



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA PARQUINA EM ADENOCARCINOMA
COLORRETAL**

CLAUDIA CAROLINE VELOSO DA SILVA

CURITIBA

2016

CLAUDIA CAROLINE VELOSO DA SILVA

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA PARQUINA EM ADENOCARCINOMA
COLORRETAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior

Coorientadora: Profa. Dra. Lúcia de Noronha

CURITIBA

2016

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

S586e
2016 Silva, Claudia Caroline Veloso da
Estudo imunoistoquímico da parquina em adenocarcinoma colorretal /
Claudia Caroline Veloso da Silva ; orientadora: Vanessa Santos Sotomaior ;
coorientadora: Lúcia de Noronha. – 2016.
105 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2016
Bibliografia: f. 78-105

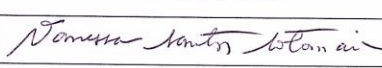
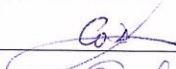
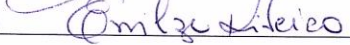
1. Adenocarcinoma. 2. Reto – Câncer. 3. Neoplasias do colo. I. Sotomaior,
Vanessa Santos. II. Noronha, Lúcia de. III. Pontifícia Universidade Católica do
Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDD 22. ed. – 616.994347

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos vinte e oito dias do mês de abril de 2016, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação, “ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DE PARQUINA EM ADENOCARCINOMA COLORRETAL” apresentado por **Claudia Caroline Veloso da Silva** para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profª Drª. Vanessa Santos Sotomaior (PUCPR) Presidente	
Prof. Dr. José Claudio Casali da Rocha (PUCPR)	
Profª. Drª. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro (UFPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

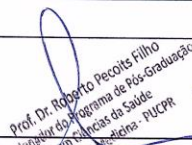
Profª Drª. Vanessa Santos Sotomaior (PUCPR) Conceito: APROVADA
Prof. Dr. José Claudio Casali da Rocha (PUCPR) Conceito: APROVADA
Profª. Drª. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro (UFPR) Conceito: APROVADA

Parecer Final: APROVADA

Observações da Banca Examinadora:



Profª Drª. Vanessa Santos Sotomaior
Presidente da Banca Examinadora



Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde - PUCPR

Prof. Dr. Roberto Flavio Silva Pecoits-Filho
Coordenador do PPGCS PUCPR

Dedico esta dissertação aos meus amados pais Ana e Claudio, pelo amparo incansável na busca e conquista dos meus sonhos, e ao meu amado esposo Édipo, pela companhia e apoio de todas as horas ao longo dessa árdua jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter colocado em minha vida a missão de realizar este trabalho; por cuidar de mim e me dar forças, coragem e sabedoria em todos os momentos ao longo deste caminho, providenciando tudo quanto era necessário e colocando em minha vida cada pessoa que de alguma forma me apoiou na realização deste sonho.

Aos meus queridos pais, Ana e Claudio, por todo amor, carinho, compreensão, apoio e incentivo, por acreditarem em mim e fazerem o possível - e muitas vezes o que era impossível aos meus olhos - para me ajudarem na realização dos meus sonhos; por me proporcionarem uma educação excepcional, não só acadêmica, mas também na vida e na fé, contribuindo para a formação do meu caráter e dos meus princípios. Vocês são meus exemplos de força, fé, humildade e esperança. Sou eternamente grata por tudo.

Ao meu amado esposo Édipo, por compartilhar comigo cada momento vivido ao longo desses dois anos, por se alegrar com as minhas conquistas e me ajudar a retirar as pedras que apareceram pelo caminho; por compreender todas as minhas ausências e muitas vezes abrir mão dos seus próprios desejos e vontades para estar ao meu lado. Sem você eu não conseguiria ter chegado até aqui.

A minha querida irmã Bárbara, por todos os momentos vividos ao meu lado, por escutar os meus anseios, torcer pelas minhas conquistas e celebrar comigo cada vitória; por me ajudar em cada tarefa que com o meu curto tempo não consegui realizar. Por toda alegria que traz aos meus dias, pela compreensão, carinho e amor demonstrados em cada gesto de apoio.

Aos meus queridos avós Rosa e Vicente, Aurélia e Pedro, pelo amor e carinho incondicionais demonstrados em cada gesto, pelas orações, pelos conselhos e palavras sábias vindas nos momentos oportunos; por todo interesse demonstrado na realização do meu estudo mesmo sem às vezes entenderem do que se tratava; por todo exemplo e por me ensinarem valores que me acompanharão por toda a minha vida.

A todos os meus familiares, pelo apoio, incentivo e compreensão demonstrados, por torcerem por mim e vibrarem com as minhas conquistas.

A minha orientadora Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior, pela sua sábia e paciente orientação; pela oportunidade que me deu, por ter confiado e acreditado em mim; pelo incentivo e auxílio em todas as etapas deste trabalho, por compartilhar comigo

seu imenso conhecimento. É um exemplo de comprometimento, responsabilidade e ética profissional em quem sempre irei me espelhar. Um eterno sentimento de carinho, gratidão e admiração.

A minha coorientadora Profa. Dra. Lúcia de Noronha, que muito me ensinou, me auxiliando de maneira imprescindível ao longo desses dois anos; por todos os conselhos importantes e suas sábias palavras, contribuindo para o meu crescimento acadêmico e profissional; por ter me conduzido de forma excepcional em todas as análises, esclarecendo minhas imensas dúvidas, pela paciência, disponibilidade e entusiasmo. Terá minha eterna admiração.

À equipe do Laboratório de Patologia Experimental Multiusuário da PUCPR, Ana, Marina e Seigo, pela incansável colaboração e apoio em muitas etapas desse trabalho, pela extrema competência e por estarem sempre prontos a esclarecer, ensinar e dividir experiência e conhecimento.

Aos meus colegas de laboratório, que de muitas formas se envolveram no meu projeto me apoiando, incentivando e auxiliando na sua realização, dividindo comigo seu tempo, companheirismo e conhecimento.

À Profa Márcia Olandoski, pelo seu inestimável auxílio, por toda sabedoria, tempo e dedicação dispensados na realização das análises estatísticas deste trabalho.

À Dra. Rosimeri Baldin, pelo conhecimento, dedicação e grande colaboração nas análises morfológicas.

Aos professores que participaram de todas as etapas de avaliação desde a apresentação do projeto até a defesa da dissertação. Muito obrigada pela valiosa contribuição, tiveram suma importância no aprimoramento do trabalho.

A todos os meus amigos que estiveram ao meu lado, mesmo que à distância, me incentivando, demonstrando grande interesse pela conclusão de mais esta etapa da minha formação, dando muito apoio, rezando por mim e entendendo todas as minhas ausências.

**“Se eu puder diminuir o sofrimento,
ou aliviar a dor de alguém,
ou ajudar um pássaro ferido
a voltar para seu ninho,
não terei vivido em vão.”**

Emily Dickinson

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Modelo clássico de progressão tumoral para o câncer colorretal.	20
Figura 2 – Montagem do TMA.	32
Figura 3 – Regiões e camadas de localização do tumor.....	33
Figura 4 – Bloco e lâmina de TMA.	34
Figura 5 – Análise morfométrica.	37
Figura 6 – Curva de sobrevida dos pacientes estudados	42
Figura 7 – Expressão da parquina e da APC.....	43
Figura 8 – Curva Roc para média de expressão da parquina nas regiões superficial e intermediária do tumor.	49
Figura 9 – Gráfico de sensibilidade e especificidade para média de expressão da parquina nas regiões superficial e intermediária do tumor.....	50
Figura 10 – Curva de sobrevida em relação à média de expressão da parquina na região profunda do tumor – ponto de corte 10.....	54
Figura 11 – Curva de sobrevida em relação à média de expressão da parquina nas regiões superficial, intermediária e profunda do tumor em todos os casos – ponto de corte 19.....	55
Figura 12 – Curva de sobrevida em relação à idade ≥ 45 anos considerando a média de expressão da parquina na região profunda do tumor – ponto de corte 10.....	56
Figura 13 – Curva de sobrevida em relação ao caráter da cirurgia.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estadiamento do câncer colorretal.	18
Tabela 2 – Características dos anticorpos empregados nos testes imunoistoquímicos....	35
Tabela 3 – Caracterização clínica da amostra estudada.....	40
Tabela 4 – Caracterização histopatológica da amostra estudada – expressão das proteínas MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 e P53	41
Tabela 5 – Sobrevida dos pacientes considerando o período entre o diagnóstico e a última consulta registrada	42
Tabela 6 – Expressão da parquina nas diferentes regiões tumorais estudadas	44
Tabela 7 – Expressão da APC nas diferentes regiões tumorais estudadas	44
Tabela 8 – Expressão de ciclina D, ciclina E e KI67 dada em percentagem de núcleos celulares positivos por amostra	45
Tabela 9 – Associação entre expressão da parquina nas diferentes regiões tumorais estudadas e variáveis clínico-patológicas.....	47
Tabela 10 – Especificidade e sensibilidade para o ponto de corte 11% com relação à média de expressão da parquina nas regiões superficial e intermediária do tumor na variável grau de diferenciação II	49
Tabela 11 – Associação entre expressão da parquina e expressão da APC nas diferentes regiões tumorais estudadas e em amostras não-neoplásicas	51
Tabela 12 – Associação entre localização e expressão da parquina nas diferentes regiões tumorais estudadas	52
Tabela 13 – Associação entre expressão da parquina e sobrevida com relação à região profunda do tumor	53
Tabela 14 – Associação entre amostras com adenocarcinoma colorretal e com mucosa colorretal não-neoplásica de pacientes sem adenocarcinoma colorretal.....	58
Tabela 15 – Associação entre amostras com adenocarcinoma colorretal e com mucosa colorretal não-neoplásica retirada do mesmo paciente.	59
Tabela 16 – Modelo de regressão de Cox para média de expressão da parquina na região profunda do tumor e as variáveis clínico-patológicas	60

LISTA DE ABREVIações

aCGH	<i>array comparative genomic hybridization</i> (hibridação genômica comparativa em microarranjo)
ACVR2	<i>Bactivin A receptor type 2B</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
CCND1	<i>cyclin D1</i>
CCNE1	<i>cyclin E1</i>
CDKN1A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFS	<i>common fragile sites</i> (sítios frágeis comuns)
DCN	<i>DNA copy number</i> (número de cópias do DNA)
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (fator de crescimento epitelial)
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> (receptor de fator de crescimento epitelial)
EZR	<i>ezipin</i>
FAP	<i>familial adenomatous polyposis</i> (polipose adenomatosa familiar)
HC-UFPR	Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
HE	hematoxilina-eosina
HNPCC	<i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i> (câncer colorretal hereditário não polipose)
HR	<i>hazard ratio</i> (taxa de risco)
ITIH3	<i>inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3</i>
KDR	<i>kinase insert domain receptor</i>
KNG1	<i>kininogen 1</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LN	linfonodos
LOH	<i>loss of heterozygosity</i> (perda de heterozigotidade)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (MAP quinase)
MKI67	<i>marker of proliferation Ki-67</i>
MLH1	<i>mutL homolog 1</i>
MSH2	<i>mutS homolog 2</i>
MSH6	<i>mutS homolog 6</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde

PA	para análise
<i>PARK2</i>	<i>parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase</i>
PINK1	<i>PTEN induced putative kinase 1</i>
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> (fosfatidilinositol 3-quinase)
<i>PLIN2</i>	<i>perilipin 2</i>
PMS2	<i>PMS1 homolog 2</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia pela polimerase em tempo real quantitativa)
ROC	<i>receiver operating characteristic</i> (características operacionais do receptor)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
TDAH	transtorno do déficit de atenção com hiperatividade
TGF β	<i>transforming growth factor-β</i> (fator de transformação de crescimento β)
TMA	<i>tissue microarray</i> (microarranjo de tecido)
TNM	tumor/linfonodo/metástase
<i>TP53</i>	<i>tumor protein p53</i>
UBL	<i>ubiquitin-like domain</i> (domínio semelhante à ubiquitina)
VEGFR2	<i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i> (receptor 2 de fator de crescimento epitelial)
<i>XPO4</i>	<i>exportin 4</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 O câncer colorretal	14
1.2 Genética do câncer colorretal	19
1.3 O <i>PARK2</i> e seu produto, a parquina	24
1.4 O <i>PARK2</i> e o câncer colorretal	28
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. METODOLOGIA	31
3.1 Amostras estudadas	31
3.2 Coleta dos dados clínicos e definição das variáveis clínico-patológicas	31
3.3 Preparo dos TMAs e das lâminas	32
3.4 Realização dos testes imunoistoquímicos	34
3.5 Análise morfométrica – parquina e APC	36
3.6 Análise morfológica com estimativa quantitativa – parquina	38
3.7 Contagem celular – ciclina D1, ciclina E1 e KI67	38
3.8 Análise da expressão de P53, MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2	39
3.9 Análise estatística	39
4. RESULTADOS	40
4.1 Análise descritiva da amostra	40
4.2 Expressão das proteínas parquina, APC, ciclina D1, ciclina E1 e KI67	43
4.3 Análise das variáveis clínico-patológicas e da expressão das proteínas ciclina D1, ciclina E1, KI67 e APC em relação à expressão da parquina	46
4.4 Análise das variáveis clínico-patológicas em relação à localização celular da parquina	51
4.5 Análise das variáveis clínico-patológicas em relação à sobrevida	53
4.6 Comparação entre as amostras com adenocarcinoma colorretal e as com mucosa colorretal não-neoplásica	57
4.7 Análise multivariada entre expressão da parquina e as variáveis clínico-patológicas	59
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	78

RESUMO

O câncer colorretal é o terceiro em incidência e a quarta causa de morte por câncer no mundo. Ele pode ocorrer pelo acúmulo de alterações moleculares, cromossômicas e epigenéticas. Apresenta história natural bem conhecida, porém, a sobrevivência observada ainda é considerada baixa, o que leva à necessidade de ampliação da sua caracterização e do desenvolvimento de métodos diagnósticos e tratamentos mais eficientes, que permitam melhores prognósticos. Uma alternativa para tanto é aumentar o conhecimento sobre genes e seus produtos, além de mecanismos moleculares, envolvidos na carcinogênese. Alterações na proteína parkina codificada pelo gene *parkin* *RBR E3 ubiquitin protein ligase (PARK2)* já foram descritas em várias doenças, incluindo o câncer colorretal, no qual a sua função ainda é desconhecida. Este estudo visou investigar o envolvimento da parkina no desenvolvimento e progressão de adenocarcinomas colorretais, através da avaliação da sua expressão associada aos parâmetros clínico-patológicos e sobrevida dos pacientes. Foram estudados 73 casos de adenocarcinomas colorretais e 64 tecidos colorretais não-neoplásicos provenientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR). Estas amostras foram alocadas em blocos de microarranjo de tecido (TMA - *tissue microarray*), transferidas para lâminas e submetidas a testes imunoistoquímicos. Posteriormente, foram analisadas por técnicas de morfometria, morfologia, contagem celular e análise da expressão de proteínas. Foi encontrada associação entre expressão da parkina em determinadas regiões do tumor e as variáveis sexo (média de expressão da parkina entre as regiões superficial (S), intermediária (I) e profunda (P) do tumor nos casos completos; $p = 0,013$, com maior expressão em homens), grau de diferenciação II (média de expressão da parkina entre as regiões S e I; $p = 0,024$, com maior expressão em tumores pouco/moderadamente diferenciados) e tipo histológico (média de expressão da parkina entre as regiões S e I; $p = 0,046$ e média de expressão da parkina entre as regiões S, I e P em todos os casos; $p = 0,028$, com maior expressão no tipo mucinoso). Notavelmente, houve correlação positiva da expressão da parkina com a sobrevida dos pacientes ($p = 0,019$). Os resultados da análise multivariada entre parkina e as variáveis clínico-patológicas demonstram que parkina é um fator independente dessas variáveis. Esses achados sugerem que a expressão da parkina tenha um potencial valor prognóstico e uma possível função protetora na evolução desta neoplasia.

ABSTRACT

Colorectal cancer is the third in incidence and the fourth cause of cancer death worldwide. It can occur by the accumulation of molecular, chromosomal, and epigenetic alterations. It features a well-known natural history, however, the survival observed is still considered very low, which leads to the need to expand the characterization and development of more efficient diagnoses and treatments that enable better prognosis. An alternative to this is to improve knowledge about genes and their products, and molecular mechanisms involved in its carcinogenesis. Alterations in the parkin protein encoded by parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase (*PARK2*) have been described in several diseases, including colorectal cancer, in which its function is still unknown. This study aimed to investigate the involvement of parkin in the development and progression of colorectal adenocarcinomas, by evaluating the immunoreactivity of this protein associated with clinicopathological parameters and survival of patients. 73 cases of colorectal adenocarcinomas and 64 non-neoplastic colorectal tissues from Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) were studied. These samples were placed in tissue microarray blocks (TMAs), transferred to slides and subjected to immunohistochemistry tests. Subsequently, they were analyzed by techniques of morphometry, morphology, cell counts, and analysis of protein expression. Association was found between immunoexpression of parkin on certain regions of the tumor and gender (average of parkin expression between superficial (S), intermediate (I) and profound (P) regions of the tumor in complete cases; $p = 0.013$; with high expression in male), degree of differentiation II (average of parkin expression between S and I regions; $p = 0.024$, with high expression in less/moderately differentiated tumors) and histological type (average of parkin expression between S and I regions; $p = 0.046$ and average of parkin expression between S, I and P regions in all the cases; $p = 0.028$ with high expression in mucinous tumors). Notably, there was a positive correlation between the expression of parkin with survival of patients ($p = 0.019$). The results of multivariate analysis between parkin and clinicopathologic variables show that parkin is an independent factor of these variables. These results suggest that the analysis of parkin expression has a potential prognostic value and a possible protective role in the evolution of this cancer.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O câncer colorretal

O câncer é uma doença multifatorial e seu desenvolvimento é resultado de fatores internos, como variações genéticas, e de fatores externos ou ambientais, como agentes físicos, químicos e biológicos capazes de causar danos ao genoma (INCA, 2016). Todos esses fatores provocam alterações essenciais na fisiologia celular resultando no desenvolvimento e progressão tumoral. Dentre essas alterações estão: autossuficiência das células mutantes em relação aos fatores de crescimento, insensibilidade aos inibidores de crescimento, desenvolvimento de mecanismos de evasão à morte celular programada, potencial ilimitado de replicação, indução de angiogênese direcionada e potencial de invasão tecidual e metástase (LUO *et al.*, 2009).

De acordo com as últimas estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2012, houve um total de 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes por câncer no mundo (WHO, 2015). A OMS estima que, em 2030, o número de novos casos de câncer atinja 21,4 milhões e o número de mortes chegue a 13,2 milhões. O envelhecimento da população é um dos fatores propostos como contribuintes para esse cenário (WHO, 2015).

Ainda de acordo com a OMS, o câncer colorretal ocupa o terceiro lugar entre os mais comuns em homens, com uma incidência anual de 746.000 novos casos, precedido dos cânceres de próstata e pulmão. E ocupa o segundo lugar entre os mais frequentes em mulheres, com uma incidência anual de 614.000 novos casos, antecedido apenas do câncer de mama. Em nível global o câncer colorretal é o terceiro em incidência e a quarta causa de morte por câncer (IARC, 2014; INCA, 2016). Quase 55% dos casos deste câncer ocorrem em regiões mais desenvolvidas (PARK *et al.*, 2011; FERLAY *et al.*, 2013), sendo a Austrália e a Nova Zelândia os países com a maior incidência. Nos EUA, a *American Cancer Society* registrou, em 2015, 132.700 novos casos e 49.700 mortes em decorrência dessa doença (ACS, 2016).

Na população brasileira para o biênio 2016/2017 foram estimados aproximadamente 596.000 novos casos de câncer e destes estima-se que 34.280 sejam de câncer colorretal, sendo 16.660 em homens e 17.620 em mulheres. Em 2013, foram registradas 15.415 mortes em decorrência deste câncer, sendo 7.387 em homens e 8.024 em mulheres (INCA, 2016). Todas essas estimativas não levaram em consideração o câncer de pele não melanoma, que é o tipo de câncer encontrado com maior frequência.

O câncer colorretal compreende neoplasias que acometem um segmento do intestino grosso, o cólon, e também o reto, comprometendo a parede intestinal, e dependendo do grau de invasão, pode comprometer outros órgãos, diretamente, ou através de metástases (INCA, 2016). Como visto nas estimativas anteriormente citadas, essa doença está entre os tipos de câncer mais encontrados na população mundial, demonstrando um aumento constante nos seus índices de incidência e mortalidade, e um impacto importante sobre os custos dos cuidados em saúde (DAVIES *et al.*, 2005; MANNE *et al.*, 2010).

Dentre os fatores de risco para o câncer colorretal estão: doença inflamatória intestinal, obesidade ou sobrepeso, estresse, tabagismo, etilismo, dietas ricas em açúcar refinado, carnes vermelhas e embutidos, e pobre em frutas, vegetais e fibras (NAGENGAST *et al.*, 1995; FADDEN *et al.*, 1997; LIM *et al.*, 2005), idade, herança familiar, fatores genéticos e a presença de pólipos adenomatosos (SILVA e SWERDLOW, 1996; REEVES *et al.*, 2004; HUXLEY *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2009). A idade é considerada um fator de risco importante uma vez que tanto a incidência quanto a mortalidade aumentam com ela, estando a média de aparecimento em torno dos 50 a 70 anos (BACON *et al.*, 1963; FORTNER *et al.*, 1984; STOWER e HARDCASTLE, 1985; CRUZ, 1991; STORM *et al.*, 1991; ARNAUD e BERGAMASCHI, 1994; RAIA e HABR-GAMA, 1994; CRUZ, 1996). Noventa e cinco por cento dos casos deste câncer provavelmente evoluíram a partir de pólipos adenomatosos (MANNE *et al.*, 2010). A sequência adenoma-carcinoma é amplamente aceita com base em estudos observacionais (WELIN *et al.*, 1963; MUTO *et al.*, 1975), sendo que a polipectomia comprovadamente reduz a incidência desta neoplasia (BRENNER *et al.*, 2011; HISABE *et al.*, 2014). Por outro lado, pólipos hiperplásicos, a não ser que estejam associados a síndromes familiares, possuem pouco ou nenhum potencial de se transformar em câncer (MANNE *et al.*, 2010).

O câncer colorretal pode ser classificado histologicamente, de acordo com a OMS, de quatro formas, como (i) adenocarcinoma mucinoso ou colóide, (ii) carcinoma de células em anel de sinete, (iii) carcinoma de pequenas células e (iv) carcinoma medular. No adenocarcinoma mucinoso ou colóide, a neoplasia apresenta vesículas de muco com revestimento epitelial parcial e/ou células neoplásicas soltas em mais de 50% da lesão, podendo apresentar células em anel de sinete. Essas são células preenchidas com um grande vacúolo de mucina que empurra o núcleo para o lado, apresentando um aspecto que lembra um anel, onde o núcleo seria a “pedra” (KIM *et al.*, 1994). Há controvérsias com relação à classificação do adenocarcinoma mucinoso como lesão de alto grau, ou seja,

com células tumorais pouco diferenciadas. Dessa forma, o mais correto seria classificá-lo sem graduação de diferenciação (BOSMAN *et al.*, 2010).

O câncer colorretal é classificado como carcinoma de células em anel de sinete quando são observadas essas células em mais de 50% da lesão. Esse tipo de carcinoma, bem como o carcinoma de pequenas células são classificados como lesão de alto grau ou pouco diferenciados (ODZE *et al.*, 2009).

O carcinoma colorretal classificado como medular apresenta um prognóstico melhor que os outros tipos histológicos. Este é um tipo histológico distinto que não deve ser classificado como pouco diferenciado ou indiferenciado, e é associado à instabilidade de microssatélites (RYAN *et al.*, 2005). O carcinoma medular pode ocorrer de forma esporádica ou associado ao câncer colorretal hereditário não polipose (HNPCC – *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*), e demonstra um elevado número de linfócitos intratumorais - as células do tumor se apresentam em blocos sólidos, arranjos trabeculares ou organóides, sem evidências imunoistoquímicas de diferenciação neuroendócrina. O carcinoma classificado como indiferenciado é composto por menos de 5% de formações glandulares, com células neoplásicas em cordões, ninhos e/ou trabéculas e extensas áreas de necrose tumoral associadas (BOSMAN *et al.*, 2010).

O estadiamento do câncer colorretal pode ser feito por meio do sistema de estadiamento tumor/linfonodo/metástase (TNM) proposto pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (EDGE *et al.*, 2010) (Tabela 1), que incorpora abordagens tanto clínicas como histopatológicas (COMPTON, 2004). Nesse sistema, o item “T” avalia o tumor primário de acordo com o grau de infiltração nas camadas epiteliais; “Tx” indica que o tumor não pode ser avaliado por falta de informações; “T0” significa que não foram encontradas evidências clínicas do tumor primário; “Tis” se refere ao carcinoma *in situ* que se encontra limitado pela membrana basal glandular (intraepitelial), ou pela lâmina própria (intramucosa); “T1” indica que o tumor invadiu a submucosa; quando em “T2” o tumor atingiu a camada muscular (muscular própria); “T3” indica que o tumor se estende à subserosa ou aos tecidos perirretais; e “T4” indica que o tumor já invadiu diretamente outros órgãos/estruturas ou perfurou o peritônio visceral (EDGE *et al.*, 2010). O item “N” aponta o envolvimento dos linfonodos: “Nx” indica que os linfonodos (LN) não podem ser avaliados; “N0” corresponde à ausência de metástases nos gânglios linfáticos regionais; quando em “N1” o tumor se disseminou em um a três LN regionais, podendo subdividir-se em “N1a” (metástase em 1 LN regional), “N1b” (metástase em 2 a 3 LN regionais) e “N1c” (implantes-satélite na subserosa/serosa sem evidências de metástase em nódulos

linfáticos); quando em “N2” a metástases ocorreu em quatro ou mais LN regionais, se subdivide em “N2a” (metástase em 4 a 6 LN regionais) e “N2b” (metástase em 7 ou mais LN regionais) (EDGE *et al.*, 2010). O item “M” avalia a ocorrência de metástase à distância: quando classificado como “Mx”, a presença de metástase não pode ser avaliada; “M0” indica ausência de metástase; e “M1” corresponde à sua existência, e pode ser subclassificado em M1a, quando há metástase para um único órgão ou local, e M1b, quando há invasão peritoneal ou ocorrência de metástase em mais de um órgão (EDGE *et al.*, 2010). Juntamente aos componentes do estadiamento TNM podem ser utilizados prefixos e sufixos que completam a classificação. O prefixo *p* é usado quando o estadiamento é realizado levando em consideração as características anátomo-patológico do tumor. O *y* caracteriza aqueles tumores que foram estadiados após tratamento por quimioterapia ou radioterapia. O prefixo *r* indica recidiva do tumor e o *c* caracteriza o estadiamento clínico. O sufixo *m*, que deve ser descrito entre parênteses (pT(m)NM), indica a ocorrência de tumores primários múltiplos sincrônicos, ou seja, dois ou mais carcinomas primários identificados ao mesmo tempo (BOSMAN *et al.*, 2010). Na Tabela 1, podemos observar os estádios, que vão de 0 a IVB, bem como a classificação T, N e M que o compõe. O estadiamento do câncer colorretal deve incluir informações clínicas, obtidas através de exames de imagem ou físico, com relação à pesquisa de metástase à distância. Resultados de testes referentes a marcadores moleculares devem ser considerados como informações complementares não compondo o estadiamento patológico (BOSMAN *et al.*, 2010).

Após a retirada cirúrgica de um tumor não avançado, sendo classificado nos estádios iniciais I e II, 90% dos pacientes apresentam uma taxa de sobrevida de 5 anos ou mais. Por outro lado, pacientes em estádios mais avançados, nos quais o tumor apresente metástases, a sobrevida de 5 anos pode ser observada em menos de 10% dos casos (SIEGEL *et al.*, 2013). Atualmente 50% dos diagnósticos ocorrem quando o paciente já apresenta metástase (ALVAREZ-CHAYER *et al.*, 2014), resultando em uma taxa de sobrevida muito reduzida (LYALL *et al.*, 2006).

Tabela 1 – Estadiamento do câncer colorretal.

TNM	pT	pN	pM
0	PTis	pN0	M0
I	pT1 pT2	pN0	M0
II	pT3 pT4	pN0	M0
IIA	pT3	pN0	M0
IIB	pT4a	pN0	M0
IIC	pT4b	pN0	M0
III	qualquer T	pN1-2	M0
IIIA	pT1 T2	pN1	M0
IIIB	pT1	pN2a	M0
	pT3 pT4a	pN1	M0
	pT2 pT3	pN2a	M0
IIIC	pT1 pT2	pN2b	M0
	pT4a	pN2a	M0
	pT3 pT4a	pN2b	M0
IV	qualquer T	qualquer N	M1
IVA	qualquer T	qualquer N	M1a
IVB	qualquer T	qualquer N	M1b

Legenda: A coluna TNM representa o estágio do tumor de acordo com a classificação TNM, iniciando no estágio menos agressivo e mostrando consecutivamente os estágios mais avançados. A coluna pT representa as classificações do tumor primário de acordo com o estadiamento patológico (p) (pTx: tumor não avaliado; pT0: sem evidência de tumor; pTis: câncer *in situ*, intraepitelial ou intramucoso; pT1: o tumor invade a submucosa; pT2: o tumor invade a camada muscular própria; pT3: o tumor invade a serosa ou tecido pericólico/perirretal; pT4a: o tumor perfura o peritônio visceral; pT4b: o tumor invade diretamente outros órgãos ou estruturas adjacentes. A coluna pN representa as classificações com relação ao comprometimento de linfonodos (LN) de acordo com o estadiamento patológico (p) (pNx: LN regionais não avaliados; pN0: ausência de metástase para LN regionais; pN1a: metástase em 1 LN regional; pN1b: metástase em 2 a 3 LN regionais; pN1c: implantes-satélite na subserosa/serosa sem evidências de metástases em nódulos linfáticos; pN2a: metástase em 4 a 6 LN regionais; pN2b: metástase em 7 ou mais LN regionais). A coluna pM representa as classificações com relação a ocorrência de metástade a distância de acordo com o estadiamento patológico (p) (pM1a: metástase para um órgão ou local; pM1b: metástase para mais de um órgão ou para o peritônio).

Fonte: adaptado de EDGE *et al.*, 2010.

O fato de a doença apresentar uma história natural bem conhecida, na qual uma lesão precursora apenas após 8 a 10 anos (CONTEDEUCA *et al.*, 2013) evolui e transforma-se numa neoplasia maligna, oferece uma ampla janela de oportunidade para sua detecção.

Lesões precursoras podem ser identificadas e ressecadas endoscopicamente, bem como tumores em estádios iniciais. A investigação diagnóstica pode ser realizada através dos seguintes métodos: teste de sangue oculto nas fezes, colonoscopia ou retossigmoidoscopia com biópsia e tomografia computadorizada (modernamente conhecida como colonoscopia virtual) (WIJKERSLOOTH *et al.*, 2011).

Apesar do custo elevado de alguns desses métodos para uso em larga escala, o impacto financeiro gerado pelo tratamento é ainda mais alto. Além disso, a escassez de equipamentos e de profissionais especializados, bem como a característica invasiva de alguns dos métodos diagnósticos constituem dificuldades adicionais a sua implementação como forma de triagem populacional.

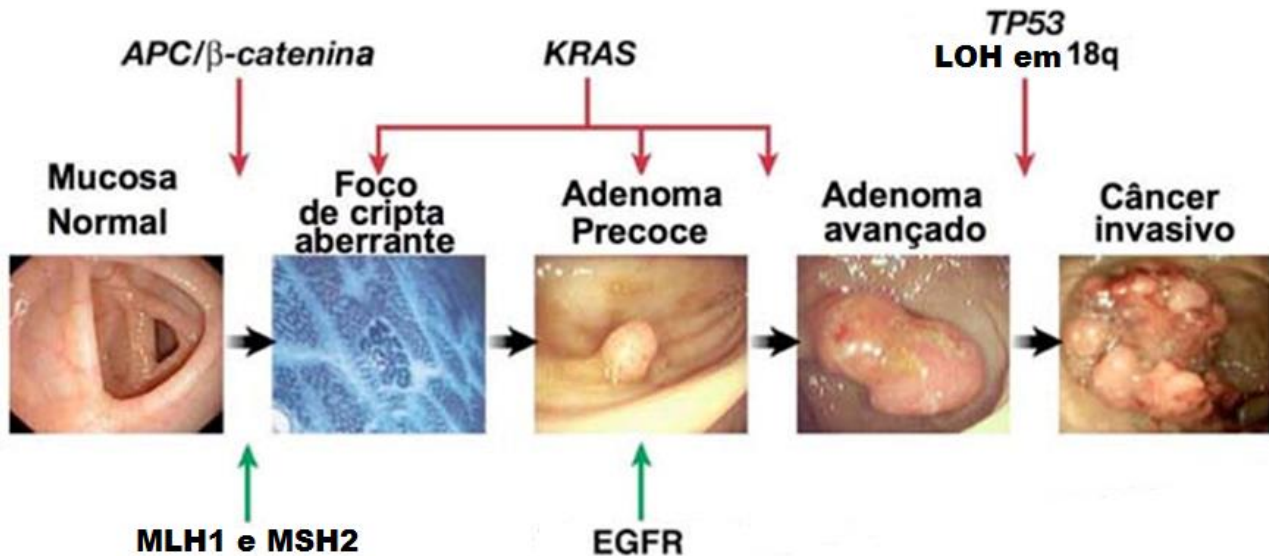
1.2 Genética do câncer colorretal

O câncer colorretal se desenvolve através do acúmulo de alterações moleculares, cromossômicas e epigenéticas (VOGELSTEIN *et al.*, 1988; MORÁN *et al.*, 2010) que levam à transformação do epitélio colorretal normal (células epiteliais glandulares) em neoplásico resultando em adenocarcinoma invasivo (HANAHA e WEINBERG, 2000; LITTLE *et al.*, 2008). Em 1988, Vogelstein e col. propuseram o clássico modelo de progressão tumoral em câncer colorretal (Figura 1), em que descrevem alterações no epitélio normal para tumores benignos (adenomas e pólipos serrilhados sésseis), seguidas pelo carcinoma invasivo, e posteriormente câncer metastático (VOGELSTEIN *et al.*, 1988).

Com relação às alterações genéticas, esse câncer pode ser dividido em esporádico e hereditário. O câncer esporádico corresponde a aproximadamente 75% dessas neoplasias e os pacientes afetados não possuem histórico familiar de neoplasias colorretais (DE LA CHAPELLE, 2004; MORÁN *et al.*, 2010; ACS, 2016). O câncer hereditário corresponde a aproximadamente 25% dos casos, e pode ser classificado em síndrome da polipose adenomatosa familiar (FAP – *familial adenomatous polyposis*) e HNPCC ou síndrome de Lynch (LYNCH *et al.*, 1995; LYNCH e LYNCH, 1998; ACS, 2016). Pode ser observado o ganho de função de um oncogene como *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) e como *BRAF* (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*), sendo os dois responsáveis por vias de transdução de sinais e que passam a ser transcritos sem o estímulo de fatores de crescimento, resultando na proliferação celular descontrolada. Ou a perda da função de um gene supressor de tumor como *TP53* (*tumor protein p53*) e *APC* (*adenomatous polyposis coli*), ou de um gene de reparo como *MLH1* (*mutL homolog 1*),

MSH2 (*mutS* homolog 2), *MSH6* (*mutS* homolog 6) e *PMS2* (*PMS1* homolog 2) (LYNCH e DE LA CHAPELLE, 2003; ANACLETO *et al.*, 2005).

Figura 1 – Modelo clássico de progressão tumoral para o câncer colorretal.



Legenda: Principais genes envolvidos em cada etapa da progressão tumoral. No início do processo de tumorigênese é observada a formação de criptas aberrantes, nesta fase podem ser observadas alterações na via de sinalização WNT que podem ocorrer devido a mutações no gene *APC* e consequentemente desregulação da β -catenina. Nesta fase inicial, também podem ser observadas alterações nos genes de reparo *MLH1* e *MSH2*. Secundariamente, com a progressão para adenomas são descritas mutações no proto-oncogene *KRAS* e em *EGFR*. Mutações em *TP53* e perda de heterozigose (LOH) no cromossomo 18q são observadas na presença de adenomas mais avançados.

Fonte: Takayama *et al.*, 1998, por Pino e Chung, 2010 e readaptado.

Entre as alterações genômicas e epigenéticas descritas em câncer colorretal, três fenótipos já foram bem caracterizados: instabilidade cromossômica (GRADY e CARETHERS, 2008), instabilidade de microssatélite (GRADY, 2004) e metilação de ilhas CpG (fenótipo metilado) (RIBIC *et al.*, 2003; GRADY, 2004; WEISENBERGER *et al.* 2006; BOLAND, 2007; BARAULT *et al.*, 2008; ISSA, 2008).

A instabilidade cromossômica é descrita em 85% dos tumores colorretais (GRADY e CARETHERS, 2008). Essa alteração pode ser caracterizada pela presença de aneuploidia, quando a célula tem o seu material genético alterado resultando em mudanças no número de cromossomos, ou por aberrações estruturais (WALTHER *et al.*, 2008). A relação da instabilidade cromossômica com o câncer colorretal ainda não foi completamente elucidada, mas alguns estudos propõem que essa instabilidade leve a um aumento da diversidade clonal contribuindo para a progressão do câncer (HERMSEN *et al.*, 2002; GRADY, 2004; MALEY *et al.*, 2006).

A instabilidade de microssatélites pode ser encontrada em aproximadamente 15% dos tumores colorretais (GRADY, 2004). Nesta, ao contrário da instabilidade cromossômica,

os pacientes apresentam um cariótipo normal e alterações no número de sequências de nucleotídeos repetidas em tandem, os microssatélites. Essas alterações podem ocorrer durante o processo de replicação do DNA, quando uma falha na DNA polimerase ao replicar as regiões de microssatélites gera deleções ou inserções de repetições na nova fita formada. A ocorrência de alterações na família dos genes de reparo por metilação aberrante do DNA ou por mutação somática ou germinativa fará com que estes não consigam reverter os erros de repetição, contribuindo para a instabilidade (FEARON e VOLGELSTEIN, 1990; JUBB *et al.*, 2001).

A maioria dos casos de síndrome de Lynch ocorre por variações nos genes de reparo *MLH1* e *MSH2*, contribuindo para a instabilidade de microssatélites. Nesta síndrome são comumente encontradas mutações desses genes nas linhagens celulares germinativa dos indivíduos (PAPADOPOULOS *et al.*, 1994; GRADY, 2004). Por outro lado, no câncer esporádico a perda da atividade dos genes de reparo ocorre em grande parte das vezes por silenciamento do gene *MLH1*, que se dá por metilação de ilhas CpG (KANE *et al.*, 1997; GRADY, 2004; PAI *et al.*, 2014). A metilação das ilhas CpG pode ser observada em cerca de 20% dos tumores colorretais. Essas são encontradas nas regiões promotoras de vários genes, dentre eles o *MLH1*. Quando ocorre a metilação destas ilhas há um bloqueio na transcrição do gene (PAI *et al.*, 2014). Uma associação entre mutações no gene *BRAF* e metilação das ilhas CpG sugere a ligação entre instabilidade de microssatélite e esta outra alteração (WEISENBERGER *et al.* 2006; BARAULT *et al.*, 2008). Tumores esporádicos com instabilidade de microssatélite também já foram associados a mutações no gene *BRAF*, enquanto que em tumores resultantes de mutações germinativas em genes de reparo não são descritas alterações nesse gene (WANG *et al.*, 2003; DOMINGO *et al.*, 2004).

Algumas características histopatológicas podem sugerir a presença de instabilidade de microssatélites, sendo elas: presença de infiltrado linfóide intratumoral (mais de cinco linfócitos para cada dez campos de grande aumento), reação linfóide Crohn-like, padrão de crescimento medular, diferenciação mucinosa ou carcinoma de células em anel de sinete e lesão situada na porção direita do cólon (BOLAND *et al.*, 1998; RIBIC *et al.*, 2003). A identificação da ocorrência de instabilidade de microssatélites contribui para a triagem da síndrome de Lynch (VASEN *et al.*, 1999). Para essa identificação é recomendado, de acordo com as diretrizes de Bethesda, o teste de instabilidade em casos de câncer colorretal que apresentam as seguintes características: aparecimento em pacientes com idade inferior a 50 anos; ocorrência de tumores sincrônicos, metacrônicos (múltiplos tumores primários que se desenvolvem em intervalos) ou de outras neoplasias associadas à síndrome de

Lynch (carcinoma de endométrio, estômago, ovário, pâncreas, ureter e pelve renal, trato biliar e intestino delgado), independentemente da idade; presença de características histopatológicas preditivas de instabilidade de microssatélite, já descritas anteriormente; a ocorrência de câncer colorretal em um ou mais consanguíneos de primeiro grau de um indivíduo com síndrome de Lynch, com um dos tumores diagnosticado em indivíduo com idade inferior a 50 anos; câncer colorretal diagnosticado em dois ou mais parentes de primeiro grau de um indivíduo com síndrome de Lynch independente da idade (HERRÁIZ e MUÑOZ-NAVAS, 2009).

Além das instabilidades genômica e epigenética, pode ocorrer o acúmulo de mutações em genes específicos, o que conseqüentemente leva à desregulação de vias específicas de sinalização resultando em alterações na proliferação, diferenciação, apoptose, imortalização, angiogênese e invasão celular (HANAHAAN e WEINBERG, 2000). Algumas das vias já descritas desreguladas nas neoplasias colorretais são: as vias de sinalização da WNT- β -catenina, do TGF β (*transforming growth factor β* – fator de transformação de crescimento β), do EGFR (*epidermal growth factor receptor* – receptor de fator de crescimento epitelial) – MAPK (*mitogen-activated protein kinase* – MAP quinase) e da PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase* – fosfatidilinositol 3-quinase). Entre essas as que apresentam associação com o maior número de casos de câncer colorretal são as WNT- β -catenina e EGFR-MAPK (SIENA *et al.*, 2009; WALTHER *et al.*, 2009).

Além das vias de sinalização, outras alterações que afetam o comportamento celular são também descritas, como: mutações no gene supressor tumoral TP53 e perda de heterozigose (LOH – *loss of heterozygosis*) em 18q (GRADY e PRITCHARD, 2014).

As mutações no gene APC são as mais comuns nos tumores colorretais esporádicos, porém quando ocorrem na linhagem germinativa são ligadas ao desenvolvimento da FAP. Mutações nesse gene podem ser encontradas no início do processo tumoral e são associadas principalmente à via clássica, adenoma tubular e instabilidade de cromossomos (Figura 1) (VOGELSTEIN *et al.*, 1988; MIYAKI *et al.*, 1999; CHUNG, 2000). A proteína APC está envolvida na via de sinalização WNT, a qual regula negativamente marcando o fator de transcrição β -catenina para a degradação via proteassomo. Alterações na proteína APC resultam em um aumento da sinalização WNT aumentando a transcrição dos genes alvo dessa via, por meio da estabilização da β -catenina. Também podem ser observadas mutações no gene da β -catenina resultando em uma proteína truncada que não sofrerá degradação mediada pela APC (SAMOWITZ *et al.*, 1999).

A proteína codificada pelo proto-oncogene *KRAS* atua na sinalização da via EGFR-MAPK através da proteína BRAF ativando MAPK e impulsionando o crescimento e sobrevivência celular. Mutações nesse proto-oncogene o transformam em um oncogene e podem resultar na sobre-expressão desta via desregulando o crescimento e a sobrevivência celular (DOWNWARD, 2003). Na sequência adenoma-carcinoma as mutações em *KRAS* ocorrem, geralmente, no início do processo, porém em um segundo momento, após mutações em *APC* (Figura 1) (VOGELSTEIN *et al.*, 1988).

O gene *TP53* é um fator de transcrição induzido por estresse, ele controla vários genes que têm função reguladora em processos de sinalização (TAKAYAMA *et al.*, 2006), sendo um dos elementos mais importantes do sistema de defesa anticâncer (LEVINE e OREN, 2009). Durante o processo de desenvolvimento tumoral, mutações em *TP53* desempenham uma função crítica na transição adenoma-carcinoma (LÓPEZ *et al.*, 2012). São descritas mutações que levam a alterações em diversos sítios da proteína P53, a maior parte ocorre no domínio de ligação ao DNA, provocando a ruptura dessa ligação e uma sequencial transativação. Essas diferentes alterações podem influenciar em processos tais como a profundidade invasiva e local metastático do tumor (LÓPEZ *et al.*, 2012).

A expressão do gene *MKI67* (*marker of proliferation Ki-67*) é descrita em diversos cânceres, incluindo o colorretal. A proteína codificada por esse gene, denominada KI67, está presente em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose) e é estritamente associada ao processo de proliferação. Assim sendo *MKI67* é um excelente marcador para determinar a ocorrência desse processo (SCHOLZEN e GERDES, 2000).

Vias adicionais de desenvolvimento do câncer colorretal são descritas, como a via serrilhada, que se desenvolve a partir da mucosa normal através de adenomas serrilhados. Nesta há uma maior ocorrência de mutações no gene *BRAF* e metilação em ilhas CpG, que resultam no desenvolvimento do câncer no cólon proximal com perda do gene *MLH1* e instabilidade de microssatélite, apresentando um bom prognóstico (BICALHO *et al.*, 2015). A outra é a via alternativa, tendo origem na mucosa normal através das vilosidades, com mutações em *KRAS*, *APC* e metilação de ilhas CpG, apresentando um pequeno número de adenomas serrilhados e resultando em um câncer com um prognóstico ruim (BICALHO *et al.*, 2015).

Além dos genes previamente descritos, outros vêm sendo estudados com relação à susceptibilidade, ao início e à progressão do câncer colorretal, e propostos como marcadores que possam auxiliar no diagnóstico precoce e no prognóstico desta patologia, como por exemplo: *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A* (*CDKN1A*) (ZIRBES *et al.*, 2000),

activin A receptor type 2B (ACVR2B) (BABEL *et al.*, 2009), *perilipin 2 (PLIN2)* (MATSUBARA *et al.*, 2011), *exportin 4 (XPO4)* (FANAYAN *et al.*, 2013), *ezrin (EZR)* (FANAYAN *et al.*, 2013), *inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3 (ITIH3)* (IVANCIC *et al.*, 2013), *kininogen 1 (KNG1)* (WANG *et al.*, 2013). Porém, poucos avanços ocorreram na descrição fenotípica da forma esporádica, especialmente nas alterações moleculares envolvidas nos estádios invasivos destas lesões (MANNE *et al.*, 2010). Os avanços na pesquisa de biomarcadores para os fenótipos moleculares de câncer colorretal devem contribuir para o diagnóstico e, especialmente, para o tratamento precoce desse câncer (BURKE e HENSON, 1993).

Apesar da detecção de biomarcadores em soro ou plasma ser bastante conveniente, a existência nessas amostras de misturas heterogêneas de proteínas provenientes de diferentes tecidos e com concentrações muito díspares dificulta a detecção de proteínas que possam ser relacionadas especificamente ao câncer colorretal (NIBBE e CHANCE, 2009). Deste modo, a utilização de tecido neoplásico e não-neoplásico, provenientes do órgão a ser estudado é a abordagem mais direta para a pesquisa de biomarcadores. As células tumorais não secretam para o sangue todas as proteínas alteradas no tumor, logo a concentração de um biomarcador candidato é superior no tecido tumoral em comparação a outros fluidos. Ainda, com a análise das amostras do tecido tumoral não restam dúvidas de que as proteínas detectadas têm origem no próprio tumor (ALFONSO *et al.*, 2005; ALVAREZ-CHAVER *et al.*, 2007). Estas evidências justificam a escolha neste trabalho do método de microarranjo de tecido (TMA – *tissue microarray*), que consiste em um bloco multiamostrado, que reúne diversas amostras parafinadas em um único bloco de parafina, para pesquisa da expressão de proteínas.

1.3 O *PARK2* e seu produto, a parquína

A proteína parquína é codificada pelo gene *PARK2* (*parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase*), localizado na região cromossômica 6q25.2-q27, e pertence a família das proteínas *RING-finger* (STAROPOLI *et al.*, 2003; KAY *et al.*, 2010). Este gene, composto por 12 exons que codificam para os 465 aminoácidos da parquína, é expresso em uma variedade de tecidos, incluindo o cérebro (em neurônios e astrócitos), pulmão, cólon, testículos e músculos (KITADA *et al.*, 1998; PICCHIO *et al.*, 2004; FUJIWARA *et al.*, 2008; POULOGIANNIS *et al.*, 2010). *PARK2* vem sendo associado a várias doenças, tais como: hanseníase (MIRA *et al.*, 2004), *Diabetes mellitus* tipo 2 (WONGSEREE *et al.*, 2009), Alzheimer (BURNS *et al.*, 2009), esclerose múltipla (WITTE *et al.*, 2009), transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH)

(JARICK *et al.*, 2014), autismo (GLESSNER *et al.*, 2009), e diversos tipos de câncer (CESARI *et al.*, 2003; VEERIAH *et al.*, 2010).

O *PARK2* está localizado no sítio frágil comum (CFS – *common fragile sites*) FRA6E, que é um dos mais expressos no genoma humano. Os sítios frágeis são muito suscetíveis à instabilidade genômica (SMITH *et al.*, 2006), sendo *hotspots* para rearranjos como translocações, deleções e amplificações (PALUMBO *et al.*, 2010), e geralmente abrigam genes de supressão tumoral (JE *et al.*, 2013). *PARK2* é considerado o gene mais relevante em FRA6E e seus exons 2 a 8 são localizados no centro de fragilidade (DENISON *et al.*, 2003a; PALUMBO *et al.*, 2010), que é a região mais instável em CFS, sendo suscetível à formação de interrupções ou quebras nas grandes regiões intrônicas (DENISON *et al.*, 2003a).

Alterações nesse gene parecem resultar em diferentes fenótipos dependendo do contexto celular, isso se deve ao fato da parquina ser uma proteína multifuncional importante em diversos processos tais como: *turnover* proteico, proteção contra diversos tipos de estresse (SHIMURA *et al.*, 2000; KAHLE e HAASS, 2004), homeostase mitocondrial, xenofagia (MANZANILLO *et al.*, 2013), metabolismo, controle do ciclo, proliferação e migração celular, entre outros, que regulam o crescimento e sobrevivência das células (XU *et al.*, 2014, GONG *et al.*, 2014).

Esta proteína é expressa em uma variedade de tecidos, principalmente no córtex cerebral, no ventrículo lateral, na tireoide, na vesícula biliar, no rim e nos testículos, nos quais apresenta uma alta expressão. No cólon e no reto sua expressão é considerada média, e é encontrada principalmente nas células glandulares (PROTEIN ATLAS).

Ela é composta pelos domínios C-terminal semelhante à ubiquitina (UBL – *ubiquitin-like*) e N-terminal RING-IBR-RING, rico em resíduos de cisteína, que contribuem para a sua função como uma E3 ubiquitina ligase (GORGOLIS *et al.*, 2005). Através da associação com enzimas de conjugação de ubiquitina, incluindo UBC7 e UBC8, promove mono e poliubiquitinação marcando proteínas desdobradas e danificadas para degradação proteassomal (SAKATA *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2005; DOSS-PEPE *et al.*, 2005; POULOGIANNIS *et al.*, 2010; VEERIAH *et al.*, 2010) ou regulando a sua localização e tráfego intracelular (LIM *et al.*, 2005; FALLON *et al.*, 2006; HAMPE *et al.*, 2006; VIVES-BAUZA *et al.*, 2010). Uma consequência da diminuição ou perda na função da parquina pode ser o acúmulo tóxico de um ou mais dos seus substratos, por exemplo, formando os corpos de Lewy que podem resultar em neurodegeneração (SHIMURA *et al.*, 2001; STAROPOLI *et al.*, 2003; HAMPE *et al.*, 2006).

A parquina possui 11 isoformas, geradas por *splicing* alternativo, sendo elas: *PARK2-004*, *PARK2-005*, *PARK2-006*, *PARK2-002*, *PARK2-003*, *PARK2-001*, *PARK2-*

203, *PARK2-201*, *PARK2-204*, *PARK2-202*, *PARK2-007* (ENSEMBL, 2016). Todas elas foram descritas na espécie humana, bem como em algumas outras espécies, e a maioria codifica para proteína, com exceção da *PARK2-007*. Esta última não é capaz de gerar uma proteína, pois é degradada por um mecanismo de vigilância celular que retira moléculas de RNA que contêm *stop* códons prematuros. As isoformas *PARK2-004*, *PARK2-005*, *PARK2-006*, *PARK2-003* e *PARK2-001*, estão envolvidas em mecanismos de autofagia, transcrição, regulação da transcrição e via de conjugação UBL (KITADA *et al.*, 1998; KASAP *et al.*, 2009). Alterações nas isoformas já foram descritas em doença de Parkinson (OLIVEIRA *et al.*, 2003; FOROUD *et al.*, 2003) e mais recentemente em câncer de ovário (DENISON *et al.*, 2003b). A isoforma *PARK2-004* também desempenha função como proteína ubiquitina transferase (COROMINAS *et al.*, 2014), assim como *PARK2-203*, *PARK2-201*, *PARK2-204*, *PARK2-202* e *PARK2-002*, tendo que essa última também possui uma atividade ligase (MUNGALL *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2016).

A parquina também é um regulador-chave da homeostase mitocondrial (NARENDRA *et al.*, 2008), envolvida em todo o espectro da dinâmica dessa organela, incluindo biogênese, fusão/fissão, e *clearance* via mitofagia (CHEN e CHAN, 2009). Neste último processo a parquina degrada seletivamente mitocôndrias que possuem mutações em seu DNA ocorridas pela ação de espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*) (GOGVADZE *et al.*, 2008; ROTHFUSS *et al.*, 2009; SUEN *et al.*, 2010). Estas organelas são essenciais para o metabolismo e morte celular, e sua disfunção pode contribuir diretamente para o desenvolvimento de câncer e de doenças neurodegenerativas (ZANSEN e SCHON, 2005; BRANDON *et al.*, 2006; POULOGIANNIS *et al.*, 2010; LIM *et al.*, 2012).

Essa proteína age igualmente na progressão do ciclo celular, sendo possível observar a dinâmica da sua localização ao longo deste ciclo: na interfase, apresenta distribuição perinuclear; na mitose, se localiza principalmente nos centrôsomos e fusos mitóticos; e na citocinese é encontrada em *midbody* (SUN *et al.*, 2013). No ciclo celular, acoplada a complexos proteicos, a parquina induz a ubiquitinação e degradação proteossomal das ciclinas D e E. Desta forma, atua regulando o ciclo, pois a progressão para a fase de síntese depende da presença das ciclinas (STAROPOLI *et al.*, 2003; IKEUCHI *et al.*, 2009; VEERIAH *et al.*, 2010; GONG *et al.*, 2014). Quando superexpressa, a parquina mantém a fase G₁ e atrasa a progressão para a mitose, por meio da alta taxa de degradação das ciclinas (TAY *et al.*, 2010; YEO *et al.*, 2012). Uma redução na expressão desta proteína, diminuindo a degradação proteossomal das ciclinas, aumenta a porção de células em fase S e G₂, o que pode contribuir no desenvolvimento da tumorigênese (VEERIAH *et al.*, 2010).

Múltiplas evidências indicam que *PARK2* também regula funcionalmente o centrôssomo e os microtúbulos interagindo com γ -tubulina, uma proteína com função na estabilização e orientação do fuso mitótico (ZHAO *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2008). Como a dinâmica dos microtúbulos tem sido associada à migração das células, *PARK2* pode regular negativamente a metástase de células de câncer pela sua atividade de estabilização dos microtúbulos e sua inativação pode promover aneuploidia e desregulação da divisão celular (CESARI *et al.*, 2003).

A ocorrência de LOH e variação do número de cópias do *PARK2* foram observadas em diversos tumores humanos, incluindo ovário (POULOGIANNIS *et al.*, 2010; TAY *et al.*, 2010; YEO *et al.*, 2012), mama (VEERIAH *et al.*, 2010), rim (PICCHIO *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004), pulmão (CESARI *et al.*, 2003) e fígado (WEST e MAIDMENT, 2004; BOUMAN *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011) sugerindo que estes mecanismos possam predispor o aparecimento desta patologia. Hipermetilação do promotor é um fator epigenético comum na alteração da expressão de um gene. Embora a frequência da hipermetilação do promotor de *PARK2* seja baixa, quando comparada com sua mutação ou deleção, pode servir como uma forma alternativa de inativar este gene, regulando negativamente a expressão do seu RNA mensageiro (POULOGIANNIS *et al.*, 2010). A baixa transcrição de *PARK2* é notavelmente correlacionada com o aumento da presença de metástase linfonodal e pior sobrevida de pacientes. Em contrapartida, uma superexpressão do *PARK2* demonstrou regular negativamente linhagens celulares de câncer (POULOGIANNIS *et al.*, 2010; TAY *et al.*, 2010; VEERIAH *et al.*, 2010; YEO *et al.*, 2012) e tumores primários (WANG *et al.*, 2004; SUN *et al.*, 2013). *Splicing* alternativo também pode levar a uma expressão anormal de *PARK2*, o que influenciaria na função da proteína (Gerola *et al.*, 2014). Alterações genéticas e epigenéticas neste gene estão presentes na maioria dos processos tumorais humanos estudados, sugerindo que a sua inativação pode contribuir para a transformação neoplásica e progressão do tumor (IKEUCHI *et al.*, 2009; GEROLA *et al.*, 2014; LA COGNATA *et al.*, 2014).

Ainda, *PARK2* é capaz de regular negativamente VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2* – receptor 2 de fator de crescimento epitelial), um fator de crescimento codificado pelo gene *KDR* (*kinase insert domain receptor*) (YEO *et al.*, 2012), tendo uma função na supressão da angiogênese. Camundongos deficientes em *PARK2* mostraram aumento da susceptibilidade à tumorigênese com um aumento da proliferação e a capacidade de formação de células de câncer no pâncreas (SUN *et al.*, 2013). A sua expressão ectópica reduziu *in vitro* e *in vivo* o crescimento de células cancerosas de diversas origens (PICCHIO *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004; POULOGIANNIS *et al.*, 2010; VEERIAH *et al.*, 2010;

YEO *et al.*, 2012; TAY *et al.*, 2014), apontando para a função supressora de tumor deste gene. Além disso, a superexpressão do *PARK2* parece inibir a migração e invasão das células cancerosas (TAY *et al.*, 2010).

1.4 O *PARK2* e o câncer colorretal

Alguns estudos vêm sendo realizados na tentativa de estabelecer uma relação entre o gene *PARK2* e o câncer colorretal, e elucidar os mecanismos pelos quais essa relação ocorreria.

Em 2009 Ikeuchi e col. avaliaram a expressão do *PARK2*, em associação com a regulação do ciclo celular através da degradação proteassomal da ciclina E em células epiteliais do cólon. A desregulação das fases G₁ e S do ciclo celular por meio da superexpressão da ciclina E é uma característica marcante observada em vários tipos de câncer (SCHRAML *et al.*, 2003). Essa ciclina foi sugerida como sendo um substrato da parquina com base no fato de que uma deficiência desta proteína contribui para o acúmulo da ciclina E, em neurônios pós-mitóticos (STAROPOLI *et al.*, 2003). O seu acúmulo também foi relatado em células de tumor colorretal (SUTTER, 2002). Ikeuchi e col. encontraram através de experimentos com cultivo celular, qRT-PCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction* – reação em cadeia pela polimerase em tempo real quantitativa) e *immunoblotting*, que a expressão da parquina é induzida em resposta à sinalização de crescimento por meio do fator EGF (*epidermal growth factor* – fator de crescimento epitelial). Este fator regula o crescimento de células epiteliais em diversos órgãos (NORMANNO *et al.*, 2006) e a sua superexpressão está envolvida na patogênese e progressão de vários cânceres (YASUI *et al.*, 1988; SALOMON *et al.*, 1995), inclusive do câncer colorretal (YANG *et al.*, 1999; CUNNINGHAM *et al.*, 2004). Ensaio de transfecção foram utilizados para analisar a influência da parquina na degradação da ciclina E, e os resultados de *immunoblotting* evidenciaram a sua função como um mediador dessa degradação. Em 43 amostras de câncer colorretal estudadas, 18 (42%) expressaram várias isoformas do *splicing* alternativo da parquina com várias deleções abrangendo os exons 3-6, região correspondente ao seu domínio UDP. Essas isoformas poderiam influenciar na proliferação celular em células cancerígenas através da desregulação da proteólise da ciclina E, demonstrada pelo acúmulo dessa proteína em células de câncer colorretal mantidas em cultivo. Esse acúmulo pode conduzir à desregulação da progressão do ciclo celular no câncer colorretal (IKEUCHI *et al.*, 2009).

Em 2010 Poulogiannis e col., demonstraram através de aCGH (*array comparative genomic hybridization* – hibridação genômica comparativa em microarranjo) em carcinomas colorretais primários que 33% das amostras apresentavam perda de número de cópias do DNA (DCN – *DNA copy number*) envolvendo o gene *PARK2*. Aproximadamente 28% das perdas por DCN foram detectadas na região 11 em 6q26 inteiramente dentro desse gene. Esta perda se estende por aproximadamente 1,2 Mb e em é geral heterozigótica, afetando mais comumente os exons 3-4, semelhante ao que ocorre no parkinsonismo juvenil autossômico recessivo (WEST e MAIDMENT, 2004). Também foi observada através da qRT-PCR, embora com expressões mínimas, hipermetilação e mutação do promotor do *PARK2*, como uma alternativa de silenciamento desse gene. Linhagens de células estáveis superexpressando *PARK2* foram utilizadas para avaliar a influência da sua alteração na proliferação de células de câncer colorretal, e foi observada uma inibição dessa proliferação (POULOGIANNIS *et al.*, 2010). Alteração ou deleção no *PARK2* foi intrinsecamente relacionada à deficiência no gene *APC*. Esta cooperação pode acelerar a progressão do tumor, e foi demonstrada através de experimentos com camundongos, nos quais animais com inativação heterozigota do *APC* e do *PARK2* apresentaram um crescimento de adenoma acelerado quando comparados com animais que apresentavam apenas mutação em *APC* (POULOGIANNIS *et al.*, 2010). A miscigenação de camundongos *PARK2 knockout* heterozigotos com camundongos *APC* mutado resultou em uma aceleração marcante no desenvolvimento do adenoma intestinal e um aumento da multiplicidade dos pólipos. Os resultados sugerem um caminho desta carcinogênese onde *PARK2* é um gene supressor de tumor cuja haploinsuficiência pode cooperar com a mutação do *APC* no desenvolvimento do câncer colorretal (POULOGIANNIS *et al.*, 2010).

No contexto exposto, no presente trabalho foi investigada, em amostras de câncer colorretal, a expressão da parquina e de outras proteínas envolvidas em vias de sinalização e de progressão deste câncer, sendo elas P53, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, KI67, APC, ciclina D e ciclina E. O objetivo é contribuir para explicar a função da parquina no câncer colorretal, estudando comparativamente a sua expressão e de outras proteínas já caracterizadas nesta neoplasia. Da mesma forma, procurar uma correlação entre os níveis de expressão das ciclinas D e E e os da parquina, para investigar a proposta de estudos anteriores de que a parquina seria um regulador do ciclo celular por meio da degradação destas ciclinas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Correlacionar a expressão da parquina a características clínico-patológicas, à expressão das proteínas ciclina D, ciclina E, KI67 e APC, e à sobrevida de pacientes com adenocarcinoma colorretal, a fim de investigar o envolvimento da parquina na carcinogênese deste adenocarcinoma.

2.2 Objetivos específicos

1. Descrever as características clínico-patológicas, incluindo a expressão imunoistoquímica das proteínas MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 e P53, dos pacientes com adenocarcinoma colorretal que compõe a amostra;

2. Avaliar a expressão da parquina, ciclina D, ciclina E, KI67 e APC por imunoistoquímica nas amostras selecionadas;

3. Comparar a expressão e localização celular da parquina em células neoplásicas (adenocarcinoma colorretal) e não-neoplásicas;

4. Investigar a associação entre a expressão da parquina e as características clínico-patológicas dos pacientes selecionados;

5. Pesquisar a correlação entre a expressão da parquina e a expressão de ciclina D, ciclina E, KI67 e APC;

6. Avaliar a associação entre a sobrevida dos pacientes estudados e suas características clínico-patológicas, bem como, a expressão de parquina, ciclina D, ciclina E, KI67 e APC.

3. METODOLOGIA

O presente projeto está vinculado a outro mais amplo intitulado: *Expressão imunoistoquímica das vias de carcinogênese em pólipos e carcinomas colorretais*, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), com o número de registro 820.432.

3.1 Amostras estudadas

Para a realização desse estudo foram selecionados 73 casos de adenocarcinoma colorretal provenientes do Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFPR, de Curitiba – PR, incluindo pacientes de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos. Estes correspondiam a todos os pacientes submetidos à cirurgia eletiva e de emergência no serviço de oncocoloproctologia entre os anos 2007 – 2011, que permaneceram em segmento no HC-UFPR e apresentaram material histológico em condições adequadas para a avaliação da expressão das proteínas pelo método imunoistoquímico. Dentre os casos selecionados não havia pacientes com FAP, nem que foram submetidos ao tratamento com radioterapia ou quimioterapia, antes da cirurgia, momento no qual as amostras foram selecionadas.

Para fins de comparação foram, posteriormente, selecionadas 64 amostras de mucosa colorretal não-neoplásica. Destas, 55 foram provenientes daqueles pacientes que compuseram o grupo com adenocarcinoma colorretal e cujas amostras retiradas na colectomia apresentaram margem cirúrgica proximal ou distal não-neoplásica (1.7 - 56 cm de distância do local do tumor). As outras 9 foram retiradas de pacientes que não apresentaram adenocarcinoma colorretal e foram submetidos a colectomia por outras causas (doença diverticular e endometriose, excluindo-se os casos com doença inflamatória intestinal).

3.2 Coleta dos dados clínicos e definição das variáveis clínico-patológicas

As amostras foram revisadas, em suas lâminas e prontuários, com o objetivo de confirmação do diagnóstico e de coleta de dados clínicos e patológicos relevantes a fim de representar o fenótipo de cada paciente.

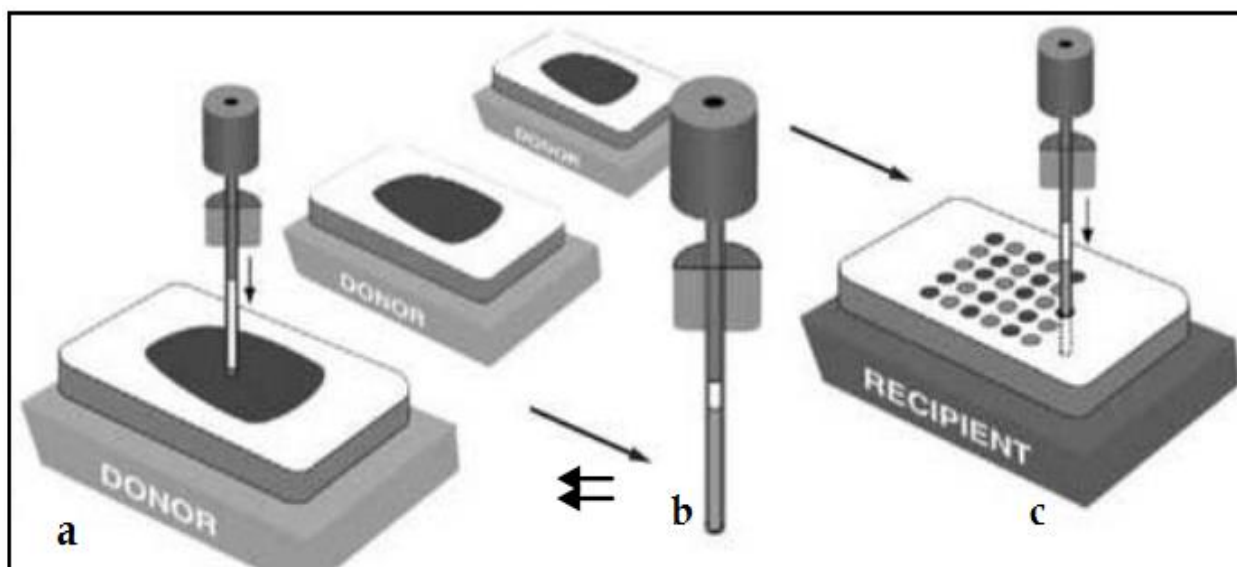
As seguintes variáveis foram analisadas: idade, sexo, comprometimento de LN, invasão angiolinfática e perineural, localização do tumor (cólon ou reto), lado do tumor (direito, abrangendo apenas os casos de cólon e esquerdo, incluindo os tumores de cólon

e reto), grau de diferenciação (pouco, moderadamente e bem diferenciado), tipo histológico (mucinoso ou não mucinoso), estadiamento, tamanho do tumor (T1, T2, T3 ou T4), cirurgia de caráter eletivo ou emergencial, área tumoral, data do diagnóstico, desfecho, data da última consulta, data do óbito e tempo de sobrevida.

3.3 Preparo dos TMAs e das lâminas

A partir dos blocos de parafina contendo tecidos neoplásicos e não-neoplásicos (Figura 2a), foram realizados cortes histológicos sequenciais de 4 μ m com a utilização de uma placa fria (Leica EG1130, *Germany*), um micrótomo (Reichert-Jung 2030, Bicut, *Germany*) e uma lâmina cortante (Marienfeld), para a confecção de lâminas com coloração hematoxilina-eosina (HE) (hematoxilina de Harris Biotec® e eosina amarelada pronta para uso Biotec®). Essas lâminas foram analisadas ao microscópio óptico para seleção e delimitação das áreas a serem retiradas e preparadas em TMA (Figura 2c).

Figura 2 – Montagem do TMA.



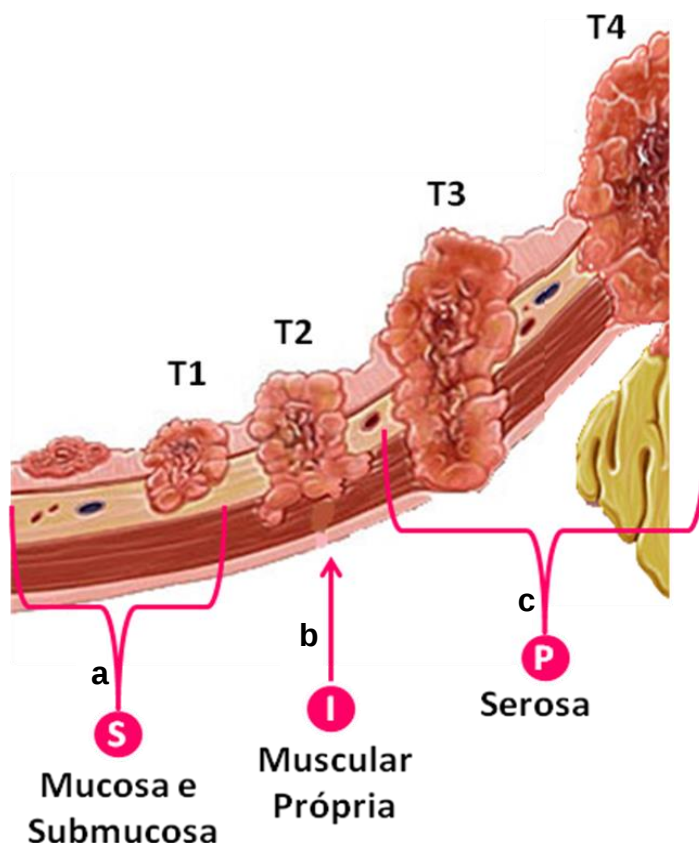
Legenda: a. Blocos doadores, dos quais são retirados fragmentos da amostra. b. Broca cilíndrica, utilizada para retirar os fragmentos e montar outro bloco. c. Bloco receptor, recebe as amostras, tem suas linhas e colunas previamente identificadas por um mapa em plano cartesiano.

Fonte: readaptado de Araújo, 2011.

Das lâminas referentes aos casos com adenocarcinoma colorretal foram escolhidas uma a três áreas representativas de acordo com a espessura da lesão, sendo essas referentes às regiões superficial (S), intermediária (I) ou profunda (P) do tumor. A região S na maioria dos tumores se encontra na camada epitelial mucosa ou na submucosa, tumores localizados nessa região são classificados de acordo com o sistema de

estadiamento TNM como T1 (Figura 3a). A região tumoral I em sua maioria se encontra na camada muscular própria, tumores com infiltração até este local são classificados como T2 (Figura 3b). A região P em sua maioria se localiza na camada serosa, tumores com infiltração até este local são classificados como T3. Nestes tumores pode ser observada perfuração ou terebração para órgãos vizinhos, sendo então classificados como T4 (Figura 3c).

Figura 3 – Regiões e camadas de localização do tumor.



Legenda: a. Tumor atingindo as camadas mucosa e submucosa (classificado como T1), onde geralmente se encontra a região tumoral superficial (S). b. Tumor atingindo a camada muscular própria (classificado como T2), onde geralmente se encontra a região tumoral intermediária (I). c. Tumor atingindo a camada serosa (classificado como T3) onde geralmente se encontra a região tumoral profunda (P), ao atingir esse grau de invasão o tumor já pode ter invadido outros órgãos (classificado como T4).

Fonte: readaptado de Derival, 2016.

Das lâminas referentes às áreas não-neoplásicas, pela ausência de tumor, foi selecionada apenas uma amostra correspondente a região da mucosa.

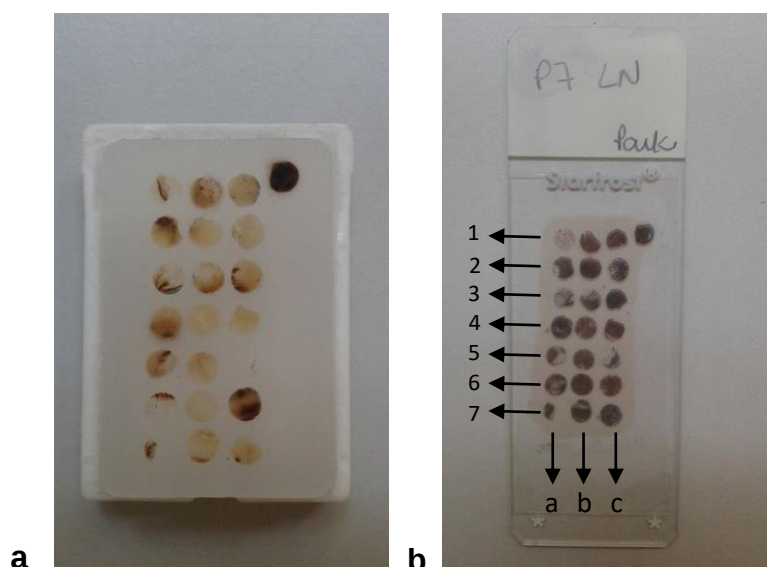
A seguir, foi organizado um mapa em plano cartesiano com a localização que cada amostra selecionada teria no TMA. Por meio de uma broca Trefina Neodent® cilíndrica, de 3 mm de diâmetro (Figura 2b), acoplada a uma caneta-pino-chave e a um motor de suspensão de 130 watts, da marca Bethil®, foram retiradas as amostras das áreas

selecionadas. A broca foi posicionada sobre a delimitação feita anteriormente com auxílio da lâmina e o motor foi acionado até que a amostra fosse puncionada (Figura 2a). Então, estas amostras foram retiradas da broca com o auxílio de uma guia e posicionadas em uma forma metálica conforme o mapa de localização. As formas foram preenchidas com parafina líquida, a 60°C, e colocadas sobre uma placa de gelo, a 10°C negativos, durante 30 minutos, para solidificação da parafina e conclusão da confecção do TMA (Figura 2c).

A partir do TMA finalizado (Figura 4a), foram realizados cortes histológicos sequenciais de 4µm de espessura com a utilização de uma placa fria (Leica EG1130, Germany) e um micrótomo (Reichert-Jung 2030, Bicut, Germany). Dois tipos de lâminas cortantes foram utilizadas conforme o destino dos cortes histológicos, Marienfeld e Superfrost®Plus, para o preparo de lâminas a serem coradas com HE ou para a utilização em imunoistoquímica, respectivamente.

A coloração HE foi realizada nas lâminas do primeiro corte de cada TMA para o controle morfológico da amostra (Figura 4b).

Figura 4 – Bloco e lâmina de TMA.



Legenda: a. Bloco de TMA finalizado. b. Lâmina do TMA corada pelo método de imunoistoquímica com identificação dos casos (linhas numeradas) e das três amostras que compõe um caso, referentes as regiões superficial (S), intermediária (I) e profunda (P) do tumor (colunas A, B e C).

Fonte: a autora

3.4 Realização dos testes imunoistoquímicos

As lâminas preparadas para imunoistoquímica foram submetidas à desparafinização com xilol PA (para análise), estas foram mergulhadas por 5 minutos em uma cuba contendo xilol PA aquecido, esse procedimento foi repetido por 3 vezes. Após,

as lâminas foram submetidas à desidratação com 3 banhos sucessivos de álcool PA, de 1 minuto cada e a reidratação com água por 5 minutos. Em seguida foram mergulhadas em hematoxilina por 8 minutos e lavadas novamente com água por 5 minutos. Então, foram mergulhadas por 3 minutos em eosina e novamente lavadas com água. Foram submetidas sucessivamente a álcool 95% por 1 minuto, álcool absoluto por 3 vezes de 1 minuto e por último a xilol novamente por 3 vezes de 1 minuto. Uma solução contendo álcool metílico e H₂O₂ PA foi utilizada para o bloqueio da peroxidase endógena. A seguir, as lâminas foram incubadas com os anticorpos para as proteínas estudadas, na diluição adaptada para melhores resultados neste material (Tabela 2), em câmara úmida, submetida a temperaturas entre 2 e 8°C, durante a noite.

Tabela 2 – Características dos anticorpos empregados nos testes imunoistoquímicos.

Proteína	Anticorpo	Especificações	Marca	Diluição	Tecido analisado
Parquina	<i>anti-Parkin antibody*</i>	monoclonal de camundongo	RabMAb	1:100	Tumoral + não neoplásica
P53	anti-proteína p53 anti-humana	monoclonal de camundongo	Dako	1:200	Tumoral
MLH1	<i>anti-Mlh1 antibody</i>	monoclonal de coelho	RabMAb	Pré-diluído	Tumoral
MSH2	<i>anti-Msh2 antibody</i>	monoclonal de coelho	RabMAb	Pré-diluído	Tumoral
MSH6	<i>anti-Msh6 antibody</i>	monoclonal de camundongo	Dako	Pré-diluído	Tumoral
PMS2	<i>anti-PMS2</i>	monoclonal de camundongo	Dako	Pré-diluído	Tumoral
KI67	<i>anti-Ki67 antibody</i>	monoclonal de camundongo	Dako	1:150	Tumoral
APC	<i>anti-APC antibody</i>	monoclonal de camundongo	RabMAb	1:200	Tumoral + não neoplásica
ciclina D	<i>anti-cyclin D1 antibody</i>	monoclonal de coelho	RabMAb	1:100	Tumoral
ciclina E	<i>anti-cyclin E1 antibody</i>	monoclonal de coelho	RabMAb	1:200	Tumoral

Legenda: P53: *tumor protein p53*; MLH1: *mutL homolog 1*; MSH2: *mutS homolog 2*; MSH6: *mutS homolog 6*; PMS2: *PMS1 homolog 2*; KI67: *marker of proliferation Ki-67*; APC: *adenomatous polyposis coli*; *o *anti-Parkin antibody* não detecta as isoformas 3 e 5 da parquina.

As condições, incluindo as diluições, para a incubação com os anticorpos primários em câmara úmida, foram estabelecidas pelos protocolos do Laboratório de Patologia Experimental Multiusuário da PUCPR. Da mesma forma, foram determinadas as condições para a incubação com polímero de revelação (*Spring*) pronto para uso, adicionado após a incubação com os anticorpos, sendo composto por duas soluções, a

primeira (*complement* - pronto para uso) com o tempo de 10 minutos e a segunda (*conjugate* - pronto para uso) com o tempo de 15 minutos.

Para a revelação, foi adicionado o complexo DAB + substrato (tampão para diluição do DAB) sobre as lâminas e a contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris, seguida de desidratação com banhos de álcool etílico 100% e clarificação com xilol PA. Para a montagem das lâminas permanentes foi utilizada a resina histológica própria para microscopia (Entellan, Merck®).

As reações com controles externos positivos e negativos para cada anticorpo foram concomitantes, estes últimos obtidos através da omissão do anticorpo primário.

3.5 Análise morfométrica – parquina e APC

A análise da expressão das proteínas parquina e APC foi realizada por morfometria, esta técnica permite a descrição quantitativa da área de expressão das proteínas. Assim as lâminas submetidas à imunoistoquímica com os anticorpos anti-parquina e anti-APC, foram inicialmente analisadas através do *software* de imagem Dino Capture 2.0® em computador Acer® acoplado a uma câmera Dino Eye® inserida no microscópio Olympus BX40® no qual foram capturadas imagens das lâminas em objetiva de 40x. Cada amostra representativa de uma região do tumor (S, I e P) foi imaginariamente dividida em quatro quadrantes e uma fotografia de cada quadrante foi registrada, totalizando em média 12 imagens de cada caso. Para as amostras provenientes da mucosa não-neoplásica, foi feita a mesma divisão imaginária em quatro quadrantes e foram registradas 4 imagens de cada quadrante, totalizando em média 12 imagens por caso, afim de que fosse obtida a mesma quantidade de imagens para um padrão de comparação.

A seguir, essas imagens (Figura 5a) foram otimizadas com o auxílio do *software* Adobe Photoshop CS6 v 13.0®, por meio do corte das áreas de estroma não neoplásico e em branco contidas nas imagens (Figura 5b), para a obtenção de uma análise específica para as regiões de interesse.

Figura 5 – Análise morfométrica.



Legenda: a. Imagem microscópica de uma amostra da lâmina corada com o anticorpo imunoistoquímico. b. Imagem otimizada com o auxílio do *software* Adobe Photoshop CS6 v 13.0®. c. Imagem submetida à máscara morfométrica.

Fonte: a autora.

Essas imagens foram, então, analisadas por meio do *software* Image Proplus® pela ferramenta morfometria de cores. Foram analisadas três cores: castanho, característica da reação positiva para parquina e para APC; azul, característica da imunonegatividade; e branca, característica das áreas que foram retiradas conforme citado anteriormente (estromais e brancas) as quais após a sua retirada se tornaram todas brancas. Uma amostra de cada cor a ser analisada foi fornecida ao programa, que gerou uma máscara a qual marcava com a cor vermelha as áreas castanhas, com a amarela, as áreas azuis e com a verde, as áreas brancas. A máscara foi aplicada para cada imagem (Figura 5c) e o programa fornecia automaticamente os micrômetros quadrados, bem como a percentagem das áreas coradas para cada cor.

Para cada quadrante das áreas tumorais (S, I e P) ou áreas de mucosa não-neoplásica foi obtido o percentual de área positiva como sendo o total de área positiva (vermelha) em micrômetros quadrados dividido pela soma deste com o total de área negativa (amarela) em micrômetros quadrados (equação 1).

$$\text{percentual de área positiva por quadrante} = \frac{\text{total de área positiva } (\mu\text{m}^2)}{\text{total de área positiva } (\mu\text{m}^2) + \text{total de área negativa } (\mu\text{m}^2)} \quad (1)$$

Em seguida, foi calculada a média dos percentuais de área positiva dos quatro quadrantes, e com isso se obteve o percentual médio de cada amostra. Os percentuais de área positiva foram calculados para as amostras que tinham dados de pelo menos um quadrante. Além das regiões S, I e P os pacientes foram ainda divididos em outros 2 grupos, o primeiro composto pelas médias de expressão das proteínas entre as amostras

correspondentes as regiões S e I. E o segundo pelas médias de expressão das proteínas entre as amostras correspondentes as regiões S, I e P considerando apenas os casos compostos por amostras das 3 regiões, sendo aqui desconsiderados casos incompletos. Por ultimo foram levadas em consideração as médias de expressão da parquina nas 3 regiões abrangendo todos os casos, independente da região amostral. Desta forma os seguintes grupos foram analisados:

- a. Média de expressão da parquina na região S (Média S);
- b. Média de expressão da parquina na região I (Média I);
- c. Média de expressão da parquina na região P (Média P);
- d. Média de expressão da parquina entre as regiões S e I (Média S e I);
- e. Média de expressão da parquina entre as regiões S, I e P nos casos completos (Média S, I e P nos casos completos);
- f. Média de expressão da parquina entre as regiões S, I e P em todos os casos (Média S, I e P em todos os casos).

3.6 Análise morfológica com estimativa quantitativa – parquina

A análise morfológica subjetiva com estimativa quantitativa da parquina foi realizada utilizando o microscópio Olympus CH30® observando imagens das lâminas em objetivas de 4x, 10x e 40x. Cada amostra representativa de uma região de localização do tumor (S, I e P) e da mucosa não-neoplásica foi inspecionada visualmente, e foram estimados os percentuais de extensão combinados com a imunolocalização (nuclear, metade basal e metade apical do citoplasma ou citoplasma como um todo) da coloração positiva (castanho) para parquina.

3.7 Contagem celular – ciclina D1, ciclina E1 e Ki67

A avaliação da expressão das proteínas ciclina D1, ciclina E1 e Ki67 foi realizada através da contagem dos núcleos positivos (castanhos) e negativos (azuis) para a reação com os anticorpos anti-ciclina D1, anti-ciclina E1 e anti-Ki67. Foi utilizado o microscópio Olympus BX40® para a realização da contagem. Dentre as três amostras representativas das regiões de localização do tumor (S, I e P) foi selecionada uma amostra com a maior positividade entre as três (*hot spot*). Nesta amostra através da objetiva de 40x foi então selecionado o campo de visualização com maior positividade (*hot spot*) e este foi, imaginariamente, dividido em quatro quadrantes, dos quais um foi escolhido para que fosse realizada a contagem, este quadrante deveria ter o mínimo de 100 células. Os

valores foram submetidos ao cálculo da percentagem, no qual foi obtida a estimativa de núcleos positivos e negativos por amostra.

3.8 Análise da expressão de P53, MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2

A expressão das proteínas P53, MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 nas lâminas de imunoistoquímica foi classificada como positiva (coloração castanha) ou negativa (coloração azul). Foi utilizado o microscópio Olympus BX40® para se observar as lâminas em objetivas de 4x, 10x e 40x. Cada amostra que compunha um caso foi analisada e a presença de ao menos uma área positiva classificou o caso como positivo e a ausência de área positiva o classificou como negativo para o anticorpo em questão. Com relação às proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 quando se encontravam alteradas foi observada coloração azul, ou seja, imunonegatividade. Já na análise para a proteína P53, o raciocínio é o inverso, quando há presença de uma proteína mutante, esta não é degradada e então é detectada, expressando imunopositividade para o anticorpo.

3.9 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20®. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

As variáveis quantitativas foram descritas por médias, medianas, valores mínimos e valores máximos, e as qualitativas foram descritas por frequências e percentuais.

Para a comparação entre as variáveis clínico-patológicas e evolução clínica em relação às variáveis quantitativas, foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes para a comparação de dois grupos. E o modelo de análise da variância (ANOVA) com um fator para comparação de mais de dois grupos.

O grau de associação entre duas variáveis foi avaliado através do coeficiente de correlação de Pearson.

Para a determinação de pontos de corte que descriminassem a melhor relação entre a especificidade e sensibilidade para a expressão da parquina associada à variável grau de diferenciação II foram ajustadas curvas ROC (*receiver operating characteristic*).

O tempo de sobrevida foi descrito por curvas de Kaplan-Meier e para a comparação entre grupos com relação ao tempo de sobrevida foi usado o teste de Log-rank. Para a análise multivariada foram ajustados modelos de regressão de Cox, seguidos do teste de Wald para avaliação das variáveis incluídas nos modelos.

4. RESULTADOS

4.1 Análise descritiva da amostra

A estatística descritiva dos dados clínico-patológicos mais relevantes para este estudo, retirados dos prontuários dos pacientes, é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Caracterização clínico-patológica da amostra estudada.

Variáveis		n*	%
Idade (Bethesda)	≤ 45 anos	13	17,8
	> 45 anos	60	82,2
Sexo	M	34	46,6
	F	39	53,4
LN	P	28	38,9
	N	44	61,1
Invasão	Ausente	28	38,9
	Presente (angiolímfática e perineural)	44	61,1
Localização	Cólon	37	50,5
	Reto	36	49,5
Lado	Direito	18	24,7
	Esquerdo	55	75,3
Diferenciação I	Bem/Moderadamente diferenciado	64	88,9
	Pouco diferenciado	8	11,1
Diferenciação II	Pouco/ Moderadamente diferenciado	62	86,1
	Bem diferenciado	10	13,9
Tipo histológico	Mucinoso	11	15,3
	Não mucinoso	61	84,7
Estadiamento	I	13	18,1
	II	24	33,3
	III+IV	35	48,6
Tamanho do tumor	T1	2	2,7
	T2	14	19,2
	T3	42	57,5
	T4	15	20,5
Cirurgia	Eletiva	59	81,9
	Emergência	13	18,1

Legenda: n = número de casos; M = masculino; F = feminino; LN = linfonodos; P = positivo; N = negativo; *em algumas variáveis temos 72 casos ao invés de 73, pois prontuário de um dos pacientes não possuía dados completos.

Os pacientes apresentavam idade mediana de 61 anos, com mínima de 18 e máxima de 90 anos, esta variável foi analisada de acordo com a classificação Bethesda, que considera dois grupos: até 45 e acima de 45 anos.

Com relação à variável grau de diferenciação, os pacientes foram agrupados de duas formas. A primeira, diferenciação I, levou em consideração o agrupamento proposto pela literatura que, de acordo com as características clínicas do tumor, o classifica em bem/moderadamente e pouco diferenciado (COMPTON, 1999; COMPTON *et al.*, 2000). A segunda, diferenciação II, agrupa os tumores em pouco/moderadamente e bem diferenciados, levando em consideração suas características histológicas (BONHIN *et al.*, 2014).

Na Tabela 4, estão apresentados os resultados das análises histopatológicas para as proteínas P53, MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2.

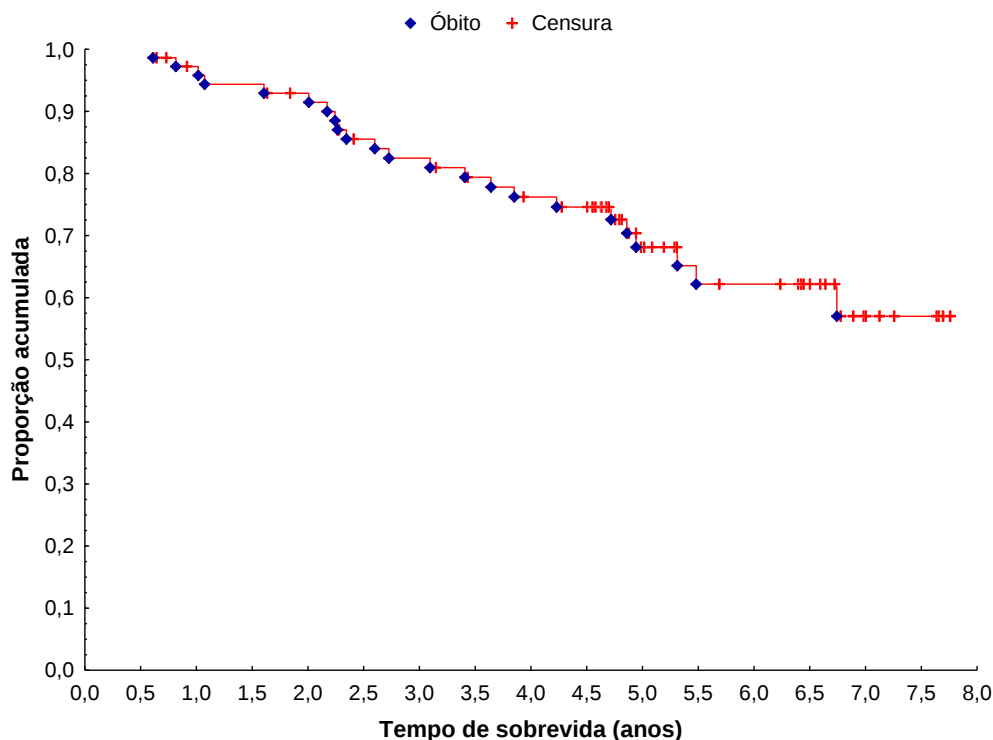
Tabela 4 – Caracterização histopatológica da amostra estudada – expressão das proteínas MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 e P53.

Variáveis		n*	%
MLH1	P	68	93,1
	N	5	6,9
MSH2	P	72	98,6
	N	1	3,4
MSH6	P	68	94,5
	N	4	5,5
PMS2	P	65	90,4
	N	7	9,6
P53	P	70	95,8
	N	3	4,2
MLH1/PMS2	P	64	92,2
	N	5	7,8
MSH2/MSH6	P	69	98,55
	N	1	1,45

Legenda: n = número de casos; P = positivo; N = negativo; *em algumas variáveis temos menos casos, pois alguns pacientes não tinham amostras suficientes.

Na Figura 6, é apresentada a curva de Kaplan-Meier para o tempo de sobrevida dos pacientes. Foram considerados censurados os casos que não morreram, para estes o tempo de seguimento correspondeu ao período entre o diagnóstico e a última consulta registrada.

Figura 6 – Curva de sobrevida dos pacientes estudados.



Legenda: Curva de sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma colorretal. Em azul estão representados os casos de pacientes que foram a óbito e em vermelho os casos censurados, que são aqueles que permaneceram vivos, para estes o tempo de seguimento correspondeu ao período entre o diagnóstico e a última consulta registrada. Na linha vertical do gráfico estão representados os casos acumulados e na linha horizontal o tempo de sobrevida.

Na Tabela 5, são apresentados os percentuais de sobrevida estimados por Kaplan-Meier de acordo com os tempos de acompanhamento.

Tabela 5 – Sobrevida dos pacientes considerando o período entre o diagnóstico e a última consulta registrada.

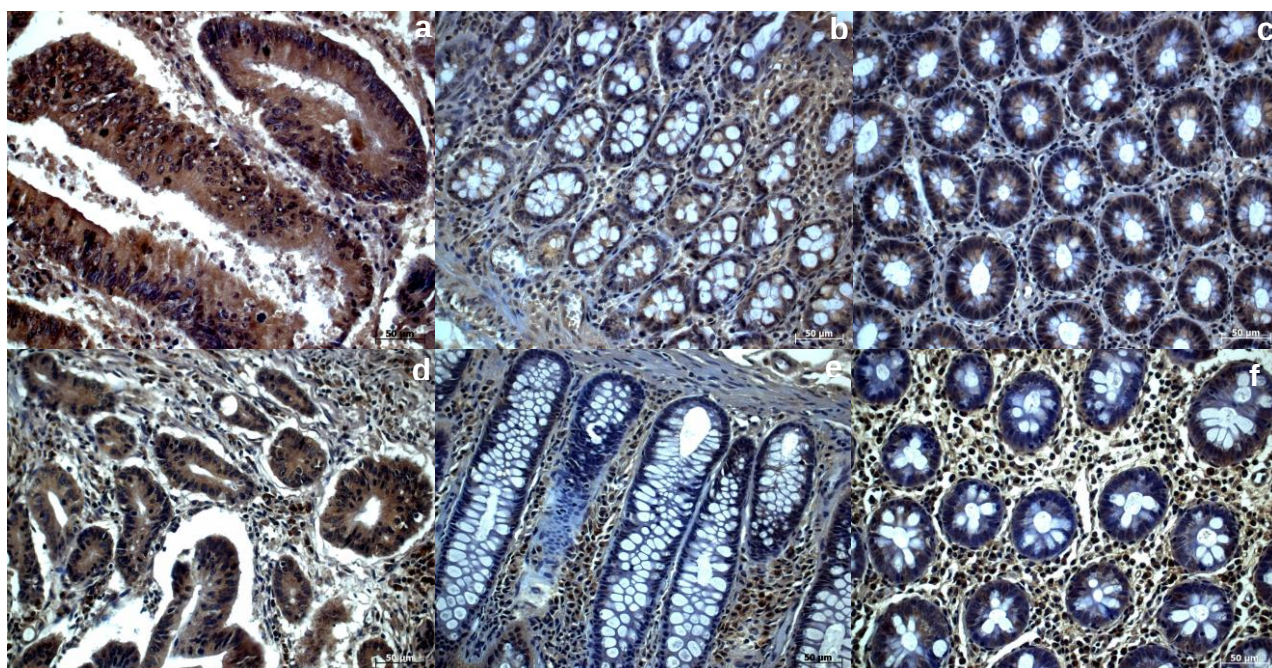
Tempo (anos)	Percentual de sobrevida
0,5	100,0%
1	97,2%
2	92,9%
3	82,5%
4	76,2%
5	68,1%
6	62,2%
7	57,0%
8	57,0%

Dos 73 casos incluídos no estudo: 20 (27,4%) morreram antes de 5 anos (tempo mínimo de 0,61 e máximo de 4,94 anos); 3 (4,1%) morreram após 5 anos (tempo mínimo de 5,31 e máximo de 6,74 anos); 39 (53,4%) pacientes não morreram e foram acompanhados por pelo menos 5 anos (tempo mínimo de 4,50 e máximo de 7,76 anos); e 11 (15,1%) não morreram e foram acompanhados por menos de 5 anos (tempo mínimo de 0,64 e máximo de 4,28 anos).

4.2 Expressão das proteínas parquina, APC, ciclina D1, ciclina E1 e KI67

Na Figura 7, estão representadas imagens geradas pela observação das lâminas de imunohistoquímica que foram utilizadas na análise morfométrica da expressão da parquina e da APC. As regiões coradas com castanho representam expressão para as proteínas e as regiões coradas em azul representam imunonegatividade.

Figura 7 – Expressão da parquina e da APC.



Legenda: a. Expressão da parquina em amostra com adenocarcinoma colorretal. b. Expressão da parquina em amostra de mucosa não-neoplásica de pacientes com adenocarcinoma colorretal. c. Expressão da parquina em amostra de mucosa não-neoplásica de pacientes sem adenocarcinoma colorretal. d. Expressão da APC em amostra com adenocarcinoma colorretal. e. Expressão da APC em amostra de mucosa não-neoplásica de pacientes com adenocarcinoma colorretal. f. Expressão da APC em amostra de mucosa não-neoplásica de pacientes sem adenocarcinoma colorretal.

Fonte: a autora.

Os resultados da análise morfométrica para a expressão da parquina e da APC nas diferentes regiões tumorais estudadas estão, respectivamente, nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Expressão da Parquina nas diferentes regiões tumorais e na mucosa não-neoplásica.

Variáveis	n*	Média	Mediana	Mínimo	Máximo
$\overline{S}$	70	14,2	12,3	2,4	55,4
$\overline{I}$	58	20,0	17,9	4,1	66,5
$\overline{P}$	44	18,2	16	2,9	45,9
$\overline{S \text{ e } I}$	56	17,2	16	3,9	49,5
$\overline{S, I \text{ e } P}$ casos completos	40	17,9	16,5	3,5	36,7
$\overline{S, I \text{ e } P}$ B todos os casos	73	16,5	15,3	2,36	36,7
Mucosa não-neoplásica I	55	23,1	22,5	9,9	50,0
Mucosa não-neoplásica II	9	27,5	27,5	13,6	39,9

Legenda: n = número de casos; $\overline{S}$ = média de expressão da parquina na região superficial (S); $\overline{I}$ = média de expressão da parquina na região intermediária (I); $\overline{P}$ = média de expressão da parquina na região profunda (P); $\overline{S \text{ e } I}$ = média de expressão da parquina entre as regiões S e I; $\overline{S, I \text{ e } P}$ casos completos = média de expressão da parquina entre as regiões S, I e P nos casos completos; $\overline{S, I \text{ e } P}$ todos os casos = média de expressão da parquina entre as regiões S, I e P em todos os casos; *em algumas regiões temos menos casos em decorrência do tamanho do tumor; Mucosa não-neoplásica I = amostra da mucosa não-neoplásica retirada do paciente com adenocarcinoma colorretal; Mucosa não-neoplásica II = amostra da mucosa não-neoplásica retirada do paciente sem adenocarcinoma colorretal.

Tabela 7 – Expressão da APC nas diferentes regiões tumorais e na mucosa não-neoplásica.

Variáveis	n*	Média	Mediana	Mínimo	Máximo
$\overline{S}$	62	30,4	30,6	1,5	72,2
$\overline{I}$	57	34,3	31,1	0,3	63,9
$\overline{P}$	51	32,5	30,8	3,8	71,9
$\overline{S \text{ e } I}$	38	32,5	32,6	10,3	59,0
$\overline{S, I \text{ e } P}$ casos completos	72	33,6	31,6	0,9	59,0
$\overline{S, I \text{ e } P}$ todos os casos	55	32,5	21,6	6,4	50,0
Mucosa não-neoplásica I	52	27,5	11,0	1,3	24,4
Mucosa não-neoplásica II	9	18,9	17,5	3,5	37,9

Legenda: n = número de casos; $\overline{S}$ = média de expressão da APC na região superficial (S); $\overline{I}$ = média de expressão da APC na região intermediária (I); $\overline{P}$ = média de expressão da APC na região profunda (P); $\overline{S \text{ e } I}$ = média de expressão da APC entre as regiões S e I; $\overline{S, I \text{ e } P}$ casos completos = média de expressão da APC entre as regiões S, I e P nos casos completos; $\overline{S, I \text{ e } P}$ todos os casos = média de expressão da APC entre as regiões S, I e P em todos os casos; *em algumas regiões temos menos casos em decorrência do tamanho dos tumores; Mucosa não-neoplásica I = amostra da mucosa não-neoplásica retirada do paciente com adenocarcinoma colorretal; Mucosa não-neoplásica II = amostra da mucosa não-neoplásica retirada do paciente sem adenocarcinoma colorretal.

Os resultados da contagem celular para as proteínas ciclina D1, ciclina E1 e KI67 estão apresentados na Tabela 8, na qual é possível observar o percentual de núcleos positivos por amostra.

Tabela 8 – Expressão de ciclina D1, ciclina E1 e KI67 dada em percentagem de núcleos celulares positivos por amostra.

% Núcleos Positivos				% Núcleos Positivos			
Caso	Ciclina E	Ciclina D	KI67	Caso	Ciclina E	Ciclina D	KI67
1	39	63	62	38	53	32	19
2	38	29	37	39	70	47	72
3	46	36	40	40	80	74	53
4	80	44	64	41	75	31	46
5	81	37	37	42	62	35	41
6	76	25	44	43	81	56	36
7	53	7	28	44	69	64	63
8	52	28	35	45	71	58	53
9	51	47	44	46	67	63	57
10	72	13	34	47	69	35	22
11	73	55	49	48	75	39	59
12	65	46	19	49	65	55	36
13	75	68	47	50	59	67	32
14	81	37	26	51	48	40	62
15	57	46	34	52	66	48	36
16	81	76	72	53	64	70	44
17	65	52	40	54	74	45	39
18	68	57	49	55	70	41	34
19	84	42	49	56	70	32	24
20	84	65	51	57	78	54	49
21	79	65	23	58	64	43	25
22	67	73	43	59	24	50	51
23	52	51	50	60	65	60	47
24	69	13	28	61	62	56	53
25	84	67	24	62	84	63	12
26	66	56	43	63	57	26	17
27	68	58	43	64	66	52	14
28	55	5	028	65	75	34	23
29	58	41	48	66	48	41	30
30	75	25	56	67	48	34	46
31	77	63	43	68	46	47	45
32	77	59	38	69	72	57	36
33	86	74	37	70	80	40	34
34	75	37	28	71	40	19	38
35	70	50	26	72	78	60	23
36	62	35	26	73	48	44	18
37	50	26	10				

4.3 Análise das variáveis clínico-patológicas e da expressão das proteínas ciclina D1, ciclina E1, KI67 e APC em relação à expressão da parquina

Não houve correlação entre parquina e as variáveis: idade (Bethesda), invasão, localização, lado, grau de diferenciação I, tamanho do tumor e caráter da cirurgia.

Para comparar as variáveis sexo e expressão da parquina, foi testada a hipótese nula de que as médias de expressão são iguais entre pacientes dos sexos feminino e masculino, *versus* a hipótese alternativa de que as médias são diferentes. Houve correlação entre as variáveis sexo e média P ($p = 0,019$), média S, I e P nos casos completos ($p = 0,013$) e média S, I e P em todos os casos ($p = 0,049$). Foi possível observar uma maior expressão da parquina no sexo masculino (Tabela 9).

Para comparar as variáveis comprometimento de LN e expressão da parquina, foi testada a hipótese nula de que as médias de expressão são iguais para pacientes com comprometimento de LN (positivos - P) e pacientes sem comprometimento de LN (negativos - N), *versus* a hipótese alternativa de médias diferentes. Foi possível observar uma tendência à significância estatística com relação à média S, I e P nos casos completos ($p = 0,052$) e à média S, I e P em todos os casos ($p = 0,087$), sendo encontrada uma maior expressão nos tumores com comprometimento de LN (Tabela 9).

Também foi encontrada correlação entre grau de diferenciação II do tumor e expressão da parquina, sendo testada a hipótese nula de que as médias são iguais para pacientes com tumor bem diferenciado e pacientes com tumor pouco/moderadamente diferenciado, *versus* a hipótese alternativa de médias diferentes. Como é possível observar na Tabela 9, um valor de $p = 0,024$ foi encontrado para a média S e I. Ao analisar a média S, I e P em todos os casos, foi observada uma tendência à significância ($p = 0,055$). A parquina foi mais positiva nos os tumores pouco/moderadamente diferenciados (Tabela 9).

Considerando o tipo histológico e a expressão da parquina, foi testada a hipótese nula de que as médias de expressão são iguais para pacientes com tumor mucinoso e não mucinoso, *versus* a hipótese alternativa de médias diferentes. Foi encontrada correlação com os grupos: média S e I ($p = 0,046$), e média S, I e P em todos os casos ($p = 0,028$). Na média S, I e P nos casos completos foi observada uma tendência à significância com $p = 0,065$. O tipo mucinoso apresentou uma maior expressão da parquina (Tabela 9).

Ao analisar estadiamento e a expressão da parquina, foi testada a hipótese nula de que as médias de expressão são iguais para pacientes no estádios I, II, III ou IV, *versus* a

hipótese alternativa de médias diferentes. Foi encontrada correlação na média S, I e P nos casos completos ($p = 0,037$), e na média S, I e P em todos os casos ($p = 0,041$). Os tumores que se encontravam nos estádios mais avançados (III + IV) apresentaram maiores níveis de expressão da parquina (Tabela 9).

Tabela 9 – Associação entre expressão da parquina nas diferentes regiões tumorais estudadas e variáveis clínico-patológicas (continua).

% de área positiva para parquina	Sexo	n**	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de p
$\overline{P}$	M	20	23,0	24,4	3,2	45,9	0,019*
	F	24	14,3	10,5	2,9	44,6	
$\overline{S, I, P}$	M	26	19,2	16,2	5,8	49,5	0,215
	F	30	15,5	15,3	3,9	31,8	
$\overline{S, I, P}$ casos completos	M	17	22,2	22,2	7,5	36,7	0,013*
	F	23	14,7	13,8	3,5	36	
$\overline{S, I, P}$ todos os casos	M	34	18,6	16,6	4,91	36,7	0,049*
	F	39	14,6	14,4	2,36	36	
% de área positiva para parquina	LN	n**	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de p
$\overline{P}$	P	23	19,6	17,9	2,9	44,6	0,427
	N	21	16,7	11	3,5	45,9	
$\overline{S, I, P}$	P	24	19,7	18,1	3,9	49,5	0,201
	N	32	15,3	13,9	5,8	32,4	
$\overline{S, I, P}$ casos completos	P	21	20,8	21,5	3,5	36,7	0,052
	N	19	14,7	12,6	6,3	33,3	
$\overline{S, I, P}$ todos os casos	P	28	19,0	18,9	3,52	36,7	0,087
	N	44	15,2	13,5	2,36	33,3	
% de área positiva para parquina	Diferenciação II	n**	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de p
$\overline{P}$	Bem diferenciado	5	15,4	13,6	5,3	32,3	0,724
	Pouco/Moderadamente diferenciado	39	18,6	17,2	2,9	45,9	
$\overline{S, I, P}$	Bem diferenciado	6	9,6	8,0	5,8	18,4	0,024*
	Pouco/Moderadamente diferenciado	50	18,1	16,8	3,9	49,5	
$\overline{S, I, P}$ casos completos	Bem diferenciado	4	12,5	9,8	7,5	23,0	0,232
	Pouco/Moderadamente diferenciado	36	18,5	16,9	3,5	36,7	
$\overline{S, I, P}$ todos os casos	Bem diferenciado	10	11,9	9,8	5,8	23,0	0,055
	Pouco/Moderadamente diferenciado	62	17,4	16,5	2,4	36,7	

Legenda: n = número de casos; M = masculino; F = feminino; $\overline{P}$ = média de expressão da parquina na região profunda (P); $\overline{S, I, P}$ = média de expressão da parquina entre as regiões superficial (S) e intermediária (I); $\overline{S, I, P}$ casos completos = média de expressão da parquina entre as regiões S, I e P nos casos completos; $\overline{S, I, P}$ todos os casos = média de expressão da parquina entre as regiões S, I e P em todos os casos; P = positivo; N = negativo; *valores de p significativos; ** em algumas regiões não temos o número total de casos em decorrência do tamanho dos tumores.

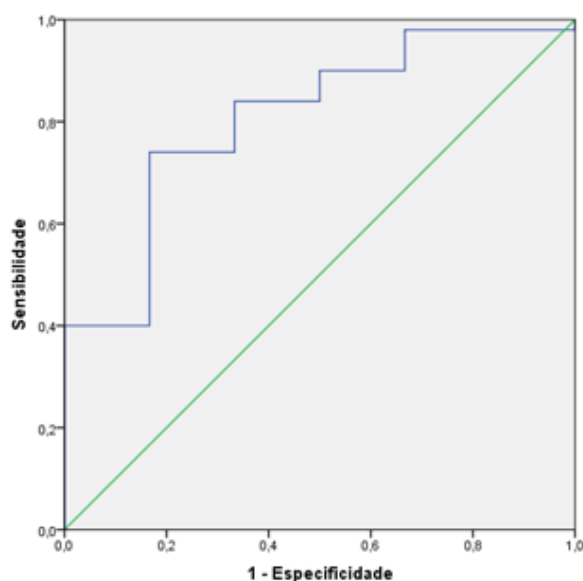
Tabela 9 – Associação entre expressão da parquina nas diferentes regiões tumorais estudadas e variáveis clínico-patológicas (continuação).

% de área positiva para parquina	Tipo histológico	n**	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de p
$\overline{P}$	Mucinoso	7	24,3	24,4	3,2	45,9	0,267
	Não Mucinoso	37	17,1	14,6	2,9	40,6	
$\overline{S\ e\ I}$	Mucinoso	9	23,0	20,9	9,4	49,5	0,046*
	Não Mucinoso	47	16,1	13,9	3,9	47,4	
$\overline{S,\ I\ e\ P}$ casos completos	Mucinoso	7	23,8	21,5	11,1	36	0,065
	Não Mucinoso	33	16,6	15,3	3,5	36,7	
$\overline{S,\ I\ e\ P}$ todos os casos	Mucinoso	11	21,8	20,5	11,1	36	0,028*
	Não Mucinoso	61	15,7	13,8	2,36	36,7	
% de área positiva para parquina	Estadiamento	n**	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de p
$\overline{P}$	I	0	-	-	-	-	0,125
	II	14	14,0	9,7	3,9	35,3	
	III + IV	30	20,2	17,6	2,9	45,9	
$\overline{S\ e\ I}$	I	6	18,3	20,2	5,9	28,0	0,248
	II	18	14,1	13,1	7,0	32,4	
	III + IV	31	19,0	17,7	3,9	49,5	
$\overline{S,\ I\ e\ P}$ casos completos	I	0	-	-	-	-	0,037*
	II	13	13,5	11,9	6,3	33,3	
	III + IV	27	20,0	20,5	3,5	36,7	
$\overline{S,\ I\ e\ P}$ todos os casos	I	13	14,4	13,3	2,4	28,0	0,041*
	II	24	13,9	12,6	4,9	33,3	
	III + IV	35	19,2	19,1	3,5	36,7	

Legenda: n = número de casos; M = masculino; F = feminino; $\overline{P}$ = média de expressão da parquina na região profunda (P); $\overline{S\ e\ I}$ = média de expressão da parquina entre as regiões superficial (S) e intermediária (I); $\overline{S,\ I\ e\ P}$ casos completos = média de expressão da parquina entre as regiões S, I e P nos casos completos; $\overline{S,\ I\ e\ P}$ todos os casos = média de expressão da parquina entre as regiões S, I e P em todos os casos; P = positivo; N = negativo; *valores de p significativos; ** em algumas regiões não temos o número total de casos em decorrência do tamanho dos tumores.

A curva ROC foi ajustada levando em consideração a variável grau de diferenciação II, analisando a média S, média I e média P, bem como a média S e I, a média S, I e P nos casos completos e a média S, I e P em todos os casos. Foi encontrada correlação ao analisar a média S e I (Figura 8), com um valor de $p = 0,015$. A área abaixo da curva representada foi igual a 0,807, sendo esta uma medida que reflete a acurácia de um teste podendo ser expressa em um valor entre 0 e 1 onde quanto mais próximo de 1 melhor é o seu valor preditivo. Estes resultados indicam que para este grupo a parquina tende a discriminar bem entre tumor bem diferenciado e tumor pouco/moderadamente diferenciado.

Figura 8 – Curva Roc para média de expressão da parquina nas regiões superficial e intermediária do tumor.



O melhor ponto de corte foi de 11%, no qual se observou uma sensibilidade de 72% e uma especificidade de 83,33% (Tabela 10; Figura 9). Neste caso, a sensibilidade foi definida como sendo a probabilidade da expressão da parquina ser > 11 dado que o tumor é pouco/moderadamente diferenciado. Já a especificidade é a probabilidade do percentual de expressão da parquina ser ≤ 11 dado que o tumor é bem diferenciado.

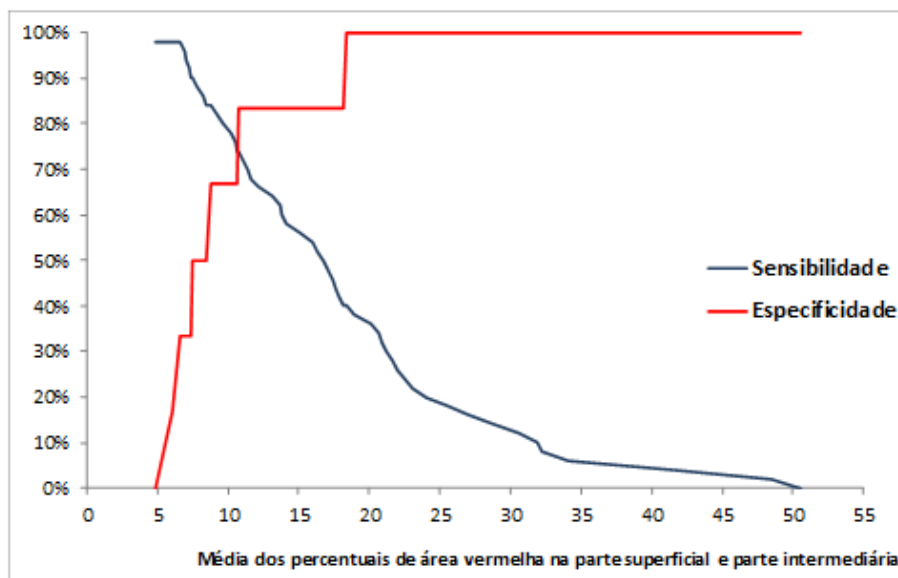
Ao se analisar a média S ($p = 0,088$), média I ($p = 0,066$) e média S, I e P em todos os casos ($p = 0,059$), foram observados resultados com tendência a significância estatística.

Tabela 10 – Especificidade e sensibilidade para o ponto de corte 11% com relação à média de expressão da parquina nas regiões superficial e intermediária do tumor na variável grau de diferenciação II.

S e I	Diferenciação II	
	Pouco/moderadamente	Bem
≤ 11	14	5
	28,00%	83,33% (especificidade)
> 11	36	1
	72,00% (sensibilidade)	16,67%
Total	50	6

Legenda: S e I = média de expressão da parquina entre as regiões superficial e intermediária.

Figura 9 – Gráfico de sensibilidade e especificidade para média de expressão da parquina nas regiões superficial e intermediária do tumor.



Foi estimado o coeficiente de correlação de Pearson entre o percentual de células positivas para ciclina D1, ciclina E1 e KI67 e a expressão da parquina. Para cada duas variáveis analisadas, foi testada a hipótese nula de que não existe correlação entre as variáveis (coeficiente de correlação igual a zero), *versus* a hipótese alternativa de que existe correlação (coeficiente de correlação diferente de zero). Nenhum resultado significativo foi encontrado, sugerindo que não existe correlação entre essas variáveis.

Foi estimado o coeficiente de correlação de Pearson entre expressão da APC e expressão da parquina. Foi testada a hipótese nula de que não existe correlação entre as duas variáveis (coeficiente de correlação igual a zero), *versus* a hipótese alternativa de que existe correlação (coeficiente de correlação diferente de zero). Foi observada associação para os grupos descritos na Tabela 11, sendo observada uma correlação positiva entre as duas variáveis demonstrando que o aumento de uma está correlacionado ao aumento da outra.

Tabela 11 – Associação entre expressão da parquína e expressão da APC nas diferentes regiões tumorais estudadas e em amostras não-neoplásicas.

Variáveis	n	Coeficiente de correlação de Pearson	Valor de p
$\overline{\text{parquína}}_{\text{mucosa não-neoplásica}} \times \overline{\text{Apc}}_{\text{mucosa não-neoplásica}}$	50	0,30	0,032*
$\overline{\text{parquína S}} \times \overline{\text{Apc S}}$	61	0,28	0,027*
$\overline{\text{parquína I}} \times \overline{\text{Apc I}}$	51	0,28	0,045*
$\overline{\text{parquína P}} \times \overline{\text{Apc P}}$	41	0,40	0,010*
$\overline{\text{parquína S e I}} \times \overline{\text{Apc S e I}}$	70	0,34	0,004*
$\overline{\text{S, I e P}}_{\text{casos completos}} \times \overline{\text{S, I e P}}_{\text{casos completos}}$	30	0,48	0,007*
$\overline{\text{S, I e P}}_{\text{todos os casos}} \times \overline{\text{S, I e P}}_{\text{todos os casos}}$	72	0,37	0,001

Legenda: N = número de casos; $\overline{\text{parquína}}_{\text{mucosa não-neoplásica}}$ = média de expressão da parquína na mucosa não-neoplásica; $\overline{\text{Apc}}_{\text{mucosa não-neoplásica}}$ = média de expressão da APC na mucosa não-neoplásica; $\overline{\text{parquína S}}$ = média de expressão da parquína na região superficial (S); $\overline{\text{Apc S}}$ = média de expressão da APC na região S; $\overline{\text{parquína I}}$ = média de expressão da parquína na região intermediária (I); $\overline{\text{Apc I}}$ = média de expressão da APC na região I; $\overline{\text{parquína P}}$ = média de expressão da parquína na região profunda (P); $\overline{\text{Apc P}}$ = média de expressão da APC na região P; $\overline{\text{parquína S e I}}$ = média de expressão da parquína entre as regiões S e I; $\overline{\text{Apc S e I}}$ = média de expressão da APC entre as regiões S e I; $\overline{\text{S, I e P}}_{\text{casos completos}}$ = média de expressão da parquína entre as regiões S, I e P nos casos completos; $\overline{\text{S, I e P}}_{\text{casos completos}}$ = média de expressão da APC entre as regiões S, I e P nos casos completos; $\overline{\text{S, I e P}}_{\text{todos os casos}}$ = média de expressão da parquína entre as regiões S, I e P em todos os casos; $\overline{\text{S, I e P}}_{\text{todos os casos}}$ = média de expressão da APC entre as regiões S, I e P em todos os casos; P = positivo; N = negativo; *valores de p significativos; **em algumas regiões não temos o número total de casos em decorrência do tamanho dos tumores.

4.4 Análise das variáveis clínico-patológicas em relação à localização celular da parquína

Cada uma das variáveis de localização celular da parquína (basal, apical, nuclear e citoplasmática) foi correlacionada com as variáveis qualitativas: idade (Bethesda), LN, invasão, lado, diferenciação I, diferenciação II, tipo histológico e tamanho do tumor. Foi testada a hipótese nula de que a média das variáveis é igual para todas as localizações, *versus* a hipótese alternativa de médias diferentes. Não foi possível estabelecer correlação para nenhuma das variáveis.

Para cada uma das variáveis quantitativas (expressão da parquína e expressão de ciclina D1, ciclina E1 e KI67) foi estimado o coeficiente de correlação de Pearson

comparando-as com as variáveis de localização celular da parquina (basal, apical, nuclear e citoplasmática). Para cada duas variáveis analisadas, foi testada a hipótese nula de que não existe associação entre as variáveis (coeficiente de correlação igual a zero), *versus* a hipótese alternativa de que existe correlação (coeficiente de correlação diferente de zero). Não foi encontrada correlação entre as variáveis de localização e a % de células positivas para ciclina D1, ciclina E1 e KI67. Houve correlação positiva entre as variáveis localizações basal, apical e citoplasmática e expressão da parquina (Tabela 12).

Tabela 12 – Associação entre localização e expressão da parquina nas diferentes regiões tumorais estudadas.

Variáveis	n**	Coeficiente de correlação de Pearson	Valor de <i>p</i>
Basal x $\overline{S}$	40	0,32	0,044*
Basal x $\overline{I}$	40	0,42	0,007*
Basal x $\overline{P}$	40	0,35	0,025*
Basal x $\overline{S \text{ e } I}$	40	0,42	0,007*
Basal x $\overline{S, I \text{ e } P}$ casos completos	40	0,48	0,002*
Basal x $\overline{S, I \text{ e } P}$ todos os casos	72	0,48	<0,001*
Apical x $\overline{S}$	40	0,29	0,071
Apical x $\overline{I}$	40	0,43	0,006*
Apical x $\overline{P}$	40	0,42	0,008*
Apical x $\overline{S \text{ e } I}$	40	0,41	0,008*
Apical x $\overline{S, I \text{ e } P}$ casos completos	40	0,50	0,001*
Apical x $\overline{S, I \text{ e } P}$ todos os casos	72	0,45	<0,001*
Citoplasmática x $\overline{S}$	40	0,32	0,044*
Citoplasmática x $\overline{I}$	40	0,42	0,007*
Citoplasmática x $\overline{P}$	40	0,35	0,025*
Citoplasmática x $\overline{S \text{ e } I}$	40	0,42	0,007*
Citoplasmática x $\overline{S, I \text{ e } P}$ casos completos	40	0,48	0,002*
Citoplasmática x $\overline{S, I \text{ e } P}$ todos os casos	72	0,48	<0,001*

Legenda: n = número de casos; $\overline{S}$ = média de expressão da parquina na região superficial (S); $\overline{I}$ = média de expressão da parquina na região intermediária (I); $\overline{P}$ = média de expressão da parquina na região profunda (P); $\overline{S \text{ e } I}$ = média de expressão da parquina entre as regiões superficial (S) e intermediária (I); $\overline{S, I \text{ e } P}$ casos completos = média de expressão da parquina entre as regiões S, I e P nos casos completos; $\overline{S, I \text{ e } P}$ todos os casos = média de expressão da parquina entre as regiões S, I e P em todos os casos; basal = expressão da parquina na região basal da célula; apical = expressão da parquina na região apical da célula; citoplasmática = expressão da parquina na região citoplasmática da célula; *valores de *p* significativos; **em algumas regiões temos menos casos em decorrência do tamanho dos tumores.

4.5 Análise das variáveis clínico-patológicas em relação à sobrevida

Para a análise entre a sobrevida e as variáveis clínico-patológicas, os pacientes foram divididos em dois grupos, utilizando como ponto de corte o tempo de 5 anos de sobrevida. O primeiro grupo compreende os pacientes que morreram antes de 5 anos decorridos do diagnóstico, e o segundo grupo compreende os pacientes que tiveram sobrevida de pelo menos 5 anos após o diagnóstico. Não foram incluídos nesta análise os 11 casos que não morreram e foram acompanhados por menos de 5 anos. Sendo assim, foram considerados 20 pacientes que morreram antes de 5 anos e 42 pacientes que sobreviveram pelo menos 5 anos. Para cada uma das variáveis quantitativas que atenderam ou não a condição de normalidade, testou-se a hipótese nula de que a média da variável é igual para pacientes que morrem antes de 5 anos e pacientes que sobrevivem pelo menos 5 anos, versus a hipótese alternativa de médias diferentes. Para cada uma das variáveis qualitativas, testou-se a hipótese nula de que a probabilidade de sobreviver pelo menos 5 anos é igual para todas as classificações da variável, versus a hipótese alternativa de probabilidades diferentes.

Não houve associação entre sobrevida e as variáveis: idade, idade (Bethesda), sexo, LN, diferenciação I, diferenciação II, tipo histológico, estadiamento, invasão angiolinfática ou perineural, tamanho do tumor, estadiamento, localização do tumor, localização celular das áreas positivas para parquima, percentual de expressão de ciclina D, ciclina E e KI67 e expressão de P53, MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2.

Todavia, houve associação ($p = 0,019$) entre sobrevida e expressão da parquima ao se analisar a média P, como pode ser observado na Tabela 13. Neste caso, os pacientes que apresentavam maior sobrevida eram aqueles com maior expressão da parquima.

Tabela 13 – Associação entre expressão da parquima e sobrevida com relação à região profunda do tumor.

% de área positiva para parquima	Sobrevida (anos)	n**	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de p
$\overline{P}$	<5	12	12,2	9,7	3,2	45,9	0,019*
	≥5	26	22,4	24,0	2,9	44,6	

Legenda: $\overline{P}$ = média de expressão da parquima na região profunda (P); n = número de casos; *valor de p significativo, **não tivemos o número total de casos em decorrência do tamanho dos tumores.

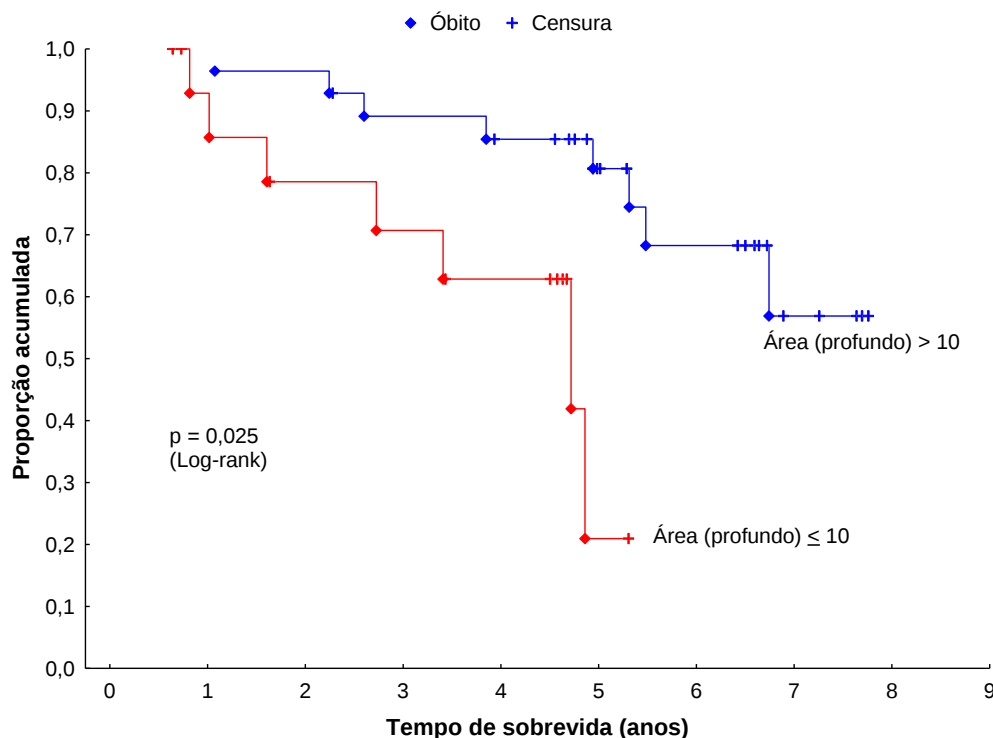
Também houve associação ($p = 0,037$) entre sobrevida e expressão da parquima ao se analisar a média P, considerando todos os casos independentemente do ponto de corte para sobrevida de 5 anos. Neste caso, os pacientes que apresentavam maior

sobrevida eram aqueles com maior expressão da parquina. O valor estimado de *hazard ratio* (HR) foi de 0,94 com intervalo de 95% de confiança dado por: 0,89 a 0,99. Isso indica que a cada unidade a mais de expressão da parquina na região P há uma diminuição de 6% de HR de óbito. Ou ainda, valores menores da expressão estão associados a maior risco de óbito, o que equivale a dizer que valores maiores de expressão estão associados a menor risco de óbito (proteção).

Posteriormente foi avaliada a associação entre as variáveis clínico-patológicas e a sobrevida utilizando todos os casos através do teste de Log-rang. Houve associação ($p = 0,025$) entre sobrevida e a média P, considerando o ponto de corte igual a 10. Os resultados indicam haver diferença significativa entre os tempos de sobrevida para pacientes com expressão da parquina ≤ 10 e com expressão > 10 . O valor estimado de HR foi de 4,98 com intervalo de 95% de confiança dado por: 1,48 a 16,68.

Na Figura 10, é apresentada a curva de sobrevida de acordo com a média P.

Figura 10 – Curva de sobrevida em relação à média de expressão da parquina na região profunda do tumor – ponto de corte 10.

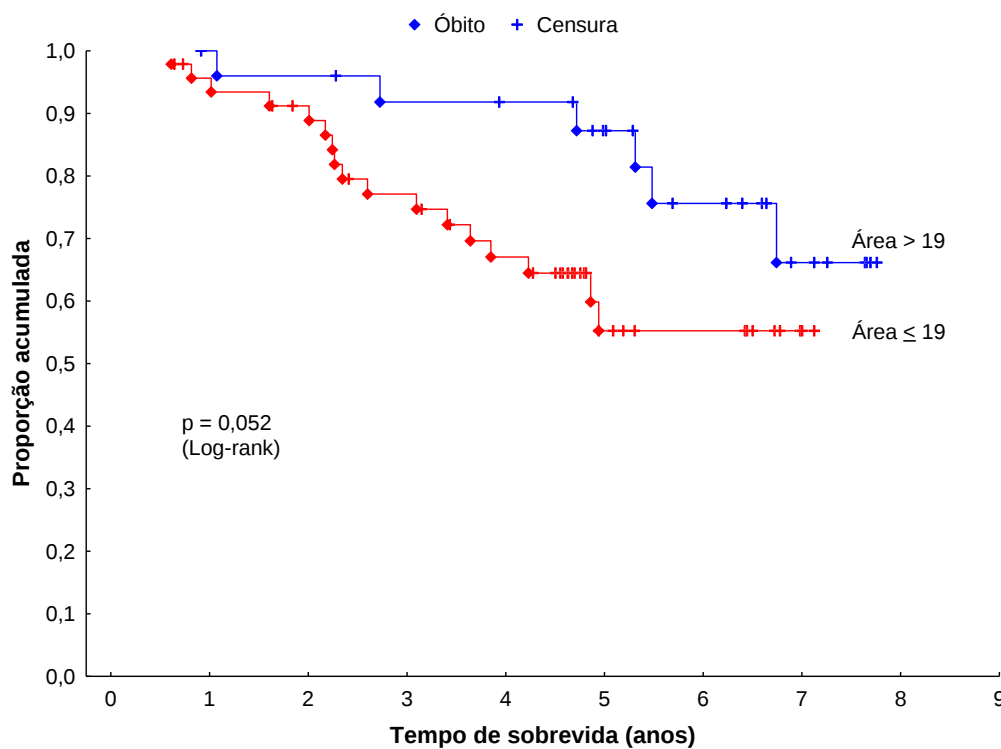


Legenda: A figura do losango representa os casos de pacientes que foram a óbito e a cruz representa os casos censurados, que são aqueles que permaneceram vivos, para estes o tempo de seguimento correspondeu ao período entre o diagnóstico e a última consulta registrada. A porção vermelha representa os resultados para aqueles pacientes com expressão da parquina abaixo do ponto de corte 10. A porção azul representa os resultados para aqueles pacientes com expressão da parquina acima do ponto de corte 10. Na linha vertical do gráfico estão representados os casos acumulados e na linha horizontal o tempo de sobrevida.

Houve uma tendência à significância ($p = 0,052$) ao se analisar a média S, I e P em todos os casos, considerando o ponto de corte igual a 19. Os resultados indicam haver uma tendência à diferença significativa entre os tempos de sobrevida para pacientes com área ≤ 19 e pacientes com área > 19 . O valor estimado de HR foi de 2,44 com intervalo de 95% de confiança dado por: 0,94 a 6,28.

Na Figura 11, é apresentada a curva de sobrevida de acordo com a expressão da parquina na média S, I e P em todos os casos.

Figura 11 – Curva de sobrevida em relação à média de expressão da parquina nas regiões superficial, intermediária e profunda do tumor em todos os casos – ponto de corte 19.

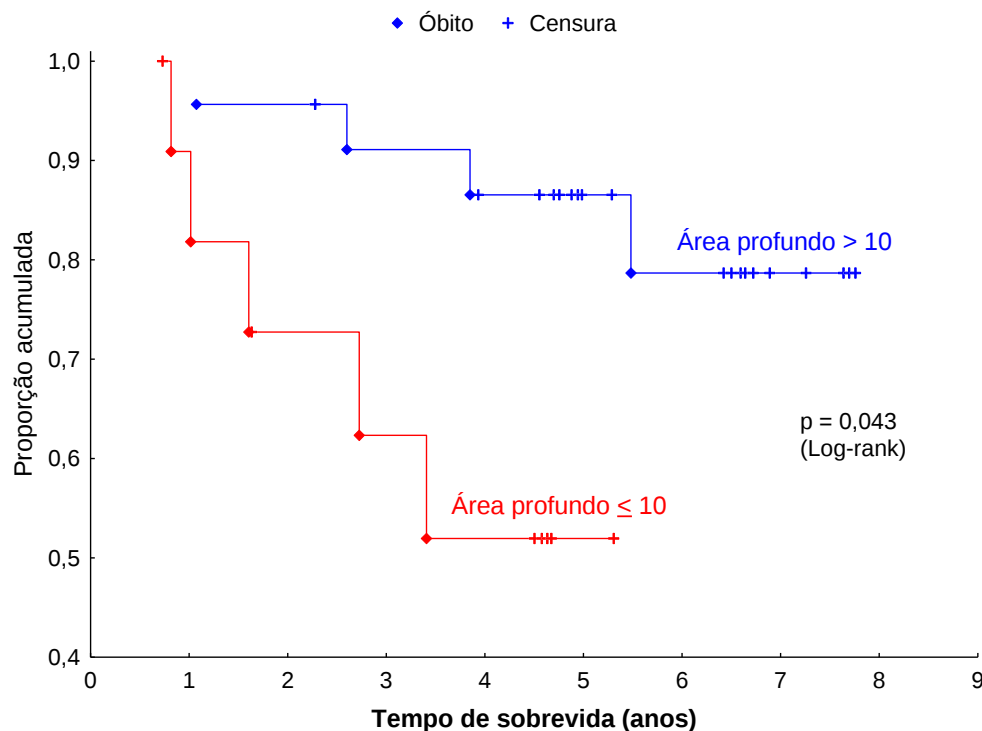


Legenda: A figura do losango representa os casos de pacientes que foram a óbito e a cruz representa os casos censurados, que são aqueles que permaneceram vivos, para estes o tempo de seguimento correspondeu ao período entre o diagnóstico e a última consulta registrada. A porção vermelha representa os resultados para aqueles pacientes com expressão da parquina abaixo do ponto de corte 19. A porção azul representa os resultados para aqueles pacientes com expressão da parquina acima do ponto de corte 19. Na linha vertical do gráfico estão representados os casos acumulados e na linha horizontal o tempo de sobrevida.

Houve associação ($p = 0,043$) entre sobrevida e idade para o grupo ≥ 45 anos considerando o ponto de corte de expressão da parquina na média P igual a 10. Os resultados indicam haver diferença significativa entre os tempos de sobrevida para pacientes ≥ 45 anos com expressão da parquina na região P ≤ 10 e com expressão > 10 ,

valores de média $P > 10$ estão associados a menor risco de óbito como pode ser observado na Figura 12.

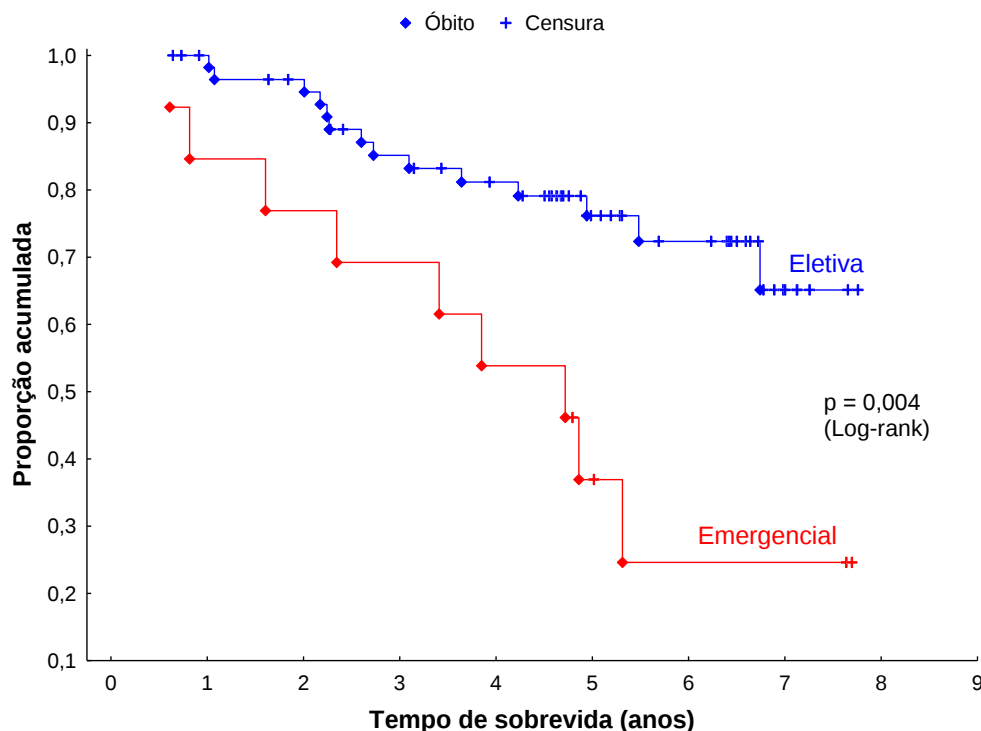
Figura 12 – Curva de sobrevida em relação à idade ≥ 45 anos considerando a média de expressão da parquina na região profunda do tumor – ponto de corte 10.



Legenda: Curva de sobrevida para idade ≥ 45 anos considerando o ponto de corte de expressão da parquina na média P igual a 10. A figura do losango representa os casos de pacientes que foram a óbito e a cruz representa os casos censurados, que são aqueles que permaneceram vivos, para estes o tempo de seguimento correspondeu ao período entre o diagnóstico e a última consulta registrada. A porção vermelha representa os resultados para aqueles pacientes com expressão da parquina acima do ponto de corte 10. A porção azul representa os resultados para aqueles pacientes com expressão da parquina abaixo do ponto de corte 10. Na linha vertical do gráfico estão representados os casos acumulados e na linha horizontal o tempo de sobrevida.

Foi encontrada associação ($p = 0,004$) entre sobrevida e caráter da cirurgia. Os resultados indicam haver diferença significativa entre os tempos de sobrevida para pacientes submetidos à cirurgia eletiva e à cirurgia de emergência. A realização de cirurgia emergencial está associada a maior risco de óbito como pode ser observado na Figura 13.

Figura 13 – Curva de sobrevida em relação ao caráter da cirurgia.



Legenda: Curva de sobrevida para caráter da cirurgia (emergencial ou de emergência). A figura do losango representa os casos de pacientes que foram a óbito e a cruz representa os casos censurados, que são aqueles que permaneceram vivos, para estes o tempo de seguimento correspondeu ao período entre o diagnóstico e a última consulta registrada. A porção vermelha representa os resultados para aqueles pacientes submetidos à cirurgia emergencial. A porção azul representa os resultados para aqueles pacientes submetidos à cirurgia eletiva. Na linha vertical do gráfico estão representados os casos acumulados e na linha horizontal o tempo de sobrevida.

4.6 Comparação entre as amostras com adenocarcinoma colorretal e as com mucosa colorretal não-neoplásica

Cada uma das variáveis referentes à parquina (localização celular e expressão nas diferentes regiões do tumor) foi testada com relação às amostras de adenocarcinoma colorretal e de mucosa colorretal não-neoplásica retirada de pacientes sem adenocarcinoma colorretal. Para cada uma das variáveis, foi testada a hipótese nula de que a média é igual nos dois grupos, *versus* a hipótese alternativa de médias diferentes. Foi encontrada correlação para expressão da parquina ($p = 0,001$), com uma maior expressão nos indivíduos com mucosa não-neoplásica. Quando os dois grupos foram comparados segundo a localização da parquina foi possível observar que nos indivíduos com adenocarcinoma colorretal há uma maior expressão da parquina no citoplasma como um todo ($p = 0,004$), bem como em suas porções apical ($p < 0,001$) e basal ($p = 0,004$). Já nos indivíduos com mucosa não-neoplásica há uma maior expressão da parquina na porção nuclear ($p = 0,030$) (Tabela 14).

Tabela 14 – Associação entre amostras com adenocarcinoma colorretal e com mucosa colorretal não-neoplásica de pacientes sem adenocarcinoma colorretal.

Variáveis		n**	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de p
Basal	Mucosa não-neoplásica II	9	67,8	70,0	50,0	80,0	0,004*
	Adenocarcinoma	72	79,6	83,3	43,3	90,0	
Apical	Mucosa não-neoplásica II	7	9,3	10,0	5,0	10,0	<0,001*
	Adenocarcinoma	72	61,2	65,8	20,0	90,0	
Nuclear	Mucosa não-neoplásica II	9	41,1	40,0	10,0	70,0	0,030*
	Adenocarcinoma	72	28,2	25,0	10,0	70,0	
Citoplasmático	Mucosa não-neoplásica II	9	67,8	70,0	50,0	80,0	0,004*
	Adenocarcinoma	72	79,6	83,3	43,3	90,0	
$\overline{S}$	Mucosa não-neoplásica II	10	40,2	38,3	15,7	66,1	0,001*
	Adenocarcinoma	40	17,9	16,5	3,5	36,7	

Legenda: n = número de casos; $\overline{S}$ = média de expressão da parquina na região superficial (S); basal = expressão da parquina na região basal da célula; apical = expressão da parquina na região apical da célula; nuclear = expressão da parquina na região nuclear da célula; *valores de p significativos; **em algumas regiões temos menos casos em decorrência do tamanho dos tumores.

Foi realizada uma análise pareada onde se comparou cada uma das variáveis referentes à parquina (localização celular e expressão nas diferentes regiões do tumor) com as amostras de adenocarcinoma colorretal e de mucosa não-neoplásica retiradas dos mesmos indivíduos. Para cada uma das variáveis, foi testada a hipótese nula de que a média entre os dois grupos é igual, *versus* a hipótese alternativa de que as médias são diferentes. Resultados significativos foram encontrados, ao se comparar a média S nos dois grupos ($p < 0,001$), onde foi encontrada uma maior expressão da parquina nas amostras de mucosa não-neoplásica. Houve associação entre os dois grupos e localização da parquina na porção basal ($p = 0,004$) e apical do citoplasma ($p < 0,001$), bem como no citoplasma como um todo ($p = 0,004$). Em amostras dos tecidos de adenocarcinoma colorretal houve uma maior expressão da parquina nas porções apical e basal do citoplasma, bem como no citoplasma como um todo. Já nas amostras de mucosa não-neoplásica houve uma maior expressão da parquina na porção nuclear (Tabela 15).

Tabela 15 – Associação entre amostras com adenocarcinoma colorretal e com mucosa colorretal não-neoplásica retirada do mesmo paciente.

Variáveis		n**	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor de <i>p</i>
$\overline{S}$	Mucosa não-neoplásica I	54	21,5	21,7	6,4	38,2	<0,001*
	Adenocarcinoma	54	14,4	12,6	2,4	43,5	
Basal	Mucosa não-neoplásica I	54	73,3	80,0	60,0	80,0	0,004*
	Adenocarcinoma	54	79,5	84,2	43,3	90,0	
Apical	Mucosa não-neoplásica I	54	18,6	20,0	5,0	70,0	<0,001*
	Adenocarcinoma	54	60,9	64,2	20,0	86,7	
Nuclear	Mucosa não-neoplásica I	54	30,0	30,0	10,0	70,0	0,278
	Adenocarcinoma	54	26,0	21,7	10,0	70,0	
Citoplasmática	Mucosa não-neoplásica I	54	73,3	80,0	60,0	80,0	0,004*
	Adenocarcinoma	54	79,5	84,2	43,3	90,0	

Legenda: n = número de casos; $\overline{S}$ = média de expressão da parquina na região superficial (S); basal = expressão da parquina na região basal da célula; apical = expressão da parquina na região apical da célula; nuclear = expressão da parquina na região nuclear da célula; citoplasmática = expressão da parquina na região citoplasmática da célula; *valores de *p* significativos; **em algumas regiões temos menos casos em decorrência do tamanho dos tumores.

4.7 Análise multivariada entre expressão da parquina e as variáveis clínico-patológicas

A fim de investigar a independência da parquina na influência da sobrevida com relação às variáveis clínico-patológicas foi realizada a análise multivariada por meio do modelo de regressão de Cox. Para esta análise foi utilizada somente a variável de expressão da parquina média P (sendo essa a que apresentou resultados mais significativos nas análises anteriores).

Não houve associação entre a média P e caráter da cirurgia e idade analisando os resultados de expressão da parquina como um todo. Não foi possível realizar essa análise para as variáveis grau de diferenciação I e II em decorrência do pequeno número de casos em algumas das classificações. Ao utilizar o ponto de corte 10 foi encontrado um valor de $p = 0,037$ no grupo idade ≥ 45 anos, com um HR de 4,63 (1,10 – 19,5). Dada a ausência da condição de proporcionalidade dos riscos para a variável idade (Bethesda), não foi possível o ajuste de um modelo de regressão de Cox com as duas variáveis (idade e média P). Sendo assim, foram ajustados modelos para a média P, dentro de cada faixa etária. Em função do pequeno número de casos com MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 e P53 negativos, não foi possível o ajuste do modelo para essas variáveis. Houve associação entre média P e as variáveis: sexo, LN, lado, tipo histológico, estadiamento, tamanho do tumor, APC P e expressão da parquina na mucosa não-neoplásica retirada dos pacientes

com adenocarcinoma (Tabela 16). E foi observada uma tendência à significância ao analisar a média P com relação à variável localização. Os resultados indicam que média P é uma variável independente, logo, independente de qualquer uma dessas variáveis há associação significativa da expressão da parquina na região P com a sobrevida. Como apresentado na Tabela 16 observa-se que a cada unidade a mais de expressão da parquina na área profunda, há um decréscimo de 5 ou 6% (de acordo com a variável) na HR de óbito, observando as variáveis: sexo, localização, LN, invasão, lado, tipo histológico, estadiamento, tamanho do tumor e expressão da APC. Ao analisar a média de expressão da parquina nas mucosas não-neoplásicas retiradas dos pacientes com adenocarcinoma colorretal observou-se respectivamente que a cada unidade a mais de parquina houve um decréscimo de 8 e 9% na HR de óbito.

Tabela 16 – Modelo de regressão de Cox para média de expressão da parquina na região profunda do tumor e as variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Valor de p	HR	IC 95%
$\overline{P}$	0,032*	0,94	0,89 - 0,99
Sexo	0,601	0,75	0,26 - 2,20
$\overline{P}$	0,051	0,95	0,9 - 1,00
Localização	0,681	0,78	0,24 - 2,56
$\overline{P}$	0,029*	0,94	0,89 - 0,99
LN	0,387	1,60	0,55 - 4,68
$\overline{P}$	0,062	0,95	0,9 - 1
Invasão	0,307	1,96	0,54 - 7,14
$\overline{P}$	0,037*	0,94	0,89 - 0,99
Lado	0,927	0,95	0,30 - 3,01
$\overline{P}$	0,035*	0,94	0,89 - 0,99
Tipo histológico	0,798	1,22	0,27 - 5,53
$\overline{P}$	0,024*	0,94	0,89 - 0,99
Estadiamento	0,301	1,88	0,57 - 6,18
$\overline{P}$	0,036*	0,94	0,89 - 0,99
Tamanho do tumor	0,868	0,90	0,28 - 2,96
$\overline{P}$	0,046*	0,95	0,90 - 0,99
APC P	0,660	0,99	0,96 - 1,03
$\overline{P}$	0,019*	0,92	0,85 - 0,99
$\overline{\text{parquina mucosa não-neoplasica}}$	0,409	1,04	0,94 - 1,15

Legenda: HR = hazard ratio; IC = intervalo de confiança; P = média de expressão da parquina na região profunda (P); APC P = média de expressão da APC na região profunda (P); *valores de p significativos; $\overline{\text{parquina mucosa não-neoplasica}}$ = média de expressão da parquina nas mucosas não-neoplásicas retiradas dos pacientes com adenocarcinoma colorretal.

5. DISCUSSÃO

O câncer, atualmente no Brasil e no mundo, pode ser considerado um problema de saúde pública, uma vez que a cada ano seus índices de incidência aumentam e com esses também aumentam os custos dos cuidados de saúde. De acordo com a OMS esses índices tendem a crescer cada vez mais, sendo estimado que em 2030 o número de novos casos chegue a 21,4 milhões, com 13,2 milhões de mortes (WHO, 2015). O câncer colorretal acompanha o aumento desses índices, ocupando o terceiro lugar dentre os mais comuns, sendo mais frequente entre as mulheres (IARC, 2014; INCA, 2016). Esse cenário sofre influência do crescimento e envelhecimento da população, da alimentação pouco saudável (rica em alimentos processados, carnes vermelhas e açúcar refinado), do uso de drogas lícitas, da obesidade, e de fatores genéticos (WHO, 2015). Visando controlar, tratar e detectar de forma mais precoce o aparecimento desta doença, várias áreas da ciência têm envidado esforços para esclarecer a sua biologia, bem como os fatores que contribuem para o seu desenvolvimento, incluindo os fatores genéticos. Assim o desenvolvimento deste estudo encontra justificativa neste contexto.

O câncer colorretal apresenta uma história natural já bem conhecida e estudada (WELIN *et al.*, 1963; MUTO *et al.*, 1975), na qual uma lesão inicial poderá passar por alterações adicionais que poderão transformá-la numa neoplasia maligna (WIJKERSLOOTH *et al.*, 2011). Essa transformação pode levar cerca de 8 a 10 anos, porém a detecção desse processo em um estágio inicial pode prevenir ou tratar de forma mais efetiva o seu desenvolvimento, sendo esse o principal alvo para o controle da doença, objetivando o aumento da sobrevida com qualidade.

Algumas vias, genes e proteínas vêm sendo descritas no processo de início e progressão do câncer colorretal, porém poucos avanços ocorreram na descrição de alterações moleculares envolvidas nos estádios mais invasivos destas lesões (MANNE *et al.*, 2010), e de eventuais fatores que possam controlar esses estádios. A proteína parquína já foi relacionada a diversas doenças e processos celulares (MIRA *et al.*, 2004; WONGSEREE *et al.*, 2009; BURNS *et al.*, 2009; WITTE *et al.*, 2009; GLESSNER *et al.*, 2009) dentre esses o câncer (CESARI *et al.*, 2003; VEERIAH *et al.*, 2010), onde a sua função até o momento não foi elucidada. Com o desenvolvimento de alguns estudos (CESARI *et al.*, 2003; PICCHIO *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004; WEST e MAIDMENT, 2004; POULOGIANNIS *et al.*, 2010; TAY *et al.*, 2010; VEERIAH *et al.*, 2010; BOUMAN *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011; YEO *et al.*, 2012) foi possível propor a existência da relação entre essa

proteína e diversos tipos de câncer, dentre esses o colorretal (IKEUCHI *et al.*, 2009; POULOGIANNIS *et al.*, 2010).

Para colaborar com esses estudos amostras de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma colorretal e de pacientes sem adenocarcinoma, provenientes do HC-UFPR, foram selecionadas. Os adenocarcinomas têm origem em células epiteliais da mucosa colorretal, são caracterizados pela formação glandular e representam 95% dos casos de carcinoma colorretal (HAMILTON, 2010; OMS, 2016). As amostras estudadas foram submetidas a técnicas largamente aceitas para o estudo de proteínas em câncer. A construção de blocos de parafina contendo vários fragmentos das amostras foi realizada por meio da técnica TMA, descrita por Kononen e col. em 1998. Esta técnica permite a análise de tecidos de forma rápida e eficiente (HOOS *et al.*, 2001), possibilitando a uniformização das reações e a economia de reagentes imunoistoquímicos. Assim, é utilizada em vários estudos para a pesquisa de fatores prognósticos e de progressão tumoral (HOOS *et al.*, 2001; BUBENDORF *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2007). A aplicação da imunoistoquímica ao TMA apresenta resultados comparáveis às técnicas convencionais já validadas em diversos estudos (TORHORST *et al.*, 2001; VAN DEN EYNDEN *et al.*, 2004). A imunoistoquímica é uma técnica que consiste na utilização de anticorpos como reagentes específicos para a detecção de antígenos de interesse, nesse caso as proteínas presentes nos tecidos (POLAK e VAN NOORDEN, 1997). É uma técnica amplamente utilizada para avaliar a expressão de proteínas, tendo fácil aplicabilidade e baixo custo (POLAK e VAN NOORDEN, 1997; BOENISCH, 2001). A morfometria é a descrição quantitativa dos achados geométricos de estruturas de qualquer dimensão (MEIJER *et al.*, 1997; BUHMEIDA, 2006). Permite a análise das diversas tonalidades de colorações, por meio da seleção de pixels de cor específicos e automaticamente pixels semelhantes também são selecionados. Garantindo eficiência e precisão, eliminando a subjetividade e permitindo uma maior reprodutibilidade interobservador (ANDREA *et al.*, 2008). Esse método já foi utilizado em outros estudos para análise de tecidos tumorais, como em Farber e col. 2011, onde foram analisadas amostras de câncer colorretal para expressões da proteína KRAS. Neste estudo, para a obtenção do percentual de área tumoral os resultados foram submetidos a cálculos semelhantes aos nossos (FARBER *et al.*, 2011).

Essas técnicas foram utilizadas para a pesquisa da parquina e de outras proteínas elencadas, que compõe o painel de fatores moleculares envolvidos no câncer colorretal e em outros processos proliferativos. Foi idealizado um modelo comparativo para propor ou confirmar o mecanismo de ação da parquina no desenvolvimento do adenocarcinoma

colorretal. Os dados clínico-patológicos considerados mais relevantes também foram submetidos à análise. Os resultados de todas as análises imunoistoquímicas foram comparados com esses dados.

Para a análise da expressão da parquína foram utilizadas amostras referentes às três regiões tumorais (S, I e P). As amostras da região S estavam presentes na grande maioria dos casos, podendo ser retiradas tanto de tumores com menores como daqueles com maiores espessuras. Já, amostras das outras duas regiões só estavam presentes nos casos em que o tumor já apresentava espessuras maiores e consequentemente poderia ter invadido outras camadas epiteliais. A falta de amostra de uma das regiões pode ter ocorrido pelo fato do tumor apresentar uma menor espessura, ou em decorrência da perda de amostras durante o processo de preparo das técnicas.

Visando caracterizar a amostra foram testadas as expressões das proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, referentes aos genes de reparo. Como já comentado anteriormente a via de instabilidade de microssatélites afeta principalmente os casos de adenocarcinoma colorretal hereditário. Nesses é observada perda de função dos genes de reparo do DNA. Esta perda de função pode ocorrer raramente nos casos esporádicos nos quais se deve principalmente à hipermetilação do promotor do gene *MLH1* levando à inibição epigenética da expressão da proteína (CUNNINGHAM *et al.*, 1998). Por outro lado, nos casos hereditários essa perda de função é resultado, em sua grande maioria, de mutações na linhagem germinativa dos genes de reparo. Uma análise indireta da presença de instabilidade de microssatélites pode ser feita por meio da técnica de imunoistoquímica, avaliando a expressão das proteínas de reparo no tecido tumoral. Em células normais elas estão presentes, mas em células tumorais estão ausentes nos casos em que o desenvolvimento do tumor se deve a alterações nos genes de reparo que resultam em instabilidade de microssatélites (DENG *et al.*, 2004). As proteínas MLH1 e MSH2 formam heterodímeros com PMS2 e MSH6 respectivamente. A expressão dessas últimas depende da ligação com seus pares, desta forma a perda de expressão da proteína MLH1 pode ser detectada também através da perda de expressão da proteína PMS2 e o mesmo ocorre entre MSH2 e MSH6 (DENG *et al.*, 2004). Porém quando ocorre a perda de expressão de PMS2 e MSH6, essas podem ser detectadas de maneira isolada, pois sendo MLH1 e MSH2 independentes estarão presentes em seus índices normais (BOLAND *et al.*, 2008). Todos os casos estavam de acordo com o que prevê a literatura, de forma que, quando o caso foi classificado como negativo para MLH1 ou MSH2 também foi encontrada negatividade em seus pares, confirmando o primeiro resultado. E foram também

encontrados resultados negativos apenas para as proteínas PMS2 e MSH6, como se é descrito.

Também foi analisada a expressão da proteína P53, estudos propõe a expressão dessa proteína como um marcador adicional de instabilidade de microssatélites (LENGAUER *et al.*, 1997; LESLIE *et al.*, 2003). Em 2011 Nyiraneza e col. detectaram uma relação estatisticamente significativa entre essas duas variáveis através da técnica de imunoistoquímica. E confirmaram a hipótese de que essa análise pode contribuir na categorização do adenocarcinoma colorretal em 2 grupos: o primeiro com expressão negativa ou a sub-expressão da P53, associado com adenocarcinomas esporádicos, e o segundo com superexpressão da proteína, comparada a expressão no tipo selvagem, associada a instabilidade de microssatélites. Os resultados de Nyiraneza e col. não deixam clara a influência da P53 no sistema de reparo, demonstrando que a princípio só podem contribuir como um sinal para os patologistas suspeitarem da existência de um tumor originário da instabilidade de microssatélite, como os casos hereditários (NYIRANEZA *et al.*, 2011). É proposto que a proteína P53 influencia na via da APC, e que consequentemente alterações nessa proteína poderiam desregular essa via. Por outro lado, ao não se encontrarem alterações em P53 seria provável que outra via estivesse envolvida no desenvolvimento do câncer, podendo ser talvez a via de instabilidade de microssatélites. A proteína P53 tipo selvagem tem um tempo de meia vida curto, aproximadamente 20 minutos, o que dificulta a sua detecção pelos métodos de imunoistoquímica. A proteína mutante não é reconhecida pela enzima que a metaboliza, resultando em uma meia vida de aproximadamente 24 horas, o que a torna detectável na imunoistoquímica (GBM, 2016). O anticorpo que utilizamos nesse trabalho reconhece uma porção conservada que existe tanto na proteína tipo selvagem como na mutante. Desta forma quando a marcação foi classificada como positiva evidenciava a presença de uma proteína P53 alterada, já quando classificada como negativa evidenciava a presença da P53 tipo selvagem. Assim a ocorrência de casos negativos para pelo menos um dos quatro marcadores dos genes de reparo juntamente com classificação negativa para P53 poderia sugerir a ocorrência de instabilidade de microssatélite. A nossa amostra apresentava a maioria dos indivíduos (70) com expressão positiva para P53.

Com relação à variável idade, os pacientes foram divididos em dois grupos, conforme a classificação do sistema Bethesda, essa divisão é estabelecida de acordo com descrições de que, pacientes com câncer colorretal hereditário, como HNPCC e síndrome de Lynch geralmente apresentam o aparecimento da doença antes dos 45 anos

de idade (LYNCH e CHAPELLE, 2003; UMAR *et al.*, 2004; SEHGAL *et al.*, 2014). Logo, se o paciente é enquadrado no primeiro grupo ≤ 45 anos é mais provável que o seu câncer seja de origem hereditária. E estando no grupo > 45 anos há uma maior probabilidade de origem esporádica. Tendo em vista que a nossa amostra apresenta a grande maioria dos indivíduos com diagnóstico acima de 45 anos, e que nas análises de expressão das proteínas MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 e P53 foi observado um maior número de casos positivos é possível propor que a nossa população seja esporádica.

Com relação a variável sexo, a nossa população apresentava-se equilibrada, sendo composta por 34 pacientes do sexo masculino e 39 do sexo feminino. Na análise entre as variáveis sexo e expressão da parquina houve uma quantidade significativamente maior da parquina no sexo masculino ao se analisar a média P ($p = 0,019$), a média S, I e P nos casos completos ($p = 0,013$) e a média S, I e P em todos os casos ($p = 0,049$). Até o momento nenhum outro estudo relatou resultados semelhantes a esses que fizessem menção a uma diferença na expressão da parquina entre os sexos. Esse resultado poderia ser explorado através da análise de uma população com um maior número de casos para confirmar a diferença de expressão aqui encontrada. De uma maneira geral é observado que o diagnóstico nos homens é mais tardio, pelo fato destes demorarem a procurar o atendimento médico, assim quando diagnosticados o tumor já se encontra em estádios mais avançados. Toda via nossos resultados demonstraram que na nossa amostra os indivíduos do sexo masculino apresentavam tumores em vários estádios, não havendo, por exemplo, mais casos de tumores em estádios avançados.

O comprometimento de LN, a ocorrência de invasão angiolinfática e perineural, a localização, grau de diferenciação, tipo histológico, estadiamento e tamanho do tumor fornecem informações importantes quando ao prognóstico do paciente. LN positivos podem indicar um pior prognóstico, e essa piora pode aumentar à medida que o número de LN envolvidos aumenta (MORRIS *et al.*, 2007). Demonstrando que o paciente se encontra em um estágio mais avançado da doença, sendo associado com o aumento das taxas de recorrência locorregional, bem como pior sobrevida em 5 anos (MERKEL *et al.*, 2001; CRONER *et al.*, 2009; KENNEDY *et al.*, 2011). Apenas 40% dos pacientes com LN positivos atingem essa sobrevida, enquanto que 68% dos pacientes que apresentam LN negativos alcançam a sobrevida de 5 anos (BAXTER *et al.*, 2005). Aqui, tínhamos uma maior quantidade de indivíduos com LN negativos. Foi encontrada uma tendência à significância ao analisar a expressão da parquina e o comprometimento de LN, o que talvez pudesse ser corroborado em uma população maior. Foi observada uma maior expressão desta

proteína ao se analisar a média S, I e P nos casos completos, onde se encontrou quase o dobro de expressão em tumores que apresentavam LN positivos. Não há na literatura descrições que correlacionem parquina com LN. No entanto, como já citado anteriormente, o comprometimento de LN, está associado com um pior prognóstico (MORRIS *et al.*, 2007), indicando que a doença se encontra em um estágio mais avançado (MERKEL *et al.*, 2001; CRONER *et al.*, 2009; KENNEDY *et al.*, 2011).

Assim como os LN, a ocorrência de invasão angiolinfática e perineural é conhecida como forte marcador prognóstico independente do estágio (CHEDOTAL *et al.*, 2005; BEARD *et al.*, 2004; MENDENHALL *et al.*, 2007), indicando um fenótipo tumoral mais agressivo e pior prognóstico (OKADA *et al.*, 2004; LIEBIG *et al.*, 2009). Sendo observado um risco aumentado de metástase para outros órgãos (HARRIS *et al.*, 2008). Pacientes com invasão têm uma sobrevida de 5 anos pós diagnóstico significativamente menor (LOPES *et al.*, 2012). Na nossa amostra tínhamos uma maior quantidade de pacientes com a presença de invasão angiolinfática e perineural, porém não encontramos resulta significativos ao analisar essa variável com relação a expressão da parquina.

Com relação à localização do tumor, nos anos 80, se começou a observar uma tendência ao aumento do percentual de câncer do lado direito do cólon (JASS, 1991; LEVI *et al.*, 1993; OBRAND e GORDON, 1998), o que segundo algumas hipóteses poderia ser devido a apresentação clínica, epidemiologia genética e ambiental ou distribuição por sexo (DISTLER e HOLT, 1997; IACOPETTA, 2002). Foi descrito que o câncer encontrado do lado direito é mais propenso a ser diploide, do tipo mucinoso, ter alta instabilidade de microssatélites e metilação em ilhas CpG. Enquanto os localizados do lado esquerdo são muitas vezes lesões infiltrativas, com sintomas obstrutivos, apresentam instabilidade cromossômica, e mais frequentemente aneuploidia (BUFILL, 1990; LANZA *et al.*, 1994; IACOPETTA, 2002). Em 2008 Meguid e col. através de seus estudos propuseram que os cânceres do lado direito teriam um pior prognóstico (MEGUID *et al.*, 2008). Em 2011 Weiss e col. realizaram estudos para confirmar essa hipótese e viram que na análise incluindo múltiplas variáveis não houve diferença na sobrevida de 5 anos entre as localizações do tumor. Mas ao analisar a doença em seus estádios houve uma maior sobrevida nos cânceres do lado direito no estágio II, e uma menor sobrevida nos cânceres deste mesmo lado no estágio III (WEISS *et al.*, 2011). Na nossa população tínhamos uma maior quantidade de pacientes com tumores localizados no lado esquerdo, no entanto não encontramos resulta significativos ao analisar essa variável com relação a expressão da parquina.

O grau de diferenciação tem sido dividido por muitos estudos em dois grupos com relação às características clínicas do tumor, aqui classificado como diferenciação II, o primeiro grupo combina os tumores bem e moderadamente diferenciados, e esses são classificados como de baixo grau (composto por cerca de 50% de tecido glandular). O segundo grupo é formado pelos tumores pouco diferenciados, classificados como de alto grau (com menos de 50% de tecido de formação glandular). A formação desses dois grupos melhorou muito a significância prognóstica desta classificação (COMPTON, 1999; COMPTON *et al.*, 2000). Sendo os tumores de alto grau ou pouco diferenciados mais associados com um pior prognóstico para o paciente (BLENKINSOPP *et al.*, 1981; JASS, 1986; COMPTON, 1999). Com relação às características histológicas o tumor pode ser classificado em pouco/moderadamente e bem diferenciado, aqui chamado de diferenciação I (BONHIN *et al.*, 2014). E de acordo com essa classificação os tumores pouco/moderadamente diferenciados são mais agressivos, sendo associados a um pior prognóstico (BLENKINSOPP *et al.*, 1981; JASS, 1986; COMPTON, 1999). Nesse grupo, onde tínhamos um maior número de casos, foi encontrada uma maior expressão da parquína, ao se analisar a média S e I ($p = 0,024$) e uma tendência à significância ao analisar a média S, I e P em todos os casos.

De acordo com a OMS, tumor mucinoso, um subconjunto de subtipos histológicos (CATALANO *et al.*, 2012), é um adenocarcinoma em que uma quantidade substancial de mucina é retida no interior do tumor, ocupando mais de 50% dele (BOSMAN *et al.*, 2010). Este tipo histológico corresponde a cerca de 25% dos adenocarcinomas colorretais (CHEW *et al.*, 2010). É proposto que o seu comportamento oncológico difere do subconjunto não mucinoso. No início das pesquisas nesse campo havia controvérsias quanto a essa diferença (KANG *et al.*, 2005; VERHULST *et al.*, 2012), pois esse tipo histológico é relativamente raro em vista dos outros, dificultando o desenvolvimento de grandes estudos (SHIN *et al.*, 2011; CATALANO *et al.*, 2012; MEKENKAMP *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2015). Porém, dados mais recentes e meta-análises propõe que o tipo mucinoso pode estar associado a um pior prognóstico, sendo que os pacientes apresentam a doença de forma mais agressiva, em estádios mais avançados, alta taxa de recorrência local e a distância e consequentemente menor sobrevida (SONG *et al.*, 2009; CHEW *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2010; HYNSTROM *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2012; VERHULST *et al.*, 2012; NITSCHKE *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015). Este tipo de tumor é encontrado mais frequentemente em pacientes jovens e do sexo feminino (KANEMITSU *et al.*, 2003) está localizado principalmente no cólon proximal, ao lado direito (WANG *et al.*, 2015) e apresenta padrões moleculares distintos, tais como instabilidade de microssatélite e mutações de ativação do gene *BRAF* (CHEW *et al.*, 2010; GOPALAN *et al.*, 2011; KELEMEN *et al.*, 2011; VERHULST *et al.*,

2012). Aqui tínhamos um maior número de pacientes com tumores do tipo não mucinoso, e ao comparar essa variável com a expressão da parquina foi observado que a parquina estava mais expressa nos tumores mucinosos ao se analisar a média S e I ($p = 0,046$), e a média S, I e P em todos os casos ($p = 0,028$).

O estadiamento é dito o preditor mais importante do prognóstico clínico, englobando várias características do tumor, identificando não somente a extensão loco-regional da lesão primária, mas também sua extensão à distância. Este foi padronizado pela AJCC através da classificação TNM. A utilização de amostras de ressecção cirúrgica para o exame histológico tem uma função insubstituível em determinar o grau de infiltração tumoral nas camadas epiteliais (T), o comprometimento de linfonodos (N) e a ocorrência de metástase à distância (M) (FLEMING *et al.*, 2012). É possível considerar que o tumor esteja em um grau mais avançado conforme esses critérios de classificação se tornam mais altos, estádios 0, I e II correspondem aos estádios mais precoces da doença, o estágio III refere-se a doença de alto risco (que pode recidivar com maior frequência) e o estágio IV corresponde a doença metastática. A determinação do estágio no qual a doença se encontra colabora para o estabelecimento da melhor terapia a ser utilizada para o tratamento. No estágio I a única terapia indicada é a cirurgia, nos casos mais avançados, a partir do estágio II, o paciente deverá ser submetido à quimioterapia/ou radioterapia adjuvante (AHNEN e MACRAE, 2009). Ao analisar esta variável podemos observar que a parquina acompanha os estádios do tumor, nos estádios mais avançados (III + IV), os quais eram compostos pelo maior número de casos e associados a um pior prognóstico (AHNEN e MACRAE, 2009), há uma maior expressão da parquina em comparação aos mais precoces, considerando a média S, I e P nos casos completos ($p = 0,037$) e a média S, I e P em todos os casos ($p = 0,041$).

Desta forma podemos perceber que nessas quatro variáveis a parquina estava mais expressa nos tumores que poderiam estar ligados a um pior prognóstico. Não há relatos na literatura que descrevam essa correlação, e sendo o *PARK2* anteriormente proposto como um gene de supressão tumoral (TAY *et al.*, 2010), o esperado seria que a sua expressão estivesse diminuída nos casos de pior prognóstico colaborando para a progressão do tumor. Porém, ao encontrarmos o oposto do esperado e levando em conta que não há nenhum relato na literatura de que níveis mais altos da parquina sejam indicadores de mal prognóstico. Podemos propor que esses níveis elevados estejam envolvidos em mecanismos de controle da progressão tumoral, por meio da sua influência em alguma via, ou proteína já descrita anteriormente (STAROPOLI *et al.*, 2003; CESARI *et al.*, 2003;

IKEUCHI *et al.*, 2009; VEERIAH *et al.*, 2010; POULOGIANNIS *et al.*, 2010; YEO *et al.*, 2012; GONG *et al.*, 2014). No entanto, os níveis da parquina nos tumores mais avançados são elevados quando comparados aos níveis desta proteína em tumores que se encontram em estádios iniciais. Porém esses níveis são baixos quando comparados aos tecidos não-neoplásicos. Desta forma os níveis da parquina poderiam ser mais elevados conforme os tumores progridem. Por outro lado, há uma limitação na técnica de imunoistoquímica utilizada nesse estudo para a pesquisa desta proteína, pois o anticorpo detecta a expressão proteica de uma maneira geral, independente de alterações moleculares. Assim, outra possibilidade seria que, embora sejam detectados níveis mais altos da parquina nos casos com pior prognóstico talvez a sua funcionalidade esteja prejudicada por alterações estruturais na sua molécula. Estudos adicionais, que permitam a detecção de alterações de nível molecular poderiam contribuir para uma melhor compreensão desses resultados.

A curva ROC foi elaborada para avaliar o poder preditivo da parquina em discriminar pacientes com adenocarcinoma colorretal pouco/moderadamente diferenciado e bem diferenciado. Foi avaliada apenas a variável grau de diferenciação II, sendo esta a que apresentou resultados significativos na comparação entre expressão da parquina e variáveis clínico-patológicas. Na análise entre os grupos só foi encontrada correlação ao avaliar a média S e I ($p = 0,015$), talvez se aumentássemos o número de casos nos outros grupos também pudéssemos encontrar correlação. A curva ROC revelou um alto poder preditivo para a parquina, com uma área abaixo da curva próxima de 1 (0,807). 11% foi selecionado como o melhor ponto de corte, de acordo com valores máximos de sensibilidade e especificidade. Assim pacientes com níveis de parquina mais altos (>11%) foram associados ao tumor pouco/moderadamente diferenciado. E aqueles com parquina mais baixa ($\leq 11\%$), foram associados ao tumor bem diferenciado. Isso indica que a parquina pode ser um bom marcador para discriminar grau de diferenciação do tumor, levando em conta suas características histopatológicas, o que pode contribuir no diagnóstico e na escolha de um tratamento mais adequado.

As taxas de sobrevida expressam quantas pessoas estão vivas em um determinado período de tempo depois de terem sido diagnosticadas (ACS, 2016). O ponto de corte considerado para a análise da sobrevivência dos pacientes com adenocarcinoma colorretal é 5 anos, pois a grande maioria dos pacientes, cerca de dois terços sobrevivem por pelo menos 5 anos após o diagnóstico (EL-SHAMI *et al.*, 2015). Sendo assim a nossa população foi inicialmente dividida em dois grupos, os pacientes que tiveram sobrevida de pelo menos 5 anos, e os que morreram antes dos 5 anos. Houve associação entre a

média P e a sobrevida ($p = 0,019$), esse resultado indica que a parquina pode ter um valor preditivo de prognóstico em pacientes que se encontram em estádios mais avançados e agressivos da doença, nos quais o tumor já atingiu a região P, demonstrando níveis mais elevados desta proteína nos pacientes que alcançaram uma maior sobrevida. A diferença observada é muito grande entre os dois grupos, sendo a mediana de expressão 9,7 nos pacientes com sobrevida menor que 5 anos e 24,0 nos pacientes com sobrevida maior que 5 anos. Esses achados vêm de encontro aos resultados descritos anteriormente com relação ao comprometimento de LN, grau de diferenciação II, tipo histológico e estadiamento, onde os níveis da parquina foram mais altos nos grupos relacionados à maior agressividade. Aqui, mesmo entre aqueles pacientes que têm um tumor mais profundo e mais agressivo, a associação com níveis mais altos da parquina resulta em uma maior sobrevida.

O teste de Log-rank leva em consideração todos os pacientes independentemente de terem uma sobrevida maior ou menor que 5 anos. Neste teste foram observados resultados significativos ao analisar sobrevida e a média P com relação ao ponto de corte 10 ($p = 0,025$), onde aqueles pacientes com parquina >10 apresentaram uma maior sobrevida. Isso também foi observado ao analisar a idade dos pacientes com relação a classificação Bethesda e levando em conta o ponto de corte 10 na média P ($p = 0,043$), onde aqueles pacientes com parquina >10 apresentaram uma maior sobrevida. Ao analisar a variável caráter da cirurgia foi observado que os pacientes submetidos à cirurgia emergencial apresentam uma menor sobrevida ($p = 0,004$). Esse resultado já era esperado, pois na grande maioria dos casos os pacientes que são submetidos a cirurgias emergenciais apresentam mais complicações. Ao analisar a média P com este teste foi encontrado que amostras com maior expressão da parquina apresentavam diminuição no risco de óbito, ou conseqüentemente um aumento nos índices de sobrevida, confirmando os resultados encontrados na análise citada anteriormente. Esta proteína poderia estar exercendo uma função protetora, influenciando no prognóstico dos pacientes. Em 2012 Yeo e col. propuseram através de seus resultados que a ativação da via da parquina poderia ser um fator preditivo de um melhor prognóstico estando correlacionada inversamente com a progressão do câncer. Demonstraram que a perda da sua função resulta em aumento da expressão da ciclina D1, estando associada a sua influência na eliminação desta ciclina por meio do sistema ubiquitina proteassomo. Este aumento, concomitantemente pode influenciar na proliferação celular. Seus resultados também

demonstraram que a presença da parquina pode influenciar negativamente a expressão de VEGFR-2, o qual é envolvido na angiogênese tumoral (YEO *et al.*, 2012).

Com relação à análise multivariada de regressão de Cox envolvendo a média P e as variáveis clínico-patológicas, foi encontrada associação ao analisar idade ≥ 45 anos ($p = 0,037$), sexo ($p = 0,037$), LN ($p = 0,029$), lado ($p = 0,032$), tipo histológico ($p = 0,035$), estadiamento ($p = 0,024$), tamanho do tumor ($p = 0,036$) e expressão da APC ($p = 0,046$), indicando que a associação entre expressão da parquina na região P e os índices de sobrevida independe dessas variáveis. Assim, independente delas, aqueles pacientes que têm maior sobrevida são aqueles que têm mais parquina. Desta forma, é possível sugerir que, se dois pacientes apresentam a mesma caracterização clínica, por exemplo, o mesmo estadiamento ou tamanho do tumor, aquele paciente que possui uma maior expressão da parquina na região profunda poderá ter uma maior sobrevida.

Os resultados da análise multivariada referentes a expressão da parquina nas mucosas não neoplásicas indicam que a expressão dessa proteína na mucosa neoplásica independe da sua expressão na mucosa não-neoplásica ($p = 0,019$). Ou seja, os níveis da parquina que os pacientes apresentavam anteriormente ao desenvolvimento do tumor no tecido mucoso não influenciam nos níveis que eles irão apresentar após o desenvolvimento do tumor.

Para tentar explorar a função da parquina no controle do câncer, buscamos as suas funções já conhecidas nos mecanismos celulares. Assim, primeiramente, analisamos a sua localização dentro da célula. Ela originalmente é uma ubiquitina ligase citosólica (OKATSU *et al.*, 2015), alguns estudos demonstram que alterações em mitocôndrias que levam a despolarização da membrana podem induzir o recrutamento da parquina para esta organela por meio do acúmulo da proteína PINK1 (*PTEN-cinase induzida putativo 1*) na membrana mitocondrial. A parquina recrutada induz a ubiquitinação de várias proteínas membranares levando a eliminação autofágica da organela danificada (NARENDRA *et al.*, 2010; GEISLER *et al.*, 2010; MATSUDA *et al.*, 2010). Essas duas proteínas também agem de maneira sinérgica no reparo de mitocôndrias levemente danificadas em decorrência do estresse oxidativo. Elas induzem a formação de vesículas derivadas de mitocôndrias, compostas por proteínas oxidadas (MCLELLAND *et al.*, 2014), que transportam a carga danificada para lisossomos levando a degradação (SOUBANNIER *et al.*, 2012). Parquina e PINK1 também podem promover a síntese de novas mitocôndrias quando necessário (VINCOW *et al.*, 2013). Há também pesquisas que demonstram que a parquina influencia na localização celular de algumas proteínas, se ligando a elas e promovendo a sua

translocação do citoplasma para o núcleo (HEBRON *et al.*, 2013; HEBRON *et al.*, 2014). Além disso, Kao em 2009 apontou que danos ao DNA poderiam induzir a translocação da parquina do citoplasma para o núcleo, para que contribuísse no reparo desse DNA e assim protegesse a célula da genotoxicidade. Sugerindo que múltiplos agentes indutores de danos poderiam induzir essa translocação, entre eles: peróxido de hidrogênio, radiação UV, e alguns agentes químicos (KAO, 2009). Essa pesquisa relaciona a movimentação da parquina com o desenvolvimento da doença de Parkinson. No entanto, seria possível supor que agentes cancerígenos pudessem induzir a translocação e que no desenvolvimento do câncer tivéssemos uma maior presença da parquina na região nuclear. Em nosso estudo foi analisada a sua localização nas regiões basal e apical do citoplasma, no citoplasma como um todo e no núcleo, comparando essas localizações com as variáveis clínico-patológicas nas amostras de adenocarcinoma colorretal e com as amostras de mucosa colorretal não-neoplásica. Houve correlação entre as localizações basal, apical e citoplasmática e expressão da parquina (valores de *p* na Tabela 12), propondo que conforme ocorre um aumento dos níveis teciduais desta proteína, ela apresenta uma maior concentração na porção citoplasmática da célula. Isso pode sugerir que no câncer há uma maior presença da parquina na região citoplasmática, e assim sendo a sua função nesse processo poderia estar relacionada a mecanismos desenvolvidos nesse compartimento celular.

Na análise comparando as amostras de adenocarcinoma colorretal e de mucosa não-neoplásica com localização e expressão da parquina, foi observada nas amostras com adenocarcinoma colorretal uma maior presença na região citoplasmática. E as amostras com mucosa não-neoplásica além de apresentarem uma maior concentração de parquina na região nuclear também apresentaram níveis mais elevados desta proteína. Desta forma, os níveis da parquina na mucosa neoplásica são menores em relação a mucosa não-neoplásica, porém levando-se em conta os resultados encontrados na análise da parquina e sobrevida podemos supor que, mesmo estando em níveis mais baixos na mucosa neoplásica esses níveis estão mais elevados entre aqueles pacientes que têm uma maior sobrevida.

A expressão da parquina também foi analisada com relação à expressão das ciclinas D1 e E1 e ao KI67. A análise relacionada às ciclinas vem de encontro ao que algumas literaturas já citadas propõe, relacionando essas proteínas à degradação proteossomal induzida pela parquina. Onde o acúmulo de ciclinas é associado à deficiência de parquina em vários tipos de câncer (STAROPOLI *et al.*, 2003; IKEUCHI *et al.*, 2009;

VEERIAH *et al.*, 2010; GONG *et al.*, 2014). O KI67 é um potente marcador de proliferação, e foi utilizado para analisar a relação entre parquina e proliferação. Não foi encontrada correlação com nenhuma dessas proteínas. O que não exclui a possibilidade da parquina estar envolvida na proliferação ou na degradação de ciclinas em processos tumorais. Mas talvez essa não seja a sua função principal no adenocarcinoma colorretal. Observamos uma pequena redução das ciclinas, com o aumento da parquina, porém esses níveis não alcançaram resultados significativos, o que não significa que não possa haver uma alteração funcional promovida por essa diferença. Isso demonstra que o mecanismo de degradação dessas proteínas mediado pela parquina está presente, no entanto ela pode estar exercendo outros papéis que estejam contribuindo de maneira mais efetiva no controle desse processo.

Muitos estudos demonstram um forte envolvimento da parquina no controle da mitofagia induzindo a eliminação autofágica de mitocôndrias danificadas como já citado anteriormente (NARENDRA *et al.*, 2010; GEISLER *et al.*, 2010; MATSUDA *et al.*, 2010), e outros relacionam a mitofagia com proliferação celular. É sugerido que as mitocôndrias são necessárias para a proliferação, dando um suporte energético para as células. Mitocôndrias tumorais podem sofrer alterações em seu DNA mitocondrial que promovam a reprogramação do seu metabolismo para suportar a rápida proliferação (USSAKLI *et al.*, 2013). As células tumorais podem abrigar uma grande quantidade de mitocôndrias disfuncionais. A alta frequência dessas mitocôndrias foi associada a um pior prognóstico em pacientes com câncer colorretal. O acúmulo delas pode ocorrer devido a deficiências na autofagia, e isso posteriormente pode induzir danos no DNA, levando ao estresse oxidativo e a instabilidade cromossômica (YANG *et al.*, 2015). Um estudo realizado por Oliveira e col. demonstrou que uma substância que induz a degradação de mitocôndrias danificadas pode induzir uma maior sobrevivência em células de adenocarcinoma colorretal. A parquina poderia estar agindo de maneira semelhante por meio do seu recrutamento para as mitocôndrias danificadas e então induzindo à mitofagia. É também sugerido que a parquina possa sofrer influência da proteína P53, de forma que essa outra proteína supressora tumoral poderia colaborar na indução e recrutamento da parquina para a mitocôndria danificada (SEIRAFI *et al.*, 2015). A parquina também pode regular, negativamente, os níveis de fosforilação do receptor de VEGF, um indutor de angiogênese, por meio da regulação da via PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase - *phosphatidylinositol 3-kinase*)/AKT, o que possivelmente esteja ligado à supressão da proliferação (FENG *et al.*, 2015). Ao comparar parquina com a proteína APC encontramos uma

correlação positiva entre ambas, propondo que os seus níveis aumentam ou diminuem concomitantemente. Esses resultados confirmam os descritos por Poulogiannis e col. em 2010, onde apresentaram que uma cooperação entre alterações nessas duas proteínas poderia acelerar a progressão do adenocarcinoma colorretal. Eles observaram que camundongos com inativação heterozigótica de ambas parquina e APC apresentavam um crescimento muito acelerado do adenoma, quando comparados com animais com mutação apenas em APC. Quando se tinha a supressão do APC e a sobre-expressão da parquina, havia uma inibição da proliferação celular (POULOGIANNIS *et al.*, 2010). Desta forma foi sugerido que uma via de carcinogênese tendo como evento inicial a supressão do APC pode influenciar em uma subsequente alteração na parquina, propondo mais um caminho no qual esta proteína poderia estar envolvida nos mecanismos do câncer. Porém não podemos afirmar necessariamente que esta influência esteja ocorrendo, mais estudos são necessários para confirmar essa correlação.

Evidências demonstram o envolvimento da parquina na regulação de alguns componentes da resposta imune, como a sinalização de macrófagos e do NF-kB, através do aumento da ubiquitinação do modulador essencial de NF-kB (MULLER-RISCHART *et al.*, 2013). Tran e col. 2011, demonstraram que a proteína parquina e seu mRNA são detectáveis em macrófagos periféricos. Outras E3 ubiquitina ligases são descritas como tendo uma função na resposta imune como a NKLAM, que é expressa em macrófagos e células *natural killer* (NK). A expressão de macrófagos NKLAM é aumentada e reforçada através da presença de citocinas pró-inflamatórias, dessa forma, sendo a parquina também uma E3 ubiquitina ligase poderia ter uma função semelhante ao desempenhado por essa outra proteína. A parquina também pode ser regulada por lipopolissacarídeos (componentes da membrana celular de bactérias gram-negativas) (ABBAS *et al.*, 2000). Polimorfismos no gene *PARK2* foram associados a um aumento da susceptibilidade à infecção (COUSSENS e WERB, 2002). Um estudo de Manzanillo e col. demonstrou que camundongos e moscas com deficiência da parquina são sensíveis a infecções bacterianas intracelulares, sugerindo que a parquina estaria desempenhando uma função de defesa a partir do sistema imune (MANZANILLO *et al.*, 2013). É cada vez mais crescente a descrição de que o sistema imune tem uma função na regulação do câncer. Ao longo da transformação de uma mucosa normal em neoplasia as células normais podem vir a expressar proteínas em níveis anormais e também novas proteínas, o que faz com que as células tumorais apresentem na sua superfície antígenos alterados com relação à célula normal ou antígenos específicos do tumor (BEACHY *et al.*, 2004). O reconhecimento de

antígenos tumorais envolve vários tipos celulares e moléculas do sistema imunológico. Em tecidos neoplásicos são encontrados macrófagos ativados, células NK, linfócitos T CD4+ e CD8+ específicos para peptídeos tumorais, assim como altos níveis de imunoglobulinas. Tumores que contêm infiltrados celulares que apresentem esta composição estão relacionados com um melhor prognóstico da doença (ZITVOGEL *et al.* 2004; CHEN *et al.* 2007). Assim sendo, a parquina poderia estar desempenhando sua função protetora através do envolvimento na regulação de células do sistema imune que são recrutadas até o tumor, e agem no combate e eliminação de células tumorais. Talvez no adenocarcinoma colorretal a função da parquina esteja mais ligada a esses outros mecanismos que a degradação de ciclinas.

O presente estudo demonstrou que níveis mais altos de expressão da parquina estão associados ao sexo masculino, ao comprometimento de LN, aos tumores do tipo mucinoso, pouco/moderadamente diferenciados, que se encontram em estádios III e IV, a maior tempo de sobrevida em tumores avançados e a amostras de mucosa não-neoplásica. Embora a parquina esteja mais expressa em tumores que apresentam piores prognósticos ela está correlacionada a uma maior sobrevida, propondo que ela estaria envolvida em mecanismos de controle da progressão tumoral.

6. CONCLUSÕES

Através do estudo com essa população podemos concluir que:

1. Houve associação entre o sexo masculino e a média de expressão da parquina nas as regiões superficial, intermediária e profunda nos casos completos ($p = 0,019$) e a média de expressão da parquina nas as regiões superficial, intermediária e profunda em todos os casos ($p = 0,013$), com níveis mais elevados no sexo masculino.

2. Houve associação entre tumores pouco/moderadamente diferenciados e a média de expressão da parquina nas regiões superficial e intermediária ($p = 0,024$), com níveis mais elevados nesses tumores.

3. Houve associação entre tumores do tipo mucinoso e a média de expressão da parquina nas regiões superficial e intermediária ($p = 0,046$) e a média de expressão da parquina nas regiões superficial, intermediária e profunda em todos os casos ($p = 0,028$), com níveis mais elevados nesse tipo tumoral.

4. Houve associação entre estádios III e IV e a média de expressão da parquina nas regiões superficial, intermediária e profunda nos casos completos ($p = 0,037$) e a média de expressão da parquina nas regiões superficial, intermediária e profunda em todos os casos ($p = 0,041$), com níveis mais elevados nesses estádios.

5. O melhor ponto de corte para a média de expressão da parquina nas regiões superficial e intermediária ($p = 0,015$) com relação à variável grau de diferenciação II foi de 11%.

6. Houve associação ($p = 0,019$) entre sobrevida, utilizando o ponto de corte de 5 anos, e média de expressão da parquina na região profunda; os pacientes que apresentaram maior sobrevida foram aqueles que apresentaram maiores níveis de parquina na amostra.

7. Houve uma correlação diretamente proporcional entre expressão da parquina e expressão da APC, não houve correlação entre parquina e ciclina D1, ciclina E1 e KI67.

8. Houve associação ($p = 0,037$) entre sobrevida e a média de expressão da parquina na região profunda, considerando todos os casos, para cada unidade a mais de expressão da parquina houve uma diminuição de 6% na HR de óbito.

9. Houve associação ($p = 0,043$) entre sobrevida e idade para o grupo ≥ 45 anos considerando o ponto de corte da média de expressão da parquina na região profunda igual a 10, expressão > 10 foi associada a menor risco de óbito.

10. Houve associação ($p = 0,004$) entre sobrevida e caráter da cirurgia, a realização de cirurgia emergencial foi associada a um maior risco de óbito.

11. O aumento da expressão da parquina em adenocarcinoma colorretal está correlacionado a sua localização nas porções basal, apical e citoplasmática da célula.

12. A parquina está mais expressa em amostras com mucosa não-neoplásica em comparação as amostras de adenocarcinoma colorretal.

13. Em amostras de mucosa não-neoplásica a expressão da parquina é elevada no núcleo, enquanto que nas amostras com adenocarcinoma colorretal essa expressão é elevada no citoplasma.

14. No modelo de regressão de Cox houve associação entre média de expressão da parquina na região profunda e as variáveis: idade ≥ 45 anos, sexo, lado, estadiamento, tamanho do tumor, média de expressão da APC na região profunda e expressão da parquina na mucosa não-neoplásica retirada dos pacientes com adenocarcinoma; indicando que a parquina é uma variável independente das outras variáveis analisadas.

Apesar de algumas limitações desse estudo, como o pequeno tamanho da amostra, a utilização apenas de indivíduos da população brasileira e somente da técnica de imunoistoquímica, a expressão da parquina pode servir como indicador de sobrevida. Sendo que o aumento da sua expressão indica um prognóstico favorável para os pacientes, propondo uma função protetora a essa proteína para pacientes com adenocarcinomas mais avançados. Essa relação entre parquina e sobrevida em pacientes com adenocarcinoma colorretal é relatada pela primeira vez, e merece uma investigação mais profunda. Uma melhor compreensão do seu mecanismo de ação pode contribuir no monitoramento da doença e em melhores estratégias de tratamento, podendo proporcionar um tratamento personalizado por meio de maiores benefícios aos pacientes com tumores mais avançados.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 4 ed. Philadelphia: Saunders, c2000.
- AHNEN, D. J.; MACRAE, F. A. Clinical manifestations, diagnosis and staging of colorectal cancer. **Up to date**, 2009.
- ALFONSO, P.; NÚÑEZ, A.; MADOZ-GURPIDE, J.; LOMBARDIA, L.; SÁNCHEZ, L.; CASAL, J. I. Proteomic expression analysis of colorectal cancer by two-dimensional differential gel electrophoresis. **Proteomics**, v. 5, n. 10, p. 2602-11, jul 2005.
- ALVAREZ-CHAUVER, P.; RODRÍGUEZ-PIÑEIRO, A. M.; RODRÍGUEZ-BERROCAL, F. J.; MARTÍNEZ-ZORZANO, V. S.; PÁEZ DE LA CADENA, M. Identification of hydrophobic proteins as biomarker candidates for colorectal cancer. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 3, p. 529-40, jan 2007.
- ALVAREZ-CHAUVER, P.; OTERO-ESTÉVEZ, O.; PÁEZ DE LA CADENA, M.; RODRÍGUEZ-BERROCAL, F. J.; MARTÍNEZ-ZORZANO, V. S. Proteomics for discovery of candidate colorectal cancer biomarkers. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 14, p. 3804-3824, 14 abr 2014.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Colorectal Cancer Facts & Figures**. CANCER. 2014. Disponível em: <<http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/colorectal-cancer-facts-figures>>. Acesso em: 10 jun. 2014.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Colon Cancer Treatment**. COLORECTAL. 2014. Disponível em: < <http://www.cancer.gov/types/colorectal/hp/rectal-treatment-pdq>>. Acesso em: 19 jan. 2016.
- ANACLETO, C.; ROSSI, B.; LOPES, A.; SOARES, F. A.; ROCHA, J. C.; CABALLERO, O.; CAMARGO, A. A.; SIMPSON, A. J.; PENA, S. D. Development and application of a multiplex PCR procedure for the detection of DNA methylation in colorectal cancer. **Oncol Rep**, v. 13, n. 2, p. 325-328, 2005.
- ANDRADE, V. P.; CUNHA, I. W.; SILVA, E. M.; AYALA, F.; SATO, Y.; FERREIRA, S. S.; NASCIMENTO, C. F.; SOARES, F. A. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 1, p. 55-60, 2007.

- ANDREA, E. A.; BLEGGI-TORRES L. F.; ALVES M. T. S. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem. **J Bras Patol Med Lab**, v. 44, n. 1, p. 51-57.
- ARAÚJO, G. B. A. **Expressão imunoistoquímica da quiescina/sulfidril oxidase 1 (QSOX1) em neuroblastomas humanos e sua correlação com fatores prognósticos clinicopatológicos e com biomarcadores de progressão tumoral**. 2011. 77 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba. 2011.
- ARNAUD, J. P.; BERGAMASCHI, R. Emergency subtotal/total colectomy with anastomosis for acutely obstructed carcinoma of the left colon. **Dis Colon Rectum**, v. 37, n. 7, p. 685- 688, 1994.
- BABEL, I.; BARDERAS, R.; DÍAZ-URIARTE, R.; MARTÍNEZ-TORRECUADRA DA, J. L.; SÁNCHEZ-CARBAYO, M.; CASAL, J. I. Identification of tumor- associated autoantigens for the diagnosis of colorectal cancer in serum using high density protein microarrays. **Mol Cell Proteomics**, v. 8, n. 10, p. 2382-2395, 2009.
- BACON, E. H.; MCGREGOR, J. K. Prevention of recurrent carcinoma of the colon and rectum: report of 236 patients. **Dis Colon Rectum**, v. 6, p. 209-214, 1963.
- BARAULT, L.; CHARON-BARRA, C.; JOOSTE, V.; DE LA VEGA, M. F.; MARTIN, L.; ROIGNOT, P.; RAT, P.; BOUVIER, A. M.; LAURENT-PUIG, P.; FAIVRE, J.; CHAPUSOT, C.; PIARD, F. Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases. **Cancer Res**, v. 68, n. 20, p. 8541–6, 2008.
- BAXTER, N. N.; VIRNIG, D. J.; ROTHENBERGER, D. A.; MORRIS, A. M.; JESSURUN, J.; VIRNIG, B. A. Lymph node evaluation in colorectal cancer patients: a population-based study. **J Natl Cancer Inst**, v. 97, n. 3, p. 219-225, 2005.
- BEACHY, P. A.; KARHADKAR, S. S.; BERMAN, D. M. Mending and malignancy. **Nature**,; v. 431, p. 402, 2004.
- BEARD, C. J.; CHEN, M. H.; COTE, K.; LOFFREDO, M.; RENSHAW, A. A.; HURWITZ, M.; D'AMICO, A. V. Perineural invasion is associated with increased relapse after external beam radiotherapy for men with low-risk prostate cancer and may be a marker for occult, high-grade cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 58, n. 1, p. 19-24, 2004.

- BICALHO, L. G. M. F.; RUIZ, R. F.; PICOLO M. M.; BLASI P. R. A. A. Epidemiologia dos adenomas serrilhados em uma casuística do Hospital Alemão Oswaldo Cruz em São Paulo. **GED gastroenterol endosc dig**, v. 34, n. 3, p. 101-106, 2015.
- BLASI, E.; BARLUZZI, R.; BOCCHINI, V.; MAZZOLLA, R.; BISTONI, F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. **J Neuroimmunol**, v. 27, n. 2-3, p. 229–237, 1990.
- BOENISCH, T. **Immunochemical Staining Methods**. DAKO Corporation, 3a edição, Carpinteria, CA, USA, 2001.
- BOLAND, C. R.; THIBODEAU, S. N.; HAMILTON, S. R.; SIDRANSKY, D.; ESHLEMAN, J. R.; BURT, R. W.; MELTZER, S. J.; RODRIGUEZ-BIGAS, M. A.; FODDE, R.; RANZANI, G. N.; SRIVASTAVA, S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. **Cancer Res**, v. 58, n. 22, p. 5248-57, 1998.
- BOLAND, C. R. Clinical uses of microsatellite instability testing in colorectal cancer: an ongoing challenge. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 7, p. 754–756, 2007.
- BOLAND, C. R.; KOI, M.; CHANG, D. K.; CARETHERS, J. M. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. **Fam Cancer**, v. 7, p. 41-52, 2008.
- BOSMAN, F.; CARNEIRO, F.; HRUBAN, R. H. THEISE, N. D. WHO classification of tumours of the digestive system. Fourthth edition. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer (IARC)**, Cap. 8, p. 134-146, 2010.
- BOUMAN, L.; SCHLIERF, A.; LUTZ, A. K.; SHAN, J.; DEINLEIN, A.; KAST, J.; GALEHDAR, Z.; PALMISANO, V.; PATENGE, N.; BERG, D.; GASSER, T.; AUGUSTIN, R.; TRÜMBACH, D.; IRRCHER, I.; PARK, D. S.; WURST, W.; KILBERG, M. S.; TATZELT, J.; WINKLHOFFER, K. F. Parkin is transcriptionally regulated byATF4: evidence for an interconnec- tion between mitochondrial stress and ER stress. **Cell Death Differ**, v. 18, n. 5, p. 769–782, 2011.
- BLENKINSOPP, W. K.; STEWART-BROWN, S.; BLESOVSKY, L.; KEARNEY G, FIELDING, L. P. Histopathology reporting in large bowel cancer, G Kearney, and L P Fielding. **J Clin Pathol** 509–513, 1981

- BONHIN, R. G.; CARVALHO, G. M.; GUIMARÃES, A. C.; CHONE, C. T.; CRESPO, A. N.; ALTEMANI, A. M.; AMSTALDEN, E. M. Histologic correlation of expression of Ki-67 in squamous cell carcinoma of the glottis according to the degree of cell differentiation. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 80, n. 4, p. 290-295, 2014.
- BRANDON, M.; BALDI, P.; WALLACE, D. C. Mitochondrial mutations in cancer. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4647-4662, 2006.
- BRENNER, H.; CHANG-CLAUDE, J.; SEILER, C.M. RICKERT, A.; HOFFMEISTER, M. Protection from colorectal cancer after colonoscopy: A population-based, case-control study. **Ann Intern Med**, v. 154, n. 1, p. 22–30, 2011.
- BUBENDORF, L.; NOCITO, A.; MOCH, H.; SAUTER, G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. **J Pathol**, v. 195, n. 1, p. 72-79, 2001.
- BUFILL, J. A. Colorectal cancer: Evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. **Ann Intern Med**, v. 113, p. 779-788, 1990.
- BUHMEIDA, A. Quantitative pathology: historical background, clinical research and application of nuclear morphometry and DNA image cytometry. **Libyan J Med**, v. 1, n. 2, p. 126–139, 2006.
- BURKE, H. B.; HENSON, D. E. The American Joint Committee on Cancer. Criteria for prognostic factors and for an enhanced prognostic system. **Cancer**, v. 72, n. 10, p. 3131–3135, 1993.
- BURNS, M. P.; ZHANG, L.; REBECK, G. W.; QUERFURTH, H. W.; MOUSSA, C. E. Parkin promotes intracellular Abeta1-42 clearance. **Hum Mol Genet**, v. 18, n. 17, p. 3206-3216, 2009.
- CATALANO, V.; LOUPAKIS, F.; GRAZIANO, F.; BISONNI, R.; TORRESI, U.; VINCENZI, B.; MARI, D.; GIORDANI, P.; ALESSANDRONI, P.; SALVATORE, L.; FORNARO, L.; SANTINI, D.; BALDELLI, A. M.; ROSSI, D.; GIUSTINI, L.; SILVA, R. R.; FALCONE, A.; D'EMIDIO, S.; ROCCHI, M.; LUZI, F. S. Prognosis of mucinous histology for patients with radically resected stage II and III colon cancer. **Ann Oncol**, v. 23, p. 135–141, 2012.
- CESARI, R.; MARTIN, E. S.; CALIN, G. A.; PENTIMALLI, F.; BICHI, R.; MCADAMS, H.; TRAPASSO, F.; DRUSCO, A.; SHIMIZU, M.; MACIULLO, V.; ANDRILLI, G.; SCAMBIA,

- G.; PICCHIO, M. C.; ALDER, H.; GODWIN, A. K.; CROCE, C. M. Parkin, a gene implicated in autosomal recessive juvenile parkinsonism, is a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q25 – q27. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 10, p. 5956-5961, 2003.
- CHEDOTAL, A.; KERJAN, G.; MOREAU-FAUVARQUE, C. The brain within the tumor: New roles for axon guidance molecules in cancers. **Cell Death Differ**, v. 12, n. 8, p. 1044-1056.
- CHEN, R.; ALVERO, A. B.; SILASI, D. A.; MOR, G. Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway. **Am J Reprod Immunol**, v. 57, p. 93-107, 2007.
- CHEN, H.; CHAN, D. C. Mitochondrial dynamics-fusion, fission, movement, and mitophagy-in neurodegenerative diseases. **Hum Mol Genet**, v. 18, n. R2, p. R169-R176, 2009.
- CHEN, J. S.; CHEN, K. T.; FAN, C. W.; HAN, C. L.; CHEN, Y. J.; YU, J. S.; CHANG, Y. S.; CHIEN, C. W.; WU, C. P.; HUNG, R. P.; CHAN, E. C. Comparison of membrane fraction proteomic profiles of normal and cancerous human colorectal tissues with gel-assisted digestion and iTRAQ labeling mass spectrometry. **FEBS J**, v. 277, n. 14, p. 3028-3038, 2010.
- CHEN, J. X.; TANG, X. D.; XIANG, D. B.; DONG, X. L.; PENG, F. Y.; SUN, G. Y. TNM stages and prognostic features of colorectal mucinous adenocarcinomas: a meta analysis. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 13, n. 7, p. 3427-30, 2012.
- CHEW, M. H.; YEO, S. A.; NG, Z. P.; LIM, K. H.; KOH, P. K.; NG, K. H.; EU, K. W. Critical analysis of mucin and signet ring cell as prognostic factors in an Asian population of 2,764 sporadic colorectal cancers. **Int J Colorectal Dis**, v.25, n. 10, p. 1221-1229, 2010.
- CHUNG, D. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. **Gastroenterology**, v. 119, n. 3, p. 854–865, 2000.
- COMPTON, C. C. Pathology report in colon cancer: What is prognostically important? **Dig Dis**, v. 17, p. 67-79, 1999.
- COMPTON, C. C.; FIELDING, L. P.; BURGART, L. J.; CONLEY, B.; COOPER, H. S.; HAMILTON, S. R.; HAMMOND, M. E.; HENSON, D. E.; HUTTER, R. V.; NAGLE, R.

- B.; NIELSEN, M. L.; SARGENT, D. J.; TAYLOR, C. R.; WELTON, M.; WILLETT, C. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch Pathol Lab Med**, v. 24, n. 7, p. 979-994, 2000.
- COMPTON, C. C.; GREENE, F. L. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. **CA Cancer J Clin**, v. 54, n. 6, p. 295-308, 2004.
- CONTEDEUCA, V.; SANSONNO, D.; RUSSI, S.; DAMMACCO, F. Pre-cancerous colorectal lesions (Review). **Int J Oncol**, v. 43, n. 4, p. 973-984, 2013.
- COROMINAS, R.; YANG, X.; LIN, G. N.; KANG, S.; SHEN, Y.; GHAMSARI, L.; BROLY, M.; RODRIGUEZ, M.; TAM, S.; WANAMAKER, S. A.; FAN, C.; YI, S.; TASAN, M.; LEMMENS, I.; KUANG, X.; ZHAO, N.; MALHOTRA, D.; MICHAELSON, J. J.; IAKOUCHEVA L. M. Protein interaction network of alternatively spliced isoforms from brain links genetic risk factors for autism. **Nat. Commun**, v. 5, p. 3650-3650, 2014.
- COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.
- CRONER, R. S.; MERKEL, S.; PAPADOPOULOS, T.; SCHELLERER, V.; HOHENBERGER, W.; GOEHL, J. Multivisceral resection for colon carcinoma. **Dis Colon Rectum**, v. 52, n. 8, p. 1381–1386, 2009.
- CRUZ, G. M. G. Câncer colônico em pacientes com menos de 40 anos de idade. **Rev Bras Colo-Proct**, v. 11, n. 1, p. 19-24, 1991.
- CRUZ, G. M. G. Câncer Colorretal metacrônico – Estudo de incidência cumulativa e apresentação de dez casos pessoais. **Rev Bras Coloproctol**, v. 16, n. 3, p. 121-128, 1996.
- CUNNINGHAM, J. M.; CHRISTENSEN, E. R.; TESTER, D. J.; KIM, C. Y.; ROCHE, P. C.; BURGART, L. J.; THIBODEAU, S. N. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. **Cancer Res**, v. 58, p. 3455–3460, 1998.
- CUNNINGHAM, D.; HUMBLET, Y.; SIENA, S.; KHAYAT, D.; BLEIBER, H.; SANTORO, S.; BETS, D.; MUESER, M.; HARSTRICK, A.; VERSLYPE, C.; CHAU, I.; CTSEM, E. Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. **N Engl J Med**, v. 351, n. 4, p. 337-345, 2004.
- DAVIES, R. J.; MILLER, R.; COLEMAN, N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 3, p. 199–209, 2005

- DE LA CHAPELLE, A. Genetic predisposition to colorectal cancer. **Nature**, v. 4, p. 769-780, 2004.
- DENG, G.; BELL, I.; CRAWLEY, S.; GUM, J.; TERDIMAN, J. P.; ALLEN, B. A.; TRUTA B.; SLEISENGER, M. H.; KIM, Y. S. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Clin Cancer Res**, v. 10, p. 191–195, 2004.
- DENISON, S. R.; CALLAHAN, G.; BECKER, N. A.; PHILLIPS, L. A.; SMITH, D. I. Characterization of FRA6E and its potential role in autosomal recessive juvenile parkinsonism and ovarian cancer. **Genes Chromo Cancer**, v. 38, n. 1, p. 40–52, 2003a.
- DENISON, S. R.; WANG, F.; BECKER, N. A.; SCHUELE, B.; KOCK, N.; PHILLIPS, L. A.; KLEIN, C.; SMITH D. I. Alterations in the common fragile site gene Parkin in ovarian and other cancers. **Oncogene**, v. 22, n. 51, p. 8370-8378, 2003b.
- DERIVAL. **Câncer Colorretal**. DERIVAL. 2016. Disponível em: <<http://derival.com.br/doencas/doencas-do-colon/cancer-colorretal/>> Acesso em 20 mar. 2016.
- DISTLER, P.; HOLT, P. R. Are right-and left-sided colon neoplasms distinct tumors? **Dig Dis**, v. 15, p. 302–311, 1997.
- DOMINGO, E.; LAIHO, P.; OLLIKAINEN, M.; PINTO, M.; WANG, L.; FRENCH, A. J.; WESTRA, J.; FREBOURG, T.; ESPIN, E.; ARMENGOL, M.; HAMELIN, R.; YAMAMOTO, H.; HOFSTRA, R. M.; SERUCA, R.; LINDBLOM, A.; PELTOMAKI, P.; THIBODEAU, S. N.; AALTONEN, L. A.; SCHWARTZ, S. J. R. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. **J Med Genet**, v. 41, n. 9, p. 664–668, 2004.
- DOSS-PEPE, E. W.; CHEN, L.; MADURA, K. Alpha-Synuclein and Parkin Contribute to the Assembly of Ubiquitin Lysine 63-linked Multiubiquitin Chains. **J Biol Chem**, v. 280, n. 17, p. 16619-16624, 2005.
- DOWNWARD, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 1, p. 11–22, 2003.
- EBERT, M. P.; MODEL, F.; MOONEY, S.; HALE, K.; LOGRASSO, J.; TONNES-PRIDY, L.; HOFFMANN, J.; CSEPREGI, A.; RÖCKEN, C.; MOLNAR, B.; SCHULZ,

- HU.; MALFERTHEINER, P.; LOFTON-DAY, C. Aristaless-like homeobox-4 gene methylation is a potential marker for colorectal adenocarcinomas. **Gastroenterology**, v. 131, n. 5, p. 1418-1430, 2006.
- EDGE, S. B.; BYRD, D. R.; COMPTON, C. C.; FRITZ, A. G.; GREENE, F. L.; TROTTI, A. **AJCC Cancer Staging Manual**. 7. ed. New York, NY: Springer-Verlag, 2009.
- EL-SHAMI, K.; OEFFINGER, K. C.; ERB, N. L.; WILLIS A.; BRETSCH, J. K.; PRATT-CHAPMAN, M. L.; CANNADY, R. S.; WONG, S. L.; ROSE, J.; BARBOUR A. L.; STEIN, K. D.; SHARPE, K. B.; BROOKS D. D.; COWENS-ALVARADO, R. L. American Cancer Society colorectal cancer survivorship care guidelines. **CA Cancer J Clin**, n. 65, p. 427-455, 2015.
- ENSEMBL. Gene: PARK2. ENSEMBL. 2016. Disponível em: <http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000185345;r=6:161347420-162727771> Acesso em: 20 fev. 2016.
- FADDEN, K.; HILL, M. J.; OWEN, R. W.; Effect of fibre on bile acid metabolism by human faecal bacteria in batch and continuous culture. **Eur J Cancer Prev**, n. 6, v. 2, p. 175–194, 1997.
- FALLON, L.; BÉLANGER, C. M.; CORERA, A. T.; KONTOGIANNEA, M.; REGAN-KLAPISZ, E.; MOREAU, F.; VOORTMAN, J.; HABER, M.; ROULEAU, G.; THORARINSDOTTIR, T.; BRICE, A.; VAN BERGEN EN HENEGOUWEN, P. M.; FON, E. A. A regulated interaction with the UIM protein Eps15 implicates parkin in EGF receptor trafficking and PI(3)K-Akt signalling. **Nat Cell Biol**, v. 8, n. 8, p. 834–842, 2006.
- FANAYAN, S.; SMITH, J. T.; LEE, L. Y.; YAN, F.; SNYDER, M.; HANCOCK, W. S.; NICE, E. Proteogenomic analysis of human colon carcinoma cell lines LIM1215, LIM1899, and LIM2405. **J Proteome Res**, v. 12, n. 4, p. 1732-1742, 2013.
- FARBER, L.; EFRATI, E.; ELKIN, H.; PEERLESS, Y.; SABO, E.; BEN-IZHAK, O.; HERSHKOVITZ, D. Molecular morphometric analysis shows relative intra-tumoural homogeneity for KRAS mutations in colorectal cancer. **Virchows Arch**, v. 459, p. 487–493, 2011.
- FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61. n. 5, p. 759-767, 1990.

- FENG, D. D.; CAI, W.; CHEN, X. Feng, D. D., Cai, W., & Chen, X. (2015). The associations between Parkinson ' s disease and cancer: the plot thickens. **Translational Neurodegeneration**, v. 4, n. 20, 2015.
- FERLAY, J.; STELIAROVA-FOUCHER, E.; LORTET-TIEULENT, J.; ROSSO, S.; COEBERGH, J. W. W.; COMBER, H.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. **Eur J Cancer**, v. 49, n. 6, p. 1374-403, 2013.
- FLEMING, M.; RAVULA, S.; TATISHCHEV, S. F.; WANG, H. L. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. **J Gastrointest Oncol**, v. 3, n. 3, p. 153–173, 2012.
- FOROUD, T.; UNIACKE, S. K.; LIU, L.; PANKRATZ, N.; RUDOLPH, A.; HALTER, C.; SHULTS, C.; MARDER, K.; CONNEALLY, P. M.; NICHOLS, W. C. c. **Neurology**, v. 60, n. 5, p. 796-801, 2003.
- FORTNER, J. G.; SILVA, J. S.; GOLBEY, R. B.; COX, E. B.; MACLEAN, B. J. Multivariate analysis of a personal series of 247 consecutive patients with liver metastases from colorectal cancer. **Ann Surg**, v. 199, n. 3, p. 306-16, 1984.
- FUJIWARA, M; MARUSAWA, H; WANG, H.; IWAI, A.; IKEUCHI, K.; IMAI, Y.; KATAOKA, A.; NUKINA, N.; TAKAHASHI, R.; CHIBA, T. Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, v. 27, n. 46, p. 6002-6011, 2008.
- GBM. Boletim informativo do GBM. GBM. 2016. Disponível em: <<http://www.gbm.org.br/gbm/boletim/Edicao06.pdf> > Acesso em 15 fev. 2016.
- GEISLER, S.; HOLMSTROM, K. M.; SKUJAT, D.; FIESEL, F. C.; ROTHFUSS, O. C.; KAHLE, P. J.; SPRINGER W. PINK1/Parkin- mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. **Nat. Cell Biol**, v. 12, n. 2, p. 119–131, 2010.
- GEROLAS.; NITTKA, S.; KÄHLER, G.; TAO, S.; BRENNER, H.; BINELLI, G.; EILS, R.; BRORS, B.; NEUMAIER, M. Genetic variants in apoptosis-related genes associated with colorectal hyperplasia. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 53, n. 9, p. 769-78, 2014.
- GLESSNER, J. T.; WANG, K.; CAI, G.; KORVATSKA, O.; KIM, C. E.; WOOD, S.; ZHANG, H.; ESTES, A.; BRUNE, C. W.; BRADFELD, J. P.; IMIELINSKI, M.; FRACKELTON, E. C.; REUCHERT, J.; CRAWFORD, E. L.; MUNSON, J.; SLEIMAN, P. M. A.; CHIAVACCI, R.; ANNAIAH, K.; THOMAS, K.; HOU, C.; GLABERSON, W.;

FLORY, J.; OTIENO, F.; GARRIS, M.; SOORYA, L.; KLEI, L.; PIVEN, J.; MEYER, K. J.; ANAGNOSTOU, E.; SAKURAI, T.; GAME, R. M.; RUDD, D. S.; ZURAWIECKI, D.; MCDOUGLE, C. J.; DAVIS, L. K.; MILLER, J.; POSEY, D. J.; MICHAELS, S.; KOLEVZON, A.; SILVERMAN, J. M.; BERNIER, R.; LEVY, S. E.; SCHULTZ, R. T.; DAWSON, G.; OWLEY, T.; MCMAHON, W. M.; WASSINK, T. H.; SWEENEY, J. A.; NURNBERGER, J. I. J.; COON, H.; SUTCLIFFE, J. S.; MINSHEW, N. J.; GRANT, S. F. A.; BUCAN, M.; COOK, E. H. J.; BUXBAUM, J. D.; DEVLIN, B.; SCHELLENBERG, G. D.; HAKONARSON, H. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. **Nature**, v. 459, n. 7246, p. 569-573, 2009.

GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria in cancer cells : what is so special about them ? **Trends Cell Biol**, v. 18, n. 04, p. 165-173, 2008.

GONG, Y.; ZACK, T. I.; MORRIS, L. G.; LIN, K.; HUKKELHOVEN, E.; RAHEJA, R.; TAN, I. L.; TURCAN, S.; VEERIAH, S.; MENG, S.; VIALE, A.; SCHUMACHER, S. E.; PALMEDO, P.; BEROUKHIM, R.; CHAN, T. A. Pan-cancer genetic analysis identifies *PARK2* as a master regulator of G1/S cyclins. **Nat Genet**, v. 46, n. 6, p. 588-94, 2014.

GOPALAN, V.; SMITH, R. A.; HO, Y. H.; LAM, A. K. Signet-ring cell carcinoma of colorectum—current perspectives and molecular biology. **Int J Colorectal Dis**, v. 26, n. 2, p. 127–133, 2011.

GORGOLIS, V. G.; VASSILIOU, L. V.; KARAKAIDOS, P.; ZACHARATOS, P.; KOTSINAS, A.; LILOGLOU, T.; VENERE, M.; DITULLIO, R. A. J. R.; KASTRINAKIS, N. G.; LEVY, B.; KLETSAS, D.; YONETA, A.; HERLYN, M.; KITTAS, C.; HALAZONETIS, T. D. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 907–913, 2005.

GRADY, W. M. Genomic instability and colon cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 23, n. 1–2, p. 11–27, 2004.

GRADY, W. M.; CARETHERS, J. M. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 135, n. 4, p. 1079–99, 2008.

GRADY, W. M.; PRITCHARD, C. C. Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. **Toxicol Pathol**, v. 42, n. 1, p. 124-39, 2014.

- HAMPE, C.; ARDILA-OSORIO, H.; FOURNIER, M.; BRICE, A.; CORTI, O.; CURIE, M.; VI, P. Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin – protein ligase with monoubiquitylation capacity. **Hum Mol Genet**, v. 15, n. 13, p. 2059-2075, 2006.
- HAMILTON. In vitro cytotoxicity of combinations of dichloroacetate with anticancer platinum compounds. **Clin Pharmacol**, v. 2, p. 177-183, 2010.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.
- HARRIS, E. I.; LEWIN, D. N.; WANG, H. L.; LAUWERS, G. Y.; SRIVASTAVA, A.; SHYR, Y.; SHAKHTOUR, B.; REVETTA, F.; WASHINGTON, M. K. Lymphovascular invasion in colorectal cancer: an interobserver variability study. **Am J Surg Pathol**, v. 32, n. 12, p. 1816-1821, 2008.
- HEBRON, M.L.; LONSKAYA, I.; MOUSSA, C. E. Nilotinib reverses loss of dopamine neurons and improves motor behavior via autophagic degradation of alpha-synuclein in Parkinson's disease models. **Hum Mol Genet**, v. 22, p. 3315–3328, 2013.
- HEBRON, M.; CHEN, W.; MIESSAU, M.J.; LONSKAYA, I.; MOUSSA, C.E. Parkin reverses TDP-43-induced cell death and failure of amino acid homeostasis. **J Neurochem**, v. 129, p. 350–361 2014.
- HERMSEN, M.; POSTMA, C.; BAAK, J.; WEISS, M.; RAPALLO, A.; SCIUTTO, A.; ROEMEN, G.; ARENDS, J. W.; WILLIAMS, R.; GIARETTI, W.; DE GOEIJ, A.; MEIJER, G. Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. **Gastroenterology**, v. 123, n. 4, p. 1109–1119, 2002.
- HERRÁIZ, M.; MUÑOZ-NAVAS, M. Recognition and management of hereditary colorectal cancer syndromes. **Rev Esp Enferm Dig**, v. 101, n. 2, p. 125–132, 2009.
- HISABE, T.; HIRAI, F.; MATSUI, T. Development and progression of colorectal cancer based on follow-up analysis. **Dig Endosc**, v. 26 (Suppl.), n. 2, p. 73-77, 2014.
- HOOS, A.; URIST, M. J.; STOJADINOVIC, A.; MASTORIDES, S.; DUDAS, M. E.; LEUNG, D. H. Y.; KUO, D.; BRENNAN, M. F.; LEWIS, J. J.; CORDON-CARDO, C. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. **Am J of Pathol**, v. 158, n. 4, p. 1245-1251, 2001.

- HORNICK, J. L.; ODZE R. D.; FARRAYE, F. A.;, HECHT, J. L. Long-term follow-up after polypectomy treatment for adenoma-like dysplastic lesions in ulcerative colitis. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 2, n. 7, p. 534-541, 2004.
- HUXLEY, R. R.; ANSARY-MOGHADDAM, A.; CLIFTON, P.; CZERNICHOW, S.; PARR, C. L. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: A quantitative overview of the epidemiological evidence. **Int J Cancer**, v. 125, n. 1, p. 171-180, 2009.
- HYNGSTROM, J. R.; HU, C. Y.; XING, Y.; YOU, Y. N.; FEIG, B. W.; SKIBBER, J. M.; RODRIGUEZ-BIGAS M. A.; CORMIER, J. N.; CHANG, G. J. Clinicopathology and outcomes for mucinous and signet ring colorectal adenocarcinoma: analysis from the National Cancer Data Base. **Ann Surg Oncol**, v. 19, n. 9, p. 2814-2821, 2012.
- IACOPETTA, B. Are there two sides to colorectal cancer? **Int J Cancer**, n. 101, p.403-408, 2002.
- IKEUCHI, K.; MARUSAWA, H.; FUJIWARA, M.; MATSUMOTO, T.; ENDO, Y.; WATANABE, T.; IWAI, A.; SAKAI, Y.; TAKAHASHI, R.; CHIBA, T. Attenuation of proteolysis-mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers. **Int J Cancer**, v. 125, n. 9, p. 2029-35, 2009.
- INCA. **Estimativa 2016/2017**. INCA. 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>> Acesso em: 17 jan. 2016.
- INCA. **Corretal**. INCA. 2016. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/definicao>> Acesso em: 17 jan. 2016
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx> Acesso em: 10 jun. 2014.
- ISSA, J. P. Colon cancer: it's CIN or CIMP. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 19, p. 5939–5940, 2008.
- IVANCIC, M. M.; IRVING, A. A.; K. G. JONAKIN, DOVE, SUSSMAN, W. M. R. The concentrations of EGFR, LRG1, ITIH4, and F5 in serum correlate with the number of colonic adenomas in ApcPirc/+ rats. **Cancer Prev Res (Phila)** v. 7, n. 11, p.1160-9. 2014.

- JARICK, I.; VOLCKMAR, A. L.; PUTTER, C.; PECHLIVANIS, S.; NGUYEN, T. T.; DAUVERMANN M. R.; BECK S.; ALBAYRAK Ö.; SCHERAG, S.; GILSBACH, S.; CICHON, S.; HOFFMANN, P.; DEGENHARDT, F.; NOTHEN, M. M.; SCHREIBER, S.; WICHMANN, H. E.; JOCKEL, K. H.; HEINRICH J.; TIESLER C. M.; FARAONE, S. V.; WALITZA, S.; SINZIG, J.; FREITAG, C.; MEYER, J.; HERPERTZ-DAHLMANN, B.; LEHMKUHL, G.; RENNER, T. J.; WARNKE, A.; ROMANOS, M.; LESCH, K. P.; REIF, A.; SCHIMMELMANN, B. G.; HEBEBRAND J.; SCHERAG, A.; HINNEY, A. Genome-wide analysis of rare copy number variations reveals *PARK2* as a candidate gene for attention-deficit/hyperactivity disorder. **Mol Psychiatry**, v. 19, n. 1, p. 115-121, 2014.
- JASS, J. R. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. **J Clin Pathol**, v. 39, n. 6, p. 585-589, 1986.
- JASS, J. R. Subsite distribution and incidence of colorectal cancer in New Zealand. **Dis Colon Rectum**, v. 34, p. 56–59, 1991.
- JE, E. M.; YOO, N. J.; LEE, S. H. Somatic mutation of *PARK2* tumor suppressor gene is not common in common solid cancers. **Pathol Oncol Res**, v. 19, n. 3, p. 393-395, 2013.
- JIANG, Q.; REN, Y.; FENG, J. Direct binding with HDAC6 mediates the reversible recruitment of parkin to the centrosome. **J Neurosci.**, v. 28, n. 48, p. 12993-13002, 2008.
- JUBB, A. M.; BELL, S. M.; QUIRKE, P. Methylation and colorectal cancer. **J Pathol**, v. 195, n. 1, p. 111-134, 2001.
- KAHLE, P. J.; HAASS, C. How does parkin ligate ubiquitin to Parkinson's disease? **EMBO Rep**, v. 5, n. 7, p. 681-685, 2004.
- KANE, M.; LODA, M.; GAIDA, G.; LIPMAN, J.; MISHRA, R.; GOLDMAN, H.; JESSUP, J. M.; KOLODNER, R. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. **Cancer Res**, v. 57, n. 5, p. 808–811, 1997.
- KANEMITSU, Y.; KATO, T.; HIRAI, T.; YASUI, K.; MORIMOTO, T.; SHIMIZU, Y.; KODERA, Y.; YAMAMURA, Y. Survival after curative resection for mucinous adenocarcinoma of the colorectum. **Dis Colon Rectum**, v. 46, n. 2, p. 2160–2167, 2003.

- KANG, H.; O'CONNELL, J. B.; MAGGARD, M. A.; SACK, J.; KO, C. Y. A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. **Dis Colon Rectum**, v. 48, n. 6, p. 1161-1168, 2005.
- KAO, S. Y. DNA damage induces nuclear translocation of parkin. **J Biomed Sci**, v. 16, n. 1, p. 67, 2009.
- KASAP, M.; AKPINAR, G.; SAZCI, A.; IDRISOGLU H. A.; VAHABOGLU, H. Evidence for the presence of full-length PARK2 mRNA and Parkin protein in human blood. **Neurosci. Lett**, v. 460, p. 196-200, 2009.
- KAY, D. M.; STEVENS, C. F.; HAMZA, T. H.; MONTIMURRO, J. S.; ZABETIAN, C. P.; FACTOR, S. A.; SAMII, A.; GRIFFITH, A.; ROBERTS, J. W.; MOLHO, E. S.; HIGGINS, D. S.; GANCHER, S.; MOSES, L.; ZAREPARSI, S.; POORKAJ, P.; BIRD, T.; NUTT, J.; SCHELLENBERG, G. D.; PAYAMI, H. A comprehensive analysis of deletions, multiplications, and copy number variations in *PARK2*. **Neurology**, v. 75, n. 30, p. 1189-1194, 2010.
- KELEMEN, L. E.; KOBEL, M. Mucinous carcinomas of the ovary and colorectum: different organ, same dilemma. **Lancet Oncol**, v. 12, p. 1071–1080, 2011.
- KENNEDY, R. D.; BYLESJO, M.; KERR, P.; DAVISON, T.; BLACK, J. M.; KAY, E. W.; HOLT, R. J.; PROUTSKI, V.; AHDESMAKI, M.; FARZTDINOV, V.; GOFFARD, N.; HEY, P.; MCDYER, F.; MULLIGAN, K.; MUSSEN, J.; O'BRIEN, E.; OLIVER, G.; WALKER, S. M.; MULLIGAN, J. M.; WILSON, C.; WINTER, A.; O'DONOGHUE, D.; MULCAHY, H.; O'SULLIVAN, J.; SHEAHAN, K.; HYLAND, J.; DHIR, R.; BATHE, O. F.; WINQVIST, O.; MANNE, U.; SHANMUGAM, C.; RAMASWAMY, S.; LEON, E. J.; SMITH, J. R. W.; MCDERMOTT U, WILSON RH, LONGLEY D, MARSHALL J, CUMMINS R, SARGENT DJ, JOHNSTON PG, HARKIN DP. Development and independent validation of a prognostic assay for stage II colon cancer using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. **J Clin Oncol**, v. 29, p. 4620–4626, 2011.
- KIM, J. P.; KIM, S. C.; YANG, H. K. Prognostic significance of signet ring cell carcinoma of the stomach. **Surg Oncol**, v. 3, n. 4, p. 221-227, 1994.
- KITADA, T.; ASAKAWA, S.; HATTORI, N.; MATSUMINE, H.; YAMAMURA, Y.; MINOSHIMA, S.; YOKOCHI, M.; MIZUNO, Y.; SHIMIZU, N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature**. v. 392, n. 6676, p. 605-608, 1998.

- KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIEMI, A.; BÄRLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; TORHORST, J.; MIHATSCH, M. J.; SAUTER, G.; KALLIONIEMI, O. P. Tissue microarrays for high throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med**, v. 4, n. 7, p. 844-847, 1998.
- KURRASCH, D. M.; HUANG, J.; WILKIE, T. M.; REPA, J. J. Quantitative real-time PCR measurement of regulators of G-protein signaling (RGS) mRNA levels in mouse tissues. **Methods in Enzymol**, v. 389, p. 3–15, 2004.
- LANZA, G. JR.; MAESTRI, I.; BALLOTTA, M. R.; DUBINI, A.; CAVAZZINI, L. Relationship of nuclear DNA content to clinicopathologic features in colorectal cancer. **Mod Pathol**, v. 7, n. 2, p. 161-165, 1994.
- LEE, J. W.; SOUNG, Y. H.; KIM, S. Y.; LEE, J. Y.; YOO, N. J.; LEE, S. H. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. **Oncogene**, v. 24, n. 8, p. 1477-1480, 2005.
- LEE, J. K.; MCCOY, M. K.; HARMS, A. S.; RUHN, K. A.; GOLD, S. J.; TANSEY, M. G. Regulator of G-protein signaling 10 promotes dopaminergic neuron survival via regulation of the microglial inflammatory response. **J Neurosci**, v. 28, n. 34, p. 8517–8528, 2008.
- LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instability in colorectal cancers. **Nature**, v. 386, p. 623-627, 1997.
- LESLIE, A.; PRATT, N. R.; GILLESPIE, K.; SALES, M.; KERNOHAN, N. M.; SMITH, G.; WOLF, C. R.; CAREY, F. A.; STEELE, R. J. Mutations of APC, K-ras, and p53 are associated with specific chromosomal aberrations in colorectal adenocarcinomas. **Cancer Res**, v. 63, n. 15, p. 4656-61, 2003.
- LEVI, F.; RANDIMBISON, L.; LA VECCHIA, C. Trends in subsite distribution of colorectal cancers and polyps from the Vaud Cancer Registry. **Cancer**, v. 72, n. 1, p. 46–50, 1993.
- LEVINE AJ, OREN M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 10, p. 749-758, 2009.
- LIEBIG, C.; AYALA, G.; WILKS, J.; VERSTOVSEK, G.; LIU, H.; AGARWAL, N.; BERGER, D. H.; ALBO, D. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 31, p. 5131-51317, 2009.

- LIM, K. L.; CHEW, K. C. M.; TAN, J. M.; WANG, C.; CHUNG, K. K.; ZHANG, Y.; TABAKA, Y.; SMITH, W.; ENGELENDER, S.; ROSS, C. A.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Parkin Mediates Nonclassical , Proteasomal-Independent Ubiquitination of Synphilin-1 : Implications for Lewy Body Formation. **Journal Neurosc**, v. 25, n. 8, p. 2002-2009, 2005.
- LIM, K.; NG, X.; GRACE, L. G.; YAO, T. Mitochondrial Dynamics and Parkinson's Disease: Focus on Parkin. **Antioxid Redox Signal**, v. 16, n. 9, p. 935–949, 2012.
- LIN, O. S. Acquired risk factors for colorectal cancer. **Methods Mol Biol**, v. 472, p. 361–372, 2009.
- LITTLE, M. P.; VINEIS, P.; LI, G. A stochastic carcinogenesis model incorporating multiple types of genomic instability fitted to colon cancer data. **J Theor Biol**, v. 254, p. 229–38, 2008.
- LOPES, R. C.; SILVEIRA JR, S.; KOCH, K. S. Incidence of angiolymphatic invasion in colorectal cancer. **J. Coloproctol**, v. 32, n. 3, p. 240-245, 2012
- LÓPEZ, I. P.; OLIVEIRA, L.; TUCCI, P.; ALVAREZ-VALÍN, F. A.; COUDRY, R.; MARÍN, M. Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer. **Gene**, v.499, n. 1, p. 81-87, 2012.
- LUO, J.; EMANUELE, M. J.; LI, DANAN.; CREIGHTON, C. J.; SCHLABACH, M. R.; WESTBROOK, T. F.; WONG, K.; ELLEDGE S. J. A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene. **Cell**, v. 137, n. 5, p. 835-848, 2009.
- LYALL, M. S.; DUNDAS, S. R.; CURRAN, S.; MURRAY, G. I. Profiling markers of prognosis in colorectal cancer. **Clini Cancer Res**, v. 12, n. 4, p. 1184-1191, 2006.
- LYNCH, H. T.; SMYRK, T.; JASS, J. R. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer and colonic adenomas: aggressive adenomas? **Semin Surg Oncol**, v. 11, n. 6, p. 406-410, 1995.
- LYNCH, H. T.; LYNCH, J. F. Genetics of colonic cancer. **Digestion**, v. 59, n. 5, p. 481-492, 1998.
- LYNCH, H. T.; DE LA CHAPELLE, A. Hereditary colorectal cancer. **N Engl J Med**, v. 348, n. 10, p. 919-932, 2003.

- MALEY, C. C.; GALIPEAU, P. C.; FINLEY, J. C.; WONGSURAWAT, V. J.; LI, X.; SANCHEZ, C. A.; PAULSON, T. G.; BLOUNT, P. L.; RISQUES, R. A.; RABINOVITCH, P. S.; REID, B. J. Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma. **Nat Genet**, v. 38, n. 4, p. 468–473, 2006.
- MANNE, U.; SHANMUGAM, C.; KATKOORI, V. R.; BUMPERS, H. L.; GRIZZLE, W. E. Development and progression of colorectal neoplasia. **Cancer Biomark**, v. 9, n. 1-6, p. 235-265, 2010.
- MANZANILLO, P. S.; AYRES, J. S.; WATSON, R. O.; COLLINS, A. C.; SOUZA, G.; RAE, C. S.; SCHNEIDER, D. S.; NAKAMURA, K.; SHILOH, M. U.; COX, J. S. The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. **Nature**, v. 501, n. 7468, p. 512–516, 2013.
- MATSUBARA, J.; HONDA, K.; ONO, M.; SEKINE, S.; TANAKA, Y.; KOBAYASHI, M.; JUNG, G.; SAKUMA, T.; NAKAMORI, S.; SATA, N.; NAGAI, H.; IOKA, T.; OKUSAKA, T.; KOSUGE, T.; TSUCHIDA, A.; SHIMAHARA, M.; YASUNAMI, Y.; CHIBA, T.; YAMADA, T. Identification of adipophilin as a potential plasma biomarker for colorectal cancer using label-free quantitative mass spectrometry and protein microarray. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 20, n. 10, p. 2195-2203, 2011.
- MATSUDA, N.; SATO, S.; SHIBA, K.; OKATSU, K.; SAISHO, K.; GAUTIER, C. A.; SOU, Y. S.; SAIKI, S.; KAWAJIRI, S.; SATO, F.; KIMURA, M.; KOMATSU, M.; HATTORI, N.; TANAKA, K. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. **J. Cell Biol**, v. 189, n. 2, p. 211–221, 2010.
- MCLELLAND, G. L.; SOUBANNIER, V.; CHEN, C. X.; MCBRIDE, H. M.; FON, E. A. Parkin and PINK1 function in a vesicular pathway regulating mitochondrial quality control. **EMBO J**, v. 33, n. 4, p. 282–295, 2014.
- MEGUID, R. A.; SLIDELL, M. B.; WOLFGANG, C. L.; CHANG, D. C.; AHUJA, N. Is there a difference in survival between right- versus left-sided colon cancers? **Ann Surg Oncol**, n. 15, v. 9, p. 2388-2394, 2008.
- MEIJER, G. A.; BELIËN, J. A.; VAN DIEST, P. J.; BAAK, J. P. Origins of image analysis in clinical pathology. **J Clin Pathol**, v. 50, n. 5, p. 365-370, 1997.

- MEKENKAMP, L. J.; HEESTERBEEK, K. J.; KOOPMAN, M.; TOL, J.; TEERENSTRA, S.; VENDERBOSCH, S.; PUNT, C. J.; NAGTEGAAL, I. D. Mucinous adenocarcinomas: poor prognosis in metastatic colorectal cancer. **Eur J Cancer**, v. 48, n. 4, p. 501-509, 2012.
- MENDENHALL, W. M.; AMDUR, R. J.; HINERMAN, R. W.; WERNING, J. W.; MALYAPA, R. S.; VILLARET, D. B.; MENDENHALL, N. P. Skin cancer of the head and neck with perineural invasion. **Am J Clin Oncol**, v.30, n. 1, p. 93-96, 2007.
- MERKEL, S.; MANSMANN, U.; PAPADOPOULOS, T.; WITTEKIND, C.; HOHENBERGER, W.; HERMANEK, P. The prognostic inhomogeneity of colorectal carcinomas Stage III: a proposal for subdivision of Stage III. **Cancer**, v. 92, n. 11, p. 2754–2759, 2001a.
- MIRA, M. T.; ALCAIS, A.; NGUYEN, V. T.; MORAES, M. O.; DI FLUMERI, C.; VU, H. T.; MAI, C. P.; NGUYEN, T. H.; NGUYEN, N. B.; PHAM, X. K.; SARMO, E. N.; ALTER, A.; MONTPETIT, A.; MORAER, M. E.; MORAES, J. R.; DORÉ, C.; GALLANT, C. J.; LEPAGE, P.; VERNER, A.; VAN DE VOSSE, E.; HUDSON, T. J.; ABEL, L.; SCHURR E. Susceptibility to leprosy is associated with *PARK2* and *PACRG*. **Nature**, v. 427, n. 6975, p. 636-40, 2004.
- MIYAKI, M.; IJIMA, T.; KIMURA, J.; YASUNO, M.; MORI, T.; HAYASHI, Y.; KOIKE, M.; SHITARA, N.; IWAMA, T.; KUROKI, T. Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cancer Res**, v. 59, n. 18, p. 4506–4509, 1999.
- MORÁN, A.; ORTEGA, P.; DE JUAN, C.; FERNÁNDEZ-MARCELO, T.; FRÍAS, C.; SÁNCHEZ-PERNAUTE, A.; TORRES, A. J.; DÍAZ-RUBIO, E.; INIESTA, P.; BENITO, M. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. **World J Gastrointest Oncol**, v. 2, n. 3, p. 151-158, 2010.
- MORRIS, E. J.; MAUGHAN, N. J.; FORMAN, D.; QUIRKE, P. Who to treat with adjuvant therapy in Dukes B/stage II colorectal cancer? The need for high quality pathology. **Gut**, v. 56, n. 10, p. 1419-1425, 2007.
- MÜLLER-RISCHART, A. K.; PILSL, A.; BEAUDETTE, P.; PATRA, M.; HADIAN, K.; FUNKE, M.; PEIS, R.; DEINLEIN, A.; SCHWEIMER, C.; KUHN, P. H.; LICHTENTHALER, S. F.; MOTORI, E.; HRELIA, S.; WURST, W.; TRÜMBACH, D.; LANGER, T.; KRAPPMANN, D.; DITTMAR, G.; TATZELT, J.; WINKLHOFFER, K. F.

The E3 ligase parkin maintains mitochondrial integrity by increasing linear ubiquitination of NEMO. **Mol Cell**, v. 49, n. 5, p. 908-902, 2013.

MUNGALL, A. J.; PALMER, S. A.; SIMS, S. K.; EDWARDS, C. A.; ASHURST, J. L.; WILMING, L.; JONES, M. C.; HORTON, R.; HUNT, S. E.; SCOTT, C. E.; GILBERT, J. G. R.; CLAMP, M. E.; BETHEL, G.; MILNE, S.; AINSCOUGH, R.; ALMEIDA, J. P.; AMBROSE, K. D.; ANDREWS, T. D.; BECK, S. c. **Nature**, v. 425, n. 6960, p. 805-811, 2003.

MUTO, T.; BUSSEY, H. J.; MORSON, B. C. The evolution of cancer of the colon and rectum. **Cancer**, v. 36, n. 6, p. 2251–2270, 1975.

NAGENGAST, F. M.; GRUBBEN, M. J.; VAN MUNSTER, I. P. Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. **Eur J Cancer**, v. 31A, n. 7–8, p. 1067–1070, 1995.

NARENDRA, D.; TANAKA, A.; SUEN, D. F.; YOULE, R. J. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. **J Cell Biol**, v. 183, n. 5, p. 795-803, 2008.

NIBBE, R. K.; CHANCE, M. R. Approaches to biomarkers in human colorectal cancer: looking back, to go forward. **Biomark Med**, v. 3, n. 4, p. 385-396, 2009.

NITSCHKE, U.; ZIMMERMANN, A.; SPÄTH, C.; MÜLLER T.; MAAK, M.; SCHUSTER, T.; SLOTTA-HUSPENINA, J.; KÄSER, S. A.; MICHALSKI, C. W.; JANSSEN, K. P.; FRIESS, H.; ROSENBERG, R.; BADER, F. G. Mucinous and signet-ring cell colorectal cancers differ from classical adenocarcinomas in tumor biology and prognosis. **Ann Surg**, v. 258, p. 775-782, 2013.

NORMANNO, N.; LUCA, A. DE; BIANCO, C.; STRIZZI, L.; MANCINO, M.; MAIELLO, M. R.; CAROTENUTO, A.; FEO, G.; CAPONIGRO, F.; SALOMON, D. S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. **Gene**, v. 366, n. 1, p. 2-16, 2006.

NYIRANEZA, C.; JOURET-MOURIN, A.; KARTHEUSER, A.; CAMBY, P.; PLOMTEUX, O.; DETRY, R.; DAHAN, K.; SEMPOUX, C. Distinctive patterns of p53 protein expression and microsatellite instability in human colorectal cancer. **Hum Pathol**, v. 42, n. 12, v. 1897-1910, 2011.

OBRAND, D. I.; GORDON, P. H. Continued change in the distribution of colorectal carcinoma. **Br J Surg**, v. 85, n. 2, p. 246–248, 1998.

- OKADA, Y.; EIBL, G.; GUHA, S.; DUFFY, J. P.; REBER, H. A.; HINES, O. J. Nerve growth factor stimulates MMP-2 expression and activity and increases invasion by human pancreatic cancer cells. **Clin Exp Metastasis**, v. 21, n. 4, p. 285-292, 2004.
- OKATSU, K.; KOYANO, F.; KIMURA, M.; KOSAKO, H.; SAEKI, Y.; TANAKA, K.; MATSUDA, N. Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor. **J Cell Biol**, v. 209, n. 111–128, 2015.
- OLIVEIRA, S. A.; SCOTT, W. K.; MARTIN, E. R.; NANCE, M. A.; WATTS, R. L.; HUBBLE, J. P.; KOLLER, W. C.; PAHWA, R.; STERN, M. B.; HINER, B. C.; ONDO, W. G.; ALLEN, F. H. JR.; SCOTT, B. L.; GOETZ, C. G.; SMALL, G. W.; MASTAGLIA, F.; STAJICH, J. M.; ZHANG, F.; VANCE, J. M. Parkin mutations and susceptibility alleles in late-onset Parkinson's disease. **Ann. Neurol**, v. 53, n. 5, p. 624-629, 2003.
- PAI, R. K.; SHADRACH, B. L.; CARVER, P.; HEALD, B.; MOLINE, J.; CHURCH, J.; KALADY, M. F.; BURKE, C. A.; PLESEC, T. P.; LAI, K. K.; GONZALO, D. H.; PAI, R. K. Immunohistochemistry for annexin A10 can distinguish sporadic from Lynch syndrome-associated microsatellite-unstable colorectal carcinoma. **Am J Surg Pathol**, v. 38, n. 4, p. 518-25, 2014.
- PALUMBO, E.; MATRICARDI, L.; TOSONI, E.; BENSIMON, A.; RUSSO, A. Replication dynamics at common fragile site FRA6E. **Chromosoma**, v. 119, n. 6, p. 575–87, 2010.
- PAPADOPOULOS, N.; NICOLAIDES, N. C.; WEI, Y.-F.; RUBEN, S. M.; CARTER, K. C.; ROSEN, C. A.; HASELTINE, W. A.; FLEISCHMANN, R. D.; FRASER, C. M.; ADAMS, M. D.; VENTER, J. C.; HAMILTON, S. R.; PETERSEN, G. M.; WATSON, P.; LYNCH, H. T.; PELTOMAKI, P.; MECKLIN, J.-P.; DE LA CHAPELLE, A.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. **Science**, v. 263, n. 5153, p. 1625-1629, 1994.
- PARK, SUNG-SUK; PARK, SUNG-KYU; LIM, J.; CHOI, Y. H.; KIM, W.; MOON, S. Esculetin inhibits cell proliferation through the Ras/ERK1/2 pathway in human colon cancer cells. **Oncol Rep.**, v. 25, n. 1, p. 223-230, 2011.
- PICCHIO, M. C.; MARTIN, ERIC SANTOS; CESARI, R.; CALIN, G. A.; YENDAMURI, S.; KUROKI, T.; PENTIMALLI, F.; SARTI, M.; YODER, K.; KAISER, L. R.; FISHEL, R.; CROCE, C. M. Alterations of the Tumor Suppressor Gene Parkin in Non-Small Cell Lung Cancer. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 8, p. 2720-2724, 2004.

- PINO, M. S.; CHUNG, D. C. The chromosomal instability pathway in colon cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2059-2072, 2010.
- POLAK, J. M.; VAN NOORDEN. **Introduction to Immunocytochemistry**. 2nd ed. 1997.
- POULOGIANNIS, G.; MCINTYRE, R. E.; DIMITRIADI, M.; APPS, J. R.; WILSON, C. H.; ICHIMMURA, K.; LUO, F.; CANTLEY, L. C.; WYLLIE, A. H.; ADAMS, D. J.; ARENDS, M. J. *PARK2* deletions occur frequently in sporadic colorectal cancer and accelerate adenoma development in APC mutant mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 34, p. 15145-15150, 2010.
- PROTEIN ATLAS. Parkin: protein expression overview. PROTEIN ATLAS. 2016. Disponível em: <<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000185345-PARK2/tissue>> Acesso em: 09 mai. 2016.
- RAIA, A. A; HABR-GAMA, A. Tumores Malignos do Cólon. **Clínica Cirúrgica Alípio Corrêa Neto**, p. 581-599, 1994.
- REEVES, H. L.; NARLA, G.; OGUNBIYI, O.; HAQ, A. I.; KATZ, A.; BENZENO, S.; HOD, E.; HARPAZ, N.; GOLDBERG, S.; KREMER, S. T. A. L.; ENG, F. J.; ARTHUR, M. J. P.; MARTIGNETTI, J. A.; FRIEDMAN, S. L. Kruppel-Like Factor 6 (KLF6) Is a Tumor-Suppressor Gene Frequently Inactivated in Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, v. 126, n. 4, p. 1090-1103, 2004.
- RIBIC, C. M.; SARGENT, D. J.; MOORE, M. J.; THIBODEAU, S. N.; FRENCH, A. J.; GOLDBERG, R. M.; HAMILTON, S. R.; LAURENT-PUIG, P.; GRYFE, R.; SHEPHERD, L. E.; TU, D.; REDSTON, M.; GALLINGER, S. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil- based adjuvant chemotherapy for colon cancer. **N Engl J Med**, v. 349, n. 3, p. 247–257, 2003.
- ROTHFUSS, O.; FISCHER, H.; HASEGAWA, T.; MAISEL, M.; LEITNER, P.; MIESEL, F.; SHARMA, M.; BORNEMANN, A.; BERG, D.; GASSER, T.; PATENGE, N. Parkin protects mitochondrial genome integrity and supports mitochondrial DNA repair. **Hum Mol Genet**, v. 18, n.20, p. 3832–3850, 2009.
- RYAN, R.; GIBBONS, D.; HYLAND, J. M.; TREANOR, D.; WHITE, A.; MULCAHY, H. E.; O'DONOGHUE, D. P.; MORIARTY, M.; FENNELLY, D.; SHEAHAN K. Pathological response following long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. **Histopathology**, v. 47, n. 2, p. 141-146, 2005.

- SAKATA, E.; YAMAGUCHI, Y.; KURIMOTO, E.; KIKUCHI, J.; YOKOYAMA, S.; YAMADA, S.; KAWAHARA, H.; YOKOSAWA, H.; HATTORI, N.; MIZUNO, Y.; TANAKA, K.; KATO, K. Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain. **Embo Rep**, v. 4, n. 3, p. 301-306, 2003.
- SALOMON, D. S.; BRANDTA, R.; CIARDIELLOB, F.; NORMANNOC, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 19, n. 3, p. 183-232, 1995.
- SAMOWITZ, W. S.; POWERS, M. D.; SPIRIO, L. N.; NOLLET, F.; VAN ROY, F.; SLATTERY, M. L. Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas. **Cancer Res**, v. 59, n. 7, p. 1442–1444, 1999.
- SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J Cell Physiol**, v. 182, n. 3, p. 311–322, 2000.
- SCHRAMML, P.; BUCHER, C.; BISSIG, H.; NOCITO, A.; HAAS, P.; WILBER, K.; SEELIG, S.; KONONEN, J.; MIHATSCH, M. J.; DIRNHOFER, S.; SAUTER, G. Cyclin E overexpression and amplification in human tumours. **J Pathol**, v. 200, n. 3, p. 375-382, 2003.
- SEHGAL, R.; SHEAHAN, K.; O'CONNELL, P. R.; HANLY, A. M.; MARTIN, S. T.; WINTER, D. C. Lynch syndrome: an updated review. **Genes (Basel)**, v. 5, n. 3, p. 497-50 2014.
- SEIRAFI, M.; KOZLOV, G.; GEHRING, K. Parkin structure and function. **FEBS J**, v. 282, n. 11, p. 2076-2088, 2015.
- SHIMURA, H.; HATTORI, N.; KUBO, S. I.; MIZUNO, Y.; ASAKAWA, S.; MINOSHIMA, S.; SHIMIZU, N.; IWAI, K.; CHIBA, T.; TANAKA, K.; SUZUKI, T.; Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase **Nat Genet**, v. 25, n. 3, p. 302-305, 2000.
- SHIMURA, H.; HATTORI, N.; FROSCH, M. P.; MIZUNO, Y.; KOSIK, K. S.; SELKOE, D. J. Ubiquitination of a New Form of α -Synuclein by Parkin from Human Brain: Implications for Parkinson ' s Disease. **Science**, v. 293, n. 5528, p. 263 - 269, 2001.
- SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA Cancer J Clin**, v. 63, p. 11-30, 2013.

- SIENA, S.; SARTORE-BIANCHI, A.; DI NICOLANTONIO, F.; BALFOUR, J.; BARDELLI, A. Biomarkers Predicting Clinical Outcome of Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 101, n. 19, p. 1308-1324, 2009.
- SILVA, S. I. ; SWERDLOW A. J. Sex differences in time trends of colorectal cancer in England and Wales: the possible effect of female hormonal factors. **British Journal of Cancer**, v. 73, n. 5, p. 692-697, 1996.
- SMITH, D. I.; ZHU, Y.; MCAVOY, S.; KUHN, R. Common fragile sites, extremely large genes, neural development and cancer. **Cancer Lett**, v. 232, n. 1, p. 48–57, 2006.
- SOUBANNIER, V.; MCLELLAND, G. L.; ZUNINO, R.; BRASCHI, E.; RIPPSTEIN, P.; FON, E. A.; MCBRIDE, H. M. A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes. *Curr Biol*, v. 22, n. 2, p. 135-141, 2012.
- STAROPOLI, J. F.; MCDERMOTT, C.; SCHULMAN, B.; DEMIREVA, E.; ABELIOVICH, A. Parkin Is a Component of an SCF-like Ubiquitin Ligase Complex and Protects Postmitotic Neurons from Kainate Excitotoxicity. **Neuron**, v. 37, n. 5, p. 735-749, 2003.
- STORM, H. H.; MANDERS, T.; FRIIS, S.; BANG, S. **Cancer incidence in Denmark 1988. Danish Cancer Registry**, Copenhagen: Danish Cancer Society, p. 1-87, 1991.
- STOWER, M. J.; HARDCASTLE, J. D. The results of 1115 patients with colorectal cancer treated over an 8-year period in a single hospital. **Eur J Surg Oncol**. v. 11, n. 2, p. 119-123, 1985.
- SUEN, D.; NARENDRA, D. P.; TANAKA, A.; MANFREDI, G.; YOULE, R. J. Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 26, p. 11835-11840, 2010.
- SUN, X.; LIU, M.; HAO, J.; LI, D.; LUO, Y.; WANG, X.; YANG, Y.; LI, F.; SHUI, W.; CHEN, Q.; ZHOU, J. Parkin deficiency contributes to pancreatic tumorigenesis by inducing spindle multipolarity and misorientation. **Cell cycle**, v. 12, n. 7, p. 1133-1141, 2013.
- SUTTER, T. Overexpression of cyclin E protein is closely related to the mutator phenotype of colorectal carcinoma. **Int J Colorectal Dis**, v. 17, n. 6, p. 374-380, 2002.
- TAKAYAMA, T.; KATSUKI, S.; TAKAHASHI, Y.; OHI, M.; NOJIRI, S.; SAKAMAKI, S.; KATO, J.; KOGAWA, K.; MIYAKE, H.; NIITSU, Y. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. **N Engl J Med**, v. 339, n. 18, p. 1277-1284, 1998.

- TAKAYAMA, T.; MIYANISHI, K.; HAYASHI, T.; SATO, Y.; NIITSU, Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. **J Gastroenterol**, v. 41, n. 3, p. 185-192, 2006.
- TAY, S. P.; YEO, C. W.; CHAI, C.; CHUA, P. J.; TAN, H. M.; ANG, A. X.; YIP, D. L.; SUNG, J. X.; TAN, P. H.; BAY, B. H.; WONG, S. H.; TANG, C.; TAN, J. M.; LIM, K. L. Parkin enhances the expression of cyclin-dependent kinase 6 and negatively regulates the proliferation of breast cancer cells. **J Biol Chem**, v. 285, n. 38, p. 29231–29238, 2010.
- TORHORST, J.; BUCHER, C.; KONONEN, J.; HAAS, P.; ZUBER, M.; KOCHLI, O. R.; MROSS, F.; DIETERICH, H.; MOCH, H.; MIHATSCH, M.; KALLIONIEMI, O. P.; SAUTER, G. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. **Am J Pathol**, v. 159, n. 6, p. 2249-2256, 2001.
- TRAN, T. A.; NGUYEN, A. D.; CHANG, J.; GOLDBERG, M. S.; LEE, J.; TANSEY, M. G. Lipopolysaccharide and Tumor Necrosis Factor Regulate Parkin Expression via Nuclear Factor-Kappa B. **PLoS One**, n. 6, V. 8, p. e23660, 2011.
- UMAR, A.; BOLAND, C. R.; TERDIMAN, J. P.; SYNGAL, S.; DE LA CHAPELLE, A.; RÜSCHOFF, J.; FISHEL, R.; LINDOR, N. M.; BURGART, L. J.; HAMELIN, R.; HAMILTON, S. R.; HIATT R. A.; JASS, J.; LINDBLOM, A.; LYNCH, H. T.; PELTOMAKI, P.; RAMSEY S. D.; RODRIGUEZ-BIGAS, M. A.; VASEN, H. F. A.; HAWK E. T.; BARRETT J. C.; FREEDMAN, A. N.; SRIVASTAVA S. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. **J. Natl. Cancer Inst**, v. 96, n. 4, p. 261–268, 2004.
- USSAKLI, C. H.; EBAEE, A.; BINKLEY, J.; BRETNALL, T. A.; EMOND, M. J.; RABINOVITCH, P. S.; RISQUES, R. A. Mitochondria and tumor progression in ulcerative colitis. **J Natl Cancer Inst**, v. 105, p. 1239-1248, 2013.
- VAN DEN EYNDEN, G. G.; VAN DER AUWERA, I.; VAN LAERE, S.; COLPAERT, C. G.; VAN DAM, P.; MERAJVER, S.; KLEER, C. G.; HARRIS, A. L.; VAN MARCK, E. A.; DIRIX, L. Y.; VERMEULEN, P. B. Validation of a tissue microarray to study differential protein expression in inflammatory and non-inflammatory breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 85, n. 1, p. 13-22, 2004.

- VASEN, H. F.; MECKLIN, J. P.; KHAN, P. M.; LYNCH, H. T. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). **Dis Colon Rectum**, v. 34, n. 5, p. 424-425, 1991.
- VEERIAH, S.; TAYLOR, B. S.; VIVANCO, I.; SANDER, C. Somatic mutations of the Parkinson's disease-associated gene *PARK2* in glioblastoma and other human malignancies. **Nat Genet**, v. 42, n. 1, p. 77-82, 2010.
- VENKATESWARAN, A.; REPA, J. J.; LOBACCARO, J. M.; BRONSON, A.; MANGELSDORF, D. J.; EDWARDS, P. A.; Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. **J Biol Chem**, v. 275, n. 19, p. 14700–14707, 2000.
- VERHULST, J.; FERDINANDE, L.; DEMETTER, P.; CEELI, W. Mucinous subtype as prognostic factor in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **J Clin Pathol**, v. 65, n. 5, p. 381-388, 2012.
- VINCOW, E. S.; MERRIHEW, G.; THOMAS, R. E.; SHULMAN, N. J.; BEYER, R. P.; MACCOSS, M. J.; PALLANCK, L. J. The PINK1-Parkin pathway promotes both mitophagy and selective respiratory chain turnover in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 16, p. 6400-6405, 2013.
- VIVES-BAUZA, C.; ZHOU, C.; HUANG, Y.; CUI, M.; VRIES, R. L. A.; KIM, J.; MAY, J. *PINK1*-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 1, p. 378-383, 2010.
- VOGELSTEIN, B.; FEARON, E. R.; HAMILTON, S. R.; KERN, S. E.; PREISINGER, A. C.; LEPPERT, M.; NAKAMURA, Y.; WHITE, R.; SMITS, A. M.; BOS, J. L. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **N Engl J Med**, v. 319, n. 9, p. 525–532, 1988.
- XU, L.; LIN, D.; YIN, D.; KOEFFLER, H. P. An emerging role of *PARK2* in cancer. **J Mol Med (Berl)**, v. 92, n. 1, p. 31-42, 2014.
- WALTHER, A.; HOULSTON, R.; TOMLINSON, I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. **Gut**, v. 57, n. 7, p. 941–50, 2008.

- WALTHER, A.; JOHNSTONE, E.; SWANTON, C.; MIDGLEY, R.; TOMLINSON, I.; KERR, D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 7 p. 489-499, 2009
- WANG, L.; CUNNINGHAM, J. M.; WINTERS, J. L.; GUENTHER, J. C.; FRENCH, A. J.; BOARDMAN, L. A.; BURGART, L. J.; MCDONNELL, S. K.; SCHAID, D. J.; THIBODEAU, S. N. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. **Cancer Res**, v. 63, n. 17, p. 5209–5212, 2003.
- WANG, F.; DENISON, S.; LAI, J. P.; PHILIPS, L. A.; MONTOYA, D.; KOCK, N.; SCHÜLE, B.; KLEIN, C.; SHRIDHAR, V.; ROBERTS, L. R.; SMITH, D. I. Parkin gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, v. 40, n. 2, p. 85–96, 2004.
- WANG, J.; WANG, X.; LIN, S.; CHEN, C.; WANG, C.; MA, Q.; JIANG, B. Identification of kininogen-1 as a serum biomarker for the early detection of advanced colorectal adenoma and colorectal cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e70519, 2013.
- WANG, Q. X.; ZHU, Y. Q.; ZHANG, H.; XIAO, J. Altered MiRNA expression in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cell Physiol Biochem*, v. 35, n. 3, p. 933-944, 2015.
- WEISS, J. M.; PFAU, P. R.; O'CONNOR, E. S.; KING, J.; LOCONTE, N.; KENNEDY, G.; SMITH, M. A. Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results-Medicare data. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 33, p. 4401-4409, 2011.
- WEISENBERGER, D. J.; SIEGMUND, K. D.; CAMPAN, M.; YOUNG, J.; LONG, T. I.; FAASSE, M. A.; KANG, G. H.; WIDSCHWENDTER, M.; WEENER, D.; BUCHANAN, D.; KOH, H.; SIMMS, L.; BARKER, M.; LEGGETT, B.; LEVINE, J.; KIM, M.; FRENCH, A. J.; THIBODEAU, S. N.; JASS, J.; HAILE, R.; LAIRD, P. W. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. **Nat Genet**, v. 38, n. 7, p. 787–93, 2006.
- WELIN, S.; YOUKER, J.; SPRATT, J. S. J. The rates and patterns of growth of 375 tumors of the large intestine and rectum observed serially by double contrast enema study (Malmoe technique). **Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med**, v. 90, p. 673–687, 1963.

- WEST, A. B.; MAIDMENT, N. T. Genetics of parkin-linked disease. **Hum Genet**, v. 114, n. 4, p. 327–336, 2004.
- WIJKERSLOOTH, T. R.; BOSSUYT, P. M.; DEKKER, E. Strategies in screening for colon carcinoma. **Neth J Med**, v. 69, n. 5, p. 112-119, 2011.
- WITTE, M. E.; BOL, J. G.; GERRITSEN, W. H.; VAN DER VALK, P.; DRUKARCH, B.; VAN HORSEN, J.; WILHELMUS, M. M. Parkinson's disease-associated parkin colocalizes with Alzheimer's disease and multiple sclerosis brain lesions. **Neurobiol Dis**, v. 36, n. 3, p. 445-452, 2009.
- WONGSEREE, W.; ASSAWAMAKIN, A.; PIROONRATANA, T.; SINSOM-ROS, S.; LIMWONGSE, C.; CHAIYARATANA, N. Detecting purely epistatic multi-locus interactions by an omnibus permutation test on ensembles of two-locus analyses. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 294. doi: 10.1186/1471-2105-10-294. 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> Acesso em: 13 ago. 2015.
- YANG, X.; JIA, X.; CORVALAN, J. R. F.; WANG, P.; DAVIS, C. G.; JAKOBOVITS, A. Eradication of Established Tumors by a Fully Human Monoclonal Antibody to the Epidermal Growth Factor Receptor without Concomitant chemotherapy. **Cancer Res.**, v. 59, n. 6, p. 1236-1243, 1999.
- YANG, F.; JIANG, Q.; ZHAO, J.; REN, Y.; SUTTON, M. D.; FENG, J. Parkin stabilizes microtubules through strong binding mediated by three independent domains. **J Biol Chem**, v. 280, n. 17, p. 17154–17162, 2005.
- YANG, M.; ZHAO, H.; GUO, L.; ZHANG, Q.; ZHAO, L.; BAI, S.; ZHANG, M.; XU, S.; WANG, F.; WANG, X.; ZHAO, B. Autophagy-based survival prognosis in human colorectal carcinoma. **Oncotarget**, v. 6, n. 9, p. 7084-7103, 2015.
- YANG, X.; COULOMBE-HUNTINGTON, J.; KANG, S.; SHEYNKMAN, G. M.; HAO, T.; RICHARDSON, A.; SUN, S.; YANG, F.; SHEN, Y. A.; MURRAY, R.; SPIROHN, K.; BEGG, B. E.; DURAN-FRIGOLA, M.; MACWILLIAMS, A.; PEVZNER, S. J.; ZHONG, Q.; TRIGG, S. A.; TAM, S.; VIDAL, M. Widespread expansion of protein interaction capabilities by alternative splicing. **Cell**, v. 164, n. 4, p. 805-817, 2016.

- YASUI, W.; SUMIYOSHI, H.; HATA, J. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in Human Gastric and Colonic Carcinomas. **Cancer Res**, v. 48, n. 1, p. 137-141, 1988.
- YEO, C. W. S.; NG, F. S. L.; CHAI, C.; TAN, J. M. M.; KOH, G. R. H.; CHONG, Y. K.; KOH, L. W. H.; FOONG, C. S. F.; SANDANARAJ, E.; HOLBROOK, J. D.; ANG, B.; TAKAHASHI, R.; TANG, C.; LIM, K. Parkin pathway activation mitigates glioma cell proliferation and predicts patient survival. **Cancer Res**, v. 72, n. 10, p. 2543-2553, 2012.
- ZANSEN, S.; SCHON, E. A. Mitochondrial DNA Mutations in Cancer. **PLoS Med**, v. 2, n. 11, p. 1082-1084, 2005.
- ZIRBES, T. K.; BALDUS, S.E.; MOENIG, S. P.; NOLDEN, S.; KUNZE, D.; SHAFIZADEH, S. T.; SCHNEIDER PM, THIELE J, HOELSCHER AH, DIENES HP. Prognostic impact of p21/waf1/cip1 in colorectal cancer. **Int J Cancer**, v. 89, n. 1, p. 14-18, 2000.
- ZITVOGEL, L.; CASARES, H.; PEQUIGNOT, M.; ALBET, M. L.; KROMER, G. The immune response against dying tumor cells. **Adv Immunol**, v. 84, p. 131-179, 2004.
- ZHANG, C.; LIN, M.; WU, R.; WANG, X.; YANG, B.; LEVINE, A. J.; HU, W.; FENG, Z. Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, v. 108, n. 39, p. 16259–16264, 2011.
- ZHAO, J.; REN, Y.; JIANG, Q.; FENG, J. Parkin is recruited to the centrosome in response to inhibition of proteasomes. **J Cell Sci**, v. 116, n. 17, p. 4011–4019, 2003.