área representativa da neoplasia. Foi adotada a medida de subtração RGB (*Red, Green, Blue*), e o valor da quantificação da análise computadorizada foi o da média obtida por três medidas da mesma lâmina em campos representativos da neoplasia e da graduação histológica.

Ao selecionar determinada estrutura tecidual, no caso a imunocoloração da beta Catenina ou da E-Caderina, apenas ela foi observada de modo colorido, realçando

estruturas da imagem pela imunocoloração específica. O programa associou tabela de cores aos valores numéricos dos pontos que compunham a imagem. Somente a estrutura composta pelos números resultantes da combinação *RGB* que o usuário selecionou apareceu colorida na tela do monitor, deixando escuro todo o restante da tela.

Usou-se filtro da média para reduzir rapidamente os ruídos eletrônicos, minimizando o contraste nas bordas da imagem para atenuar as distorções geradas por processo de digitalização e produzidas por interferências elétricas diversas. O cálculo da média foi feito pela convolução de máscara de 3x3, onde o *pixel* central da máscara foi substituído pelo da média desse, com seus oito vizinhos.

O programa analisou a imagem, permitindo ao usuário tomar conhecimento dos valores correspondentes a densidade óptica e da quantidade de imunocoloração da beta Catenina ou E-Caderina no tecido selecionado.

O pesquisador não teve prévio acesso ao estágio TNM ao qual pertencia o paciente do espécime analisado.

4.10. Análise da expressão das proteínas de adesão beta Catenina e E-Caderina

A análise da imunocoloração foi classificada de acordo com seu conteúdo e localização da imunocoloração conforme se segue:

a) Conteúdo de beta Catenina e E-Caderina nos tumores, expressos conforme descrito no item 4.9.

b) Localização predominante da imunocoloração das proteínas de adesão classificadas em:

- Membranosa, quando a imunorreação ocorreu predominantemente na membrana celular do adenocarcinoma;

- Citoplasmática, quando a imunorreação ocorreu difusamente no citoplasma celular, associado ou não ao componente membranoso.

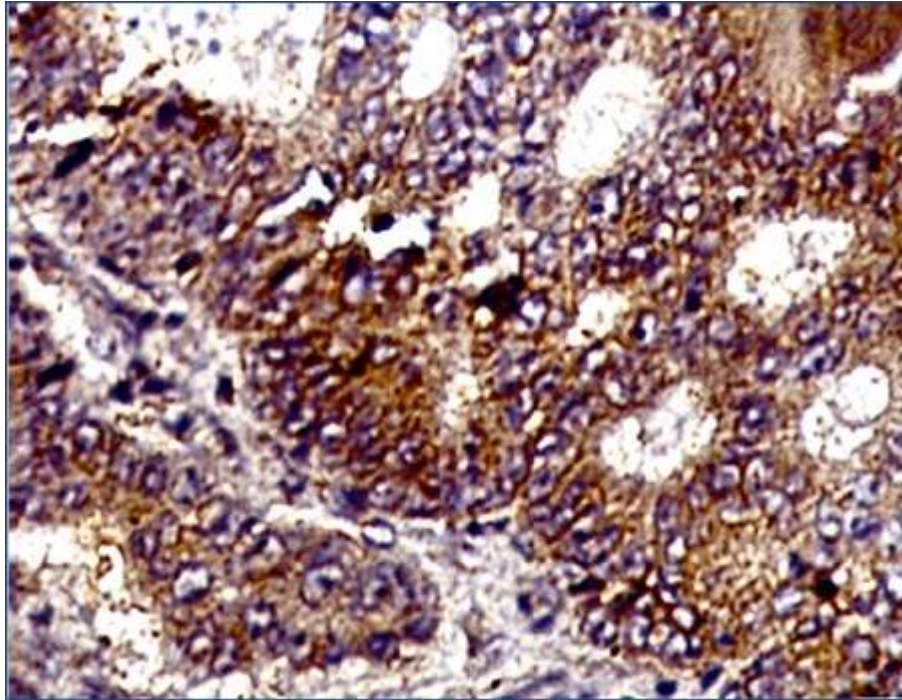


Figura 5. Padrão de adesão da imunocoloração proteica. E-Caderina citoplasmática (Magnificação de 400x)

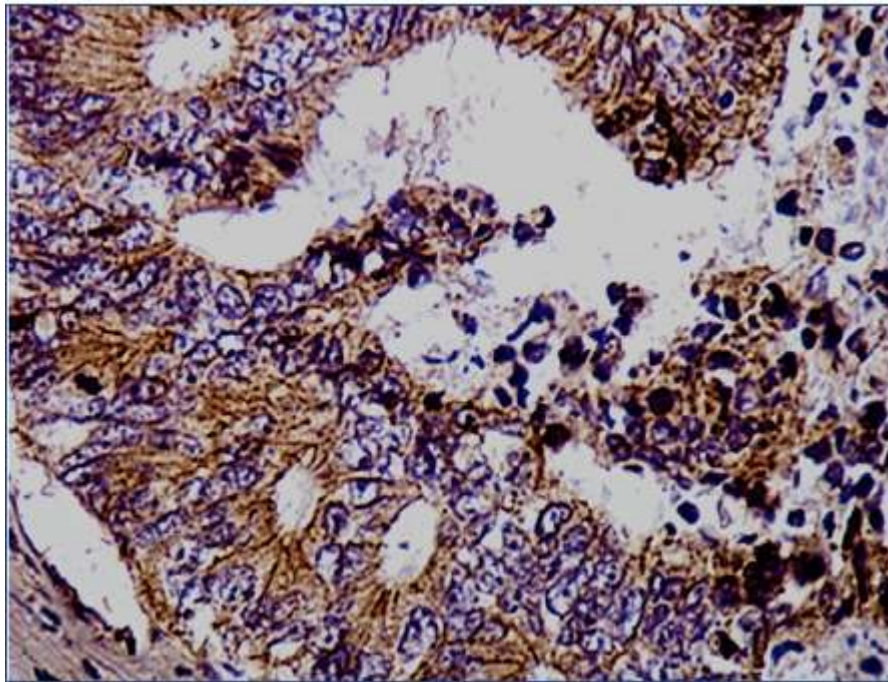


Figura 6. Padrão de adesão da imunocoloração proteica. E-Caderina membranosa (Magnificação de 400x)

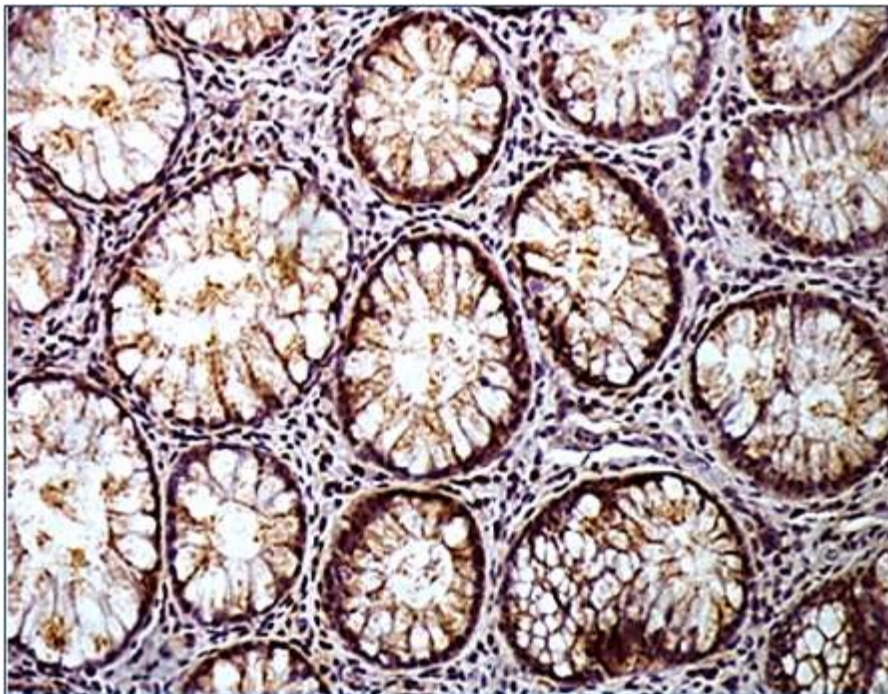


Figura 7. Padrão de adesão da imunocoloração proteica. Beta Catenina membranosa (Magnificação de 400x)

4.11. Análise estatística

A análise dos resultados obtidos foi realizada adotando-se nível de significância menor que 5% ($p \leq 0,05$), mediante os seguintes modelos: estatística descritiva; medidas de tendência central; Teste de normalidade; Teste de igualdade das médias (*t* de Student); Teste de igualdade de medianas (Mann-Whitney); Análise de variância (Kruskal-Wallis).

Para análise estatística dos resultados foi utilizado o programa de análise estatística SPSS for Windows, versão 13.0.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados sob a forma de tabelas ou figuras. A presença do asterisco indica existência de significância para $p < 0,05$. Dados individuais estão apresentados no ANEXO 1.

5.1 Distribuição por gênero e idade

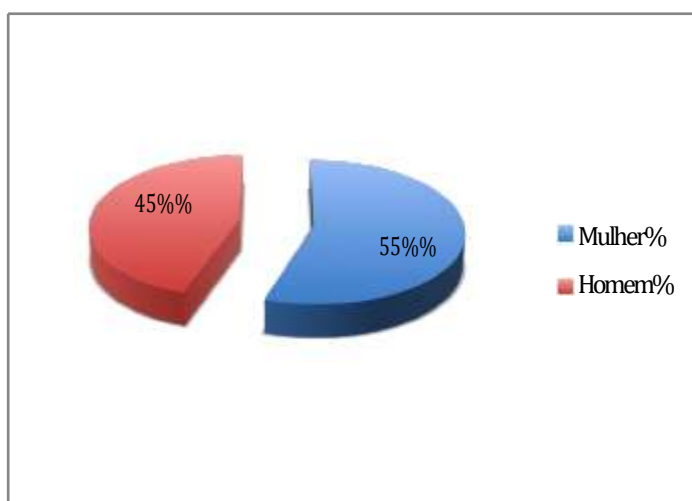


Figura 8. Distribuição por gênero

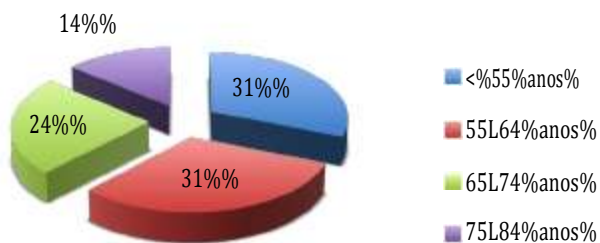


Figura 9. Distribuição por idade

5.2 Quanto à beta Catenina

Tabela 1. Conteúdo de beta Catenina em relação ao gênero

Variável	Classificação	n	Média(%)	CI-95%	p
Sexo	Homens	13	4,90	3,0-6,7	0,59
	Mulheres	16	5,34	3,9-6,8	

Mann-Whitney

n - numero; CI - Intervalo de Confiança; p - nível de significância; * p< 0,05

Tabela 2. Conteúdo de beta Catenina em relação à idade

Variável	Classificação	n	Média(%)	CI-95%	p
Idade	< 55 anos	9	5,60	3,14-8,05	0,3
	55-64 anos	9	4,97	3,12-6,8	
	65-74 anos	7	3,86	2,02-5,69	
	75-84 anos	4	6,78	0,7-12,8	

Kruskal-Wallis

n- numero; CI- Intervalo de Confiança; p- nível de significância; * p< 0,05

Tabela 3. Conteúdo de beta Catenina em relação ao grau histológico

Variável	Classificação	n	Média(%)	CI-95%	p
Grau Histológico	Bem diferenciado	5	5,90	3,5-8,2	0,48
	Moderadamente diferenciado	23	5,05	3,7-6,3	
	Indiferenciado	1	3,40	-	

Kruskal-Wallis

n- numero; CI- Intervalo de Confiança; p- nível de significância; * p< 0,05

Tabela 4. Conteúdo de beta Catenina em relação ao estágio TNM

Variável	Classificação	n	Média(%)	CI-95%	p
TNM	I	5	3,6	0,43-6,88	0,04*
	II	8	4,2	2,85-5,55	
	III	8	4,8	2,56-6,91	
	IV	8	7,4	4,79-10,00	

Anova

n- numero; CI- Intervalo de Confiança; p- nível de significância; * $p < 0,05$

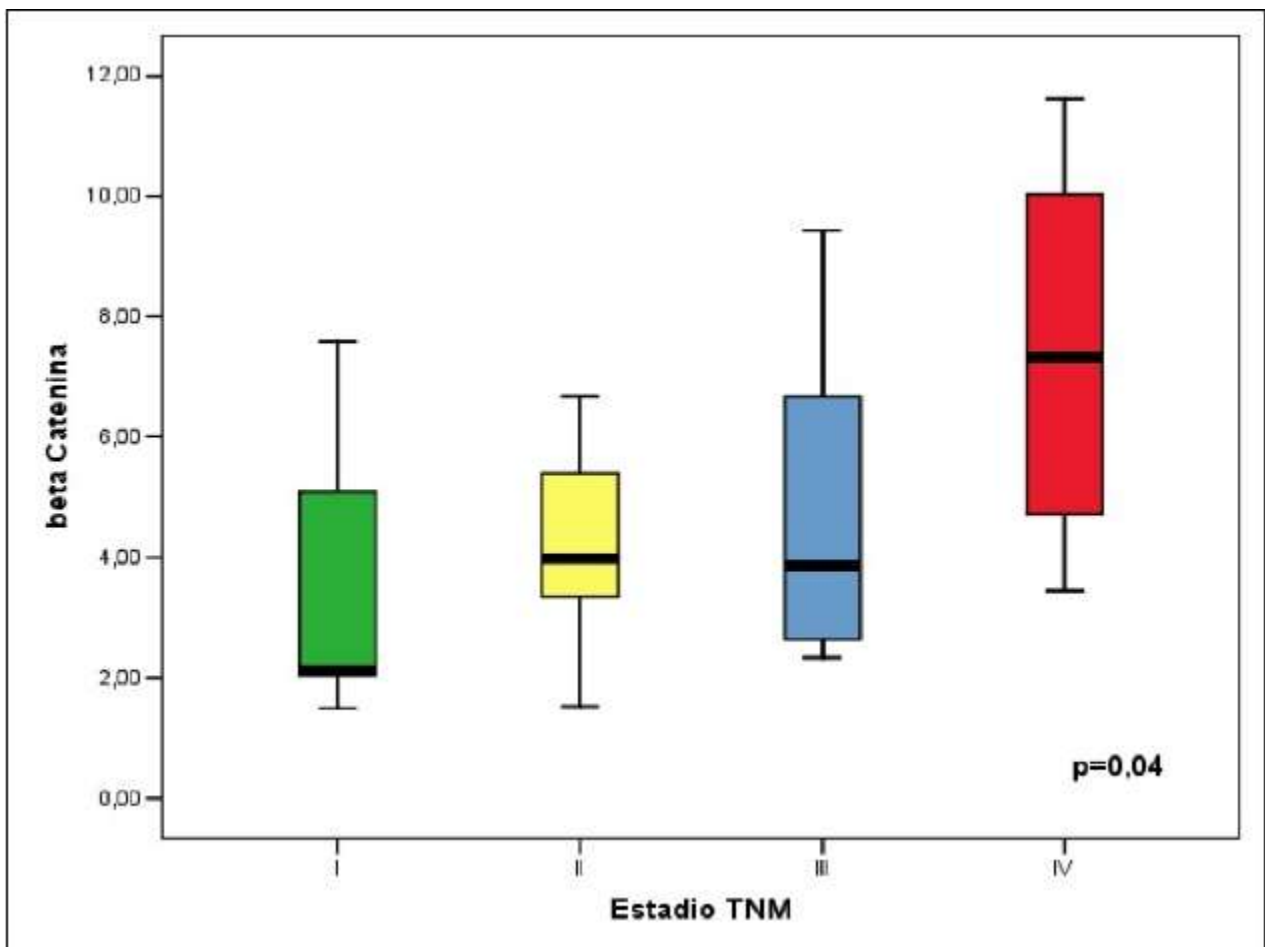


Figura 10. Conteúdo de beta Catenina nos estádios TNM

Tabela 5. Conteúdo de beta Catenina em relação a profundidade de invasão tumoral na parede do cólon

Variável	Classificação	n	Média(%)	CI-95%	p
	T1	1	1,49	-	
Profundidade de Invasão (T)	T2	4	4,20	0,01-8,40	0,03*
	T3	16	4,57	3,25-5,88	
	T4	8	7,22	4,98-9,45	

Kruskal-Wallis

n- numero; CI- Intervalo de Confiança; p- nível de significância; * p< 0,05

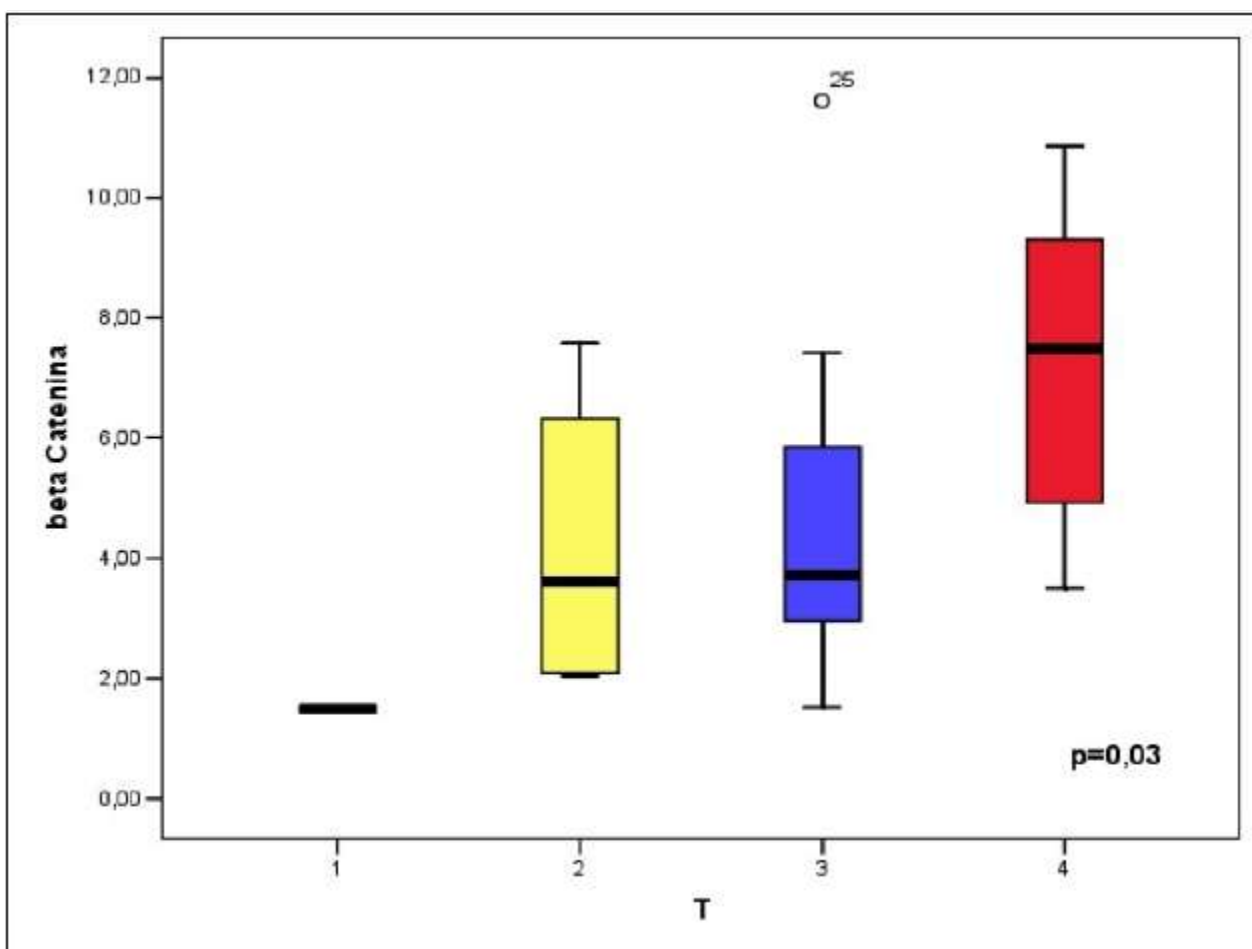


Figura 11. Conteúdo de beta Catenina e profundidade de invasão tumoral

Tabela 6. Conteúdo de beta Catenina em relação ao acometimento linfonodal

Variável	Classificação	n	Média(%)	CI-95%	p
Linfonodos (N)	N0	13	3,99	2,8-5,18	0,05*
	N1	8	4,75	2,59-6,90	
	N2	8	7,40	4,7-10,00	

Kruskal-Wallis

n- numero; CI- Intervalo de Confiança; p- nível de significância; * p< 0,05

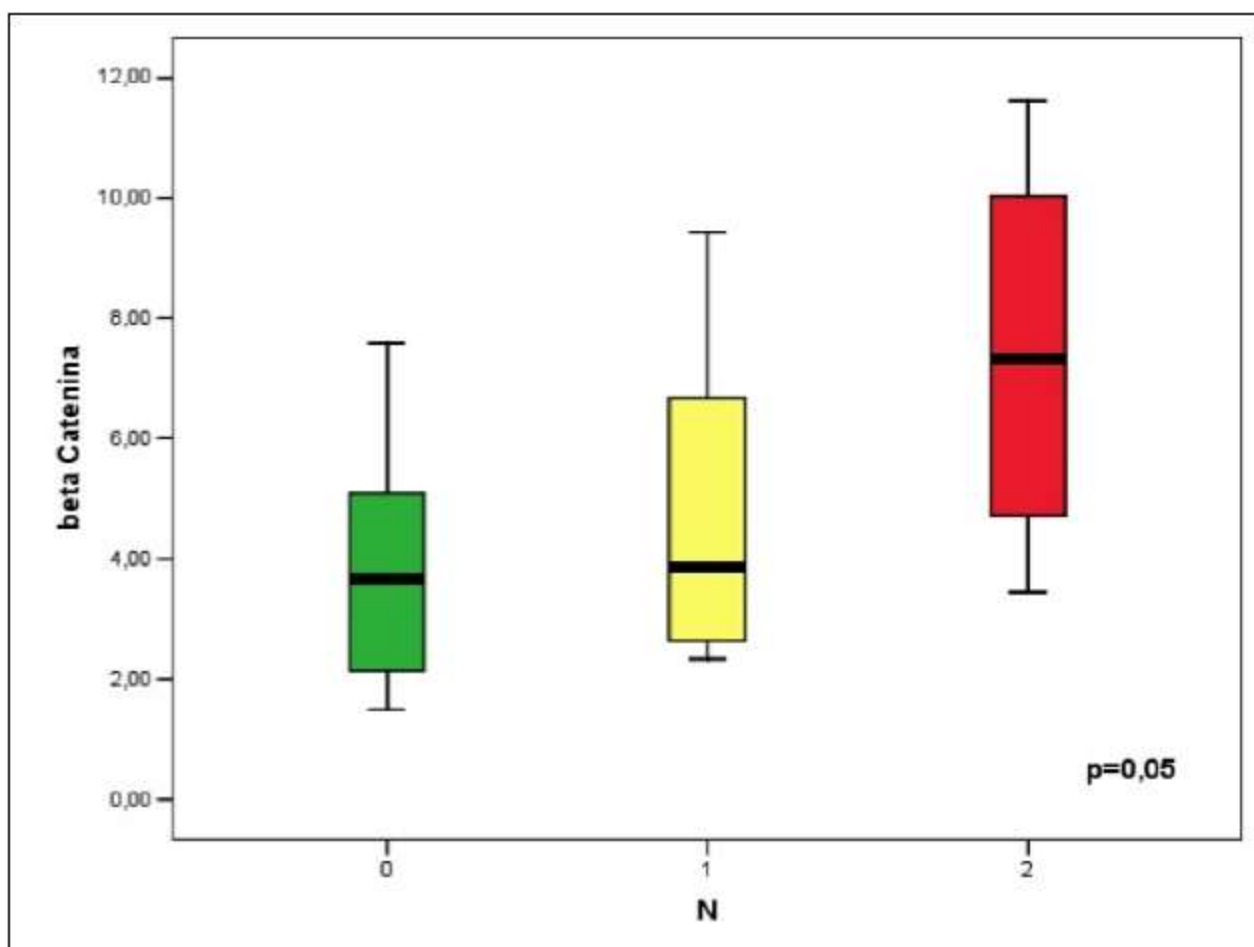


Figura 12. Conteúdo de beta Catenina e acometimento linfonodal em adenocarcinoma colorretal

Tabela 7. Conteúdo de beta Catenina em relação à presença de metástase à distância

Variável	Classificação	n	Média(%)	CI-95%	p
Metástase	ausente	13	3,99	2,80-5,18	0,04*
	presente	16	6,07	4,43-7,72	

Mann-Whitney

n- numero; CI- Intervalo de Confiança; p- nível de significância; * p< 0,05

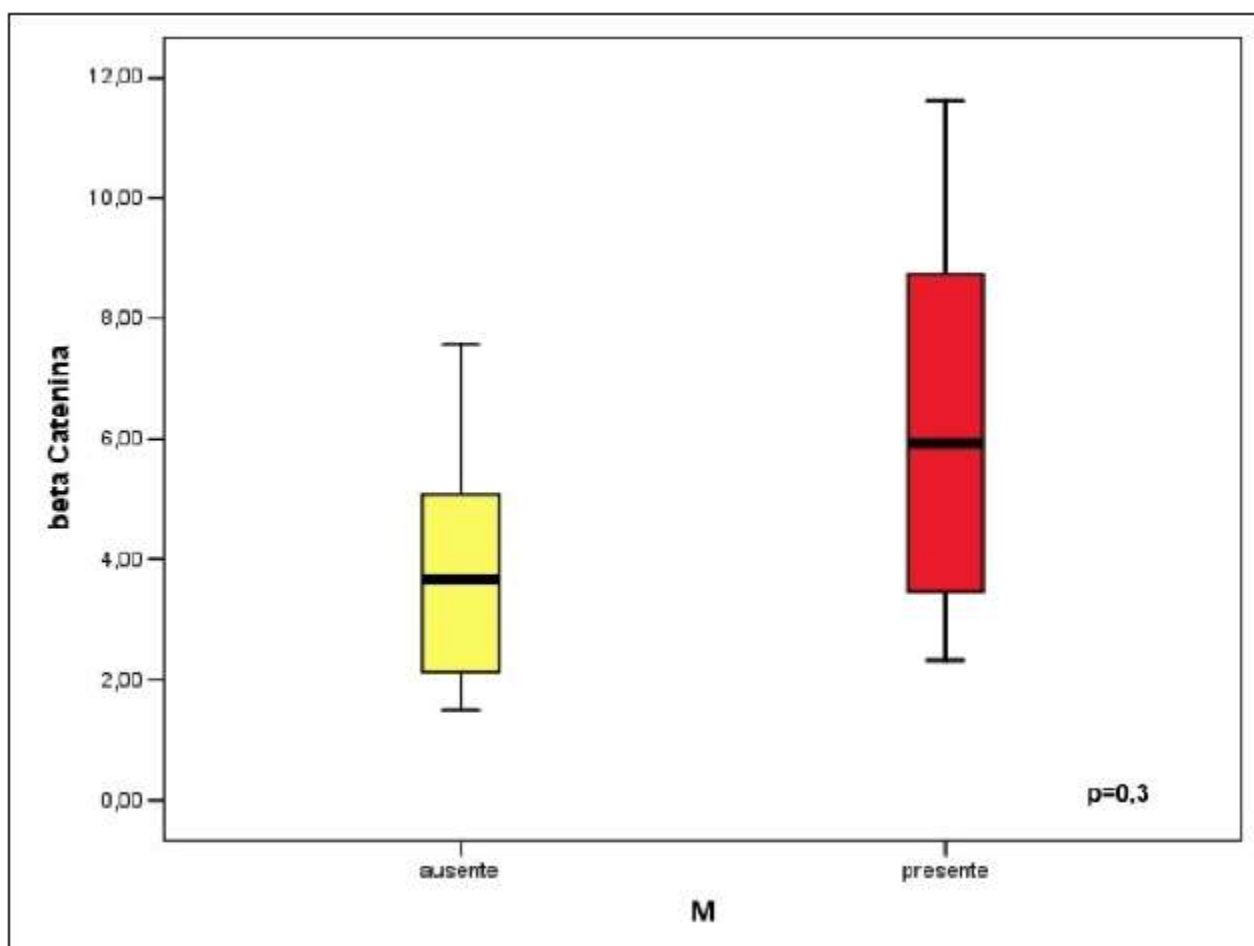


Figura 13. Conteúdo de beta Catenina e presença de metástase tumoral

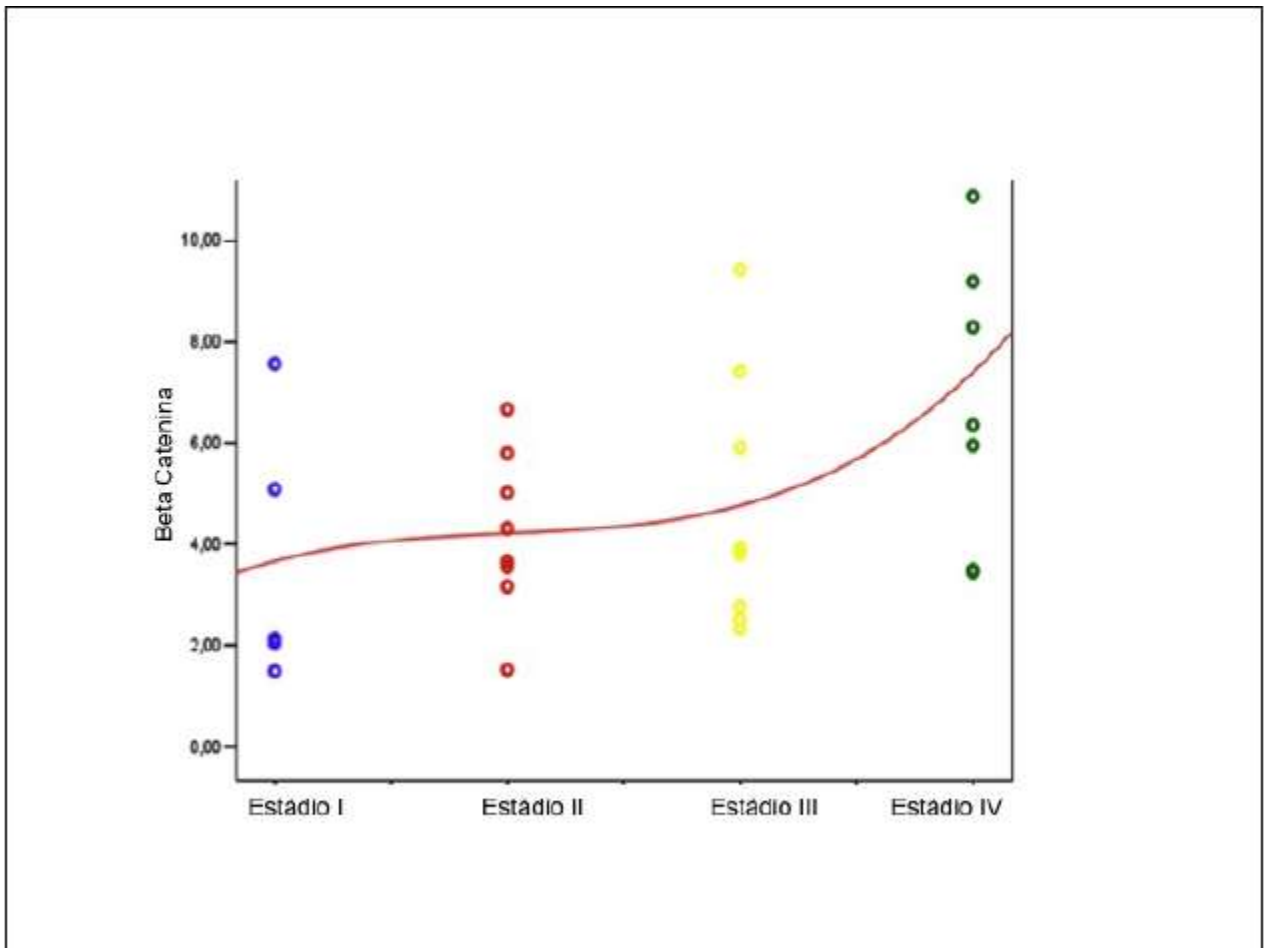


Figura 14. Correlação do conteúdo de beta Catenina nos estádios TNM

Tabela 8. Conteúdo de beta Catenina em relação ao local de expressão

Variável	Classificação	n	Média(%)	CI-95%	p
Local de Expressão	Membranoso	8	7,73	5,40-10,10	0,005*
	Citoplasmático	21	4,16	3,20-5,10	

Kruskal-Wallis

n- numero; CI- Intervalo de Confiança; p- nível de significância; * p< 0,05

5.3 Quanto à E-Caderina

Tabela 9. Conteúdo de E-Caderina em relação ao gênero

Variável	Classificação	n	Média(%)	CI-95%	p
Sexo	Homens	13	3,23	2,00-4,50	0,18
	Mulheres	16	3,94	2,90-5,00	

Mann-Whitney

n- numero; CI- Intervalo de Confiança; p- nível de significância; * p< 0,05

Tabela 10. Conteúdo de E-Caderina em relação a idade

Variável	Classificação	n	Média(%)	CI-95%	p
Idade	< 55 anos	9	3,89	2,30-5,47	0,21
	55-64 anos	9	3,90	2,35-5,47	
	65-74 anos	7	2,42	1,29-3,55	
	75-84 anos	4	4,43	0,16-8,69	

Kruskal-Wallis

n- numero; CI- Intervalo de Confiança; p- nível de significância; * p< 0,05

Tabela 11. Conteúdo de E-Caderina em relação ao grau histológico

Variável	Classificação	n	Média(%)	CI-95%	p
Grau Histológico	Bem	5	4,82	2,00-11,60	0,04*
	Moderadamente	23	3,56	2,70-4,30	
	Indiferenciado	1	1,46	-	

Kruskal-Wallis

n- numero; CI- Intervalo de Confiança; p- nível de significância; * p< 0,05

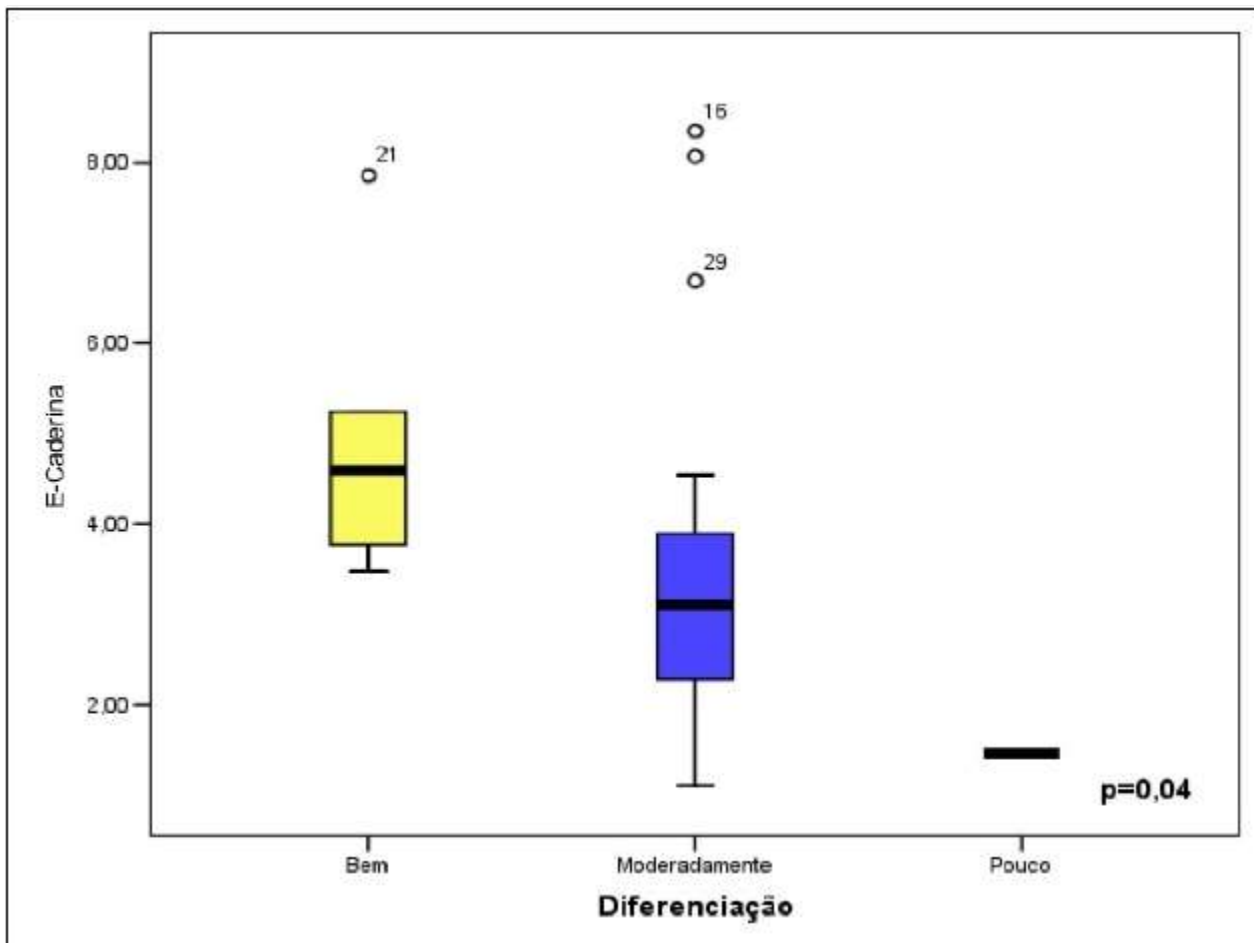


Figura 15. Conteúdo de E-Caderina e grau histológico

Tabela 12. Conteúdo de E-Caderina em relação ao estágio TNM

Variável	Classificação	n	Média(%)	CI-95%	p
Estádio TNM	I	5	2,77	1,40-4,20	0,49
	II	8	3,31	1,60-5,10	
	III	8	4,03	2,30-5,80	
	IV	8	4,04	2,10-5,99	

Kruskal-Wallis

n- numero; CI- Intervalo de Confiança; p- nível de significância; * p< 0,05

Tabela 13. Conteúdo de E-Caderina em relação profundidade de invasão tumoral na parede do colón

Variável	Classificação	n	Média(%)	CI-95%	p
Profundidade de Invasão (T)	T1	1	2,00	-	0,49
	T2	4	2,97	1,10-4,90	
	T3	16	3,60	2,40-4,70	
	T4	8	4,30	2,50-6,03	

Kruskal-Wallis

n- numero; CI- Intervalo de Confiança; p- nível de significância; * p< 0,05

Tabela 14. Conteúdo de E-Caderina em relação ao acometimento linfonodal

Variável	Classificação	n	Média(%)	CI-95%	p
Linfonodos (N)	N0	13	3,11	2,05-4,20	0,33
	N1	8	4,03	2,30-5,80	
	N2	8	4,04	2,10-6,00	

Kruskal-Wallis

n- numero; CI- Intervalo de Confiança; p- nível de significância; * p< 0,05

Tabela 15. Conteúdo de E-Caderina em relação a presença de metástase à distância

Variável	Classificação	n	Média(%)	CI-95%	p
Metástase	ausente	13	3,11	2,05-4,20	0,14
	presente	16	4,03	2,90-5,20	

Mann-Whitney

n- numero; CI- Intervalo de Confiança; p- nível de significância; * p< 0,05

Tabela 16. Conteúdo de E-Caderina em relação ao local de expressão

Variável	Classificação	n	Média(%)	CI-95%	p
Local de Expressão	Membranoso	8	4,60	3,17-6,00	0,03*
	Citoplasmático	21	2,92	2,15-3,70	

Mann-Whitney

n- numero; CI- Intervalo de Confiança; p- nível de significância; * p< 0,05

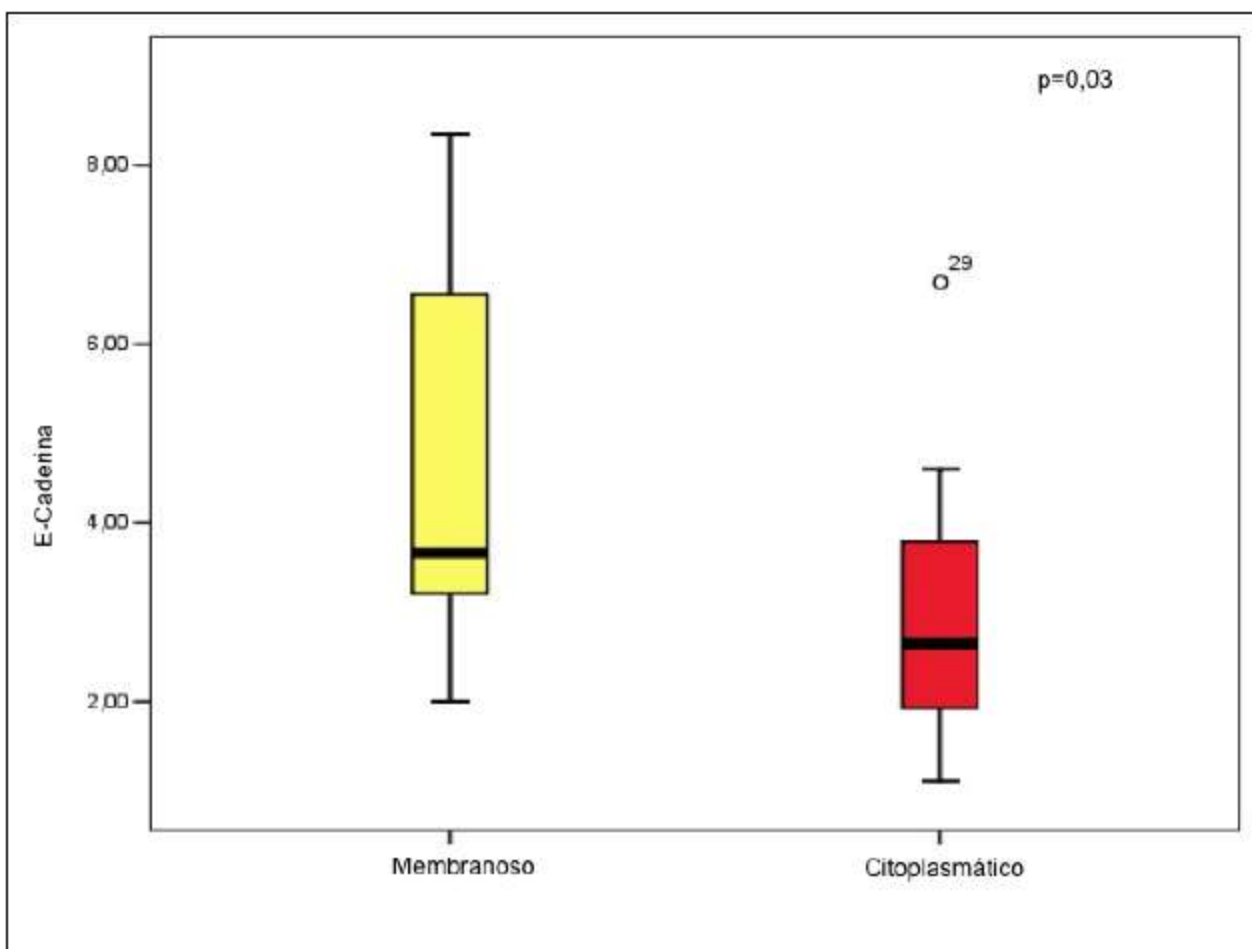


Figura 16. Conteúdo de E-Caderina membranoso e citoplasmático

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1. Quanto à epidemiologia do CCR

Nos últimos anos a incidência de CCR parece ter atingido estabilidade nas áreas de alto risco e parece aumentar nas antes consideradas de baixo risco. Supõe-se que isso se deva ao envelhecimento das populações, à adoção de estilos de vida com tendência mais sedentária e ao aumento na preferência e aceitação de dietas pouco saudáveis (Cancer Facts & Figures, 2012). As taxas de incidência são um pouco mais altas para homens do que para mulheres nos Estados Unidos (Ferlay et al., 2001). No Brasil, as taxas não apresentam diferença expressiva entre os sexos (Duarte-Franco e Franco, 2004), em acordo com a nossa casuística.

Embora alguns estudos evidenciem que o gênero feminino possa ser marcador prognóstico favorável do câncer colorretal (Hendifar *et al.*, 2009; Derwinger e Gustavsson, 2011), não houve diferença entre o conteúdo de beta Catenina e de E-Caderina entre os diferentes gêneros no presente estudo. Possivelmente fatores externos à biologia molecular estejam envolvidos neste prognóstico, tais como proteção humoral, hormonal, a exemplo das doenças cardiológicas, ou mesmo a busca por auxílio médico de forma mais precoce entre as mulheres que entre homens, relacionada a comportamento cultural.

Como acontece com a maioria das neoplasias epiteliais, a mortalidade do CCR aumenta de forma exponencial com a idade, independentemente do sexo. Parece que a idade está também associada ao aumento da incidência e a detecção de adenomas maiores e em maior número. Além disso, depois dos 60 anos de idade, o risco de adenomas com displasia de alto grau, portanto de câncer, é 80% maior do que em pessoas mais jovens (Duarte-Franco e Franco, 2004). As mais altas taxas de incidência de câncer de cólon situam-se entre os 75 e 84 anos de idade, respondendo por 27.2% do total de cânceres de colón diagnosticados, sendo de 19% entre os 65 e 74 anos e de 11,3% na faixa etária anterior, entre 55 e 64 anos de idade (SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009). No presente estudo não foi possível correlacionar a beta Catenina e a E-Caderina às diferentes faixas etárias enquanto fator relacionado ao prognóstico,

estando 70% dos pacientes situados na faixa etária acima dos 55 anos. Este fato pode se dever a amostra do estudo tratar de pacientes que apresentam apenas neoplasias de cólon esquerdo, em contraste à distribuição relatada na literatura, sem distinções entre os cólons.

6.2. Importância da distinção entre os cólons direito e esquerdo

Considerando que cerca de 70% das lesões encontra-se em cólon esquerdo, a distinção entre cólons parece importante, por poder se tratar de patologias distintas. Entre estas distinções, que podem influenciar o prognóstico da doença, chamam atenção as diferenças na origem embriológica (Minoo *et al.*, 2010), além das funções fisiológicas (Guyton, 1996). Exemplo importante relacionado ao desenvolvimento do adenocarcinoma de cólon é a fermentação bacteriana que age sobre as mucinas de forma distintas nos cólons direito e esquerdo. Subtipos de mucinas são produzidos em concentrações inversas nas criptas do cólon quando se consideram os diferentes segmentos (Iacopetta, 2002; Gervaz *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2008 Li e Lai, 2009). Este fato parece ter importância sobre o processo inflamatório da mucosa intestinal, e, portanto, possivelmente na carcinogênese (Ribeiro *et al.*, 2008). Os sais biliares, associados a risco aumentado de câncer colorretal, estão em maior concentração no cólon direito (Gervaz *et al.*, 2004). A origem vascular distinta nestes tumores também é critério relacionado ao prognóstico quando se pensa em disseminação da neoplasia, já que se trata de sistema mesentérico superior ou inferior, tumores localizados no cólon direito ou esquerdo, com distribuição das células neoplásicas para o sistema venoso esplâncnico ou sistêmico, respectivamente (Floch, 2004). Clinicamente, tumores do cólon esquerdo são frequentemente relacionados a sangramento vivo às evacuações, obstipação intestinal, evacuações com fezes afiladas e dor abdominal em cólica (Averbach e Borges, 2004). A anemia hipocrômica microcítica, fraqueza e astenia, são mais frequentemente observadas em pacientes com tumores de cólon direito com grandes dimensões, pois levam a perda oculta de sangue por tempo prolongado (Majumdar *et al.*, 1999). Estas diferenças clínicas muitas vezes podem estar

relacionadas à busca por auxílio médico de forma mais precoce, e portanto, a prognósticos diferentes, sendo mais sombrio no cólon direito. Quando se comparam os aspectos histopatológicos nota-se que neoplasias localizadas no cólon direito geralmente possuem crescimento exofítico, mais comumente são produtoras de muco, apresentam padrão diplóide e encontram-se menos relacionadas à presença de pólipos. Em contraposição, tumores do cólon esquerdo possuem crescimento ulceroinfiltrativo ou estenosante, raramente são produtores de muco, geralmente são aneuplóides e se encontram mais frequentemente associados a pólipos adenomatosos (Pocard *et al.*, 1995). Estas também são diferenças que podem estar relacionadas ao prognóstico visto que tumores de cólon esquerdo evoluem mais frequentemente para quadros suboclusivos ou oclusivos intestinais. Mais de 1.000 genes são expressos de forma distinta no cólon descendente em comparação ao cólon ascendente (Glebov *et al.*, 2003). Diversos estudos demonstraram que tanto as formas familiares quanto as esporádicas de CCR associados à INC, tendem a ocorrer na parte distal do cólon, enquanto CCR associados à IMS têm preferência proximal em ambas as formas, familiar e esporádica. Tumores localizados no cólon direito têm menor expressão de beta Catenina nuclear, enquanto tumores de reto apresentam maiores expressões de E-Caderina (Gervaz *et al.*, 2001; Jass, 2007; Li e Lai, 2009), outro fator que parece decisivo no prognóstico, devido ao aumento proliferação celular. Todas estas características fazem crer a necessidade da distinção entre cólons esquerdo e direito nos estudos relacionados ao prognóstico da doença nestes segmentos.

Estudos que não consideram estas diferenças avaliam sob a mesma ótica, tumores diferentes, que incidem em estruturas diferentes, apesar de contínuas, o que poderia acarretar em resultados enviesados.

6.3. Quanto à relação das moléculas de adesão e o TNM

Os sistemas de estadiamento do câncer colorretal se baseiam nas informações de extensão de doença e são importantes não apenas para o planejamento da terapêutica adjuvante, mas também para avaliação do prognóstico, estratificando grupos de pacientes e permitindo, portanto, comparações de resultados. Sabe-se que o prognóstico de pacientes com câncer colorretal apresenta-se relacionado ao grau de penetração do tumor através da parede do cólon, a presença ou ausência de envolvimento linfonodal ou metástase à distância. Estas três características formam a base de todos os sistemas de estadiamento descritos para esta doença (Dukes, 1932; Steinberg et al., 1986; Sobin e Wittekind, 2002, Priolli *et al.*, 2010).

Apesar de grande número de estudos, ainda há controvérsias quanto à relação da expressão proteínas de adesão, disseminação, grau de diferenciação no câncer colorretal e prognóstico (Nolet et. al, 1999; Maruyama et al., 2000; Ougolkov et al, 2002; Khoursheed et al., 2003; Miyamoto et al., 2004; Kojima et al., 2004; Delektorskaya et al., 2005; Jesus et al., 2005; Pignatelli et al., 2005; Elzagheit et al., 2006; Elzagheid et al, 2008; Wanitsuwan et al., 2008; Tsanou et al., 2008; Hahn-Strömberg, 2009).

Proteínas de adesão relacionam-se não somente à adesão celular, mas também à indução de divisão celular e estão, por este motivo, relacionadas à possibilidade de disseminação do câncer.

De forma distinta ao que ocorre com a E-Caderina, maiores conteúdos de beta Catenina foram encontrados em estádios TNM avançados, assim como em tumores com maior grau de invasão na parede do cólon e com metástases à distância. O presente estudo é, no melhor de nosso conhecimento, o primeiro a demonstrar a existência de relação entre aferição objetiva de níveis de beta Catenina e estadiamento tumoral, grau de invasão do cólon e presença de doença disseminada, corroborando achados de estudos qualitativos, onde foi demonstrada a correlação entre o prognóstico do CCR e a expressão qualitativa, nuclear, da beta Catenina (Maruyama et al., 2000; Ougolkov et al, 2002; Miyamoto et al., 2004; Elzagheid et al, 2008; Wanitsuwan et al., 2008).

Pode-se demonstrar, neste estudo, que o comportamento da beta Catenina no adenocarcinoma de cólon esquerdo apresentou-se relacionada aos estádios da doença. Houve certa estabilidade em seu conteúdo nos estádios intermediários (II e III), demonstrado pelo platô observado na figura 1. Este comportamento poderia ser explicado pela multifuncionalidade desta proteína. Estando envolvida na proliferação celular, enquanto fator transcricional, atuaria principalmente na fase de promoção do carcinoma, enquanto que ao perder sua função de adesão celular, na fase de progressão da doença, estaria relacionada à perda de contato celular. A dispersão celular tumoral facilitaria a disseminação da doença à distância, promovendo a formação de tumores secundários, com nova subsequente proliferação.

6.4. Quanto à relação entre moléculas de adesão e grau histológico

Estudos têm sido publicados, correlacionando variáveis clínicas e histopatológicas ao prognóstico do CCR, mas seus resultados são conflituosos (Ponz de Leon *et al.*,1992). As diferenças encontradas poderiam ser explicadas pelo grau de subjetivismo das análises efetuadas. A distinção histopatológica entre adenoma de alto grau de displasia, carcinoma intramucoso e carcinoma superficial invasivo gera controvérsias e variações de critério diagnóstico entre os patologistas. Patologistas japoneses baseiam-se em anormalidades citológicas, principalmente nucleares, associadas a arquitetura glandular para o diagnóstico de carcinoma, dando origem, desta forma, ao termo: carcinoma intramucoso. Enquanto isso, patologistas ocidentais requerem a presença de invasão da lamina própria para classificar a lesão como carcinoma (Willis e Riddell, 2003). Esses limites, no entanto, não podem ser definidos pela coloração com hematoxilina-eosina associada a um diagnóstico subjetivo. O Consenso de Viena reafirma este debate, quando o diagnóstico de câncer foi dado por 5-40% dos patologistas ocidentais e 45-75% dos patologistas japoneses. Conclui-se que, tanto patologistas ocidentais quanto japoneses foram incapazes de alinhar os três seguintes diagnósticos: adenoma com alto grau de displasia, carcinoma não invasivo (*in situ*) e suspeição de carcinoma invasivo (Rubio, 2003). Estes estudos evidenciam, uma

vez mais, a necessidade de se estabelecer um critério diagnóstico objetivo de análise, tal como a análise auxiliada por computador.

Estudos *in vitro* mostraram que a perda da E-Caderina pode estar associada com a disseminação e a menor diferenciação no câncer colorretal. Os autores sugerem que a expressão da E-Caderina pode ser usada como marcador de recorrência do câncer colorretal (Kojima et al., 2004) e reafirmaram a perda da expressão da E-Caderina em tumores colorretais menos diferenciados (Kojima et al., 2004; Delektorskaya et al., 2005; Pignatelli et al., 2005; Elzagheit et al., 2006; Tsanou et al., 2008). Estes achados contradizem estudos que não relacionam a expressão da E-Caderina com fatores morfológicos ou prognósticos do câncer colorretal (Nollet et al., 1999; Hahn-Strömberg et al., 2009). No presente estudo, menores conteúdos de E-Caderina associaram-se a piores graus histológicos do adenocarcinoma de cólon esquerdo, corroborando pesquisas que relacionam a forma de expressão da E-Caderina ao grau histológico do tumor (Kojima et al., 2004) mas, de forma nunca antes publicado, revela que o conteúdo de E-Caderina no tecido tumoral relaciona-se ao grau histológico do câncer (Martinez et al., 2011; ANEXO 2).

Não há diferença entre graus histológicos e o conteúdo de beta Catenina, de forma distinta ao achado da E-Caderina. Este resultado sugere que a proteína inicialmente envolvida com a diferenciação neoplásica é a E-Caderina. Corroboram estes achados, dados que sugerem o envolvimento de proteínas de adesão como estágio inicial do desenvolvimento da sequência adenoma-carcinoma (Chen *et al.*, 2008).

E-Caderina, quando pesquisada no tecido epitelial normal tem sua expressão sistematicamente preservada, distribuída de forma homogênea na membrana celular (Ramburan e Govender, 2002; Delektorskaya *et al.*, 2005). Corroborando outros estudos, foi possível demonstrar que nas células com adenocarcinoma colorretal esquerdo há maior expressão de E-Caderina citoplasmática (Fig. 4), acompanhando a maior expressão de beta Catenina também neste local (Filiz et al., 2010; El-Bahrawy et al., 2001; Stanczak *et al.*, 2011).

6.5. Comentários finais

A decisão quanto ao tratamento a ser instituído no adenocarcinoma do cólon permanece dependente principalmente do estadiamento da doença. No entanto, até hoje, não foi estabelecido de forma eficiente, marcador capaz de predizer o prognóstico deste tumor e, de forma mais acurada, determinar se o paciente deverá ou não ser submetido às terapias adjuvantes. A análise proteômica do conteúdo tecidual de moléculas de adesão, combinado aos parâmetros já estabelecidos de prognóstico do CCR, poderiam melhorar os critérios de seleção, principalmente naqueles pacientes com Estádio II da classificação TNM da doença. É neste contexto que a avaliação do conteúdo tecidual de beta Catenina e E-Caderina têm seu importante papel.

Quando as caderinas formam as junções aderentes, na célula normal, moléculas de beta Catenina são transferidas do citoplasma para regiões mais próximas à membrana para organização do citoesqueleto, prevenindo a translocação livre da beta Catenina do citoplasma para o núcleo celular. Quando um componente deste cinturão é perdido, como a E-Caderina, há liberação de beta Catenina, que atuará como estimulante à proliferação celular induzindo a proliferação. Somado a isso, haverá ativação das metaloproteinases e colagenases teciduais, facilitando o destacamento celular e invasão do tumor à distância.

No CCR, estudos demonstraram que mutações na beta Catenina podem resultar em seu acúmulo no citoplasma e no núcleo celular, resultando em aumento da atividade transcricional. Mutações que inativam a proteína APC, ocorrência comum em câncer do cólon ou que ativem a proteína beta Catenina, levam a falha de degradação e consequente estabilização e acúmulo da beta Catenina no citoplasma, levando à ativação aberrante da via WNT. Desta forma, se houver maior quantidade de beta Catenina livre no citoplasma poderá existir maior atividade transcricional nuclear, o que favoreceria, em última instância, à proliferação celular.

Na presença de menores conteúdos de E-Caderina, a beta Catenina atua como fator transativador, induzindo transcrição de genes que controlam a proliferação celular. Parece lógico supor então, que maiores conteúdos de beta Catenina no citoplasma

relacionam-se a maior estímulo a proliferação e desarranjo do citoesqueleto, e, portanto ao pior prognóstico.

Em portadores de tumor com grande conteúdo de beta Catenina, poder-se-ia indicar terapia alvo para prevenir a disseminação da doença. Contudo, para que esta afirmativa possa ser confirmada, novos estudos seriam necessários.

A despeito do pequeno número de casos apresentados neste estudo, pode-se demonstrar associação entre a E-Caderina, beta Catenina e variáveis relacionadas ao prognóstico, tais como grau de diferenciação, invasão do tumor na parede do cólon, acometimento linfonodal e disseminação à distância. Este resultado deve à homogeneidade da amostra que analisou exclusivamente cólon esquerdo. Estudos que incluam análise de sobrevida deverão ser realizados, com maior número de casos, intencionando corroborar com os dados aqui apresentados.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Pode-se concluir, segundo o delineamento desta pesquisa, que:

Há relação entre o conteúdo das proteínas de adesão celular, E-Caderina e beta Catenina, a fatores prognósticos do adenocarcinoma do cólon esquerdo, estando a E-Caderina relacionada ao grau de diferenciação e a beta Catenina ao estágio TNM no adenocarcinoma de cólon esquerdo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, K.; Takeichi, M. EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105:13-19, 2008.

Agnantis, N. J.; Goussia, A. C.; Batistatou, A.; Stefanou, A. Tumor Markers in Cancer Patients. An Update of their Prognostic Significance Part II. **in vivo**, 18:481-88, 2004.

Akiyama, T. Wnt/b-catenin signaling. **Cytok Growth Fac Rev**, 11:273-82, 2000.

Averbach, M; Borges, J. L. A. Diagnóstico de Câncer Colorretal. In: Rossi, B. M.; Nakagawa, W. T.; Ferreira, F. O.; Junior, S. A.; Lopes A. **Câncer de Cólon Reto e Ânus**. São Paulo: Lemar e Tecmed Editora, 2004. p. 63-75.

Barth, A. I. M.; Näthke, I. S.; Nelson, W. J. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. **Cur Opinion Cell Biol**, 9:683-90, 1997.

Battle, E.; Wilkinson, D. G. Molecular Mechanisms of Cell Segregation and Boundary Formation in Development and Tumorigenesis. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 1;4(1):a008227, 2012.

Boyle, P.; Levin, B. **World Cancer Report. WHO**. Lyon: IARC Publications, 2008.

Buffill, J. A. Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. **Ann Intern Med**, 113(10):779-88, 1990.

Beavon, I. R. G. The E-cadherin-catenin complex in tumor metastasis: structure, function and regulation. **Eur J Canc**, 36:1607-20, 2000.

Bright-Thomas, R. M.; Hargest, R. APC, beta-Catenin and hTCF-4; an unholy trinity in the genesis of colorectal cancer. **Eur J Surg Oncol Mar**;29(2):107-17, 2003. In: Rossi, B. M.; Nakagawa, W. T.; Ferreira, F. O.; Junior, S. A.; Lopes A. **Câncer de Cólon Reto e Ânus**. São Paulo: Lemar e Tecmed Editora, 2004. p. 55-62.

Cancer Facts & Figures, American Cancer Society (ACS), Atlanta, Georgia, 2012 [Acesso em 08 mai. 2012]. Disponível em <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf>>

Carmeliet, P.; Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other disease. **Nature**, 407(6801):249-57, 2000.

Cell Signaling Technology, 2010 [Acesso em 08 mai. 2012] Disponível em <http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Wnt_beta_Catenin.html#describe>

Chammas, R.; Brentani, R. R. Cell Matrix Interactions. In Bertino J, editor. Encyclopedia of câncer . New York: Elsevier Science, 2002 In Rossi, B. M.; Nakagawa, W. T.; Ferreira, F. O.; Junior, S. A.; Lopes A. **Câncer de Cólon Reto e Ânus**. São Paulo: Lemar e Tecmed Editora, 2004. p. 55-61.

Chammas, R., Novak E. M., Mecanismos de Invasão e Metástases em Câncer Colorretal. In: Rossi, B. M.; Nakagawa, W. T.; Ferreira, F. O.; Junior, S. A.; Lopes A. **Câncer de Cólon Reto e Ânus**. São Paulo: Lemar e Tecmed Editora, 2004. p. 55-61.

Chen, S.; Liu, J; Li, G.; Mo, F.; Xu, X.; Zhang, T.; Li, X.; Han and Y Sun. Altered distribution of betacatenin and prognostic roles in colorectal carcinogenesis. **Scand J Gastroenterol**, 43(4):456-64, 2008.

Conacci-Sorrell, M.; Simcha, I.; Ben-Yedidia, T. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin–cadherin interactions: the roles of b-catenin signaling, Slug, and MAPK. **J Cell Biol**, 163:847-57, 2003.

Compton, C.C.; Fenoglio-Preiser, C. M.; Pettigrew, N.; Fielding, L. P. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors consensus conference: Colorectal Working Group. **Cancer**, 88: 1739–57, 2000.

Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch Pathol Lab Med** 124: 979–94, 2000.

Compton, C. C. Colorectal Carcinoma: Diagnostic, Prognostic, and Molecular Features **Mod Pathol**, 16(4):376–88, 2003.

Cotran, R. S.; Kumar, V.; Collins, T. **Patologia estrutural e funcional**. Editora Guanabara Koogan, 2000. p. 233-93.

Coudry, R. A.; da Cunha, I. W.; Soares, F. A. Coudry, R. A.; da Cunha, I. W.; Soares, F. A.. Anatomia patológica de Pólipos e Câncer Colorretal In: Rossi, B. M.; Nakagawa, W. T.; Ferreira, F. O.; Junior, S. A.; Lopes A. **Câncer de Cólon Reto e Ânus**. São Paulo: Lemar e Tecmed Editora, 2004. p.105-24.

Delektorskaya, V. V.; Perevoshchikov, A. G.; Golovkov, D. A.; Kushlinskii N. E. Expression of E-cadherin, beta-catenin, and CD-44v6 cell adhesion molecules in primary tumors and metastases of colorectal adenocarcinoma. **Bull Exp Biol Med**, 139(6):706-10, 2005.

Debruyne, P.; Vermeulen, S.; Mareel, M. The role of the E-cadherin/catenin complex in gastrointestinal cancer. **Acta Gastroenterol Belg**, 62(4):393-402, 1999.

Derwinger, K.; Gustavsson, B. A study on gender and prognosis in synchronous colorectal cancer **Clin Med Insights Oncol**. 5:259–264, 2011;

Distler, P., Holt, P. R. Are right and left-sided neoplasms distinct tumors? **Dig Dis**, 15(4-5):302-11, 1997.

Duarte-Franco, E., Franco, E. L. Epidemiologia e Fatores de Risco em Câncer Colorretal. In: Rossi, B. M.; Nakagawa, W. T.; Ferreira, F. O.; Junior, S. A.; Lopes A. **Câncer de Cólon Reto e Ânus**. São Paulo: Lemar e Tecmed Editora, 2004. p3-21.

Dukes, C. E The classification of cancer of the rectum. **J. Pathol. Bacteriol** 35:323-32, 1932.

El-Bahrawy, M. A.; Poulsom, R.; Jeffery, R.; Talbot, I.; Alison, M. R. The expression of E-cadherin and catenins in sporadic colorectal carcinoma. **Hum Pathol** 32:1216–24, 2001.

Elzagheid, A.; Algars, A.; Bendardaf, R.; Lamlum, H.; Ristamaki, R., Collan, Y.; Syrjanen, K.; Pyrhonen, S. E-cadherin expression pattern in primary colorectal carcinomas and their metastases reflects disease outcome. **World J Gastroenterol**, 21;12(27):4304-9, 2006.

Elzagheid. A.; Buhmeida, A.; Korkeila, E.; Collan, Y.; Syrjänen, K.; Pyrhönen, S. Nuclear β -catenin expression as a prognostic factor in advanced colorectal carcinoma. **World J Gastroenterol**, 14(24):3866-71, 2008.

Fearon, E.R.; Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, 61(5):759-67, 1990.

Ferlay, J. et al. **International Agency for Research on Cancer 2008**, 1-5, 2010.

Filiz, A. I.; Senol, Z.; Sucullu, I.; Kurt, Y.; Demirbas, S.; Levhi Akin, M. The survival effect of E-cadherin and catenins in colorectal carcinomas. **Colorectal Dis**, 12:1223–30, 2010.

Floch, M.H. **Netter's Gastroenterology**. Ed. Saunders, 2004 p. 331-34.

Frattini, M.; Balestra, D.; Suardi, S.; Oggionni, M.; Alberici, P.; Radice, P.; Costa, A.; Daidone, M. G.; Leo, E.; Pilotti, S.; Bertario, L.; Pierotti, M. A. Different Genetic Features Associated with Colon and Rectal Carcinogenesis. **Clin Cancer Res**, 10:4015-21, 2004.

Fujimori, M.; Ikeda, S.; Shimizu, Y.; Okajima, M.; Asahara, T. Accumulation of beta-catenin protein and mutations in exon 3 of beta-catenin gene in gastrointestinal carcinoid tumor. **Cancer Res**, 61:6656-59, 2001.

Furuta, K.; Zahurak, M.; Goodman, S. N.; Hamilton, S. R.; August, J. T. CD44 expression in the stromal matrix of colorectal cancer: association with prognosis. **Clin Cancer Res**, 4(1):21-9, 1998.

Garcea, G.; Sharma, R. A.; Dennison, A.; Steward, W. P.; Gescher, A.; Berry, D. P. Molecular biomarkers of colorectal carcinogenesis and their role in surveillance and early intervention. **Eur J Cancer**, 39(8):1041-52, 2003.

Gervaz, P.; Bouzourene, H.; Cerottini, J.P.; Chaubert, P.; Benhattar, J.; Secic, M.; Wexner, S.; Givel, J.; Belin, B. Dukes B colorectal cancer: distinct genetic categories and clinical outcome based on proximal or distal tumor location. **Dis Colon Rectum**, 44(3):364-72, 2011.

Gervaz, P.; Bucher, P.; Morel, P. Two colons-two cancers: paradigm shift and clinical implications. **J Surg Oncol** 88: 261-266, 2004.

Glebov, O. K.; Rodriguez, L. M.; Nakahara, K.; Jenkins, J.; Cliatt, J.; Humbyrd, C. J.; DeNobile, J.; Soballe, P.; Simon, R.; Wright, G.; Lynch, P.; Patterson, S.; Lynch, H.; Gallinger, S.; Buchbinder, A.; Gordon, G.; Hawk, E.; Kirsch, I. R. Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 12: 755-762, 2003.

Guyton, A. C.; Hall, J. E. **Tratado de Fisiología Médica**. Guanabara Koogan, 1996 p. 751-760.

Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. **Pathology and genetics of the tumors of the digestive system**. Lyon: IARC Press, 2000.

Hahn-strömberg, V.; Edvardsson, H.; Bodin, L.; Franzén, L. Disturbed expression of E-cadherin, beta-catenin and tight junction proteins in colon carcinoma is unrelated to growth pattern and genetic polymorphisms. **APMIS**,116(4):253-62, 2008.

Hahn-Strömberg, V.; Edvardsson, H.; Bodin, L.; Franzén, L. Tumor volume of colon carcinoma is related to the invasive pattern but not to the expression of cell adhesion proteins. **APMIS**, 117(3):205-11, 2009.

Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100(1):57-70, 2000.

Hendifar, A.; Yang, D.; Lenz, F.; Lurje, G.; Pohl, A.; Lenz, C.; Ning, Y.; Zhang, W.; Lenz, H. J. Gender disparities in metastatic colorectal cancer survival **Clin Cancer Res**,15(20):6391-7, 2009.

Henson, D.E., Hutter, R.V., Sobin, L.H. & Bowman, H.E. Protocol for the examination of specimens removed from patients with colorectal carcinoma. A basis for checklists. Cancer Committee, College of American Pathologists. Task Force for Protocols on the Examination of Specimens from Patients with Colorectal Cancer. **Arch Pathol Lab Med** 123:55-61, 1999.

Herman, J. G.; Umar, A.; Polyak, K.; Graff, J. R.; Ahuja, J. P.; Markowitz, S.; Willson, J. K.; Hamilton, S. R.; Kinzler, K. W.; Kane, M. F.; Kolodner, R. D.; Vogelstein, B.;

Kunkel, T. A.; Baylin, S. B. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. **Proc Natl Acad Sci USA**, 95:6870-6875, 1998.

Iacopetta, B. Are there two sides to colorectal cancer? **Int J Cancer**, 101:403-408, 2002.

Iwashyna, T. J.; Lamont, E. B. Effectiveness of adjuvant fluorouracil in clinical practice: a population-based cohort study of elderly patients with stage III colon cancer. **J Clin Oncol**, 20(19):3992-8, 2002.

Jass, J. R. Molecular heterogeneity of colorectal cancer: implications for cancer control. **Surg Oncol**, 16:S7-S9, 2007.

Jesus, E. C.; Matos, D.; Artigiani, R.; Waitzberg, A. F.; Goldenberg, A., Saad, S. S. Assessment of staging, prognosis and mortality of colorectal cancer by tumor markers: receptor erbB-2 and cadherins. **Acta Cir Bras**, 20(6): 422-427, 2005.

Kanazawa, N.; Oda, T.; Gunji, N.; Nozue, M.; Kawamoto, T.; Todoroki, T.; Fukao. E-cadherin expression in the primary tumors and metastatic lymph nodes of poorly differentiated types of rectal cancer. **Surg Today**, 32(2):123-28, 2002.

Kojima, M.; Shiokawa, A.; Ohike, N.; Tamegai, Y.; Kato, H.; Morohoshi, T. Relation of E-cadherin and beta-catenin expression to pit pattern in colorectal cancer. **Oncol Rep**, 12(3):533-8, 2004.

Konishi, K.; Fujii, T.; Boku, N.; Kato, S.; Koba, I.; Ohtsu, A.; Tajiri, H.; Ochiai, A.; Yoshida, S. Clinicopathological differences between colonic and rectal carcinomas: are they based on the same mechanism of carcinogenesis? **Gut**, 45(6):818-21, 1999.

Khoursheed, M. A.; Mathew, T. C.; Makar, R. R.; Louis, S.; Asfar, S. K.; Al-Sayer, H. M.; Dashti, H. M. Expression of E-cadherin in human colorectal cancer. **Surgeon** 1, 86-91, 2003.

Lee, C. M.; Shuarstamn, H.; Deavers, M. T. b-catenin nuclear localization is associated with grade in ovarian serous carcinoma. **Gynecol Oncol**, 88: 363-368, 2003.

Li, F. Y.; Lai, M. D. Colorectal cancer, one entity or three. **JZhejiang Univ Sci B**, 10:219-229, 2009.

Lohi, J.; Oivula, J.; Kivilaakso, E.; Kiviluoto, T.; Fröjdman, K.; Yamada, Y.; Burgeson, R. E.; Leivo, I.; Virtanen, I. Basement membrane laminin-5 is deposited in colorectal adenomas and carcinomas and serves as a ligand for alpha3beta1 integrin. **APMIS**. 2000 Mar;108(3):161-72. In: Rossi BM, editor **Câncer de Colon, Reto e Ânus**. São Paulo: Lemar e Tecmed editora, 2004. p.55-61.

Majumdar, S. R.; Fletcher, R. H.; Evans AT. How does colorectal câncer present? Symptoms, duration, and clues to location. **AM J Gastroenterol** 1999; 94:3039-45 In: Rossi BM, editor **Câncer de Colon, Reto e Ânus**. São Paulo: Lemar e Tecmed editora, 2004. p.63-6.

Malheiros, A. P. R.; Teixeira, M. G.; Habr-Gama, A.; Alcantara, P. S. M. Resultados do tratamento cirúrgico do câncer colo-retal em doentes de idade até 64 anos e de 65 anos ou mais. **Rev Bras Coloproct**, 25:128-36, 2005.

Marchenko, N. D.; Marchenko, G. N.; Weinreb, R. N.; Lindsey, J. D.; Kyshtoobayeva, A.; Crawford, H. C.; Strongin, A. Y. Beta-Catenin regulates the gene of MMP-26, a novel matrix metalloproteinase expressed both in carcinomas and normal epithelial cells. **Int J Biochem Cell Biol**, 36:942–956, 2004.

Martinez, C. A. R. Estudo morfométrico da superfície mucosa do estômago de cães submetidos a esplenectomia e a vagotomia gástrica proximal isoladas e associadas.[Tese]. São Paulo: Hospital Servidor Público Estadual “Francisco Morato Oliveira”; 2002.

Martinez C.A.R.; Waisberg, J.; Palma T.R.; Silva, F.Z.; Cimerman G.; Goffi F. S. Morphometric study of gastric mucosa in dogs submitted to proximal gastric vagotomy, splenectomy or proximal gastric vagotomy associated with splenectomy. **Acta Cir Bras**,17(5):289-98, 2002.

Martinez, C. A. R.; Priolli, D. G.; Cardinalli, I. A.; Pereira, J. A.; Portes, A. V.; Margarido, N. F. Influence of tumor localization on the tissue expression of p53 protein in patients with colorectal cancer. Study of 100 cases. **Rev. Col. Bras. Cir**, 35(4):235-43, 2008.

Martinez, N. P.; Kanno, D. T.; Pereira, J. A.; Cardinalli, I. A.; Priolli, D. G. Beta-catenin and E-cadherin tissue "content" as prognostic markers in left-side colorectal cancer. **Cancer Biomark**, 8(3):129-35, 2011.

Maruyama, K.; Ochiai, A.; Akimoto, S.; Nakamura, S.; Baba, S.; Moriya, Y.; Hirohashi, S. Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer. **Oncology**, 59:302-309, 2000.

Matos D.; Saad S. S.; Franceschi Jr, O.; Barreto, E. P.; Novelli, M. D. Estudo experimental comparativo entre anastomoses colocólicas com sutura manual e com anel biofragmentável. **Rev Assoc Méd Brasil**. 39(4):201-6,1993.

McCrea, P.D. & Gu, D. The catenin family at a glance. **Journal of Cell Science**, 123,637-642, 2010.

Minoo, P.; Zlobec, I.; Peterson, M.; Terracciano, L.; Lugli, A. Characterization of rectal, proximal and distal colon cancers based on clinicopathological, molecular and protein profiles. **Int J Oncol**, 37: 707-718, 2010.

Miyamoto, S.; Endoh, Y.; Hasebe, T.; Ishii, G.; Kodama, K.; Goya, M.; Ono, M.; Saitoh, N.; Chiba, T.; Ochiai, A. Nuclear betacatenin accumulation as a prognostic factor in Dukes' D human colorectal cancers. **Oncol Rep**, 12: 245-251, 2004.

Neves, F.J.; Mattos, I. E.; Koifman, R. J. Mortalidade por câncer de colon e reto nas capitais brasileiras no período 1980-1997. **Arq Gastroenterol**, 42:63-70, 2005.

Niporciukas, M. C. Avaliação da Neovascularização da Córnea de Ratos.[Tese]. São Paulo: Universidade São Paulo; 1992.

Nollet, F.; Berx, G.; van Roy, F. The role of the e-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. **Mol Cell Biol Res Com**, 2:77-85, 1999.

Novelli MD. Introdução de uma nova metodologia para análise morfométrica através do processamento de imagens por computadores com aplicação no ensino e na pesquisa. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 1992.

Novelli, M. D.; Barreto, E.; Matos, D.; Saad, S. S.; Borra, R. C. Aplicação do processamento de imagens por computador na quantificação das variáveis histopatológicas de reparação tecidual de anastomoses colólicas em cães. **Rev Ass Méd Brasil**, 43:277-82, 1997.

Obrand, D. I.; Gordon, P. H. Continued change in the distribution of colorectal carcinoma. **Br J Surg**, 85(2):246-8, 1998.

Onder, T. T.; Gupta, P. B.; Mani, S. A.; Yang, J.; Lander, E. S.; Weinberg, R. A. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. **Cancer Res**, 15;68(10):3645-54, 2008.

Oloumi, A.; McPhee, T.; Dedhar, S. Regulation of E-cadherin expression and beta-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. **Biochim Biophys Acta**, 1691(1):1-15, 2004.

Ougolkov, A. V.; Yamashita, K.; Mai, M.; Minamoto, T. Oncogenic beta-catenin and MMP-7 (matrilysin) cosegregate in late-stage clinical colon cancer. **Gastroenterology**, 122:60-71, 2002.

Ponz de Leon M, Sant M, Micheli A, Sacchetti C, Di Gregorio C, Fante R, Zanghieri G, Melotti G, Gatta G. Clinical and pathologic prognostic indicators in colorectal cancer. A population-based study. **Cancer**, 69:626-35,1992.

Pignatelli, M. Models of colorectal tumour differentiation. **Cancer Surv**, 16:3-13, 1993.

Pinho, M. **Biologia Molecular do Câncer - Fundamentos para a prática Médica**. Livraria e Editora Revinter Ltda, 2005. p.163-180.

Popescu, R. A.; Norman, A., Ross, P. J. Adjuvant or palliative chemotherapy for colorectal cancer in patients 70 years or older. **J Clin Oncol** 17 (8): 2412-8, 1999.

Priolli, D. G. Cicatrização da anastomose cólica. Avaliação através da associação de métodos convencionais com análise de imagem auxiliada por computador. Estudo experimental em ratos.[Tese]. São Paulo: Hospital Servidor Público Estadual “Francisco Morato Oliveira; 1999.

Priolli, D. G.; Margarido, N. F.; Martinez, C. A. R.; Rotta, C. M.; Stephani, S. M. Edema quantification by computerized morphometry as an evaluation parameter for the resistance of colon anastomoses. **Acta Cir Bras**, 18:398-406, 2003

Priolli, D. G., Cardinalli, I. A., Piovesan, H., Margarido, N. F., & Martinez, C. A. R. Proposta para Estadiamento do Câncer Colorretal Baseada em Critérios Morfofuncionais. Correlação com Níveis Séricos do Antígeno Carcinoembrionário. **Rev bras Coloproct**, 27:374-383, 2007.

Priolli, D. G.; Martinez, C. A. R.; Cardinalli, H.; Margarido, N. F.; Waisberg, N.F. Morphofunctional staging is a valuable prognostic factor for colorectal cancer and it correlates with plasma CEA levels. **Arq. Gastroenterol** 47(3):225-32, 2010.

Ramburan, A.; Govender, D. Cadherins and catenins in pathology. **Cur Diag Pathol**, 8(5):305-317, 2002.

Reeder, J. A.; Gotley, D. C.; Walsh, M. D.; Fawcett, J.; Antalis, T. M. Expression of antisense CD44 variant 6 inhibits colorectal tumor metastasis and tumor growth in a wound environment. **Cancer Res**, 58(16):3719-26, 1998.

Rubio, C.A. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. **Gut**, 47, 251-255, 2003.

Rowlands, T. C.; Symonds, M.; Farookhi, R.; Blaschuk, O. W. Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues. **Rev Reproduc**, 5:(1)53-61, 2000.

SEER Cancer Statistics Review 1975-2009 [Acesso em 08 mai. 2012]. Disponível em <http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/browse_csr.php>.

Smith, J. J.; Deane, N. G.; Dhawan, P.; Beauchamp, R. D. Regulation of metastasis in colorectal adenocarcinoma: A collision between development and tumor biology. **Surgery**, 144(3):353–366, 2008.

Sobin, L.H.; Wittekind. **TNM – Classificação de Tumores Malignos**. John Wiley & Sons, INC. Publication, 2002.

Sordat, I.; Decraene, C.; Silvestre, T.; Petermann, O.; Auffray, C.; Piétu, G.; Sordat, B. Complementary DNA arrays identify CD63 tetraspanin and alpha3 integrin chain as differentially expressed in low and high metastatic human colon carcinoma cells. **Lab Invest**, 82(12):1715-24, 2002.

Sordat, I.; Roussele, P.; Chaubert P.; Petermann, O.; Aberdam, D.; Bosman, F. T. Tumor cell budding and laminin-5 expression in colorectal carcinoma can be modulated by the tissue micro-environment. **Int J Câncer** 88(5):708-17, 2000.

Stanczak, A.; Stec, R.; Bodnar, L.; Olszewski, W.; Cichowicz, M.; Kozłowski, W.; Szczylik, C.; Pietrucha, T.; Wieczorek, M.; Lamparska-Przybysz, M. Prognostic significance of Wnt-1, β -catenin and E-cadherin expression in advanced colorectal carcinoma. **Patho Oncol Res**, 17(4)955-63, 2011.

Steinberg, S. M.; Barkin, J. S.; Kaplan, R. S. Prognostic indicators of colon tumors. The Gastrointestinal Tumor Study Group experience. **Cancer**, 57(9):1866-70, 1986.

Sthephani, S.M.; Novelli, M. D.; Leite, M. S. B.; Bromberg, S. H.; Andretto, R.; Pinto jr, P. E.; Zanotto, A.; Farhoud, S.; Priolli, D.G. Processamento de imagens auxiliado pelo computador na avaliação da cicatrização da anastomose do colo esquerdo obstruído em ratos. **Estudos**. 31:1181-96, 2004.

Tenan, M.; Fulci, G.; Albertoni, M.; Diserens, A. C.; Hamou, M. F.; El Atifi-Borel, M.; Feige, J. J.; Pepper, M. S.; Van Meir, E. G. Thrombospondin-1 is downregulated by anoxia and suppresses tumorigenicity of human glioblastoma cells. **J Exp Med**, 15;191(10):1789-98, 2000.

Tsanou, E.; Peschos, D.; Batistatou, A.; Charalabopoulos, A.; Charalabopoulos, K. The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach. **Anticancer Res**, 28(6A):3815-26, 2008.

Vogelstein, B.; Fearon, E. R.; Hamilton, S. R.; Kern, S. E.; Preisinger, A. C.; Leppert, M.; Nakamura, Y.; White, R.; Smits, A. M., Bos, J. L. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **N Engl J Med**, 319:525-532, 1988.

Wanitsuwan, W.; Kanngurn, S.; Boonpipattanapong, T.; Sangthong, R.; Sangkhathat, S. Overall expression of betacatenin outperforms its nuclear accumulation in predicting outcomes of colorectal cancers. **World J Gastroenterol**, 14(39):6052-6059, 2008.

Willis, J. & Riddell, R.H. Biology versus terminology: East meets West in surgical pathology. **Gastrointest Endosc**, 57, 369-376, 2003.

van der Wurff, A. A.; Vermeulen, S. J.; van der Linden, E. P.; Mareel, M. M.; Bosman, F.T.; Arends, J. W. Patterns of alpha- and beta-catenin and E-cadherin expression in colorectal adenomas and carcinomas. *J Pathol*, 182(3):325-30, 1997 In: Rossi BM, editor **Câncer de Colon, Reto e Ânus**. São Paulo: Lemar e Tecmed editora, 2004

9. ANEXOS

9.1. ANEXO 1 - Dados Individuais da amostra

ANEXO I (Dados individuais da amostra)

Pacientes	Idade	Gênero	Conteúdo de1 beta1Cateina	Expressão de1beta1 Cateina	Conteúdo de1E7 Cateina	Expressão de1E7 Cateina	Graduação1 Histopatológica	TNM	Estado	Local1
36	71	F	5,1	citoplasmático	4,6	citoplasmático	Moderado	T2N0M0&&	3	colón&esquerdo
37	57	F	7,6	citoplasmático	3,11	membranoso	Moderado	T2N0M0&&	3	colón&esquerdo
38	71	F	2,1	citoplasmático	2,25	citoplasmático	Moderado	T2N0M0&&	3	colón&esquerdo
39	58	F	3,7	membranoso	1,92	citoplasmático	Moderado	T2N0M0&&	1	colón&esquerdo
40	60	F	3,7	membranoso	3,48	membranoso	Moderado	T3N0M0&&	1	colón&esquerdo
41	68	F	5,8	membranoso	3,58	membranoso	Moderado	T3N0M0&&	1	colón&esquerdo
42	75	F	3,2	citoplasmático	3,33	citoplasmático	Moderado	T3N0M0&&	1	colón&esquerdo
43	43	F	7,4	membranoso	5,24	membranoso	Moderado	T3N1M0&&	3	colón&esquerdo
44	52	F	2,5	citoplasmático	4,55	citoplasmático	Moderado	T3N1M0&&	3	colón&esquerdo
45	40	F	3,8	citoplasmático	8,07	membranoso	Moderado	T3N1M0&&	3	colón&esquerdo
46	66	F	3,4	citoplasmático	1,46	citoplasmático	Indiferenciado	T3N2M1&&	3	colón&esquerdo
47	53	F	6,7	citoplasmático	3,23	citoplasmático	Moderado	T4N0M0&&	3	colón&esquerdo
48	79	F	3,9	citoplasmático	2,31	citoplasmático	Moderado	T4N2M0&&	2	colón&esquerdo
49	37	F	8,3	membranoso	3,78	citoplasmático	Moderado	T4N2M1&&	4	colón&esquerdo
50	84	F	9,2	membranoso	3,74	membranoso	Moderado	T4N4M1&&	3	colón&esquerdo
51	84	F	11	membranoso	8,35	membranoso	Moderado	T4N4M1&&	3	colón&esquerdo
52	31	F	1,5	citoplasmático	2,85	membranoso	Moderado	T4N4M1&&	3	colón&esquerdo
53	56	F	4,3	citoplasmático	2,85	citoplasmático	Moderado	T3N0M0&&	4	colón&esquerdo
54	65	F	1,5	citoplasmático	1,11	citoplasmático	Moderado	T3N0M0&&	4	colón&esquerdo
55	54	F	3,6	citoplasmático	1,11	citoplasmático	Moderado	T3N0M0&&	4	colón&esquerdo
56	59	F	2,8	membranoso	7,86	membranoso	Bem& diferenciado	T3N0M0&&	1	colón&esquerdo
57	57	F	2,8	citoplasmático	4,13	citoplasmático	Bem& diferenciado	T3N1M0&&	3	colón&esquerdo
58	65	F	5,9	citoplasmático	1,21	citoplasmático	Moderado	T3N1M0&&	3	colón&esquerdo
59	70	F	2,3	citoplasmático	4,05	membranoso	Moderado	T3N1M0&&	3	colón&esquerdo
60	44	F	12	membranoso	2,47	membranoso	Moderado	T3N1M0&&	3	colón&esquerdo
61	58	F	6,4	citoplasmático	2,49	citoplasmático	Moderado	T3N2M1&&	3	colón&esquerdo
62	58	F	6,4	citoplasmático	2,49	citoplasmático	Bem& diferenciado	T3N2M1&&	3	colón&esquerdo
63	63	F	9,4	citoplasmático	2,65	citoplasmático	Moderado	T4N1M0&&	3	colón&esquerdo
64	68	F	3,31	citoplasmático	3,31	membranoso	Moderado	T4N1M0&&	4	colón&esquerdo
65	61	F	3,5	citoplasmático	6,69	citoplasmático	Moderado	T4N2M1&&	4	colón&esquerdo

c

9.2 ANEXO 2 – Publicação

CANCER BIOMARKERS

Editor-in-Chief: S. Srivastava

ISSN 1574 0153

IOS
Press

Volume 8, Number 3, 2010/2011

CANCER BIOMARKERS

Volume 8, Number 3, 2010/2011

Abstracted/Indexed in: Academic Source Complete, Biological Abstracts, BIOSIS Previews, CAB Abstracts, Chemical Abstracts Service (CAS), Elsevier BIOBASE, Embase Elsevier, EMBIO Elsevier, Journal Citation Reports/Science Edition, MEDLINE, Prouis Science Integrity, PubsHub, Science Citation Index Expanded (SciSearch®), SciVerse Scopus, Ulrich's Periodicals Directory

CONTENTS

- D.-C. Liu, Z.-L. Yang and S. Jiang*
Identification of musashi-1 and ALDH1 as carcinogenesis, progression, and poor-prognosis related biomarkers for gallbladder adenocarcinoma 113
- J.-Z. Ceme, K. Gersak and S. Novakovic*
The influence of the genetic variant within miRNA-binding site in estrogen receptor alpha gene on the risk of breast cancer in postmenopausal women on hormone replacement therapy 123
- N.P. Martinez, D.T. Kanno, J.A. Pereira, I.A. Cardinali and D.G. Priolli*
Beta-catenin and E-cadherin tissue "content" as prognostic markers in left-side colorectal cancer 129
- C. Lücke, S. Siebert, D. Mayr and A. Mayerhofer*
Connexin expression by human granulosa cell tumors: Identification of connexin 32 as a tumor signature 137
- C.M. Willis, L.E. Britton, R. Harris, J. Wallace and C.M. Guest*
Volatile organic compounds as biomarkers of bladder cancer: Sensitivity and specificity using trained sniffer dogs 145
- S.S. Varghese, P.M. Sunil and M.R. Nirmal*
Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral precancer and oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study 155

Beta-catenin and E-cadherin tissue “content” as prognostic markers in left-side colorectal cancer

Natalia Peres Martinez, Danilo Toshio Kanno, José Aires Pereira, Izilda Aparecida Cardinalli and Denise Gonçalves Priolli*

São Francisco University Medical School, Bragança Paulista, Sao Paulo, Brazil

Abstract. *Aim:* To investigate the relationship between beta-catenin and E-cadherin tissue quantitative expression (content) in tumors and clinical prognostic factors in patients with left colon cancer.

Material and Methods: Twenty nine patients with colon adenocarcinoma located distal to the splenic flexure were studied. Diagnosis and histological variables related to adenocarcinoma prognosis were evaluated using hematoxylin-eosin. Beta-catenin and E-cadherin were analysed by immunohistochemistry with specific anti-beta-catenin and anti-E-cadherin monoclonal antibodies. Tissue quantitative expression (content) was determined by computer assisted image analysis method. Results were analysed with statistical tests, adopting a significance level of 5%.

Results: There are correlations between beta-catenin and TNM stage ($p < 0.01$). There are progressively greater amounts of beta-catenin in patients with deeper invasion of the tumor in colon layers ($p = 0.03$), progressive lymph node involvement ($p = 0.05$), as well as in patients with distant metastasis ($p = 0.04$). Worse histological grades are related to lower expression of E-cadherin in tumor tissue ($p = 0.01$).

Conclusions: E-cadherin can be used as an indicator of tumor differentiation degree, whereas beta-catenin can be used as a predictor of invasion depth and spread of distal colorectal cancer.

Keywords: Colorectal carcinoma, beta-catenin, e-cadherin, immunohistochemistry, image processing, computer-assisted, prognosis

1. Introduction

Since 1990, the emergence of colorectal cancer (CRC) from the normal colonic mucosa has been well established as being mediated by a sequence of mutations in genes controlling proliferation, differentiation, adhesion and cell apoptosis. The ability of these cells to divide as well as the loss of cell adhesion, allowing uncontrolled growth and spread to other organs and tissues, are two of the main factors related to disease prognosis [1].

Normal colon mucosa epithelial cells are closely adhered to each other and the basal lamina through in-

tricate system of cell adhesion, which is composed of many proteins. In this cell adhesion system, the cadherin-catenin complex plays a prominent role. E-cadherin is a member of the cadherin family, and acts by mediating cell-to-cell and cell-to-extracellular matrix interactions, thus retaining the integrity of epithelial tissue. It belongs to the family of transmembrane glycoproteins and participates in the maintenance of cell phenotype. Beta-catenin is of major importance for maintaining tissue integrity. It also participates in the Wnt pathway as a transactivator of nuclear transcription factors [2]. Thus, both E-cadherin and beta-catenin play an important role in the morphogenesis and maintenance of tissue integrity.

Despite significant advances in understanding the mechanisms involved in colorectal carcinogenesis, it is unclear whether the increased tissue content of beta-catenin or changes in the pattern of protein expression

*Corresponding author: Denise Gonçalves Priolli, Postgraduate Program in Health Sciences, São Francisco University Medical School, Bragança Paulista, Sao Paulo, Brazil E-mail: depriolli@terra.com.br

in neoplastic cells can be used to predict the evolution of the CRC. Some studies have demonstrated the prognostic value of cytoplasmic beta-catenin, whereas others suggest that there is an independent prognostic value of nuclear beta-catenin [3–7]. Another change that seems to be correlated to the prognosis is the loss of function of E-cadherin. Studies show a relationship between E-cadherin and differentiation, tumor size, histological type and metastasis, but the results remain inconsistent [8–17].

It is possible that the conflicting results in the literature regarding the prognostic value of adhesion proteins in CRC are due to lack of standardization of positive or negative results, in addition to the different immunohistochemical techniques and varying methods of results analysis employed in different studies. Most studies determine the cadherin-catenin expression in a subjective way, rather than using a method that would enable the precise quantification of tissue. Likewise, these studies have analysed the expression of proteins in tumors of the colon and rectum together, without considering the differences between both, i.e. differences between gene expression found in cells of the colonic mucosa when comparing tumors located before and after the splenic flexure [18,19]. Different gene expression can modify both the pattern of tissue expression and the tissue adhesive proteins between the proximal or distal colon. The measurement of the tissue content of these proteins with precise methods of analysis and better studied case selection criteria could contribute to a better understanding of the dissemination mechanisms and consequently, the prognosis of the disease.

Thus, the objective of this study is to relate the content (quantitative expression), of the cell adhesion proteins E-cadherin and beta-catenin to the prognosis of patients with colorectal adenocarcinoma of the distal colon.

2. Materials and methods

2.1. Ethics

This study followed all the guidelines provided by the Sao Francisco University Ethics Research Committee, the requirements of the National Research Ethics (CONEP) of the Ministry of Health (Resolution CNS196/96) and the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki). The study was approved receiving report number 0002.0.142.000-07.

2.2. Patients

We studied 29 patients (17 females and 12 males) with a mean age of 58 years that were diagnosed with adenocarcinoma of the distal colon. All patients were operated by the same surgical team between September 2008 and February 2009. Patients with tumors located before the splenic flexure or with a history suggestive of hereditary colorectal cancer, as well as patients who were undergoing neoadjuvant therapy, were excluded.

Before surgical treatment, all patients were submitted to clinical tumor staging including chest radiographs and/or computed tomography, computed tomography of the abdomen and pelvis as well as cardiologic evaluation. The tumor staging was done according to the guidelines of the American Joint Committee on Cancer (AJCC).

Several variables related to disease prognosis were analysed: age, gender, carcinoembryonic antigen (CEA), histological grading of tumor differentiation (well, moderately, poorly), depth of invasion into the colon wall (T1, T2, T3 and T4), metastatic lymph node involvement (N) and distant metastasis (M). The last three elements are combined to determine the TNM classification of the tumor.

To perform the histopathological study, all surgical specimens previously fixed in a 10% formalin solution were covered in paraffin and stained with hematoxylin-eosin (HE).

The measurement of serum CEA was performed using a chemiluminescence technique. Blood samples were collected by venipuncture immediately before the operation and sent promptly to the laboratory for analysis.

2.3. Immunohistochemistry technique

It was presented in previous study [20]. Briefly, specimens were covered in paraffin and three slices of 4 microns were removed from the periphery of the tumor. The slides were mounted after being de-waxed in three successive baths of xylene for 5 minutes, followed by an alcohol wash and a distilled water wash. The slides were submerged in phosphate buffered sodium 0.05 Mol pH 7.2 (PBS) for 10 minutes and dried with filter paper. The blocking of endogenous peroxidase with 3% hydrogen peroxide 30V was carried out in a moist chamber at room temperature for 10 minutes, followed by another PBS wash for 10 minutes. Antigenic retrieval was performed with a citrate solution (0.05 Mol at a pH of 9.0) in a water



Fig. 1. Pattern of adhesion protein immunostaining. A- Cytoplasmic E-cadherin expression B-membranous E-cadherin expression C- Normal beta-catenin expression (magnification of 400x).

bath at 95°C for a period of 40 minutes. At the end of this process, the slides were cooled at room temperature and washed a final time in PBS for 5 minutes. The primary specific monoclonal antibodies, anti-E-cadherin (Dako CYTOMATION®, Copenhagen, Denmark) and anti-beta-catenin (Dako CYTOMATION®, Copenhagen, Denmark), were diluted at a ratio of 1:50 in bovine serum albumin (Sigma®, Saint Louis, USA). All sections were covered with approximately 100 μ L of this solution and placed in a moist chamber at 40°C for 24 hours. After this period, the sections were once more washed with PBS for five minutes and then incubated with secondary antibody (Biotinylated Link Universal® Dako CYTOMATION, Copenhagen) in a moist chamber for one hour at room temperature. Another washing with PBS was performed and the streptavidin-HRP complex (LSAB + System HRP, Dako CYTOMATION®, Copenhagen, Denmark) was applied for one hour. After additional washing with PBS, the slides were stained with Diaminobenzidine (DAB), prepared five minutes before the end of the exposure time to the dripped ABC complex, and incubated for three minutes. Following the DAB incubation, the slices were washed in both tap water and distilled water and counterstained with Harris hematoxylin for 45 seconds. After a final wash with distilled water, the slices were dehydrated by submersion in increasing concentrations of ethanol and xylene, two times in a one-minute period. Finally the slides were mounted with resin and glass, labeled and analyzed. The reaction was considered positive when the expression was diffuse with points of varying intensities and homogeneous distribution. The negative control was generated using the same staining technique without the addition of primary antibody. The positive control came from known positive immunohistochemical stain sample.

2.4. Immunohistochemistry pattern

The evaluation of the immunoreaction expression pattern of beta-catenin and E-cadherin in each slide was

performed with a light microscope (H550-S, Nikon®) with a final magnification of 400x. The pattern of protein expression was always assessed in areas that had similar degrees of histological differentiation. The pattern of adhesion protein immunostaining was classified as either membranous or cytoplasmic (Fig. 1) by a pathologist experienced in immunohistochemistry.

2.5. Content of beta-catenin and E-cadherin

The quantification of beta-catenin and E-cadherin present in each selected visual field was determined using image analysis assisted by computer. The selected images in each slide were captured by a camera attached to the microscope. The system for image capture is composed of a digital color camera (Nikon DSFi1®) coupled to the optical microscope (H550-S-Nikon®), which is connected to an LCD monitor (Dell®, 17 inches) and PC (Dell Dimension®, Pentium 4, dual-core, 3 GB of RAM in Windows XP® platform). After capture and scanning, the images were evaluated by specific image analysis (NIS-Elements, Nikon®). The program combines numerical values of points in the histogram of color that make up the image, allowing the user to numerically express the quantity of immunostaining in each field analyzed. The quantity of immunostaining represents the amount of protein in the tissue observed. Since it is quantitative analyses, it is measured in terms of content defined as "the sum that is contained in the tissue." The measurement was always made at 100x in an area representative of the tumor. For the final value, we considered the average values obtained after reading three separate fields on the same slide.

2.6. Statistical analysis

The results analysis was accomplished by adopting a significance level less than 5% ($p \leq 0.05$) in the following measures: descriptive statistics, measures of

Table 1
Differences between the content of the tissue adhesive proteins (beta-catenin and e-cadherin) and the variables related to the prognosis of the disease

Variables	n	β -catenin (%)			E-cadherin (%)			
		Mean	C.I.-95%	p	Mean	C.I.-95%	p	
Histological Grade	Well	5	5.9	3.5-8.2	0.48	4.82	2.0-11.6	*0.04
	Moderate	23	5.05	3.7-6.3		3.56	2.7-4.3	
	Poor	1	3.4	-		1.46	-	
TNM stage	I	5	3.6	0.43-6.88	*0.04	2.77	1.4-4.2	0.49
	II	8	4.2	2.85-5.55		3.31	1.6-5.1	
	III	8	4.8	2.56-6.91		4.03	2.3-5.8	
	IV	8	7.4	4.79-10		4.04	2.1-5.99	
Deep of invasion (T)	T1	1	1.49	-	*0.03	2.00	-	0.49
	T2	4	4.2	0.01-8.4		2.97	1.1-4.9	
	T3	16	4.57	3.25-5.88		3.6	2.4-4.7	
	T4	8	7.22	4.98-9.45		4.3	2.5-6.03	
Lymph nodes (N)	N0	13	3.99	2.8-5.18	*0.05	3.11	2.05-4.2	0.33
	N1	8	4.75	2.59-6.9		4.03	2.3-5.8	
	N2	8	7.40	4.7-10		4.04	2.1-6.0	
Metastasis (M)	absence	13	3.99	2.8-5.18	*0.04	3.11	2.05-4.2	0.14
	present	16	6.07	4.43-7.72		4.03	2.9-5.2	
Immunoeexpression side	Membranous	8	7.73	5.4-10.1	*0.005	4.60	3.17-6.0	*0.03
	Cytoplasmic	21	4.16	3.2-5.1		2.92	2.15-3.7	

n = number of patients; C.I. = Confidence interval; * = significant.

central tendency, normality test, analysis of variance (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney), and the association test of Spearman. The data were analysed with the statistical analysis program SPSS for Windows, version 13.0.

3. Results

Table 1 shows the comparison between beta-catenin and E-cadherin tissue content and the variables selected for the study.

Beta-catenin content in membranous expression is significantly higher than in cytoplasmic expression ($p = 0.005$). The loss of beta-catenin expression in the basal membrane is related to the worst degree of tumor histological grade ($r_s = 0.535$, $p = 0.003$). Lower amounts of beta-catenin relate to less differentiated CRC.

There is a correlation between beta-catenin and several of the measured variables: TNM stages of colorectal carcinoma ($p < 0.01$, $r_s = 0.48$) with progressive increase of the content of beta-catenin in tumor tissue ($p = 0.04$) and progressive invasion of the tumor at the deepest layers of the colon ($p = 0.03$, $r_s = 0.508$), with averages of 1.49%, 4.2%, 5.7% and 7.22% respectively for T1 tumors, T2, T3 and T4 ($p = 0.03$).

There is progressive increase of beta-catenin content in tumors of patients with progressive lymph node invasion ($p = 0.05$), as well as significant difference

($p = 0.04$) in beta-catenin content between patients who presents or do not present distance metastasis.

There is a relationship between the E-cadherin quantity expression and the distribution of membranous or cytoplasmic immunoreactivity ($r_s = 0.393$, $p = 0.03$), with a mean significantly higher for the membranous distribution of E-cadherin ($p = 0.03$). Worse tumor grades were associated with smaller content of E-cadherin in tumor tissue ($r_s = 0.464$, $p = 0.01$).

4. Discussion

Adhesion proteins are related not only to the formation of the intercellular adhesion system, but also to proteins that induce cell division and are therefore related to possible spread of cancer. One of the molecular principles involved in this mechanism is the degradation of the primary tumor cells, mediated by catenins and cadherins. Despite a great number of studies, there are still controversies about the relationship among the expression of adhesion proteins, dissemination and the degree of cell differentiation in colorectal cancer [3-17].

It is possible that the conflicting results in the literature regarding the prognostic value of adhesion proteins in CRC based on tumor location in the proximal or distal colon segments. Tumors located in the proximal colon represent a distinct group with clinical and pathological features different from tumors located in the dis-

tal colon [19,21–23]. It is possible that these genotypic differences are related to the different phenotypes seen in tumors located in the two intestinal segments [24]. When comparing histopathological aspects, it is noted that tumors located in the proximal colon are usually exophytic and most commonly produce mucus. The flow cytometry pattern is diploid and tumors are less related to the presence of polyps. These tumors are generally considered "de novo" [24]. In contrast, tumors of the distal colon have ulcerative-infiltrative growth or are stenotic, rarely producing mucus. The flow cytometry patterns are usually aneuploid, and these tumors are most often associated to adenomatous polyps. Microarray techniques allows concomitant analysis of simultaneous expression of thousands genes obtained from the same tissue sample. It was demonstrated that the expression of genes that control the cell cycle differ between the proximal and distal colon, suggesting that there are different response mechanisms of genes for intraluminal carcinogens action [19–24]. This evidence supports the idea that there are different pathways involved in CRC carcinogenesis [24] and, thus, justifies evaluating tumors in the distal colon separately from tumor in the proximal colon.

The E-cadherin is determined by chromosome 16q24, a region frequently lost in the development of malignant tumors. *In vitro* studies have shown that loss of E-cadherin may be associated with the spread and poor differentiation in colorectal carcinoma. Authors suggested that the expression of E-cadherin can be used as a marker of recurrence of colorectal cancer based on dedifferentiation [12] and reaffirmed the loss of expression of E-cadherin in colorectal tumors less differentiated [8–12]. These findings contradict studies that do not relate the expression of E-cadherin with morphological or prognostic factors of colorectal cancer [13,16,17]. In the present study we show that the membranous or cytoplasmic expression of E-cadherin is correlated with the histological grade of the tumor. In addition, smaller amounts of E-cadherin are associated with poor histological grades of left colon cancer. The findings of this study support the idea that the form of expression of E-cadherin is related to histological grade of malignancy, but in a way never shown before, revealing that the content of E-cadherin in tumor tissue correlates with the degree of dedifferentiation of distal CRC.

The E-cadherin appears to be directly or indirectly involved with the catenins in intercellular adhesion to form the cadherin-catenin complex. In CRC, studies have shown that a mutation in the beta-catenin can re-

sult in an accumulation of protein in the cytoplasm and cell nucleus, which results in increased transcriptional activity [2].

Changes in the cadherin-catenin complex are present in various tumor types, especially those of more aggressive and metastatic potential [25,26]. The decreased regulation of the cadherin-catenin complex induces cell proliferation due to the loss of contact with the membrane and allows the release of the cell from the primary site of the neoplastic lesion, thereby facilitating the emergence of metastases.

There is a smaller amount of E-cadherin in poorly differentiated tumors. This phenomenon occurs because when the cadherins form adherent junctions, molecules of beta-catenin are transferred from the cytoplasm to the region closest to the membrane, in order to organize the cytoskeleton, to prevent the free translocation of beta-catenin from the cytoplasm to the cell nucleus. The beta-catenin binds cytoplasmic elements to elements of the cell membrane. When the components of the belt are lost, cell proliferation is stimulated, and the beta-catenin will act as a factor stimulating proliferation. In addition, beta-catenin will activate the metalloproteinases and tissue collagenases, facilitating cell detachment and invasion of different tissues. Therefore, in the presence of minor amounts of E-cadherin, beta-catenin acts as transactivation factor, inducing the transcription of genes that control cell proliferation and tissue invasion [2,27]. Thus, it seems logical to assume that greater amounts of beta-catenin in the cytoplasm are related to a higher stimulation of proliferation and disruption of the cytoskeleton.

In agreement with other research, the results of this study demonstrate that there are relationships between the levels of membranous or cytoplasmic expression of beta-catenin and tumor differentiation [7]. However, no significant difference was found between the different histological grades and the content measured objectively, unlike those found for E-cadherin. This result suggests that the protein initially involved in neoplastic differentiation is the E-cadherin, whereas the beta-catenin is possibly related to neoplastic proliferation. This result confirms data that suggest the involvement of adhesion proteins as an initial stage of the adenoma-carcinoma sequence development [27].

Greater amount of beta-catenin was found in the advanced TNM stages, as well as in tumors with greater depth of colon invasion. This result corroborates with findings of previous qualitative assessments [3–7]. This study is, to the best of our knowledge, the first to demonstrate the existence of a relationship between ob-

actively measured beta-catenin levels and tumor staging, degree of invasion of colon wall and the presence of disseminated disease.

A quantitative measure can give beta-catenin the status of a prognostic marker of the depth of invasion [12] and distal CRC spread. The content and expression of E-cadherin can be used as indicators of the degree of differentiation, whereas the highest content of beta-catenin, associated with the loss of normal expression, is related to a worse prognosis. The tissue proteomics analysis combined with the parameters established in relation to the prognosis of CRC may improve the selection criteria for recommending further treatment, mainly in patients with intermediate disease stage, when adjuvant therapy is still controversial [28–30].

Despite the low number of cases presented in this paper, the statistic analysis could demonstrate positive association between E-cadherin, beta-catenin and variables related to prognoses. Further studies, including survival analysis, could be performed with a higher number of cases, in order to corroborate this research.

The results of this study suggest that the increased possibility of developing metastases is related to changes in the pattern of expression and tissue content of E-cadherin and beta-catenin and that these findings can be considered unfavorable prognostic factors in distal CRC.

In conclusion, E-cadherin can be used as an indicator of tumor differentiation degree, whereas beta-catenin can be used as a predictor of invasion depth and spread of distal colorectal cancer.

References

- [1] D. Hanahan and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, *Cell* **100**(1) (2000), 57–70.
- [2] T. Akiyama, Wnt/beta-catenin signaling, *Cytokine Growth Factor Rev* **11**(4) (2000), 273–282.
- [3] K. Maruyama, A. Ochiai, S. Akimoto, S. Nakamura, S. Baba, Y. Moriya and S. Hirohashi, Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer, *Oncology* **59** (2000), 302–309.
- [4] A.V. Ongolkov, K. Yamashita, M. Mai and T. Minamoto, Oncogenic beta-catenin and MMP-7 (matrilysin) cosegregate in late-stage clinical colon cancer, *Gastroenterology* **122** (2002), 60–71.
- [5] S. Miyamoto, Y. Endoh, T. Hasebe, G. Ishii, K. Kodama, M. Goya, M. Ono, N. Saitoh, T. Chiba and A. Ochiai, Nuclear beta-catenin accumulation as a prognostic factor in Dukes' D human colorectal cancers, *Oncol Rep* **12** (2004), 245–251.
- [6] A. Elzagheid, A. Bulgmeida, E. Kuekeita, Y. Collan, K. Syrjänen and S. Pyrhönen, Nuclear β -catenin expression as a prognostic factor in advanced colorectal carcinoma, *World J Gastroenterol* **14**(24) (2008), 3866–3871.
- [7] W. Wanitsuwan, S. Kanngurn, T. Boonpipattanapong, R. Sangthong and S. Sangkhatat, Overall expression of beta-catenin outperforms its nuclear accumulation in predicting outcomes of colorectal Cancers, *World J Gastroenterol* **14**(39) (2008), 6052–6059.
- [8] E. Tsanou, D. Peschos, A. Batistatou, A. Charalabopoulos and K. Charalabopoulos, The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach, *Anticancer Res* **28**(6A) (2008), 3815–3826.
- [9] M. Pignatelli, Models of colorectal tumour differentiation, *Cancer Surv* **16** (1993), 3–13.
- [10] V.V. Delekorskaya, A.G. Perevoshchikov, D.A. Golovkov and N.E. Kushlinskii, Expression of E-cadherin, beta-catenin, and CD-44v6 cell adhesion molecules in primary tumors and metastases of colorectal adenocarcinoma, *Bull Exp Biol Med* **139**(6) (2005), 706–710.
- [11] A. Elzagheid, A. Algars, R. Bendardaf, H. Lamham, R. Ristansaki, Y. Collan, K. Syrjänen and S. Pyrhönen, E-cadherin expression pattern in primary colorectal carcinomas and their metastases reflects disease outcome, *World J Gastroenterol* **12**(27) (2006), 4304–4309.
- [12] M. Kojima, A. Shiokawa, N. Ohike, Y. Tamegai, H. Kato and T. Morohoshi, Relation of E-cadherin and beta-catenin expression to pit pattern in colorectal cancer, *Oncol Rep* **12**(3) (2004), 533–538.
- [13] H. Edvardsson, L. Bodin, L. Franzén and V. Hahn-strömberg, Disturbed expression of Ecadherin, beta-catenin and tight junction proteins in colon carcinoma is unrelated to growth pattern and genetic polymorphisms, *APMIS* **116**(4) (2008), 253–262.
- [14] M.A. Khoussheed, T.C. Mathew, R.R. Makar, S. Louis, S.K. Asfar, H.M. Al-Sayer, H.M. Dashti and A. Al-Bader, Expression of E-cadherin in human colorectal cancer, *Surgeon* **1**(2) (2003), 86–91.
- [15] E.C. Jesus, D. Matos, R. Artigiani, A.F. Waitzberg, A. Goldenberg and S.S. Saad, Assessment of staging, prognosis and mortality of colorectal cancer by tumor markers: receptor erbB-2 and cadherins, *Acta Cir Bras* **20**(6) (2005), 422–427.
- [16] F. Nollet, G. Bexx, F. van Roy, The role of the e-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer, *Mol Cell Biol Res Com* **2** (1999), 77–85.
- [17] V. Hahn-Strömberg, H. Edvardsson, L. Bodin and L. Franzén, Tumor volume of colon carcinoma is related to the invasive pattern but not to the expression of cell adhesion proteins, *APMIS* **117**(3) (2009), 205–211.
- [18] C.A.R. Martínez, D.G. Priolli, I.A. Cardinali, J.A. Pereira, A.V. Portes and N.F. Margarido, Influence of tumor localization on the tissue expression of p53 protein in patients with colorectal cancer. Study of 100 cases, *Rev Col Bras Cir* **35**(4) (2008), 235–243.
- [19] P. Distler and P.R. Holt, Are right and left-sided neoplasms distinct tumors? *Dig Dis* **15**(4–5) (1997), 302–311.
- [20] D.G. Priolli, C.A.R. Martínez, H. Piovesan, I.A. Cardinali, N.F. Margarido and J. Waisberg, Morphofunctional malignancy grading is valuable prognostic factor for colorectal cancer, *Arg Gastroenterol* **47**(3) (2010), 225–231.
- [21] P. Gervaz, H. Bouzourene, J.P. Cerottini, P. Chaubert, J. Benhattar, M. Secic et al., Dukes B colorectal cancer: distinct genetic categories and clinical outcome based on proximal or distal tumor location, *Dis Colon Rectum* **44**(3) (2001), 364–372; discussion 372–322 D.I.
- [22] J.A. Buffill, Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location, *Ann Intern Med* **113**(10) (1990), 779–788.

- [23] K. Konishi, T. Fujii, N. Boku, S. Kato, I. Koba, A. Ohtsu et al., Clinicopathological differences between colonic and rectal carcinomas: are they based on the same mechanism of carcinogenesis? *Gut* **45**(6) (1999), 818–821.
- [24] M. Pocard, R.J. Salmon, M. Muleris, Y. Remvikos, J. Bara, B. Dutrillaux and M.F. Poupon, Two colon—two cancers? Proximal or distal adenocarcinoma: arguments for a different carcinogenesis. *Bull Cancer* **82**(1) (1995), 10–21.
- [25] A.L.M. Barth, I.S. Näthke and W.J. Nelson, Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9** (1997), 683–690.
- [26] I.R.G. Beavon, The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and Regulation. *Eur J Cancer* **36** (2000), 1607–1620.
- [27] S. Chen, J. Liu, G. Li, F. Mo, X. Xu, T. Zhang, X. Zhang, J. Li, X. Han and Y. Sun, Altered distribution of beta-catenin and prognostic roles in colorectal carcinogenesis. *Scand J Gastroenterol* **43**(4) (2008), 456–464.
- [28] S. Hirohashi and Y. Kanai, Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* **94**(7) (2003), 575–581.
- [29] B. Glimelius, O. Dahl, B. Cedemark, A. Jakobsen, S.M. Bentzen, H. Starkhammar, H. Grönberg, R. Hultborn, M. Albertsson, L. Pählman and K.M. Tyeit, Adjuvant chemotherapy in colorectal cancer: a joint analysis of randomised trials by the Nordic Gastrointestinal Tumour Adjuvant Therapy Group. *Acta Oncol* **44**(8) (2005), 904–912.
- [30] D. Schrag, S. Rifas-Shiman, L. Saltz, P.B. Bach and C.B. Begg, Adjuvant chemotherapy use for Medicare beneficiaries with stage II colon cancer. *J Clin Oncol* **20**(19) (2002), 3999–4005.

9.3. ANEXO 3 – Prêmio



CONGRESSO PAULISTA DO COLÉGIO BRASILEIRO DE CIRURGIÕES
23 A 25 DE Setembro de 2010 - Parque das Convenções - Anhembi - SP

Certificado

Certificamos que

NATALIA PERES MARTINEZ

participou do CONGRESSO PAULISTA DO COLÉGIO BRASILEIRO DE CIRURGIÕES em 23 a 25 de setembro de 2010 no Centro de Convenções do Parque Anhembi, São Paulo - SP, na qualidade de Apresentador de Trabalho: "Análise das habilidades e competências de diagnóstico e terapêutica de emergência no atendimento ao paciente com trauma torácico".
G. Pereira, J.A. Cardinailli, C. Bacci, M. F. P. Rio III, D. S., premiada como o melhor FÓRUM DE PESQUISA apresentada no Congresso.

São Paulo, 25 de setembro de 2010.


TCBC Paulo Kassab
Presidente
Congresso Paulista do CBC


TCBC Roberto Stad Júnior
Presidente
Comissão Organizadora


TCBC José Carlos Brascani
Presidente
Comissão Científica