UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

MARIÂNGELA OTTOBONI BRUNALDI

O estudo do NF- κ B e da Survivina na progressão do
Câncer Colorretal

RIBEIRÃO PRETO

2013

MARIÂNGELA OTTOBONI BRUNALDI

Versão corrigida. Original disponível na secretaria do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP.

**O estudo do NF- κ B e da Survivina na progressão do
Câncer Colorretal**

Tese apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção de Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Patologia

Opção: Patologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Ribeiro-Silva

RIBEIRÃO PRETO

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Brunaldi, Mariângela Ottoboni.

O estudo do NF- κ B e da Survivina na progressão do Câncer Colorretal. Ribeirão Preto, 2013.

166 f: 61 fig.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Patologia.

Orientador: Ribeiro-Silva, Alfredo.

1. Câncer Colorretal, 2. NF- κ B, 3. Survivina, 4. Carcinogênese Colorretal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariângela Ottoboni Brunaldi

O estudo do NF- κ B e da Survivina na progressão do Câncer Colorretal.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
a obtenção de título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Patologia

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu grande companheiro José Eduardo, pelo apoio constante, generosidade e compreensão.

Aos meus filhos Vítor e Eduardo, razão da minha vida.

Aos meus pais, Dionísio e Sidney, pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Zucoloto, “*in memorian*”, meu grande mestre, minha gratidão pelo apoio constante, generosidade, bondade e minhas saudades.

Ao Prof. Dr. Alfredo Ribeiro-Silva, meu orientador, pelo apoio constante, pelo acolhimento e incentivo.

Ao Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia pelas valiosas contribuições para esse trabalho.

À Prof^a. Dra. Leandra Naíra Zambelli Ramalho pelo suporte na área técnico-científica nesta longa trajetória de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Edson Garcia Soares por ter nos disponibilizado o arquivo do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP para efetuarmos nossa pesquisa.

As minhas amigas Margarida M. R. Moraes e Maria Heloisa R. Palermo, pelo carinho e apoio.

Aos meus amigos e parceiros de Laboratório: João Felipe Rito Cardoso, Juliana Zanetti, João Paulo Oliveira da Costa, Giórgia Gobbi da Silveira, Verônica Assalin Zogeto, Célia Cohen por tornarem agradável nosso ambiente de trabalho.

Aos parceiros da Pós Graduação, Danilo Soave pelo apoio na elaboração e arte final de figuras; Jean Gonzales de Menezes pela ajuda valiosa na escolha da população de estudo; Vinicius Kannen e Tassiana Marini, parceiros na elaboração do estudo da survivina.

As técnicas de laboratórios, Laura Midori Kawasse, Márcia A. Ferreira Oliva, Deisy Mara da Silva, Rosangela Orlandin Lopes, Maria Helena Riul e Auristela de Mello Martins Solano pela dedicação, esmero, profissionalismo e amizade.

As secretárias, Neide Terezinha Gonçalves do Departamento de Patologia, Camila de Luca Zambonini da Pós Graduação e Rosângela Mazzucato C. de Paiva da Graduação, Felipe Denipotte Coelho, técnico da Informática e Antônio de Pádua Martins, técnico de laboratório, pela disponibilidade, carinho e paciência.

Aos oficiais administrativos responsáveis pelo Arquivo do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da FMRPUSP, César Alberto Brigato Júnior e Décio Antonio Barrionovo Filho, atenciosos e prestativos.

As oficiais administrativas do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da FMRPUSP, Renata Paola Ferraz, Regina Célia Laporti, Rose de Fátima Rehder, Ana Maria M. P. dos Santos e Márcia Correia pela presteza ao nos atender.

À CAPES pelo apoio científico e financeiro.

“A inteligência não é formada somente pelo conhecimento, mas também, e sobretudo, pela habilidade de aplicar os conhecimentos na prática.”

Aristóteles

RESUMO

BRUNALDI, M.O. **O estudo do NF- κ B e da Survivina na progressão do Câncer Colorretal.** 2013. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O câncer colorretal (CCR) é importante causa de morte no Brasil, representando a segunda causa de morbimortalidade por câncer nas regiões Sudeste e Sul. Foi uma das primeiras neoplasias malignas a ter modelo de carcinogênese identificado. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a expressão do NF- κ B e da survivina na progressão do CCR, sua relação com alvos moleculares envolvidos na sobrevivência celular [proibitina, fator de necrose tumoral (TNFR1), p53, β catenina]; invasão (metaloproteinases 2 e 9 - MMP), angiogênese (fator de crescimento endotelial vascular VEGF) e apoptose (caspase 3 e método do Túnel). Trata-se de estudo retrospectivo baseado na análise histopatológica de dezoito casos de adenomas com displasia de alto (AG) e baixo grau (BG), respectivamente; dez casos de adenocarcinoma bem, moderado e pouco diferenciado, respectivamente, nove casos de lesões serrilhadas e nove biópsias colorretais (controle) selecionados aleatoriamente no Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, no período de 2000 a 2009. Foram construídos arranjos de matriz tecidual para representar os casos de adenocarcinomas e cinco casos de adenomas >1 cm de diâmetro. A detecção do NF- κ B foi realizada pelo método de Southwestern imunoistoquímica. Avaliou-se a expressão imunoistoquímica da survivina, proibitina, TNFR1, p53, β catenina, MMPs 2 e 9, VEGF, caspase 3 e Túnel. Não observamos expressão imunoistoquímica do NF- κ B em 70% dos casos de adenocarcinomas, em 72% dos adenomas AG e em 89% das lesões serrilhadas; a marcação foi positiva em 66% e 56% dos casos de adenoma do BG e controle, respectivamente. Expressões da survivina, proibitina citoplasmática, TNFR1, p53, MMP 2 e 9 foram crescentes na seqüência adenoma-carcinoma, sem aparente modulação pelo NF- κ B. A survivina suprimiu ação da caspase 3, exceto nos adenomas BG e controle, com baixos níveis de apoptose ao túnel. Lesões serrilhadas e controle apresentaram baixa expressão do TNFR1 e da proibitina citoplasmática, ausência de marcação da p53 e MMPs 2 e 9, exceto um caso controle. Identificou-se marcação nuclear da proibitina nos adenocarcinomas pouco diferenciados, adenomas AG e BG. A expressão da p53 relacionou-se ao grau de displasia nos adenomas e à desregulação da survivina. Observou-se expressão citoplasmática e nuclear da β catenina nos adenocarcinomas, adenomas AG e BG. As lesões serrilhadas exibiram expressão citoplasmática em 44% dos casos. O grupo controle exibiu expressão preservada da β catenina. Identificou-se expressão do VEGF nos adenocarcinomas, relacionada à perda de diferenciação celular, presença de metástases, não correlacionada ao NF- κ B. Com base nos nossos resultados, sugerimos a desregulação da β catenina como possível responsável pela inibição do NF- κ B; além de sua participação na desregulação da survivina juntamente com a p53. As lesões serrilhadas não exibiram indícios sugestivos de inibição do NF- κ B pela β catenina. A survivina, devido propriedades anti-apoptóticas, emerge como potencial alvo terapêutico no tratamento do CCR, confirmando estudos anteriores.

Palavras chave: Câncer Colorretal, NF- κ B, Survivina, Carcinogênese Colorretal.

ABSTRACT

BRUNALDI, M.O. **The study of NF- κ B and survivin in the progression of colorectal cancer.**2013. [Thesis]. Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Colorectal cancer (CRC) is an important cause of death in Brazil, representing the second leading cause of cancer mortality in the Southeast and South. It was among the first malignancies that have the carcinogenesis model identified. The aim of this study was to evaluate the expression of NF- κ B and survivin in the progression of CRC, its relationship with molecular targets involved in cell survival [prohibitin, tumor necrosis factor (TNFR1), p53, β catenina], invasion (metalloproteinases 2 and 9 - MMP), angiogenesis (vascular endothelial growth factor VEGF) and apoptosis (caspase 3 and method Tunnel). This is a retrospective study based on the histopathological analyses of eighteen cases of high- (HG) and low- grade dysplastic (LG) adenomas, respectively; ten cases of adenocarcinoma well, moderately and poorly differentiated, respectively, nine cases of serrated lesions e nine biopsies (control); randomly selected in the Pathology Service of the University Hospital of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo from 2000 to 2009. Tissue microarray were constructed to represent the cases of adenocarcinomas and five cases of adenomas > 1cm in diameter. Detection of NF- κ B was performed by the Southwestern immunohistochemistry method. We evaluated immunohistochemical expression of survivin, prohibitin, TNFR1, p53, β catenin, MMPs 2 and 9, VEGF, caspase 3 and method Tunnel. We did not observe immunohistochemical expression of NF- κ B in 70% of cases of adenocarcinomas, in 72% of HG adenomas and 89% of lesions serrated; staining was positive in 66% and 56% of cases of LG adenoma and control, respectively. Expressions of survivin, cytoplasmic prohibitin, TNFR1, p53, MMPs 2 and 9 were increasing in adenoma-carcinoma sequence, without apparent modulation by NF- κ B. Survivin suppressed action of caspase 3, except in BG adenomas and control, with low levels of apoptosis to the tunnel. Serrated lesions and control showed low expression of TNFR1 and cytoplasmic prohibitin, the absence of staining of p53 and MMPs2 and 9, except for one control. We identified nuclear staining of prohibitin in poorly differentiated adenocarcinomas, HG and LG adenomas. Expression of p53 was related to the grade of dysplasia in adenomas and deregulation of survivin. The expression of the cytoplasmic and nuclear β catenin was observed in adenocarcinoma, HG and LG adenoma. Serrated lesions exhibited cytoplasmic expression in 44% of cases. Control group exhibited preserved expression of β catenin. It was identified VEGF expression in adenocarcinomas, related to the loss of cellular differentiation, metastasis, not correlated with NF- κ B. According to our results, we suggest that deregulation of β catenin is possible responsible for the inhibition of NF- κ B besides their participation in the deregulation of survivin with p53. Serrated lesions exhibited no evidence suggestive of inhibition of NF- κ B by β catenin. Survivin emerges as a potential therapeutic target in the treatment of CRC due to their anti-apoptotic properties, confirming previous studies.

Key Words: Colorectal Cancer, NF- κ B, Survivin, Colorectal Carcinogenesis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. -** Taxas de incidência do câncer colorretal padronizada por idade, por sexo e distribuição mundial.
- Figura 2. -** Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2012, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do cólon e reto).
- Figura 3. -** Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100mil mulheres, estimadas para o ano de 2012, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna de cólon).
- Figura 4. -** Modelo genético do câncer colorretal (CCR).
- Figura 5. -** Frequência de Adenocarcinomas em adenomas relacionada ao tamanho e arquitetura da lesão.
- Figura 6. -** Vias de sinalização do NF- κ B: Canônico (clássico); Dano induzido ao DNA e Não canônico.
- Figura 7. -** Representação de alvos NF- κ B dependentes envolvidos nos diferentes aspectos da oncogênese.
- Figura 8. -** Vias de Sinalização do receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral.
- Figura 9. -** Modelo simplificado dos papéis da PBT1 na tumorigênese.
- Figura 10. -** Esquema representativo da ação da PBT1 em células epiteliais intestinais.
- Figura 11. -** Visão Global esquemática do papel das MMPs no Câncer.
- Figura 12.-** Construção dos arranjos de matriz tecidual.
- Figura 13. -** Fotomicrografia de adenocarcinoma colorretal moderadamente diferenciado: **A1-** Corte histológico corado ao H&E; **A2-** Ausência de marcação imunoistoquímica ao NF- κ B.
- Figura 14. -** Fotomicrografia de adenoma colorretal com displasia de alto grau: **A1-**Corte histológico corado ao H&E; **A2-** Ausência de marcação imunoistoquímica ao NF- κ B em adenoma com displasia de alto grau.
- Figura 15. -** Fotomicrografia de adenoma colorretal com displasia de baixo grau: **A1-** Corte histológico corado ao H&E; **A2-** Marcação nuclear da expressão do NF- κ B em adenoma com displasia de baixo grau.
- Figura 16. -** Fotomicrografia de lesão serrilhada: **A1-** Corte histológico corado ao H&E; **A2-** Ausência de marcação imunoistoquímica ao NF- κ B em corte histológico de lesão serrilhada.
- Figura 17. -** Fotomicrografia de mucosa colônica: **A1-** Corte histológico corado ao H&E revelando ausência de atipias epiteliais e arquiteturais; **A2-** Marcação nuclear da expressão do NF- κ B em corte histológico de mucosa colônica.

- Figura 18. -** Representação gráfica dos percentuais da ausência de expressão imunoistoquímica do NF- κ B, Survivina positiva, AE da Caspase 3 e positividade ao Túnel.
- Figura 19.-** Fotomicrografia de adenocarcinoma: **A1-** Expressão citoplasmática da Survivina; **A2-** Expressão citoplasmática da Caspase 3; **A3-** Ausência de apoptose ao método do Túnel.
- Figura 20.-** Fotomicrografia de adenoma de alto grau: **A1-** Expressão citoplasmática da Survivina; **A2-** Expressão citoplasmática da Caspase3; **A3-** Ausência de apoptose ao método do Túnel.
- Figura 21.-** Fotomicrografia de adenoma de baixo grau: **A1-** Expressão citoplasmática da Survivina; **A2-** Expressão citoplasmática da Caspase 3; **A3-** Presença de apoptose ao método do Túnel.
- Figura 22. -** Fotomicrografia de lesão serrilhada: **A1-** Expressão citoplasmática focal da Survivina; **A2-** Expressão citoplasmática da Caspase 3; **A3-** Ausência de apoptose ao método do Túnel.
- Figura 23. -** Fotomicrografia de Mucosa colônica (controle): **A1-** Ausência de expressão citoplasmática da Survivina; **A2-** Expressão citoplasmática da Caspase 3; **A3-** Presença de apoptose ao método do Túnel.
- Figura 24. -** Representação gráfica em percentuais da expressão da PBT Nuclear.
- Figura 25. -** Representação gráfica em percentuais da expressão da PBT citoplasmática.
- Figura 26. -** Representação gráfica dos percentuais de expressão imunoistoquímica das proteínas envolvidas na sinalização pró-inflamatória, Caspase 3 e Túnel.
- Figura 27.-** Fotomicrografia de adenocarcinoma: **A1-** Ausência de marcação do NF- κ B; **A2-** Expressão citoplasmática da proibitina; **A3-** Expressão citoplasmática do TNFR1.
- Figura 28. -** Fotomicrografia de adenoma com displasia de alto grau: **A1-** Ausência de marcação do NF- κ B; **A2-** Expressão citoplasmática da proibitina; **A3-** Expressão citoplasmática do TNFR1.
- Figura 29. -** Fotomicrografia de adenoma com displasia de baixo grau: **A1-** Marcação nuclear (seta) do NF- κ B; **A2-** Expressão citoplasmática da proibitina; **A3-** Expressão citoplasmática do TNFR1.
- Figura 30. -** Fotomicrografia de lesão serrilhada: **A1-** Ausência de marcação do NF- κ B; **A2-** Expressão citoplasmática da proibitina; **A3-** Expressão citoplasmática do TNFR1.
- Figura 31. -** Fotomicrografia de mucosa colônica (controle): **A1-** Marcação nuclear do NF- κ B; **A2-** Expressão citoplasmática da proibitina; **A3-** Expressão citoplasmática do TNFR1.

- Figura 32. -** Representação gráfica dos percentuais de expressão imunoistoquímica das proteínas envolvidas no processo de sobrevivência celular com ênfase ao NF- κ B, PBT Nuclear, Caspase 3 e Túnel.
- Figura 33. -** Fotomicrografia de expressão nuclear e citoplasmática de proibitina em: **A1**- Adenocarcinoma; **A2**- Adenoma de alto grau; **A3**- Adenoma de baixo grau.
- Figura 34. -** Representação gráfica dos percentuais de expressão imunoistoquímica da p53.
- Figura 35. -** Representação gráfica dos percentuais de expressão imunoistoquímica da p53, Survivina, PBT Nuclear e sua repercussão no processo apoptótico através da expressão da Caspase 3 e Túnel.
- Figura 36. -** Fotomicrografia de adenocarcinoma: **A1**- Marcação nuclear da p53 no epitélio de revestimento glandular; **A2**- Expressão citoplasmática da Survivina.
- Figura 37. -** Fotomicrografia de adenoma de alto grau: **A1**- Marcação nuclear da p53 no epitélio de revestimento glandular; **A2**- Expressão citoplasmática da Survivina.
- Figura 38. -** Fotomicrografia de adenoma de baixo grau: **A1**- Marcação nuclear da p53 no epitélio de revestimento glandular; **A2**- Expressão citoplasmática da Survivina.
- Figura 39. -** Fotomicrografia de lesão serrilhada: **A1**- Ausência de marcação imunoistoquímica da p53; **A2**- Expressão citoplasmática da Survivina.
- Figura 40. -** Fotomicrografia de mucosa colônica (controle): **A1**- Ausência de marcação imunoistoquímica da p53; **A2**- Ausência de marcação imunoistoquímica da Survivina.
- Figura 41. -** Representação gráfica dos percentuais de expressão imunoistoquímica da β catenina nuclear nos grupos de estudo.
- Figura 42. -** Fotomicrografia de mucosa colônica (controle) demonstrando expressão de membrana preservada da β catenina no epitélio glandular colônico, ausência de expressão citoplasmática e nuclear.
- Figura 43. -** Fotomicrografia de adenocarcinoma: **A1**- Diminuição da expressão de membrana, expressão citoplasmática e expressão nuclear focal da β catenina no epitélio glandular; **A2**- Marcação nuclear da β catenina em Adenocarcinoma pouco diferenciado.
- Figura 44. -** Fotomicrografia de adenoma de alto grau: **A1**- Diminuição da expressão de membrana, expressão citoplasmática e expressão nuclear focal da β catenina no epitélio glandular; **A2**- Detalhe da marcação nuclear da β catenina em epitélio glandular.
- Figura 45. -** Fotomicrografia de adenoma de baixo grau: **A1**- Diminuição da expressão de membrana, expressão citoplasmática e expressão nuclear focal da β

catenina no epitélio glandular; **A2**- Detalhe da marcação nuclear da β catenina.

- Figura 46. -** Fotomicrografia de lesão serrilhada demonstrando diminuição da expressão de membrana, expressão citoplasmática e ausência de expressão nuclear da β catenina.
- Figura 47. -** Representação gráfica dos percentuais de expressão imunoistoquímica associada do NF- κ B à β catenina nas populações de estudo.
- Figura 48. -** Representação gráfica dos percentuais de expressão imunoistoquímica da p53 e coexpressão da β catenina nuclear na população de estudo.
- Figura 49. -** Representação gráfica dos percentuais de expressão da MMP 2 nos grupos de estudo.
- Figura 50. -** Representação gráfica dos percentuais de expressão da MMP 9 nos grupos de estudo.
- Figura 51. -** Fotomicrografia de adenocarcinoma: **A1**- Expressão citoplasmática da MMP 2 no epitélio de revestimento glandular; **A2**- Expressão citoplasmática da MMP 9 no epitélio de revestimento glandular.
- Figura 52. -** Fotomicrografia de adenoma de alto grau: **A1**- Expressão citoplasmática focal da MMP 2; **A2**- Expressão citoplasmática da MMP 9.
- Figura 53. -** Fotomicrografia de adenoma de baixo grau: **A1**- Expressão citoplasmática focal da MMP 2 no epitélio de revestimento glandular; **A2**- Expressão citoplasmática da MMP 9 no epitélio de revestimento glandular.
- Figura 54. -** Fotomicrografia de lesão serrilhada: **A1**- Ausência de expressão da MMP 2; **A2**- Ausência de expressão da MMP 9.
- Figura 55. -** Fotomicrografia de mucosa colônica (controle): **A1**- Ausência de expressão da MMP 2; **A2**- Ausência de expressão da MMP 9.
- Figura 56. -** Representação gráfica dos percentuais de expressão imunoistoquímica da MMP 2 e 9 correlacionada à presença de metástases.
- Figura 57. -** Fotomicrografia de adenocarcinoma: **A1**- Expressão citoplasmática do VEGF no epitélio glandular; **A2**- Detalhe da marcação citoplasmática do VEGF.
- Figura 58. -** Fotomicrografias de adenomas de alto e baixo grau: **A1** e **A2**- Ausência de expressão imunoistoquímica do VEGF.
- Figura 59. -** Fotomicrografias de: **A1**- Lesão serrilhada; **A2**- Mucosa colônica (controle), ausência de expressão do VEGF.
- Figura 60. -** Representação gráfica dos percentuais da expressão associada do VEGF às MMP 2 e 9 nos grupos de estudo.
- Figura 61. -** Representação esquemática do possível mecanismo molecular inibitório do NF- κ B e a desregulação da survivina nas populações de Adenocarcinomas e Adenomas com displasia de alto grau.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** - Classificação das lesões serrilhadas do intestino grosso.
- Tabela 2.** - Estadiamento patológico dos pacientes portadores de adenocarcinomas segundo sistema TNM.
- Tabela 3.** - Imunodeteção do NF- κ B.
- Tabela 4.** - Intensidade de expressão imunoistoquímica da Survivina.
- Tabela 5.** - Imunodeteção da Caspase 3.
- Tabela 6.** - Imunodeteção de apoptose ao Túnel.
- Tabela 7.** - Expressão imunoistoquímica das proteínas NF- κ B, Survivina, Caspase 3 e Túnel.
- Tabela 8.** - Imunodeteção do TNFR1.
- Tabela 9.** - Imunodeteção da PBT Nuclear e citoplasmática.
- Tabela 10.** - Imunodeteção do NF- κ B, TNFR1, PBT citoplasmática, Caspase 3 e Túnel.
- Tabela 11.** - Imunodeteção do NF- κ B, PBT Nuclear, Caspase 3 e Túnel.
- Tabela 12.** - Imunodeteção da p53.
- Tabela 13.** - Imunodeteção da p53, Survivina, PBT Nuclear, Caspase 3 e Túnel.
- Tabela 14.** - Expressão da β catenina na população de estudo baseada na distribuição subcelular (membrana, citoplasma e núcleo) e intensidade da marcação.
- Tabela 15.** - Expressão imunoistoquímica associada do NF- κ B e β catenina nas populações de estudo.
- Tabela 16.** - Expressão imunoistoquímica alterada da β catenina e da Survivina.
- Tabela 17.** - Correlação entre a expressão imunoistoquímica da β catenina nuclear ao estadiamento patológico dos adenocarcinomas.
- Tabela 18.** - Correlação da expressão nuclear da β catenina à presença de metástases.
- Tabela 19.** - Expressão imunoistoquímica do p53 e da β catenina nuclear.
- Tabela 20.** - Expressão imunoistoquímica das MMPs 2 e 9 nos grupos de estudo.
- Tabela 21.** - Expressão imunoistoquímica das MMPs 2 e 9 na população dos adenocarcinomas estadiados segundo o sistema TNM.
- Tabela 22.** - Correlação entre a expressão das MMPs 2 e 9 à presença de metástases.
- Tabela 23.** - Expressão imunoistoquímica das MMPs 2 e 9 e NF- κ B nos grupos de estudo.
- Tabela 24.** - Expressão imunoistoquímica do VEGF.
- Tabela 25.** - Correlação entre expressão imunoistoquímica do VEGF à presença de metástases.
- Tabela 26.** - Percentuais de expressão imunoistoquímica do VEGF, MMPs 2 e 9.
- Tabela 27.** - Expressão imunoistoquímica do VEGF e p53 nas populações de estudo.
- Tabela 28.** - Percentuais de expressão imunoistoquímica do VEGF e do NF- κ B.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

15PGDH	15-prostaglandina desidrogenase
APC	Gene da polipose adenomatosa colônica
ASS	Adenoma Serrilhado Sésil
AST	Adenoma Serrilhado Tradicional
Bax	Bcl-2–associada proteína X
Bcl 2	<i>B cell CLL/ lymphoma 2</i>
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
BRAF	<i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
CCR	Carcinoma colorretal
CIMP	Fenótipo Metilador das Ilhotas de CpG
CIN	Instabilidade cromossômica
c-MYC	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
COX 2	Ciclooxigenase 2
DCC	Deleção no Câncer Colorretal
DII	Doença inflamatória intestinal
DMV	Densidade microvascular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FCA	Foco de criptas aberrantes
GSK3 β	Glicogênio sintase quinase-3 beta
H&E	Hematoxilina-eosina
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
<i>hMLH1</i>	Gene de reparo do DNA (<i>human mutL homolog 1</i>)
<i>hMSH2</i>	Gene de reparo do DNA (<i>human mutS homolog 2</i>)
HNPCC	Carcinoma colorretal hereditário não-polipóide
ICAM 1	Molécula de adesão intercelular 1
IFN-γ	Interferon gama
IIQ	Imunoistoquímica
IKK	Quinase inibidora do NF- κ B
IKKα	Quinase inibidora do NF- κ B subunidade alfa
IKKβ	Quinase inibidora do NF- κ B subunidade beta
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma 2 viral oncogene homolog</i>
MEC	Matriz extracelular
MIN	Microssatélite instável

MLH3	<i>human mutL homolog 3</i>
MMP	Metaloproteinase
MMR	Mismatch repair
MOD	<i>Minimal oligomerization domain</i>
MSH3	<i>human mutS homolog 3</i>
MSH6	<i>human mutS homolog 6</i>
MSH-I	Instabilidade de microssatélites de alta frequência
MSI	Instabilidade de microssatélites
MYH	<i>Mut Yhomologue</i>
NEMO	NF- κ B <i>essencial modulator</i>
NF-κB	Fator nuclear da cadeia Kappa de linfócito B
NIE	Neoplasia intra-epitelial
PAF	Polipose Adenomatosa Familiar
PAM	Polipose associada ao <i>MYH (mut Y homologue)</i>
PBT	Proibitina
PBT1	Proibitina 1
PBT2	Proibitina 2
PGE2	Prostaglandina <i>E2</i>
PH	Pólipo hiperplásico
PI3-K	<i>fosfatidilinositol-3-Kinase</i>
PM	Pólipo Misto
PMS1/2	<i>Post meiotic segregation increased 1/2</i>
RAF/MAPK	MAPK-Mitogen-activated protein Kinase
RCU	Retocolite Ulcerativa
SMAD2	<i>“mothers against decapentaplegic homolog 2 (Drosophila)”</i>
SMAD4	<i>“mothers against decapentaplegic homolog 4 (Drosophila)”</i>
SPFH	<i>Stomatin, Prohibitin, Flotillin, HflC/K</i>
TCF 4	Fator de transcrição 4
TCF/LEF	<i>T-cell factor/ lymphoid enhancer factor</i>
TGFβIIIR	Fator de transformação do crescimento beta receptor II
TIMP	Inibidores teciduais das metaloproteinases
TMA	Matriz de arranjos teciduais
TRAF 1	Receptor associado ao fator de necrose tumoral 1
UDB	<i>Ubiquitin-binding domain</i>
VCAM 1	Molécula de adesão celular-vascular 1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Wnt	<i>Wingless e Integrase-1 (via de sinalização)</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	23
1.1.	ASPECTOS GERAIS	23
1.2.	ETIOLOGIA E PATOGÊNESE	25
1.2.1.	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	25
1.2.1.1.	História familiar	25
1.2.1.2.	Fatores nutricionais	25
1.2.1.3.	Doenças inflamatórias crônicas	25
1.2.1.3.1.	Retocolite ulcerativa (RCU)	25
1.2.1.3.2.	Doença de Crohn	26
1.2.2.	MECANISMOS E VIAS GENÉTICAS	26
1.2.2.1.	Vias de instabilidade genômica	27
1.2.2.1.1.	Instabilidade cromossômica (CIN)	27
1.2.2.1.1.1.	Gene supressor tumoral APC/ β catenina	28
1.2.2.1.1.2.	KRAS	30
1.2.2.1.1.3.	p53	30
1.2.2.1.1.4.	DCC/SMAD (perda da heterozigose do 18q)	31
1.2.2.1.2.	Instabilidade de microssatélites (MSI)	31
1.2.2.1.3.	Deficiência de reparo do DNA do tipo excisão de base associada ao gene MYH	32
1.2.2.2.	Mecanismo epigenético na carcinogênese colônica	33
1.2.2.3.	Vias de fatores de crescimento	33
1.2.2.3.1.	Regulação aberrante da sinalização da prostaglandina	33
1.2.2.3.2.	Receptor do fator de crescimento epidérmico	34
1.2.2.3.3.	Fator de crescimento endotelial vascular	34
1.3.	LESÕES PRECURSORAS	35
1.3.1.	FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES (FCA)	35
1.3.2.	ADENOMAS COLORRETAIS (PÓLIPOS ADENOMATOSOS)	35
1.3.2.1.	Características histológicas	36

1.3.3.	LESÕES SERRILHADAS	37
1.3.3.1.	Pólipos hiperplásicos (PH)	38
1.3.3.2.	Adenoma serrilhado tradicional (AST)	38
1.3.3.3.	Adenoma serrilhado séssil (ASS)	38
1.3.3.4.	Pólipo misto (PM)	39
1.3.4.	PÓLIPOS JUVENIS	39
1.4.	CRESCIMENTO CELULAR, INVASÃO E METÁSTASES	39
1.4.1.	NF-KB	39
1.4.1.1.	Alvos moleculares relacionados ao NF-κB	42
1.4.1.1.1.	Sobrevivência Celular - Survivina	42
1.4.1.1.2.	Inflamação - Fator de Necrose Tumoral (TNF)	44
1.4.1.1.3.	Inflamação - Proibitina (PBT)	46
1.4.1.1.4.	Invasão e metástases - Metaloproteinases (MMPs)	49
1.4.1.1.5.	Angiogênese - Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)	51
2.	OBJETIVOS GERAIS	54
2.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
3.	MATERIAL E MÉTODOS	56
3.1.	DELINEAMENTO DO ESTUDO	56
3.2.	CASUÍSTICA	56
3.2.1.	DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO A SER ESTUDADA	56
3.2.2.	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	57
3.2.2.1.	Adenocarcinomas colorretais	57
3.2.2.2.	Adenomas colorretais	59
3.2.2.3.	Lesões serrilhadas	59
3.2.2.4.	População controle	60
3.3.	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	60
3.4.	METODOLOGIA	61

3.4.1.	CONSTRUÇÃO DOS BLOCOS DE MATRIZ DE ARRANJOS TECIDUAIS (TMA)	61
3.4.2.	REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS (IIQ)	62
3.4.2.1.	Southwestern imunoistoquímica	63
3.4.2.2.	Critérios para avaliação das respostas imunoistoquímicas	64
3.5.	TÚNEL	68
3.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
4.	RESULTADOS	71
4.1.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA NF- KB, SURVIVINA, CASPASE 3 E TÚNEL	71
4.1.1.	NF-κB	71
4.1.2.	Expressão imunoistoquímica da Survivina	73
4.1.3.	Caspase 3	74
4.1.4.	Túnel	75
4.1.5.	Relações entre expressões NF-κB, Survivina, Caspase 3 e Túnel	76
4.2.	TNFR1	79
4.3	EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROIBITINA - DISTRIBUIÇÃO SUBCELULAR	80
4.3.1.	Expressão imunoistoquímica citoplasmática da proibitina	80
4.3.2.	Expressão imunoistoquímica nuclear da proibitina	80
4.3.3.	Relação da expressão imunoistoquímica do NF-κB, TNFR1, PBT citoplasmática, Caspase 3 e Túnel	82
4.3.4.	Relação da expressão imunoistoquímica do NF-κB, PBT Nuclear, Caspase 3 e Túnel	85
4.4.	EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA P53 E SUAS RELAÇÕES COM A SURVIVINA, PBT NUCLEAR, CASPASE 3 E TÚNEL	86
4.4.1.	p53	86
4.4.2.	Relações entre expressões imunoistoquímica da p53, Survivina, PBT Nuclear, Caspase 3 e Túnel	87

4.5.	β CATENINA: DISTRIBUIÇÃO SUBCELULAR, RELAÇÕES COM NF-κB, SURVIVINA, ESTADIAMENTO PATOLÓGICO NAS POPULAÇÕES DE ADENOCARCINOMAS, METÁSTASES, ADENOMAS E P53	90
4.5.1.	Distribuição subcelular da β catenina na população de estudo	90
4.5.2.	Relação da expressão imunoistoquímica da β catenina com NF- κ B, Survivina, estadiamento patológico nas populações de adenocarcinomas, metástases, adenomas e p53	94
4.5.2.1.	Relação entre a expressão imunoistoquímica da β catenina e NF- κ B	94
4.5.2.2.	Relação entre a expressão imunoistoquímica da β catenina nuclear e Survivina	95
4.5.2.3.	Expressão nuclear da β catenina e estadiamento patológico dos adenocarcinomas	96
4.5.2.4.	Relação da expressão nuclear da β catenina, metástases e evolução	97
4.5.2.5.	Expressão nuclear da β catenina nos grupos dos adenomas, lesões serrilhadas e controle	98
4.5.2.6.	Relação da expressão imunoistoquímica da β catenina nuclear e p53	98
4.6.	ANÁLISE DAS VIAS DE INVASÃO COM ÊNFASE A AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS METALOPROTEINASES (MMP) 2 E 9, SUAS RELAÇÕES COM NF-κB, ESTADIAMENTO PATOLÓGICO E METÁSTASES	99
4.6.1.	Expressão imunoistoquímica das MMPs 2 e 9 nas populações de estudo	99
4.6.2.	Correlação entre a expressão imunoistoquímica das MMPs 2 e 9 e o estadiamento patológico baseado no sistema TNM	102
4.6.3.	Correlação entre a expressão imunoistoquímica das MMPs 2 e 9, metástases e evolução	103
4.6.4.	Relação da expressão imunoistoquímica das MMPs 2 e 9 com NF- κ B	104

4.7.	ANÁLISE DA ANGIOGÊNESE ATRAVÉS DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO VEGF E SUAS CORRELAÇÕES COM PRESENÇA DE METÁSTASES, MMPS 2 E 9, P53 E NF-KB	105
4.7.1.	Expressão imunoistoquímica do VEGF nas populações de estudo	105
4.7.2.	Correlação das expressões imunoistoquímicas do VEGF e a presença de metástases e evolução	107
4.7.3.	Correlação das expressões imunoistoquímicas do VEGF e MMPs	107
4.7.4.	Correlação das expressões imunoistoquímicas do VEGF e p53	108
4.7.5.	Correlação das expressões imunoistoquímicas do VEGF e NF-KB	109
5.	DISCUSSÃO	111
6.	CONCLUSÕES	130
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
	ANEXOS	154

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

O câncer de cólon e reto (CCR) configura-se como a terceira causa mais comum de câncer no homem (663.000 casos, 10% do total), e o segundo em mulheres (570.000 casos, 9,4% do total) em todo o mundo, sendo a segunda causa em países desenvolvidos. Os padrões geográficos são bem similares entre homens e mulheres (1,4:1), porém o câncer de reto é cerca de 20% a 50% mais frequente em homens na maioria das populações (Figura 1) (FERLAY et al., 2010; INCA,2012).

Figura 1. - Taxas de incidência do câncer colorretal padronizada por idade, por sexo e distribuição mundial. Fonte: Adaptado GLOBOCAN, 2008.

A sobrevida média global em cinco anos se encontra em torno de 55% nos países desenvolvidos e 40% para países em desenvolvimento. O número de casos novos de câncer de cólon e reto estimados para o Brasil no biênio de 2012/2013 será de 14.180 casos em homens e de 15.960 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 15 casos novos a cada 100 mil homens e 16 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2012).

Excetuando os tumores de pele não melanoma, o câncer de cólon e reto em homens é o segundo mais frequente na região Sudeste (22/100.000) e o terceiro nas regiões Sul (18/100.000) e Centro-Oeste (14/100.000). Na região Norte (4/100.000) ocupa a quarta posição, no Nordeste (5/100.000), a quinta (Figura 2). Para as mulheres, é o segundo mais

frequente nas regiões Sul (20/100.000) e Sudeste (23/100.000); o terceiro nas regiões Centro-oeste (15/100.000) e Nordeste (7/100.000), e o sexto na região Norte (5/100.000) (Figura 3) (INCA, 2012).

Figura 2. - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o biênio de 2012/2013, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do cólon e reto). Fonte: Adaptado: INCA, 2012.

Figura 3. - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100mil mulheres, estimadas para o biênio de 2012/2013, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna de cólon). Fonte: Adaptado INCA, 2012.

1.2 ETIOLOGIA E PATOGÊNESE

1.2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

1.2.1.1 História familiar

A história familiar de câncer de cólon e reto e a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino configuram como importantes fatores de risco para o desenvolvimento do câncer colorretal (INCA, 2012).

1.2.1.2 Fatores nutricionais

Os fatores nutricionais implicados na neoplasia colorretal são dietas ricas em gordura animal; baixa ingestão de frutas, vegetais e fibras; alta ingestão calórica; obesidade, sedentarismo; fumo e álcool (POLYDORIDES, 2010).

1.2.1.3 Doenças inflamatórias crônicas

São importantes fatores etiológicos no desenvolvimento do CCR.

1.2.1.3.1 Retocolite ulcerativa (RCU)

Doença inflamatória crônica de etiologia desconhecida, considerada uma desordem cuja duração e extensão são os maiores fatores de risco para o desenvolvimento do CCR. É descrito um risco de 30% de desenvolvimento de CCR em pacientes com pancolite, cuja doença inflamatória iniciou-se antes dos 15 anos de idade e com mais de 30 anos de evolução (HAMILTON et al., 2010).

CCRs associados à RCU são frequentemente múltiplos, planos, infiltrativos e mucinosos ou do tipo células em anel-de-sinete.

As alterações moleculares no CCR esporádico e o relacionado à RCU são similares, diferindo na frequência e sequência: a mutação *APC* ocorre tardiamente e a mutação *TP53* precocemente no CCR relacionado à RCU (HAMILTON et al., 2010).

1.2.1.3.2 Doença de Crohn

O risco de desenvolvimento do CCR nesta população é cerca de três vezes maior quando comparado à população controle. A longa duração e o início em fase precoce da vida são fatores de risco para o desenvolvimento do CCR, assim como na RCU.

As características moleculares são similares as da RCU (HAMILTON et al., 2010).

1.2.2 MECANISMOS E VIAS GENÉTICAS

O carcinoma colorretal é uma doença geneticamente heterogênea e complexa, apresentando, assim como os seus precursores patológicos, características moleculares, patológicas e história natural distintas. Pode ser dividido em dois grandes grupos: 1) esporádico (não hereditário), que corresponde à maioria dos casos (80%- 85%) e desenvolve-se em indivíduos sem história familiar; 2) familiar (hereditário), correspondendo a 15%-20% dos casos e inclui: A- polipose adenomatosa familiar (PAF), de herança autossômica dominante; B- síndrome de câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC ou Síndrome de Lynch) (NOGUEIRA et al., 2006; FELIN et al., 2008).

As grandes vias moleculares envolvidas no desenvolvimento do CCR são: A- Instabilidade cromossômica (CIN) presente em 85% dos casos de CCRs esporádicos; B- Instabilidade de microssatélites (MSI); C- Deficiência de reparo do DNA do tipo excisão de base associada ao gene *MYH* (mut *Y* *homologue*); e D- Via fenótipo metilador das ilhotas CpG (CIMP) (WORTHLEY; LEGGETT, 2010; TAKAYAMA et al., 2006; ROCHA; DUQUE, 2010).

No grupo familiar, as vias principais da carcinogênese são: A- Via de instabilidade cromossômica que ocorre na PAF caracterizada pela herança de uma mutação do gene supressor tumoral *APC* (gene da polipose adenomatosa colônica) e B- Via da hipermutabilidade do DNA causada pela mutação germinativa em um dos genes de reparo do DNA (FELIN et al., 2008).

1.2.2.1.1 Vias de instabilidade genômica

Independentemente da via de base, alterações genéticas múltiplas e sequenciais devem ocorrer para o câncer se desenvolver. A instabilidade genômica é um processo fundamental para o desenvolvimento do CCR, produzindo e perpetuando mutações, e acelerando o processo evolutivo neoplásico (WORTHLEY; LEGGETT, 2010; ROCHA; DUQUE, 2010).

1.2.2.1.2 Instabilidade cromossômica (CIN)

FEARON & VOGELSTEIN (1990) propuseram um modelo genético onde foi analisada a variação da expressão gênica na seqüência adenoma-carcinoma, responsável pela maioria dos casos de CCR esporádico e da polipose adenomatosa familiar (WILMINK, 1997). Neste modelo, as mutações no gene *APC* ocorreriam inicialmente durante o desenvolvimento de adenoma, mutações *KRAS* apareceriam durante o estágio intermediário, e mutações do p53 e deleções no cromossomo 18q ocorreriam concomitantemente durante a transição para a malignidade (Figura 4). Esta via é caracterizada por perdas alélicas nos cromossomos 5q (*APC*), 17p (*P53*), e 18q (*DCC/SMAD4*), sendo denominada instabilidade cromossômica (CIN) (Figura 4). As CINs ocorrem em aproximadamente 70%-85% dos CCRs esporádicos, principalmente nas lesões avançadas (TAKAYAMA et al., 2006; FERREIRA, 2009; WORTHLEY; LEGGETT, 2010; ROCHA; DUQUE, 2010).

Figura 4. - Modelo genético do Câncer Colorretal (CCR).

- a:** A maioria dos CCRs se origina de pólipos adenomatosos em um período de anos ou décadas. Há indicações de que alterações genéticas somáticas seletivas e hereditárias sejam à base da iniciação e da progressão do tumor. Embora a ordem na qual os defeitos surjam não seja invariável, as mutações mostram uma forte associação com determinados estágios da tumorigênese.
- b:** Em aproximadamente 15% dos CCR, a função de reparo de DNA (MMR) está inativada por mutações somáticas ou por inativação epigenética, levando a instabilidade de microssatélites de alta frequência (MSI-H). Inativação mutacional somática dos genes MMR é mais comumente observada com segundo "hit" em pacientes portadores de mutações germinativas em genes MMR e naqueles tumores relacionados à HNPCC. Inativação epigenética dos genes MMR comumente afeta a hipermetilação do promotor *MLH1*. Esses tumores muitas vezes inicialmente apresentam-se como adenomas serrilhados sésseis (ASS) e mostram hipermetilação de numerosos genes (fenótipo metilador das ilhotas CpG (CIMP)) e mutações *BRAF*. Em tumores esporádicos MSI-H e familiar, a inativação de genes (por exemplo, *TGFβIIIR*, *BAX*) que codificam seqüências contêm elementos repetitivos (microssatélites) que podem contribuir para a progressão tumoral (Adaptado: FEARON, 2011).

1.2.2.1.1.1 Gene supressor tumoral APC/ β catenina

A proteína *APC* está ligada a processos de adesão celular, migração celular, apoptose e regulação da β catenina. A β catenina é uma proteína celular de 92-KDa, vital para sinalização e adesão celular, está presente em diferentes localizações intracelulares associadas a funções distintas. Quando ligada a membrana celular, é parte de junções de aderência que são necessárias para manutenção de adesão homotípica célula-célula (ligada ao complexo E-

caderina e α catenina), atuando na inibição da invasão por sua ação sobre a E-caderina. Quando localizada no núcleo, interage com proteínas de ligação do DNA da família TCF/LEF (*T-cell fator / lymphoid enhancer factor*) e atua como ativador de transcrição na sinalização Wnt (*Wingless e Integrase-1*) (HORST et al., 2009). No citoplasma pode ser encontrada livre no citosol ou ligada ao produto do gene *APC*. Suas maiores funções estão relacionadas à adesão celular e mediação da via de transdução sinalizadora Wnt / β catenina (KOBAYASHI et al., 2000; MI et al., 2009; NORWOOD et al., 2010).

Mutações do gene *APC*, principal mecanismo que leva a alteração da regulação da β catenina, tem sido descrito em aproximadamente 70% a 80% dos casos de CCR. A incapacidade da regulação da β catenina gera seu acúmulo no citoplasma, com migração para o núcleo e formação de complexos com fatores de transcrição da família TCF/LEF e posterior ativação de genes-alvo (c-MYC e ciclina D1, relacionados à proliferação e ao crescimento celular; Metaloproteinase 7 relacionada aos mecanismos de invasão e metástases). Nos demais 20% a 25% dos casos em que não se observa mutação do *APC*, notam-se alta frequência de mutação no gene da β catenina, o que confere resistência à regulação pelo *APC*, GSK3 (Glicogênio sintase-quinase 3 beta) e complexo axina, levando ao acúmulo citoplasmático de β catenina com consequente migração nuclear, associação com proteínas de genes da família TCF e ativação dos genes-alvo que atuam na proliferação celular e apoptose (FERREIRA, 2009; KOBAYASHI et al., 2000; HORST et al., 2009; DENG et al., 2002).

Outra importante função da β catenina identificada por DENG et al (2002) refere-se ao seu papel de inibidor do NF- κ B. A β catenina exerce esta função através da interação física com NF- κ B, independente da regulação da I κ B- α e vias de sinalização TCF 4, resultando na redução de ligação DNA NF- κ B e inibição da transativação NF- κ B. A atividade reprimida do NF- κ B é encontrada em células de câncer de cólon humano nas quais a β catenina está ativada. A β catenina ativada inibe a expressão dos genes alvos do NF- κ B, incluindo *Fas* e TRAF1.

A expressão nuclear da β catenina tem sido relacionada a importantes variáveis clinicopatológicas. WANG et al (2011) demonstraram que a superexpressão nuclear da β catenina no fronte invasivo do CCR está associada com estágio avançado e a pouca diferenciação celular tumoral o que também explicaria sua correlação com a presença de metástases hepáticas. MÅRTENSSON et al. (2007) relacionaram a expressão da β catenina a instabilidade genética e ao prognóstico no CCR. Concluíram que CCRs com instabilidade cromossômica (CIN) estão frequentemente associados com alta expressão da β catenina

nuclear, aneuploidia DNA e expressão anormal do p53, enquanto baixa ou ausência de expressão da β catenina nuclear, expressão normal do p53 parecem ocorrer em CCRs com instabilidade de microssatélites (MSI). Com relação ao prognóstico, observaram que o estágio tumoral B de Dukes associado à alta expressão nuclear da β catenina se relacionam ao pior prognóstico.

1.2.2.1.1.2 KRAS

KRAS (12p12) é o outro importante gene na via CIN. Mutações têm sido encontradas em 35%-42% dos CCRs e em números similares nos adenomas avançados (WORTHLEY; LEGGETT, 2010). A maioria das mutações do *KRAS* ocorre como uma mutação de ponto de ativação em códons 12, 13 e 64. Esta proteína mutante ativa vias efetoras, incluindo *RAF/MAPK*, *JNK*, e *fosfatidilinositol-3-Kinase (PI3-K)*, levando a promoção de crescimento constitutivo. Alguns genes-alvo do *KRAS* incluem a ciclina D1, DNA metiltransferase, e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (TAKAYAMA et al., 2006).

1.2.2.1.1.3 p53

Localizado no cromossomo 17, o gene *p53* (17p13) é conhecido como guardião do genoma por codificar uma proteína capaz de promover a expressão de genes que bloqueiam o crescimento celular ou que induzem apoptose quando o DNA está lesado (NOGUEIRA et al., 2006). A proteína p53, fosfoproteína de 53 quilodáltons, desempenha papel fundamental na regulação de vias de sinalização que controlam as respostas celulares aos danos do DNA causados por diferentes agentes, podendo levar a uma parada no ciclo celular (*checkpoint* G1/S, embora haja evidências de que exerça função crítica na regulação da transição G2/M) (SILVA, 2010).

Em situações normais, a p53 possui meia vida curta, encontra-se em baixos níveis em tecidos normais que não sofreram dano e esses níveis são mantidos através de mecanismos que garantam sua rápida degradação (SILVA, 2010).

A importância da p53 nas respostas celulares aos danos no DNA se deve ao fato que mutações no seu gene codificador TP53 (*tumour protein 53*) são as alterações genéticas mais encontradas em cânceres humanos. Cerca de 50% dos cânceres humanos possuem mutações

no *TP53* e acredita-se que parte dos 50% restantes, apresente alteração na via do p53 por outros mecanismos (SILVA, 2010).

A perda da heterozigose do p53 geralmente ocorre no período evolutivo de transição entre adenoma e carcinoma colorretal, sendo encontrada em 16% dos adenomas e em 40% a 50% dos carcinomas (TAKAYAMA et al., 2006; NACCARATI et al., 2012).

Em situações de somatória de estresse celular pode ocorrer inativação de p53 com consequente facilitação do crescimento e da aquisição de propriedades invasivas (NOGUEIRA, 2006; FERREIRA, 2009). A p53 mutante pode ser detectada através de métodos imunoistoquímicos (IIQ) por apresentar uma conformação mais resistente à degradação do que a proteína selvagem (não mutante), e sua imunorreatividade tende aumentar com o estágio tumoral. A superexpressão da p53 pode representar um fator preditivo independente de sobrevida em pacientes portadores de CCR linfonodo positivo (SILVA, 2010; FENOGLIO-PREISER et al., 2008; McKAY et al., 2002).

1.2.2.1.1.4 DCC/SMAD (perda da heterozigose do 18q)

Os genes *DCC*, *SMAD2* e *SMAD4* estão localizados no 18q21.1 e a perda alélica neste sítio é encontrada em cerca de 60% dos CCRs. O gene *DDC* (gene deletado no câncer de cólon) está relacionado a uma regulação negativa de crescimento. A mutação de um alelo pode ocasionar a diminuição da expressão e assim comprometer o controle de crescimento celular por alteração da adesão, facilitando a expansão clonal e a progressão tumoral. *SMAD 2* e *SMAD4* estão envolvidos na via de sinalização TGF- β (WORTHLEY;LEGGETT, 2010; TAKAYAMA et al., 2006; FERREIRA, 2009).

1.2.2.1.2 Instabilidade de microssatélites (MSI)

O microssatélite consiste de unidades de cerca de um a quatro nucleotídeos, repetidas em seqüência, dentro do genoma humano. O deslizamento da DNA polimerase durante a replicação do DNA é considerada a principal causa da variação no número de repetições nesses locos (TANNAPFEL et al., 2010; FERREIRA, 2010). Pela sua estrutura repetitiva, os microssatélites são particularmente propensos a erros de reparo. A deficiência de genes

envolvidos no reparo do DNA do tipo mal-pareamento (MMR, DNA *mismatch repair*) caracterizam a instabilidade de microssatélites (ROCHA; DUQUE, 2010). O sistema MMR é composto por, pelo menos, sete proteínas, *MLH1*, *MLH3*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *PMS1* e *PMS2*, que estão associadas a pares específicos para formar heterodímeros funcionais, sendo o *MLH1* e o *MSH2* essenciais para o bom funcionamento do mecanismo de reparo (WORTHLEY; LEGGETT, 2010; TAKAYAMA et al., 2006).

A inativação do mecanismo de reparo do DNA ocorre em 15% dos CCRs ocasionando o acúmulo de mutações somáticas nas células tumorais. Os CCRs com deficiência *MMR* caracterizam-se por instabilidade dos microssatélites, baixa expressão dos genes de *MMR*, cariótipo quase diploide, alta frequência de mutações nos genes *BAX*, *TGFBR2* e *BRAF*, e baixa frequência de mutações em *TP53*, *SMAD4* e *KRAS* (ROCHA; DUQUE, 2010).

A instabilidade de microssatélites tem sido identificada em CCRs associados com a síndrome do câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC), cujos pacientes apresentam como principal característica a perda de função dos genes responsáveis pelo reparo do DNA: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*; e menos frequentemente em *MSH3* e *PMS2*. No entanto, aproximadamente 15% dos CCRs esporádicos também podem apresentar um fenótipo de microssatélite instável (MIN) (TAKAYAMA et al., 2006; ROCHA; DUQUE, 2010; NOGUEIRA et al., 2006).

Muitos CCRs mantêm o sistema MMR eficiente, ou seja, o número de repetições dessa região é o mesmo no tecido tumoral e normal pareados, e são denominados estáveis (MSS, microssatélite estável). Nos tumores instáveis (MIN), os erros de repetição ocorrem nas células mais proliferativas do tumor, resultando em células com números de repetições novas. Genes supressores tumorais com regiões repetitivas mono- e dinucleotídicas, tais como o *TGFBR2* e *BAX* podem ser inativados na deficiência de MMR (ROCHA; DUQUE, 2010).

1.2.2.1.3 Deficiência de reparo do DNA do tipo excisão de base associada ao gene MYH

A deficiência constitutiva de reparo do DNA do tipo excisão de base gera a Síndrome de Polipose associada ao *MYH* (PAM), uma síndrome autossômica recessiva responsável por aproximadamente 0,5% a 1% dos CCRs (NIELSEN et al., 2009). Indivíduos com MAP apresentam mutações bi-alélicas no gene de reparo de excisão de base *MYH*

(mutYhomologue), idade aproximada de 55 anos e múltiplos adenomas colorretais (entre 10 e 100) (POULSEN; BISGAARD, 2008; ROCHA; DUQUE, 2010).

1.2.2.2 Mecanismo epigenético na carcinogênese colônica

Estudos recentes de biologia molecular têm revelado a importância dos mecanismos epigenéticos na carcinogênese colorretal, sendo alguns deles relacionados à metilação do DNA e a modificação das histonas. Regiões ricas em citosina e guanina (CpG) localizadas na sequência de codificação 5'-CpG-3' podem sofrer hipermetilação, levando ao silenciamento dos genes inclusive o *MLH1*. Como consequência do fenótipo metilador genômico, as citosinas metiladas (5-metil-citosina) dos dinucleotídeos 5'-CpG-3' tornam-se alvos preferenciais para a ocorrência de transições C>T e de transversões G>T, gerando mutações somáticas que podem alterar a função dos genes condutores da carcinogênese. Cânceres que apresentam metilação e silenciamento de múltiplos genes são descritos como *CIMP* (*Cpg-island methylator phenotype*) positivos e exibem também como característica a instabilidade de microssatélites (TAKAYAMA et al., 2006; ROCHA; DUQUE, 2010; VAN ENGELAND et al., 2011).

A via CIMP é a segunda via mais comum no CCR esporádico e acontece em aproximadamente 15% desses casos (WORTHLEY; LEGGETT, 2010).

1.2.2.3 Vias de fatores de crescimento

1.2.2.3.1 Regulação aberrante da sinalização da prostaglandina

A ativação de vias de fator de crescimento é comum nos CCRs. A ativação da via da sinalização da prostaglandina é um passo precoce e inicial no desenvolvimento do adenoma. Esta via é induzida pela inflamação ou pela hiperexpressão da COX 2 (ciclooxygenase 2), enzima que atua na síntese da prostaglandina *E2* (*PGE2*). A *PGE2* pode também ser induzida pela perda catalítica das prostaglandinas, a 15-prostaglandina desidrogenase (*15PGDH*) (MARKOWITZ; BERTAGNOLLI, 2009; ROCHA; DUQUE, 2010).

A expressão da COX2 está elevada em aproximadamente dois terços dos CCRs e a perda de *15PGDH* está presente em 80% dos adenomas colorretais e CCRs. Estudos clínicos demonstraram que o uso de antiinflamatórios não hormonais, como inibidores da COX2 e o ácido acetilsalicílico, são capazes de reduzir o volume de adenomas pré-existentes e na prevenção do desenvolvimento de novos adenomas (MARKOWITZ; BERTAGNOLLI, 2009; FERREIRA, 2009; ROCHA; DUQUE, 2010).

1.2.2.3.2 Receptor do fator de crescimento epidérmico

O fator de crescimento epidérmico (EGF) é uma proteína solúvel que tem efeito trófico nas células intestinais. Estudos clínicos têm demonstrado um papel importante de sinalização através do seu receptor EGFR em um subgrupo de CCRs. Este receptor atua na ativação das vias de sinalização da *MAPK* e *PI3K*. Dados recentes têm mostrado que CCRs avançados com mutações ativadoras dessas vias, incluindo mutações de *KRAS*, *BRAF* e da subunidade da *PI3K*, tornam o CCR não responsivo ao tratamento com anti-EGF (MARKOWITZ; BERTAGNOLLI, 2009; ROCHA; DUQUE, 2010).

1.2.2.3.3 Fator de crescimento endotelial vascular

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é produzido em estados de injúria ou durante o crescimento de tecidos normais e induz a produção de novos vasos sanguíneos estromais (angiogênese) (MARKOWITZ; BERTAGNOLLI, 2009; ROCHA; DUQUE, 2010).

A angiogênese é um processo que leva à formação de novos vasos sanguíneos e tem papel central na sobrevivência das células cancerosas, no crescimento primário do tumor, invasão, disseminação hematogênica e metástases (YU et al., 2004, TAKAYAMA et al., 2006, OKITA et al., 2009). A formação maciça de vasos sanguíneos no sítio primário do tumor aumenta a possibilidade de disseminação hematogênica tumoral. Portanto, a densidade microvascular (DMV) é considerada um fator de influência na metastatização e consequentemente de prognóstico em vários cânceres humanos (YU et al., 2004). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seu receptor (VEGF-R) representam importantes reguladores da angiogênese (OKITA et al., 2009; TAKAYAMA et al., 2006).

1.3 LESÕES PRECURSORAS

A história natural do CCR tem sido extensamente investigada em relação ao acúmulo de alterações genéticas.

1.3.1 FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES (FCA)

Focos de criptas aberrantes são os precursores morfológicos iniciais da neoplasia epitelial, originalmente descritos em modelos experimentais de câncer colorretal em animais. FCA tem sido proposto como biomarcadores intermediários em estudos de carcinogênese (FENOGLIO-PREISER et al., 2008). Caracterizam-se por apresentar desde uma glândula alterada até agrupamentos em placas de criptas anormais que apresentam: A- abertura luminal alterada; B- espessamento epitelial; e C- por serem maiores que as criptas normais adjacentes cerca de três vezes em diâmetro, com lúmen oval ou em fenda (TANAKA, 2009). Microscopicamente são encontrados dois tipos principais: FCA com características semelhantes a pólipos hiperplásicos e com alta frequência de mutações em protooncogenes *Ras*; e FCA displásica (micro-adenomas) associados com a mutação do gene *APC* (HAMILTON et al., 2010; FENOGLIO-PREISER et al., 2008).

1.3.2 ADENOMAS COLORRETAIS (PÓLIPOS ADENOMATOSOS)

Essas lesões precursoras apresentam por definição epitélio displásico (neoplasia intra-epitelial - NIE). A displasia pode ser de baixo e alto grau dependendo do grau de complexidade arquitetural, extensão da estratificação nuclear e severidade da morfologia anormal nuclear. Focos de crescimento invasivo podem ser encontrados em adenomas com displasia de alto grau podendo representar áreas de carcinoma intramucoso e de carcinoma invasivo (HAMILTON et al., 2010; FENOGLIO-PREISER et al., 2008).

A porcentagem de adenomas contendo displasia de alto grau aumenta significativamente com o aumento do tamanho da lesão, arquitetura vilosa, multiplicidade de lesões e em indivíduos com mais de 60 anos de idade (Figura 5). O “*odds ratio*” para displasia de alto grau é de 20 para adenomas maiores que 1cm e em adenomas que contem um componente viloso maior que 75%. A incidência deste tipo de displasia em pacientes com

adenoma tubular isolado, adenomas tubulares múltiplos, adenoma viloso isolado e adenomas vilosos múltiplos é de 2,8%, 4,6%, 16% e 22% respectivamente (FENOGLIO-PREISER et al., 2008).

Figura 5. - Frequência de adenocarcinomas em adenomas relacionada ao tamanho e arquitetura da lesão (Adaptado: HAMILTON et al., 2010).

1.3.2.1 Características histológicas

Os adenomas podem exibir diferentes padrões de crescimento histológico sendo eles: tubulares, túbulo-vilosos e vilosos.

Os adenomas tubulares são os mais comuns, representando 68% a 87,1% dos adenomas e com dimensão inferior a 1 cm em aproximadamente 90% dos casos (TANNAPFEL et al., 2010). Exibem como característica a manutenção da arquitetura original das criptas colônicas, embora sejam revestidas por um epitélio displásico que substitui o epitélio colônico normal (FENOGLIO-PREISER et al., 2008).

Os adenomas vilosos compreendem aproximadamente a 5% dos adenomas e exibem projeções frondosas de epitélio displásico do tipo “dedo de luva” recobrimdo pequena porção de lamina própria. A porção vilosa deve representar pelo menos 80% da sua estrutura total (LANZA et al., 2011; TANNAPFEL et al., 2010; FENOGLIO-PREISER et al., 2008). Cerca de 30% dessas lesões exibem displasia de alto grau e em 2% dos casos há câncer associado (GREENSON et al., 2010).

Os adenomas túbulo-vilosos representam 10% a 25% dos adenomas e apresentam a associação dos padrões de crescimento tubular e viloso com componente viloso compreendendo de 20-25% a 75-80% da estrutura total da lesão (POLYDORIDES, 2010).

1.3.3 LESÕES SERRILHADAS

Os pólipos epiteliais do cólon e reto eram classificados como lesões não neoplásicas (por exemplo, pólipos hiperplásicos) e lesões neoplásicas (adenomas). A característica distinta era a presença de displasia citológica ou neoplasia intra-epitelial (NIE), que era considerada condição obrigatória para o diagnóstico de adenoma (AUST; BARETTON, 2010).

Ao longo dos últimos anos tem se demonstrado que lesões serrilhadas/pólipos hiperplásicos sem a presença de NIE são, de fato, proliferações clonais epiteliais com alterações genéticas subjacentes principalmente *KRAS* e *BRAF*. Além disso, tem se observado que a descamação normal do epitélio, induzida por uma forma especial de apoptose (“*anoikis*” – apoptose induzida pela falta da adesão celular ou por adesão celular imprópria), está bloqueada nos pólipos hiperplásicos e nos adenomas serrilhados. Aparentemente, esta inibição está mediada por *RAS* ou *RAF* ativado/mutante. Logo, a morfologia serrilhada característica das criptas pode ser explicada pela retenção de grande número de células epiteliais com “*anoikis*” defeituosa (AUST; BARETTON, 2010; SNOVER, 2011).

As lesões serrilhadas representam uma complexa família de lesões que exibem mutações específicas e graus diversos de metilação. Os cânceres serrilhados correspondem a 10%-20% de todos os CCR e mais de 30% dos cânceres intervalo (*interval cancer*) (TERDIMAN; McQUAID, 2010).

A classificação das lesões serrilhadas baseia-se nas suas características arquiteturais, celulares e na presença de displasia (SNOVER, 2011; SNOVER et al., 2010) (Tabela 1).

Tabela 1. - Classificação das lesões serrilhadas do intestino grosso (SNOVER, 2011; SNOVER et al., 2010).

Pólipo Hiperplásico
• Tipo Microvesicular
• Tipo rico em células caliciformes
• Tipo pobre em mucina
Adenoma/Pólipo Serrilhado Sésil
• Sem Displasia citológica
• Com Displasia citológica
Adenoma Serrilhado Tradicional
• Sem Displasia Convencional
• Com Displasia Convencional

1.3.3.1 Pólipos hiperplásicos (PH)

Pólipos hiperplásicos são as lesões serrilhadas mais comuns (80%-90%). Estão localizados principalmente no cólon esquerdo (sigmoide) e reto e geralmente tem diâmetro inferior a 5 mm. O risco de malignização para pequenas lesões localizadas distalmente é muito baixo, porém tem sido demonstrado que lesões maiores que 10 mm e situadas no cólon proximal podem progredir para um carcinoma colorretal, além de serem consideradas precursoras de adenomas serrilhados tradicionais ou adenomas serrilhados sésseis (TANNAPFEL et al., 2010; AUST; BARETTON, 2010; LANZA et al., 2011).

1.3.3.2 Adenoma serrilhado tradicional (AST)

É a variante serrilhada mais rara, ocorrendo em aproximadamente 1% de todos os casos de adenomas colorretais e estão localizados principalmente no cólon esquerdo ou reto. Microscopicamente apresentam a arquitetura dos pólipos hiperplásicos com NIE dos adenomas clássicos (90% displasia de baixo grau e 10% displasia de alto grau). Caracterizam-se por exibir alta frequência de mutações *KRAS* (TANNAPFEL et al., 2010; AUST; BARETTON, 2010).

1.3.3.3 Adenoma serrilhado séssil (ASS)

É o segundo tipo mais comum de lesão serrilhada com frequência de 15%-20%. Macroscopicamente, são lesões sésseis ou levemente elevadas, maiores que 5mm e localizadas no cólon direito. O diagnóstico diferencial deve ser feito com pólipos hiperplásicos, cujos critérios diferenciais baseiam-se na ramificação da lesão (formato L e T) na base da cripta, tipo de serrilhado, dilatação de criptas (angular) e ocasional inversão de criptas estendendo sob a *muscularis mucosae* (TANNAPFEL et al., 2010; AUST; BARETTON, 2010).

1.3.3.4 Pólipo misto (PM)

Esses pólipos exibem um ou mais componentes serrilhados (HP, ASS, AST) associado e/ou entremeados com componente adenomatosos clássicos (tubulares, túbulo-vilosos e vilosos) (LANZA et al., 2011).

1.3.4 PÓLIPOS JUVENIS

Pólipos juvenis esporádicos são considerados lesões hamartomatosas e comumente ocorrem na infância. Neoplasia intra-epitelial (displasia) é rara neste tipo de lesão, porém o risco maior de desenvolvimento de CCR ocorre em pacientes portadores da Síndrome da polipose juvenil (HAMILTON et al., 2010).

1.4 CRESCIMENTO CELULAR, INVASÃO E METÁSTASES

O paradigma da invasão e metástases do CCR consiste em uma série complexa de passos, incluindo a disseminação e crescimento celular, proteólise da matriz extracelular local (ECM), adesão e angiogênese, (TAKAYAMA et al., 2006).

1.4.1 NF-KB

O fator nuclear da cadeia “Kappa” de linfócitos B (NF-KB) é um fator de transcrição pleiotrópico que tem importante papel no controle da proliferação celular, apoptose e consequentemente na oncogênese. O NF-KB é um dímero das proteínas Rel, composto por cinco diferentes subunidades, denominadas p65 (RelA), Rel B, c-Rel, p50 e p52 (WAJANT; SCHEURICH, 2011). Em condições de repouso, o dímero NF-KB permanece no citoplasma, sequestrado por uma proteína inibitória denominada KB (I K B) que impede a sua entrada no núcleo. Quando a célula é ativada por diferentes estímulos, a proteína IKB é fosforilada e degrada rapidamente. A forma livre do NF-KB é translocada para o núcleo e liga-se a um potencializador intrínico de genes alvo para induzir a transcrição do gene (YU et al., 2004).

As principais vias de sinalização do NF- κ B são: a clássica (canônica), alternativa (não canônica) e atípica. A via clássica ou canônica é a mais comum e está associada à expressão de genes relacionados à inflamação, à antiapoptose, à sobrevivência celular e à resposta imunológica inata (FRANCO, 2010). Envolve predominantemente a ativação do p50, p65 (Rel A) e c-Rel contendo dímeros de NF- κ B, por degradação do complexo IKK (complexo proteína quinase de I κ B) (VLANTIS; PASPARAKIS, 2010). Assim, a fosforilação e a degradação do I κ B são necessárias para que ocorra a translocação do NF- κ B. A fosforilação do I κ B ocorre pela ação de proteínas quinase específicas, como o complexo I κ B quinase (IKK), que contém duas subunidades catalíticas a IKK α e a IKK β ; e uma subunidade não catalítica denominada NEMO (NF- κ B *essencial modulator*), considerada uma subunidade regulatória do complexo IKK que possui um domínio MOD (*minimal oligomerization domain*) e um domínio de ligação à ubiquitina UBD (*ubiquitin-binding domain*) associado ao MOD, essencial para a ativação do processo. Há várias combinações entre as subunidades do IKK, podendo ser homo ou heterodímeros IKK α ou IKK β , associados ou não ao NEMO, sendo o mais comumente observado IKK α -IKK β -NEMO (FRANCO, 2010).

A proteína I κ B fosforilada recebe a adição de ubiquitina, pela ação da ubiquitina ligase, sendo degradada pelo complexo proteossoma 26S. Isso leva a liberação do NF- κ B. O I κ B α e o I κ B β ligam-se ao p50, tornando a sequência localizadora de núcleo inacessível, impedindo a sua translocação. O desmembramento do complexo I κ B/NF- κ B permite o deslocamento do NF- κ B para o núcleo, com subsequente ligação do NF- κ B aos genes que apresentam a sequência regulatória GGGACTTTCC junto à região promotora, ocasionando a um aumento na expressão do gene alvo (GLEZER et al., 2000; DELLA PORTA, 2011; VLANTIS; PASPARAKIS, 2010).

A via não-canônica (alternativa) é ativada pelo conjunto de receptores da família TNF que incluem receptores de linfotóxina β (LT β R), BAFF (*B cell-activating factor receptor*), RANK (*receptor activator of NF κ B*) e CD40L. A ativação é intermediada pela quinase NIK (NF- κ B *inducing Kinase*) que sinaliza para o IKK α fosforilar a p100 associada à RelB (FRANCO, 2010). O processamento do p100 é induzido pela fosforilação de duas serinas específicas localizadas na região do terminal-C da proteína, Ser 866 e Ser 870, que tem como alvo moléculas para ubiquitinação e degradação proteossômica do domínio inibitório, produzindo a forma processada do p52. O dímero formado p52/Rel B desloca-se para o núcleo, ativando a transcrição de conjuntos distintos de genes alvos (FRANCO, 2010; VLANTIS; PASPARAKIS, 2010).

A via atípica é desencadeada pelo reconhecimento do DNA lesado, decorrente de condições tais como por irradiação ultravioleta, situações de stress entre outras. Esses estímulos induziriam a fosforilação do IKB através de um mecanismo independente do complexo IKK, dissociando-se do NF- κ B não através da degradação do proteossoma. As subunidades ativadas na via atípica são as mesmas da clássica, p50/RelA, que atuam no controle de genes inflamatórios, genes envolvidos no reparo do DNA e antioxidantes, importantes principalmente nas doenças inflamatórias crônicas (Figura 6) (CECON; 2010, DELLA PORTA, 2011; KRIETE; MAYO, 2009).

Figura 6. - Vias de sinalização do NF- κ B: Canônico (clássico); Dano induzido ao DNA e não canônico. **Siglas:** P= sítios de fosforilação, Ub= sítios de ubiquitinação (Adaptado: SCHMITZ et al., 2004).

Estudos recentes têm demonstrado que NF- κ B/RelA está também envolvido na angiogênese tumoral de várias neoplasias malignas (HUANG et al., 2001). Além disso, estudos de expressão gênica têm identificado que alvos de transcrição NF- κ B são suscetíveis a promover fenótipo oncogênico (BASSÈRES; BALDWIN, 2006) (Figura 7).

Figura 7. - Representação de alvos NF-κB dependentes envolvidos nos diferentes aspectos da oncogênese (Adaptado: BASSÈRES; BALDWIN, 2006).

A ativação do NF-κB está associada com CCR (KARIN et al., 2002), sendo detectado aumento de sua atividade em linhagens de células procedentes de cânceres colônicos e amostras de tumores humanos, assim como, em núcleos de macrófagos estromais em pólipos adenomatosos (HARDWICK et al., 2001).

A ativação constitutiva do NF-κB é frequentemente observada no CCR e tem papel chave na angiogênese e antiapoptose, promovendo o crescimento tumoral (SAKAMOTO et al., 2009).

1.4.1.1 Alvos moleculares relacionados ao NF-κB

1.4.1.1.1 Sobrevivência Celular - Survivina

NF-κB é capaz de regular a transcrição de diferentes genes anti-apoptóticos, incluindo PIAs (proteínas inibidoras de apoptose), Bcl2 e BclX (MARSONI; DAMIA, 2004).

As PIAs são uma família de inibidores moleculares de apoptose, codificados por genes presentes em mamíferos e filogeneticamente conservadas. Exercem sua função anti-apoptótica através da inibição ou promoção da degradação das caspases efetoras 3 e 7, e intervindo na atividade da caspase iniciadora 9. A principal característica molecular das PIAs é a presença de 1 ou mais inibidores de domínios apoptose (*baculovirus IAP repeat* [BIR] domains) e incluem sete diferentes membros da família PIA: NAIP, XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2, livina, TsIAP (ILP-2) e survivina (DE OLIVEIRA LIMA et al., 2009; FERREIRA, 2007).

A survivina, menor membro da família PIA, é uma proteína citoplasmática multifuncional constituída por 142 aminoácidos, com peso molecular de 16.5 kDa, codificada por um gene localizado na posição telomérica 17q25, implicada no controle da proliferação celular, inibição da apoptose e na promoção da angiogênese. Inibe a atividade da caspase 3 e 7, regula o ciclo celular nas fases G2 e M na organização dos fusos mitóticos e pode desempenhar ainda um papel na mediação das funções da via Wnt/ β catenina no processo de apoptose (PAVLIDOU et al., 2011; FERREIRA, 2007; HUANG et al., 2006; KIM et al., 2003).

Está presente durante o desenvolvimento embrionário e fetal, indetectável em tecidos adultos normais, exceto no testículo, timo e placenta; no entanto, está super expressa em uma variedade de cânceres (pulmão, cólon, pâncreas, próstata, mama e linfoma não Hodgkin entre outros) e está associada a fatores de riscos de recorrência e de pior prognóstico (DE OLIVEIRA LIMA et al., 2009; FERREIRA, 2007; PAVLIDOU et al., 2011; XIAOYUAN et al., 2010).

Seis isoformas da survivina foram descritas:

- Tipo selvagem (*wild type*) - localização citoplasmática;
- Survivina-deltaEx3- atua como inibidor da apoptose assim como a tipo selvagem, localização nuclear;
- Survivina-2b - apresenta função pró-apoptótica por dimerização com a do tipo selvagem, reduzindo o efeito anti-apoptótico da selvagem, localização citoplasmática;
- Survivina-3b;
- Survivina-2a - altamente expressa em células malignas e atenua os efeitos anti-apoptóticos da selvagem;
- Survivina-2b+32- recentemente descrita (PAVLIDOU et al., 2011).

A desregulação da expressão da survivina nas neoplasias se dá por diversos mecanismos moleculares que incluem alteração no fator de transcrição NF- κ B, perda da função do p53, alteração na via RB/E2F, amplificação do locus 17q25 (neuroblastoma), desmetilação do exon 1 da survivina (câncer de ovário) (FERREIRA, 2007; SCHUSSEL, 2007; JIANG et al., 2004).

Esta desregulação pode ainda ser mediada pela TCF/ β catenina que altera o equilíbrio entre a proliferação/diferenciação celular e apoptose que caracteriza o ciclo de vida dos enterócitos, impondo um fenótipo embrionário *stem-cell like* que ao expandir o

compartimento celular leva a formação do adenoma viloso inicial. A desregulação da expressão do gene TCF-dependente se inicia quando o cofator β catenina torna-se aberrantemente estabilizado e evade do processo de controle. A desregulação da β catenina resulta da mutação em sítios de fosforilação do glicogênio sintase quinase-3 β ou deleções na proteína APC, presente em muitos cânceres colorretais (van de WETERING et al., 2002; BIENZ; CLEVERS, 2000; SCHUSSEL, 2007; KIM et al., 2003).

Estudos têm demonstrado que a expressão da survivina é evento essencial no estágio inicial da carcinogênese colorretal e tem papel importante na transição adenoma-carcinoma (KAWASAKI et al., 2001; HERNANDEZ et al., 2011), sendo detectadas taxas de positividade de 31,7% em adenomas com displasia de baixo grau, 56,7% nos adenomas de alto grau e 63,2% nos adenocarcinomas (LIN et al., 2003).

1.4.1.1.2 Inflamação - Fator de Necrose Tumoral (TNF)

Somente pequena população de células tumorais instalada em órgãos distantes tem capacidade para sobreviver, crescer e esquivar-se do sistema imune. Muitos fatores moleculares estão envolvidos neste processo (TAKAYAMA et al., 2006). *Fas-Ligand* (proteína trans-membrana) e *TRAIL* (*tumor necrosis-related apoptosis-inducing ligand*), membros da família TNF (fator de necrose tumoral- agente apoptogênico), são moléculas efetoras da citotoxicidade mediada por células que participam da resposta imune contra células neoplásicas. Portanto, a resistência de células tumorais a apoptose induzida pela atividade de ligantes (por exemplo, *TRAIL*) pode contribuir para o escape do sistema imune (GRIMM et al., 2010).

O TNF é um importante mediador de apoptose, bem como da inflamação e imunidade, estando implicado na patogênese de um largo espectro de doenças humanas, incluindo a sepse, diabetes, osteoporose, esclerose múltipla, artrite reumatoide e doença inflamatória intestinal. A sua ligação aos seus receptores leva a várias respostas celulares incluindo morte celular programada, sobrevivência celular, diferenciação celular, proliferação e ativação de funções imunes (VLANTIS; PASPARAKIS, 2010).

A interação do TNF ao TNFR1 ativa vias sinalizadoras que ativarão os fatores de transcrição nuclear NF-KB e JNK/AP-1, que ativarão diferentes genes (SESSO, 2010; CHEN; GOEDDEL, 2002).

A ativação do fator de transcrição nuclear NF-KB é a vertente de maior importância consequente da ativação do TNFR1, por ter potencial de acionar várias vias sinalizadoras não apoptóticas, regulando a expressão de produtos de vários genes que atuam na sobrevivência celular e por outro lado, quando os genes estão desregulados promovendo disfunção celular que caracteriza um quadro patológico (Figura 8) (SESSO, 2010).

Figura 8. -

Vias de sinalização do receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral - Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) ativa vias de sobrevivência e proliferação juntamente com a via apoptótica através do TNFR1-1. As vias separadas são bem definidas embora o balanço da regulação sobrevivência-morte celular permaneça obscuro. Abreviaturas: APAF-1, *apoptosis protein activating factor 1*; Bcl-2, *B-cell lymphoma 2*; Bid, Bak, Bax, and Bcl-XL, família de proteínas mitocondriais da família Bcl-2; CAD, *caspase-activated DNase*; Caspase-3/8/9, *cysteine aspartase* (protease apoptótica) 3/8/9; Cdc37, co-chaperona da *HSP90*; cIAP, inibidor citoplasmático da apoptose; cFos/cJun, fatores de transcrição; DD, domínio de morte; EndoG, *DNase* mitocondrial; FADD, *Fas-associated DD*; HSP90, *heat shock protein90*; I-CAD, inibidor da CAD; I κ B, inibidor do NF- κ B; IKK α / β , *IKB kinase*; JNK, *cJunn-terminal kinase*; MEKK1, *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-related kinase kinase 1*; MKK3/7, *MAPK kinase 3/7*; NEMO, modulador essencial do NF- κ B; NF- κ B, fator de transcrição nuclear kappa B; NIK, *NF- κ B inducing kinase*; p38MAPK, *p38 mitogen-activated protein kinase*; RIP, receptor interagindo com proteína; SODD, silenciador do DD; sTNFR-1, TNFR1-1 solúvel; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; TNFR1-1, receptor 1 do TNF; TRADD, receptor TNF associado DD; TRAF-2, receptor TNF associado ao fator-2 (Adaptado: VAN HORSSSEN; TENHAGEN; EGGERMONT, 2006).

1.4.1.1.3 Inflamação - Proibitina (PBT)

O gene humano da proibitina (PBT) foi identificado e clonado em 1991, resultado de uma pesquisa investigativa para potenciais supressores tumorais, sendo assim denominado com base em suas atividades antiproliferativas. A PBT é uma proteína ubiquamente expressa, altamente conservada encontrada principalmente na mitocôndria, no núcleo e na membrana plasmática, tendo importante função na estabilidade mitocondrial. No núcleo tem papel significativo como supressor de tumor, podendo inibir a proliferação celular pela repressão direta ou indireta da atividade transcricional do E2F e modular positivamente a atividade transcricional do p53 (Figura 9) (TORTELLI JÚNIOR, 2008; WANG; FALLER, 2008; ARTAL-SANZ; TAVERNARAKIS, 2010; THEISS; SITARAMAN, 2011).

Figura 9. - Modelo simplificado dos papéis da PBT1 na tumorigênese. A localização subcelular da PBT1 pode determinar o seu papel na tumorigênese e no destino da célula. A-Ras ativado interage diretamente com PBT1 ligada à membrana plasmática, causando a ativação do C-Raf. A via Ras-Raf está envolvida no crescimento e transformação celular. B-PBT1 interage com o supressor de tumor Rb no núcleo, suprimindo assim a transcrição mediada pelo E2F. C-PBT1 nuclear interage com p53, resultando na atividade transcricional máxima do p53 e controle do ciclo celular (*check point* p53) (Adaptado: THEISS; SITARAMAN, 2011).

O complexo mitocondrial eucariótico da PBT compreende duas subunidades homólogas, PBT-1 e PBT-2 (proteína 37 associada ao receptor da célula B), com pesos moleculares de 32 e 34 kDa localizadas nos cromossomos 17 (17q21) e 12 (12p13) respectivamente. Compartilham um domínio referido como SPFH (*Stomatin, Prohibitin, Flotillin, HflC/K*) na sua porção amino-terminal, possuindo um domínio transmembrânico. Estudos sugerem que este domínio seja importante para associações com lipídeos e interações proteína-proteína, para formar arcabouços estruturais, podendo atuar através de vias de sinalização do citoesqueleto (ARTAL-SANZ; TAVERNARAKIS, 2010; CZARNECKA et al., 2006; THEISS; SITARAMAN, 2011; TORTELLI JÚNIOR, 2008).

Na mitocôndria, o complexo PBT-1 e PBT-2 localizam-se na membrana interna e tem papel crítico na manutenção da sua função e morfologia, atuando na estabilização de proteínas mitocondriais associadas com a cadeia respiratória, atuando como chaperona mitocondrial (NIJTMANS et al., 2000; TORTELLI JÚNIOR, 2008).

Estudos sugerem ainda que a PBT-1 exerça função relevante no combate ao estresse oxidativo em vários tipos de células. Os níveis de PBT estão diminuídos durante o estresse oxidativo em células epiteliais intestinais. A redução de PBT-1 em células endoteliais aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) na mitocôndria através da diminuição da atividade do complexo I e bloqueio parcial da cadeia de transporte de elétrons. Este aumento de ERO causado pela senescência celular ocasiona subsequentemente, a diminuição da motilidade e migração celular, reduzindo a capacidade angiogênica das células endoteliais (THEISS; SITARAMAN, 2011).

Estudos em células epiteliais intestinais utilizando modelos *in vitro* de estresse oxidativo/inflamação e em modelos *in vivo* de colite indicam que a PBT-1 proteja essas células do estresse oxidativo associado à inflamação e possa modular o processo inflamatório. O fator de necrose tumoral alfa (TNF α), citocina chave que atua na doença inflamatória intestinal (DII), diminui os níveis de PBT *in vivo* e em cultura de células epiteliais intestinais. Esses resultados sugerem que o TNF α possa contribuir para níveis reduzidos de PBT na mucosa de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal (Figura 10) (THEISS; SITARAMAN, 2011).

Figura 10. - Esquema representativo da ação da PBT-1 em células epiteliais intestinais. Na doença inflamatória intestinal, ocorre uma resposta imunológica crônica e exagerada durante a qual células do sistema imune ativadas e células epiteliais intestinais liberam espécies reativas de oxigênio (ERO) e citocinas imunorregulatórias incluindo $\text{TNF}\alpha$. ERO causa estresse oxidativo, levando a aumento da permeabilidade e danos. A função alterada da barreira epitelial permite a translocação de antígeno/bactérias da luz intestinal para a lâmina própria. O $\text{TNF}\alpha$ ativa o fator de transcrição NF- κ B, que pode estimular a sinalização pró-inflamatória e aumentar a permeabilidade. Em células epiteliais intestinais, os níveis de PBT-1 estão reduzidos durante a inflamação. A restauração dos níveis de PBT-1 nessas células inibe o estresse oxidativo e ativação do NF- κ B (Adaptado: THEISS; SITARAMAN, 2011).

THEISS et al. (2009) demonstraram ainda que a expressão aumentada da PBT em células epiteliais intestinais reduz a magnitude e a duração da ativação do NF- κ B através da citocina pró-inflamatória $\text{TNF}\alpha$, via diminuição da expressão da importina $\alpha 3$, proteína envolvida na translocação nuclear do p50/p65. Esses resultados sugerem que o $\text{TNF}\alpha$ regula negativamente a expressão da PBT nas células intestinais, via NF- κ B.

A PBT-1 atua significativamente na regulação da progressão do ciclo celular e pode inibir a replicação do DNA em múltiplos tipos celulares. Seus níveis estão aumentados em cânceres da cérvix uterina, esôfago, estômago, mama, pulmão, bexiga, tireóide, ovário e próstata, e diminuídos em gliomas. Sítios de ligação para a oncoproteína Myc estão presentes no promotor da PBT-1 e, provavelmente, contribuem para aumento dos níveis da PBT-1 em muitos tumores (THEISS et al., 2009; CHEN et al., 2010).

CHEN et al. (2010) detectaram expressão elevada da PBT em tecidos com CCR através dos métodos de Western blot e imunohistoquímica, não sendo observados níveis significativamente elevados em adenomas colorretais, embora a expressão da proteína estivesse aumentada na sequência adenoma-carcinoma no desenvolvimento do CCR. O gene

PBT está localizado no braço longo do cromossomo 17, onde perdas alélicas do CCR esporádico humano são muito frequentes. Logo, a expressão significativamente aumentada da PBT no CCR quando comparada a dos adenomas e do tecido colônico normal, sugere a possibilidade de que a sua expressão possa estar associada ao processo de transformação de adenoma a CCR segundo os autores.

1.4.1.1.4 Invasão e metástases- Metaloproteinases (MMPs)

Proteinases produzidas por células cancerosas ou fibroblastos degradam componentes da matriz extracelular (MEC) e capacitam as células cancerosas a se desconectarem do sítio primário. Dentre os vários tipos de proteinases, as metaloproteinases, parecem exercer efeito dominante. As metaloproteinases de matriz (MMPs) compreendem uma família de endopeptidases zinco-dependentes que consistem de mais de 21 MMPs humanas e numerosas homólogas de outras espécies. Elas podem ser divididas em oito classes estruturais, três das quais ligadas à membrana (TAKAYAMA et al., 2006; EGEBLAD; WERB, 2002).

As MMPs são sintetizadas como zimógenas inativas e ativadas por clivagem de protease. Sua atividade é regulada por inibidores endógenos, incluindo α 2-macroglobulina; inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), pequenas moléculas com domínios *like-TIMP*, e o inibidor *RECK* (proteína indutora da reversão rica em cisteína com domínios Kazal) ligada à membrana (EGEBLAD; WERB, 2002).

MMPs apresentam expressão aumentada em quase todos os tipos de câncer humano, e sua expressão é frequentemente associada com baixa sobrevida. Assim como algumas das MMPs (por exemplo, a MMP 7) são expressas pelas células cancerosas, MMPs (por exemplo, MMP 2 e MMP 9) são sintetizadas por células do estroma tumoral, incluindo fibroblastos, miofibroblastos, células inflamatórias e células endoteliais.

Podem promover a progressão do câncer, aumentando o crescimento de células cancerosas, migração, invasão, metástase e angiogênese. Exercem esses efeitos por meio de clivagem de um diversificado grupo de substratos, que incluem não só os componentes estruturais da matriz extracelular, mas também proteínas de fator de crescimento de ligação, os precursores do fator de crescimento, receptores tirosina quinase, moléculas de adesão da célula e outras proteinases (EGEBLAD; WERB, 2002) (Figura 11).

Figura 11. - Visão Global esquemática do papel das MMPs no Câncer. MMPs degradam componentes estruturais dentro da MEC, facilitando a invasão de células tumorais e metástases e assim liberando fatores de crescimento, citocinas e fatores angiogênicos embutidos na MEC (VEGF, TGF- β , bFGF, IFN- γ etc.). MMPs também geram inibidores da angiogênese, tais como a angiostatina, endostatina e tumstatina. Processam e ativam e inativam moléculas sinalizadoras (citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento) que tem como alvo células do sistema imune (inflamação), células endoteliais (angiogênese) e células tumorais (crescimento celular, sobrevivência, migração, invasão e metástases) Clivagem de moléculas de adesão mediadas pelas MMPs (E caderina, ICAM-1, integrinas etc.) aumentam a migração de células tumorais e invasão ($\neg$ regulação negativa; $\rightarrow$ regulação positiva) (Adaptado: BAUVOIS, 2012).

Têm sido descrito ainda sua relação com o NF- κ B, pela identificação de sítios κ B em promotores de genes que codificam várias MMPs (KARIN et al., 2002). A ativação do NF- κ B poderia contribuir para a destruição da matriz extracelular por células cancerosas (TAKESHITA et al., 1999; WANG et al., 1999; BOND et al., 1998).

A expressão aumentada das MMPs 1, 2, 3, 7 e 9 tem sido encontrada no CCR quando comparados com a mucosa colônica normal e adenomas colorretais. A expressão da MMP 1 tem sido correlacionada com a invasão, metástases e prognóstico. Observou-se expressão aumentada da MMP 2 em CCR com um padrão de crescimento infiltrativo preferencialmente ao expansivo e relacionada a tumores de menor diferenciação celular e metástases hepáticas (ŞURLIN; IONA; PLEŞEA, 2011). DONG et al. (2011) sugeriram que a supressão da MMP 2 possa reduzir os processos de crescimento celular tumoral e de invasão pela regulação da expressão do VEGF e MT1-MMP (metaloproteinase membrana tipo 1). A MMP 3 tem sido relacionada à presença de metástases linfonodais (İŞLEKEL et al. 2007) e a MMP 7 ao estágio de Dukes e maior potencial metastático do CCR. A expressão elevada da MMP 9 em células tumorais têm sido associada à progressão metastática do CCR (ZUZGA et al., 2008) e a presença de invasão perineural (İŞLEKEL et al. 2007).

BARRESI et al (2011) sugeriram que a expressão elevada da MMP 2 e 9 possa ser um indicador útil na identificação de pacientes com alto risco de progressão do CCR.

1.4.1.1.5 Angiogênese - Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

A angiogênese é um processo que leva à formação de novos vasos sanguíneos e tem papel central na sobrevivência das células cancerosas, no crescimento primário do tumor, invasão, disseminação hematogênica e metástases (YU et al., 2004, TAKAYAMA et al., 2006, OKITA et al., 2009).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) regula a angiogênese normal e patológica, ativando múltiplas cadeias de sinalização que promovem o crescimento endotelial, a migração, diferenciação e permeabilidade vascular. A família VEGF de fatores de crescimento angiogênicos e linfangiogênicos compreendem cinco glicoproteínas VEGF (VEGF-A (ou VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E) e dois fatores de crescimento placentário 1 e 2 (PlGF) (WINDER; LENZ, 2010).

A atividade do VEGF é mediada principalmente pela ligação ao receptor VEGF-R2, promovendo a autofosforilação do domínio tirosina quinase do receptor e consequentemente a ativação de cascatas de sinalização intracelular, resultando na proliferação e diferenciação de células endoteliais (GIORDANO; PASQUALINI; ARAP, 2010).

O VEGF-A (VEGF) atua também como um fator anti-apoptótico. Níveis elevados de VEGF têm sido correlacionados com aumento da densidade microvascular, diminuição do índice apoptótico, aumento da incidência de metástases, diminuição da taxa de sobrevida e pior prognóstico (JALBÁ et al., 2011).

A clivagem de proteínas extracelulares pelas MMPs libera o VEGF e a endostatina pela clivagem do colágeno IV, assim como uma mutação no p53 também determina um aumento na sua expressão. No CCR, neoplasias do aparelho respiratório e da mama, as moléculas de ação estromal, como a COX 2, as MMPs, moléculas de adesão e VEGF, aceleram o processo de angiogênese (JOBIM et al., 2008).

O VEGF é expresso em aproximadamente 50% dos CCRs, com mínima ou nenhuma expressão na mucosa colônica normal e adenomas e sua expressão tem sido correlacionada com pior prognóstico (BENDARDAF et al., 2008).

Autores têm sugerido uma possível regulação do VEGF pelo NF- κ B (HUANG et al. 2000; SHIBATA et al., 2002).

Diante do exposto, fica claro que o NF- κ B é um dos fatores de transcrição mais relevantes, em decorrência do seu envolvimento em múltiplos processos celulares no câncer incluindo inflamação, transformação, proliferação, angiogênese, invasão, metástases, quimiorresistência e radiorresistência (CHATURVEDI et al., 2011). A survivina, importante proteína, alvo dependente do NF- κ B no processo de sobrevivência celular, tem sido indicada como um novo expoente no campo terapêutico do CCR (XIAOYUAN et al., 2010). Ambos possuem mecanismos moleculares de ativação e supressão associados e independentes, não completamente elucidados e relações com fatores de transcrição, entre eles, a β catenina e p53, de grande relevância na carcinogênese colorretal.

Considerando-se que cerca de 85% dos CCRs esporádicos (NEUMANN et al., 2012) crescem lentamente a partir de pólipos adenomatosos (seqüência adenoma-carcinoma) e que adenomas com cerca de 1 cm de tamanho tem aproximadamente 10 a 15% de chance de progredir para carcinoma em um período de 10 anos (FEARON, 2011), faz-se necessárias pesquisas aprofundadas no campo da prevenção da doença. Marcadores moleculares que indiquem importantes fases de evolução da doença deverão ser incorporados progressivamente ao exame de rotina diagnóstico histopatológico, propiciando assim, a identificação de indivíduos com risco potencial de desenvolvimento para o CCR e sua inserção em programas de acompanhamento colonoscópico.

Em face disto, este trabalho se justifica pela necessidade de investigação continuada do papel do NF- κ B e da survivina na progressão, no comportamento biológico e prognóstico do CCR, sua relação com fatores de transcrição que atuem na sobrevivência celular, invasão e angiogênese, tão necessários para a disseminação e perpetuação da doença.

Pesquisas no campo do diagnóstico do CCR permitirão a detecção de marcadores moleculares indicadores de progressão neoplásica, prognóstico e a determinação de alvos terapêuticos eficazes, que possibilitarão prevenir a doença e em face dela, aumentar a expectativa e qualidade de vida dos pacientes.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS GERAIS

Avaliara expressão imunoistoquímica do NF- κ B e da Survivina em amostras representativas da seqüência adenoma-carcinoma colorretal e sua relação com alvos moleculares envolvidos na sobrevivência celular, invasão e angiogênese.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Serão avaliadas, em amostras que representem a sequência adenoma-carcinoma colorretal, lesões serrilhadas e amostras teciduais colorretais sem atipias epiteliais e arquiteturais:

- 2.1.1.** A expressão imunoistoquímica do NF- κ B, sua relação com a expressão da survivina, do TNFR1, expressão imunoistoquímica nuclear e citoplasmática da proibitina, e repercussão no processo de apoptose através expressão imunoistoquímica da caspase 3 e Túnel;
- 2.1.2.** A expressão imunoistoquímica da p53, sua relação com expressão da survivina, expressão imunoistoquímica nuclear da proibitina, e repercussão no processo de apoptose;
- 2.1.3.** A expressão imunoistoquímica da β catenina, sua relação com NF- κ B, survivina, p53, correlação da expressão nuclear com estadiamento patológico e à presença de metástases;
- 2.1.4.** A expressão imunoistoquímica de metaloproteinases 2 e 9, associação com o estadiamento patológico dos adenocarcinomas e metástases; relação com a expressão do NF- κ B;
- 2.1.5.** A expressão imunoistoquímica do fator de crescimento endotelial vascular, sua relação com a progressão da doença e à presença de metástases, relação com a expressão imunoistoquímica das metaloproteinases 2 e 9, da p53 e do NF- κ B.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), Processo HCRP N.º 10757/2009.

3.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo retrospectivo baseado na análise histopatológica de 84 casos provenientes de biópsias e ressecções segmentares de lesões colorretais neoplásicas benignas e malignas de pacientes distintos, selecionados aleatoriamente no período de 2000 a 2009, obtidos no arquivo do Serviço de Patologia (SERPAT) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP).

3.2. CASUÍSTICA

3.2.1. DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO A SER ESTUDADA

Foram selecionados setenta e cinco casos de lesões colorretais neoplásicas benignas e malignas provenientes de biópsias e de ressecções segmentares constando de: dezoito casos de adenomas com displasia de alto grau incluindo lesões de padrões tubulares, túbulo-viloso e vilosos; dezoito casos de adenomas com displasia de baixo grau seguindo a mesma metodologia acima descrita; nove casos de lesões serrilhadas; dez casos de adenocarcinoma bem diferenciado; dez casos de adenocarcinoma moderadamente diferenciado; e dez casos de adenocarcinoma pouco diferenciado, escolhidos aleatoriamente no período de 2000 a 2009 no SERPAT do HCFMRP-USP.

Os tecidos provenientes das ressecções cirúrgicas e biópsias colorretais já haviam sido previamente submetidos ao processamento histológico assim como incluídos em parafina, corados pelo método de coloração de Hematoxilina-eosina (H&E), e foram revisados e catalogados segundo os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde baseados na

classificação histológica dos tumores do cólon e reto para lesões epiteliais (HAMILTON et al., 2010).

Para análise comparativa entre as populações foram selecionados nove casos de biópsias colorretais sem atipias epiteliais e arquiteturais catalogados como controle.

3.2.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

3.2.2.1. Adenocarcinomas colorretais

Trinta casos de adenocarcinomas foram selecionados para estudo, baseados no grau de diferenciação celular determinado no percentual de formação glandular identificado nas amostras, sendo subdivididas em bem (> 95% de formação glandular), moderadamente (50% a 95%) e pouco diferenciadas (> 0% a 49%) (HAMILTON et al., 2010).

A população constituiu-se de vinte e um pacientes do sexo masculino e nove do sexo feminino (razão 2,3:1), com idade média e desvio padrão de $63,9 \pm 14,67$ anos.

O estadiamento patológico foi realizado através do sistema de classificação T (tumor primário) N (Linfonodos regionais) M (metástases à distância) (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2010), conforme abaixo discriminado:

- Tumor primário (T)

- TX – Tumor primário não estimado.
- T0 – Não há evidências de tumor primário.
- Tis – Carcinoma *in situ*, intraepitelial ou com invasão da lamina própria (intramucoso).
- T1 – Tumor invade a submucosa.
- T2 – Tumor invade a muscular própria.
- T3 – Tumor invade além da muscular própria para o interior dos tecidos pericólicos.
- T4a – Tumor penetra a superfície do peritônio visceral (inclui invasão de outros órgãos ou outros segmentos colorretais como resultado de extensão direta através da serosa).
- T4b – Tumor invade diretamente ou está aderido a outros órgãos ou estruturas.

- Linfonodos regionais (N)

- NX – Linfonodos regionais não avaliados.
- N0 – Ausência de metástases em linfonodos regionais.
- N1 – Metástases em 1 a 3 linfonodos regionais.
- N1a – Metástases em 1 linfonodo regional.
- N1b – Metástases em 2-3 linfonodos regionais.
- N1c – Tumor depositado na subserosa, mesentério ou em tecidos não peritonizados pericólico ou perirretal sem metástases em linfonodos regionais.
- N2 – Metástases em 4 ou mais linfonodos regionais.
- N2a – Metástases em 4-6 linfonodos regionais.
- N2b – Metástases em 7 ou mais linfonodos regionais.

- Metástases à distância (M)

- M0 – Ausência de metástases à distância.
- M1 – Presença de metástases à distância.
- M 1 a – Metástases confinadas a um órgão ou sítio (fígado, pulmão, ovário, linfonodo não regional).
- M 1 b – Metástases em mais de um órgão/sítio ou peritônio.

A distribuição dos pacientes de acordo com o estadiamento patológico pode ser observada na Tabela 2:

Tabela 2.- Estadiamento patológico dos pacientes portadores de adenocarcinomas segundo sistema TNM (AJCC, 2010).

TNM (n=30)	T (n)	N	M	Dukes
I (n=6)	T1 (n=1)	N0	M0	A
	T2 (n=5)	N0	M0	A
IIA (n=11)	T3	N0	M0	B
IIB (n=5)	T4a	N0	M0	B
IIIA (n=1)	T3 (n=1)	N1	M0	C
IIIB (n=5)	T3(n=4)	N2a	M0	C
	T4a (n=1)	N2a	M0	C
IVA (n=1)	T3	N1	M1a	-
NE (n=1)	----	----	----	-

- NE= não estadiado-

3.2.2.2. Adenomas colorretais

Foram incluídas para o estudo, dezoito amostras de adenomas colorretais com displasia de alto grau e dezoito amostras com displasia de baixo grau, classificadas com base no grau de complexidade arquitetural epitelial, extensão da estratificação e severidade da morfologia nuclear anormal (HAMILTON et al., 2010), e que exibiam os seguintes padrões arquiteturais:

- Tubulares- apresentavam manutenção da arquitetura original das criptas colônicas, revestidas por um epitélio displásico substituindo o epitélio colônico normal, com componente viloso representando 0%-20% da estrutura total da lesão;
- Túbulo-vilosos- mostravam a associação dos padrões de crescimento tubular e viloso, revestidas por um epitélio displásico, com componente viloso representando de 20%-25% a 75%-80% da estrutura total da lesão;
- Vilosos- lesões com predomínio da arquitetura vilosa, representando mais de 80% da estrutura total do adenoma revestidas por um epitélio displásico (FENOGLIO-PREISER et al., 2008; POLYDORIDES, 2010).

As populações de adenomas com displasia de alto e baixo grau constituíram-se por oito homens e dez mulheres (razão 0.8:1), com idade média e desvio padrão de $64,22 \pm 13,38$ anos e $55,05 \pm 13,28$ anos, respectivamente.

3.2.2.3. Lesões serrilhadas

A população constituiu-se por nove casos de lesões serrilhadas de pacientes distintos, sendo cinco do sexo masculino e quatro do sexo feminino, com idade média de 54,33 anos, desvio padrão de 21,24 anos, representados por oito pólipos/adenomas serrilhados sésseis (ASS/P) e um pólipo hiperplásico que exibiam os critérios histológicos abaixo descritos (SNOVER et al., 2010; POLYDORIDES, 2010):

✓ **Pólipos/adenomas serrilhados sésseis**

- Criptas distorcidas, frequentemente dilatadas próximo à base com serrilhado proeminente (com ou sem ramificação);
- Criptas horizontais ou em forma de T invertido ou L;
- Criptas invertidas abaixo da *muscularis mucosae*;
- Maturação invertida das células caliciformes.

✓ **Pólipo hiperplásico**

- Criptas alongadas;
- Serrilhado localizado na metade superior ou terço superior das criptas;
- Núcleos pequenos, uniformes e basais;
- Ausência de atipias citológicas e arquiteturais.

3.2.2.4. População controle

Foram incluídas duas amostras de tecido colorretal que representavam margem cirúrgica livre de infiltração neoplásica de ressecção segmentar de adenocarcinoma colorretal, três amostras procedentes de margens cirúrgicas de ressecções colônicas segmentares por doença diverticular e quatro biópsias de lesões inflamatórias inespecíficas sem atipias epiteliais e arquiteturais.

Essa população constituiu-se por nove pacientes distintos, sendo três do sexo masculino e seis do sexo feminino, com idade média de 60,66 anos, desvio padrão de 12,29 anos.

3.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos pacientes portadores de retocolite ulcerativa inespecífica e Doença de Crohn, portadores de neoplasias malignas em sítios extra-intestinais e doenças autoimunes.

3.4. METODOLOGIA

3.4.1. CONSTRUÇÃO DOS BLOCOS DE MATRIZ DE ARRANJOS TECIDUAIS (TMA)

Os TMAs foram construídos utilizando-se os casos de adenocarcinomas colorretais, três casos de adenoma túbulo-viloso de alto grau maiores que 1 cm de diâmetro, dois casos de adenoma viloso de alto grau maiores que 1 cm de diâmetro. As lâminas coradas previamente pelo método de Hematoxilina-eosina (H&E) foram usadas para confirmação dos diagnósticos e seleção de locais de interesse para a remoção das áreas mais representativas dos tumores.

Os blocos de TMA foram construídos utilizando equipamentos de “*tissue micro-array builder*” (Histopathology, Ltd., Akác u. 8., 7632 Pécs, Hungary, Baranya) de acordo com instruções do fabricante, nas seguintes fases: 1) a área selecionada nos respectivos blocos de parafina foi delimitada; 2) blocos receptores com capacidade para abrigar 24 amostras teciduais cada, através de núcleos cilíndricos de 2 mm de profundidade, foram preparados utilizando-se molde contido no Kit construtor de micro-arranjo tecidual; 3) um cilindro de 2mm de tecido foi extraído da área selecionada utilizando-se de um extrator de *punch*; 4) os tecidos obtidos a partir o bloco de doação foram transferidos para o núcleo do bloco receptor; 5) as posições dos novos núcleos foram criadas nos blocos receptores, separados por espaços milimétricos preenchidos por parafina, de tal forma que uma sequência de amostras de tecido foi criada; 6) uma amostra de tecido hepático foi colocado em um núcleo periférico à esquerda para nortear o reconhecimento da sequência da amostra tecidual representada através de mapas (Figura 12).

Figura 12.- Construção dos arranjos de matriz tecidual: **A-** Construtor da matriz de arranjo tecidual; **B-** Extrator de punch; **C-** Bloco receptor; **D-** Blocos de TMA finalizados (Adaptado: SOAVE, 2011).

3.4.2. REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS (IIQ)

Para as reações de imunoistoquímica foram utilizados cortes histológicos de 4µm de espessura depositados em lâminas previamente sinalizadas com organosilano 4% em acetona (3-aminopropil trietoxisilano-SIGMA, St Louis, USA), desparafinadas e reidratadas. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram condicionadas em tampão citrato 10 mmol/l, pH 6.0, expostas à panela a vapor por 45 minutos, resfriadas em temperatura ambiente e lavadas em tampão fosfato (PBS). Para a detecção do VEGF, β catenina, NF-KB, metaloproteinase 2 e 9, Caspase 3, p53, Survivina, TNFR1 e Proibitina foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% e PBS por 20 minutos, bloqueio de antígenos com BSA (*phosphate buffered saline* pH 7,4; Sigma Chemical CO P.O. 14508, St. Louis, MO 63178, USA) por 60 minutos.

Os anticorpos primários foram incubados em câmara úmida na geladeira overnight: VEGF (clone A20, *Rabbit policlonal Ig G*; diluição 1:300, Santa Cruz Biotechnology, Inc); β catenina (NCL-B-cat clone 17C2, diluição 1:100, Vision Biosystems, Novocastra Laboratories Ltd.); anti- NF-KB (clone c-20, diluição 1:100, Santa Cruz Biotechnology, USA), metaloproteinases 2 e 9 (MMP2,9) (clone 3B6, Anti-MMP-2 (Ab-3) *Mouse monoclonal* mAb (42-5D11), diluição 1:100 ; Anti-MMP-9 (Ab-1) *Mouse monoclonal* mAb (6-6B), diluição 1:350, Novocastra Laboratories Ltd.); Caspase 3 (clone NCL-CPP32; *Mouse monoclonal* Ac, diluição 1:200, Vision Biosystems); p53 (clone NCL-p53-DO7, *Mouse Monoclonal* Ac, diluição 1:25, Novocastra Laboratories Ltd.), Survivina (FL-142, *Rabbit polyclonal* Ac, SC-10811 Diluição 1:100, Santa Cruz Biotechnology, USA); TNFR1 (clone H-271, *Rabbit polyclonal* Ac, diluição 1:100, Santa Cruz Biotechnology, USA); Proibitina ab-1 (clone II-14-10, *Mouse monoclonal* Ac, diluição 1:100, Thermo Fisher Scientific 46360 Fremont Blvd., Fremont, CA 94538, USA).

A seguir foram realizadas três lavagens sendo duas com PBS e uma com TBS (10mM *phosphate buffered saline* pH 7,4, 0,05%, Tween 20); aplicação do anticorpo secundário da Invitrogen (Invitrogen Corporation, 542 Flynn Road, Camarillo, CA 93012, USA) por 30 minutos. Os cortes histológicos foram incubados pelo HRP polímero conjugado da Invitrogen por 30 minutos. Desenvolvimento da marcação imunoistoquímica foi realizado com 3,3-diaminobenzidina tetrahydrochloride (DBA) (Sigma-Aldrich, GmbH, P.O. 1120, 89552 Steinheim, Germany) diluído em tampão PBS e peróxido hidrogênio 0.036% com

tempo de marcação variando de 10 a 5 minutos, contra-corados com Hematoxilina de Harris; desidratados e montados com Entellan(Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Amostras de adenocarcinoma colorretal foram usadas como controle positivo para MMP2 e 9. Amostras de câncer de mama foram utilizadas como controle positivo para VEGF, survivina e p53.

Tonsilas normais foram usadas como controle positivo para β catenina, TNFR1 e amostras de tecido hepático para a proibitina.

Os controles negativos foram preparados através da omissão dos anticorpos primários.

As análises histopatológicas foram realizadas em microscópio com luz convencional, sendo examinados cerca de dez campos de maior aumento para cada reação imunoistoquímica nos cortes histológicos convencionais.

Cada arranjo de matriz tecidual foi amostrado através de três cortes histológicos semi-seriados, obtidos em diferentes níveis de profundidade, utilizados para cada reação imunoistoquímica, ampliando dessa forma a amostragem histológica das lesões e a avaliação da resposta ao processo imunoistoquímico, possibilitando a obtenção do percentual de marcação em cada amostra para se obter a média de valores.

3.4.2.1. Southwestern imunoistoquímica

A detecção in situ não radioativa para NF- κ B em cortes de parafina foi realizada através do método de Southwestern imunoistoquímica baseado na metodologia descrita por HERNÁNDEZ-PRESA et al., 1999, utilizando kits de marcação e de detecção para digoxigenina (Roche Applied Science, Germany). Foi utilizada como sonda a sequência sintética de DNA (Imprint Genetics Corporation, Hialeah, USA), sense 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3' e sua complementar, correspondente ao NF- κ B.

Após anelamento com a sequência complementar, a sonda foi marcada com digoxigenina. A sonda marcada foi aplicada às lâminas por 12 horas a 37°C. A seguir, os cortes foram incubados com anticorpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatase alcalina e detectados pela solução de NBT/BCIP por 1 hora a 37°C. Em seguida, as lâminas foram montadas com glicerol. O controle negativo foi realizado com uma sequência de NF- κ B mutante.

3.4.2.2. Critérios para avaliação das respostas imunoistoquímicas

- **NF- κ B e Fator de Necrose Tumoral- Receptor 1 (TNFR1)**

As expressões imunoistoquímicas do NF- κ B e TNFR1 foram avaliadas através de um escore, sendo consideradas positivas, as amostras que exibiam marcações nucleares roxas e marcações citoplasmáticas, respectivamente, independente da intensidade de marcação, segundo os critérios abaixo descritos:

- Negativo = ausência de marcação;
- 1+ = < 10% de células positivas;
- 2+ = 10% a 50% de células positivas; e
- 3+ = > 50% de células positivas (DELLA PORTA, 2011).

Para verificação da associação estatística das variáveis foram compostos três grupos: Negativo; Baixa expressão (BE)- 1+ e 2+ e Alta expressão (AE)- 3+.

- **Survivina**

A expressão imunoistoquímica da survivina foi avaliada através de um escore, sendo consideradas positivas, as amostras que exibiam marcação citoplasmática, independente da intensidade da marcação, segundo os seguintes critérios:

- Negativo = < 10% de células marcadas;
- 1+ = 10% a 29% de células marcadas;
- 2+ = 30% a 59% de células marcadas; e
- 3+ = > 60% de células marcadas (LIN et al., 2003).

Para verificação da associação estatística das variáveis foram constituídos dois grupos: negativo e positivo (amostras com $\geq 10\%$ de células coradas) (XI et al., 2011).

- **Caspase 3**

A expressão imunoistoquímica da caspase 3 foi avaliada através de um escore, sendo consideradas positivas, as amostras que exibiam marcação citoplasmática, independente da intensidade da marcação, segundo o critério abaixo descrito:

- Negativo= 0 a 5%;
- 1+= 6% a 25% de células marcadas;
- 2+= 26% a 50% de células marcadas;
- 3+= 51% a 75% de células marcadas; e
- 4+= 76% a 100% de células marcadas.

Para verificação da associação estatística das variáveis foram compostos três grupos: Negativo; Baixa expressão (BE)- 1+ e 2+ e Alta expressão (AE)- 3+.

- **β Catenina**

A expressão da β catenina nas células epiteliais colônicas foi avaliada através de um escore que incluiu:

- **Distribuição da marcação:** membrana; citoplasma e nuclear.

- **Membrana**

A marcação de membrana foi graduada obedecendo aos seguintes critérios:

- 0= < 5 % de células epiteliais com marcação positiva;
- 1+= 5 a 25% de células epiteliais com marcação positiva;
- 2+= 26 a 50% de células epiteliais com marcação positiva;
- 3+= 51 a 75% de células epiteliais com marcação positiva; e
- 4+= >75% de células epiteliais com marcação positiva.

A avaliação da intensidade da marcação imunoistoquímica seguiu ao critério:

- 0= negativa;
- 1+= fraca;
- 2+= moderada; e
- 3+= intensa.

O escore final foi obtido através da multiplicação da extensão da positividade pela intensidade. A contagem final de 9 a 12 foi definida como expressão intensa, 5 a 8 como expressão reduzida e 0 a 4 como expressão marcadamente reduzida (OZAWA et al., 1990; HAO et al., 1997; HAO et al., 2001; MI et al., 2009).

- **Nuclear e citoplasmática**

A marcação nuclear e citoplasmática para β catenina obedeceu ao seguinte critério:

- 0= negativo (ausência de marcação citoplasmática ou nuclear);
- 1+= < 5% de células epiteliais marcadas;
- 2+= 5% a 25% de células epiteliais marcadas; e
- 3+= > 26% de células marcadas.

Expressão reduzida de membrana, expressão citoplasmática e nuclear foram consideradas expressão alterada de β catenina (MI et al., 2009; OZAWA et al., 1990; HAO et al., 1997; HAO et al., 2001).

- **p53**

As amostras que exibiam marcação nuclear $\geq 10\%$ foram consideradas positivas, A escolha deste valor de corte baseou-se no estudo de GRIZZLE et al. (1998), que detectaram que este valor mostra alta concordância entre a detecção imunoistoquímica e pontos de mutação do gene p53 detectado através de análise de polimorfismo de conformação de fita simples.

- **Proibitina (PBT)**

A expressão imunoistoquímica da Proibitina foi avaliada com relação à:

- Distribuição da marcação: Citoplasmática.
- Intensidade da marcação: Fraca = 1; Moderada = 2 e Forte = 3.

O percentual de células marcadas foi mensurado segundo os critérios abaixo discriminados:

- Negativo= ausência de marcação;
- 1+= 1% a 25% de células marcadas;
- 2+= 26% a 50% de células marcadas;
- 3+= 51% a 75% de células marcadas; e
- 4+= > 76% de células marcadas.

O escore final foi calculado através da multiplicação: intensidade x percentual de células coradas, resultando em:

- 0 - Negativo;
- 1-3 - Fracamente positivo;
- 4-7 - Positivo; e
- 8-12 - Fortemente positivo (REN et al., 2010).

A análise da marcação nuclear obedeceu ao mesmo escore utilizado para a citoplasmática, independente da intensidade da marcação.

Para análise estatística da expressão citoplasmática e nuclear da PBT foram constituídos três grupos conforme discriminados abaixo: Negativo; Baixa expressão para fracamente positivo e positivo/ 1+ e 2+; e Alta expressão (AE) para fortemente positivo/ 3+ e 4+; respectivamente.

• **VEGF**

A avaliação da expressão do VEGF foi realizada segundo os critérios abaixo discriminados:

- Marcação citoplasmática positiva > 10% de marcação epitelial,
- Marcação citoplasmática negativa < 10% de marcação epitelial. (LI et al., 2011).

- **Metaloproteinases 2 e 9**

A avaliação imunoistoquímica das metaloproteinases (MMP) 2 e 9 incluiu a análise da proporção de células reativas dentro do tumor e a intensidade da coloração da marcação citoplasmática. A presença de precipitação marrom escuro claramente visível foi considerada positiva e o sistema de graduação utilizado foi: 0= < 1% de células positivas; 1= 1%-10% de células tumorais marcadas; 2= 11%-50% de células tumorais marcadas; 3= 51%-90% de células tumorais marcadas; e 4= > 90% de células tumorais marcadas. A intensidade da marcação foi representada pela intensidade estimada baseada no seguinte critério: 0= reação não visível; 1= fraca; 2= moderada e 3= intensa. Foram examinados cerca de dez campos de maior aumento (SOARES et al., 2006; CURRAN et al., 2004; GOLOVKOV, 2009; FELIN et al., 2009; LYALL et al., 2006).

Para análise estatística, foram considerados casos negativos quando a soma da intensidade e da proporção de células marcadas foi de 0 a 1= negativa; soma de 1 a 4= fracamente positiva; e positiva quando a soma era maior que 4 (SOARES et al., 2006).

3.5. TÚNEL

Secções dos tecidos parafinados foram desparafinados e incubados em 20µg/mL proteinase K (Promega Corporation, Madison, WI- USA). Foi utilizado para a detecção de apoptose in situ, peroxidase *DeadEnd* (*Kit Dead EndTM Colorimetric TUNEL System*- Promega Corporation, Madison, WI- USA) com o kit (*TUNEL DeadEnd*, Promega Corporation) sendo utilizado biotina *dUTP-nick-end*. As amostras foram tratadas com peróxido de hidrogênio 3% para bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Após a adição do tampão de equilíbrio, os cortes foram tratados com deoxinucleotídeo-transferase e digoxigenina-dNTPs por 60 minutos a 37°C. A seguir, tratados com anti-peroxidase-digoxigenina por 30 minutos a 37°C, coradas com DAB (diamino benzidina) e contracorados com Hematoxilina de Mayer. Finalmente, os cortes foram lavados, desidratados e montados.

O controle negativo foi preparado pela omissão da enzima deoxinucleotídeo-transferase para controlar a incorporação não-específica de nucleotídeos ou ligação conjugada da enzima. O número de células TÚNEL positiva foi avaliado com base no percentual de marcação nuclear observado em cada amostra para se obter a média de valores. As células

foram consideradas positivas quando exibiam marcação nuclear marrom evidente. Marcações estromais foram desconsideradas. O *cut off* foi estabelecido de acordo com o percentual mais frequente de pontos sendo <5% considerado negativo e $\geq$ a 5% positivo (ZANETTI, 2011).

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do *software* estatístico SAS® 9.0 (SAS Institute Inc., SAS/STAT® User's Guide, Version 9.0, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999). Para verificar a associação entre as variáveis qualitativas relacionadas ao estudo, os dados foram submetidos ao Teste Exato de Fisher (FISHER, 1935) ou teste de χ^2 . Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA NF-KB, SURVIVINA, CASPASE 3 E TÚNEL.

4.1.1. NF-KB

Não foi observada expressão imunoistoquímica da proteína NF-KB em 7/10 (70%) das amostras das populações de adenocarcinomas, respectivamente, 13/18 (72%) dos casos adenomas de alto grau (AG), 6/18 (34%) dos casos de adenoma de baixo grau (BG), 8/9 (89%) das amostras de lesões serrilhadas (ser.) e 4/9 (44%) dos casos da população controle.

A baixa expressão (BE) foi detectada nos demais casos dos adenocarcinomas [3/10 (30%)] respectivamente; 4/18 (22%) das amostras de adenoma de alto grau; 6/18 (33%) dos casos de baixo grau; 1/9 (11%) das lesões serrilhadas e em 2/9 (22%) das amostras do controle.

A alta expressão (AE) da proteína foi observada somente em 1/18 (6%) caso da população de adenoma de alto grau; 6/18 (33%) dos casos de baixo grau e em 3/9 (34%) das amostras do controle.

A Tabela 3 pormenoriza todos os dados de expressão imunoistoquímica e relações estatísticas entre as populações.

Tabela 3. - Imunodeteção do NF-KB expressa em porcentagens e relações estatísticas entre as populações
Siglas: B = Adenocarcinoma bem diferenciado, M = Adenocarcinoma moderadamente diferenciado, P = Adenocarcinoma pouco diferenciado, Ser = lesão serrilhada, Contr.=Controle.

População	Imunodeteção NF-KB			p p<0,05*
	Negativo	BE 1+/2+	AE 3+	
<u>B</u>em (n=10)	70%	30%	0%	B/M/P x AG p>0,05
<u>M</u>oderado (n=10)	70%	30%	0%	B/M/Px BG p>0,05
<u>P</u>ouco (n=10)	70%	30%	0%	B/M/P x Contr. p>0,05
AG (n=18)	72%	22%	6%	AGxContr. p>0,05
BG (n=18)	34%	33%	33%	BGxContr p>0,05
<u>S</u>errilhada (n=9)	89%	11%	0%	Ser.x Contr. p>0,50
<u>C</u>ontrole (n=9)	44%	22%	34%	---

As Figuras abaixo ilustram os aspectos histopatológicos das lesões que compõem as populações de estudo, coradas ao método de H&E e a imunodeteção para o NF- κ B.

Figura 13. - Fotomicrografia de adenocarcinoma colorretal moderadamente diferenciado: **A1**- Corte histológico corado ao H&E (H&E, aumento de 200X); **A2**- Ausência de marcação imunoistoquímica ao NF- κ B em corte histológico de adenocarcinoma (southwestern imunoistoquímica, NF- κ B, aumento de 200x).

Figura 14. - Fotomicrografia de adenoma colorretal com displasia de alto grau: **A1**- Corte histológico corado ao H&E (H&E, aumento de 400x); **A2**- Ausência de marcação imunoistoquímica ao NF- κ B em adenoma com displasia de alto grau (southwestern imunoistoquímica, NF- κ B, aumento de 200x).

Figura 15.- Fotomicrografia de adenoma colorretal com displasia de baixo grau: **A1**- Corte histológico corado ao H&E (H&E, aumento de 100x); **A2**- Marcação nuclear (seta) da expressão do NF- κ B em adenoma com displasia de baixo grau (southwestern imunoistoquímica, NF- κ B, aumento de 100x).

Figura 16. - Fotomicrografia de lesão serrilhada: **A1-** Corte histológico corado ao H&E (H&E, aumento de 200X); **A2-** Ausência de marcação imunoistoquímica ao NF- κ B em corte histológico de lesão serrilhada (southwestern imunoistoquímica, NF- κ B, aumento de 200X).

Figura 17.- Fotomicrografia de mucosa colônica: **A1-** Corte histológico corado ao H&E revelando ausência de atipias epiteliais e arquiteturas (H&E, aumento de 100X); **A2-** Marcação nuclear (seta) da expressão do NF- κ B em corte histológico de mucosa colônica (southwestern imunoistoquímica, NF- κ B, aumento de 200x).

4.1.2. EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA SURVIVINA

A alta expressão da survivina foi predominante na população dos adenocarcinomas, sendo observada em 6/10 (60%) das lesões bem e moderadamente diferenciadas, respectivamente, e em 7/10 (70%) das amostras pouco diferenciadas.

O grupo dos adenomas exibiu predomínio da baixa expressão, presente em 8/18 (44%) casos do de baixo grau e em 6/18 (33%) casos de alto grau, porém esses últimos apresentaram maior taxa de alta de expressão (5/18[28%]) que os primeiros (4/18 [22%]).

As lesões serrilhadas exibiram predomínio da baixa expressão da proteína (4/9 [44%]). A população controle não exibiu expressão da survivina.

A Tabela 4 discrimina a intensidade de expressão da survivina na população de estudo e revela relações estatísticas entre as populações.

Tabela 4. - Intensidade de expressão imunoistoquímica da Survivina expressa em porcentagens e relações estatísticas entre as populações. **Siglas:** B= Adenocarcinoma bem diferenciado, M= Adenocarcinoma moderadamente diferenciado, P= Adenocarcinoma pouco diferenciado, Ser = lesão serrilhada, Contr.=Controle.

População	Neg.	+	++	+++	Taxa de Expressão(%)	p p<0,05*
Controle (n=9)	9 (100%)	0 (0%)	0(0%)	0(0%)	0%	---
Serrilhada (n=9)	3 (34%)	4 (44%)	1(11%)	1 (11%)	66%	B/M/P/AG/BGxSer p>0,05
BG (n=18)	6 (33%)	8 (44%)	3 (17%)	1 (6%)	67%	BG x Ser. p=0,9454
AG (n=18)	7 (39%)	6 (33%)	2 (11%)	3 (17%)	61%	AG x BG p=0,6679
Bem (n=10)	1 (10%)	3 (30%)	1 (10%)	5 (50%)	90%	B x BG p=0,0488*
Moderado (n=10)	1 (10%)	3 (30%)	2 (20%)	4 (40%)	90%	B/M/Px AG p>0,05
Pouco (n=10)	3 (30%)	0 (0%)	1 (10%)	6 (60%)	70%	P x BG p=0,0065*

4.1.3. CASPASE 3

A análise imunoistoquímica da caspase 3 revelou predomínio da AE nas populações dos adenocarcinomas com percentuais de 10/10 (100%) das lesões bem diferenciados, 9/10 (90%) casos moderados e 6/10 (60%) nos pouco diferenciados. Um caso (10%) tanto da população dos adenocarcinomas moderadamente quanto dos pouco diferenciados não apresentou expressão da caspase 3. No entanto, três (30%) amostras de adenocarcinomas pouco diferenciados mostraram BE da proteína.

Os adenomas com displasia de alto e baixo grau exibiram AE da caspase 3 em 9/18 (50%) e em 3/18 (16%) dos casos, respectivamente. Por outro lado, a BE expressão foi predominante nos adenomas de baixo grau, presente em 10/18 (56%) das amostras, e detectada em 6/18 (33%) casos das de alto grau.

A população de lesões serrilhadas e do controle exibiram BE da caspase 3 em 5/9 (56%) e em 4/9 (44)% dos casos, respectivamente.

Não foi observada expressão da caspase 3 em 3/18 (17%), 5/18 (28%), 4/9 (44%) e 1/9 (12%) dos casos de adenomas de alto grau, baixo grau, lesões serrilhadas e controle, respectivamente.

A Tabela 5 dá detalhes dos achados de expressão imunoistoquímica da caspase 3 e revela relações estatisticamente significantes entre as populações.

Tabela 5. - Imunodeteção da caspase 3 expressa em porcentagens e relação estatística. **Siglas:** B = Adenocarcinoma bem diferenciado, M = Adenocarcinoma moderadamente diferenciado, P = Adenocarcinoma pouco diferenciado, Ser = lesão serrilhada, Contr.=Controle.

População	Caspase 3		
	Imunodeteção Negativo	BE 1+/2+	AE 3+/4+
Bem (n=10)	0%	0%	100%
Moderado (n=10)	10%	0%	90%
Pouco (n=10)	10%	30%	60%
AG (n=18)	17%	33%	50%
BG (n=18)	28%	56%	16%
Serrilhada (n=9)	44%	56%	0%
Controle (n=9)	12%	44%	44%
p<0,05*			p>0,05

A análise estatística avaliando a expressão imunoistoquímica da caspase 3 não revelou relação estatisticamente significativa entre as populações.

4.1.4. TÚNEL

A análise da expressão do processo de apoptose através do teste do túnel revelou baixa positividade nas lesões de adenocarcinoma detectada somente em dois casos de cada população (20%). Essa mesma baixa positividade foi observada no grupo das lesões serrilhadas detectada em apenas três casos (33%).

A população dos adenomas com displasia de alto grau revelou nove casos positivos (50%) e nove negativos (50%). No grupo dos de baixo grau houve predomínio de positividade detectada em 11/18 casos representando 61%.

O grupo controle apresentou positividade em 9/9 (100%) dos casos.

A Tabela 6 dá detalhes da expressão imunoistoquímica de apoptose ao Túnel e revela relações estatisticamente significantes entre as populações.

A análise estatística relacionando as expressões do NF- κ B às expressões da Survivina, Caspase 3 e Túnel nas populações de estudo não detectou associação estatisticamente significante entre as variáveis.

A Figura 18 ilustra a distribuição dos percentuais de expressão imunoistoquímica das proteínas envolvidas na via apoptótica nos grupos de estudo, demonstrando a relação direta entre a positividade da survivina e a baixa expressão de apoptose mais evidente na população dos adenocarcinomas.

Figura 18. - Representação gráfica dos percentuais da ausência de expressão imunoistoquímica do NF- κ B, Survivina positiva, AE da Caspase 3 e positividade ao Túnel.

As Figuras a seguir representam as marcações imunoistoquímicas do NF- κ B, Survivina, Caspase 3 e Túnel nas populações de estudo.

Figura19. - Fotomicrografia de adenocarcinoma: **A1-** Expressão citoplasmática da Survivina (imunoistoquímica, Survivina, aumento de 400X), **A2-** Expressão citoplasmática da Caspase 3 (imunoistoquímica, Caspase 3, aumento de 400X), **A3-** Ausência de apoptose ao método do Túnel (imunoistoquímica, Túnel, 200X).

Figura 20. - Fotomicrografia de adenoma de alto grau: **A1**- Expressão citoplasmática da Survivina (imunoistoquímica, Survivina, aumento de 200X), **A2**- Expressão citoplasmática da Caspase 3 (imunoistoquímica, Caspase 3, aumento de 200X), **A3**- Ausência de apoptose ao método do Túnel (imunoistoquímica, Túnel, 200X).

Figura 21. - Fotomicrografia de adenoma de baixo grau: **A1**- Expressão citoplasmática da Survivina (imunoistoquímica, Survivina, aumento de 200X), **A2**- Expressão citoplasmática da Caspase 3 (imunoistoquímica, Caspase 3, aumento de 200X), **A3**- Presença de apoptose ao método do Túnel (seta) (imunoistoquímica, Túnel, 200X).

Figura 22. - Fotomicrografia de lesão serrilhada: **A1**- Expressão citoplasmática focal (seta) da Survivina (imunoistoquímica, Survivina, aumento de 200X), **A2**- Expressão citoplasmática da Caspase 3 (imunoistoquímica, Caspase 3, aumento de 200X), **A3**- Ausência de apoptose ao método do Túnel (imunoistoquímica, Túnel, 200X).

Figura 23. - Fotomicrografia de Mucosa colônica (controle): **A1**- Ausência de expressão citoplasmática da Survivina (imunoistoquímica, Survivina, aumento de 100X), **A2**- Expressão citoplasmática da Caspase 3 (imunoistoquímica, Caspase 3, aumento de 200X), **A3**- Presença de apoptose ao método do Túnel (setas) (imunoistoquímica, Túnel, 200X).

4.2. TNFR1

A análise imunoistoquímica do TNFR1 revelou 10/10 (100%) casos de alta expressão na população dos adenocarcinomas bem e moderadamente diferenciados, respectivamente, e em 8/10 (80%) casos pouco diferenciados.

A alta expressão do TNFR1 foi predominante ainda no grupo dos adenomas de alto grau presente em 12/18 (67%) dos casos e baixa nos adenomas de baixo grau observado em 17/18 (94%) das amostras.

Os grupos das lesões serrilhadas e controle mostraram predomínio absoluto da baixa expressão detectado em 9/9 (100%) e em 89% (8/9) dos casos, respectivamente.

A Tabela 8 evidencia esses dados e revela relações estatisticamente significantes entre as populações.

Tabela 8. - Imunodeteção do TNFR1 expressa em porcentagens e relações estatísticas entre as populações. **Siglas:** B = Adenocarcinoma bem diferenciado, M = Adenocarcinoma moderadamente diferenciado, P = Adenocarcinoma pouco diferenciado, Ser = lesão serrilhada, Contr.=Controle.

População	Imunodeteção	TNFR1	P p<0,05*
	BE1+/2+	AE 3+	
<u>Bem</u> (n=10)	0%	100%	B/M x BG* p<0,0001
<u>Moderado</u> (n=10)	0%	100%	B/M x Contr* p=0,0001
<u>Pouco</u> (n=10)	20%	80%	P x BG* p=0,0001
<u>AG</u> (n=18)	33%	67%	AG x Ser.* p=0,0011
<u>BG</u> (n=18)	94%	6%	AG x BG * p=0,0003
<u>Serrilhada</u> (n=9)	100%	0%	S x Contr.* p=0,0009
<u>Controle</u> (n=9)	89%	11%	B/M/AG x Contr* p<0,005

4.3. EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROIBITINA- DISTRIBUIÇÃO SUBCELULAR

4.3.1. Expressão imunoistoquímica citoplasmática da proibitina

A análise imunoistoquímica da PTB citoplasmática revelou predomínio de alta expressão nas populações de adenocarcinomas bem, moderado e pouco diferenciado [7/10 (70%), 8/10 (80%) e 10/10 dos casos (100%), respectivamente]; Adenomas de AG e BG [14/18 (78%) e 10/18 (56%) casos, respectivamente], o mesmo não sendo observado nas populações de lesões serrilhadas e de controle onde notamos principalmente baixa expressão da proteína [9/9 (100%) e 7/9 (78%) casos, respectivamente].

4.3.2. Expressão imunoistoquímica nuclear da proibitina

A expressão imunoistoquímica da PBT em localização nuclear foi negativa em 10/10 (100%) dos casos de Adenocarcinomas bem e moderadamente diferenciados, respectivamente.

A população de adenocarcinoma pouco diferenciado mostrou alta expressão da PTB nuclear em 5/10 (50%) dos casos, baixa expressão em 4/10 casos (40%) e ausência de expressão em 1/10 caso (10%).

Os Adenomas com displasia de alto grau revelaram percentuais equivalentes de baixa e alta expressão da PBT nuclear, presentes em 4/18 (22%) casos, respectivamente. Os demais casos [10/18 (56%)] não exibiram expressão nuclear.

Os Adenomas com displasia de baixo grau exibiram alta expressão da PBT em 2/18 (11%) casos, BE em 9/18 (50%) das amostras e ausência de expressão em 7/18 (39%) dos casos.

Não foi observada expressão nuclear da PBT nas 9/9 (100%) amostras de lesões serrilhadas e Controle, respectivamente.

A Tabela 9 discrimina os percentuais de expressão imunoistoquímica nuclear e citoplasmática da proibitina nas populações de estudo e relações estatisticamente significantes entre as populações.

Tabela 9. - Imunodeteção da PBT Nuclear e citoplasmática expressa em porcentagens e relações estatísticas entre as populações. **Siglas:** B = Adenocarcinoma bem diferenciado, M = Adenocarcinoma moderadamente diferenciado, P = Adenocarcinoma pouco diferenciado, Ser = lesão serrilhada, Contr.= Controle.

População	PBT Nu Neg.	PBT Nu BE(1+/2+)	PBT Nu AE (3+/4)	p p<0,05*	PBT Cito BE (fraco+/+)	PBT Cito AE (forte+)	p p<0,05*
Controle (n=9)	100%	0%	0%	P x Contr* p=0,0005	78%	22%	AG x Contr* p=0,0115
Serrilhada (n=9)	100%	0%	0%	P x Ser.* p=0,0005	100%	0%	M x Ser* p=0,0007
BG (n=18)	39%	50%	11%		44%	56%	BG x Ser* p=0,0088
AG (n=18)	56%	22%	22%	B x AG* p=0,0446	22%	78%	AG x Ser.* p=0,0002
Bem (n=10)	100%	0%	0%	B x P* p=0,0003	30%	70%	B x Ser* p=0,0031
Moderado (n=10)	100%	0%	0%	Mx AG* p=0,0446	20%	80%	M x Contr* p=0,0230
Pouco (n=10)	10%	40%	50%	M x P* p=0,0003	0%	100%	P x BG* p= 0,0251

As Figuras 24 e 25 ilustram as distribuições dos percentuais de expressão imunoistoquímica das PBTs Nuclear e Citoplasmática nas populações de estudo evidenciando um aumento crescente da expressão da citoplasmática na sequência adenoma-carcinoma.

Figura 24. - Representação gráfica em percentuais da expressão da PBT Nuclear.

Figura 25. - Representação gráfica em percentuais da expressão da PBT citoplasmática.

4.3.3. Relação da expressão imunoistoquímica do NF- κ B, TNFR1, PBT citoplasmática, Caspase 3 e Túnel

Foram avaliadas as relações entre a expressão imunoistoquímica do NF- κ B, TNFR1, PBT relacionados com a sinalização pró-inflamatória, na qual, níveis elevados de TNF promoveriam a ativação do NF- κ B e inibição da expressão da PBT (vice-versa) e seus efeitos finais no processo de apoptose (Caspase 3 e Túnel).

A Tabela 10 dá detalhes dos percentuais de expressão das proteínas e revela relações estatísticas entre as variáveis nas populações de estudo.

Tabela 10. - Imunodeteção do NF- κ B, TNFR1, PBT citoplasmática, Caspase 3 e Túnel expressa em porcentagens e relações estatísticas.

Imunodeteção N.º pacientes %	Bem 10	Mod. 10	Pouco 10	AG 18	BG 18	Ser. 9	Controle 9
NF- κ B Neg.	70%	70%	70%	72%	34%	89%	44%
NF- κ B Pos.	30%	30%	30%	28%	66%	11%	56%
TNFR1 AE	100%	100%	80%	67%	6%	0%	11%
TNFR1 BE	0%	0%	20%	33%	94%	100%	89%
PBT Cito AE	70%	80%	100%	78%	56%	0%	22%
PBT Cito BE	30%	20%	0%	22%	44%	100%	78%
Caspase 3 Neg.	0%	10%	10%	17%	28%	44%	12%
Caspase 3 Pos.	100%	90%	90%	83%	72%	56%	88%
Túnel Pos.	20%	20%	20%	50%	61%	33%	100%
Túnel Neg.	80%	80%	80%	50%	39%	67%	0%
p<0,05*							p>0,05

A análise estatística relacionando as expressões do NF- κ B às expressões do TNFR1, PBT citoplasmática, caspase 3 e túnel nas populações de estudo não detectou associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

A Figura 26 representa a relação entre proteínas envolvidas na sinalização pró-inflamatória, seus efeitos finais traduzidos pela expressão Caspase 3/Túnel, denotando ausência de *feedback* positivo entre as proteínas e apoptose final.

Figura 26. - Representação gráfica dos percentuais da expressão imunohistoquímica das proteínas envolvidas na sinalização pró-inflamatória, Caspase 3 e Túnel.

As Figuras a seguir representam as marcações imunohistoquímicas do NF- κ B, proibitina citoplasmática e TNFR1 nos grupos de estudo.

Figura 27. - Fotomicrografia de adenocarcinoma: **A1-** Ausência de marcação do NF- κ B (southwestern imunohistoquímica, NF- κ B, aumento de 200X), **A2-** Expressão citoplasmática da proibitina (imunohistoquímica, proibitina, aumento de 200X), **A3-** Expressão citoplasmática do TNFR1 (imunohistoquímica, TNFR1, aumento de 200X).

Figura28. - Fotomicrografia de adenoma com displasia de alto grau: **A1**- Ausência de marcação do NF- κ B (southwestern imunistoquímica, NF- κ B, aumento de 200X), **A2**- Expressão citoplasmática da proibitina (imunistoquímica, proibitina, aumento de 200X), **A3**- Expressão citoplasmática do TNFR1 (imunistoquímica, TNFR1, aumento de 200X).

Figura29. - Fotomicrografia de adenoma com displasia de baixo grau: **A1**- Marcação nuclear (seta) do NF- κ B (southwestern imunistoquímica, NF- κ B, aumento de 200X), **A2**- Expressão citoplasmática da proibitina (imunistoquímica, proibitina, aumento de 200X), **A3**- Expressão citoplasmática do TNFR1 (imunistoquímica, TNFR1, aumento de 200X).

Figura 30. - Fotomicrografia de lesão serrilhada: **A1**- Ausência de marcação do NF- κ B (southwestern imunistoquímica, NF- κ B, aumento de 200X), **A2**- Expressão citoplasmática da proibitina (imunistoquímica, proibitina, aumento de 200X), **A3**- Expressão citoplasmática (seta) do TNFR1 (imunistoquímica, TNFR1, aumento de 200X).

Figura 31. - Fotomicrografia de mucosa colônica (controle): **A1**- Marcação nuclear (seta) do NF- κ B (southwestern imunistoquímica, NF- κ B, aumento de 200X), **A2**- Expressão citoplasmática da proibitina (imunistoquímica, proibitina, aumento de 200X), **A3**- Expressão citoplasmática do TNFR1 (imunistoquímica, TNFR1, aumento de 200X).

4.3.4. Relação da expressão imunoistoquímica do NF- κ B, PBT Nuclear, Caspase 3 e Túnel

A Tabela 11 pormenoriza os percentuais de expressão das proteínas NF- κ B, PBT Nuclear, Caspase 3, Túnel e relações estatísticas entre as variáveis nas populações de estudo.

Tabela 11.- Imunodeteccção do NF- κ B, PBT Nuclear, Caspase 3 e Túnel expressa em percentagens e relação estatística.

Imunodeteccção	Bem	Mod.	Pouco	AG	BG	Ser.	Controle
Nº pacientes %	10	10	10	18	18	9	9
NF- κ B Neg.	70%	70%	70%	72%	34%	89%	44%
NF- κ B Pos.	30%	30%	30%	28%	66%	11%	56%
PBT Nu Pos.	0%	0%	90%	44%	61%	0%	0%
PBT Nu Neg.	100%	100%	10%	56%	39%	100%	100%
Caspase 3 Pos.	100%	90%	90%	83%	72%	56%	88%
Caspase 3 Neg.	0%	10%	10%	17%	28%	44%	12%
Túnel Pos.	20%	20%	20%	50%	61%	33%	100%
Túnel Neg.	80%	80%	80%	50%	39%	67%	0%
p<0,05*							p>0,05

A análise estatística relacionando as expressões do NF- κ B às expressões da PBT nuclear, Caspase 3 e Túnel nas populações de estudo não detectou associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

A Figura 32 representa a relação entre proteínas envolvidas no processo de sobrevivência celular com ênfase a ausência de expressão imunoistoquímica do NF- κ B, PBT nuclear positiva, Caspase 3 positiva e Túnel positivo.

Figura 32. - Representação gráfica dos percentuais da expressão imunoistoquímica das proteínas envolvidas no processo de sobrevivência celular com ênfase ao NF- κ B, PBT Nuclear, Caspase 3 e Túnel.

As Figuras a seguir ilustram a expressão nuclear da proibitina.

Figura 33. - Fotomicrografia de expressão nuclear (setas) e citoplasmática de proibitina em **A1**- Adenocarcinoma, **A2**- Adenoma de alto grau; **A3**- Adenoma de baixo grau (imunohistoquímica, proibitina, aumento de 200x).

4.4. EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA P53 E SUAS RELAÇÕES COM A SURVIVINA, PBT NUCLEAR, CASPASE 3 E TÚNEL

4.4.1. p53

A Tabela 12 discrimina os percentuais de expressão da p53 e relações estatisticamente significantes entre as populações.

Tabela 12. - Imunodeteção da p53 expressa em porcentagens e relações estatísticas entre as populações. **Siglas:** B = Adenocarcinoma bem diferenciado, M= Adenocarcinoma moderadamente diferenciado, P = Adenocarcinoma pouco diferenciado, Ser = lesão serrilhada, Contr.= Controle.

População	Imunodeteção		p* p<0,05
	Negativo	Positivo	
Bem (n=10)	50%	50%	B x Ser.* p=0,00325
Moderado (n=10)	20%	80%	M x Ser/Contr* p=0,0019
Pouco (n=10)	60%	40%	
AG (n=18)	56%	44%	AG x Contr* p=0,0258
BG (n=18)	61%	39%	
Serrilhada (n=9)	100%	0%	AG x Ser.* p=0,0258
Controle (n=9)	100%	0%	B x Contr* p=0,0325

A Figura 34 ilustra a distribuição dos percentuais de expressão da p53 na população de estudo.

Figura 34. - Representação gráfica dos percentuais da expressão imunoistoquímica da p53.

4.4.2. Relações entre expressões imunoistoquímica da p53, Survivina, PBT Nuclear, Caspase 3 e Túnel

A perda da função do p53 promove a desregulação da survivina. Para avaliar tal relação, analisados a correlação entre a expressão imunoistoquímica das proteínas p53, survivina, PBT nuclear e seus efeitos na cascata de apoptose através da expressão imunoistoquímica da caspase efetora 3 e detecção final da apoptose pelo teste do Túnel.

A Tabela 13 discrimina os percentuais de expressão imunoistoquímica positiva da p53, survivina, PBT nuclear, caspase 3 e túnel, independente da intensidade da marcação e relações estatísticas.

Tabela 13. - Imunodeteção da p53, survivina, PBT Nuclear, Caspase 3 e Túnel expressa em porcentagens e relações estatísticas.

Imunodeteção (n= %)	Bem 10	Mod. 10	Pouco 10	AG 18	BG 18	Ser. 9	Controle 9
p 53 Pos.	50%	80%	40%	44%	39%	0%	0%
p 53 Neg.	50%	20%	60%	56%	61%	100%	100%
Survivina Pos.	90%	90%	70%	61%	67%	67%	0%
Survivina Neg.	10%	10%	30%	39%	33%	33%	100%
PBT Nuclear Pos.	0%	0%	90%	44%	61%	0%	0%
PBT Nuclear Neg.	100%	100%	10%	56%	39%	100%	100%
Caspase 3 Pos.	100%	90%	90%	83%	72%	56%	88%
Caspase 3 Neg.	0%	10%	10%	17%	28%	44%	12%
Túnel Pos.	20%	20%	20%	50%	61%	33%	100%
Túnel Neg.	80%	80%	80%	50%	39%	67%	0%
p<0,05*							p>0,05

A análise estatística relacionando a expressão das proteínas entre si nas populações de estudo não revelou associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

A Figura 35 evidencia percentuais de expressão imunoistoquímica da p53, PBT Nuclear e Caspase 3 nas populações de estudo.

Figura 35. - Representação gráfica dos percentuais da expressão imunoistoquímica da p53, Survivina, PBT Nuclear e sua repercussão no processo apoptótico através da expressão da Caspase 3 e Túnel.

As Figuras abaixo ilustram a marcação imunoistoquímica da p53 e da survivina nas populações de estudo.

Figura 36. - Fotomicrografia de adenocarcinoma: **A1-** Marcação nuclear da p53 no epitélio de revestimento glandular (imunoistoquímica, p53, aumento de 200X), **A2-** Expressão citoplasmática da Survivina (imunoistoquímica, Survivina, aumento de 200X).

Figura37. - Fotomicrografia de adenoma de alto grau: **A1-** Marcação nuclear da p53 no epitélio de revestimento glandular (imunoistoquímica, p53, aumento de 200X), **A2-** Expressão citoplasmática da Survivina (imunoistoquímica, Survivina, aumento de 200X).

Figura38. - Fotomicrografia de adenoma de baixo grau: **A1-** Marcação nuclear da p53 no epitélio de revestimento glandular (imunoistoquímica, p53, aumento de 100X), **A2-** Expressão citoplasmática da Survivina (imunoistoquímica, Survivina, aumento de 200X).

Figura39. - Fotomicrografia de lesão serrilhada: **A1-** Ausência de marcação imunoistoquímica da p53 (imunoistoquímica, p53, aumento de 100X), **A2-** Expressão citoplasmática da Survivina (seta) (imunoistoquímica, Survivina, aumento de 200X).

Figura 40.- Fotomicrografia de mucosa colônica (controle): **A1-** Ausência de marcação imunoistoquímica da p53 (imunoistoquímica, p53, aumento de 100X), **A2-** Ausência de marcação imunoistoquímica da Survivina (imunoistoquímica, Survivina, aumento de 100X).

4.5. β CATENINA: DISTRIBUIÇÃO SUBCELULAR, RELAÇÕES COM NF- κ B, SURVIVINA, ESTADIAMENTO PATOLÓGICO NAS POPULAÇÕES DE ADENOCARCINOMAS, METÁSTASES, ADENOMAS E P53

4.5.1. Distribuição subcelular da β catenina na população de estudo

A localização subcelular da β catenina nas populações de estudo foi avaliada através da expressão imunoistoquímica positiva detectada na membrana celular, citoplasma e núcleo.

O grupo controle exibiu expressão de membrana preservada da β catenina em 100% dos casos e ausência de expressão citoplasmática e/ou nuclear.

As populações constituídas por adenocarcinomas, adenomas (AG, BG) e lesões serrilhadas exibiram expressão imunoistoquímica reduzida de β catenina em localização de membrana celular em 100% das amostras.

A expressão citoplasmática de β catenina foi identificada em 100% das amostras dos grupos dos adenocarcinomas, adenomas de alto e baixo grau e em 44% dos casos de lesão serrilhada.

A expressão nuclear da β catenina foi detectada em 61% das amostras de adenoma de AG e BG, respectivamente, e 20% das amostras de adenocarcinoma bem diferenciados; 40% no grupo dos moderados e 30% dos casos dos pouco diferenciados. As demais populações não exibiram expressão nuclear.

A Tabela 14 discrimina a distribuição da expressão da β catenina nas populações estudadas.

Tabela 14. - Expressão da β catenina na população de estudo baseada na distribuição subcelular (membrana, citoplasma e núcleo) e intensidade da marcação e relações estatísticas. **Siglas:** Mb- marcação imunoistoquímica de membrana; Cito- marcação imunoistoquímica citoplasmática; Nucl- marcação imunoistoquímica nuclear; Neg- negativo.

População (n)	Mb 9-12	Mb 5-8	Mb 0-4	Cito Neg.	Cito 1+	Cito 2+	Cito 3+	Nucl Neg.	Nucl 1+	Nucl 2+	Nucl 3+
Pouco(10)	0/10	2/10	8/10	0/10	1/10	3/10	6/10	7/10	1/10	1/10	1/10
Mod. (10)	0/10	7/10	3/10	0/10	0/10	2/10	8/10	6/10	3/10	1/10	0/10
Bem (10)	0/10	9/10	1/10	0/10	0/10	2/10	8/10	8/10	2/10	0/10	0/10
AG (18)	0/18	13/18	5/18	0/18	0/18	2/18	16/18	7/18	2/18	7/18	2/18
BG (18)	0/18	13/18	5/18	0/18	0/18	5/18	13/18	7/18	3/18	6/18	2/18
Ser. (9)	0/10	9/9	0/9	5/9	1/9	1/9	2/9	9/9	0/9	0/9	0/9
Contr. (9)	9/9	0/9	0/9	9/9	0/9	0/9	0/9	9/9	0/9	0/9	0/9
p<0,05*	p>0,05			p>0,05				p>0,05			

A análise estatística da expressão imunoistoquímica da β catenina segundo sua distribuição subcelular e intensidade de marcação não revelou relação estatisticamente significativa entre as populações de estudo.

A Figura 41 evidencia os percentuais da expressão nuclear da β catenina nuclear nos grupos de estudo, demonstrando que os níveis mais elevados são observados nas lesões adenomatosas com displasia de baixo e alto grau com percentuais de expressão equivalentes.

Figura 41. - Representação gráfica dos percentuais de expressão imunohistoquímica da β catenina nuclear nos grupos de estudo.

As Figuras a seguir ilustram os padrões de marcações imunohistoquímicas da β catenina nas populações de estudo.

Figura 42. - Fotomicrografia de mucosa colônica (controle) demonstrando expressão de membrana preservada da β catenina no epitélio glandular colônico, ausência de expressão citoplasmática e nuclear (imunohistoquímica, β catenina, aumento de 200X).

Figura 43. - Fotomicrografia de adenocarcinoma: **A1-** Diminuição da expressão de membrana, expressão citoplasmática e expressão nuclear focal (seta) da β catenina no epitélio glandular (imunohistoquímica, β catenina, aumento de 200X), **A2-** Marcação nuclear da β catenina em Adenocarcinoma pouco diferenciado (seta) (imunohistoquímica, β catenina, aumento de 200X).

Figura 44. - Fotomicrografia de adenoma de alto grau: **A1**- Diminuição da expressão de membrana, expressão citoplasmática e expressão nuclear focal da β catenina no epitélio glandular (imunohistoquímica, β catenina, aumento de 200X), **A2**- Detalhe da marcação nuclear da β catenina em epitélio glandular (seta) (imunohistoquímica, β catenina, aumento de 400X).

Figura 45. - Fotomicrografia de adenoma de baixo grau: **A1**- Diminuição da expressão de membrana, expressão citoplasmática e expressão nuclear focal da β catenina no epitélio glandular (imunohistoquímica, β catenina, aumento de 100X), **A2**- Detalhe da marcação nuclear da β catenina (seta) (imunohistoquímica, β catenina, aumento de 200X).

Figura 46. - Fotomicrografia de lesão serrilhada demonstrando diminuição da expressão de membrana, expressão citoplasmática e ausência de expressão nuclear da β catenina (imunohistoquímica, β catenina, aumento de 200X).

A análise estatística relacionando a expressão imunoistoquímica da β catenina (normal, alterada e nuclear) à presença ou ausência de marcação do NF- κ B avaliada individualmente em cada população não revelou associação estatisticamente significativa entre as variáveis com $p > 0,05$.

A Figura 47 ilustra os percentuais de expressão imunoistoquímica associada da β catenina e NF- κ B.

Figura47. - Representação gráfica dos percentuais da expressão associada do NF- κ B à β catenina nas populações de estudo. **Siglas:** NF- = NF- κ B negativo; β cat.alt= β catenina alterada; NF+ = NF- κ B positivo; β cat.Nu+ = β catenina Núcleo +, β cat.NL= β catenina normal.

4.5.2.2. Relação entre a expressão imunoistoquímica da β catenina nuclear e Survivina

A desregulação da survivina se dá por diversos mecanismos. Um deles é através da própria desregulação da β catenina que altera o equilíbrio entre a proliferação/diferenciação celular e apoptose.

A Tabela 16 dá detalhes da expressão imunoistoquímica alterada da β catenina e da survivina em percentuais e relação estatística entre as variáveis.

Tabela 16. - Expressão imunoistoquímica nuclear da β catenina e da survivina e relação estatística entre as variáveis nas populações de estudo. **Siglas:** Nucl= Nuclear, Pos=Positiva, Neg.=Negativa.

População	β Nucl. -	β Nucl.+	Survivina-	Survivina+	P p<0,05*
Controle (n=9)	100%	0%	100%	0%	—
Serrilhada (n=9)	100%	0%	33%	67%	—
BG (n=18)	39%	61%	33%	67%	p=0,6148
AG (n=18)	39%	61%	39%	61%	p=1,0000
Bem (n=10)	80%	20%	10%	90%	p=1,0000
Moderado (n=10)	60%	40%	10%	90%	p=0,4000
Pouco (n=10)	70%	30%	30%	70%	p=0,1833

4.5.2.3. Expressão nuclear da β catenina e estadiamento patológico dos adenocarcinomas

A expressão nuclear da β catenina foi observada em parte das populações de adenocarcinoma, sendo notada em 3/6 dos casos classificados como TNM I; 1/11 caso TNM II A; 3/5 casos TNM II B; 2/5 casos TNM IIIB.

A Tabela 17 pormenoriza esses dados.

Tabela 17. - Correlação entre a expressão imunoistoquímica da β catenina nuclear ao estadiamento patológico dos adenocarcinomas e relações estatísticas. **Siglas:** NE - não estadiado

Nº pacientes (%)	β catenina Nuclear +	β catenina Nuclear –
TNM I (n=6)	50%	50%
TNM II A (n=11)	10 %	90%
TNM II B (n=5)	60%	40%
TNM IIIA (n=1)	0%	100%
TNM IIIB (n=5)	40%	60%
TNM IVA (n=1)	0%	100%
NE (n=1)	0%	100%
p<0,05*		p>0,05

A análise estatística relacionando individualmente o grau de estadiamento patológico à marcação nuclear da β catenina não revelou associação estatisticamente significativa entre as variáveis avaliada em cada população de estudo com $p>0,05$.

4.5.2.4. Relação da expressão nuclear da β catenina, metástases e evolução

Metástases à distância e locorregionais foram detectadas na época do diagnóstico e/ou na evolução dos pacientes em 11/30 (37%) casos da população dos adenocarcinomas sendo observadas em:

- 3/10 (30%) dos casos de adenocarcinomas bem diferenciados (um paciente apresentava metástases na época do diagnóstico e dois evoluíram com metástase hepática e pulmonar);
- 3/10 (30%) dos casos de adenocarcinoma moderadamente diferenciados (um paciente exibiu metástase em linfonodos regionais e dois evoluíram com metástase hepática e pulmonar);
- 5/10 (50%) dos casos de adenocarcinomas pouco diferenciados (todos apresentavam metástases em linfonodos regionais na época do diagnóstico).

A Tabela 18 demonstra a correlação da expressão nuclear da β catenina à presença de metástases na época do diagnóstico/ evolução da doença nos adenocarcinomas e relação estatística.

Tabela 18. - Correlação da expressão nuclear da β catenina à presença de metástases na época do diagnóstico / evolução da doença nos adenocarcinomas e relações estatísticas. **Siglas:** Meta= metástases, β Nucl = β catenina nuclear.

(%)	Metástases	Meta +/ β Nucl +	Meta -/ β Nucl +	$p<0,05^*$
Bem (n=10)	30%	0%	20%	$p>0,05$
Moderado (n=10)	30%	10%	30%	$p>0,05$
Pouco (n=10)	50%	10%	20%	$p>0,05$

A análise estatística através do teste Fisher relacionando a expressão imunoistoquímica da β catenina nuclear à presença/não de metástases não revelou associação estatisticamente significativa entre as variáveis nas populações de estudo.

4.5.2.5. Expressão nuclear da β catenina nos grupos dos adenomas, lesões serrilhadas e controle

A β catenina nuclear foi observada em 11/18 (61%) casos nas populações de adenomas com displasia de alto e baixo grau, respectivamente.

Não foi detectada positividade nuclear nos grupos das lesões serrilhadas e controle.

4.5.2.6. Relação da expressão imunoistoquímica da β catenina nuclear e p53.

A Tabela 19 discrimina os percentuais de expressão nuclear da β catenina, expressão imunoistoquímica da p53 e análise estatística da associação entre essas variáveis em cada população de estudo.

Tabela 19. - Expressão imunoistoquímica da p53 e da β catenina nuclear em porcentagens e análise estatística da associação entre as variáveis nas populações de estudo. **Siglas:** β Nucl = β catenina nuclear.

População	β Nucl. -	β Nucl.+	p53 -	p 53+	p p<0,05*
Controle (n=9)	100%	0%	100%	0%	—
Serrilhada (n=9)	100%	0%	100%	0%	---
BG (n=18)	39%	61%	61%	39%	
AG (n=18)	39%	61%	56%	44%	p=0,3665
Bem (n=10)	80%	20%	50%	50%	p=0,4444
Moderado (n=10)	60%	40%	20%	80%	p=0,4667
Pouco (n=10)	70%	30%	60%	40%	p=1,0000

A Figura 48 ilustra percentuais de expressão da p53 e coexpressão da β catenina nuclear nos grupos de estudo.

Figura 48. - Representação gráfica dos percentuais da expressão imunohistoquímica da p53 e coexpressão da β catenina nuclear na população de estudo.

4.6. ANÁLISE DAS VIAS DE INVASÃO COM ÊNFASE A AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS METALOPROTEINASES (MMPs) 2 E 9, SUAS RELAÇÕES COM NF- κ B, ESTADIAMENTO PATOLÓGICO E METÁSTASES

4.6.1. Expressão imunohistoquímica das MMP 2 e 9 nas populações de estudo

As expressões imunohistoquímicas da metaloproteinases 2 e 9 encontram-se discriminadas e expressas em porcentagens na Tabela 20.

Tabela 20. - Expressão imunohistoquímica das MMP 2 e 9 nos grupos de estudo expressa em porcentagens. **Síglas:** neg.- negativa; fraca+- fracamente positiva e + positiva.

Nº pacientes (%)	Bem 10	Moderado 10	Pouco 10	AG 18	BG 18	Serrilhada 9	Controle 9
MMP 2 neg.	0%	0%	40%	66%	94%	100%	89%
MMP 2 fraca+	20%	0%	10%	28%	0%	0%	0%
MMP 2+	80%	100%	50%	6%	6%	0%	11%
MMP 9 neg.	10%	20%	0%	34%	39%	100%	89%
MMP 9 fraca+	20%	0%	10%	33%	39%	0%	0%
MMP 9+	70%	80%	90%	33%	22%	0%	11%

A Figura 49 representa os percentuais de expressão da MMP 2 nas populações de estudo.

Figura 49. - Representação gráfica dos percentuais de expressão da MMP 2 nos grupos de estudo.

A Figura 50 representa os percentuais de expressão da MMP 9 nas populações de estudo e demonstra aumento crescente nos níveis de sua expressão no espectro evolutivo da seqüência adenoma-carcinoma.

Figura50. - Representação gráfica dos percentuais de expressão da MMP 9 nos grupos de estudo.

As Figuras a seguir ilustram os padrões de marcações imunoistoquímicas das MMPs 2 e 9 nas populações de estudo.

Figura 51. - Fotomicrografia de adenocarcinoma: **A1**- Expressão citoplasmática da MMP 2 no epitélio de revestimento glandular (imunoistoquímica, MMP 2, aumento de 200X), **A2**- Expressão citoplasmática da MMP 9 no epitélio de revestimento glandular (imunoistoquímica, MMP 9, aumento de 200X).

Figura 52. - Fotomicrografia de adenoma de alto grau: **A1**- Expressão citoplasmática focal da MMP 2 (imunoistoquímica, MMP 2, aumento de 400X), **A2**- Expressão citoplasmática da MMP 9 (imunoistoquímica, MMP 9, aumento de 400X).

Figura 53. - Fotomicrografia de adenoma de baixo grau: **A1**-Expressão citoplasmática focal da MMP 2 no epitélio de revestimento glandular (imunoistoquímica, MMP 2, aumento de 400X), **A2**- Expressão citoplasmática da MMP 9 no epitélio de revestimento glandular (imunoistoquímica, MMP 9, aumento de 400X).

Figura 54. - Fotomicrografia de lesão serrilhada: **A1**- Ausência de expressão da MMP 2 (imunohistoquímica, MMP 2, aumento de 100X), **A2**- Ausência de expressão da MMP 9 (imunohistoquímica, MMP 9, aumento de 100X).

Figura 55. - Fotomicrografia de mucosa colônica (controle): **A1**- Ausência de expressão da MMP 2 (imunohistoquímica, MMP 2, aumento de 100X), **A2**- Ausência de expressão da MMP 9 (imunohistoquímica, MMP 9, aumento de 100X).

4.6.2. Correlação entre a expressão imunohistoquímica das MMPs 2 e 9 e o estadiamento patológico baseado no sistema TNM

Para análise da correlação da expressão das MMPs 2 e 9 na população dos adenocarcinomas, as categorias de imunoexpressão foram agrupadas em negativas e positivas (fracamente positiva e positiva).

A Tabela 21 discrimina os percentuais da expressão imunohistoquímica das MMPs 2 e 9 segundo a categoria estabelecida no sistema de estadiamento patológico TNM.

Tabela 21. - Expressão imunoistoquímica das MMPs 2 e 9 na população dos adenocarcinomas estadiados segundo o sistema TNM e relações estatísticas. **Sigla:** NE= não estadiado.

(%)	MMP 2+	MMP 2 –	MMP 9+	MMP 9 –
TNM I (n=6)	100%	0%	83%	17%
TNM IIA (n=11)	82%	18%	90%	10%
TNM IIB (n=5)	100%	0%	80%	20%
TNM IIIA (n=1)	100%	0%	100%	0%
TNM IIIB (n=5)	60%	40%	100%	0%
TNM IVA (n=1)	100%	0%	100%	0%
NE (n=1)	100%	0%	100%	0%
p<0,05*	p>0,05		p>0,05	

A análise estatística relacionando a expressão imunoistoquímica individualizada das MMP 2 e 9 (positiva e negativa) ao estágio tumoral não revelou associação estatística significativa entre as variáveis.

4.6.3. Correlação entre a expressão imunoistoquímica das MMPs 2 e 9, metástases e evolução

Metástases à distância e locorregionais foram detectadas na época do diagnóstico e/ou na evolução dos pacientes em 11/30 (37%) casos da população dos Adenocarcinomas.

A Tabela 22 discrimina os percentuais de expressão das MMPs 2 e 9 correlacionados à presença de metástases na população dos adenocarcinomas.

Tabela 22. - Correlação entre a expressão das MMPs 2 e 9 à presença de metástases e análise estatística avaliando a associação entre as variáveis nas populações de estudo.

Adenocarcinoma (n)	Metástases +	Meta/MMP2+	Meta+/MMP2-	Meta/MMP9+
Bem (10)	30%	30%	0%	30%
Moderado (10)	30%	30%	0%	30%
Pouco (10)	50%	30%	20%	50%
p<0,05*		p>0,05		p>0,05

A análise estatística realizada relacionando a presença/não de metástases à expressão das MMP 2e 9 não revelou associação estatisticamente significativa entre as variáveis nos grupos de estudo.

A Figura 56 ilustra os percentuais de expressão das MMPs 2 e 9 correlacionados aos de metástases.

Figura 56. - Representação gráfica dos percentuais da expressão imunoistoquímica das MMPs 2 e 9 correlacionadas à presença de metástases.

4.6.4. Relação da expressão imunoistoquímica das MMPs 2 e 9 com NF-κB

Para análise da relação entre as MMPs 2 e 9 e o NF-κB, foram considerados positivos todos os casos que apresentavam expressão imunoistoquímica das MMPs independente da intensidade da marcação.

A Tabela 23 discrimina os percentuais de expressão imunoistoquímica das MMPs 2 e 9, NF-κB e relação estatística nas populações de estudo.

Tabela 23. - Expressão imunoistoquímica das MMPs 2 e 9 e NF-κB nos grupos de estudo e análise estatística avaliando associação entre NF-κB e MMPs nas populações de estudo.

População	KB+	KB-	MMP2+	MMP2-	p<0,05*	MMP9+	MMP9-	p<0,05*
Bem	30%	70%	100%	0%	---	90%	10%	0,3000
Moderado	30%	70%	100%	0%	1,0000	80%	20%	1,0000
Pouco	30%	70%	60%	40%	1,0000	100%	0%	1,0000
AG	28%	72%	34%	56%	0,6148	66%	34%	1,0000
BG	66%	34%	6%	94%	0,3156	61%	39%	0,0833
Serrilhada	11%	89%	0%	100%	---	0%	100%	---
Controle	56%	34%	11%	89%	---	11%	89%	1,0000

*Não foi detectada associação estatisticamente significante entre a expressão imunoistoquímica do NF-κB e às das MMPs 2 e 9 avaliadas individualmente em cada população de estudo.

4.7. ANÁLISE DA ANGIOGÊNESE ATRAVÉS DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO VEGF E SUAS CORRELAÇÕES COM PRESENÇA DE METÁSTASES, MMPS 2 E 9, p53E NF- κ B

4.7.1. Expressão imunoistoquímica do VEGF nas populações de estudo

A Tabela 24 pormenoriza os percentuais de expressão do VEGF nas populações de estudo e relações estatisticamente significantes entre as populações de estudo.

Tabela 24. - Expressão imunoistoquímica do VEGF e relações estatísticas.

População	Imunodeteccção		p* p<0,05
	Negativo	Positivo	
<u>Bem</u> (n=10)	40%	60%	B/M x Ser./Contr.* p=0,0108
<u>Moderado</u> (n=10)	40%	60%	M x AG/BG* p=0,0006
<u>Pouco</u> (n=10)	10%	90%	P x AG/BG* p<0,0001
<u>AG</u> (n=18)	100%	0%	B x AG * p=0,0006
<u>BG</u> (n=18)	100%	0%	B x BG* p=0,0006
<u>Serrilhada</u> (n=9)	100%	0%	P x Ser.* p<0,0001
<u>Controle</u> (n=9)	100%	0%	P x Contr* p<0,0001

As Figuras a seguir demonstram a marcação imunoistoquímica nas populações de estudo.

Figura57. - Fotomicrografia de adenocarcinoma: **A1**- Expressão citoplasmática do VEGF no epitélio glandular (imunistoquímica, VEGF, aumento de 200X), **A2**- Detalhe da marcação citoplasmática do VEGF (imunistoquímica, VEGF, aumento de 400X).

Figura58. - Fotomicrografias de adenomas de alto e baixo grau: **A1** e **A2** - Ausência de expressão imunistoquímica do VEGF (imunistoquímica, VEGF, aumento de 400X).

Figura59. - Fotomicrografias de: **A1**- Lesão serrilhada; e **A2**- Mucosa colônica (controle), ausência de expressão do VEGF (imunistoquímica, VEGF, aumento de 100X, respectivamente).

4.7.2. Correlação das expressões imunoistoquímicas do VEGF à presença de metástases e evolução

Metástases à distância e locorregionais foram detectadas na época do diagnóstico e/ou na evolução dos pacientes em 11/30 (37%) casos da população dos adenocarcinomas.

A Tabela 25 discrimina os percentuais de expressão do VEGF correlacionados com a presença de metástases na população dos adenocarcinomas e relações estatísticas entre as populações.

Tabela 25. - Correlação entre expressão imunoistoquímica do VEGF à presença de metástases e relações estatísticas.

População	VEGF		Metástases		p* p<0,05
	VEGF+Meta +	VEGF+Meta-	VEGF-Meta+	VEGF-Meta-	
Bem (10)	20%	40%	10%	30%	B x M p=1,000
Mod. (10)	20%	40%	10%	30%	M x P p=0,3496
Pouco(10)	50%	40%	0%	10%	P x B p=0,3496

4.7.3. Correlação das expressões imunoistoquímicas do VEGF e MMPs

A Tabela 26 discrimina os percentuais de expressão imunoistoquímica do VEGF relacionados às MMPs 2 e 9 e relação estatística entre as variáveis nas populações de estudo.

Tabela 26. - Percentuais de expressão imunoistoquímica do VEGF relacionados às MMPs 2 e 9 e relações estatísticas.

População	VEGF+	VEGF-	MMP2+	MMP2-	p<0,05*	MMP9+	MMP9-	p<0,05*
Bem	60%	40%	100%	0%	---	90%	10%	1,0000
Moderado	60%	40%	100%	0%	0,4000	80%	20%	0,4667
Pouco	90%	10%	60%	40%	1,0000	100%	0%	0,4000
AG	0%	100%	34%	56%	---	66%	34%	---
BG	0%	100%	6%	94%	---	61%	39%	---
Serrilhada	0%	100%	0%	100%	---	0%	100%	---
Controle	0%	100%	11%	89%	---	11%	89%	---

*Não foi detectada associação estatisticamente significativa entre a expressão imunoistoquímica do VEGF e às das MMPs 2 e 9 avaliadas individualmente em cada população de estudo.

A Figura 60 ilustra a associação das expressões do VEGF às MMP 2 e MMP 9.

Figura 60. - Representação gráfica dos percentuais da expressão associada do VEGF às MMPs 2 e 9 nos grupos de estudo.

4.7.4. Correlação das expressões imunoistoquímicas do VEGF e p53

A Tabela 27 sumariza os percentuais de expressão imunoistoquímica do VEGF e p53.

Tabela 27. - Expressão imunoistoquímica do VEGF e p53 nas populações de estudo e relações estatísticas.

População	VEGF -	VEGF+	p53 -	p 53+	p p<0,05*
Controle (n=9)	100%	0%	100%	0%	—
Serrilhada (n=9)	100%	0%	100%	0%	—
BG (n=18)	100%	0%	61%	39%	---
AG (n=18)	100%	0%	56%	44%	---
Bem (n=10)	40%	60%	50%	50%	p=1,0000
Moderado (n=10)	40%	60%	20%	80%	p=1,0000
Pouco (n=10)	10%	90%	60%	40%	p=1,0000

A análise estatística relacionando a expressão do VEGF à coexpressão da p53 não revelou associação estaticamente significante entre as variáveis nas populações.

4.7.5. Correlação das expressões imunoistoquímicas do VEGF e NF-κB

A Tabela 28 pormenoriza os percentuais de expressão do VEGF e NF-κB nas populações de estudo.

Tabela 28. - Percentuais de expressão imunoistoquímica do VEGF e do NF-κB e relações estatísticas.

População	VEGF -	VEGF+	NF-κB -	NF-κB+	p p<0,05*
Controle (n=9)	100%	0%	44%	56%	—
Serrilhada (n=9)	100%	0%	89%	11%	—
BG (n=18)	100%	0%	34%	66%	---
AG (n=18)	100%	0%	72%	28%	---
Bem (n=10)	40%	60%	70%	30%	p=1,0000
Moderado (n=10)	40%	60%	70%	30%	p=0,500
Pouco (n=10)	10%	90%	70%	30%	p=1,0000

A análise estatística relacionando a expressão imunoistoquímica do VEGF à co-expressão do NF-κB nos grupos de estudo não detectou associação estatística significativa entre as variáveis.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O câncer colorretal é importante causa de morte por câncer nos Estados Unidos, Europa e Brasil. No Brasil representa a segunda principal causa de morbimortalidade por câncer nas regiões Sudeste e Sul (MEIRELLES; CARVALHO, 2010; INCA, 2012).

Foi uma das primeiras neoplasias malignas a ter um modelo de carcinogênese reconhecido (FERREIRA, 2009). Este modelo clássico de carcinogênese baseado na seqüência adenoma-carcinoma proposta por FEARON; VOGELSTEIN (1990) é apontado como responsável por aproximadamente 85% dos CCRs esporádicos (NEUMANN et al., 2012).

Considerada uma das neoplasias malignas do trato gastrointestinal de melhor prognóstico, se diagnosticada precocemente, acomete principalmente homens em uma proporção de 1.4-2 homens para 1.0 mulheres, acima de 40 anos de idade (INCA, 2012; GREENSON, 2010, FENOGLIO-PREISER, 2008).

O presente estudo verificou a imunoexpressão do NF- κ B e survivina, importantes marcadores moleculares no desenvolvimento do câncer colorretal, envolvidos em etapas cruciais do processo de carcinogênese, a sobrevivência celular e a angiogênese, essenciais para a perpetuação da proliferação celular desordenada e disseminação da doença. Para tal, selecionamos uma população mista representada por adenocarcinomas com diferentes graus de diferenciação celular, adenomas colorretais com displasia de alto e baixo grau, lesões serrilhadas e uma população controle (amostras de tecido colorretal sem atipias epiteliais e arquiteturais).

A ativação do fator nuclear- κ B tem sido identificada no controle de múltiplos processos celulares no câncer, incluindo inflamação, transformação, proliferação, angiogênese, invasão, metástases, quimiorresistência e radiorresistência. Este fator está constitutivamente ativado em células tumorais e sua ativação aberrante tem sido associada a propriedades apoptose-resistentes (CHATUVERDI et al., 2011; DENG et al., 2002; LIND et al., 2001).

No presente estudo, não observamos expressão imunoistoquímica do NF- κ B em 70% dos casos dos adenocarcinomas. Em virtude de suas propriedades anti-apoptóticas, esperaríamos uma alta expressão desse fator nesse grupo.

Fato similar também foi observado na população de adenomas de alto grau (72% dos casos) e lesões serrilhadas (89% dos casos). Contudo, o grupo dos adenomas de baixo grau

exibiu expressão do NF- κ B em 66% dos casos, favorecendo a possibilidade de que este fator tenha atuado como pró-apoptótico, haja vista os percentuais de apoptose detectados. Essa função dual do NF- κ B será discutida adiante.

Em relação às lesões serrilhadas, sabe-se que a via serrilhada da neoplasia colorretal é distinta da seqüência adenoma-carcinoma, desenvolvendo-se através da metilação epigenética de genes supressores tumorais específicos que efetivamente silenciam a transcrição de genes (MESSICK et al, 2012). O mecanismo mais comum de crescimento tumoral via serrilhada parece se iniciar com a mutação do gene *BRAF*, cuja mutação inibe a apoptose normal das células epiteliais colônicas (SNOVER, 2011). Logo a ausência de expressão do NF- κ B e a detecção de um único caso com baixa expressão da proteína pode ser reflexo dessas diferenças moleculares presentes nos mecanismos de desenvolvimento das lesões.

A população controle exibiu positividade imunoistoquímica para o NF- κ B em 5/9 (56%) das amostras. Os casos selecionados para a composição desse grupo foram biópsias de lesões inflamatórias inespecíficas e margens cirúrgicas de ressecções segmentares colônicas decorrentes de doença diverticular. Portanto, a expressão imunoistoquímica do NF- κ B nesses casos se justificaria pela função pró-inflamatória exercida por este fator.

A superexpressão da survivina é um dos eventos iniciais no desenvolvimento do CCR, crescente na seqüência adenoma-carcinoma e com a perda de diferenciação tumoral (HERNANDEZ et al., 2011). A desregulação da Survivina se dá por diversos mecanismos entre eles ressaltamos a alteração no fator de transcrição NF- κ B, perda da função do p53 e desregulação TCF/ β catenina (KIM et al., 2003).

Detectamos nas populações, um aumento crescente da expressão da survivina na seqüência adenoma-carcinoma, aspectos concordantes com os relatos da literatura (HERNANDEZ et al., 2011), porém sem correlação com o grau de diferenciação nos adenocarcinomas e adenomas, achados igualmente similares aos descritos por LIN et al (2003).

No grupo das lesões serrilhadas, a expressão da survivina foi observada em 6/9 (66%) casos, sendo um pólipó hiperplásico e os demais adenomas serrilhados sésseis. PARFITT, DRIMAN (2007) observaram expressão imunoistoquímica da survivina no citoplasma e em região nuclear do epitélio de revestimento da base de criptas em pólipos hiperplásicos e em adenomas serrilhados sésseis. No nosso estudo detectamos somente expressãocitoplasmática difusa da survivina. Acreditamos que para uma análise mais aprofundada dessa questão seria necessária amostragem mais ampla.

Não foi detectada expressão da survivina no grupo controle, coincidente com o estudo de LIN et al. (2003).

Os achados referentes à imunodeteção da caspase 3 e a apoptose através do método do túnel serão analisados conjuntamente.

Foram detectados níveis de alta expressão da caspase 3 nas populações de adenocarcinomas, sobretudo nos bem (100%) e moderadamente (90%) diferenciados. Embora o grupo dos adenocarcinomas pouco diferenciados não tenha exibido percentuais tão elevados de alta expressão (60%), a positividade global da caspase 3 foi observada em 90% das amostras. Ao analisarmos a imunodeteção de apoptose através do método do túnel, notamos que apenas 20% das amostras de cada grupo de adenocarcinoma exibiram evidências de apoptose.

Essa discrepância entre os níveis de expressão da caspase 3 e a baixa expressão no túnel pode ser explicada através da ação anti-apoptótica da survivina, altamente expressa nessa população, haja vista que o NF- κ B foi negativo em 70% dessas amostras. JEYASURIA et al.(2011) postularam que níveis elevados de survivina restringiriam as consequências da ação da caspase 3 quando essa apresenta níveis elevados, o que justificaria os nossos achados. Os membros da família das proteínas inibidoras de apoptose (PIA) são inibidores endógenos da caspase 3 ativa, e a survivina, membro dessa família, bloqueia ambas vias apoptóticas, intrínseca e extrínseca, por interação direta ou indireta com as caspase 3 e 7 (JEYASURIA et al.,2011; WALIGÓRSKA-STACHURA et al.,2012).

Em relação ao grupo de adenomas de alto grau observamos percentuais relevantes de alta expressão da caspase 3 (50% dos casos). No entanto, a expressão da survivina (61% dos casos) foi inferior aquela detectada nos adenocarcinomas (70%-90%), com inibição da caspase 3 aparentemente proporcional ao seu nível de expressão, corroborada pelos índices de apoptose detectada no túnel (50% dos casos).

A população de adenomas de baixo grau exibiu alta expressão da caspase 3 em pequena parcela da população (16% dos casos) e expressão global (alta e baixa expressão) em 72% das amostras. A expressão da survivina foi detectada em 67% dos casos e apoptose em 61% dessas amostras. Considerando exclusivamente essa via de modulação da apoptose orquestrada pela survivina, observamos que a sua ação anti-apoptótica não foi tão eficiente. Porém, esse grupo exibiu expressão do NF- κ B em 66% dos casos. Qual seria então a atuação do NF- κ B neste contexto? Estudos indicaram um papel pró-apoptótico de certos dímeros do NF- κ B. Segundo CHEN et al.(2003), o NF- κ B exerceria uma função dual na dependência

dos níveis de RelA e c-Rel, o que justificaria nossos achados. Além disso, vários autores têm descrito uma associação entre o aumento de apoptose e a progressão tumoral colorretal (YU et al., 2006; KAWASAKI et al., 2001). O aumento da atividade proliferativa induziria a apoptose devido à falta de nutrientes, competição por fatores de crescimento e oxigênio resultado da proliferação desordenada (AOTAKE et al., 1999; ARANHA et al., 2007). Esse fato explicaria o crescimento lento dos adenomas precoces (décadas), apesar da sua alta atividade proliferativa (SINICROPE et al., 1996).

As lesões serrilhadas apresentaram um padrão de expressão da caspase 3 (56% dos casos) e survivina (67%) aparentemente interligados à resposta apoptótica dentro dos padrões esperados (positividade ao túnel de 33%). O NF- κ B foi negativo na grande maioria dos casos (89%), sugerindo que a supressão de apoptose ocorreu através da ação da survivina. A inibição de apoptose é um achado comum nas lesões serrilhadas colorretais. Acredita-se que essa inibição seja o fator responsável pelo desenvolvimento do aspecto serrilhado das lesões devido ao acúmulo de células no interior das criptas, com seu posterior empilhamento (NOFFSINGER; HART, 2010).

O grupo controle apresentou expressão global (AE e BE) da caspase 3 em 88% dos casos, ausência de expressão da survivina e positividade ao túnel em todas as amostras, dentro dos padrões esperados. O NF- κ B foi positivo em 56% dos casos, e em face desse achado, acreditamos que o raciocínio aplicado aos adenomas de baixo grau, considerando a vertente pró-apoptótica de dímeros do κ B seja igualmente aplicado a essa população.

Visando avaliar detalhadamente a ausência de expressão do NF- κ B, analisamos sua função pró-inflamatória através da interação com o fator de necrose tumoral (TNF) e a proibitina.

O TNF é um importante mediador de apoptose, bem como da inflamação e da imunidade (VLANTIS; PASPARAKIS, 2010). A sua ligação ao TNFR1 desencadeia uma série de eventos intracelulares que resulta na ativação de dois grandes fatores de transcrição, o NF- κ B e o c-Jun (CHEN; GOEDDEL, 2002). A ativação do NF- κ B pelo TNFR1 é de grande importância, principalmente por ter potencial de acionar várias vias sinalizadoras não apoptóticas (SESSO, 2010).

A proibitina (PTB1) é uma proteína celular pleiotrópica, envolvida na regulação da proliferação, apoptose, transcrição, entre outras funções (THEISS; SITARAMAN, 2011). Atua principalmente como supressora tumoral quando localizada no núcleo e como pró-

tumorigênica quando ligada à membrana plasmática (TORTELLI JÚNIOR, 2008; XU et al., 2008; NITJMANS et al., 2000).

No intestino pode exercer função crucial na modulação da resposta inflamatória. THEISS et al. (2009) sugeriram que o TNF α regule negativamente a expressão da PBT em células epiteliais intestinais via NF- κ B, na doença inflamatória intestinal. Assim, a PBT inibiria a ativação do NF- κ B através de um mecanismo que envolveria a importina $\alpha 3$, proteína envolvida na translocação nuclear do p50/p65.

Em função desses dados e na ausência de expressão do NF- κ B detectada em grande parte das populações de adenocarcinomas, adenomas de alto grau e serrilhada, analisamos a relação da expressão da PBT e do TNFR1, considerando a função pró-inflamatória das proteínas e seus mecanismos regulatórios.

A alta expressão imunoistoquímica do TNFR1 e da proibitina citoplasmática foi predominante nos grupos dos adenocarcinomas e adenomas de alto grau, assim como, a ausência de expressão do NF- κ B (70% dos casos). Tais achados sugerem que não houve *feedback* entre essas proteínas e portanto a ausência de expressão do NF- κ B não foi decorrente do mecanismo regulatório pró-inflamatório observado nas doenças inflamatórias intestinais. Devemos considerar ainda que, foram excluídos desse estudo, portadores de doença de Crohn e retocolite ulcerativa, condições inflamatórias crônicas que perpetuam a sinalização do TNF mantendo-o em níveis elevados de expressão, com ativação do NF- κ B e decréscimo dos níveis de expressão da PBT (THEISS; SITARAMAN, 2011).

Portanto, a elevada expressão citoplasmática da proibitina no presente estudo poderia estar relacionada ao seu papel pró-tumorigênico. CHEN et al. (2010) observaram uma superexpressão da proibitina em casos de CCR, com aumento da expressão na seqüência tecido normal-adenoma-carcinoma, embora os níveis de expressão em adenomas colorretais não tenham sido significativamente elevados. Os nossos achados apontam uma expressão crescente da proibitina citoplasmática também nesta seqüência tecido normal-adenoma-carcinoma, achado similar ao descrito por CHEN et al. (2010), acrescido de que a elevação desses níveis de expressão foi diretamente proporcional à perda da diferenciação celular, sugerindo que a essa proteína atue de fato como pró-tumorigênica, evento também corroborado pelos baixos níveis de apoptose detectados pelo método do túnel principalmente na populações dos adenocarcinomas.

Em relação à população de adenoma de baixo grau, acreditamos que proibitina também tenha atuado como pró-tumorigênica, porém como os níveis de expressão foram

inferiores (56%) e a expressão do NF- κ B superior aos das demais populações, isto propiciou atuação pró-apoptótica exercida provavelmente por dímeros do κ B, que atuaram independentemente da regulação intermediada pelo TNFR1 [percentuais de alta expressão pouco relevantes (6%)], permitindo assim, a ação efetiva da caspase 3, comprovada pela presença de apoptose detectada em 61% dos casos.

Os grupos de serrilhada e controle apresentaram ínfimos percentuais de alta expressão de proibitina (0% e 22%, respectivamente) e TNFR1 (0% e 11%, respectivamente), reafirmando mais uma vez as diferenças moleculares presentes nos mecanismos de desenvolvimento dessa primeira população e corroborando a provável vertente pró-apoptótica do κ B, independente da regulação do TNFR1 na segunda população.

A proibitina em localização nuclear está relacionada à função de supressor tumoral inibindo a proliferação transcricional do E2F e modulando positivamente a atividade transcricional do p53 (FUSARO et al., 2003; TORTELLI JÚNIOR, 2008). No presente estudo detectamos expressão nuclear da proibitina no grupo dos adenomas de baixo grau (61%), alto grau (44%) e adenocarcinomas pouco diferenciados (90% dos casos). As demais populações não apresentaram expressão dessa proteína nessa localização. Particularizando a análise desses achados, notamos que na população de adenomas de baixo grau, os percentuais de expressão nuclear da proibitina (61% dos casos), NF- κ B (66%) e apoptose ao túnel (61%) foram similares. Esses dados sinalizam para possível ação da proibitina nuclear como supressora tumoral, contribuindo na modulação positiva de apoptose, com provável participação pró-apoptótica do NF- κ B exercida por seus dímeros e ratificada pelos níveis de apoptose. Em relação aos adenomas de alto grau e adenocarcinomas pouco diferenciados, a expressão do NF- κ B foi pouco significativa (28% e 30%, respectivamente), prevalecendo à ação anti-apoptótica da survivina, resultando na supressão parcial de apoptose.

Prosseguindo na análise da sobrevivência celular e nos possíveis mecanismos que geraram a desregulação da survivina, inserimos no presente estudo a imunodeteção da proteína p53.

A mutação do gene p53 é encontrada em aproximadamente 50% dos cânceres humanos e a imunorreatividade em 47% a 50% dos CCRs, independente do *status* alélico (FENOGLIO-PREISER, 2008). A maioria das mutações do p53 resulta na expressão de p53 mutante que exhibe propriedades de ganho de função. Tais mutações promovem ativamente sinais de pró-sobrevivência celular e tumorigênese, independente da perda da função do p53 selvagem (MIRZAYANS et al., 2012).

A imunodeteção da p53 no presente estudo revelou níveis crescentes de expressão da proteína na sequência adenoma-carcinoma, embora a população de adenocarcinomas pouco diferenciados tenha apresentado percentual de expressão levemente inferior (40%) ao do grupo de adenomas de alto grau (44%) e adenocarcinomas bem diferenciados (50%). Nossos achados são similares aos descritos por HUH et al. (2010), que também observaram percentuais de positividade da p53 mais elevados em adenocarcinomas bem e moderadamente diferenciados (50%) quando comparados com os poucos diferenciados (32%).

A expressão da p53 foi detectada em 8/18 (44%) dos casos de adenomas com displasia de alto grau e em 7/18 (39%) com displasia de baixo grau. Vários autores (SOUZA et al., 2012; VERNILLO et al., 2008) têm relatado percentuais discordantes de imunorreatividade para a proteína p53, porém usualmente correlacionados com o grau de displasia, tal como observada no nosso estudo. A taxa de expressão da p53 depende do método imunoistoquímico de detecção; do número de lesões e seções histológicas examinadas; critério de análise empregado e do *cutt-off* (VERNILLO et al., 2008). A escolha do nosso ponto de corte ($\geq 10\%$) baseou-se na grande concordância observada entre a detecção imunoistoquímica e ponto de mutação do gene p53 detectado através da análise de polimorfismo de conformação de fita simples (SHANMUGAM et al., 2008).

As lesões serrilhadas e o grupo controle não exibiram expressão da p53. A via molecular de desenvolvimento do CCR através da via serrilhada tem como os seus maiores expoentes, a mutação em *BRAF* e o fenótipo metilador em ilhas CpG. Alterações *WNT/CTNNB1*, mutações *KRAS* e *TP53* são eventos genéticos mais comuns na via esporádica, adenoma-carcinoma de desenvolvimento do CCR (ROSTI et al., 2012). Logo, os nossos achados são coincidentes com os da literatura. Porém, devemos considerar ainda, a presença de uma minoria de lesões colorretais que apresentam alterações moleculares tanto da via serrilhada quanto da esporádica (sequência adenoma-carcinoma), exibindo características morfológicas de ambas as vias (JASS et al., 2006). Acreditamos que para uma análise mais aprofundada da questão seria necessária uma amostragem mais ampla das lesões.

O gene p53 é um importante regulador negativo da transcrição do gene survivina (PARENTI et al., 2006; CHANG et al., 2010). Estudos têm demonstrado que a expressão da survivina está intimamente associada ao acúmulo da p53 mutante em células cancerosas (ZHANG et al., 2006). Observamos elevados níveis de expressão da proteína p53 na sequência adenoma-carcinoma (39%-80%) na qual os percentuais de expressão da survivina foram igualmente elevados (61%-90%), porém não diretamente proporcionais. Nossos

resultados estão de acordo com os descritos por PARENTI et al. (2006) que observaram um aumento da taxa de expressão da p53 e da survivina na progressão do processo de carcinogênese no esôfago de Barrett, porém sem diferenças significativas entre lesões com displasia de alto e baixo grau. De modo similar, YANG et al. (2009) relataram uma maior expressão da survivina em tumores esofágicos com presença de p53 mutante.

As lesões serrilhadas exibiram alta expressão de survivina (67%) com ausência de expressão da p53, o que nos faz considerar novamente as diferenças moleculares existentes entre as vias esporádicas e a serrilhada determinando tal resposta.

É evidente em nosso estudo, a relação entre a superexpressão da proteína p53, denotando mutação da p53, com subsequente desregulação da survivina, representada por seus percentuais de expressão imunoistoquímica, resultando no decréscimo de apoptose, ratificada pelo método do túnel. CHANG et al. (2010) demonstraram resistência celular à apoptose mediada pela survivina em células de câncer esofágico na vigência da perda de função da p53.

A atividade transcricional do p53 pode também ser regulada pela proibitina quando localizada no núcleo, atuando como supressora tumoral e modulando o processo de apoptose através do p53 (JOSHI et al., 2007). Como descrevemos anteriormente, a proibitina em localização nuclear foi detectada somente nos grupos de adenomas de alto e baixo grau, assim como, nos adenocarcinomas pouco diferenciados. Em todos esses grupos notamos uma expressão da proteína p53 em patamares relativamente elevados (39%-40%), indicando a presença da forma mutante da proteína p53 (PARENTI et al., 2006). Na população de adenoma de baixo grau observamos percentuais similares de expressão imunoistoquímica nuclear da proibitina (supressora tumoral) e do NF- κ B (vertente pró-apoptótica), baixos níveis de positividade (39%) para a p53 (mutante), sugerindo um *feedback* positivo entre a proibitina nuclear e o NF- κ B na modulação do processo de apoptose (61% dos casos), se sobrepujando à ação anti-apoptótica da survivina.

Esta modulação intrincada não se aplicou ao grupo de adenomas de alto grau. Esse grupo exibiu percentuais idênticos de expressão nuclear da proibitina e da p53 (44% dos casos), com elevados níveis de survivina (61%), NF- κ B negativo em 72% das amostras, indicando um equilíbrio de ações pró e anti-apoptótica ratificado pela taxa de apoptose detectada (50% das amostras).

Em relação à população dos adenocarcinomas pouco diferenciados, houve nítido predomínio da ação anti-apoptótica da survivina (70%), corroborada pelos baixos níveis de

apoptose (20%), mesmo em face da expressão tão elevada da proibitina nuclear (90%) e p53 mutante expressa em 44% dos casos.

Prosseguindo na análise dos possíveis mecanismos que geraram a inibição do NF- κ B e a desregulação da survivina, investigamos a expressão da β catenina na população de estudo.

A β catenina, proteína multifuncional, membro do complexo caderina-catenina que atua na adesão homotípica célula-célula, tem papel importante na via de sinalização Wnt, envolvida na progressão do câncer (OGATA et al., 2010; DENG et al., 2002; MI et al., 2009). Na célula epitelial colônica está predominantemente ligada a E-caderina na membrana lateral celular (HANDJARI et al., 2011). No CCR, mutações do gene supressor tumoral APC ou da β catenina, assim como, a ativação da via Wnt, resultam na estabilização da β catenina com acúmulo dessa proteína no citoplasma, com posterior ligação a proteínas da família de fatores de transcrição TCF e translocação para o núcleo, resultando na regulação positiva de vários genes (entre eles, *c-myc* e ciclina D1) implicados na tumorigênese (MI et al., 2009).

A análise imunoistoquímica da β catenina na população controle revelou expressão de membrana preservada, ausência de expressão citoplasmática e nuclear, dentro dos padrões de normalidade esperados e que serviram de padrão para as demais avaliações. Assim, observamos redução de expressão de membrana e expressão citoplasmática da β catenina em 100% dos casos de adenocarcinomas, adenomas de alto e baixo grau. Houve predomínio absoluto de alta expressão citoplasmática (3+) em todos esses grupos, com percentuais mais elevados na transição de displasia de baixo (72%) para alto grau histológico (89%) sugerindo ser um bom indicador de progressão tumoral. Esses achados são coincidentes com os descritos por HAO et al. (1997) que também observaram níveis crescentes de expressão citoplasmática da β catenina, assim como, redução da expressão de membrana no processo de progressão tumoral colorretal.

As lesões serrilhadas exibiram redução da expressão de membrana em 100% dos casos, dados similares ao relatados por FU et al. (2012). A expressão citoplasmática foi detectada em 44% das amostras. Não foi observada expressão nuclear. YAMAMOTO et al. (2003) detectaram níveis de expressão citoplasmática (16% dos casos) e nuclear (3% das amostras) da β catenina pouco significativos em adenomas serrilhados quando comparados com adenomas colorretais convencionais (77% com marcação citoplasmática e 61% nuclear) e carcinomas com invasão da submucosa (88% marcação citoplasmática e nuclear, respectivamente). Nesse estudo não foi detectada mutação da β catenina e a expressão de

membrana estava preservada nas lesões serrilhadas. Por outro lado, YACHIDA et al. (2009) identificaram expressão nuclear da proteína somente em lesões serrilhadas que apresentavam a mutação *BRAF* V600E. Logo, nossos resultados são divergentes desses estudos e essas divergências podem ser decorrentes da ausência da mutação *BRAF* nas amostras avaliadas. Acreditamos que para uma análise mais minuciosa da questão seria necessária uma amostragem mais ampla.

Identificamos expressão nuclear da β catenina nas populações de adenomas de alto e baixo grau (61% das amostras, respectivamente), assim como, no grupo dos adenocarcinomas, porém com níveis de expressão inferiores aos dos adenomas e sem correlação com o grau de diferenciação das lesões. Os relatos científicos são categóricos ao afirmar o aumento da expressão nuclear da β catenina na seqüência adenoma-carcinoma, associado ao grau de displasia e a perda da diferenciação celular (HAO et al., 1997; WONG et al., 2004; HERTER et al., 1999; KOBAYASHI et al., 2000). Nossos dados não seguem esses padrões. Alguns fatores podem ter influenciado nesses resultados e citamos entre eles, o tamanho da amostragem e a heterogeneidade intrínseca dos tumores. ELZAGHEID et al. (2008) em um estudo sobre a expressão nuclear da β catenina como fator prognóstico no carcinoma colorretal avançado discutiram essas divergências nos relatos da literatura e citaram como fatores responsáveis por essa discrepância, a falta de padronização na avaliação dos resultados positivos e negativos, as diferenças entre os métodos imunoistoquímicos utilizados, além dos dois itens mencionados. Ao iniciarmos esse estudo, tínhamos conhecimento dessas variáveis e para minimizar seus efeitos, ao confeccionarmos os arranjos de matriz tecidual (TMA) que representavam toda a população dos adenocarcinomas, selecionamos cuidadosamente os casos e buscamos neoplasias com um padrão histológico mais uniforme, além de utilizar cortes histológicos com diferentes níveis de profundidade para uma mesma reação. A padronização da reação imunoistoquímica foi realizada não só no controle positivo recomendado pelo fabricante, mas também nos TMA. Após essa fase, iniciamos as reações e nelas incluímos novamente os arranjos teciduais ampliando assim a amostragem histológica.

A β catenina atua ainda como inibidor do NF- κ B, através de interação física, independente da regulação da I κ B- α e da via de sinalização TCF4, resultando na redução de ligação DNA NF- κ B e inibição da transativação NF- κ B. Portanto, a atividade reprimida do NF- κ B seria encontrada em células de câncer de cólon humano nas quais a β catenina estaria ativada. Além disso, a β catenina ativada inibiria também a expressão dos genes alvos do NF- κ B, como o Fas e o TRAF1 (DENG et al.; 2002).

Esse mecanismo justificaria a ausência de expressão do NF- κ B identificada em nosso estudo. Dessa forma, analisamos a relação entre a β catenina e o NF- κ B. A expressão anormal (citoplasmática e nuclear associadas) da β catenina foi observada em todo o espectro da seqüência adenoma-carcinoma, principalmente nas amostras que não exibiram expressão do NF- κ B [adenomas de baixo grau (34% dos casos), adenomas de alto grau (72% dos casos) e grupos dos adenocarcinomas (70% dos casos), bem, moderado e pouco diferenciado, respectivamente]. Portanto, nossos dados apontam a desregulação da β catenina como possível responsável pela inibição do NF- κ B detectada no presente estudo, conforme descrito por DENG et al. (2002).

Em relação às lesões serrilhadas, mesmo em face da ausência de expressão do NF- κ B em 89% das amostras com expressão citoplasmática da β catenina em 44% e expressão reduzida de membrana em 100% dos casos, nos parece pouco provável a atuação da β catenina como inibidora do κ B, haja vista as diferenças moleculares presentes nas vias de desenvolvimento dessas lesões comparadas aquelas da seqüência adenoma-carcinoma. YAMAMOTO et al. (2003) identificaram em um estudo a expressão citoplasmática da β catenina somente em uma pequena parcela de uma população constituída por adenomas serrilhados. Esses autores sugeriram que a mutação da β catenina teria uma contribuição questionável e pouco provável na tumorigênese serrilhada, assim como, a sua localização intracelular não estaria ligada aos eventos iniciais da progressão tumoral serrilhada.

A β catenina também participa na regulação da survivina. Esse mecanismo se dá através da sinalização Wnt, com indução do crescimento celular, por meio da ativação do c-myc e ciclina D1, e a transcrição do gene survivina (anti-apoptótico) mediada pela β catenina/TCF (CHANG et al. 2010).

Dessa forma, resolvemos investigar se a desregulação da β catenina também contribuiu para a desregulação da survivina, uma vez que, que os nossos resultados sinalizam a mutação da p53 como parte efetiva desse mecanismo que resultou na superexpressão da survivina.

Observamos sinais de desregulação da β catenina em toda seqüência adenoma-carcinoma (adenoma de baixo grau- alto grau- adenocarcinoma) traduzida pela expressão citoplasmática e nuclear dessa proteína acompanhada da superexpressão da survivina. Embora não tenhamos detectados níveis de expressão nuclear da β catenina diretamente proporcionais aos da survivina nessa população, acreditamos que a mutação da p53 associada à desregulação da β catenina possa ter contribuído para a desregulação da survivina. Os relatos

de literatura são enfáticos em relação à participação da survivina na patogênese molecular do CCR vinculada a proliferação celular e a resistência a apoptose, em decorrência da sinalização aberrante β catenina/TCF (KIM et al., 2003). CHANG et al.(2010) demonstraram que a regulação negativa da β catenina inibiria a proliferação de células cancerosas esofágicas e induziria a apoptose espontânea, reforçando assim, a importância desse mecanismo. Esses estudos corroboram os nossos achados e ressaltam a participação da β catenina na regulação da survivina.

As lesões serrilhadas também exibiram indícios de alteração da regulação da β catenina comprovada pela presença de expressão citoplasmática da proteína em 44% das amostras, porém sem expressão nuclear. Conforme descrevemos anteriormente, a mutação da β catenina tem contribuição questionável e pouco provável na tumorigênese nos tumores serrilhados segundo YAMAMOTO et al.(2003) e GARCÍA-SOLANO et al.(2012), e desta forma, não teria participação comprovada no mecanismo regulatório da survivina tal como aquele das lesões esporádicas.

A Figura 61 abaixo sintetiza as possíveis alterações observadas no processo de sobrevivência celular e apoptose nas populações dos adenocarcinomas e adenomas com displasia de alto grau.

Figura 61 - Representação esquemática do possível mecanismo molecular inibitório do NF- κ B e a desregulação da survivina nas populações de Adenocarcinomas e Adenomas com displasia de alto grau.

Estudos indicaram uma ligação direta entre a β catenina e a proteína p53 demonstrando que a desregulação da β catenina poderia induzir a estabilização do p53, levando a ativação de genes alvo p53 e, em contrapartida, promover a regulação decrescente da β catenina (LEVINA et al., 2004). MÅRTENSSON et al.(2007) demonstraram uma correlação significativa entre o acúmulo nuclear da β catenina, expressão anormal da p53 e aneuploidia em tumores colorretais. No presente estudo não observamos relação entre essas proteínas. Tanto a β catenina nuclear quanto a p53 mostraram expressão elevada em toda sequência adenoma-carcinoma, porém não foi observada uma correlação significativa entre os seus percentuais de expressão. Acreditamos que para uma análise mais aprofundada dessa questão seria necessário individualizar as populações especialmente o grupo de adenocarcinomas com uma amostragem mais ampla.

A expressão nuclear da β catenina tem sido indicada como um potencial fator prognóstico em portadores de CCR. WONG et al. (2003) observaram que pacientes com CCR e alta expressão nuclear da β catenina tinham maior incidência de metástases linfonodais e menor taxa de sobrevida global. BRABLETZ et al. (2005) relacionaram a expressão nuclear da β catenina ao processo de invasão e metástases. Diferentemente do relato desses autores, não detectamos relação entre a expressão nuclear da β catenina, grau avançado de estadiamento patológico e a presença de metástases. Nossos achados são coincidentes com os descritos por WANITSUWAN et al. (2008) que não identificaram associação entre a expressão nuclear dessa proteína e prognóstico no CCR.

Os processos de migração, invasão, metastatização e angiogênese representam importantes etapas na progressão neoplásica e dentro deste contexto, as metaloproteinases (MMP) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ocupam lugar de destaque.

As MMPs são enzimas proteolíticas que regulam inúmeras funções celulares, fundamentais para a gênese de neoplasias, progressão e comportamento biológico assim como, o crescimento celular, diferenciação, apoptose, migração, invasão e regulação da angiogênese e vigilância imunológica (EGLEBAD; WERB, 2002; SOARES et al., 2006; SHI et al., 2013).

As collagenases tipo IV, gelatinase A e B (MMP 2 e MMP 9, respectivamente) têm sido amplamente estudadas em modelos experimentais e no CCR humano. O aumento da expressão dessas metaloproteinases é parte do evento inicial da tumorigênese colorretal

associado com a degradação da membrana epitelial colônica (MYSLIWIEC; ORNSTEIN, 2002; FELIN et al., 2008).

No presente estudo identificamos elevação dos níveis de expressão da MMP 2 em todo o espectro da seqüência adenoma-carcinoma, mais evidentes na transição das lesões com displasia de baixo (6%) para alto grau (34%). Esses achados são coincidentes com os relatos de literatura que apontam o aumento de expressão da MMP 2 nas fases iniciais da carcinogênese colorretal, associando-a principalmente a transformação maligna, mas não obrigatoriamente ao potencial de malignidade (MYSLIWIEC; ORNSTEIN, 2002; FELIN et al., 2008). MURNANE et al. (2011) sugeriram que o nível elevado de atividade da MMP 2 possaserm um indicador de risco para o desenvolvimento do CCR e auxiliar na distinção entre adenomas colorretais com displasia de alto e de baixo grau, corroborando assim nossos dados. Em relação ao grupo de adenocarcinomas notamos níveis elevados de expressão da MMP 2, porém sem correlação com o grau de diferenciação tumoral, resultados concordantes com os estudos de FELIN et al. (2008).

Um caso na população controle exibiu expressão da MMPs 2 e 9. Este caso representava a margem cirúrgica livre de infiltração neoplásica de uma ressecção segmentar de CCR. MASSUDA; AOKI (1999) detectaram um aumento da expressão da MMP 2 e decréscimo do inibidor tecidual da metaloproteinase 2 (TIMP-2) em mucosa normal colônica, presente em peças cirúrgicas de ressecções segmentares de CCR, sugerindo que a mucosa adjacente ao tumor maligno não seja completamente normal e que essas alterações na MMP e TIMP ocorreriam antes mesmo da instalação tumoral, o que justificaria nossos resultados e provavelmente se aplicaria a MMP 9.

Não detectamos expressão imunoistoquímica das MMPs 2 e 9 no grupo das lesões serrilhadas. A via serrilhada de desenvolvimento do CCR representa um capítulo relativamente novo e promissor na literatura científica, carecendo de estudos voltados para o papel das MMPs no processo de progressão neoplásica serrilhada. Em vista disso, não obtivemos dados que pudéssemos comparar com os nossos achados.

Detectamos níveis de expressão crescentes da MMP 9 em toda seqüência adenoma-carcinoma, relacionados ao grau de diferenciação tumoral, assim como com o estágio avançado dos adenocarcinomas segundo sistema de classificação patológica TNM e a presença de metástases, indicando sua correlação com a progressão tumoral e com o prognóstico, aspectos concordantes com os relatos de MYSLIWIEC; ORNSTEIN, 2002; FELIN et al., 2008. ROH et al. (2010) e GOLOVKOV (2009) sugeriram que a expressão

aumentada MMP 9 no CCR esteja relacionada com menor diferenciação tumoral, maior risco de desenvolvimento de metástases hepáticas e portanto seja um bom indicador de prognóstico pós-operatório, corroborando nossos apontamentos.

A associação entre a expressão da MMP 2, a severidade do estágio tumoral nos adenocarcinomas e a presença de metástase foi menos relevante do que a observada em relação à MMP 9. Esses achados são coincidentes com os descritos por HONG et al. (2011) que também não observaram correlação entre a expressão da MMP 2 e o estágio tumoral, grau de diferenciação celular, metástases à distância, assim como com a recorrência tumoral.

A atividade das MMPs 2 e 9 é regulada por diversos mecanismos que envolvem interações célula-célula e célula-matriz, além do estímulo procedente de fatores de crescimento, ativação de pró-enzimas, inibição de enzima ativa por seus inibidores teciduais e através fatores de transcrição que podem ativar ou inativar a região do promotor da metaloproteinase (WESTERMARCK; KÄHÄRI, 1999; BASSÈRES; BALDWIN, 2006; PIOVESAN, 2011; STRONGIN et al., 1995). O NF- κ B é um desses fatores de transcrição que regula a ativação das MMPs, através de sítios κ B presentes nos promotores dos genes que as codificam (KARIN et al, 2002; BALDWIN, 2001; DRAGUTINOVIC et al., 2011). Assim sendo, analisamos a correlação entre a expressão das MMPs e do NF- κ B.

Não observamos associação entre os percentuais de expressão do NF- κ B ativado e a expressão das MMPs 2 e 9 nas populações estudadas. Um dos fatores que parece ter influenciado nos nossos resultados foi à inibição do fator nuclear κ B pela β catenina ativada, com aparente supressão da sua atividade, observada principalmente nos grupos dos adenocarcinomas e adenomas de alto grau. A β catenina tem sido relacionada à ativação da MMP7 e essa ativação se daria na presença da mutação no gene *APC*, que resultaria no acúmulo nuclear do complexo β catenina/ TCF, que por sua vez, atuaria como fator de transcrição na regulação positiva da MMP 7 (ZUCKER; VACIRCA, 2004). Logo a ativação das MMPs 2 e 9 observada no presente estudo ocorreu por outros mecanismos, aparentemente desvinculado do NF- κ B e que não foram avaliados no presente estudo.

A angiogênese é um fator essencial na formação de metástases e na disseminação tumoral. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), regulador positivo da angiogênese, é um potente fator mitogênico para o endotélio, gerando uma resposta angiogênica completa e aumento da permeabilidade vascular. O aumento da expressão do VEGF está associado a vários fatores, entre eles, a hipóxia, a degradação das proteínas

extracelulares pelas MMPs e a mutação do gene p53 (JOBIM et al., 2008). HUANG et al. (2000) e SHIBATA et al. (2002) relataram uma relação direta entre a atividade do NF- κ B e a expressão do VEGF. Nesses estudos sugeriram que a inibição da atividade do NF- κ B em câncer de ovário e de mama, respectivamente, diminuiria a expressão do VEGF.

O VEGF encontra-se superexpresso em várias neoplasias malignas humanas, tais como o câncer colorretal, carcinomas esofágicos, cânceres de mama, entre outros. No câncer colorretal tem sido correlacionado à progressão tumoral, aumento da incidência de metástases, menor taxa de sobrevida global e pior prognóstico (JALBÀ et al., 2011).

No nosso estudo detectamos superexpressão do VEGF somente nas populações de adenocarcinomas, com elevados percentuais de expressão no grupo dos poucos diferenciados (90% dos casos). Notamos que essa expressão foi pontual, limitada ao polo extremo da sequência adenoma-carcinoma, portanto, relacionada com a progressão da doença e com associação positiva com a presença de metástases. Esses achados estão em concordância com os relatos de literatura que associam a superexpressão do VEGF à progressão da doença, a estádios mais avançados e à presença de metástases; e enfatizam como achado usual, a ausência ou mínima expressão deste fator na mucosa normal colônica e em adenomas (BENDADARF et al., 2008; LEE et al., 2000).

A degradação da membrana basal e de componentes da matriz extracelular é condição necessária para que ocorram as metástases. Esse processo de destruição da matriz extracelular é orquestrado pelas metaloproteinases que ao clivar as proteínas extracelulares liberam o VEGF (JOBIM et al., 2008). Assim analisamos as relações entre as MMPs 2 e 9 e o VEGF.

Detectamos percentuais crescentes de expressão da MMP 9 na população dos adenocarcinomas relacionados à perda de diferenciação celular, ou seja, as lesões bem diferenciadas exibiram percentuais de expressão menores que as pouco diferenciadas. Essa tendência se manteve em relação ao VEGF, demonstrando uma possível interação e modulação entre essas proteínas. Em relação à MMP 2 notamos percentuais de expressão relevantes porém não relacionados a diferenciação celular e em níveis não proporcionais ao VEGF. Esses achados sugerem uma correlação mais significativa e harmônica entre a MMP 9 e o VEGF, aspectos concordantes com as observações de JOBIM et al. (2008) em um estudo sobre o câncer de mama. Não podemos descartar ainda a participação da MMP 2 nesse processo, embora nossos dados apontem para uma correlação menos significativa, porém não excludente e corroborada pela literatura. Relatos científicos comprovam a importância da MMP 2 na expressão do VEGF. CHETTY et al. (2010), por exemplo, demonstraram que a

supressão transcricional da MMP 2 poderia atenuar a angiogênese tumoral através da redução do VEGF (A) mediada pela via de sinalização integrina- α V β 3 e PI3K/AKT.

Vários autores têm correlacionado o VEGF à p53 no câncer colorretal, demonstrando que a proteína p53 não mutante poderia interromper o desenvolvimento tumoral através da regulação negativa da neoangiogênese (TAKAHASHI et al., 1998; PERRONE et al., 2004). Assim sendo, analisamos a correlação entre as proteínas.

Conforme descrevemos anteriormente a expressão do VEGF foi observada somente no grupo dos adenocarcinomas, nos quais a p53 exibiu níveis crescentes de expressão não relacionados com a perda de diferenciação celular, achados discordantes das observações de PERRONE et al. (2004). Acreditamos que a heterogeneidade intrínseca dos tumores associada ao tamanho amostral possam ter interferido nessa análise.

Nas demais populações, adenomas com displasia de alto e baixo grau, lesões serrilhadas, não foi observada associação entre a p53 e o VEGF. Nossos achados são similares aos descritos por KAKLAMANIS et al. (2006) em um estudo sobre a expressão do VEGF na sequência adenoma-carcinoma.

A ativação do VEGF pode ainda ser modulada pelo NF- κ B. Dentro desse contexto, avaliamos a relação entre a expressão do VEGF e do NF- κ B.

Não observamos associação entre a expressão do NF- κ B ativado e a expressão do VEGF nas populações estudadas. Acreditamos que a inibição do fator nuclear κ B pela β catenina ativada, justificaria esses resultados tal como observamos na correlação entre as metaloproteinases e o NF- κ B. VAISH, SANYAL (2012) acreditam que a sinalização aberrante da β catenina possa regular positivamente o VEGF. Aplicando esse raciocínio a nossa questão, sugerimos que a desregulação da β catenina possivelmente teve papel relevante no mecanismo de ativação do VEGF, comprovado pelos níveis de expressão detectados no grupo dos adenocarcinomas.

O nosso estudo comprovou a complexidade dos mecanismos regulatórios da sobrevivência celular orquestrados pelo NF- κ B e survivina na progressão do câncer colorretal e elevou a β catenina ao patamar de grande protagonista. O NF- κ B sempre foi considerado grande alvo terapêutico no tratamento do câncer colorretal, principalmente em função do seu papel como anti-apoptótico e modulador das vias de invasão e angiogênese através da ativação das metaloproteinases e do fator de crescimento endotelial vascular. Os nossos dados não ratificam essas ações.

O potencial de malignidade das lesões neoplásicas avaliadas prevaleceu através dos mecanismos iniciais da carcinogênese colorretal, descritos por VOLLSTEIN, FEARON (1998), com desregulação da β catenina estabelecendo uma rota à sobrevivência celular através da desregulação da survivina. A survivina, proteína multifuncional, eficientemente desempenhou seu papel anti-apoptótico através de supressão da ação efetiva da caspase 3 e garantiu dessa forma à sobrevivência celular, haja vista os baixos percentuais de apoptose detectados principalmente nas populações dos adenocarcinomas e adenomas com displasia de alto grau. A mutação p53, por sua vez, também se associou e atuou brilhantemente na via de sobrevivência celular e na regulação e ativação da survivina.

Diante do exposto, concluímos que a survivina emerge como potencial alvo terapêutico no controle do câncer colorretal, ratificando estudos anteriores (HERNANDEZ et al., 2011; WALIGÓRSKA-STACHURA et al., 2012). A desregulação da β catenina teve grande repercussão nos mecanismos de sobrevivência celular garantindo, na vigência da inibição do NF- κ B, a perpetuação da proliferação celular através da ativação da survivina.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

6.1.1 Não foi observada expressão imunoistoquímica do NF- κ B na maioria das amostras de adenocarcinomas, de adenomas de alto grau e de lesões serrilhadas. As populações de adenoma de baixo grau e de controle exibiram expressão imunoistoquímica do NF- κ B em grande parte dos casos. A expressão imunoistoquímica da survivina foi crescente em toda sequência adenoma-carcinoma, sem aparente modulação pelo NF- κ B, com ação anti-apoptótica eficiente, com exceção dos grupos de adenoma de baixo grau e controle, suprimindo aparentemente a atividade da caspase 3 que exibiu níveis elevados de expressão, corroborada pelos baixos níveis de apoptose detectada ao método do túnel. A survivina aparentemente também atuou na supressão de apoptose no grupo das lesões serrilhadas.

Não se detectou indícios de suposta modulação entre as proteínas NF- κ B, TNFR1 e proibitina citoplasmática no presente estudo. Níveis crescentes de expressão imunoistoquímica citoplasmática da proibitina foram identificados na sequência adenoma-carcinoma suscitando a hipótese de possível atuação como pró-tumorigênica. As lesões serrilhadas apresentaram níveis de expressão imunoistoquímica do TNFR1 e da proibitina citoplasmática divergentes das demais populações, provavelmente decorrente das diferenças moleculares existentes entre os mecanismos de desenvolvimento das lesões serrilhadas e das esporádicas.

Observou-se expressão nuclear da proibitina nos grupos dos adenomas com displasia de baixo e alto grau, e adenocarcinomas pouco diferenciados. No primeiro grupo, os percentuais de expressão imunoistoquímica da proibitina nuclear e do NF- κ B sugerem uma possível modulação positiva de apoptose exercida em associação pelas duas proteínas. Na população de adenomas com displasia de alto grau observamos um equilíbrio de ações pró e anti-apoptóticas. Em relação ao grupo dos adenocarcinomas pouco diferenciados houve predomínio das ações anti-apoptóticas provavelmente exercida pela survivina, com baixa taxa de apoptose, ausência de expressão do NF- κ B na grande maioria dos casos.

- 6.1.2 A expressão imunoistoquímica da proteína p53 foi observada em toda seqüência adenoma-carcinoma, não correlacionada com a perda da diferenciação celular na população dos adenocarcinomas, relacionada ao grau de displasia nos grupos dos adenomas e a desregulação da survivina. As lesões serrilhadas não exibiram positividade para a p53, embora tenham apresentado alta de expressão da survivina, com provável mecanismo molecular regulatório divergente da via esporádica. A imunodeteção para a p53 e a survivina foi negativa no grupo controle.

Na população de adenomas de baixo grau, prevaleceu à modulação positiva de apoptose comandada pela proibirina nuclear (promove a atividade transcricional p53 não mutante) que possivelmente atuou associada ao NF- κ B. Em relação, ao grupo de adenomas de alto grau verificou-se um equilíbrio de ações pró-(proibirina nuclear) e anti-apoptóticas (survivina), com detecção de apoptose em metade dos casos. Na população de adenocarcinomas pouco diferenciados observou-se predomínio da ação anti-apoptótica da survivina.

- 6.1.3 A análise da expressão imunoistoquímica da β catenina revelou redução da expressão de membrana e expressão citoplasmática em toda população dos adenocarcinomas e dos adenomas de alto e baixo grau. As lesões serrilhadas apresentaram expressão reduzida de membrana e ausência de expressão nuclear em todas as amostras, e expressão citoplasmática em pequena parcela da população. O grupo controle exibiu expressão de membrana preservada, ausência de expressão citoplasmática e nuclear. As populações de adenomas de baixo e alto grau e adenocarcinomas mostraram expressão nuclear da β catenina, que não se relacionou com o grau de displasia e a perda da diferenciação celular.

Nossos dados sugerem a desregulação da β catenina como possível responsável pela inibição do NF- κ B detectada nos grupos dos adenomas com displasia de alto grau e adenocarcinomas. Em relação às lesões serrilhadas, não houve indícios de suposta inibição do fator nuclear κ B pela β catenina.

A desregulação da β catenina parece ter contribuído para a desregulação da survivina juntamente com a mutação p53 detectada na seqüência adenoma-

carcinoma. Em relação às lesões serrilhadas, não houve indícios sugestivos desse mecanismo.

No presente estudo não foi observada associação direta entre os percentuais de expressão imunoistoquímica da β catenina nuclear e a expressão da proteína p53, principalmente nos adenocarcinomas.

Não foi observada associação positiva entre a expressão nuclear da β catenina, o grau do estadiamento patológico e à presença de metástases.

- 6.1.4 Identificou-se níveis crescentes de expressão imunoistoquímica das metaloproteinases 2 e 9 na seqüência adenoma-carcinoma relacionados com à progressão tumoral. Não foi detectada expressão imunoistoquímica das metaloproteinases 2 e 9 nas lesões serrilhadas. Um caso da população controle exibiu expressão imunoistoquímica das duas metaloproteinases.

Observou-se associação entre os níveis crescentes de expressão imunoistoquímica da metaloproteinase 9 e o grau de diferenciação tumoral, o estágio avançado na população de adenocarcinomas e a presença de metástases. Essa associação foi menos relevante em relação à metaloproteinase 2.

Não foi detectada associação entre a expressão das metaloproteinases 2 e 9 e a expressão do NF-KB no presente estudo.

- 6.1.5. A expressão imunoistoquímica do fator de crescimento endotelial vascular foi identificada somente na população dos adenocarcinomas, relacionada à progressão da doença, perda da diferenciação celular e à presença de metástases.

Observou-se indícios de uma possível interação e modulação entre o fator de crescimento endotelial vascular e a metaloproteinase 9 no grupo dos adenocarcinomas. Essa associação não foi relevante em relação à metaloproteinase 2.

Não foi observada uma associação direta entre os percentuais de expressão imunoistoquímica do fator de crescimento endotelial vascular e da proteína p53 na população dos adenocarcinomas.

Não foi observada associação entre a expressão do fator de crescimento endotelial vascular e a expressão do NF- κ B na população dos adenocarcinomas.

O nosso estudo corrobora a importância da β catenina nos mecanismos moleculares modulatórios de sobrevivência celular, invasão e angiogênese em toda seqüência adenoma-carcinoma, e seu papel na inibição do NF- κ B. Nossos dados confirmam a relevância da survivina no processo de sobrevivência celular ratificando seu potencial como alvo terapêutico.

No estudo atual, as lesões serrilhadas representaram um capítulo à parte, mesmo em face do número limitado de amostras. A ausência de expressão do NF- κ B identificada em grande parcela dessa população e a superexpressão da survivina não relacionada à mutação p53, representam um terreno fértil para investigações futuras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER- **CANCER STAGING MANUAL**. Part III- Digestive System- Colon and Rectum p.173-206, 2010. EE: Edge S.B.; Byrd D.R.; Compton, C.C.; Fritz, A.G.; Greene, F.L.; Trotti, A. 7^a edition. Springer, New York.

AOTAKE, T.; LU, C.D.; CHIBA, Y.; MURAOKA, R.; TANIGAWA, N. Changes of angiogenesis and tumor cell apoptosis during colorectal carcinogenesis. **Clin Cancer Res**, Denville, v.5, n.1, p.135-142, 1999.

ARANHA, M.M.; BORRALHO, P.M.; RAVASCO, P.; MOREIRA DA SILVA, I.B.; CORREIA, L.; FERNANDES, A.; CAMILO, M.E.; RODRIGUES, C.M. NF-kappa B and apoptosis in colorectal tumorigenesis. **Eur J Clin Invest**, Berlin, v.37, n.5, p.416-424, 2007.

ARTAL-SANZ, M.; TAVERNARAKIS, N. Opposing function of mitochondrial prohibitin in aging. **Aging**, Albany, v.2, n.12, p.1004-1011, 2010.

AUST, D.E.; BARETTON G.B. Serrated polyps of the colon and rectum (hyperplastic polyps, sessile serrated adenomas, traditional serrated adenomas, and mixed polyps)- proposal for diagnosis criteria. **Virchows Arch**, Berlin, v.457, n.3, p.291-297, 2010.

BALDWIN, A.S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. **J Clin Invest**, New Haven, v.107, n.3, p.241-246, 2001.

BARRESI, V.; REGGIANI-BONETTI, L.; DI GREGORIO, C.; VITARELLI, E.; DE LEON, M.P.; BARRESI, G. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) prognostic value in stage I colorectal carcinoma. **Pathol Res Pract**, Stuttgart, v.207, n.8, p.479-486, 2011.

BASSÈRES, D.S.; BALDWIN, A.S. Nuclear factor- κ B and inhibitor of κ B kinase pathways in oncogenic initiation and progression. **Oncogene**, Basingstoke, v.25, n.51, p.6817-6830, 2006.

BAUVOIS, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v.1825, n.1, p.29-36, 2012.

BENDARDAF, R.; BUHMEIDA, A.; HILSKA, M.; LAATO, M.; SYRJÄNEN, S.; SYRJÄNEN, K.; COLLAN, Y.; PYRHÖNEN, S. VEGF-1 expression in colorectal cancer is

associated with disease localization, stage, and long-term disease-specific survival. **Anticancer Res**, Athens, v.28, n.6B, p.3865-3870, 2008.

BIENZ, M.;CLEVERS, H.Linking colorectal cancer to Wnt signaling. **Cell**, Cambridge, v.103, n.2, p.311-320, 2000.

BOND, M.; FABUNMI, R.P.; BAKER, A.H.; NEWBY, A.C. Synergistic up regulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.435, n.1, p.29-34, 1998.

BRABLETZ,T.; HLUBEK,F.; SPADERNA,S.; SCHMALHOFER,O.; HIENDLMEYER, E.; JUNG, A.; KIRCHNER, T. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. **Cells Tissues Organs**, Basel, v.179, n.1-2, p.56-65, 2005.

CECON, E. **Fator de transcrição NF KB nas glândulas pineais de ratos**. 2010. 138 folhas. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CHANG, E.; DONAHUE, J.; SMITH, A.; HORNICK, J.; RAO, J.N.; WANG, J.Y.; BATTAFARANO, R.J. Loss of p53, rather than beta-catenin overexpression, induces survivin-mediated resistance to apoptosis in an esophageal cancer cell line. **J Thorac Cardiovasc Surg**, St. Louis, v.140, n.1, p.225-232, 2010.

CHATURVEDI, M.M.; SUNG, B.; YADAV, V.R. KANNAPPAN, R.; AGGARWAL, B.B. NF- κ B addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. **Oncogene**, Basingstoke, v.30, n.14, p.1615-1630, 2011.

CHEN, D.; CHEN, F.; LU, X.; YANG, X.; XU, Z.; PAN, J.; HUANG, Y.; LIN, H.; CHI, P. Identification of prohibitin as a potential biomarker for colorectal carcinoma based on proteomics technology. **Int J Oncol**, Athens, v.37, n.2, p.355-365, 2010.

CHEN, G.; GOEDDEL, D.V. TNFR1 signaling: a beautiful pathway. **Science**, New York, v.296, n.5573, p.1634-1635, 2002.

CHETTY, C.; LAKKA, S.S.; BHOOPATHI, P.; RAO, J.S. MMP-2 alters VEGF expression via α V β 3 integrin-mediated PI3K/AKT signaling in A549 lung cancer cells. **Int J Cancer**, Genève, v. 127, n.5, p.1081-1095, 2010.

CURRAN, S.; DUNDAS, S. R.; BUXTON, J.; LEEMAN, M. F.; RAMSA, Y. R.; MURRAY, G. I. Matrix metalloproteinase (MMP/TIMP) phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. **Clin Cancer Res**, Denville, v.10, n.24, 8229-34, 2004.

CZARNECKA, A.M.; CAMPANELLA, C.; ZUMMO, G.; CAPPELLO, F. Mitochondrial chaperones in cancer: from molecular biology to clinical diagnostics. **Cancer Biol Ther**, Georgetown, v.5, n.7, p.714-20. 2006.

DE OLIVEIRA LIMA, F.; DE OLIVEIRA COSTA, H.; BARREZUETA, L.F.; FUJIYAMA OSHIMA, C.T.; SILVA, J.A. JR.; GOMES, T.S.; PINHEIRO, N. JR.; NETO, R.A.; FRANCO, M. Immunoexpression of inhibitors of apoptosis proteins and their antagonist SMAC/DIABLO in colorectal carcinoma: correlation with apoptotic index, cellular proliferation and prognosis. **Oncol Rep**, Athens, v.22, n.2, p.295-303, 2009.

DELLA PORTA, L. **A ativação do fator nuclear Kappa-B versus a inibição da proibitina no desenvolvimento do câncer hepático em humanos**. 2011. 105 folhas. Dissertação de Mestrado; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

DENG, J.; MILLER, S.A.; WANG, H.Y.; XIA, W.; WEN, Y.; ZHOU, B.P.; LI, Y.; LIN, S.Y.; HUNG, M.C. Beta-catenin interacts with and inhibits NF-kappa B in human colon and breast cancer. **Cancer Cell**, Cambridge, v.2, n.4, p.323-34, 2002.

DONG, W.; LI, H.; ZHANG, Y.; YANG, H.; GUO, M.; LI, L.; LIU, T. Matrix metalloproteinase 2 promotes cell growth and invasion in colorectal cancer. **Acta Biochim Biophys Sin**, Shanghai, v.43, n.11, p.840-848, 2011.

DRAGUTINOVIC', V.V.; RADONJIC', N.V.; PETRONJEVIC', N.N.; TATIC', S.B.; DIMITRIJEVIC', I.B.; RADOVANOVIC', N.S.; KRIVOKAPIC', Z.V. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and -9 (MMP-9) in preoperative serum as independent prognostic markers in patients with colorectal cancer. **Mol Cell Biochem**, The Hague, v.355, n.1-2, p.173-178, 2011.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, London, v.2, n.3, p.161-174 2002.

ELZAGHEID, A.; BUHMEIDA, A.; KORKEJA, E.; COLLAN, Y.; SYRJÄNEN, K.; PYRHÖNEN, S. Nuclear β catenin expression as a prognostic factor in advanced colorectal carcinoma. **World J Gastroenterol**, Beijing, v. 14, n.24, p. 3866-3871, 2008.

FEARON, E. Molecular genetics of colorectal cancer. **Annu Rev Pathol**, Palo Alto, v.6, p.479-507, 2011.

FEARON, E.R.; VOLGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, Cambridge, v.61, n.5, p.759-67, 1990.

FELIN, C. R.; ROCHA, A. B.; FELIN, I. P. D.; GRIVICICH, I. Expressão das metaloproteinases 2 e 9 em adenocarcinoma colorretal. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v.52, n.4, p.291-297, 2008.

FELIN, I. P. D.; GRIVICICH, I.; FELIN, C. R.; FEDRIGO, C. A.; ROCHA, A. B. Expressão imuno-histoquímica das metaloproteinases 2 e 9 não está associada à progressão do carcinoma de células escamosas de esôfago. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.45, n.4, p.317-323, 2009.

FENOGLIO-PREISER, C.M.; STEMMERMANN, G.N.; LANTZ, P.E.; ISAACSON, P.G. In: **Gastrointestinal pathology: an atlas and text**. Chapter 14- Epithelial neoplasms of the colon, page: 899-1035. EE: Fenoglio-Preiser CM, Stemmermann GN, Lantz PE, Isaacson PG. 2008, 3rd edition, Lippincott Williams & Williams, Philadelphia.

FERLAY J, SHIN H-R, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C, PARKIN DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer**, Genève, v.127, n.12, p.2893-2917, 2010.

FERREIRA, F.O. Câncer colo-retal esporádico: modelo para a compreensão da carcinogênese – Principais eventos moleculares do desenvolvimento do câncer colorretal. www.geth.org.br, 20 august 2009; 14:44.

FERREIRA, S. S. **Expressão de survivina em tumores do estroma gastrointestinal**. 2007. 70 folhas. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

FISHER, RA. The logic of inductive inference. **J R Statist Soc**, London, v.98, n.1, p. 39-82, 1935.

FRANCO, D.G. Fator de transcrição nuclear Kappa no sistema nervoso central: do fisiológico ao patológico. *Revista da Biologia*- www.ib.usp.br/revista volume 4- 35-39, junho, 2010; acessado em 17/10/2011.

FU, B.; YACHIDA, S.; MORGAN, R.; ZHONG, Y.; MONTGOMERY, E.A.; IACOBUZIO-DONAHUE C.A. Clinicopathological and genetic characterization of traditional serrated adenomas of the colon. **Am J Clin Pathol**, Philadelphia, v.138, n.3, p. 356-366, 2012.

FUSARO, G.; DASGUPTA, P.; RASTOGI, S.; JOSHI, B.; CHELLAPPAN, S. Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from nucleus upon apoptotic signaling. **J Biol Chem**, Baltimore, v.278, n. 48, p.47853-47861, 2003.

GARCÍA-SOLANO, J.; CONESA-ZAMORA, P.; TRUJILLO-SANTOS, J.; TORRES-MORENO, D.; MÄKINEN, M.J.; PÉREZ-GUILLERMO, M. Immunohistochemical expression profile of β -catenin, E-cadherin, P-cadherin, laminin-5 γ 2 chain, and SMAD4 in colorectal serrated adenocarcinoma. **Hum Pathol**, Philadelphia, v.43, n.7, p.1094-1102, 2012.

GIORDANO, R. J.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Mecanismos de angiogênese e metástase. In: **Oncologia Molecular**. Eds: Ferreira C G, Rocha JC. Editora Atheneu, 2ª Edição, 2010; Capítulo 10: 139-149.

GLEZER, I.; MARCOURAKIS, T.; AVELLAR, M.C.W.; GORENSTEIN, C.; SCAVONE, C. O fator de transcrição NF-kB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v.22, n.1, p.26-30, 2000.

GOLOVKOV, D. A. Key enzymes of the extracellular matrix in colorectal cancer. **Bull Exp Biol Med**, New York, v.147 n.3, p.353-356, 2009.

GREENSON, J.K. Colorectal adenocarcinoma In: **Diagnostic pathology gastrointestinal**. EE: Greenson JK, Lamps LW, Montgomery EA, Owens SR, Polydorides AD, Lauwers GY, Purdy JK, Bihlmeyer SK, Srivastava A. 1st edition, 2010, Amirsys, Inc, Salt Lake City, Utah, ch5, p.124-133.

GRIMM, M.; KIM, M.; ROSENWALD, A.; VON RAHDEN, B.; TSAUR, I.; MEIER, E.; HEEMANN, U.; GERMER, C.T.; GASSER, M.; WAAGA-GASSER, A.M. Tumour-mediated TRAIL-Receptor expression indicates effective apoptotic depletion of infiltrating CD8+ immune cells in clinical colorectal cancer. **Eur J Cancer**, Oxford, v.46, n.12, p.2314-23, 2010.

GRIZZLE, W.E.; MYERS, R.B.; MANNE, U.; SRIVASTAVA, S. Immunohistochemical evaluation of biomarkers in prostatic and colorectal neoplasia. In: **Tumor Marker Protocols, Methods in Molecular Medicine**. Eds: Hanausek M, Walaszek Z, 1998. Humana Press, Totowa, NJ, v.14, p.143-160.

HAMILTON, S.R.; BOSMAN, F.T.; BOFFETTA, P.; LLYAS, M.; MORREAU, H.; NAKAMURA, S-I.; QUIRKE, P.; RIBOLI, E.; SOBIN, L.H. Carcinoma of the colon and rectum. In: **WHO Classification of Tumours of the Digestive System**, Eds: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. International Agency for Research on Cancer (IARC), 4th Edition, Lyon, France, 2010. chapter 8: 131-146.

HANDJARI, D.R.; ABINENO, P.; SIREGAR, B. Subcellular localization of beta catenin in colorectal non neoplastic and neoplastic lesions. **Makara, Kesehatan**, v.15, n.2, p.86-92, 2011.

HAO, X. P.; PRETLOW, T. G.; RAO, J. S.; PRETLOW, T. P. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is expressed similarly in multiple aberrant crypt foci and colorectal tumors from the same patients. **Cancer Res**, Chicago, v.61, n.2, p.419-422, 2001.

HAO, X.; TOMLINSON, I.; ILYAS, M.; PALAZZO, J. P.; TALBOT, I. C. Reciprocity between membranous and nuclear expression of b-catenin in colorectal tumours. **Virchows Arch**, Berlin, v.431, n.3, p.167-172, 1997.

HARDWICK, J.C.; VAN DEN BRINK, G.R.; OFFERHAUS, G.J.; VAN DEVENTER, S.J.; PEPPELENBOSCH, M.P. NF-kappaB, p38 MAPK and JNK are highly expressed and active in the stroma of human colonic adenomatous polyps. **Oncogene**, Basingstoke, v.20, n.7, p.819-827, 2001

HERNANDEZ, J.M.; FARMA, J.M.; COPPOLA, D.; HAKAM, A.; FULP, W.J.; CHEN, D.T.; SIEGEL, E.M.; YEATMAN, T.J.; SHIBATA, D. Expression of the antiapoptotic protein surviving in colon cancer. **Clin Colorectal Cancer**, Dallas, v.10, n.3, p.188-193, 2011.

HERNÁNDEZ-PRESA, M. A.; GÓMEZ-GUERRERO, C.; EGIDO, J. In situ non-radioactive detection of nuclear factors in paraffin sections by Southwestern histochemistry. **Kidney Int**, New York, v.55, n.1, p.209-214, 1999.

HERTER, P.; KUHNENE, C.; MÜLLER, K-M; WITTINGHOFER, A.; MÜLLER, O. Intracellular distribution of β -catenin in colorectal adenomas, carcinomas and Peutz-Jeghers polyps. **J Cancer Res Clin Oncol**, Berlin, v.125, n.5, p.297-304, 1999.

HONG, S.W.; KANG, Y.K.; LEE, B.; LEE, W.Y.; JANG, Y.G.; PAIK, I.W.; LEE, H. Matrix metalloproteinase-2 and -7 expression in colorectal cancer. **J Korean Soc Coloproctol**, Seoul, v.27, n.3, p.133-139, 2011.

HORST, D.; REU, S.; KRIEGL, L.; ENGEL, J.; KIRCHNER, T.; JUNG, A. The intratumoral distribution of nuclear beta-catenin is a prognostic marker in colon cancer. **Cancer**, New York, v.115, n.10, p. 2063-2070, 2009.

HUANG, M.;WANG, Y.;SUN, D.;ZHU, H.;YIN, Y.;ZHANG, W.;YANG, S.;QUAN, L.;BAI, J.;WANG, S.;CHEN, Q.;LI, S.XU, N. Identification of genes regulated by Wnt/beta-catenin pathway and involved in apoptosis via microarray analysis. **BMC Cancer**, London, v.6, p. 221-232, 2006.

HUANG, S.; ROBINSON, J.B.; DEGUZMAN, A.; BUCANA, C.D.; FIDLER, I.J. Blockade of nuclear factor-kappa B signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growthfactor and interleukin 8. **Cancer Res**, Chicago, v.60, n.19, p.5334–5339, 2000.

HUANG, S; PETTAWAY,C. A.; UEHARA, H.;BUCANA, C. D.; FIDLER, I. J.; Blockade of NF-Kappa B activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. **Oncogene**, Basingstoke, v.20 n.31 p.4188-4197. 2001.

HUH, J.W.; LEE, J.H.; KIM, H.R. Expression of p16, p53, and Ki-67 in colorectal adenocarcinoma: a study of 356 surgically resected cases. **Hepatogastroenterology**, Stuttgart, v. 57, n.101, p.734-740, 2010.

IŞLEKEL, H.; OKTAY, G.; TERZI, C.; CANDAL, A.E.; FÜZÜN, M.;KÜPELİOĞLU, A. Matrix metalloproteinase-9, -3 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables. **Cell Biochem Funct**, Guildford, v.25, n.4, p.433-441, 2007.

JALBĂ, C.S.; JALBĂ, B.A.; NICULA, C.; ZLATIAN, O.; IOANA, M.; BÂRCĂ, A.; CIMPOERU, A.; CRUCE, M. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor-A in colorectal cancer. **Rom J Morphol Embryol**, Bucuresti, v.52, n.3, p.775–781, 2011.

JASS, J.R.; BAKER, K.; ZLOBEC, I.; HIGUCHI, T.; BARKER, M.; BUCHANAN, D.; YOUNG, J. Advanced colorectal polyps with the molecular and morphological features of serrated polyps and adenomas: concept of a “fusion” pathway to colorectal cancer. **Histopathology**, Oxford, v.49, n.2, p.121-131, 2006.

JASS, J.R.; Tumors of the small and large intestines. In: **Diagnostic Histopathology of tumors**. Ed: Christopher D.M. Fletcher. Churchill Livingstone- Elsevier, 3ª edição, 2007; Chapter 9: 379-416.

JEYASURIA, P.; SUBEDI, K.; SURESH, A.; CONDON, J.C. Elevated levels of uterine anti-apoptotic signaling may activate NF- κ B and potentially confer resistance to caspase-3 mediated apoptotic cell death during pregnancy in mice. **Biol Reprod**, New York, v.85, n.2, p.417-24, 2011.

JIANG, Y.; SAAVEDRA, H.I.; HOLLOWAY, M.P.; LEONE, G.; ALTURA, R.A. Aberrant regulation of surviving by the RB/E2F family of proteins. **J Biol Chem**. Baltimore, v.279, n.39, p.40511-40520, 2004.

JOBIM, F.C.; SCHWARTSMANN, G.; XAVIER, N.L.; UCHOA, D.M.; SACIOTO, M.; CHEMELLO, N. Expressão da MMP-9 e do VEGF no câncer de mama: correlação com outros indicadores de prognóstico. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v.30, n.6, p.287-293, 2008.

JOSHI, B.; RASTOGI, S.; MORRIS, M.; CARASTRO, L.M.; DeCOOK, C.; SETO, E.; CHELLAPPAN, S.P. Differential regulation of human YY1 and caspase 7 promoters by prohibitin through E2F1 and p53 binding sites. **Biochem J**, London, v.40, n.1, p. 155-166, 2007.

KARIN, M.; CAO, Y.; GRETEN, F.R.; LI, Z.W. NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. **Nat Rev Cancer**, London, v.2, n.4, p.301-310, 2002.

KAWASAKI, H.; TOYODA, M.; SHINOHARA, H.; OKUDA, J.; WATANABE, I.; YAMAMOTO, T.; TANAKA, K.; TENJO, T.; TANIGAWA, N. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. **Cancer**, New York, v.91, n.11, p.2026-2032, 2001.

KIM, P.J.; PLESCIA, J.; CLEVERS, H.; FEARON, E.R.; ALTIERI, D.C. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. **Lancet**, London, v.362, n.9379, p.205-209, 2003.

KOBAYASHI, M.; HONNA, T.; MATSUDA, Y.; SUZUKI, Y.; NARISAWA, R.; AJIOKA, Y.; ASAKURA, H. Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. **Br J Cancer**, London, v.82 n.10, p.1689-93, 2000.

- KRIETE, A.; MAYO, K.L. Atypical pathways of NF-KB activation and aging. **Exp Gerontol**, Oxford, v.44, n.4, p.250-255, 2009.
- LANZA, G.; MESSERINI, L.; GAFÀ, R.; RISIO, M. Colorectal tumours: The histology report. **Dig Liver Dis**, Roma, v.43, n.Suppl 4, p.344-355, 2011.
- LEE, J.C.; CHOW, N.H.; WANG, S.T.; HUANG, S.M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. **Eur J Cancer**, Oxford, n.6, p.748-753, 2000.
- LEVINA, E.; OREN, M.; BEN-ZE'EV, A. Downregulation of beta-catenin by p53 involves changes in the rate of beta-catenin phosphorylation and Axin dynamics. **Oncogene**, Hampshire, v.23, n.25, p.4444-4453, 2004.
- LI, Q.; WANG, D.; LI, J.; CHEN, P. Clinicopathological and prognostic significance of HER-2/neu and VEGF expression in colon carcinomas. **BMC Cancer**, London, v.11, p.277-282, 2011.
- LIN, L.J.; ZHENG, C.Q.; JIN, Y.; MA, Y.; JIANG, W.G.; MA, T. Expression of survivin protein in human colorectal carcinogenesis. **World J Gastroenterol.**, Beijing, v.9, n.5, p.974-977, 2003.
- LIND, D.S.; HOCHWALD, S.N.; MALATY, J.; REKKAS, S.; HEBIG,P.; MISHRA,G.; MOLDAWER, L.L.; COPELAND III, E.M.; MACKAY, S. Nuclear factor- κ B is upregulated in colorectal cancer. **Surgery**, St. Louis, v.130, n.2, p. 123-402, 2001.
- LYALL, M.S.; DUNDAS, S.R.; CURRAN, S.; MURRAY, G.I. Profiling markers of prognosis in colorectal cancer. **Clin Cancer Res**, Denville, v.12, n.4, p.1184-1191, 2006.
- MARKOWITZ, S.D.; BERTAGNOLLI, M.M. Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer. **New Engl J Med**, Boston, v.361, n.25, p.2449-2460, 2009.
- MARSONI, S.; DAMIA, G. Molecular targeting: new therapeutic strategies to improve tumour apoptosis. **Ann Oncol.**, Dordrecht, v.15, Suppl 4, p.229-31, 2004.
- MÅRTENSSON, A.; OBERG, A.; JUNG, A.; CEDERQUIST. K.; STENLING, R.; PALMQVIST, R.; Beta-catenin expression in relation to genetic instability and prognosis in colorectal cancer. **Oncol Rep**. Athens, Greece 2007 Feb;17(2):447-52.

MASSUDA, H.; AOKI, H. Host expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in normal colon tissue affects metastatic potencial of colorectal cancer. **Dis Colon Rectum**, Philadelphia, v.42, n.3, p. 393-397, 1999.

MCKAY, J. A.; DOUGLAS, J. J.; ROSS, V. G.; CURRAN, S.; LOANE, J. F.; AHMED, F. Y.; CASSIDY, J.; MCLEOD, H. L.; MURRAY, G. I. Analysis of Key cell-cycle checkpoint proteins in colorectal tumors. **J Pathol**, London, v.196, n.4, p.386-393, 2002.

MEIRELLES, L.R.; CARVALHO, R.B. Tumores do trato gastrointestinal. In: **Patologia Diagnóstica de Tumores**. Eds: Billis A, Altemani A, Andrade L. Impressão Digital do Brasil. 2ª edição. Campinas. 2010,Capítulo 9, p.362-370.

MESSICK, C.A.; CHURCH, J.; BENNETT, A.; KALADY, M.F. Serrated polyps: New classifications highlight clinical importance. **Colorectal Dis**, Oxford, v.14, n.11, p.1328-1337, 2012.

MI, B.; WANG, X.; BAI, Y.; GONG, W.; WANG, X.; GENG, Y.; WANG, J.; ZHANG, H.;JIANG, B. Beta-catenin expression is altered in dysplastic and nondysplastic aberrant crypt foci of human colon. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, Hagerstown, v.17, n.4, p.294-300, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Câncer Colo-retal. Epidemiologia- Estimativa de Incidência do Câncer no Brasil para 2012**. INCA Portal de Serviços do Governo, www.inca.org.br em 11-01-2012.

MIRZAYANS, R.; ANDRAIS, B.; SCOTT, A.; MURRAY, D. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. **J Biomed Biotechnol**, Akron, v. 2012, ID 170325, doi: 10.1155/2012/170325.

MURNANE, M.J.; CAI, J.; SHUJA, S.; MCANENY, D.; WILLTT, J.B. Active matrix metalloproteinase-2 activity discriminates colonic mucosa, adenomas with and without high-grade dysplasia, and cancers. **Human Pathol**, Philadelphia, v.42, n.5, p.699-701, 2011.

MYSLIWIEC,A.G.; ORNSTEIN,D.L. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer. **Clin Colorectal Cancer**, Dallas, v.1, n.4, p.208-19, 2002.

NACCARATI, A.; POLAKOVA, V.; PARDINI, B.; VODICKOVA, L.; HEMMINKI, K.; KUMAR, R.; VODICKA, P. Mutations and polymorphisms in TP53 gene--an overview on the role in colorectal cancer. **Mutagenesis**, Oxford, v.27, n.2, p.211-218, 2012.

NEUMAN, J.; HORST, D.; KRIEGL, L.; MAATZ, S.; ENGEL, J.; JUNG, A.; KIRCHNER, T. A simple immunohistochemical algorithm predicts the risk of distant metastases in right-sided colon cancer. **Histopathology**, Oxford, v. 60, n.3, p. 416-426, 2012.

NIELSEN, M.; MIRANDA, N.F.; VAN PUIJENBROEK, M.; JORDANOVA, E.S.; MIDDELDORP, A.; VAN WEZEL, T.; VAN EIJK, R.; TOPS, C.M.; VASEN, H.F.; HES, F.J.; MORREAU, H. Colorectal carcinomas in MUTYH-associated polyposis display histopathological similarities to microsatellite unstable carcinomas. **BMC Cancer**, London, v.9, p.184-198, 2009.

NIJTMANS, L.G.; DE JONG, L.; ARTAL SANZ, M.; COATES, P.J.; BERDEN, J.A.; BACK, J.W.; MUIJSERS, A.O.; VAN DER SPEK, H.; GRIVELL, L.A. Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. **The EMBO Journal**, Eynsham, Oxford v.19, n.11, p. 2444-2451, 2000.

NOFFSINGER, A.E.; HART, J. Serrated adenoma: a distinct form of non-polypoid colorectal neoplasia? **Gastrointest Endosc Clin N Am**, Philadelphia ,v.20,n.3, p.543-563, 2010.

NOGUEIRA, A. M. M. F.; BARBOSA, A. J. A.; BRASILEIRO FILHO, G.; RASO, P. Tubo digestivo e Peritônio. In: **Bogliolo Patologia**. Ed: Geraldo Brasileiro Filho. 7ª edição Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, 2006. Capítulo 21, p. 660-730.

NORWOOD, M.G.; BAILEY, N.; NANJI, M.; GILLIES, R.S.; NICHOLSON, A.; UBHI, S.; DARNTON, J.J.; STEYN, R.S.; WOMACK, C.; HUGHES, A.; HEMINGWAY, D.; HARRISON, R.; WATERS, R.; JANKOWSKI, J.A. Cytoplasmic beta-catenin accumulation is a good prognostic marker in upper and lower gastrointestinal adenocarcinomas. **Histopathology**, Oxford, v.57, n.1, p.101-111, 2010.

OGATA, D.C.; GREC, F.H.; LUZ, M.A.; IOSHI, S.O.; TOMASICH, F.D.S. Foco de criptas aberrantes e cancer da junção colorretal: análise da presença de lesões precoces microscópicas na periferia do câncer colorretal e correlação com a expressão da β -catenina e Ki-67. **Rev Col Bras Cir**, Rio de Janeiro, v.37, n.2, p. 114-120, 2010.

OKITA, N. T.; YAMADA, Y.; TAKARI, D.; HIRASHIMA, Y.; MATSUBARA, J.; KATO, K.; HAMAGUCHI, T.; SHIRAO, K.; SHIMADA, Y.; TANAGUCHI, H.; SHIMODA, T. Vascular endothelial growth factor receptor expression as a prognostic marker for survival in colorectal cancer. **Jpn J Clin Oncol**, Tokyo, v.39 n.9, p. 595-600, 2009.

OZAWA, M.; RINGWALD, M.; KEMLER, R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v.87, n.11, p.4246-4250, 1990.

PARENTI, A.; LEO, G.; PORZIONATO, A.; ZANINOTTO, G.; ROSATO, A.; NINFO, V. Expression of survivin, p53, and caspase3 in Barrett's esophagus carcinogenesis. **Hum Pathol**, Philadelphia, v.37, n.1, p.16-22, 2006.

PARFITT, J.R.; DRIMAN, D.K. Survivin and hedgehog protein expression in serrated colorectal polyps: an immunohistochemical study. **Hum Pathol**, Philadelphia, v.38, n.5, p.710-713, 2001.

PAVLIDOU, A.;DALAMAGA, M.; KROUPIS, C.;KONSTANTOUDAKIS, G.;BELIMEZI, M.;ATHANASAS, G.;DIMAS, K. Survivin isoforms and clinicopathological characteristics in colorectal adenocarcinomas using real-time qPCR. **World J Gastroenterol**, Beijing, v.17, n.12, p.1614-1621, 2011.

PERRONE, G.; VINCENZI, B.; SANTINI, D.; VERZÌ, A.; TONINI, G.; VETRANI, A.; RABITTI. Correlation of p53 and bcl-2 expression with vascular endothelial growth factor (VEGF), microvessel density (MVD) and clinico-pathological features in colon cancer. **Cancer Lett**, Amsterdam, v.208, n.2, p.227-234, 2004.

PIOVESAN, L.F. **Análise da expressão das metaloproteínas 2 e 9 e seus reguladores no câncer de bexiga**. 2011. 77folhas. Tese de doutorado- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

POLYDORIDES, A.D. Adenoma, Colon. In: **Diagnostic Pathology Gastrointestinal**. Eds: Greenson JK, Lamps LW, Montgomery EA, Owens SR, Polydorides AD, Lauwers GY, Purdy JK, Bihlmeyer SK, Srivastava A. Amirsys, Inc., Salt Lake City, Utah, 1st edition, 2010.. Section 5, p.5-114.

POLYDORIDES, A.D. Mixed adenoma- serrated polyp In: **Diagnostic pathology gastrointestinal**. Eds: Greenson JK, Lamps LW, Montgomery EA, Owens SR, Polydorides AD, Lauwers GY, Purdy JK, Bihlmeyer SK, Srivastava A. Amirsys, Inc, Salt Lake City, Utah. 1st edition, 2010, Section 5, p.112-113.

POULSEN, M.L.M.; BISGAARD, M.L. *MUTYH* Associated Polyposis (MAP). **Curr Genomics**, Hilversum, v.9, n.6, p.420-435, 2008.

REN, H.Z.; WANG, J.S.; WANG, P.; PAN, G.Q.; WEN, J.F.; FU, H.; SHAN, X.Z. Increased expression of prohibitin and its relationship with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. **Pathol Oncol Res**, Budapest, v.16, n.4, p.515-522, 2010.

ROCHA, J.C.C.; DUQUE, C.G. Câncer colorretal. In: **Oncologia Molecular**. Eds: Ferreira C G, Rocha JC. Editora Atheneu, 2ª Edição, 2010; Capítulo 18.3:263-269.

ROH, S.A.; CHOI, E.Y.; CHO, D.H.; JANG, S.J.; KIM, S.Y.; KIM, Y.S.; KIM, J.C. Growth and invasion of sporadic colorectal adenocarcinomas in terms of genetic change. **J Korean Med Sci**, Seoul, v.25, n.3, p.353-360, 2010.

ROSTY, C.; WALSH, M.D.; WALTERS, R.J.; CLENDENNING, M.; PEARSON, S.A.; JENKINS, M.A.; WIN, A.K.; HOPPER, J.L.; SWEET, K.; FRANKEL, W.L.; ARONSON, M.; GALLINGER, S.; GOLDBLATT, J.; TUCKER, K.; GREENING, S.; GATTAS, M.R.; WOODALL, S.; ARNOLD, J.; WALKER, N.I.; PARRY, S.; YOUNG, J.P.; BUCHANAN, D.D. Multiplicity and Molecular Heterogeneity of Colorectal Carcinomas in Individuals With Serrated Polyposis. **Am J Surg Pathol**, New York, Dec 1, 2012. [Epub ahead of print]

SAKAMOTO, K.; MAEDA, S.; HIKIBA, Y.; NAKAGAWA, H.; HAYAKAWA, Y.; SHIBATA, W.; YANAI, A.; OGURA, K.; OMATA, M. Constitutive NF-KB Activation in Colorectal Carcinoma plays a key role in angiogenesis, promoting tumor growth. **Clin Cancer Res**, Denville, v.15, n.7, p. 2248-2258, 2009.

SCHMITZ, M.L.; MATTIOLI, I.; BUSS, H.; KRACHT, M. NF-kB: A Multifaceted Transcription Factor Regulated at Several Levels. **Chembiochem**, Weinheim, v.5, n.10, p.1348-1358, 2004.

SCHUSSEL, JL. **Avaliação da expressão imunoistoquímica das proteínas survivina e β catenina em queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio**. 2007. 62 folhas. Dissertação de mestrado. Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SESSO, A. Fundamentos sobre Morte celular. In: **Patologia - Processos Gerais**. Eds: Franco M, Montenegro MR, Brito T, Bacchi CE, Almeida PC, Editora Atheneu. 5ª edição, São Paulo, 2010, Cap 3, p.47-68.

SHANMUGAM, C.; KATKOORI, V.R.; JHALA, N.C.; GRIZZLE, W.E.; SIEGAL, G.P.; MANNE, U. p53 Nuclear Accumulation and Bcl-2 Expression in Contiguous Adenomatous

Components of Colorectal Adenocarcinomas Predict Aggressive Tumor Behavior. **J Histochem Cytochem**, Baltimore, v.56, n.3, p.305-312, 2008.

SHI, M.; YU, B.; GAO, H.; MU, J.; JI, C. Matrix metalloproteinase 2 overexpression and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. **Mol Biol Rep**, Dordrecht, v. 40, n.1, p. 617-623, 2013.

SHIBATA, A.; NAGAYA, T.; IMAI, T.; FUNAHASHI, H.; NAKAO, A.; SEO, H. Inhibition of NF-kappa B activity decreases the VEGF mRNA expression in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Breast Cancer Res Treat**, The Hague, v.73, n.3, p.237-243, 2002.

SILVA, R.L.A. Oncogenes e gene supressores de tumor. In: **Oncologia Molecular**. Eds: Ferreira C G, Rocha JC. Editora Atheneu, 2ª Edição, São Paulo, 2010; Cap. 4, p.43-81.

SINICROPE, F.A.; RODDEY, G.; MCDONNELL, T.J.; SHEN, Y.; CLEARY, K.R.; STEPHENS, L.C. Increased apoptosis accompanies neoplastic development in the human colorectum. **Clin Cancer Res**, Denville, v.2, n.12, p.1999-2006, 1996.

SNOVER, D.C. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. **Hum Pathol**, Philadelphia, v.42, n.1, p.1-10, 2011.

SNOVER, D.C.; AHNENE, D.J.; BURT, R.W.; ODZE, R.D. Serrated polyps of the colon and rectum and serrated polyposis. In: **WHO Classification of Tumours of the Digestive System**, Eds: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France, 4th Edition, 2010, chapter 8, p.160-165.

SOARES, F. A.; CUNHA, I. W.; GUIMARÃES, G. C.; NONOGAKI, S.; CAMPOS, R. S. M.; LOPES, A. The expression of metaloproteinases-2 and -9 is different according to the patterns of growth and invasion in squamous cell carcinoma of the penis. **Virchows Arch**, Berlin, v.449, n.6, p.637-646, 2006.

SOAVE, D.F. **Influência do imunofenótipo CD44/CD24 nos fatores prognósticos de Neoplasias Malignas de Glândulas Salivares**. 2011. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

STRONGIN, A.Y.; COLLIER, I.; BANNIKOV, G.; MARMER, B.L.; GRANT, G.A.; GOLDBERG, G.I. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. **J Biol Chem**, Baltimore, v.270, n.10, p.5331-5338, 1995.

ŞURLIN, V.; IOANA, M.; PLEŞEA, I.E. Genetic patterns of metalloproteinases and their tissular inhibitors – clinicopathologic and prognostic significance in colorectal câncer. **Roman J Morphol Embryol**, Bucuresti, v.52, n.1 Suppl, p.231-236, 2011.

TAKAHASHI, Y.; BUCANA, C.C.; CLEARY, K.R.; ELLIS, L.M. p53, vessel count, and vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer. **Int J Cancer**, Genève, v.79, n.1, p.34-38, 1998.

TAKAYAMA, T.; MIYANISHI, K.; HAYASHI, T.; SATO, Y.; NIITSU, Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. **J Gastroenterol**, Tokyo, v.41 n.3, p.185-192, 2006.

TAKESHITA, H.; YOSHIZAKI, T.; MILLER, W.E.; SATO, H.; FURUKAWA, M.; PAGANO, J.S.; RAAB-TRAUB, N. Matrix metalloproteinase 9 expression is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 C-terminal activation regions 1 and 2. **J Virol**, Baltimore, v.73, n.7, p.5548-5555, 1999.

TANAKA, T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. **J Carcinog**, London, v.8 p.5, 2009.

TANNAPFEL, A.; NEID M, AUST D, BARETTON G. The origins of colorectal carcinoma. **Dtsch Arztebl Int**, Cologne, v.107, n.43, p.760-6, 2010.

TERDIMAN, J.P.; McQUAID, K.R. Surveillance guidelines should be update to recognize the importance of serrated polyps. **Gastroenterology**, Baltimore, v.139, n.5, p.1444-1447, 2010.

THEISS, A.L.; JENKINS, A.K.; OKORO, N.I.; KLAPPROTH, J.M.; MERLIN, D.; SITARAMAN, S.V. Prohibitin inhibits tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor-kappa B nuclear translocation via the novel mechanism of decreasing importin alpha3 expression. **Mol Biol Cell**, Bethesda, v.20, n.20, p.4412-4423, 2009.

THEISS, A.L.; SITARAMAN, S.V. The role and therapeutic potential of prohibitin in disease. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v.1813, n.6, p.1137-43, 2011.

TORTELLI JÚNIOR, T.C. **Avaliação do papel de proibitina no desenvolvimento de resistência à cisplatina em linhagens de melanoma humano**. 2008. 106 folhas. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

VAISH, V.; SANYAL, S.N, Role of sulindac and celecoxib in the regulation of angiogenesis during the early neoplasm of colon: exploring PI3-K/PTEN/Akt pathway to the canonical Wnt/ β -catenin signaling. **Biomed Pharmacother**, New York, v.66, n.5, p. 354-367, 2012.

VAN DE WETERING, M.; SANCHO, E.; VERWEIJ, C.; DE LAU, W.; O Ving, I.; HURLSTONE, A.; VAN DER HORN, K.; BATLLE, E.; COUDREUSE, D.; HARAMIS, A.P.; TJON-PON-FONG, M.; MOERER, P.; VAN DEN BORN, M.; SOETE, G.; PALS, S.; EILERS, M.; MEDEMA, R.; CLEVERS, H. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. **Cell**, Cambridge, v.111, n.2, p.241-25, 2002.

VAN ENGELAND, M.; DERKS, S.; SMITS, K.M.; MEIJER, G.A.; HERMAN, J.G. Colorectal cancer epigenetics: Complex simplicity. **J Clin Oncol**, New York, v.29, n.10, p.1382-1391, 2011.

VAN HORSSSEN, R.; TEN HAGEN, T.L.M.; EGGERMONT, A.M.M. TNF- α in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. **Oncologist**, Dayton, v.11, n.4, p.397-408, 2006.

VERNILLO, R.; LORENZI, B.; BANDUCCI, T.; MINACCI, C.; VINDIGNI, C.; LUCENTI FEI, A.; LORENZI, M. Immunohistochemical expression of p53 and Ki67 in colorectal adenomas and prediction of malignancy and development of new polyps. **Int J Biol Markers**, Milano, v.23, n.2, p.89-95, 2008.

VLANTIS, K.; PASPARAKIS, M. Role of TNF in pathologies induced by nuclear factor κ B deficiency. In: TNF pathophysiology. Molecular and Cellular mechanisms. EE: Kollias, G.; Sfrikakis, P.P. **Curr Dir Autoimmun**, Basel, v.11, p.80-93, 2010.

WAJANT, H.; SCHEURICH, P. TNFR1-induced activation of the classical NF- κ B pathway. **The FEBS Journal**, Oxford, v.278, n.6, p.862-876, 2011.

WALIGÓRSKA-STACHURA, J. JANKOWSKA, A.; RYSZARD, W.; WŁODZIMIERZ, L.; MACIEJ, B.; AGATA, C.; BASZKO-BŁASZYK, D.; VIOLET, S.; MAREK, R. Survivin-prognostic tumor biomarker in human neoplasms-review. **Ginek Pol**, Warszawa, v.83, n.7, p. 537-540, 2012.

WANG, L.; CHENG, H.; LIU, Y.; WANG, L.; YU, W.; ZHANG, G.; CHEN, B.; YU, Z.; HU, S. Prognostic value of nuclear β -catenin overexpression at invasive front in colorectal

cancer for synchronous liver metastasis. **Ann Surg Oncol**, New York, v.8, n.6, p.1553-1559, 2011.

WANG, S.; FALLER, D.V. Roles of prohibitin in growth control and tumor suppression in human cancers. **Transl Oncogenomics**, Auckland, v.3, p.23-37, 2008.

WANG, W.; ABBRUZZESE, J.L.; EVANS, D.B.; CHIAO, P.J. Overexpression of urokinase-type plasminogen activator in pancreatic adenocarcinoma is regulated by constitutively activated RelA. **Oncogene**, Basingstoke, v.18, n.32, p.4554-4563, 1999.

WANITSUWAN, W.; KANNGURN, S.; BOONPIPATTANAPONG, T.; SANGTHONG, R.; SANGKHATHAT, S. Overall expression of beta-catenin out performs its nuclear accumulation in predicting outcomes of colorectal cancers. **World J Gastroenterol**, Beijing, v.14, n.39, p.6052-6059, 2008.

WESTERMARCK, J.; KÄHÄRI, V.M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. **FASEB J**, Bethesda, v.13, n.8, p.781-792, 1999.

WINDER, T.; LENZ, H-J. Vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor signaling pathways as therapeutic targets for colorectal cancer. **Gastroenterology**, Baltimore, v.138, n.6, p.2163-2176, 2010.

WONG, S.; LAI, L. The role of TGF- β in human cancers. **Pathology**, Surry Hills, v.33, n.1, p.85-92, 2001.

WONG, S.C.C.; FONG LO, E.S.; LEE, K.C.; CHAN, J.K.C.; WENDY HSIAO, W.L. Prognostic and Diagnostic Significance of β -Catenin Nuclear Immunostaining in Colorectal Cancer. **Clin Cancer Res**, Denville, v.10, n.4, pp.1401-1408, 2004.

WORTHLEY, D. L.; LEGGETT, B. A. Colorectal Cancer: Molecular features and clinical opportunities. **Clin Biochem Rev**, Chippendale, v.31 n.2, p.31-38, 2010.

XI, R.C.; BIAO, W.S.; GANG, Z.Z. Significant elevation of survivin and livin expression in human colorectal cancer: inverse correlation between expression and overall survival. **Onkologie**, Basel, v.34, n.8-9, p.428-432, 2011.

XIAOYUAN, C.; LONGBANG, C.; JINGHUA, W.; XIAOXIANG, G.; HUAICHENG, G.; QUN, Z.; HAIZHU, S. Survivin: a potential prognostic marker and chemoradiotherapeutic target for colorectal cancer. **Ir J Med Sci.**, Dublin, v.179, n.3, p.327-335, 2010.

YAMAMOTO,T.; KONISHI, K.; YAMOCHI, T.; MAKINO, R.; KANEKO, K.; SHIMAMURA, T.; OTA, H.; MITAMURA,K. No major tumorigenic role for β -catenin in serrated as opposed to conventional colorectal adenomas. **British J Cancer**, London, v.89, p.152-55, 2003.

YANG, X.; XIONG, G.; CHEN, X.; XU, X.; WANG, K.; FU, Y.; YANG, K.; BAI, Y. Survivin: correlation with p53 mutations and promoter polymorphism. **Dis Esophagus**, Milano, v.22, n.3, p.223-230, 2009.

YU, H. G.; ZHONG, X.; YANG Y. N.;LUO, H. S.; YU, J. P.; MEIER, J. J.; SCHRADER, H.; BASTIAN, A.; SCHMIDT, W. E.; SCHMITZ, F. Increased expression of nuclear factor-KB/RelA is correlated with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. **Int J Colorectal Dis**, Heidelberg, v.19, n.1, p.18-22, 2004.

ZANETTI, J.S. **O papel da hipóxia tumoral nos carcinomas mamários que supreeexpressam MUC1**. 2011. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

ZHANG, M.; YANG, J.; LI, F. Transcriptional and post-transcriptional controls of survivin in cancer cells: novel approaches for cancer treatment. **J Exp Clin Cancer Res**, Roma, v.25, n.3, p.391-402, 2006.

ZUCKER, S.; VACIRCA, J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. **Cancer Metastasis Rev**, Boston, v.23, n.1-2, p.101-117, 2004.

ZUZGA, D.S.; GIBBONS, A.V.; LI, P.; LUBBE, W.J.; CHERVONEVA, I.; PITARI, G.M. Overexpression of matrix metalloproteinase 9 in tumor epithelial cells correlates with colorectal cancer metastasis. **Clin Transl Sci**, Malden, v.1, n.2, p.136-141, 2008.

ANEXOS

ANEXOS

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.usp.br

Ribeirão Preto, 08 de dezembro de 2009

Ofício nº 4056/2009
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“MECANISMOS MOLECULARES RELACIONADOS À ANGIOGÊNESE E SOBREVIVÊNCIA CELULAR ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLO-RETAL”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 300ª Reunião Ordinária realizada em 07/12/2009 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 10757/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
MARIÂNGELA OTTOBONI BRUNALDI
PROF. DR. SÉRGIO ZUCOLOTO (Orientador)
Depto. de Patologia e Medicina Legal

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

Is the immunohistochemical assessment of nuclear β -catenin and p53 useful in the routine diagnosis of colorectal adenomas?

Mariângela O. Brunaldi, Jean G. Menezes, Danilo F. Soave, Sérgio B. Garcia, Alfredo Ribeiro-Silva.

Department of Pathology and Forensic Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil.

Correspondence:

Prof. Dr. Alfredo Ribeiro-Silva, MD, PhD.

Laboratory of Cancer Pathology, Department of Pathology and Forensic Medicine
Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo – Brazil.

Avenida Bandeirantes 3900, Campus Universitário Monte Alegre, 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

fax: + 55 16 3602-0224; fone: +55 16 3602-3172 ou 3602-3119

email: arsilva@fmrp.usp.br

ABSTRACT

Purpose: Using immunohistochemical staining, we examined the presence of nuclear β -catenin and co-expression of p53 in colorectal adenomas. We sought to obtain more specific data in the histological assessment of the colorectal adenomas for the identify of patients at risk for developing colorectal cancer (CRC).

Methods: This study is a retrospective investigation of thirty-six colorectal adenomas (CRA) selected between 2000-2009, that consisted of eighteen samples each of high- and low-grade dysplastic adenomas. Nine samples of normal colorectal tissue were included.

Results: Nuclear β -catenin was detected in 61% of both high/low-grade dysplastic colorectal adenomas, whereas p53 was detected in 44% and 39% of the cases, respectively. The co-expression of these proteins was identified in 33% and 39% of the high- and low-grade adenomas, respectively. Most of the cases of high/low-grade tubular adenoma exhibited significant nuclear β -catenin levels that were associated with p53 expression in 40% and 67% of these samples, respectively. High-grade dysplastic tubulovillous and villous adenomas exhibited nuclear β -catenin expression in 33% and 67%, respectively, and p53 co-expression in the majority of samples. The low-grade dysplastic tubulovillous and villous lesions exhibited nuclear β -catenin expression in 67% of both samples and exhibited p53 co-expression in most cases. The normal colorectal tissue exhibited no nuclear β -catenin and p53 expression.

Conclusions: The elevated levels of nuclear β -catenin and the co-expression of p53, particularly in the tubular adenomas, suggest these markers are useful and complementary to the histological assessment of CRA, for the identification of patients at risk for developing of CRC.

Keywords: Colorectal adenoma, Colorectal cancer, β -catenin, p53.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is a public health problem and is the third most common cancer in men (663,000 cases, 10% of all cancer types), and the second most common cancer in women (570,000 cases, 9.4% of all cancer types) worldwide [1]. The estimated incidence of new colon and rectal cancer cases for Brazil in 2012/2013 is approximately 14,180 cases in men and 15,960 in women, with an estimated risk of 15 new cases per 100,000 men and 16 per 100,000 women [2].

Adenomatous polyps are frequently detected in colorectal cancer screening and are generally regarded as precursors of most colorectal cancers (CRC) [3]. Thus, surveillance guidelines after polypectomy have been established. The method proposed by the American Cancer Society, the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American College of Radiology [4,5] stratifies patients into low- and high-risk categories for the development of advanced neoplasias based predominantly on the multiplicity of lesions, lesion size (larger than 1 cm), and on the presence of high-grade dysplasia and villous features. The histological examination of the Hematoxylin-eosin (H&E) is the gold standard for assessment of colorectal adenomas. However, the interpretation of dysplasia and the quantitative analysis of the villous features are subjective and are often inconsistent between observers [6,7,8,9,10].

The classical model of CRC carcinogenesis is based on the adenoma-carcinoma progression sequence proposed by Fearon & Vogelstein [3], which accounts for approximately 85% of all sporadic CRCs [11]. In these tumours, the mutations of the adenomatous polyposis coli (APC) gene initially triggers the development of the adenoma, followed by mutation of the K-ras gene during the intermediate stage, subsequent mutation of the p53 gene and loss of heterozygosity for the long arm of the chromosome 18q, which occur during malignant transformation [12].

The APC protein is associated with processes of cellular adhesion, migration, apoptosis and the regulation of β -catenin. The β -catenin protein is essential for cellular signaling and adhesion, and it is present in different intracellular locations that are associated with its distinct functions. When associated with the plasma membrane, β -catenin is part of the adhesive junctions that are necessary for the maintenance of homotypic cell-cell adhesion (bound to complexes containing E-cadherin and α -catenin). When β -catenin is localized within the nucleus, it acts as a transcriptional activator in the Wntless (Wnt) pathway. It can also be found in an unbound state within the cytosol or linked to the APC. Its major functions are related to cellular adhesion and to mediating signaling of Wnt / β -catenin signaling pathway [13,14].

Using immunohistochemical (IHC) analyses, Yamamoto et al. [15] observed the expression of nuclear β -catenin in 61% of a series of conventional colorectal adenoma cases. Wong et al. [16] reported the expression of nuclear β -catenin in 92% of the adenomas examined by IHC. This study also evaluated normal tissue; polyps and colorectal carcinomas, which exhibited 0%, 8% and 100% nuclear β -catenin expression, respectively, suggesting that the nuclear translocation of β -catenin is strongly correlated with colorectal carcinogenesis.

p53 is a tumor suppressor gene, that encodes a protein of 53 kDa that, plays a key role in the regulation of signaling pathways that control the cellular responses to DNA damage and apoptotic cell death. The loss of heterozygosity of the p53 gene usually occurs during the period of transition between the colorectal adenoma and carcinoma states [17,18]. Mutation of the p53 gene promotes the accumulation of p53 protein in the nucleus, thereby increasing its half-life and allowing for its detection by immunohistochemistry [19].

Sheikh et al. [20] detected the expression of the p53 protein in 64.2% of the severely dysplastic colorectal adenomas evaluated, and this positive index correlated with the multiplicity of the lesions, the villous histology, the recurrence of the adenomas and the invasivity of the carcinomas.

The association between β -catenin and p53 has been described by several authors [21,22]. Damalas et al. [22] suggests that the oncogenic activity of deregulated β -catenin puts a selective pressure for the inactivation of the p53 pathway in emerging tumours.

The aim of our study was to immunohistochemically evaluate the levels of nuclear β -catenin and p53 co-expression in colorectal adenomas, biomarkers that are indicative of the important steps in the colorectal carcinogenesis, through an analysis based on the histological grade of dysplasia and the architectural pattern, without knowledge of the characteristics of the lesions (location, size, etc.), to obtain more specific and less-subjective data (such as the percentage of villi [6]). In this way, we aimed to complement the routine histopathological examination of colorectal adenomas in the absence of clinical information. This approach aimed to provide more accurate information for the identification of patients at risk for colorectal cancer development.

Materials and Methods

Samples

A retrospective series of thirty six colorectal adenomas was selected from the Service of Pathology (SERPAT), Clinical Hospital, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (HCFMRP-USP), from 2000 to 2009. This series consisted of eighteen samples of high-grade adenomas including tubular, tubulovillous and villous patterns, as well as eighteen samples of low-grade adenomas using the methodology described above.

For the comparative analysis between the populations, we included nine samples of normal colorectal tissue, that were classified as the control group.

This study was conducted according to the ethical norms of the 1975 Helsinki Declaration and was analyzed and approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Histological Analysis

The selected cases were reviewed by two experienced gastrointestinal pathologists (M.O.B and S.Z) and cataloged according to the criteria proposed by the World Health Organization Classification of tumors of the colon and rectum [23]. The discordant results were resolved using a multi-head microscopic analysis system.

The determination of the degree of tumors was based on the architectural complexity, and the extent and severity of the stratification of the abnormal epithelial nuclear morphology [23].

The tubular growth patterns of the lesions were characterized by maintenance of the original architecture of the colonic crypts, and the replacement of the normal colonic epithelium with dysplastic epithelium, exhibiting a villous component below 20%-25% of the total structure of the lesion. The tubulovillous adenomas exhibited an association of the tubular and villous growth patterns, with the villous component representing 20%-80% of the total structure of the lesion. The villous adenomas exhibited villous components that were greater than 80% of the total structure of the lesion [23,24].

The histological analyses were performed without knowledge of the location or lesions size.

Immunohistochemistry (IHC)

The immunohistochemical reactions were performed on 4 µm thick histological sections deposited on slides that were previously silanized using 4% organosilane in acetone (3-aminopropyl-trietoxilisano, SIGMA, St Louis, USA). Briefly, the sections were deparaffinated in xylene, rehydrated, placed in a 10mmol/l, pH 6.0 citrate buffer and subjected to antigen retrieval using a steamer for 35 minutes. After antigen retrieval, the slides were

cooled to room temperature and washed in phosphate buffered saline (PBS). The endogenous peroxidase activity was blocked using 3% hydrogen peroxide in PBS for 10 minutes. Following two washes in PBS and onewashinTBS (10nM phosphate buffered saline pH 7.4,0.05%, Tween 20). The slides were blocked for non-specific staining by using PBS (pH 7.4) (Sigma Chemical CO P.O. 14508, St. Louis, MO 63178, USA) for 60 minutes.

The following primary antibodies were incubated in a humidified chamber overnight:β-catenin (NCL-B-cat clone 17C2, Dilution 1:100,Vision Biosystems, Novocastra Laboratories Ltd), p53 (clone NCL-p53-DO7, Mouse Monoclonal Ac, Dilution 1:500, Novocastra Laboratories Ltd). After incubation with the primary antibodies, the slides were washed twice for 3 minutes per wash in TBS, followed by incubation with the MACH 4 Universal HRP-Polymer Kit with DAB (Polymer Detection Kit, M4BD534G,H, L; Biocare Medical, LLC. 4040 Pike Lane, Concord, CA 94520, USA) for 60 minutes. Following two washes in TBS, DAB was applied for 5 to 10 minutes. After this period, the slides were washed in distilled water, and Harris's hematoxylin was applied as a counter-stain.

The slides were next dehydrated in a graded series of ethanols and mounted using Permount (Fisher Chemicals, Fair Lawn, New Jersey 07410, USA)

The samples of normal colonic tissue were used as a positive control for p53. Normal human tonsil tissue was used as a positive control for the β-catenin. Negative controls for immunostaining were prepared by the omission of the primary antibody.

The evaluation of β-catenin and p53 by immunostaining analysis

The levels of the nuclear β-catenin and p53 co-expression in the colonic epithelial cells were semi-quantitatively evaluated by screening the entire section.They were defined as positive when more than 5% and $\geq 10\%$ of the nuclei were positively stained for nuclear β-catenin and p53, respectively, independent of the intensity of staining [25,26].

Statistical analysis

The statistical analysis to determine the association between the variables among the different groups were performed using the Fisher's tests. The tests were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.Data were analyzed by use of the Statistical Analysis System software (SAS Institute Inc., SAS/STAT® User'sGuide, Version 9.0, Cary, NC: SAS Institute Inc.).

RESULTS

1- The evaluation of the levels of nuclear β -catenin and p53 expression by IHC in the study groups

The levels of the nuclear β -catenin were detected by IHC in 11 out of the 18 (61%) adenomas, with no correlation with the grade of the dysplasia.

The expression of p53 was detected in 8 out of 18 (44%) cases of adenomas exhibiting high-grade dysplasia and 7 out of 18 (39%) cases exhibiting low-grade dysplasia, indicating a correlation with the degree of dysplasia.

The co-expression of the proteins was detectable in 33% and 39% of the high- and low-grade cases of adenomas, respectively.

The normal colorectal tissue exhibited no nuclear β -catenin and p53 expression (Table 1).

Table 1: The IHC evaluation of nuclear β -catenin and the expression of p53.

All patients (n=45)	High-grade dysplastic adenoma (n=18)	Low-grade dysplastic adenoma (n=18)	Normal control (n=9)
Nuclear β -catenin +	11/18 (61%)	11/18 (61%)	0/9 (0%)
Nuclear β -catenin -	7/18 (39%)	7/18 (39%)	9/9 (100%)
p 53 +	8/18 (44%)	7/18 (39%)	0/9 (0%)
p 53 -	10/18 (56%)	11/18 (61%)	9/9 (100%)
Nuclear β -catenin+/p53+	6/18 (33%)	7/18 (39%)	0/9 (0%)

The statistical analysis of the level of the nuclear β -catenin by the Fisher test revealed statistically significant differences between the high- and low-grade adenomas as compared to the normal population ($p < 0.05$), however, it was not observed significant difference between the populations for the co-expression of the p53.

2- The correlation of the levels of nuclear β -catenin and p53 expression in the adenoma groups based on the histological architectural pattern

The tubular adenomas exhibited nuclear β -catenin in 5 out of 6 (83%) and 3 out of 6 (50%) cases of the high- and low-grade dysplastic cases, respectively. In this group, the p53 protein was detected in 2 out of 5 (40%) exhibiting high-grade dysplasia, which also exhibited positive staining for the nuclear β -catenin and 2 out of 3 (67%) samples exhibiting low- grade dysplasia.

The villous adenomas exhibiting high- and low-grade dysplasia both displayed nuclear β -catenin in 4 out of 6 (67%) cases. They displayed co-expression of p53 in 2 out of 4 (50%) of the high-grade and 3 out of 4 (75%) of the low-grade samples that were positive for β -catenin immunoreactivity.

The high-grade dysplastic tubulovillous adenomas exhibited nuclear β -catenin in 2 out of 6 (33%) cases that also exhibited p53 positive staining. The low-grade lesions exhibited nuclear β -catenin in 4 out of 6 (67%) samples; of these cases, p53 was co-expressed in 2 out of 4 (50%) (Table 2).

Table 2: The IHC evaluation of nuclear β -catenin and the expression of p53 in the adenomas groups.

N° of patients (n)= 6	Nuclear β -catenin +	p53 +	Nuclear β -catenin+/p53+
High- grade dysplastic tubular adenoma	5/6 (83%)	3/6 (50%)	2/5 (40%)
High-grade dysplastic tubulovillous adenoma	2/6 (33%)	3/6 (50%)	2/2 (100%)
High-grade dysplastic villous adenoma	4/6 (67%)	2/6 (33%)	2/4 (50%)
Low-grade dysplastic tubular adenoma	3/6 (50%)	2/6 (33%)	2/3 (67%)
Low-grade dysplastic tubulovillous adenoma	4/6 (67%)	2/6 (33%)	2/4 (50%)
Low-grade dysplastic villous adenoma	4/6 (67%)	3/6 (50%)	3/4 (75%)

Using the Fisher's test to determine the possible association between nuclear β -catenin and the co-expression of p53 in each individual group, we found no statistically significant association between these two variables in the populations of either high-or low-grade grade adenomas (tubular, tubulovillous and villous).

Part of the immunohistochemical staining is represented in Figure 1.

Fig.1-a- Normal colonic mucosa (H&E 50X); b- The membrane localization of β -catenin within normal mucosa (400X); c- Negative IHC staining for p53 (100X); d1-d2- Tubular adenoma with low-grade dysplasia exhibiting focal villous patterns (black arrow) (H&E 50X); e1-e2- Nuclear β -catenin (50X and 400X (detail red arrow)); f- Positive IHC staining for p53 (50X); g- Villous adenoma exhibiting low-grade dysplasia (H&E 50X); h1-h2- Nuclear β -catenin (200X (detail red arrow)); i- Positive IHC staining for p53 (50X)

DISCUSSION

The association between β -catenin and p53 has been already described. Damalas et al. [27] suggested that the overexpression of the β -catenin could promote p53 accumulation, increasing its transactivation. Pancione et al. [28] described the combination of reduced membrane expression of β -catenin and high expression levels of p53 in primary colorectal cancer as a possible prognostic factor for the severity of disease onset, progression and metastasis.

In this study, we examined the expression of the β -catenin by immunohistochemical analyses of colorectal adenomas with different architectural patterns (tubular, tubulovillous and villous), high- and low-grade dysplasia, without prior knowledge of specific characteristics of the lesions, including location, lesion size and multiplicity. These immunohistochemical analyses were performed to obtain more accurate, specific and less-subjective data (such as the percentage of villi) [6,7,8,9,10] that might complement routine histopathological examination in the absence of clinical information, to identify patients at risk for the development of colorectal cancer.

We detected significant nuclear accumulation of β -catenin in both high- and low-grade dysplastic adenomatous lesions with equivalent percentages of IHC expression (61% of cases), without a correlation with the dysplastic grade, as described by Wong et al. [16]. Several studies have reported the pathological significance of nuclear β -catenin in colonic adenomas, although the percentages of positively stained nuclei have exhibited discordance (Yamamoto et al. (61%) [15], Wong et al. (92%) [16]). We agree with Wong et al. [16], who suggested that the discordant percentage might be attributed to the use of different immunohistochemical methods. Nonetheless, the increased nuclear levels of this protein in colonic adenomas are clear.

The positive expression of p53 was detected in 44% cases of high-grade dysplastic adenomas and 39% of low-grade dysplastic adenomas. Many studies have reported different frequencies of immunoreactivity for the p53 protein, usually correlated to the degree of dysplasia, as observed in this study. However, we did not observe a specific correlation of p53 with the presence of villous characteristics. Sousa et al. [17], found p53 immunoreactivity in 18% of the colorectal adenomatous lesions examined, which was related to the degree of dysplasia. Vernillo et al. [29], reported p53 immunoreactivity in 48.7% of their studied series, which was related to the degree of dysplasia and the presence of villi. Voskuil et al. [30] observed p53-positive staining in 31% of the sporadic colorectal adenomas that were not correlated with the grade of dysplasia or the presence of villi. We agree with Vernillo et al. [29], that the frequency of p53 immunoreactivity depends on the immunohistochemical methods of detection, the number of lesions examined, the number of stained histological sections evaluated; the analytical criteria used and the cut-off. The choice of cutoff ($\geq 10\%$) in our study was based the high concordance between immunohistochemical detection and the point mutations of the p53 gene [17,26].

The tubular adenoma samples with high- and low-grade dysplasia exhibited nuclear β -catenin in 83% and 50% of the samples, respectively. In this group, the p53 protein was detected in 40% of the high-grade dysplastic samples, which also exhibited positive nuclear β -

catenin staining, in contrast to 67% of the low-grade dysplastic samples. Yamamoto et al.[15] observed nuclear β -catenin in 61% of the cases of tubular adenomas examined, where the samples with villous architecture were excluded. In this study, we observed that 83% of the total samples of tubular adenomas (including both those with high- and low-grade dysplasia) exhibited a villous component that represented 1%- 5% of the total structure of the lesion. Ishii et al.[31] identified a subset of tubular adenomas with the molecular characteristic of tubulovillous adenomas based on the presence of villous representing 1% to 20% of the total structure of the lesion. Although the authors did not observe an association between nuclear β -catenin and villous structures, they described the propensity of this subgroup of adenomas to exhibit mutated K-ras, loss of 06-Methyl Guanine DNA Methyltransferase (MGTM) and similar p53 overexpression, as detected in our study.

The villous adenomas with high- and low-grade dysplasia exhibited nuclear β -catenin in 67% cases, the expression of which was associated with p53 expression in 50% high- and 75% low-grade dysplastic samples. In these samples, no correlation was observed between the expression of p53 and the dysplastic grade, consistent with the study of Carneiro et al.[32]. The tubulovillous adenomas with high-grade dysplasia exhibited nuclear β -catenin in 33% cases in which the p53 also exhibited positive staining. However, the low-grade lesions displayed more nuclear β -catenin compared to the high-grade lesions, which exhibited nuclear β -catenin in 67% samples and p53 expression in 50% of these samples. Ishii et al.[31] detected nuclear β -catenin and co-expression of p53 in 27.1% and 32.2% cases of tubulovillous adenomas, percentages that were similar to those observed in the high-grade dysplastic population of our study.

Several authors have attributed the correlation of nuclear β -catenin and the expression of p53 in colorectal adenomas to many factors, which not only include the degree of dysplasia [31], but also the presence of the villous features, the multiplicity and size of the lesions [20]. Not all of these aspects were explored in this study.

The rationale behind conducting a blind study without prior knowledge of the clinical features of adenomas (location, multiplicity, history), which considered only the histological of the H&E and molecular features, was based on the reality that surgical pathologists are often presented with requests for histopathological tests with limited clinical information. Under such circumstances, the histological aspects of the H&E of the lesions can serve as the parameters for the risk stratification. High-grade dysplasia and villous features are accepted in several guidelines for colonoscopic surveillance, are indicated as risk factors for progression to malignancy, and are associated with the size (> 1 cm) and the multiplicity of the lesions [4,5].

The American Cancer Society, the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American College of Radiology recommends a follow-up colonoscopy with a 3-year interval for high-risk patients (exhibiting 3 or more adenomas, high-grade dysplasia, villous features, or an adenoma ≥ 1 cm). Low-risk patients are characterized by the presentation of one or more tubular adenomas ≤ 1 cm, without high-grade dysplasia, and are generally recommended for a colonoscopy follow-up 5-10 year intervals [4,5]. However, the pathologic interpretation of dysplasia and the analysis of the villous features are subjective

and often poor reliable among observers [6]. Therefore, several authors advocate abandoning these pathologic features for clinical use [6,8].

Our study revealed interesting aspects of the low-grade dysplastic tubular adenomas, which exhibited nuclear β -catenin in 50% cases and the co-expression of p53 in 67% of these samples, as detected by IHC analysis. These results are clinically relevant and need to be clarified as the development of CRC occurs principally via adenoma-carcinoma progression sequence, which results from the accumulation of genetic alterations [3]. In this context, the following important questions arise: What is the biological behavior of these lesions? Do patients who exhibit this type of adenoma with positive molecular biomarkers represent high-risk group for the development of CRC? Although our case series is limited, our findings might represent a starting point for larger prospective studies, which would promote a clearer definition of the biological behavior of these lesions by identifying parameters that might be used for routine histopathological diagnosis, thereby facilitating the development of modalities that may allow for enhanced detailed therapeutic plans.

The molecular studies incorporated into the routine histopathological examination and guidelines for colonoscopy surveillance, especially the combined analysis of two molecular biomarkers that are indicative of the important steps in the colorectal carcinogenesis, will allow for more accurate and objective diagnoses of colorectal neoplastic lesions, and for the reduction of the subjectivity and the inter-observer variability that are often present during current assessments of high-grade dysplasia and quantification of the villous elements within the samples [6,7,8,9].

We conclude that the combined analysis of nuclear β -catenin and the p53 might be useful in the routine diagnosis of this pathology in helping to identify patient who are at risk of developing CRC. Further studies are needed to more accurately determine the biological behavior of colorectal adenomas, and of tubular adenoma, in particular.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements We thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil for financial support. We are thankful to Professor Sérgio Zucoloto (in memorian) for his valuable assistance. We would like to thank Laura Midori Kawasse, Marcia Ferreira Oliva, Deisy Mara da Silva and Rosangela Orlandin Lopes for technical support.

REFERENCES

1. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008:GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127: 2893–917.
2. Ministério da Saúde. Câncer Colo-retal. Epidemiologia- Estimativa de Incidência do Câncer no Brasil para 2012. Instituto Nacional do Câncer (INCA) Portal de Serviços do Governo. Available from: <http://www.inca.org.br>. Accessed January 11, 2012.
3. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
4. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Andrews KS, et al. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology* 2008; 134:1570-95.
5. Winawer SJ, Zauber AG, Fletcher RH, et al. Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society. *Gastroenterology* 2006;130:1872-85.
6. Denis B, Peters C, Chapelain C, Kleinclaus I, et al. Diagnostic accuracy of community pathologists in the interpretation of colorectal polyps. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009; 21:1153-60.
7. Rex DK, Goldblum JR. PRO: Villous Elements and High-Grade Dysplasia Help Guide Post-Polypectomy Colonoscopic Surveillance. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:1327-29.
8. Appelman HD. CON: High-Grade Dysplasia and Villous Features Should Not Be Part of the Routine Diagnosis of Colorectal Adenomas. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:1329-31.
9. Odze R. A Balancing View: Pathologist–Clinician Interaction Is Essential. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:1331-33.
10. Golembeski CP, McKenna BJ, Appelman HD. “Advanced” adenomas: Pathologists don’t agree. [Abstract] *Mod Pathol*. 2007; 20(Suppl 2):115A.
11. Neuman J, Horst D, Kriegl L et al. A simple immunohistochemical algorithm predicts the risk of distant metastases in right-sided colon cancer. *Histopathology* 2012;60:416-26.
12. Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastases. *J Gastroenterol*. 2006;41:185-92.
13. Horst D, Reu S, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. The intratumoral distribution of nuclear β -catenin is a prognostic marker in colon cancer. *Cancer* 2009;115:2063-70.
14. Norwood MG, Bailey N, Nanji M et al. Cytoplasmic beta-catenin accumulation is a good prognostic marker in upper and lower gastrointestinal adenocarcinomas. *Histopathology* 2010;57:101-11.
15. Yamamoto T, Konishi K, Yamochi T et al. No major tumorigenic role for β -catenin in serrated as opposed to conventional colorectal adenomas. *British J Cancer* 2003;89:152–7.
16. Wong SCC, Fong-Lo ES, Lee KC, Chan JKC, Wendy-Hsiao WL. Prognostic and Diagnostic Significance of β -Catenin Nuclear Immunostaining in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10:1401-08.
17. Sousa WA, Rodrigues LV, Silva Jr RG, Vieira FL. Immunohistochemical evaluation of p53 and Ki-67 proteins in colorectal adenomas. *Arq Gastroenterol*. 2012;49:35-40.

18. Worthley DL, Leggett BA. Colorectal Cancer: Molecular features and clinical opportunities. *Clin Biochem Rev.* 2010;31:31-8.
19. Porcelli B, Frosi B, Terzuoli L et al. Expression of p185 and p53 in benign and malignant colorectal lesions. *Histochem J.* 2001;33:51-7.
20. Sheikh RA, Min BH, Yasmeen S et al. Correlation of Ki-67, p53, and Adnab-9 Immunohistochemical Staining and Ploidy with Clinical and Histopathologic Features of Severely Dysplastic Colorectal Adenomas. *Dig Dis Sci.* 2003;48: 223-29.
21. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-70.
22. Damalas A, Kahan S, Shtutman M, Ben-Ze'ev A, Oren M. Deregulated β -catenin induces a p53 and ARF-dependent growth arrest and cooperates with Ras in transformation. *EMBO J.* 2001; 20: 4912-4922.
23. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, eds. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. 4th edn. International Agency for Research on Cancer (IARC) Lyon, France. 2010:134-46.
24. Polydorides AD. Adenoma, Colon. In: Greenson JK, Lamps LW, Montgomery EA et al, eds. *Diagnostic Pathology Gastrointestinal*. Salt Lake City, 1st edn. Utah, USA. Amirsys Inc. 2010:114-23.
25. Hao X, Tomlinson I, Ilyas M, Palazzo JP, Talbot IC. Reciprocity between membranous and nuclear expression of β -catenin in colorectal tumours. *Virchows Arch.* 1997;431:167-172.
26. Shanmugam C, Katkoori VR, Jhala NC, Grizzle WE, Siegal GP, Manne U. p53 Nuclear Accumulation and Bcl-2 Expression in Contiguous Adenomatous Components of Colorectal Adenocarcinomas Predict Aggressive Tumor Behavior. *J Histochem Cytochem.* 2008;56:305-312.
27. Damalas A, Ben-Ze'ev A, Simcha I et al. Excess β -catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *EMBO J.* 1999;18:3054-3063.
28. Pancione M, Forte N, Fucci A et al. Prognostic role of β -catenin and p53 expression in the metastatic progression of sporadic colorectal cancer. *Human Pathology* 2010;41:867-876.
29. Vernillo R, Lorenzi B, Banducci T et al. Immunohistochemical expression of p53 and Ki67 in colorectal adenomas and prediction of malignancy and development of new polyps. *Int J Biol Markers* 2008;23:89-95.
30. Voskuil DW, Kampman E, Van Geloof W et al. No Major Difference in K-ras and p53 Abnormalities in Sporadic and Hereditary Nonpolyposis Colorectal Adenomas. *Dig Dis Sci.* 2000;45:2187-2194.
31. Ishii T, Notohara K, Umapathy A et al. Tubular Adenomas with minor villous changes show molecular features characteristic of tubulovillous adenomas. *Am J Surg Pathol.* 2011;35:212-220.
32. Carneiro FP, Ramalho LN, Britto-Garcia S, Ribeiro-Silva A, Zucoloto S. Immunohistochemical expression of p16, p53 and p63 in colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Dis Colon Rectum* 2006;49:588-594.