



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

**ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DE PARQUINA, APC E KI67
EM PÓLIPOS E ADENOCARCINOMAS COLORRETAIS**

WILLIAM AUGUSTO CASTELEINS CECILIO

CURITIBA

2017

WILLIAM AUGUSTO CASTELEINS CECILIO

**ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DE PARQUINA, APC E KI67
EM PÓLIPOS E ADENOCARCINOMAS COLORRETAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Escola de Medicina, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa S. Sotomaior
Coorientadora: Profa. Dra. Lúcia de Noronha

CURITIBA

2017

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

Cecilio, William Augusto Casteleins
C388a Análise comparativa da expressão de parquinha, APC e KI67 em pólipos
2017 e adenocarcinomas colorretais / William Augusto Casteleins Cecilio ;
orientadora: Vanessa S. Sotomaior ; coorientadora: Lúcia de Noronha. – 2017.
82 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2017
Bibliografia: f. 54-82

1. Cólon (Anatomia) – Câncer. 2. Reto – Câncer. 3. Adenocarcinoma.
4. Carcinogênese. I. Sotomaior, Vanessa S. II. Noronha, Lúcia de. III. Pontifícia
Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde. IV. Título.

CDD 20. ed. – 616.994347

RESUMO

O carcinoma colorretal tem elevada incidência e prevalência mundial, permanecendo a 3^a. causa de morte por câncer no Brasil. A ampliação de programas de rastreamento populacional combinada à evolução das ferramentas de biologia molecular, com aplicação direta em terapias farmacológicas, acessíveis na prática clínica, elevaram as taxas de sucesso no tratamento desta neoplasia. Com base nos conhecimentos da sequência evolutiva adenoma-adenocarcinoma, objetivamos analisar comparativamente a imunexpressão do gene supressor tumoral *PARK2* (e sua proteína PARQUINA) em relação aos bem estabelecidos *APC* e *KI67*, em amostra de pólipos e adenocarcinomas colorretais. Foram incluídos pólipos com características neoplásicas, classificados em adenomas com displasia de baixo grau, com displasia de alto grau, sésseis serrilhados, além dos pólipos hiperplásicos. Através de técnica de microarranjos teciduais, analisamos por imunistoquímica 284 pólipos de 222 pacientes, além de 73 amostras de pacientes portadores de adenocarcinomas. Devido ao fato de que mais da metade dos pacientes tiveram mais de um pólipo incluído no estudo, vimos a necessidade de elaborar um modelo estatístico de regressão linear multinível, para análise hierárquica destes pólipos, em relação ao grupo de pacientes, evitando possível viés de interpretação. Não houve correlação entre variáveis relacionadas aos pacientes (sexo, idade e multiplicidade de pólipos) e expressão tecidual das proteínas analisadas. A análise do efeito conjunto de pólipos e adenocarcinomas, pelo grau de diferenciação, considerados no contexto da estrutura hierárquica multinível, revelou maior expressão de PARQUINA e APC em adenocarcinomas, ao passo que a expressão de KI67 foi maior nos pólipos com displasia de alto grau. Tais resultados encontram suporte na literatura, na medida em que trabalhos de outros autores demonstraram que PARQUINA e APC atuam sinergicamente sobre o tecido colorretal. Porém, não há estudos anteriores que demonstram valores mais elevados de expressão destas proteínas, produtos de genes supressores tumorais, em adenocarcinomas em comparação com pólipos neoplásicos, como vimos aqui. Este achado nos leva a supor que tais proteínas estariam envolvidas em mecanismos de controle da progressão tumoral em fases tardias da via de carcinogênese. Este é um fato notável, considerando que a via clássica da carcinogênese colorretal se inicia pela mutação de *APC*.

ABSTRACT

Colorectal carcinoma remains the 3rd most common cause of cancer in Brazil. The wide spread of screening programs combined with the evolution of molecular biology, applied on the clinical practice, have raised the success rates in the treatment of this neoplasia. Based on the current knowledge of the sequence adenoma-adenocarcinoma, we aimed to analyze comparatively the immune-expression of the tumor suppressor gene *PARK2* (and its protein, Parkin) with *APC* and *KI67*, in samples of colorectal polyps and adenocarcinomas. We included neoplastic polyps, classified as low dysplasia adenoma, high dysplasia adenoma, sessile serrated polyps, and hyperplastic polyps. Through techniques of tissue microarray, we reviewed by immunohistochemistry, 284 polyps from 222 patients, besides 73 colorectal samples of adenocarcinoma. Due to the fact that more than half of the patients with polyps were found to have more than one lesion, we decided to elaborate a multilevel linear regression statistical model, in order to avoid interpretation bias. There was no significant difference on variables related to patient (sex, age, multiplicity of polyps) and the tissue expression of the proteins. The analysis of the combined effect of polyps and adenocarcinomas, by the level of differentiation, considered in the context of the hierarchical multilevel structure, has shown higher expression of Parkin and APC in the sample of adenocarcinomas, whereas the expression of KI67 was higher in the group of high dysplasia polyps. Such findings have similarities in literature, many authors support that Parkin and APC act on synergism over the colorectal tissue. Although, there are no studies showing overexpression of such proteins in adenocarcinomas, compared to neoplastic polyps, as we have seen here. This findings point out that Parkin and APC might be involved in later mechanisms of tumor progression control, in the pathway of carcinogenesis. It is such a remarkable fact, considering that the classical pathway starts with the mutation of *APC*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Localização citogenética do gene <i>PARK2</i>	19
Figura 2	Genes e vias dos fatores de crescimento que dirigem a progressão do carcinoma colorretal, conforme o modelo de Vogelstein e colaboradores	22
Figura 3	Montagem do TMA	28
Figura 4	Exemplos de modelo de bloco e lâmina de TMA	28
Figura 5	Análise morfológica das amostras	31
Gráfico 1	Análise multinível do efeito conjunto de pólipos/adenocarcinoma e grau de diferenciação sobre a expressão de PARQUINA	45
Gráfico 2	Análise multinível do efeito conjunto de pólipos/adenocarcinoma e grau de diferenciação sobre a expressão de APC	45
Gráfico 3	Análise multinível do efeito conjunto de pólipos/adenocarcinoma e grau de diferenciação sobre a expressão de KI67	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Definições para T, N e M	8
Tabela 2 -	Estadiamento para o adenocarcinoma colorretal pelo sistema TNM, Dukes e Aster-Coller Modificado (MAC)	9
Tabela 3 -	Análise descritiva dos pacientes portadores de pólipos e adenocarcinomas	34
Tabela 4 -	Análise descritiva dos pólipos	35
Tabela 5 -	Imunoexpressão das proteínas analisadas para os pólipos .	36
Tabela 6 -	Correlação entre PARQUINA e outros marcadores	36
Tabela 7 -	Análise da imunoexpressão de PARQUINA e APC entre os pacientes portadores de pólipos, quanto às variáveis sexo, idade e multiplicidade de pólipos	37
Tabela 8 -	Análise da imunoexpressão de PARQUINA e APC no grupo de pólipos, em relação às variáveis de lateralidade, tamanho, aspecto, grau de diferenciação e histologia	38
Tabela 9 -	Comparações entre os grupos de classificação histológica entre si, analisados dois a dois, em relação à imunoexpressão de PARQUINA	38
Tabela 10 -	Avaliação da associação entre variáveis relativas ao pólipo e variáveis relativas ao paciente considerando uma estrutura hierárquica para a imunoexpressão da PARQUINA ..	40
Tabela 11 -	Avaliação da associação entre variáveis relativas ao pólipo e variáveis relativas ao paciente considerando uma estrutura hierárquica para a imunoexpressão de APC	41
Tabela 12 -	Valores da imunoexpressão de PARQUINA, APC e Ki67, para os pólipos e os adenocarcinomas	42
Tabela 13 -	Subgrupos, definidos pelo grau de diferenciação dos pólipos e adenocarcinomas, considerando os pólipos como independentes dentro de um mesmo paciente	43
Tabela 14 -	Expressão das proteínas estudadas para os subgrupos, definidos pelo grau de diferenciação dos pólipos e	43

	adenocarcinomas, comparados dois a dois	
Tabela 15 -	Análise do efeito conjunto de pólipos/adenocarcinoma e grau de diferenciação sobre a expressão de PARQUINA, APC e KI67, considerando a estrutura hierárquica multinível	44

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	–	ácido acetilsalicílico
aCGH	–	<i>array comparative genomic hybridization</i>
AJCC	–	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AMER1	–	<i>APC Membrane Recruitment protein 1</i>
ANOVA	–	<i>analysis of variance</i>
APC	–	<i>adenomatous polyposis coli</i>
ARID1A	–	<i>AT-rich interaction domain 1A</i>
BRAF	–	<i>serine/threonine-protein kinase B-Raf</i>
CCR	–	carcinoma colorretal
CIMP	–	<i>CpG island methylator phenotype</i>
CIN	–	<i>chromosomal instability</i>
CMS	–	<i>Consensus Molecular Subtypes</i>
C-MYC	–	<i>MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor</i>
COX-2	–	<i>cyclooxygenase 2</i>
CpG	–	<i>5'-C (cytosine) – phosphate - G (guanine) - 3' direction</i>
DAB	–	<i>3,3'-diaminobenzine</i>
DDC	–	<i>deleted in colon cancer</i>
DNA	–	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EGFR	–	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ESMO	–	<i>European society form medical oncology</i>
EUA	–	Estados Unidos da América
FAM123B	–	<i>family with sequence similarity 123B</i>
FAP	–	<i>familial adenomatous polyposis</i>
FRA6E	–	<i>fragile site, aphidicolin type, common, fra(6)(q26)</i>
GDP	–	<i>guanosine diphosphate</i>
GTP	–	<i>guanosine-5'-triphosphate</i>
H ₂ O ₂	–	peróxido de hidrogênio
HDA	–	<i>high dysplasia adenoma</i>
HE	–	hematoxilina-eosina
HER	–	<i>Human Epidermal Growth Fator Receptor</i>
HNPCC	–	<i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>
H-RAS	–	<i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>

IC 95%	–	intervalo de confiança de 95%
ICC	–	coeficiente de correlação intraclasse
<i>IGF2</i>	–	<i>insulin-like growth fator 2</i>
IHQ	–	imunoistoquímica
INCA	–	Instituto Nacional do Câncer
KI67	–	marcador de proliferação celular (proteína)
<i>K-RAS</i>	–	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LDA	–	<i>low dysplasia adenoma</i>
MAC	–	<i>Modified Aster-Coller classification</i>
<i>MAPK</i>	–	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
<i>MEK</i>	–	<i>MAPK/ERK kinase</i>
<i>MKI67</i>	–	<i>marker of proliferation Ki-67 (KI67)</i>
<i>MLH1</i>	–	<i>mutL homolog 1</i>
<i>MLH3</i>	–	<i>mutL homolog 3</i>
MMR	–	<i>mismatch repair</i>
<i>MSH2</i>	–	<i>mutS homolog 2</i>
<i>MSH6</i>	–	<i>mutS homolog 6</i>
MSI	–	<i>microsatelite instability</i>
NCCN	–	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
<i>N-RAS</i>	–	<i>neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<i>PACRG</i>	–	<i>parkin co-regulated gene</i>
<i>PARK2</i>	–	<i>Parkinson disease (autosomal recessive, juvenile) 2, parkin</i>
PH	–	pólipos hiperplásicos
<i>PI3K</i>	–	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
<i>PMS2</i>	–	<i>postmeiotic segregation increased 2</i>
<i>PTEN</i>	–	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PUCPR	–	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
<i>RAF</i>	–	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
<i>RAS</i>	–	<i>rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<i>RAS</i>	–	<i>retrovirus-associated DNA sequences</i>
RNAm	–	<i>messenger ribonucleic acid</i>
ROS	–	<i>reactive oxygen species</i>
SEER	–	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>

SMAD4	–	<i>mothers against decapentaplegic homolog 4</i>
SOX9	–	<i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i>
SSP	–	<i>sessile serrated polyp</i>
TCGA	–	<i>The Cancer Genomic Atlas</i>
TGF- α	–	transforming growth factor alfa
TGF- β	–	<i>transforming growth factor beta</i>
TMA	–	<i>tissue microarray</i>
TNM	–	<i>Tumor, Nodes, Metastases</i>
TP53	–	<i>tumor supressor p53</i>
UFPR	–	Universidade Federal do Paraná
V600E	–	mutação do gene <i>BRAF</i> , em que Valina (V) é substituída por Ácido Glutâmico (E) na posição do aminoácido 600
WNT	–	<i>wingless/integrated</i>

SUMÁRIO

RESUMO	<i>iii</i>
ABSTRACT	<i>iv</i>
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	<i>v</i>
LISTA DE TABELAS	<i>vi</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	<i>viii</i>
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O câncer colorretal	1
1.2 Classificação dos pólipos	4
1.3 Classificação dos adenocarcinomas colorretais	6
1.4 Bases Moleculares do carcinoma colorretal	10
1.5 O gene <i>PARK2</i> e sua relação com <i>APC</i>	18
1.6 Sequência adenoma – adenocarcinoma	21
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Amostras estudadas	26
4.2 Preparo dos TMAs e das lâminas	27
4.3 Realização dos testes imunoistoquímico	29
4.4 Análise morfológica – PARQUINA e APC	30
4.5 Contagem celular – KI67	31
4.6 Análise estatística	32
5. RESULTADOS	34
5.1 Análise descritiva da amostra	34
5.2 Análise da expressão imunoistoquímica das proteínas estudadas ...	35
5.3 Análise da expressão de PARQUINA e APC por modelo de regressão linear multinível	39
5.4 Comparação entre pólipos e adenocarcinomas	41
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÕES	51

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
9. REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 O câncer colorretal

Câncer colorretal (CCR) é um termo genérico, utilizado para se referir à neoplasia maligna que acomete duas porções distintas do tubo digestivo, o cólon e o reto. É classicamente definido pelo tipo histológico mais comumente encontrado nestas topografias, o adenocarcinoma¹. Essa referência se faz salutar, pois existem outras neoplasias malignas primárias, ou seja, outros tipos de câncer que também incidem sobre o cólon e o reto, porém com uma prevalência muito menor e, conseqüentemente, com menor impacto populacional e em políticas de saúde pública². A título de exemplo, podem ser citados os linfomas³, tumores neuroendócrinos^{4,5}, carcinomas de células escamosas⁶ e os sarcomas intestinais^{7,8}. O adenocarcinoma, por sua vez, em se tratando de terminologia com finalidade prática, recebe simplesmente o nome de “carcinoma”, sendo assim, o termo “câncer colorretal” pode ser adequadamente substituído por “carcinoma colorretal” (CCR).

O CCR tem grande importância epidemiológica mundial devido à sua elevada prevalência e incidência em diversos países. Globalmente tem se verificado um fenômeno interessante e antagônico: apesar de as taxas de mortalidade associadas a esta neoplasia estarem reduzindo (pois os pacientes permanecem vivos por mais tempo, em decorrência dos avanços no tratamento), acompanhadas também da redução no diagnóstico de casos novos em alguns países (pela ampla realização de polipectomias endoscópicas, que eliminam lesões precursoras), ainda assim o carcinoma colorretal se mantém como uma doença de alta letalidade mundialmente. Nos EUA corresponde à 3^a. neoplasia maligna mais frequente em ambos os sexos. Estimam-se mais de 71 mil casos novos em homens e 64 mil em mulheres, sendo a 2^a. causa de morte por câncer em homens e a 3^a. em mulheres para o ano de 2017². No Brasil, segue a mesma tendência, de acordo com as previsões do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o biênio 2016-2017, com mais de 34 mil casos novos por ano⁹. A faixa etária mais acometida está entre os 60 e 70 anos¹⁰.

Os fatores de risco mais bem estabelecidos para esta neoplasia são: idade superior a 60 anos, sexo masculino, presença de pólipos colônicos, história individual ou familiar de CCR e a exposição a fatores ambientais, como dieta rica em carne vermelha e gorduras, pobre em frutas e verduras, obesidade, tabagismo, sedentarismo e *diabetes mellitus*^{11,12,13,14,15,16}. Outro fator importante, intrínseco ao indivíduo, é o fato de ser portador de doença inflamatória intestinal (retocolite ulcerativa e doença de Crohn), tendo seu risco aumentado com a gravidade e o tempo de início da doença^{17,18,19,20}. Por outro lado, admite-se como fator protetor a prática esportiva aeróbica regular e o uso crônico de ácido acetilsalicílico^{21,22,23}.

Apesar de a maioria dos tumores de cólon ser esporádica, estes tumores podem surgir como parte de algumas síndromes hereditárias. As mais conhecidas são a Síndrome de Polipose Adenomatosa Familiar (FAP, *familial adenomatous polyposis*) e a Síndrome de Lynch, em que não há polipose, também chamada de HNPCC (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*)^{11,24,25}. As síndromes polipoides são as mais raramente encontradas, respondendo por menos de 1% dos casos de CCR²⁶. A Síndrome de Lynch, por sua vez, corresponde a 2 a 4% dos casos, em outras palavras, 1 a cada 35 casos de carcinoma colorretal se deve a esta síndrome²⁷.

Eventualmente, o diagnóstico do CCR pode acontecer em um indivíduo que se submeteu a um exame endoscópico dos cólons, seja para investigação de dor abdominal ou alteração do hábito intestinal, seja para rastreamento^{28,29}. O rastreamento, por sua vez, está indicado para todas as pessoas acima dos 50 anos, para aquelas que têm história familiar de CCR, ou nos indivíduos que apresentaram resultado positivo para a presença de sangue oculto nas fezes⁸. Na colonoscopia visualiza-se uma lesão de aspecto tumoral na mucosa colônica, que é submetida à biópsia, ou um pólipó, que poderá ser removido (polipectomia), e cujo laudo anatomopatológico revela tratar-se de um adenocarcinoma. Nestes casos, há maior probabilidade de se fazer o diagnóstico de doença localizada³⁰. Porém, em uma grande parcela dos pacientes, o diagnóstico é feito na vigência de sintomas obstrutivos intestinais, sangramento retal, perfuração ou mesmo com a presença de doença avançada locoregional ou metastática^{31,32,33}.

A difusão dos programas de rastreio populacional, por meio de

protocolos que visam à realização de exames de colonoscopia e retossigmoidoscopia, a fim do diagnóstico precoce e realização de polipectomias endoscópicas, quando lesões precursoras são identificadas e removidas, tem resultado em queda progressiva na incidência do CCR de 3% ao ano, a partir de 2004, nos EUA². Este fato, somado ao aumento da disponibilidade do tratamento e o incremento das opções terapêuticas (especialmente terapias sistêmicas farmacológicas), se reflete numa redução significativa da mortalidade³⁴. Em termos de tratamento, o CCR admite várias possibilidades, a depender do estágio em que se encontra a doença e das condições clínicas de cada paciente^{35,36}. A radioterapia tem papel reservado para os casos de tumores no reto, em suas porções mais baixas, preferencialmente como primeira linha do tratamento, com finalidade neoadjuvante, ou seja, antes de uma cirurgia eletiva^{37,38}. A ressecção cirúrgica é o tratamento de escolha para a maioria dos carcinomas colorretais, em algum momento da sua evolução, seja antes de iniciar a quimioterapia ou após^{39,40}. O tratamento sistêmico farmacológico pós-operatório (adjuvante) baseia-se no estadiamento tumoral, sendo de um modo geral contraindicado para pacientes em estágio I, controverso para casos em estágio II e mandatório para aqueles em estágio III e IV¹¹. Atualmente existe uma vasta gama de drogas citotóxicas que podem ser utilizadas em diversas combinações, formando os vários protocolos de tratamento disponíveis⁴¹. A adição de terapias de alvos moleculares⁴², com ação anti-angiogênica^{43,44}, ação em receptores de membrana celular^{45,46,47} e em proteínas específicas, como a tirosina-quinase^{48,49,50,51,52}, trouxeram nova expectativa para o tratamento deste câncer, especialmente quando metastático, com resultados positivos em se obter taxas de resposta favoráveis, aumentando o tempo para progressão da doença e a sobrevida global^{53,54,55}.

O desafio atual para o tratamento do CCR é a manutenção permanentemente ativa dos protocolos de rastreamento populacional, que provavelmente contribuem para reduzir a mortalidade, além das campanhas de prevenção que reforçam a necessidade de adoção de hábitos de vida saudáveis⁵⁶. Por outro lado, ainda há muita dificuldade, no âmbito da saúde pública, em se ampliar a oferta de vagas em consulta especializada para todos os níveis da população, com acesso rápido ao tratamento oncológico⁵⁷. Dentro

desse contexto, a pesquisa básica tem seu papel em aprofundar o entendimento da biologia da doença, dos mecanismos de interação celular e alvos moleculares, particularmente na atual era da genômica e proteômica, identificando potenciais marcadores diagnósticos e terapêuticos, aplicáveis de maneira translacional à prática clínica^{58,59,60}.

1.2 Classificação dos pólipos

Pólipos podem ser definidos como estruturas elevadas que produzem uma saliência na mucosa colorretal, quando visualizados à endoscopia digestiva⁶¹. São, por definição, benignos, porém alguns tipos podem acumular mutações e evoluir, com o passar do tempo, para um adenocarcinoma^{62,63,64,65}.

Os pólipos são extremamente prevalentes na população mundial, podendo-se afirmar que 50% das pessoas acima de 70 anos de idade, são portadoras assintomáticas^{64,66,67,68,69}. Comuns em ambos os sexos⁷⁰ e em todas as raças^{71,72}, os pólipos são mais frequentes em obesos e pessoas expostas a dietas ricas em carnes vermelhas e gorduras e pobre em fibras^{73,74}.

Os pólipos são classificados segundo suas características macroscópicas, ou seja, aquelas visualizadas pelo endoscopista durante a realização de um exame, e microscópicas, observadas com técnicas histopatológicas⁷⁵.

As macroscópicas referem-se, sobretudo, ao tamanho e ao aspecto dos pólipos. Quanto ao tamanho, eles podem ser classificados em muito pequenos (<4mm), pequenos (4-10mm), intermediários (10-20mm) ou grandes (>20mm)^{76,77}. Considerando o aspecto, a classificação mais utilizada é a de Paris, formulada em 2002 e atualizada em 2003, que congrega as lesões em três grupos morfológicos: protrusas ou salientes (tipo I), não-protrusas e não-escavadas (tipo II) e escavadas (tipo III). As tipo I se subdividem em pediculadas (tipo Ip) e sésseis (tipo Is); as tipo II, em discretamente elevadas (IIa), completamente planas (IIb) e levemente deprimidas (IIc). As tipo III são raramente vistas no cólon e no reto⁷⁸.

As características histopatológicas permitem classificar os pólipos em não-neoplásicos e neoplásicos.

Pólipos hiperplásicos, inflamatórios, hamartomatosos e os pseudopólipos são considerados não-neoplásicos^{79,80,81}. Eles são os mais frequentemente encontrados, formados pela hiperproliferação das células normais da mucosa e geralmente são menores que 10mm. Os pólipos não-neoplásicos não são indicados para polipectomia de rotina, por não apresentarem potencial de malignidade *a priori*⁸². Em situações específicas, como em casos de pólipos hiperplásicos >10mm⁸¹, Síndrome da Polipose Hiperplásica⁸³ e alguns pólipos hamartomatosos relacionados à Síndrome de Peutz-Jeghers⁷⁹ e Polipose Juvenil^{84,85}, a remoção é recomendada, por apresentarem risco para malignidade⁸⁶. Por exemplo, os pólipos >10mm possuem um risco estimado em 15% de progressão para adenocarcinoma em um período de 10 anos^{87,88,89}.

Os pólipos neoplásicos são compostos pelos adenomas (tubular, viloso e túbulo-viloso) e pelos pólipos serrilhados^{79,90}.

Os adenomas são caracterizados por crescimento epitelial exagerado, displasia e diferenciação anormal, às vezes, até com pequenos focos de células invasivas^{91,92}. Áreas residuais de adenomas benignos são comumente encontradas em espécimes cirúrgicos de ressecção de CCR^{83,86,87}. Todos os adenomas apresentam displasia, que deve ser classificada pelo médico patologista como sendo de baixo ou de alto grau^{93,94}. Esta classificação baseia-se no grau de atipia celular e displasia tecidual, sendo considerada de baixo grau quando as alterações visualizadas estão limitadas ao terço inferior do epitélio intestinal. As alterações arquiteturais que acometem além do terço inferior, são consideradas de alto grau histológico⁹⁵.

Os pólipos serrilhados podem ser sésseis, tradicionais e mistos^{83,86}:

Séssil: geralmente >5mm, morfologicamente plano ou séssil, localizado predominantemente no cólon direito, pode atingir mais de 20mm de diâmetro⁹⁶. A correlação entre o tamanho, localização e aspecto na colonoscopia é fundamental para o diagnóstico. Lesões >5mm e localizadas no cólon direito ou transversal provavelmente representam um pólipo serrilhado séssil precoce⁹⁷. Devido ao seu aspecto, pode ser difícil a detecção

pela colonoscopia, pois apresenta coloração semelhante à mucosa adjacente e pode estar coberto por muco, ocultando seu padrão vascular^{90,98}. O carcinoma dele originado apresenta histologia mucinosa e se diferencia da Síndrome de Lynch por ocorrer em pacientes com mais de 65 anos e por ser derivado do pólipó serrilhado ao invés do adenoma⁹⁹.

Tradicional: é um tipo de pólipó serrilhado que apresenta caracteristicamente algum grau de displasia. Geralmente é pediculado ou subpediculado, exibe arquitetura complexa e de padrão serrilhado, podendo ser confundido com o adenoma viloso^{100,101}. Pelo fato de possuírem displasia, devem ser ressecados completamente pelo exame colonoscópico, sempre que possível. O seu risco de evoluir para neoplasia maligna é determinado pelo tamanho, número, grau de displasia e morfologia⁹⁵.

Misto: apresenta displasia, com um componente convencional adenomatoso e um componente serrilhado (serrilhado séssil ou serrilhado tradicional) intimamente misturados, podendo inclusive conter características de pólipó hiperplásico, o que justifica a denominação “misto”^{102,103}. Estão presentes em grande quantidade nas poliposes colônicas¹⁰⁴.

1.3 Classificação dos adenocarcinomas colorretais

A classificação do câncer de cólon e reto, assim como de qualquer tipo de câncer, é feita com base no seu estágio de desenvolvimento. Esse processo de classificação é chamado de “estadiamento” e é realizado por meio de um sistema universalmente conhecido como TNM (*Tumor, Nodes, Metastases*). O sistema TNM, publicado pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), foi recentemente atualizado, em sua 8ª. edição, lançada em Janeiro de 2017 (Tabela 1)¹⁰⁵. De um modo geral, o estadiamento é realizado inicialmente, sempre que possível, com exames de imagem pré-operatórios, para avaliar radiologicamente o tórax, abdômen e pelve, sendo continuado no intraoperatório pela exploração cirúrgica da cavidade peritoneal e completado pela análise anatomopatológica das peças cirúrgicas retiradas¹⁰⁶.

Pela nova edição da classificação da AJCC¹⁰⁵, os tumores (T) são representados pela sua profundidade de invasão na parede intestinal, sendo

que T1 envolve até a camada submucosa, enquanto T2 penetra através da submucosa até a muscular própria, T3 invade os tecidos pericólicos e periretais e T4 divide-se em T4a e T4b. Os tumores classificados como T4a penetram diretamente a superfície do peritônio visceral, e os T4b invadem diretamente ou estão aderidos a outros órgãos ou estruturas adjacentes. A importância desta classificação se dá pelo fato de estar diretamente relacionada com o prognóstico. Como exemplo, uma análise da base de dados americana *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) entre 1992 e 2004, incluindo 109.953 pacientes mostrou que a taxa de sobrevida relativa em 5 anos (isto é, a sobrevida em 5 anos corrigida pela morbidade relacionada à idade) foi consideravelmente maior (79,6%) em pacientes T4a do que T4b (58,4%), ambos sem linfonodos acometidos¹⁰⁷.

A análise dos linfonodos regionais (N) requer o mínimo de 12 gânglios recuperados da peça cirúrgica pelo patologista, a fim de que se possa classificá-los. Neste caso, dividem-se em N1a (em que há 1 linfonodo positivo para malignidade, entre todos os dissecados), N1b (2-3 linfonodos positivos), N2a (4-6 linfonodos positivos) e N2b (mais de 7 linfonodos metastáticos). Além disso, se houver nódulos tumorais satélites (ou seja, depósitos tumorais microscópicos) em subserosa, mesentério ou tecidos pericólicos/perirretais não peritonizados, na ausência de metástase linfonodal, dá-se a classificação N1c. A sobrevida global reduz, para um mesmo estágio T, conforme se aumenta a progressão na classificação N¹⁰⁸.

A disseminação metastática (M) à distância é definida como M1a, quando ocorre em apenas um sítio ou órgão sólido (o que inclui linfonodos não regionais, que não pertencem à cadeia de drenagem linfática habitual), M1b quando acomete mais de um órgão distante, excluindo-se o peritônio, que se classifica como M1c pela edição 2017 da AJCC. Pacientes com envolvimento peritoneal metastático apresentam sobrevida livre de progressão, e mesmo sobrevida global, muito menor do que os que não o apresentam¹⁰⁹.

Tabela 1 – Definições para T, N e M

Tumor primário (T)	
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : intraepitelial ou invasão da lâmina própria ^a
T1	Tumor invade a camada submucosa
T2	Tumor invade a camada muscular própria
T3	Tumor invade através da muscular própria até os tecidos pericólicas
T4a	Tumor penetra a superfície do peritônio visceral ^b
T4b	Tumor invade diretamente ou está aderido a outros órgãos e estruturas ^{b,c}

Linfonodos regionais (N)	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase linfonodal
N1	Metástase em 1-3 linfonodos regionais
N1a	Metástase em 1 linfonodo regional
N1b	Metástase em 2-3 linfonodos regionais
N1c	Depósitos tumorais na camada subserosa, mesentério ou tecidos não-peritonizados pericólicos ou periretais, na ausência de metástase em linfonodos regionais
N2	Metástase em 4 ou mais linfonodos regionais
N2a	Metástase em 4-6 linfonodos regionais
N2b	Metástase em 7 ou mais linfonodos regionais

Metástase à distância (M)	
M0	Ausência de metástase à distância
M1a	Metástase à distância confinada a apenas um sítio ou órgão (exemplo: fígado, pulmão, ovário, linfonodos não-regionais)
M1b	Metástase à distância em mais de um sítio ou órgão
M1c	Metástase peritoneal (carcinomatose), com ou sem metástase visceral

Nota: Adaptado com permissão da AJCC (*American Joint Committee on Cancer*)¹⁰⁵, disponível na internet no endereço eletrônico www.nccn.org.

Legenda:

^a Tis inclui células cancerígenas confinadas à membrana basal glandular (intraepitelial) ou lâmina própria mucosa (intramucosa), sem extensão através da muscular própria para dentro da submucosa;

^b Invasão direta em T4 inclui invasão a outros órgãos ou outros segmentos do cólon/reto, como resultado de extensão direta através da serosa, confirmado ao exame microscópico, ou para câncer em localização retroperitoneal ou subperitoneal, invasão direta de outros órgãos ou estruturas em virtude da extensão além da muscular própria;

^c Tumor que é grosseiramente aderente a outros órgãos ou estruturas recebe a classificação cT4b. No entanto, se não houver tumor microscopicamente presente na área de adesão, a classificação será pT1-4a, dependendo da profundidade de invasão parietal.

Diversas informações precisam ser fornecidas pelo patologista a fim de se completar o estadiamento de maneira precisa, o que tem relevância para o

prognóstico da doença e para se definir a melhor estratégia terapêutica para cada caso. Entre estas informações, são de interesse o grau de diferenciação histológica (baixo ou alto grau), as condições das margens cirúrgicas proximais, distais e radiais (se estão livres, ou não, de acometimento tumoral) e se há invasão linfovascular e perineural na peça tumoral. A coleção destes dados é agrupada individualmente, de modo a classificar o estágio de extensão da doença, em grupos de relevância clínica, que variam de I a IV^{87,105}. Os prefixos “p” e “yp” referem-se respectivamente ao “estadiamento patológico” e ao “estadiamento patológico após tratamento neoadjuvante e cirúrgico”, enquanto que “c” refere-se ao estadiamento clínico, por exames de imagem¹⁰⁵.

Outras classificações também foram criadas ao longo dos anos, completando o sistema TNM, como a de Dukes¹¹⁰ e a de Astler-Coller modificada¹¹¹, que podem ser combinadas entre si, permitindo uma comparação entre elas (Tabela 2).

Tabela 2 – Estadiamento para o adenocarcinoma colorretal pelo sistema TNM, Dukes e Astler-Coller Modificado (MAC).

Estágio	T	N	M	Dukes	MAC
0	Tis	N0	M0	-	-
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2-T3	N2a	M0	C	C1/C2
	T1-T2	N2b	M0	C	C1
IIIC	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1-N2	M0	C	C3
IVA	qualquer T	qualquer N	M1a	-	-
IVB	qualquer T	qualquer N	M1b	-	-

Nota: Adaptado com permissão da AJCC (*American Joint Committee on Cancer*)¹⁰⁵, disponível na internet no endereço eletrônico www.nccn.org.

Apesar de clinicamente bem definido, sua classificação molecular ainda é motivo de controvérsias entre pesquisadores. A fim de resolver uma diversidade de inconsistências entre classificações de CCR baseadas em expressão genética, formou-se um consórcio de especialistas internacionais dedicados a um consenso¹¹². Desta reunião surgiram 4 subtipos moleculares, conhecidos como CMS (*Consensus Molecular Subtypes*) com características distintas, a saber: CMS1 (instabilidade microssatélite) corresponde a 14% dos casos, apresenta padrão hipermutado e possui forte ativação imune; CMS2 (canônico) representa a 37% dos casos, exibe padrão epitelial e ativação por sinalização das vias WNT (*wingless/integrated*) e MYC (*MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor*); CMS3 (metabólico) representa 13% dos casos, também com padrão epitelial, mas com evidente desregulação metabólica; e CMS4 (mesenquimal) corresponde a 23% dos casos, caracterizado pela ativação do fator de crescimento de transformação β , invasão estromal e angiogênese. Esta é considerada a mais robusta classificação para CCR, de clara interpretação biológica, servindo de base para futuras estratificações do ponto de vista clínico e de terapia-alvo¹¹³. Apesar de moderna, essa classificação ainda não é recomendada na prática clínica¹¹⁴.

1.4 Bases Moleculares do carcinoma colorretal

Em 1990, Fearon e Vogelstein descreveram as bases moleculares para o CCR como um processo de várias etapas¹¹⁵. De acordo com o modelo proposto, mutações germinativas ou somáticas, seriam necessárias para transformação maligna, e o acúmulo de múltiplas mutações genéticas ao longo dos anos, mais que sua sequência, determinaria o comportamento biológico do tumor.

Por definição, as mutações germinativas são aquelas que ocorrem durante a replicação do DNA, em fase que antecede a meiose, afetando os gametas e todas as células que deles descendem após a fecundação. Predominam nas síndromes genéticas e têm como principal característica a capacidade de serem herdadas e transmitidas à geração seguinte^{116,117}.

Mutações somáticas, por sua vez, ocorrem em algum momento da vida

do indivíduo e não estão necessariamente presentes em todas as células do organismo. Podem ser causadas por fatores ambientais ou como falha no processo de duplicação do DNA, antes da fase de mitose¹¹⁸. Assim, todas as células descendentes serão afetadas e estarão localizadas em tecidos específicos do corpo. Desta forma, mutações adquiridas em células somáticas (diferente dos gametas) não são passadas para as gerações subsequentes. Estas características são encontradas em praticamente 90% dos casos esporádicos (não familiar) de CCR e resultam de um acúmulo gradual de múltiplas mutações¹¹⁹.

O *The Cancer Genomic Atlas* publicou em 2012 os resultados de análises multidimensionais de CCR humano, a partir de análises de amostras por sequenciamento do exoma, número de cópias de DNA, padrões de expressão e metilação¹²⁰. O TCGA identificou 24 genes como direcionadores em vias de sinalização relacionadas à iniciação e à progressão do CCR. Além dos genes previamente conhecidos, cita como exemplo de novos genes, os *AT-Rich Interaction Domain 1A (ARID1A)*, *SRY (sex determining region Y)-box 9 (SOX9)* e *APC Membrane Recruitment protein 1 (AMER1)*. Também estabelece que os adenocarcinomas de cólon e reto, apesar de estruturas anatomicamente distintas, são indistinguíveis do ponto de vista genômico, quando originados por vias de não-hipermetilação. Por outro lado, confirma o fato de que tumores do cólon direito/ascendente tendem a hipermetilação, com mais altas taxas de mutação em comparação com os do cólon esquerdo e reto.

A maior parte das alterações moleculares descobertas para os tumores hereditários se mostrou também importante para o entendimento das neoplasias esporádicas¹²¹. Exemplo clássico deste fato é o gene *Adenomatous Polyposis Coli (APC)*, que codifica para a proteína de mesmo nome, fundamental para a integridade da via de sinalização WNT. A ocorrência de mutações germinativas, em um dos alelos deste gene é a base genética para a Polipose Adenomatosa Familiar, causa rara de câncer hereditário. Mutações deste gene também estão presentes em cânceres colorretais esporádicos e ocorrem precocemente¹¹⁸, enquanto mutações no gene supressor tumoral *TP53 (tumor supressor p53)* geralmente são mais tardias¹²². Dessa forma, credita-se à mutação do *APC* o primeiro evento da

carcinogênese¹¹⁵, que depois recebe uma quantidade variável de outras mutações¹²³ e alterações epigenéticas¹²⁴, em que muitos genes estão envolvidos, em diversos graus de importância.

Em situações de equilíbrio, as ligações de proteínas WNT a seus receptores faz com que a proteína APC se ligue à β -catenina causando a sua degradação. A proteína β -catenina acumulada no interior da célula migra para o núcleo e atua como fator de transcrição de genes de relevância para o crescimento celular, tais quais *C-MYC* e o gene da proteína ciclina D. Desta forma a integridade da via de sinalização WNT contribui para a regulação fina da expressão desses genes. Caso não haja ligação entre a proteína WNT e seu receptor, a molécula da β -catenina é destruída e genes como *C-MYC* têm sua transcrição reduzida¹²⁵. Quando a proteína APC está alterada, devido a mutações em seu gene codificador, a degradação de β -catenina fica comprometida, mesmo que o receptor de WNT esteja intacto, levando a uma hiperexpressão dos genes por ela transativados, direcionando a célula para a multiplicação¹²⁶.

A família de receptores *Human Epidermal growth factor Receptor* (HER) também está implicada na carcinogênese do CCR. É composta de quatro diferentes receptores, com atividade tirosina-quinase. Entre outros, são ligantes desses receptores o EGFR (*epidermal growth factor receptor*) e o TGF- α (*transforming growth factor alfa*). A ligação do fator de crescimento epidérmico ao seu receptor transmembrana causa homo ou heterodimerização do receptor com outras moléculas da mesma família, levando à sua ativação. Essa ativação produz fosforilação de proteínas celulares envolvidas em diferentes vias de sinalização, como as vias RAS (*Rat Sarcoma viral oncogene homolog*), RAF (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*), MEK (*MAPK/ERK Kinase*), MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) e PI3K (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase*)¹²⁷.

Estudos demonstraram que em um mesmo segmento intestinal, EGFR está diferentemente expresso, quando comparado às células da mucosa não neoplásica, células pré-malignas e cancerosas¹²⁸. Mais de 90% dos pacientes com CCR metastático apresentam hiperexpressão de EGFR em suas células tumorais^{129,130}. Dessa forma, o uso de anticorpos monoclonais a ele

direcionados, como Cetuximabe e Panitumumabe, inibem sua ligação com seu ligante, bloqueando as fosforilações subsequentes e direcionando as células malignas à parada de replicação^{131,132}. Essa característica concede atividade terapêutica a essas drogas, fato que levou à sua aprovação no tratamento do CCR metastático¹³³. Porém, essa ação terapêutica se restringe apenas aos pacientes que não apresentam mutação do gene *Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog (K-RAS)* em suas células tumorais¹³⁴. Recente estudo de análise econômica conduzido pelo governo Canadense na província de Ontário mostrou que o teste molecular deste gene, nas amostras tumorais preservadas em parafina, é custo-efetivo considerando o uso de terapia anti-EGFR nas estratégias de tratamento para CCR avançado¹³⁵.

Três genes da família RAS são conhecidos: *Harvey Rat Sarcoma viral oncogene homolog (H-RAS)*, *Neuroblastoma Rat Sarcoma viral oncogene homolog (N-RAS)* e o já citado *K-RAS*, sendo que todos codificam para proteínas com propriedades semelhantes, preferencialmente expressos em tecidos diferentes¹³⁶. Tais proteínas são ativadoras de uma série de vias de sinalização, desencadeada por receptores com atividade tirosina-quinase, como é o caso do próprio EGFR. Tais proteínas estão localizadas na face interna da membrana celular, possuem atividade GTPase e estão constantemente ligadas à GTP (*guanosine-5'-triphosphate*), quando ativada, ou GDP (*guanosine diphosphate*) quando inativada. Funcionam, portanto, como moléculas intermediárias entre a ativação dos receptores de membrana e as vias de sinalização celular¹³⁷. A ativação dos receptores tirosina-quinase direciona RAS ao seu estado ativado (por exemplo, ligado à GTP), sendo que já foram identificadas nove vias de sinalização como dependentes da ativação de RAS. Como exemplo, cita-se a via Erk/Map quinase¹³⁸.

O gene *K-RAS* é o segundo mais frequentemente mutado em neoplasias humanas, o primeiro é *TP53*¹³⁹. Estima-se que 40% dos tumores de cólon apresentam mutação em *K-RAS*. Mutações pontuais restritas aos códons 12, 13 e 61 codificam uma proteína com propriedade de ligar-se irreversivelmente à GTP, mantendo-se constitutivamente ativa, independentemente de EGFR, o que parece conduzir esses tumores a um pior prognóstico¹⁴⁰.

Os eventos genéticos mais tardios na carcinogênese do CCR incluem a deleção da região cromossômica 18q e a inativação do gene *TP53*¹⁴¹. A diminuição, ou perda de função, da proteína TP53 interfere com a carcinogênese pelo fato dessa molécula funcionar como fator de transcrição responsável pela ativação de diversos genes, que seriam importantes para a homeostase celular¹⁴². Além disso, TP53 desempenha papel fundamental na indução da célula à apoptose, o que acontece quando a célula sofreu danos irreparáveis em seu DNA ou quando encontra-se oncogeneticamente estimulada^{143,144}.

Deleções no braço longo do cromossomo 18 ocorrem em cerca de 70% dos casos de CCR e com frequência ainda maior nas células tumorais encontradas em sítios de metástase^{141,145}. Análises de perda de heterozigose revelaram que 18q é a porção genômica mais frequentemente deletada nesta neoplasia¹⁴⁶. Isso indica claramente que essa topografia abriga um ou mais genes supressores tumorais, com participação relevante na carcinogênese colorretal¹⁴⁷.

Um dos primeiros genes identificados em 18q e relacionado ao CCR é o gene *Deleted in Colon Cancer (DDC)*¹⁴⁸, cuja proteína atua como receptor transmembrana para netrin-1, uma molécula funcionalmente relacionada à laminina, e com importante função na organização estrutural de células do sistema nervoso. A interação de netrin-1 com DDC desencadeia sinais intracelulares que resultam em uma atividade pró-apoptótica¹⁴⁹.

O gene *Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4 (SMAD4)* também se situa no braço longo do cromossomo 18 (região 18q) e está mutado em cerca de 15% dos casos de carcinoma colorretal¹⁴⁶. SMAD4 faz parte de um complexo proteico que participa da sinalização produzida pela interação entre TGF- β (*transforming growth factor beta*) e seu receptor¹⁵⁰. Assim, a perda monoalélica do gene *SMAD4* na deleção da região 18q também pode ser um mecanismo responsável pela progressão carcinogénica. Outro cromossomo em que a perda de segmentos também é frequentemente encontrada nessa progressão, refere-se ao braço curto do cromossomo 17 (região 17p), embora esteja alterada apenas tardiamente em neoplasias coloretais¹⁵¹.

Os estudos com famílias de portadores da Síndrome de Lynch, que desenvolvem adenocarcinoma colorretal em idades inferiores a 45 anos, chamaram atenção para o fato de não portarem, na linhagem germinativa, alterações em genes conhecidos da carcinogênese colorretal¹⁵². Porém apresentavam erros de replicação do DNA, que em análises posteriores revelaram se referir a perda funcional (por mutações ou deleções) em um dos alelos dos genes de reparo de DNA, conhecidos como família MMR (*mismatch repair*)¹⁵³. Estes genes são *MutL Homolog 1 (MLH1)*, *MutS Homolog 2 (MSH2)*, *MutS Homolog 6 (MSH6)*, *PostMeiotic Segregation Increased 2 (PMS2)* e possivelmente *MutL Homolog 3 (MLH3)*¹⁵⁴. A ocorrência de alterações somáticas no outro alelo de qualquer um destes genes, já germinativamente alterado, leva ao comprometimento do mecanismo de correção genômica durante o processo de replicação do DNA na fase S do ciclo celular, conferindo à célula elevada propensão ao acúmulo de mutações¹⁵⁵. Essa falha pode ser detectada através da investigação de instabilidades de microssatélites (MSI, *microsatellite instability*)¹⁵⁶.

Microssatélites são regiões pequenas do genoma onde os nucleotídeos encontram-se repetidos sequencialmente¹⁵⁷. Nessas regiões que os erros de replicação são mais facilmente reconhecidos, pois a repetição nucleotídica favorece a ocorrência de mutações de ponto, além de pequenas deleções e inserções próximas das sequências de repetição^{119,158}. Na prática clínica se utilizam testes para detecção de instabilidade de microssatélite a partir de exames de imunistoquímica no material proveniente do tumor¹⁵⁹. Dez por cento (10%) dos carcinomas colorretais provenientes de pacientes sem história familiar apresentam essa característica¹⁶⁰. Nesses casos, a inativação de ambos os alelos se processa somaticamente em fase precoce da carcinogênese, em função da metilação do promotor de qualquer dos genes de reparo, mas geralmente de *MLH1*¹⁶¹. A deficiência na manutenção da estabilidade genômica facilita o acúmulo de mutações que influenciam no processo de carcinogênese. Porém, é curioso notar que as evidências apontam para uma menor agressividade e um melhor prognóstico para os tumores esporádicos que apresentam MSI¹⁶².

Condições celulares que elevam taxas de mutação podem permitir ou acelerar a progressão tumoral. Mais de 80% dos CCR exibem ganhos ou

perdas cromossômicas, um fenômeno que pode favorecer a amplificação de oncogenes e a perda de supressores tumorais¹¹. Alterações na disjunção cromossômica podem ser a causa desta instabilidade cromossômica (CIN, *chromosomal instability*).

Mecanismos epigenéticos são tão significativos quanto as mutações em carcinogênese, apesar de menos compreendidos^{163,164}. Diversas modificações covalentes em proteínas histonas e a metilação de resíduos de citosina no DNA representam uma das formas de regulação gênica, sendo a última muito melhor caracterizada no CCR. Os pares de nucleotídeo 5'-CpG-3' são alvos específicos para metilação, em áreas de promotores de alto conteúdo de CpG, onde fenômenos abundantes de metilação silenciam genes adjacentes. Em comparação com tecido normal, os carcinomas colorretais apresentam entre 8% e 15% menos metilações do DNA, mesmo em adenomas^{119,165,166}.

A diminuição da metilação pericentromérica pode levar a perda de fidelidade durante a separação cromossomal, e a metilação alterada somada à perda da impressão do *locus* Igf2, estão associados com aumento do risco de câncer colorretal, demonstrando o amplo efeito da hipometilação global no crescimento celular¹⁶⁷. Contrariamente, um subgrupo de tumores apresenta hipermetilação de ilhas ricas de promotores CpG, chamados CIMP (*CpG island methylator phenotype*), com atenuação transcricional dos genes relacionados, incluindo supressores tumorais^{164,168}. Os precursores adenomatosos de CCR portadores de CIMP são os pólipos sésseis serrilhados, histologicamente compostos de displasia dentro de um padrão arquitetural típico de pólipos hiperplásicos¹¹⁹.

A proteína KI67, produto do gene *Marker of proliferation KI67 (MKI67)* é expressa apenas no núcleo de células em divisão, o faz dela um marcador de proliferação celular¹⁶⁹. É uma proteína necessária para manter os cromossomos individualmente dispersos no citoplasma, após o desmonte do envelope nuclear durante a divisão celular. Sua identificação se dá por exames de imunistoquímica e sua aferição é dada em porcentagem de células positivas, em contagem realizada visualmente pelo patologista em lâmina de microscopia ótica convencional. Para CCR, índices de KI67 $\geq 50\%$ permitem considerar os tumores como altamente proliferativos, tendo correlação com o grau de indiferenciação neoplásica¹⁷⁰.

Mais recentemente reconheceu-se a participação do gene *serine/threonine-protein kinase B-Raf (BRAF)* mutado, através da metilação do DNA em mecanismos de silenciamento genético, além de levar a hipermetilação de ilhas CpG, que escondem instabilidade microssatélite¹⁷¹. O resultado disso é o aumento na recidiva tumoral e na ocorrência de metástases peritoneais, levando a queda na sobrevida. Sua atuação é tão importante que o consenso da Sociedade Européia de Oncologia Clínica (ESMO) de 2016 recomenda a realização rotineira de testes de mutação do *BRAF* em CCR metastático¹⁷².

As modernas terapias-alvo, voltadas ao bloqueio do EGFR, aumentaram significativamente a sobrevida em pacientes com doença avançada. A ausência de mutação do *KRAS* (denominada tipo selvagem) é preditora de resposta ao tratamento com drogas anti-EGFR, selecionando pacientes e evitando toxicidades desnecessárias. Por outro lado, não se espera resposta a estas medicações quando ocorrem mutações dos genes *KRAS*, *BRAF* (na posição V600E) e *PI3K*, ou na perda de expressão do *Phosphatase and Tensin homolog (PTEN)*^{171,172,173}.

A proteína do gene *PI3K* é uma subunidade da enzima fosfatidilinositol 3-kinase, que atua no processo de fosforilação envolvido no mecanismo de sinalização celular¹⁷⁴. Sua atividade é importante para o crescimento, divisão (proliferação) e migração celular, produção de novas proteínas, transporte de material dentro da célula e, por fim sobrevivência celular¹⁷⁵. Sua atividade inclui a regulação de diversos hormônios e participa da maturação de adipócitos¹⁷⁶. Mutações em *PI3K* são encontradas em diversos tipos de tumores, como mama, ovário, cérebro, fígado e pulmão, sendo que em carcinoma colorretal chegam a 10 – 20%¹⁷⁷. Neste caso, tem relação com neoplasias do cólon proximal (direito/ascendente), instabilidade microssatélite e associação com mutações do *KRAS*^{178,179}.

O gene *PTEN* codifica para uma enzima do tipo fosfatase, sendo encontrada em quase todos os tecidos corporais e atuando como supressora tumoral¹⁸⁰. A fosfatase remove grupos fosfato de outras proteínas e de lipídeos, sinalizando desta forma para a interrupção da divisão celular e ativando mecanismos de apoptose¹⁸¹. Outras atividades incluem o controle da migração e adesão celular, formação de novos vasos sanguíneos

(angiogênese) e manutenção da estabilidade do material genético¹⁸². A ocorrência de mutações de *PTEN* em CCR varia na literatura de 1 a 29%, sendo que a perda de expressão do gene é mais comum (encontrada em 20 – 40% dos casos) nesses tumores¹⁸³.

Por fim, a ciclooxigenase-2 (COX-2), uma enzima do tipo prostaglandina H2-sintetase, é uma glicoproteína de membrana que atua como efetor na cascata inflamatória do ácido araquidônico, através formação de tromboxanos e prostaciclina¹⁸⁴. Sua inibição farmacológica, pelo uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (por exemplo, o ácido acetilsalicílico, AAS) leva ao alívio de sintomas flogísticos clássicos, como dor e edema. A COX-2 é de reconhecida importância na gênese de várias neoplasias, estando superexpressa em 70-80% dos CCR e relacionada com pior prognóstico em vários estudos^{185,186}. Há evidências claras de que o uso regular de AAS reduz o risco para o desenvolvimento de adenomas e carcinomas colorretais por inibição da via da COX-2^{187,188}. Sua superexpressão nos CCR está inversamente associada à MSI e CIMP¹⁸⁹, porém sem evidências de que os tumores com estas características se desenvolvem a partir de lesões polipoides de padrão sésil serrilhado no intestino grosso¹⁹⁰.

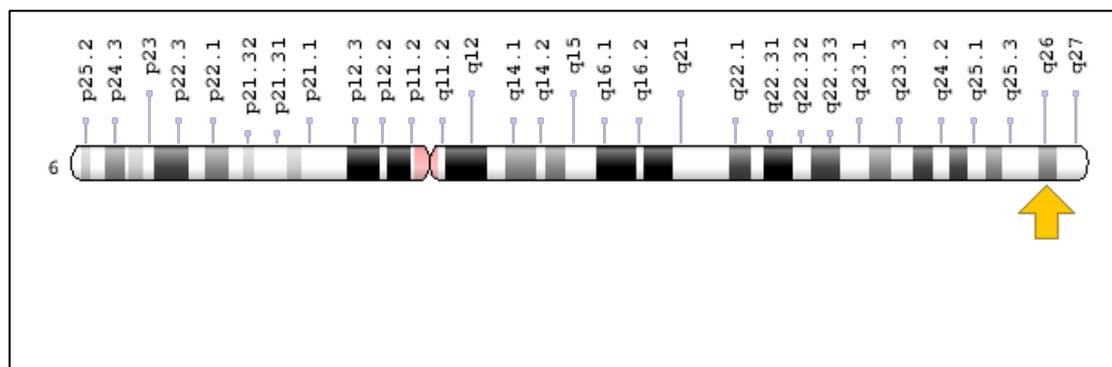
1.5 O gene *PARK2* e sua relação com *APC*

O gene *PARK2* (*Parkinson disease [autosomal recessive, juvenile] 2, parkin*), é um dos maiores genes humanos, que codifica para a proteína PARQUINA, cuja principal função celular é a de eliminar proteínas desdobradas e danificadas, marcando-as para degradação proteassomal num processo chamado ubiquitinação¹⁹¹. A molécula ubiquitina atua como sinalização na mobilização de outras proteínas para a degradação no proteassomo. Dessa forma, o sistema ubiquitina-proteassomo funciona como um “controle de qualidade” em nível celular, que também regula a disponibilidade de proteínas envolvidas em diversas atividades celulares críticas, como tempo para a divisão celular e seu crescimento. Essa atividade faz com que a PARQUINA pertença a um grupo de proteínas denominado Ubiquitina E3 Ligases¹⁹².

Os estudos acerca da estrutura e atividade da PARQUINA levaram os pesquisadores a propor diversas funções para ela, incluindo a de supressora tumoral¹⁹³. Entre outras funções, também regula a formação e liberação de vesículas sinápticas nos neurônios, que contém mensageiros químicos responsáveis pela transmissão de sinal de uma célula nervosa para outra¹⁹⁴. Além disso, a PARQUINA está envolvida na manutenção da integridade da função mitocondrial, sendo que ela pode auxiliar o início do processo de destruição das mitocôndrias alteradas¹⁹⁵.

A localização citogenética deste gene é o braço longo (q) do cromossomo 6, em 6q25.2-q27, sendo composto por 12 exons que codificam os 465 aminoácidos que compõem a proteína PARQUINA (Figura 1). É expresso em uma variedade de tecidos, incluindo o cérebro, pulmão, cólon, testículos e músculos¹⁹⁶.

Figura 1 – Localização citogenética de *PARK2*, no braço longo do cromossomo 6, posição 26.



Legenda: Localização molecular entre os pares de base 161,347,417 e 162,727,802 (*Homo sapiens* Annotation Release 108, GRCh38.p7). Fonte: *Genetics Home Reference*¹⁹¹

O gene *PARK2* encontra-se no sítio frágil comum FRA6E, uma região cromossômica conhecida por sua instabilidade e tendência a quebras e rearranjos¹⁹⁴. Alterações envolvendo essa região foram identificadas em várias formas de câncer humano, entre os quais: glioblastomas, carcinomas colorretais, pulmonares e ovarianos^{195,197}. Em alguns destes tumores, segmentos da região FRA6E, incluindo parte ou todo o gene *PARK2*, estão anormalmente duplicados ou deletados. Essas alterações genéticas são consideradas somáticas, porque ocorrem apenas em células cancerígenas e

não são herdadas. Como resultado, a atividade da PARQUINA esta reduzida ou ausente nestas células, sendo ela uma proteína supressora tumoral, sua carência funcional pode levar à formação de tumores¹⁹⁸.

Mais de 200 mutações no gene *PARK2* já foram identificadas, responsáveis por causar doença de Parkinson, especialmente na sua forma juvenil, que acontece antes dos 20 anos de idade, mas também em alguns casos de início tardio, após a quinta década de vida¹⁹⁹. Tais mutações podem codificar para proteínas desfuncionalizadas, que serão rapidamente degradadas no espaço intracelular, mas podem também codificar para uma proteína com perda de sua atividade ubiquitina-ligase. Este fato leva ao acúmulo de outras proteínas indesejadas, que impedem, em última análise, a formação de vesículas sinápticas contendo dopamina. Como a PARQUINA é abundante no cérebro, sua atividade reduzida resulta em carência de dopamina no sistema nervoso central, característica principal da doença de Parkinson²⁰⁰.

Em relação a outras doenças, estudos sugerem que variações alélicas comuns (polimorfismos) deste gene e de outro gene vizinho a ele, chamado *Parkin co-regulated gene (PACRG)*, poderiam aumentar o risco de um indivíduo contrair Hanseníase²⁰¹. As mutações do gene *PARK2* também podem romper o mecanismo de regulação mitocondrial, em que a redução na degradação seletiva de organelas danificadas leva a uma população de mitocôndrias disfuncionais²⁰².

A ocorrência de metilação anormal do promotor comum dos genes *PARK2* e *PACRG* foi observada em 26% de pacientes com Leucemia Linfóide Aguda e em 20% de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica durante episódio de crise blástica²⁰³.

Avanços recentes correlacionaram o gene *PARK2* com o CCR. Em 2010, Poulgiannis *et al.* demonstraram, através de arranjos de hibridização genômica comparativa (aCGH), em carcinomas colorretais primários, que 33% das amostras apresentavam perda do número de cópias do DNA envolvendo o gene *PARK2*¹⁹³. Neste mesmo estudo, uma alteração ou deleção neste gene foi intrinsecamente relacionada à deficiência no gene *APC*. No experimento realizado pelos autores, com camundongos portadores de inativação heterozigótica de *APC* e *PARK2*, observaram crescimento acelerado de

adenomas colônicos quando comparados com animais que tinham mutação isolada em *APC*. Os resultados sugerem uma via de carcinogênese onde *PARK2* é um gene supressor tumoral cuja haploinsuficiência pode cooperar com a mutação do *APC* no desenvolvimento do CCR. Apesar destes resultados, muito pouco se publicou a partir deste estudo, correlacionando estes genes, na tentativa de se entender a relação entre eles e a via da carcinogênese colorretal.

Em uma análise comparativa da imunoexpressão tecidual de *PARQUINA* e *APC*, em neoplasias malignas humanas colorretais, pesquisadora desta instituição obteve resultados animadores, observando uma correlação fortemente positiva entre ambas, em amostra composta exclusivamente por adenocarcinomas; ainda, estabeleceu correlação específica em um subgrupo de pacientes, portadores de doença mais avançada, de tal expressão com aumento de sobrevida²⁰⁴.

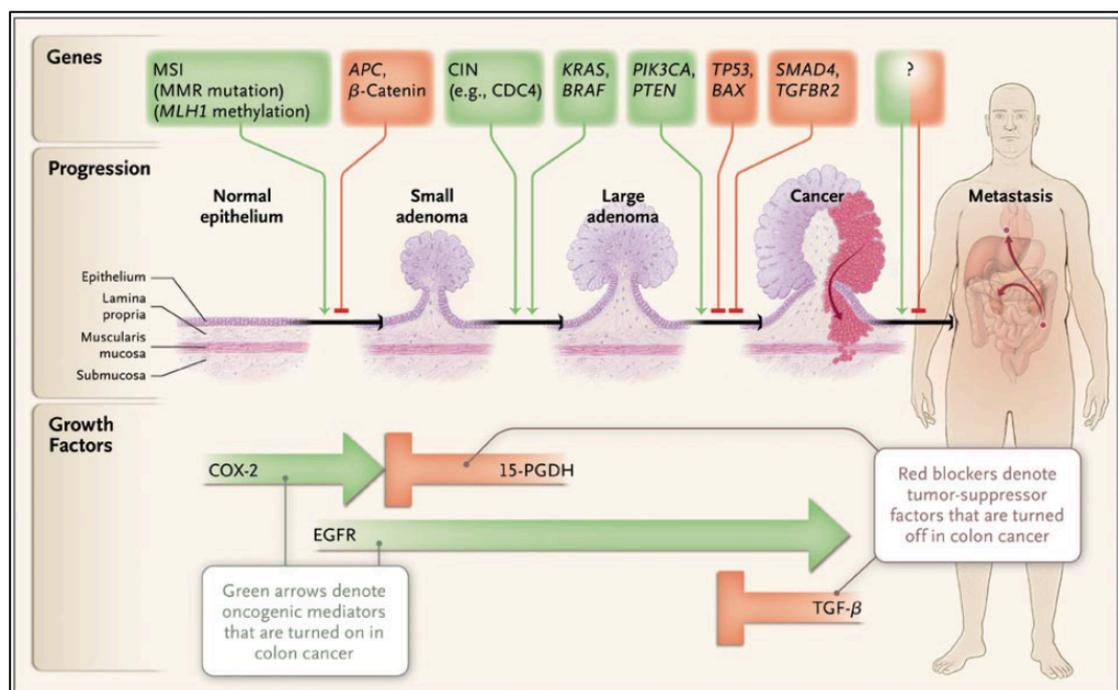
1.6 Sequência adenoma - adenocarcinoma

A base genética para o estudo do CCR decorre da premissa de que este tipo de câncer surge a partir de um pólipó benigno. Em uma publicação inovadora para a época, Volgenstein e colaboradores¹⁶⁵ propuseram em 1988 um modelo consistente para explicar a gênese do tumor colorretal, na qual as etapas necessárias para o desenvolvimento do carcinoma frequentemente envolvem a ativação mutacional de um oncogene acoplado à mutação em diversos outros genes, geralmente supressores tumorais (Figura 2)¹⁶⁶. Para isso levantaram a hipótese de que a maioria dos carcinomas se desenvolve a partir de adenomas e estudou quatro alterações genéticas em 172 amostras de tumores colorretais representativas de vários estádios de desenvolvimento neoplásico. As alterações estudadas foram mutações do gene *RAS* e deleções alélicas nos cromossomos 5, 17 e 18. As amostras consistiram de adenomas obtidos de pacientes portadores de FAP e de pacientes sem polipose familiar, bem como de adenocarcinomas retirados por cirurgia. Foram observadas mutações do gene *RAS* em 58% dos adenomas maiores de 1 cm e em 47% dos adenocarcinomas. Além disso, uma região específica do

cromossomo 18 esteve altamente deletada nos carcinomas (73%) e nos adenomas com displasia de alto grau (47%), porém em apenas 13% dos adenomas sem displasia. Estas observações permitiram correlacioná-las com a progressão clínica dos tumores, sugerindo um modelo, ou uma sequência de evolução de adenomas para adenocarcinomas^{165,205}.

A partir deste trabalho, os pesquisadores progrediram nesta linha de estudo, e determinaram em publicações subsequentes que o primeiro evento nos CCR esporádicos²⁰⁶ (não familiares) é a inativação do *APC*²⁰⁷, um gene supressor tumoral, seguido por mutações potenciais em diversos outros genes de uma cascata, que leva a alterações genômicas e epigenéticas^{115,208}. Dentre estas, as mais significativas são a instabilidade cromossômica²⁰⁹ e instabilidade microssatélite^{210,211}. Entre as mutações que seguem-se à do *APC*, as mais relevantes referem-se ao *TP53* e ao *KRAS*²¹². As mutações do *KRAS* tendem a acontecer antes das mutações do *TP53* e estão presentes em cerca de 30-40% dos pacientes com CCR¹⁷³. Porém as mutações de *TP53* tornam a progressão tumoral agressiva, contribuindo para quimioresistência²¹³ e maior agressividade da doença, com pior prognóstico global²¹⁴.

Figura 2 – Genes e vias dos fatores de crescimento que dirigem a progressão do carcinoma colorretal, conforme o modelo de Vogelstein e colaboradores¹⁶⁵.



Fonte: Adaptado por Markowitz e Bertagnoli¹⁶⁶

De um modo geral, alterações em três classes de genes levam à formação de tumores: oncogenes, genes supressores tumorais e genes que impedem o dano ao DNA²¹⁵. Muito embora os eventos oncogenéticos possam ter uma base genética (mutacional) ou epigenética, atualmente mais se conhece acerca de mutações somáticas que levam a aumento no potencial de malignidade^{87,216}. Analisadas à luz da sequência adenoma-adenocarcinoma, estas mutações sustentam a tese do câncer como uma doença multifacetada, que viola controles naturais da sobrevivência celular, crescimento e invasão²¹⁷. Mutações individuais raramente se correlacionam precisamente com uma característica em particular, como sobrevida ou angiogênese e mutações comuns frequentemente esbarram em múltiplas funções celulares. Apesar disso, a combinação de mutações somáticas define subtipos de câncer, com propriedades específicas e sensibilidade a certas terapias¹¹⁹.

Há algumas variações da sequência adenoma-adenocarcinoma, como nos casos dos portadores de doença inflamatória intestinal, especialmente retocolite ulcerativa, que aumentam em 10 vezes o risco de malignização colônica¹⁶⁶. O ciclo de lesão de origem inflamatória da mucosa intestinal, seguido de cicatrização, aumenta o risco de mutações. Nestes casos, o câncer pode surgir tipicamente de um pólipo mas também dentro de placas adenomatosas planas e áreas não-adenomatosas de displasia. Uma mutação no gene *TP53* tende a acontecer precocemente nesta sequência, e a inativação do gene *APC* é menos comum do que no carcinoma colorretal esporádico^{218,219}.

2. JUSTIFICATIVA

Ao longo dos últimos 30 anos, as pesquisas voltadas ao entendimento das origens do CCR têm crescido exponencialmente³⁵. Desde o desenvolvimento das teorias que explicam a sequência adenoma-adenocarcinoma publicadas por Vogelstein *et al.*¹⁶⁵, houve grande evolução no conhecimento deste processo, cada vez mais relacionado à biologia molecular^{1,220,221} e à genética tumoral^{222,223}. A evolução das ferramentas empregadas pela biologia molecular no estudo da genética tumoral, esclarecendo as vias pelas quais a célula neoplásica se origina e progride, tem acrescentado grande importância na identificação de alvos terapêuticos em potencial, de modo que a pesquisa básica seja aplicada à prática clínica, para o tratamento de pacientes^{39,41,42}.

Frente a essa ampla fronteira de descobertas e inovações, relacionadas tanto ao carcinoma colorretal quanto ao gene *PARK2* e motivados por resultados previamente obtidos em estudos deste grupo de pesquisa²⁰⁴, buscamos analisar a expressão deste relativamente “novo” gene dentro da via clássica de progressão tumoral, partindo de sua atividade em pólipos e adenomas colônicos, até o outro extremo da via de carcinogênese, quando o câncer está instalado, na expectativa de encontrar uma relação que possa abrir uma janela de oportunidade de aplicação prática²²⁴. Assim, partindo da pesquisa laboratorial, realizada na bancada do laboratório, obter uma ferramenta de utilidade clínica, capaz de beneficiar simultaneamente pacientes e profissionais de saúde. Em outras palavras, a própria definição da pesquisa translacional, em que o trabalho de pesquisa de uma equipe multiprofissional expande-se e combina-se harmoniosamente numa verdadeira interdisciplinaridade.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar comparativamente a expressão imunoistoquímica das proteínas PARQUINA, APC e KI67 em amostras de pólipos e adenocarcinomas colorretais, bem como correlacioná-las a variáveis clínico-patológicas, tendo como base o modelo clássico de Vogelstein¹⁶⁵ de progressão adenoma-adenocarcinoma.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a correlação entre a expressão de PI3K, COX-2, PTEN, PARQUINA, APC e KI67 em pólipos;
- b) Avaliar a correlação entre variáveis relativas aos pacientes e a expressão de PARQUINA, APC e KI67;
- c) Avaliar a correlação entre variáveis relativas aos pólipos e aos pacientes, considerando uma estrutura hierárquica multinível;
- d) Analisar o efeito conjunto de pólipos e adenocarcinomas, pelo grau de diferenciação, sobre a expressão de PARQUINA, APC e KI67, considerados no contexto da estrutura hierárquica multinível.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras estudadas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sob o número 820.432, de 25/08/2014. O material de estudo foi coletado em dois centros hospitalares na cidade de Curitiba, estado do Paraná, Brasil.

Os pólipos foram obtidos através de polipectomias realizadas por exames rotineiros de colonoscopia no Hospital Santa Cruz²²⁵. Foram excluídos os pólipos cujo exame anatomopatológico foi compatível com pólipos inflamatórios, hamartomas e pseudopólipos. Os pólipos incluídos foram reunidos em quatro grupos, baseados em semelhanças clínicas, histológicas e de carcinogênese: adenomas com displasia de baixo grau (LDA, *low dysplasia adenoma*), adenomas com displasia de alto grau (HDA, *high dysplasia adenoma*), pólipos serrilhados sésseis (SSP, *sessile serrated polyp*) e pólipos hiperplásicos (PH), para posteriores comparações. Muito frequentemente foram encontrados e removidos mais de um pólipo, durante o exame, de um mesmo paciente. Desta forma, muitos pólipos incluídos na análises pertenceram a um mesmo paciente. Dados clínicos e de expressão das proteínas PI3K, COX-2, PTEN e KI67²²⁵ referentes a essas amostras foram reanalisados segundo os objetivos do presente estudo. A análise histoquímica da PARQUINA e da APC foram realizadas pelo preparo de novas lâminas a partir das amostras originais.

Os adenocarcinomas corresponderam a produtos de ressecção cirúrgica colorretal, recebidos pelo laboratório de patologia do Hospital de Clínicas da UFPR, entre os anos de 2007 a 2011²⁰⁴. Foram excluídos do estudo os casos em que as amostras do material histológico obtido apresentavam-se em condições inadequadas para processamento laboratorial.

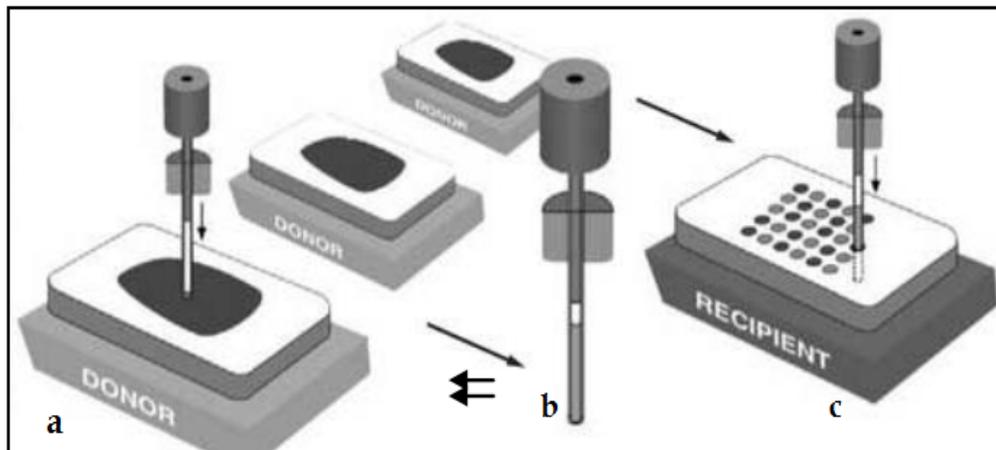
A idade dos pacientes foi estratificada em 3 grupos, conforme a classificação de Bethesda²²⁶: ≤ 45 anos, entre 46 - 55 anos e ≥ 56 anos. Esta classificação leva em conta o fato de pacientes com CCR hereditário

geralmente apresentarem a doença antes dos 45 anos de idade, logo em pacientes abaixo desta faixa etária seria mais provável que o câncer fosse de origem hereditária, e acima de 56 anos, uma maior probabilidade de ocorrência esporádica. Entre 46 e 55 anos, seria uma faixa etária inespecífica para se explicar a origem da neoplasia.

4.2 Preparo dos TMAs e das lâminas

O processamento histológico seguiu rotina laboratorial de cada hospital, para confecção de blocos em parafina e estudo preliminar em hematoxilina-eosina (HE). Posteriormente, os blocos foram encaminhados ao Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), onde foram analisados por patologista especialista em trato gastrointestinal, que reclassificou os pólipos nos grupos acima descritos e revisou o estadiamento patológico dos adenocarcinomas. Em seguida, foi realizada análise de imunoistoquímica, por técnica padronizada neste laboratório, de microarranjo de tecido (*Tissue Microarray*, TMA)²²⁷. Esse método consiste na montagem de blocos histológicos em parafina, com várias amostras para confecção de lâminas histopatológicas multiamostrais, para realização de técnicas histoquímicas e imunológicas. Inicialmente 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 3b), 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 3a). 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 3c)²²⁸.

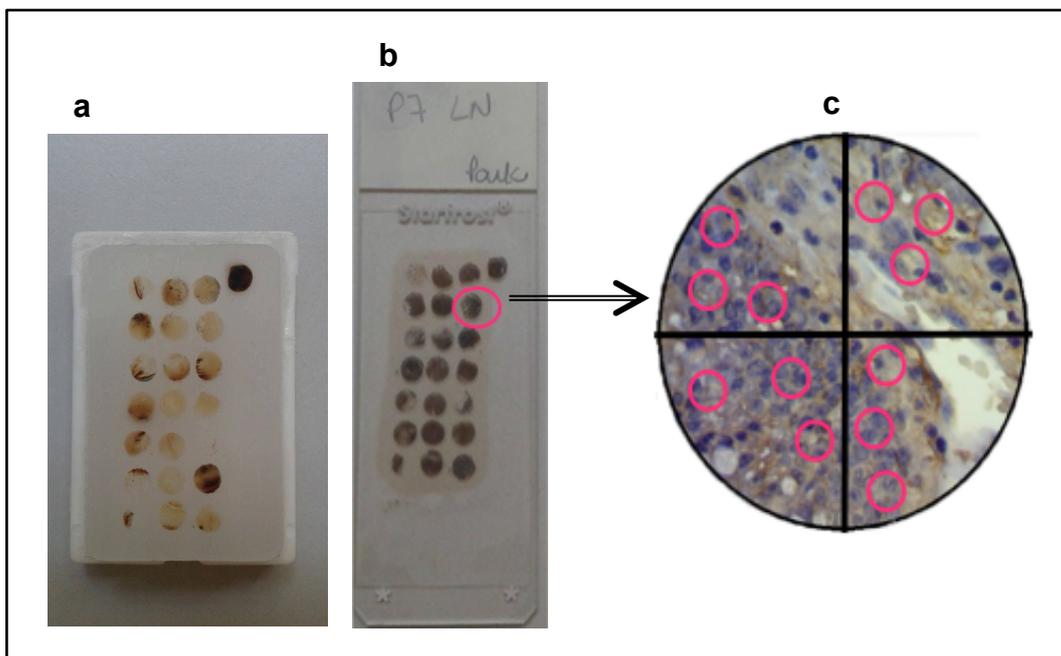
Figura 3 – Montagem do TMA



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 das amostras, que tem suas linhas e colunas previamente identificadas por um mapa em plano cartesiano.

A partir do TMA finalizado (Figura 4a), foram realizados cortes histológicos (Figura 4b) sequenciais de 4 μ m 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 imunohistoquímica (IHQ). A coloração HE foi realizada nas lâminas do primeiro corte de cada TMA para o controle morfológico da amostra.

Figura 4 – Exemplos de modelo de bloco e lâmina de TMA



Legenda: **a.** Blocos parafinados com as amostras dos blocos doadores; **b.** Lâmina com corte destes blocos, para leitura em microscópio óptico; **c.** Representação esquemática da leitura das lâminas, em que foram definidos quatro quadrantes, dos quais se fez três fotografias de áreas representativas do material amostrado, para posterior análise morfométrica (12 fotografias para cada caso).

4.3 Realização dos testes imunoistoquímicos

As lâminas preparadas para imunoistoquímica foram submetidas à desparafinização com xilol, à desidratação com banhos sucessivos de álcool e à reidratação com água. Álcool metílico e H₂O₂ foram utilizados 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, em câmara úmida, submetida a temperaturas entre 2 e 8°C, durante a noite.

Para análise imunoistoquímica foram utilizados os seguintes anticorpos primários:

- PARQUINA: anticorpo *anti-Parkin* monoclonal de camundongo, marca *RabMAb*[®], diluição 1:100;
- APC: anticorpo anti-APC monoclonal de camundongo, marca *RabMAb*[®], diluição 1:200;
- KI67: anticorpo anti-KI67 monoclonal de camundongo, marca *Dako*[®], diluição 1:150;

As condições, incluindo as diluições, para a incubação com os anticorpos primários em câmara úmida, foram estabelecidas pelos protocolos do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR. Da mesma forma, foram determinadas as condições para a incubação com polímero de revelação (*Spring*), adicionado após a incubação com os anticorpos, sendo composto por duas soluções, a primeira (*complement*) com o tempo de 10 minutos e a segunda (*conjugate*) com o tempo de 15 minutos. Para a revelação, foi adicionado o complexo DAB + substrato 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. Para a montagem das lâminas permanentes foi utilizada a resina histológica da marca *Entellan*[®]. As reações com controles externos positivos e negativos para cada anticorpo

foram concomitantes, estes últimos obtidos através da omissão do anticorpo primário.

4.4 Análise morfométrica – PARQUINA e APC

A análise da expressão das proteínas PARQUINA e APC foi realizada por técnica de morfometria, que permite a descrição quantitativa da área de expressão das proteínas, em micrômetros quadrados (μm^2). Assim as lâminas submetidas à imunistoquímica com os anticorpos anti-PARQUINA e anti-APC, foram inicialmente submetidas a leitura em microscópio óptico com objetiva de 40x, conectado a uma câmera *Dino-eye*[®] para registro de imagens fotográficas digitais, que a seguir foram analisadas com o programa *Image Pro Plus*[®] através da ferramenta de morfometria de cores. Para cada amostra de pólipo e de adenocarcinoma, foram identificados quatro campos de grande aumento (quadrantes), dos quais se realizou três fotografias de área representativa de cada quadrante, num total de 12 fotografias por caso (Figura 4c).

Foram analisadas três cores: castanho (reação positiva para o anticorpo monoclonal), azul (característica de imunonegatividade) e branca (referente a regiões de não interesse, posteriormente eliminadas da fotografia, conforme explicado a seguir). Uma amostra de cada cor a ser analisada foi fornecida ao programa, que gerou uma máscara, marcando com a cor vermelha as áreas previamente castanhas, com amarelo as áreas previamente azuis, e com verde as áreas que eram brancas. A máscara foi aplicada para cada imagem e o programa calculou automaticamente os micrômetros quadrados e a percentagem das áreas referentes a cada dor.

As fotografias (Figura 5a) foram analisadas individualmente, com o programa *Adobe Photoshop CS6 Extended*[®] (versão 2012). Foram eliminadas de cada uma das fotografias as regiões de não interesse (Figura 5b), representadas por estroma e artefatos, deixando-se apenas vilosidades e criptas (nos casos de pólipos) e área tumoral (nos adenocarcinomas). Após este tratamento das fotografias, foram submetidas à aplicação da máscara, a fim de medir as áreas de imunopositividade dos marcadores (Figura 5c) e o

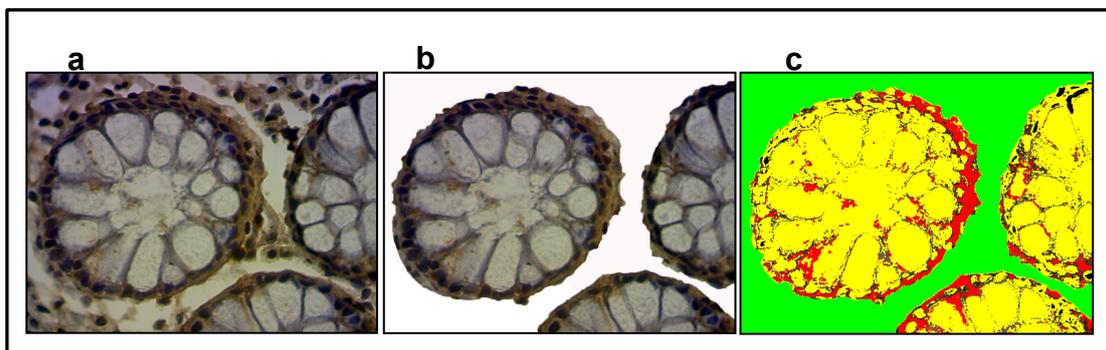
percentual de sua área, para o cálculo das médias.

Para cada quadrante analisado, o programa calculou o percentual de área positiva como sendo o total de área positiva (vermelha) dividido pela soma deste com o total de área negativa (amarela), em micrometros quadrados, conforme a equação abaixo:

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

Calculou-se a média do percentual da área de imunopositividade para cada quadrante, a partir disso calculou-se a média dos quadrantes em cada caso, obtendo-se o valor utilizado na análise estatística (média de imunopositividade).

Figura 5 – Análise morfométrica das amostras de pólipos.



Legenda: **a.** Imagem de um pólipos, representada por fotografia de uma área representativa em um dos quadrantes analisados, em aumento de 40x; **b.** Fotografia anterior, após eliminação das áreas de não interesse, imediatamente antes de realizar análise morfométrica; **c.** Análise morfométrica, em que se observa em verde as áreas de não interesse que foram previamente eliminadas, em amarelo as vilosidades e as criptas, e em vermelho as áreas de imunopositividade para o marcador imunohistoquímico utilizado.

4.5 Contagem celular – KI67

A avaliação da expressão da proteína KI67 foi realizada através da contagem dos núcleos positivos e negativos para a reação com o anticorpo

anti-KI67. Foi utilizado o microscópio *Olympus BX40*[®] para a realização da contagem. Através da objetiva de 40x foi selecionado o campo de visualização com maior positividade em cada lâmina 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 porcentagem, no qual foi obtida a estimativa de núcleos positivos e negativos por amostra.

Apenas as mostras de adenocarcinoma foram avaliadas para KI67 no presente estudo, as amostras os dados dos pólipos foram obtidos de estudo anterior²²⁵.

4.6 Análise estatística

Considerando o fato de que diversos pacientes contribuíram para a amostra com mais de um pólipo, foi necessário analisá-los dentro de um modelo estatístico que considerasse a estrutura hierárquica dos dados da pesquisa, neste caso, pólipos dentro do mesmo paciente, a fim de evitar possíveis vieses de análise. Para avaliar a associação entre fatores relativos a pólipos e a pacientes e a expressão dos marcadores, foram ajustados modelos univariados de regressão linear multinível, definindo-se pólipo como nível 1 e paciente como nível 2. A significância das variáveis foi avaliada pelo teste de Wald e os resultados foram apresentados em termos de coeficientes lineares das variáveis com intervalos de confiança de 95%. O coeficiente de correlação intraclasse foi estimado para avaliar a composição das variações dos marcadores.

A associação entre variáveis quantitativas foi feita estimando-se coeficientes de correlação de Pearson e a comparação entre grupos em relação à expressão de cada marcador foi feita usando-se o teste t de *Student* para amostras independentes ou o modelo de análise da variância (ANOVA) com um fator.

Finalmente, para a comparação dos grupos definidos por pólipo e adenocarcinoma foi usado o teste t de *Student* para amostras independentes, o teste exato de Fisher e o teste de Qui-quadrado. Valores de $p < 0,05$

indicaram significância estatística. Todos os dados foram analisados com o programa computacional *Stata* v.14[®].

5. RESULTADOS

5.1 Análise descritiva da amostra

A Tabela 3 sintetiza os dados epidemiológicos dos pacientes portadores de pólipos (n = 222) e portadores de adenocarcinoma colorretal (n= 73). Nela são mostrados os dados relativos a sexo, idade (pela classificação de Bethesda)²²⁶, lado do cólon acometido e grau histológico de diferenciação. Para a análise de lateralidade e diferenciação, foram considerados todos os pólipos (n = 284) do estudo, e não os pacientes individualmente. Todos os casos de lesões encontradas no reto foram classificados como pertencendo ao cólon esquerdo (36 casos de adenocarcinomas e 130 casos de pólipos).

Tabela 3 – Análise descritiva dos pacientes portadores de pólipos e adenocarcinomas.

		Pólipos		Adenocarcinomas	
		n	%	n	%
Sexo	Masculino	122	55,0	34	46,6
	Feminino	100	45,0	39	53,4
	Total	222	100,0	73	100,0
Idade*	≤ 45 anos	45	20,3	13	17,8
	46 a 55 anos	58	26,1	12	16,4
	≥ 56 anos	119	53,6	48	65,8
	Total	222	100,0	73	100,0
Lateralidade	Cólon Direito	121	42,6	18	24,7
	Cólon Esquerdo**	163	57,4	55	75,3
	Total	284	100,0	73	100,0
Grau de Diferenciação	Baixo grau	262	92,3	64	88,9
	Alto grau	22	7,7	8	11,1
	Total	284	100,0	72***	100,0

Legenda: dados epidemiológicos dos pacientes

* Idade, pela classificação de Bethesda²²⁶; ** cólon esquerdo inclui os casos de reto;

*** um dos casos de Adenocarcinoma não teve o grau de diferenciação classificado.

Foram identificados 122 pacientes com mais de um pólipo (55%), num total de 284 pólipos, que foram analisados individualmente e estão descritos

separadamente na Tabela 4. Com relação ao tamanho destes pólipos, a maioria (186; 65,5%) apresentou diâmetro entre 4 e 10mm; 30 (10,6%) possuíam diâmetro superior a 10mm. 257 pólipos (90,5%) foram classificados como sésseis. Considerando a classificação histológica, a maioria (192; 67,6%) apresentou displasia de baixo grau (LDA). Os pólipos hiperplásicos (PH) foram 45 (15,8%), seguidos pelos pólipos serrilhados sésseis (SSP; 25; 8,8%) e pelos adenomas com displasia de alto grau (HDA; 22; 7,7%).

Tabela 4 – Análise descritiva dos pólipos.

Variável	Classificação	N	%
Multiplicidade	Único	100	45,0
	Múltiplos	122	55,0
	Total	222	100
Tamanho	< 4 mm	68	23,9
	4 a 10 mm	186	65,5
	> 10 mm	30	10,6
	Total	284	100
Aspecto	Pediculado	27	9,5
	Séssil	257	90,5
	Total	284	100
Classificação Histológica	LDA	192	67,6
	SSP	25	8,8
	HDA	22	7,7
	PH	45	15,8
	Total	284	100

Legenda: LDA: adenoma de baixo grau; SSP: pólipo serrilhado séssil; HDA: adenoma de alto grau; PH: pólipo hiperplásico.

5.2 Análise da expressão imunoistoquímica das proteínas estudadas

A Tabela 5 mostra a imunoexpressão das proteínas estudadas nos pólipos, representada por média, mediana, valor mínimo, valor máximo e desvio padrão.

Tabela 5 – Imunoexpressão das proteínas analisadas nos pólipos.

Proteína	n*	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
PARQUINA	284	10,5	9,7	0,6	30,5	6,1
APC	257	18,9	18,3	2,4	43,3	7,3
KI67 (%)	252	43,3	40,0	10,0	80,0	14,8
PI3K	281	1283	486	7	8702	1779
COX-2	278	9688	10190	100	18279	3145
PTEN	283	2765	2173	161	11621	1969

* Os diferentes valores de “n” devem-se ao fato de o material amostral dos pólipos ser de dimensões muito pequenas, o que fez com que nem todos pudessem ser cortados várias vezes para montagem das lâminas de TMA, necessárias ao estudo imunoistoquímico.

A seguir, para cada uma destas proteínas, tomou-se como referência a PARQUINA e APC e testou-se a hipótese nula de que não existe correlação entre a imunoexpressão de cada uma delas em relação aos demais marcadores (coeficiente de correlação igual a zero), *versus* a hipótese alternativa de que existe correlação (coeficiente de correlação diferente de zero). Na Tabela 6, abaixo, são apresentados os coeficientes de correlação de Pearson estimados e os valores de p dos testes estatísticos. Identificamos correlação positiva ($p < 0,001$) entre a PARQUINA e as proteínas APC, PI3K e COX-2; bem como entre APC e PI3K, COX-2 e PTEN. Apesar de estatisticamente significativa, os coeficientes menores do que 0,5 implicam em uma fraca correlação entre as variáveis.

Tabela 6 – Correlação entre PARQUINA e APC e outros marcadores

Variáveis	n	Coefficiente de correlação de Pearson	Valor de p^*
PARQUINA x APC	257	0,23	<0,001*
PARQUINA x PI3K	281	0,28	<0,001*
PARQUINA x COX-2	278	0,31	<0,001*
PARQUINA x PTEN	283	0,10	0,097
PARQUINA x KI67	252	-0,09	0,171
APC x PI3K	256	0,12	0,049*
APC x COX-2	252	0,28	<0,001*
APC x PTEN	257	0,14	0,026*
APC x KI67	229	0,11	0,097

* Valores de $p < 0,05$.

Nas próximas duas tabelas, são apresentadas estatísticas descritivas da expressão de PARQUINA e APC entre os pacientes portadores de pólipos (Tabela 7) e dentro do grupo de pólipos considerados independentemente (Tabela 8), de acordo com as classificações das variáveis analisadas e os valores de p dos testes estatísticos. Para cada variável testou-se a hipótese nula de que as médias de imunopositividade dos marcadores analisados são iguais para todas as classificações da variável aplicada, *versus* a hipótese alternativa de que as médias não são todas iguais.

Ao se comparar a expressão da PARQUINA e APC com relação ao sexo, idade e ocorrência de múltiplos pólipos, não se observou diferença (Tabela 7).

Tabela 7 – Análise da imunoposição de PARQUINA e APC entre os pacientes portadores de pólipos, quanto às variáveis: sexo, idade e multiplicidade de pólipos.

Variável	Classificação	PARQUINA				APC			
		n*	Média	Desvio padrão	p^{**}	n*	Média	Desvio padrão	p^{**}
Sexo	Feminino	100	10,7	6,0	0,417	89	19,3	6,8	0,461
	Masculino	122	10,1	5,9		116	18,6	6,9	
Idade	≤ 45 anos	45	10,9	6,0	0,780	41	18,1	7,8	0,181
	46 a 55 anos	58	10,1	6,3		55	17,8	5,7	
	≥ 56 anos	119	10,3	5,7		109	19,7	7,0	
Multiplicidade de pólipos	Único	100	9,9	6,5	0,300	92	18,7	6,8	0,692
	Mais de 1	122	10,8	5,4		113	19,0	6,9	

* Os diferentes valores de “n” devem-se ao fato de o material amostral dos pólipos ser de dimensões muito pequenas, o que fez com que nem todos pudessem ser cortados várias vezes para montagem das lâminas de TMA, necessárias ao estudo imunoistoquímico de PARQUINA e APC;

** Teste t de *Student* para amostras independentes (sexo e multiplicidade) ou ANOVA com um fator (idade), $p < 0,05$.

Por outro lado, ao se observar a Tabela 8, notamos que houve diferença para a expressão de APC, sendo maior nos pólipos encontrados no lado direito do cólon ($p = 0,016$). Quanto à expressão da PARQUINA, houve diferença apenas em relação à classificação histológica do pólipo ($p < 0,001$). Devido a esse fato, realizaram-se comparações duas a duas entre os subtipos histológicos, apresentadas na Tabela 9.

Assim, a Tabela 9 apresenta as comparações entre os subtipos histológicos, analisados dois a dois, para a imunexpressão de PARQUINA. Essas comparações mostraram que há diferença entre os adenomas com displasia de baixo grau (LDA) em relação a todos os outros subtipos (para valores de $p < 0,05$). A expressão em LDA é menor.

Tabela 8 – Análise da imunexpressão de PARQUINA e APC no grupo de pólipos, em relação às variáveis de lateralidade, tamanho, aspecto, grau de diferenciação e histologia.

Variável	Classificação	PARQUINA				APC			
		n*	Média	Desvio padrão	p**	n*	Média	Desvio padrão	p**
Lateralidade	Direito	121	10,9	6,0	0,357	114	20,1	7,6	0,016
	Esquerdo	163	10,2	6,1		143	17,9	6,9	
Tamanho	< 4 mm	68	11,0	6,7	0,583	63	18,7	6,9	0,170
	4 a 10 mm	186	10,3	6,0		169	18,5	7,1	
	> 10 mm	30	11,0	5,4		25	21,5	8,8	
Aspecto	Pediculado	27	8,6	4,6	0,077	19	19,2	8,5	0,857
	Séssil	257	10,7	6,2		238	18,8	7,2	
Grau de diferenciação	Baixo	262	10,4	6,1	0,177	240	18,8	7,3	0,516
	Alto	22	12,2	6,1		17	20,0	7,8	
Classificação histológica	LDA	192	9,2	5,6	<0,001	176	18,7	7,5	0,068
	SSP	25	12,8	6,0		20	22,5	7,8	
	HDA	22	12,2	6,1		17	20,0	7,8	
	PH	45	14,1	6,2		44	17,5	5,6	

* Os diferentes valores de “n” devem-se ao fato de o material amostral dos pólipos ser de dimensões muito pequenas, o que fez com que nem todos pudessem ser cortados várias vezes para montagem das lâminas de TMA, necessárias ao estudo imunoistoquímico de PARQUINA e APC;

** Teste t de *Student* para amostras independentes (lateralidade, aspecto e grau de diferenciação) ou ANOVA com um fator (tamanho e classificação histológica), $p < 0,05$.

Tabela 9 – Comparações entre os grupos de classificação histológica entre si, analisados dois a dois, em relação à imunexpressão de PARQUINA.

Classes histológicas	p*
LDA x SSP	0,003*
LDA x HDA	0,021*
LDA x PH	<0,001*
SSP x HDA	0,717
SSP x PH	0,371
HDA x PH	0,206

*ANOVA com um fator, $p < 0,05$.

5.3 Análise da expressão de PARQUINA e APC por modelo de regressão linear multinível

Entendemos que as análises apresentadas anteriormente podem apresentar viés. Na análise da Tabela 7, estamos considerando que pólipos dentro de um mesmo paciente são independentes, o que não é uma suposição sustentável. Já na Tabela 8, estamos considerando a média de expressão de PARQUINA e APC de todos os pólipos de um mesmo paciente, desconsiderando uma possível variabilidade das expressões de marcadores desses pólipos. Para evitar estas duas fontes de confusão, foi necessário usar um modelo de análise que considere os pólipos dentro do mesmo paciente.

Para tanto, foram ajustados modelos de regressão linear multinível para a expressão de PARQUINA definindo-se dois níveis: pólipo (nível 1) e paciente (nível 2). Inicialmente, foi ajustado o modelo nulo, ou seja, sem quaisquer variáveis explicativas. A partir do ajuste deste modelo, foi estimado o coeficiente de correlação intraclasses (ICC) para a PARQUINA (0,365) e APC (0,322). Isto significa dizer que 36,5% das variações na expressão da PARQUINA e 33,2% das variações na expressão de APC são explicadas pelas variações entre pacientes, justificando a necessidade de se considerar uma estrutura hierárquica dos dados na análise.

Em seguida, foram ajustados modelos para a expressão dos marcadores, incluindo cada uma das variáveis relativas aos pólipos (nível 1) e cada uma das variáveis relativas aos pacientes (nível 2), de modo que o pólipo está “aninhado” (*nested*) ao paciente (modelos univariados). Para cada modelo (variável), testou-se a hipótese nula de que não há associação entre a variável e a expressão do marcador (coeficiente linear igual a zero), *versus* a hipótese alternativa de que há associação (coeficiente linear diferente de zero). Nas Tabelas 10 (PARQUINA) e 11 (APC) abaixo são apresentados, para cada variável, o valor estimado dos coeficientes lineares e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) para estes coeficientes.

A Tabela 10 indica que houve significância estatística para associação da expressão de PARQUINA em relação a todas as classes histológicas dos pólipos e para expressão dos marcadores PI3K, COX-2 e PTEN, com coeficiente positivo. Na Tabela 11, que analisa a expressão do APC em

relação às mesmas variáveis, verifica-se significância em relação à localização do pólipó no cólon esquerdo (incluindo reto), ao grupo de pólipos serrilhados sésseis (SSP) e aos marcadores PI3K, COX-2 e PTEN.

Tabela 10 - Avaliação da associação entre variáveis relativas ao pólipó e variáveis relativas ao paciente considerando uma estrutura hierárquica para a imunexpressão da PARQUINA

Variável	Coefficiente estimado	IC 95%	Valor de p^*
Variáveis relativas a paciente			
Idade (ref: ≤ 45 anos)	-	-	-
46 a 55 anos	-0,86	-3,18 ; 1,45	0,464
≥ 56 anos	-0,33	-2,35 ; 1,70	0,752
Sexo (ref: feminino)	-0,36	-1,89 ; 1,16	0,640
Pólipó (ref: único)	0,84	-0,70 ; 2,38	0,283
Variáveis relativas a pólipó			
Localização (ref: esquerdo)	0,47	-0,89 ; 1,83	0,501
Aspecto (ref: pediculado)	1,51	-0,93 ; 3,94	0,226
Tamanho (ref: < 4 mm)			
< 4 mm	-	-	-
4 a 10 mm	-0,93	-2,63 ; 0,76	0,281
> 10 mm	0,44	-2,16 ; 3,05	0,739
Grau de diferenciação (ref: baixo)	1,70	-0,81 ; 4,22	0,184
Classificação histológica (ref: LDA)			
LDA	-	-	-
SSP	3,76	1,36 ; 6,15	0,002*
HDA	2,86	0,44 ; 5,29	0,021*
PH	4,83	2,97 ; 6,69	<0,001*
PI3K (dividido por 1000)	1,32	0,95 ; 1,69	<0,001*
COX-2 (dividido por 1000)	0,63	0,41 ; 0,84	<0,001*
PTEN (dividido por 1000)	0,57	0,22 ; 0,92	0,001*
KI67 (dividido por 10)	-0,47	-0,97 ; 0,02	0,062

*Modelo de Regressão Linear Multinível, $p < 0,05$.

Tabela 11 - Avaliação da associação entre variáveis relativas ao pólipos e variáveis relativas ao paciente considerando uma estrutura hierárquica para a imunexpressão de APC.

Variável	Coefficiente estimado	IC 95%	Valor de p*
Variáveis relativas a paciente			
Idade (ref: ≤ 45 anos)	-	-	-
46 a 56 anos	-0,44	-3,29; 2,41	0,761
≥ 56 anos	1,42	-1,10 ; 3,93	0,269
Sexo (ref: feminino)	-0,95	-2,84 ; 0,93	0,324
Pólipo (ref: único)	0,41	-2,50 ; 2,33	0,672
Variáveis relativas a pólipo			
Localização (ref: esquerdo)	2,20	0,51 ; 3,90	0,011*
Aspecto (ref: pediculado)	-0,85	-4,22 ; 2,53	0,623
Tamanho (ref: < 4 mm)			
< 4 mm	-	-	-
4 a 10 mm	-0,09	-2,18 ; 2,00	0,934
> 10 mm	2,76	-0,55 ; 6,07	0,102
Grau de diferenciação (ref: baixo)	1,47	-1,97; 4,91	0,403
Classificação histológica (ref: LDA)			
LDA	-	-	-
SSP	3,54	0,26 ; 6,82	0,03*
HDA	1,51	-1,94 ; 4,96	0,391
PH	-1,32	-3,68 ; 1,03	0,271
PI3K (dividido por 1000)	0,59	0,10 ; 1,09	0,018*
COX2 (dividido por 1000)	0,61	0,34 ; 0,88	<0,001*
PTEN (dividido por 1000)	0,56	0,13 ; 0,99	0,011*
KI67 (dividido por 10)	0,60	-0,03 ; 1,22	0,062

*Modelo de Regressão Linear Multinível, $p < 0,05$.

5.4 Comparação entre pólipos e adenocarcinomas

Na Tabela 12 estão os valores da imunexpressão da PARQUINA, APC e KI67, para os pólipos e os adenocarcinomas. Nesta análise, os pólipos de um mesmo paciente foram considerados independentemente. Foi encontrada maior expressão da PARQUINA e do APC nos adenocarcinomas,

com uma média de imunopositividade superior em relação aos pólipos ($p < 0,001$). Por outro lado, a imunopositividade da proteína Ki67 foi superior nos pólipos ($p = 0,027$).

Tabela 12 – Valores de imunopressão da PARQUINA, APC e Ki67, para os pólipos e os adenocarcinomas.

Marcador	Grupo	n*	Média	Desvio padrão	Valor de p^{**}
PARQUINA	Pólipo	284	10,5	6,1	<0,001
	Adenocarcinoma	73	16,5	8,6	
APC	Pólipo	257	18,9	7,3	<0,001
	Adenocarcinoma	72	32,5	14,1	
Ki67	Pólipo	252	43,3	14,8	0,027
	Adenocarcinoma	73	39,0	14,1	

* Os diferentes valores de “n” devem-se ao fato de o material amostral dos pólipos ser de dimensões muito pequenas, o que fez com que nem todos pudessem ser cortados várias vezes para montagem das lâminas de TMA, necessárias ao estudo imunohistoquímico de PARQUINA, APC e Ki67;

** Teste t de *Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

A Tabela 13 mostra a formação de quatro subgrupos, definidos pelo grau de diferenciação dos pólipos e adenocarcinomas, considerando os pólipos como independentes dentro de um mesmo paciente. Observando os resultados, verifica-se que há maior expressão da PARQUINA nos adenocarcinomas de baixo grau, ao passo que há maior expressão da proteína APC nos adenocarcinomas de alto grau ($p < 0,001$). Para a expressão de Ki67, não encontramos diferença entre os subgrupos.

Tabela 13 – Subgrupos, definidos pelo grau de diferenciação dos pólipos e adenocarcinomas, considerando os pólipos como independentes dentro de um mesmo paciente.

Variável	Subgrupos	n*	Média	Mediana	Desvio padrão	Valor de p**
PARQUINA	Pólipo baixo grau	262	10,4	9,6	6,1	<0,001
	Pólipo alto grau	22	12,2	11,6	6,1	
	Adenocarcinoma baixo grau	64	16,8	15,1	8,6	
	Adenocarcinoma alto grau	8	15,3	19,8	8,4	
APC	Pólipo baixo grau	240	18,8	18,3	7,3	<0,001
	Pólipo alto grau	17	20,0	19,6	7,8	
	Adenocarcinoma baixo grau	64	32,4	31,6	14,0	
	Adenocarcinoma alto grau	8	33,2	34,6	16,5	
KI67	Pólipo baixo grau	233	42,9	40,0	14,7	0,080
	Pólipo alto grau	19	48,4	40,0	15,7	
	Adenocarcinoma baixo grau	64	39,2	38,0	13,6	
	Adenocarcinoma alto grau	8	39,5	44,5	17,8	

* Os diferentes valores de “n” devem-se ao fato de o material amostral dos pólipos ser de dimensões muito pequenas, o que fez com que nem todos pudessem ser cortados várias vezes para montagem das lâminas de TMA, necessárias ao estudo imunoistoquímico de PARQUINA, APC e Ki67;

*ANOVA com um fator, $p < 0,05$.

Considerando-se que foi encontrada diferença entre os grupos em relação a PARQUINA e APC, para estas variáveis os grupos foram comparados dois a dois. Na Tabela 14, abaixo, são apresentados os valores de p dessas comparações.

Tabela 14 – Expressão das proteínas estudadas para os subgrupos, definidos pelo grau de diferenciação dos pólipos e adenocarcinomas, comparados dois a dois.

Grupos comparados	Valor de p*	
	PARQUINA	APC
Pólipo baixo grau x Pólipo alto grau	0,217	0,608
Pólipo baixo grau x Adenocarcinoma baixo grau	<0,001*	<0,001*
Pólipo baixo grau x Adenocarcinoma alto grau	0,039*	<0,001*
Pólipo alto grau x Adenocarcinoma baixo grau	0,005*	<0,001*
Pólipo alto grau x Adenocarcinoma alto grau	0,258	0,001*
Adenocarcinoma baixo grau x Adenocarcinoma alto grau	0,549	0,817

*ANOVA com um fator, $p < 0,05$.

Analisamos, em seguida, estes subgrupos dentro da estrutura hierárquica multinível, estimando o coeficiente linear (IC 95%) sobre a expressão dos marcadores, que estão representados na Tabela 15. A partir disso, pudemos gerar os Gráficos 1, 2 e 3.

Tabela 15 – Análise do efeito conjunto de pólipos/adenocarcinoma e grau de diferenciação sobre a expressão de PARQUINA, APC e KI67, considerando a estrutura hierárquica multinível.

Marcador	Variável	Coefficiente estimado	IC 95%	Valor de p^{**}
PARQUINA	Grau de diferenciação (ref: baixo)	0,94	-1,43; 3,31	0,437
	pólipo/adenocarcinoma (ref: pólipos)	6,19	4,43; 9,95	<0,001**
APC	Grau de diferenciação (ref: baixo)	1,52	-2,05; 5,09	0,405
	pólipo /adenocarcinoma (ref: pólipos)	13,5	11,0; 15,9	<0,001**
KI67*	Grau de diferenciação (ref: baixo)	0,40	-0,17; 0,97	0,172
	pólipo /adenocarcinoma (ref: pólipos)	-0,42	-0,80; -0,04	0,032**

* KI67 dividido por 10; ** $p < 0,05$.

No modelo da PARQUINA (Gráfico 1) encontramos resultado ($p < 0,001$) para maior expressão do gene *PARK2* no conjunto de adenocarcinomas, em relação aos pólipos, na presença de outra variável incluída no modelo (grau de diferenciação). No Gráfico 2, modelo do APC, também verificamos este resultado para adenocarcinomas ($p < 0,001$). Analisando este modelo para o KI67 (Gráfico 3), encontramos maior expressão do marcador em pólipos ($p = 0,032$).

Gráfico 1 – Análise multinível do efeito conjunto de pólipo/adenocarcinoma e grau de diferenciação sobre a expressão de PARQUINA.

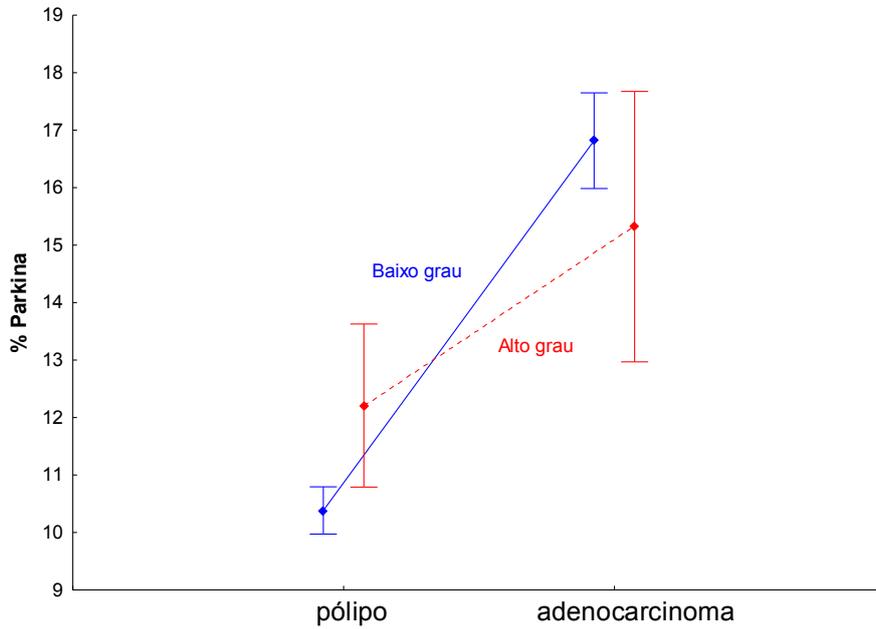


Gráfico 2 – Análise multinível do efeito conjunto de pólipo/adenocarcinoma e grau de diferenciação sobre a expressão de APC.

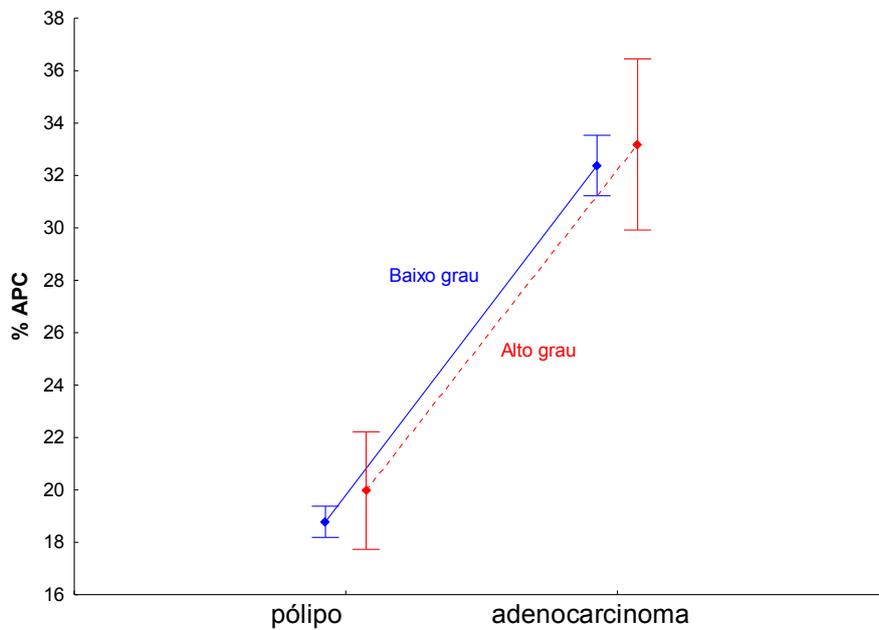
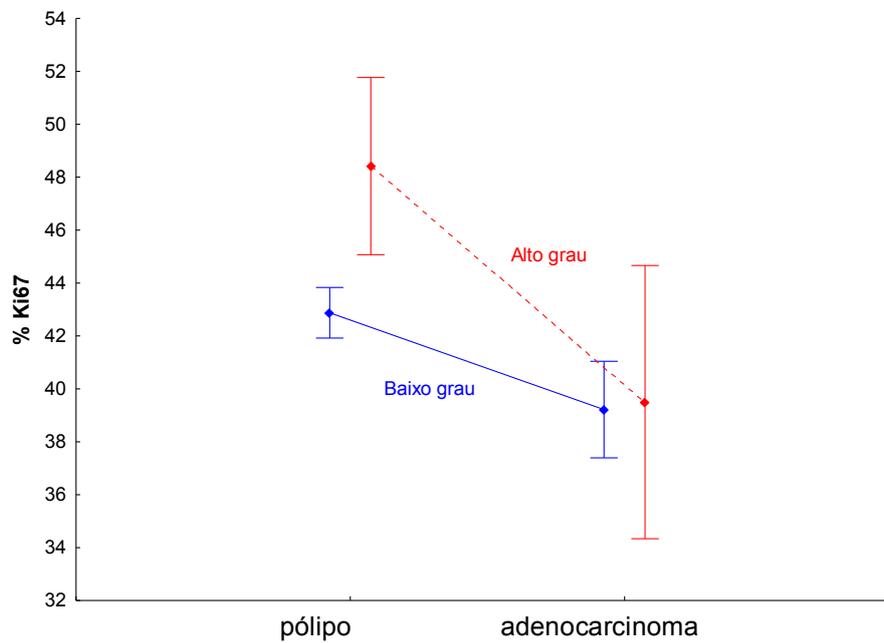


Gráfico 3 – Análise multinível do efeito conjunto de pólipo/adenocarcinoma e grau de diferenciação sobre a expressão de Ki67.



6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo revelam maior expressão de PARQUINA e APC em adenocarcinomas do que nos pólipos analisados. Com relação ao KI67, o achado foi inverso, maior expressão nos pólipos.

Considerando a diferença observada em relação à expressão de PARQUINA e APC, foi decidido analisá-los, pólipos e adenocarcinomas, em subgrupos, definidos pelo grau de diferenciação, e compará-los dois a dois (Tabela 13).

Neste caso, também foram encontradas diferença significativa ($p < 0,05$) para PARQUINA e APC, com valores de imunoexpressão superiores em adenocarcinomas (de alto e baixo grau) quando comparados com pólipos (com displasia de alto e baixo grau).

Tal fato sugere que à medida que um pólipo neoplásico se desdiferencia evolutivamente, caminhando para a formação de um adenocarcinoma, a expressão de PARQUINA e APC aumenta, ao contrário do que inicialmente era esperado. Ora, se ambos são produtos de genes supressores tumorais, quando mutados estariam favorecendo a evolução neoplásica, desta forma, deveriam ser expressos em quantidades progressivamente menores. Entretanto, esta premissa não pôde ser confirmada com os resultados observados. Por outro lado, é importante notar que a análise imunoistoquímica realizada não permite investigar se a proteína expressa é funcional ou não.

A seguir, os subgrupos foram analisados dentro da estrutura hierárquica multinível, com o objetivo de se evitar um possível viés de interpretação. Caso contrário, os pólipos dentro de um mesmo paciente estariam sendo considerados independentes, o que não é uma suposição sustentável. E também uma possível variabilidade de expressão dos marcadores PARQUINA, APC e KI67 estaria sendo desconsiderada, nesses pólipos. Daí a necessidade de se utilizar o modelo multinível, que considera a estrutura hierárquica dos pólipos dentro de um mesmo paciente, já que 55% dos pacientes portadores de pólipos incluídos no estudo tiveram mais de um pólipo que foi removido e analisado.

De fato, depois da análise multinível, com 4 subgrupos de pólipos e

carcinomas, na presença da variável “grau de diferenciação”, foi confirmado que ocorre maior expressão de PARQUINA e APC no conjunto de adenocarcinomas ($p < 0,001$) do que nos grupos de pólipos (Gráficos 1 e 2).

Igualmente, ao analisar a estrutura hierárquica multinível para a imunexpressão de APC, foi identificada uma maior expressão desta proteína para pólipos no lado esquerdo do cólon, estatisticamente significativo ($p = 0,011$), o que é esperado na via clássica do modelo de carcinogênese. Corroborando, assim, as conclusões anteriores²²⁵ que sugerem que os resultados observados com esses marcadores podem estar associados com a progressão de lesões precursoras para o câncer colorretal.

Quanto ao marcador KI67, novamente o oposto se verifica, maior expressão em pólipos do que em carcinomas (Gráfico 3), apesar de uma menor significância estatística ($p = 0,032$).

Estes resultados se aproximam, pelo menos em parte, dos encontrados por Poulougiannis *et al.*¹⁹³, que verificaram que a deleção ou alteração no gene *PARK2* estaria intrinsecamente relacionada à deficiência de expressão do gene *APC*, sendo que ambos estariam cooperando conjuntamente para acelerar a progressão tumoral, conforme os autores observaram em experimentos com camundongos *knockout* para estes genes. Estes animais apresentaram um crescimento acelerado de adenomas, quando comparados com animais mutados apenas para *APC*. Este foi um dos estudos mais marcantes em sugerir o gene *PARK2* como supressor tumoral no carcinoma colorretal.

Um artigo de revisão abordando o papel da PARQUINA em carcinogênese, publicado por Xu *et al.*²²⁹, explora os mecanismos de inativação genética de *PARK2* conhecidos até o momento. Além disso, comenta o fato de alguns estudos biológicos mostrarem funções pró-sobrevivência e de supressão de crescimento celular, para a PARQUINA.

Há crescente aumento nas evidências que mostram a inativação somática do gene *PARK2* em vários tipos de câncer humanos, embora a associação entre genótipo e susceptibilidade ao câncer ainda seja motivo de grande debate^{193,196,197,203}. Esses mecanismos de inativação podem ocorrer por mais de uma via, como mutação, alteração do número de cópias, hipermetilação e pela expressão de proteínas (mRNA) aberrantes. Análises

por sequenciamento de próxima geração reportam que a frequência de mutações de *PARK2* em CCR estariam entre 2,4 – 5,6%²²⁹. Além disso, diversas linhagens celulares de câncer abrigando essas mutações foram identificadas em locais bem conservados da estrutura genética.

Perda de heterozigiosidade e alteração no número de cópias de DNA foram encontradas em outros tipos de câncer, diferentes do colorretal, ao passo que hipermetilação do promotor é um mecanismo epigenético comum para alterar a expressão gênica, tendo sido encontrado em 4,7% dos casos de CCR¹⁹³. Além destes mecanismos, *splicing* alternativo ou aberrante também pode levar a expressão anormal de *PARK2*, cujos transcritos foram identificados em 42% de portadores de carcinoma colorretal.

Estudos com moscas e ratos mutantes para *PARK2* mostraram defeitos em mecanismos de defesa antioxidante²³⁰. A expressão ectópica de PARQUINA reduz o nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) e aumenta o nível celular de glutathiona, ao passo que mutações em *PARK2* reduzem os níveis de glutathiona e aumentam o dano oxidativo intracelular. Assim, a perda de *PARK2* pode contribuir para a produção de ROS durante a transformação oncogênica, semelhante ao efeito da inativação de *TP53*²³¹. Paradoxalmente, a atividade da PARQUINA pode ser necessária para os tumores dependentes de *KRAS* manterem o controle de qualidade mitocondrial e absorverem o *stress* oxidativo, pois a geração de espécies reativas de oxigênio mitocondrial é essencial para o crescimento destes tumores²³². Neste contexto, *PARK2* torna-se uma proteína a favor da sobrevivência em células cancerígenas transformadas pelo *KRAS*. Por outro lado, o excesso de ROS modula a sulfonação, desdobramento de proteínas e solubilidade da PARQUINA, levando à redução da sua atividade.

Interessante notar que estes dados, embora necessitem estudos mais aprofundados, criam uma expectativa de que a inativação de *PARK2*, em tumores avançados seria um fator protetor, ou de melhor prognóstico, com aumento, pelo menos teórico, de sobrevida. Assim, consideramos notável que os achados do presente estudo evidenciaram aumento significativo da expressão de PARQUINA (e também de APC) em adenocarcinomas colorretais em comparação com pólipos neoplásicos, muito embora essa análise não tenha sido correlacionada com fatores prognósticos. Não é

possível deixar de mencionar que tal fato está em consonância com os achados da pesquisa anterior, em que houve aumento da expressão de PARQUINA nos adenocarcinomas colorretais avançados²⁰⁴. Este aumento de expressão foi correlacionado positivamente com aumento de sobrevida e, portanto, melhor prognóstico em comparação com carcinomas de mais baixo grau e em estádios menos avançados de desenvolvimento.

Essa correlação específica não encontra relatos semelhantes na literatura, o que nos leva a supor que os níveis elevados de PARQUINA encontrados em nossas amostras de CCR, estariam envolvidos em mecanismos de controle da progressão tumoral por meio da influência em alguma outra via, ou proteína.

7. CONCLUSÕES

a) Houve fraca correlação entre a expressão, em pólipos, de PARQUINA e de APC, PI3K, COX-2, bem como entre a expressão de APC e de PI3K, COX-2, PTEN;

b) Não houve correlação entre variáveis relativas aos pacientes (sexo, idade e multiplicidade de pólipos) e a expressão de PARQUINA, APC e KI67;

c) Considerando uma estrutura hierárquica multinível, foi possível observar associação entre a expressão de:

- i. PARQUINA e todas as classes histológicas dos pólipos (SSP, HDA e PH);
- ii. PARQUINA e de PI3K, COX-2 e PTEN;
- iii. APC e localização do pólipo no cólon esquerdo (incluindo reto);
- iv. APC e o grupo de pólipos serrilhados sésseis (SSP);
- v. APC e a expressão de PI3K, COX-2 e PTEN.

d) A análise do efeito conjunto de pólipos e adenocarcinomas, pelo grau de diferenciação, sobre a expressão de PARQUINA, APC e KI67, considerados no contexto da estrutura hierárquica multinível, revelou maior expressão de PARQUINA e APC em adenocarcinomas do que nos pólipos analisados. Com relação ao KI67, o achado foi inverso, sua maior expressão foi encontrada nos pólipos com displasia de alto grau.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Podemos afirmar, pelos resultados apresentados, que a expressão tecidual de PARQUINA em pólipos e adenocarcinomas colorretais tem um comportamento que acompanha a expressão de outra proteína, muito mais bem estabelecida como supressora tumoral, a APC. Ambas tendem a ser expressas de maneira sinérgica, aumentando ou diminuindo juntas. Com relação à sua atuação no modelo de progressão tumoral de Vogelstein¹⁶⁵, admite-se como evento inicial nos tumores da via “clássica”, ou seja, do cólon esquerdo, a mutação de APC. A partir daí, uma sequência de eventos ocorrem em diversas fases da evolução de um pólipo, até que acumule mutações suficientes para apresentar-se com displasia, que irá invariavelmente evoluir para carcinoma. Tem sido sugerido que a proteína multifuncional PARQUINA, produto do gene *PARK2*, tenha função supressora tumoral, semelhante ao APC, porém sua posição no modelo de Vogelstein nunca foi proposto. A análise da expressão destes genes, em amostras sequenciais de pólipos neoplásicos e de adenocarcinomas colorretais poderia auxiliar no esclarecimento desta hipótese. Inesperadamente, os valores de imunexpressão encontrados para ambos os marcadores revelaram-se progressivamente maiores, conforme caminhamos numa sequência de adenomas para adenocarcinomas. Isto significa que a eventual mutação destes genes, fato que leva a uma esperada redução de sua expressão nos primeiros eventos da via clássica, resulta paradoxalmente num aumento da expressão mais tardiamente, quando a célula tornou-se maligna e com alto potencial de invasão tumoral e agressividade (neoplasias pouco diferenciadas). Concomitantemente, poderíamos esperar um aumento do marcador de divisão celular e formação de proteínas de membrana, o KI67, porém os dados apresentados revelam um comportamento inversamente proporcional ao da PARQUINA e APC. Tais dados necessitam de validação em estudos com populações amostrais maiores e, preferencialmente, em vários centros, para que se possa afirmar com maior grau de acurácia o papel da PARQUINA nos carcinomas colorretais e sua relação com APC e outras proteínas que atuam no ciclo celular.

Pelo exposto, concluímos que a PARQUINA e o APC têm comportamento biológico semelhante, no que se refere à supressão tumoral, porém com tendência a aumento “de novo” de sua expressão conforme a célula neoplásica avança na sequencia adenoma-adenocarcinoma. Resta saber se o aumento dos níveis proteicos observados é acompanhado de função biológica compatível, em nível celular, o que é motivo para se prosseguir nas investigações.

9. REFERÊNCIAS

1. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, et al. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1). pii: E197.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A., Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017; 67: 7-30.
3. Waisberg J, Anderi ADV, Cardoso PAS, et al. Extensive colorectal lymphomatous polyposis complicated by acute intestinal obstruction: a case report. *J Med Case Rep.* 2017; 11(1):190.
4. Stoner P, Ghaffaripour T, Cohen D. Aggressive large cell neuroendocrine carcinoma of the sigmoid colon in a patient with ulcerative colitis. *BMJ Case Rep.* 2017 Aug 7;2017. pii.
5. Matsushashi N, Takahashi T, Tomita H, et al. Evaluation of treatment for rectal neuroendocrine tumors sized under 20mm in comparison with the WHO 2010 guidelines. *Mol Clin Oncol.* 2017; 7(3): 476-480.
6. Guerra GR, Kong CH, Warriar SK, et al. Primary squamous cell carcinoma of the rectum: an update and implications for treatment. *World J Gastrointest Surg.* 2016; 8(3): 252-65.
7. Frezza AM, Stacchiotti S, Gronchi A. Highlights in soft tissue sarcomas and gastrointestinal stromal tumours (GIST) trials reported at ASCO 2017 Annual Meeting. *BMC Med.* 2017; 15(1): 160.
8. Hirji SA, Senturk JC, Hornick J, et al. A rare case of interdigitating dendritic cell sarcoma of the rectum: review of histopathology and management strategy. *BMJ Case Rep.* 2017; pii: bcr-2017-221754.

9. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2016/2017. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>>. Acesso em: 17 jan. 2017. Rio de Janeiro – RJ: INCA, 2016.
10. Jemal A, Siegel RL, Ward E et al, Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009; 59: 225-49.
11. Saragiotto DF, Riechelmann R, Ribeiro Jr U, et al. Tumores do Cólon *in* Hoff PMG, Katz A, Chammas T, et al (eds). Tratado de Oncologia, São Paulo: Editora Atheneu, 2013; Cap 123: pag. 1731-66.
12. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control*. 2013; 24:1207-22.
13. Sharma I, Zhu Y, Woodrow JR, et al. Inflammatory diet and risk for colorectal cancer: A population-based case-control study in Newfoundland, Canada. *Nutrition*. 2017; 42: 69-74.
14. Momenyan S, Ghalane S, Sarvi F, et al. The Association between Lifestyle, Occupational, and Reproductive Factors and Colorectal Cancer Risk *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017; 18(8): 2157-2162.
15. Ambe PC, Jansen S, Zirngibl H. New trend in colorectal cancer in Germany: are young patients at increased risk for advanced colorectal cancer? *World J Surg Oncol*. 2017; 15(1): 159.
16. Theodoratou E, Timofeeva M, Li X, et al. Nature, Nurture, and Cancer Risks: Genetic and Nutritional Contributions to Cancer. *Annu Rev Nutr*. 2017; 37: 293-320.
17. Beaugerie L, Svrcek M, Seksik P, et al. Risk of colorectal high-grade dysplasia and cancer in a prospective observational cohort of patients

- with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2013; 145(1): 166-175.
18. Garg SK, Velayos FS, Kisiel JB. Intestinal and Nonintestinal Cancer Risks for Patients with Crohn's Disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2017; 46(3): 515-529.
 19. Bojesen RD, Riis LB, Høgdall E, et al. Inflammatory Bowel Disease and Small Bowel Cancer Risk, Clinical Characteristics, and Histopathology: A Population-Based Study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017 S1542-3565; (17)30799-1.
 20. Cohen-Mekelburg S, Schneider Y, Gold S, et al. Advances in the Diagnosis and Management of Colonic Dysplasia in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2017; 13(6): 357-362.
 21. Liao X, Lochhead P, Nishihara R, et al. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med*. 2012; 367: 1596–1606.
 22. Tomitão MTP, Nahas SC, Kubrusly MS, et al. Cyclooxygenase-2 gene polymorphisms and susceptibility to colorectal cancer in a Brazilian population. *J Gastrointest Oncol*. 2017; 8(4): 629-635.
 23. Shaw E, Warkentin MT, McGregor SE, et al. Intake of dietary fibre and lifetime non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) use and the incidence of colorectal polyps in a population screened for colorectal cancer. *J Epidemiol Community Health*. 2017; 71(10): 961-969.
 24. Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26:5783-8.

25. Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol*. 2006; 101: 385-98.
26. Basso G, Bianchi P, Malesci A, et al. Hereditary or sporadic polyposis syndromes. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017; 31(4): 409-417.
27. Bhattacharya P, McHugh TW. Lynch Syndrome. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431096>>. Acesso em 16 set 2017.
28. Senore C, Bellisario C, Segnan N. Distribution of colorectal polyps: Implications for screening. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017; 31(4): 481-488.
29. Chittleborough TJ, Kong JC, Guerra GR, et al. Colonoscopic surveillance: quality, guidelines and effectiveness. *ANZ J Surg*. 2017 Aug 13. [Epub ahead of print]
30. Allen JE, Sharma P. Polyp characterization at colonoscopy: Clinical implications. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017; 31(4): 435-440.
31. Qiu M, Hu J, Yang D, et al. Pattern of distant metastases in colorectal cancer: a SEER based study. *Oncotarget*. 2015; 6(36): 38658-66.
32. Tørring ML, Murchie P, Hamilton W et al. Evidence of advanced stage colorectal cancer with longer diagnostic intervals: a pooled analysis of seven primary care cohorts comprising 11.720 patients in five countries. *Br J Cancer*. 2017; 117(6): 888-897.
33. Chen TM, Huang YT, Wang GC. Outcome of colon cancer initially presenting as colon perforation and obstruction. *World J Surg Oncol*. 2017; 15(1): 164.

34. Rex DK, Boland CR, Dominitz JA, et al. Colorectal Cancer Screening: Recommendations for Physicians and Patients From the U.S. Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2017; 153(1): 307-323.
35. Sa S, Li J, Li X, et al. Development and validation of a preoperative prediction model for colorectal cancer T-staging based on MDCT images and clinical information. *Oncotarget*. 2017; 8(33): 55308-55318.
36. Dam C, Lindebjerg J, Jakobsen A, et al. Local staging of sigmoid colon cancer using MRI. *Acta Radiol Open*. 2017; 6(7): 1-6.
37. Shin YS, Yu CS, Park JH, et al. Total Mesorectal Excision Versus Local Excision After Favorable Response to Preoperative Chemoradiotherapy in "Early" Clinical T3 Rectal Cancer: A Propensity Score Analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2017; 99(1): 136-144.
38. Abdel-Rahman O, Kumar A, Kennecke HF, et al. Impact of Duration of Neoadjuvant Radiation on Rectal Cancer Survival: A Real World Multi-center Retrospective Cohort Study. *Clin Colorectal Cancer*. 2017 Jun 23. [Epub ahead of print]
39. Barina A, De Paoli A, Delrio P, et al. Rectal sparing approach after preoperative radio- and/or chemotherapy (RESARCH) in patients with rectal cancer: a multicentre observational study. *Tech Coloproctol*. 2017 Jul 28. [Epub ahead of print]
40. Lee KC, Chung KC, Chen HH, et al. Prognostic factors of overall survival and cancer-specific survival in patients with resected early-stage rectal adenocarcinoma: a SEER-based study. *J Investig Med*. 2017 Jul 21. [Epub ahead of print]
41. Sasaki T, Ito Y, Ohue M, et al. Postoperative Chemoradiotherapy After Local Resection for High-Risk T1 to T2 Low Rectal Cancer: Results of a

- Single-Arm, Multi-Institutional, Phase II Clinical Trial. *Dis Colon Rectum*. 2017; 60(9): 914-921.
42. Martini G, Troiani T, Cardone C, et al. Present and future of metastatic colorectal cancer treatment: A review of new candidate targets. *World J Gastroenterol*. 2017; 23(26): 4675-4688.
 43. Tol J, Koopman M, Cats A, et al. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009; 360: 563–572.
 44. Petrovic N. Targeting Angiogenesis in Cancer Treatments: Where do we Stand? *J Pharm Pharm Sci*. 2016; 19: 226–238.
 45. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2: 127–137.
 46. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*. 2008; 358: 1160–1174.
 47. Sforza V, Martinelli E, Ciardiello F, et al. Mechanisms of resistance to anti-epidermal growth factor receptor inhibitors in metastatic colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2016; 22:6345–6361.
 48. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, et al. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*. 2002; 418:934.
 49. Yang H, Higgins B, Kolinsky K, et al. Antitumor activity of BRAF inhibitor vemurafenib in preclinical models of BRAF-mutant colorectal cancer. *Cancer Res*. 2012;72: 779-89.
 50. Kopetz S, Desai J, Chan E, et al. Phase II Pilot Study of Vemurafenib in Patients With Metastatic BRAF-Mutated Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33: 4032-38.

51. Corcoran RB, Atreya CE, Falchook GS, et al. Combined BRAF and MEK Inhibition With Dabrafenib and Trametinib in BRAF V600-Mutant Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2015; 33:4023-31.
52. Bendell JC, Kim TW, Goh BC. Clinical activity and safety of cobimetinib (cobi) and atezolizumab in colorectal cancer (CRC). *J Clin Oncol*. 2016; 34 Suppl:abstr 3502.
53. Liao X, Lochhead P, Nishihara R, et al. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med*. 2012; 367: 1596-606.
54. Zhao Z, Li J, Ye R, et al. A phase II clinical study of combining FOLFIRI and bevacizumab plus erlotinib in 2nd-line chemotherapy for patients with metastatic colorectal cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96(30): e7182.
55. Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C, et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016; 17:738-46.
56. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Rastreamento / Série A. Normas e Manuais Técnicos Cadernos de Atenção Primária, n. 29: 75-7. Disponível em: <http://dab.saude.gov.br/portaldab/biblioteca.php?conteudo=publicacoes/cab29>. Brasília - DF: Ministério da Saúde, 2010. Acesso em 23 jan 2017.

57. Bergerot CD, Philip EJ, Bergerot PG, et al. Quality Oncology Practice Initiative Can Guide and Improve Oncology Providers' Training in Brazil. *J Glob Oncol*. 2016; 3(3):189-93.
58. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014; 515: 563-7.
59. Ahn SM, Ansari AA, Kim J, et al. The somatic POLE P286R mutation defines a unique subclass of colorectal cancer featuring hypermutation, representing a potential genomic biomarker for immunotherapy. *Oncotarget*. 2016; 7:68638-49.
60. Domingo E, Freeman-Mills L, Rayner E, et al. Somatic POLE proofreading domain mutation, immune response, and prognosis in colorectal cancer: a retrospective, pooled biomarker study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2016; 1(3):207-16.
61. Kandiah K, Subramaniam S, Bhandari P. Polypectomy and advanced endoscopic resection. *Frontline Gastroenterol*. 2017; 8(2): 110-114.
62. Satoh K, Yachida S, Sugimoto M, et al. Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114(37): E7697-E7706.
63. Atkin W, Wooldrage K, Brenner A, et al. Adenoma surveillance and colorectal cancer incidence: a retrospective, multicentre, cohort study. *Lancet Oncol*. 2017; 18(6): 823-834.
64. Patel A, Williams N, Parsons N, et al. Risk factors for metachronous adenoma in the residual colon of patients undergoing curative surgery for colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2017 Aug 21. [Epub ahead of print]

65. Connell LC, Mota JM, Braghiroli MI, Hoff PM. The Rising Incidence of Younger Patients With Colorectal Cancer: Questions About Screening, Biology, and Treatment. *Curr Treat Options Oncol.* 2017; 18(4):23.
66. Rex DK, Lehman GA, Ulbright TM, et al. Colonic neoplasia in asymptomatic persons with negative fecal occult blood tests: influence of age, gender, and family history. *Am J Gastroenterol.* 1993; 88(6): 825-31.
67. Skinner CS, Ahn C, Halm EA, et al. Recommendation of colorectal cancer testing among primary care patients younger than 50 with elevated risk. *Prev Med.* 2017; 102: 20-23.
68. Rex DK. Polyp detection at colonoscopy: Endoscopist and technical factors. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017; 31(4): 425-433.
69. Øines M, Helsingen LM, Bretthauer M, Emilsson L. Epidemiology and risk factors of colorectal polyps. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017; 31(4): 419-424.
70. Chen QF, Zhou XD, Sun YJ, et al. Sex-influenced association of non-alcoholic fatty liver disease with colorectal adenomatous and hyperplastic polyps. *World J Gastroenterol.* 2017; 23(28): 5206-5215.
71. Fedewa SA, Flanders WD, Ward KC, et al. Racial and Ethnic Disparities in Interval Colorectal Cancer Incidence: A Population-Based Cohort Study. *Ann Intern Med.* 2017; 166(12): 857-866.
72. Sonnenberg A, Turner KO, Genta RM. Ethnic variations in the occurrence of colonic neoplasms. *United European Gastroenterol J.* 2017; 5(3): 424-431.

73. Shapero TF, Chen GI, Devlin T, et al. Obesity Increases Prevalence of Colonic Adenomas at Screening Colonoscopy: A Canadian Community-Based Study. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2017; 2017: 8750967.
74. Kim JH, Cho KI, Kim YA, Park SJ. Elevated neutrophil-to-lymphocyte ratio in metabolic syndrome is associated with increased risk of colorectal adenoma. *Metab Syndr Relat Disord*. 2017 Sep 14. [Epub ahead of print]
75. Zhou L, Zhang H, Sun S, et al. Clinical, endoscopic and pathological characteristics of colorectal polyps in elderly patients: Single-center experience. *Mol Clin Oncol*. 2017; 7(1): 81-87.
76. Byeon JS. How to recognize, characterize, and manage premalignant and malignant colorectal polyps in Lee SW, Ross HM, Rivadeneira DE, et al (eds). *Advanced colonoscopy and endoluminal surgery*, Springer International Publishing, 2017; Chapter 12:115-30.
77. dos Santos CEO, Pereira-Lima JC, Onófrio FQ. Large colorectal lesions: evaluation and management. *GE Port J Gastroenterol*. 2016; 23(4): 197-207.
78. Endoscopic Classification Review Group. Update on the Paris classification of superficial neoplastic lesions in the digestive tract. *Endoscopy*. 2005; 37(6): 570–8.
79. Campos FG, Figueiredo MN, Martinez CA. Colorectal cancer risk in hamartomatous polyposis syndromes. *World J Gastrointest Surg*. 2015; 7(3): 25-32.
80. Politis DS, Katsanos KH, Tsianos EV, Christodoulou DK. Pseudopolyps in inflammatory bowel diseases: Have we learned enough? *World J Gastroenterol*. 2017; 23(9): 1541-1551.

81. Facciorusso A, Antonino M, Di Maso M, Barone M, Muscatiello N. Non-polypoid colorectal neoplasms: Classification, therapy and follow-up. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(17): 5149-57.
82. Vleugels JLA, Hazewinkel Y, Fockens P, Dekker E. Natural history of diminutive and small colorectal polyps: a systematic literature review. *Gastrointest Endosc*. 2017; 85(6): 1169-1176.
83. Williams GT, Arthur JF, Bussey HJ, et al. Metaplastic polyps and polyposis of the colorectum. *Histopathology*. 1980 Mar; 4(2): 155–70.
84. Ishida H, Ishibashi K, Iwama T. Malignant tumors associated with juvenile polyposis syndrome in Japan. *Surg Today*. 2017 May 26. [Epub ahead of print]
85. Ma C, Giardiello FM, Montgomery EA. Upper tract juvenile polyps in juvenile polyposis patients: dysplasia and malignancy are associated with foveolar, intestinal, and pyloric differentiation. *Am J Surg Pathol*. 2014; 38(12): 1618-26.
86. Watanabe T, Itabashi M, Shimada Y, et al. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2010 for the treatment of colorectal cancer. *Int J Clin Oncol*. 2012; 17(1): 1–29.
87. Shivdasani R. Molecular biology of colorectal cancer in DeVita Jr VT, Lawrence TS, Rosenberg SA (eds). *Cancer - Principles & Practice of Oncology*, 9th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2011; Chapter 88: pag 1074-83.
88. Margagnoni G, Angeletti S, D'Ambra G, et al. Outcome and risk of recurrence for endoscopic resection of colonic superficial neoplastic lesions over 2 cm in diameter. *Dig Liver Dis*. 2016; 48(4): 399-403.

89. Hirose R, Yoshida N, Murakami T, et al. Histopathological analysis of cold snare polypectomy and its indication for colorectal polyps 10-14 mm in diameter. *Dig Endosc.* 2017; 29(5): 594-601.
90. Ma MX, Bourke MJ. Sessile Serrated Adenomas: How to Detect, Characterize and Resect. *Gut Liver.* 2017 May 11. [Epub ahead of print]
91. Pidala MJ, Cusick MV. The Difficult Colorectal Polyp. *Surg Clin North Am.* 2017; 97(3): 515-527.
92. Zippi M, Hong W, Crispino P, Traversa G. New device to implement the adenoma detection rate. *World J Clin Cases.* 2017; 5(7): 258-263.
93. Winawer SJ, Zauber AG, O'Brien MJ, et al. The National Polyp Study. Design, methods, and characteristics of patients with newly diagnosed polyps. The National Polyp Study Workgroup. *Cancer.* 1992; 70(5 Suppl): 1236-45.
94. Klein JL, Okcu M, Preisegger KH, Hammer HF. Distribution, size and shape of colorectal adenomas as determined by a colonoscopist with a high lesion detection rate: Influence of age, sex and colonoscopy indication. *United European Gastroenterol J.* 2016; 4(3): 438-48.
95. Tanaka Y, Yamano HO, Yamamoto E, et al. Endoscopic and molecular characterization of colorectal sessile serrated adenoma/polyps with cytologic dysplasia. *Gastrointest Endosc.* 2017 May 10. pii: S0016-5107(17) 31888-6. [Epub ahead of print]
96. O'Connell B, Hafiz N, Crockett S. The Serrated Polyp Pathway: Is It Time to Alter Surveillance Guidelines? *Curr Gastroenterol Rep.* 2017; 19(10): 52.
97. Li D, Woolfrey J, Jiang SF, et al. Diagnosis of sessile serrated adenoma after educational training in a large, community-based, integrated

healthcare setting. *Gastrointest Endosc.* 2017 Aug 23. pii: S0016-5107(17)32194-6. [Epub ahead of print]

98. Salimzadeh H, Bishehsari F, Amani M, et al. Advanced colonic neoplasia in the first degree relatives of colon cancer patients: A colonoscopy-based study. *Int J Cancer.* 2016; 139(10): 2243-51.
99. Silva P, Albuquerque C, Lage P, et al. Serrated polyposis associated with a family history of colorectal cancer and/or polyps: The preferential location of polyps in the colon and rectum defines two molecular entities. *Int J Mol Med.* 2016; 38(3): 687-702.
100. Hisamatsu K, Noguchi K, Tomita H, et al. Distinctive crypt shape in a sessile serrated adenoma/polyp: Distribution of Ki67-, p16INK4a-, WNT5A-positive cells and intraepithelial lymphocytes. *Oncol Rep.* 2017; 38(2): 775-784.
101. Sekine S, Ogawa R, Hashimoto T, et al. Comprehensive characterization of RSPO fusions in colorectal traditional serrated adenomas. *Histopathology.* 2017; 71(4): 601-9.
102. Lieberman S, Walsh T, Schechter M, et al. Features of patients with Hereditary Mixed Polyposis Syndrome caused by duplication of GREM1 and implications for screening and surveillance. *Gastroenterology.* 2017; 152(8): 1876-1880.
103. Plesec T, Brown K, Allen C, et al. Clinicopathological features of a kindred with SCG5-GREM1-associated hereditary mixed polyposis syndrome. *Hum Pathol.* 2017; 60:75-81.
104. Schramm C, Kaiser M, Drebber U, et al. Factors associated with reclassification of hyperplastic polyps after pathological reassessment from screening and surveillance colonoscopies. *Int J Colorectal Dis.* 2016; 31(2): 319-25.

105. Jessup JM, Goldberg RM, Asare EA, et al. Colon and Rectum *in* Amin MB (editor-in-chief). *AJCC Cancer Staging Manual*, 8th Edition. Springer Nature, 2017; Chapter 20: pag 251-74.
106. Maciver AH, Lee N, Skitzki JJ, Boland PM, Francescutti V. Cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (CS/HIPEC) in colorectal cancer: Evidence-based review of patient selection and treatment algorithms. *Eur J Surg Oncol*. 2017; 43(6): 1028-1039.
107. Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, et al. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 264-71.
108. Rogers AC, Winter DC, Heeney A, et al. Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2016; 115(7): 831-40.
109. Franko J, Shi Q, Goldman CD, et al. Treatment of colorectal peritoneal carcinomatosis with systemic chemotherapy: a pooled analysis of north central cancer treatment group phase III trials N9741 and N9841. *J Clin Oncol*. 2012; 30: 263-7.
110. Fisher ER, Sass R, Palekar A, Fisher B, Wolmark N. Dukes' classification revisited. Findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projects (Protocol R-01). *Cancer*. 1989; 64(11): 2354-60.
111. Chapuis PH, Fisher R, Dent OF, Newland RC, Pheils MT. The relationship between different staging methods and survival in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 1985; 28(3): 158-61.

112. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015; 21(11): 1350-6.
113. Graham DM, Coyle VM, Kennedy RD, et al. Molecular subtypes and personalized therapy in metastatic colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2016; 12: 141–50.
114. National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology – Colon Cancer, version 2.2017. Disponível em: <https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#colon>. Acesso em 19 ago 2017.
115. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990; 61(5): 759-67.
116. Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB, et al. Hereditary colorectal cancer syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline endorsement of the familial risk-colorectal cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines. *J Clin Oncol.* 2015; 33(2): 209-17.
117. Stoffel EM, Yurgelun MB Genetic predisposition to colorectal cancer: Implications for treatment and prevention. *Semin Oncol.* 2016; 43(5): 536-542.
118. Gold B. Somatic mutations in cancer: Stochastic versus predictable. *Mutat Res.* 2017; 814: 37-46.
119. Sabbaga J. Biologia molecular dos tumores do trato gastrointestinal *in* Hoff PMG, Katz A, Chammas T, et al (eds). Tratado de Oncologia, São Paulo: Editora Atheneu, 2013; Cap 116: pag. 1615-24.

120. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012; 487(7407): 330-7.
121. Ismaiel NE, Sharaf WM, Helmy DO, et al. Detection of cancer stem cells in colorectal cancer: histopathological and immunohistochemical study. *Open Access Maced J Med Sci*. 2016 4(4): 543-547.
122. Rapozo DC, Grinmann AB, Carvalho AT, et al. Analysis of mutations in TP53, APC, K-ras, and DCC genes in the non-dysplastic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis*. 2009; 24(10): 1141-8.
123. Frattini M¹, Balestra D, Suardi S, et al. Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(12 Pt 1): 4015-21.
124. Scarpa M, Scarpa M, Castagliuolo I, et al. Aberrant gene methylation in non-neoplastic mucosa as a predictive marker of ulcerative colitis-associated CRC. *Oncotarget*. 2016; 7(9): 10322-31.
125. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004; 20: 781-810.
126. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*. 2000; 14: 1837-51.
127. Zhang H, Berezov A, Wang Q, et al. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest*. 2007; 117: 2051-8.
128. Thierry AR, El Messaoudi S, Mollevi C, et al. Clinical utility of circulating DNA analysis for rapid detection of actionable mutations to select metastatic colorectal patients for anti-EGFR treatment. *Ann Oncol*. 2017; 28(9): 2149-2159.

129. Ponz-Sarvise M, Rodriguez J, Viudez A, et al. Epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer treatment: what's new? *World J Gastroenterol.* 2007; 13: 5877-87.
130. Okada Y, Kimura T, Nakagawa T, et al. EGFR Downregulation after Anti-EGFR Therapy Predicts the Antitumor Effect in Colorectal Cancer. *Mol Cancer Res.* 2017 Jul 11. [Epub ahead of print]
131. Ketzer S, Schimmel K, Koopman M, Guchelaar HJ. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Panitumumab in the Treatment of Colorectal Cancer. *Clin Pharmacokinet.* 2017 Aug 29. [Epub ahead of print]
132. Battaglin F, Dadduzio V, Bergamo F, et al. Anti-EGFR monoclonal antibody panitumumab for the treatment of patients with metastatic colorectal cancer: an overview of current practice and future perspectives. *Expert Opin Biol Ther.* 2017; 17(10): 1297-1308.
133. Au TH, Wang K, Stenehjem D, Garrido-Laguna I. Personalized and precision medicine: integrating genomics into treatment decisions in gastrointestinal malignancies. *J Gastrointest Oncol.* 2017;8(3):387-404.
134. Pohl M, Schmiegel W. Therapeutic Strategies in Diseases of the Digestive Tract - 2015 and Beyond Targeted Therapies in Colon Cancer Today and Tomorrow. *Dig Dis.* 2016; 34(5): 574-9.
135. Health Quality Ontario. KRAS Testing for Anti-EGFR Therapy in Advanced Colorectal Cancer: An Evidence-Based and Economic Analysis. *Ontario Health Technology Assessment Series.* 2010; 10(25): 1-49.
136. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989; 49: 4682-9.

137. Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem.* 1987; 56: 779-827.
138. Ince TA, Richardson AL, Bell GW, et al. Transformation of different human breast epithelial cell types leads to distinct tumor phenotypes. *Cancer Cell.* 2007; 12:160-70.
139. Parsons BL, Meng F. *K-RAS* mutation in the screening, prognosis and treatment of cancer. *Biomark Med.* 2009; 3: 757-69.
140. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90: 675-84.
141. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science.* 1989; 244: 207-11.
142. Ohue M, Tomita N, Monden T, et al. A frequent alteration of p53 gene in carcinoma in adenoma of colon. *Cancer Res.* 1994; 54(17): 4798-804.
143. Kim YW, Lee S, Park JH, Yoon TY, Park YK, Yang MH. An immunohistochemical study of the expression of p53 protein in colon cancer. *J Korean Med Sci.* 1995; 10(3): 176-82.
144. Giaretti W, Rapallo A, Sciutto A, et al. Intratumor heterogeneity of k-ras and p53 mutations among human colorectal adenomas containing early cancer. *Anal Cell Pathol.* 2000; 21(2): 49-57.
145. Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, et al. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet.* 1996; 13: 343-6.

146. Tanaka T, Watanabe T, Kitayama J, et al. Chromosome 18q deletion as a novel molecular predictor for colorectal cancer with simultaneous hepatic metastasis. *Diagn Mol Pathol*. 2009; 18(4): 219-25.
147. Lech G, Slotwinski R, Krasnodebski IW. The role of tumor markers and biomarkers in colorectal cancer. *Neoplasma*. 2014; 61(1): 1-8.
148. Mehlen P, Mazelin L. The dependence receptors DDC and UNC5H as a link between neuronal guidance and survival. *Biol Cell*. 2003; 95: 425-36.
149. Duman-Scheel M. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) pathfinding: axon guidance gene finally turned tumor suppressor. *Curr Drug Targets*. 2012; 13(11): 1445-53.
150. Takagi Y, Kohmura H, Futamura M, et al. Somatic alterations of the *DPC4* gene in human colorectal cancers *in vivo*. *Gastroenterology*. 1996 Nov; 111(5): 1369-72.
151. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al. Chromosome 17 deletions and *p53* gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*. 1989; 244: 217-21.
152. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. *Cancer*. 1996; 78(6): 1149-67.
153. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993; 260: 812-6.
154. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, et al. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet*. 2009; 76: 1-18.

155. Carethers JM. Microsatellite Instability Pathway and EMAST in Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2017; 13(1): 73-80.
156. Babaei H, Zeinalian M, Emami MH, Hashemzadeh M, Farahani N, Salehi R. Simplified microsatellite instability detection protocol provides equivalent sensitivity to robust detection strategies in Lynch syndrome patients. *Cancer Biol Med.* 2017; 14(2): 142-150.
157. Kelkar YD, Strubczewski N, Hile SE, et al. What is a microsatellite: a computational and experimental definition based upon repeat mutational behavior at A/T and GT/AC repeats. *Genome Biol Evol.* 2010; 2: 620-35.
158. Chang L, Chang M, Chang HM, Chang F. Microsatellite Instability: A Predictive Biomarker for Cancer Immunotherapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017 Sep 4. [Epub ahead of print]
159. Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, et al. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res.* 1997; 57(2): 300-3.
160. de la Chapelle A, Hampel H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28(20): 3380-7.
161. Kane MF, Loda M, Gaida GM, et al. 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.* 1997; 57(5): 808-11.
162. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 609-18.

163. Farchoukh L, Kuan SF, Dudley B, Brand R, Nikiforova M, Pai RK. MLH1-deficient Colorectal Carcinoma With Wild-type BRAF and MLH1 Promoter Hypermethylation Harbor KRAS Mutations and Arise From Conventional Adenomas. *Am J Surg Pathol*. 2016; 40(10): 1390-9.
164. Jones HG, Jenkins G, Williams N, et al. Genetic and epigenetic Intra-tumour heterogeneity in colorectal cancer. *World J Surg*. 2017; 41(5): 1375-83.
165. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988; 319(9):525-32.
166. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009; 361(25): 2449–2460.
167. Nagai Y, Sunami E, Yamamoto Y, et al. LINE-1 hypomethylation status of circulating cell-free DNA in plasma as a biomarker for colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(7): 11906-16.
168. Sánchez-Vega F, Gotea V, Chen YC, Elnitski L. CpG island methylator phenotype in adenocarcinomas from the digestive tract: Methods, conclusions, and controversies. *World J Gastrointest Oncol*. 2017; 9(3): 105-120.
169. MacCallum DE, Hall PA. The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKi67. *J Pathol*. 2000; 191(3): 286-98.
170. Yang Y, Li J, Jin L, et al. Independent Correlation Between Ki67 Index and Circulating Tumor Cells in the Diagnosis of Colorectal Cancer. *Anticancer Res*. 2017; 37(8): 4693-700.
171. Yaeger R, Cercek A, Chou JF, et al. *BRAF* mutation predicts for poor outcomes after metastasectomy in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2014; 120(15): 2316-24.

172. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2016; 27(8): 1386-422.
173. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, et al. Prognostic role of *KRAS* and *BRAF* in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol*. 2010; 28(3): 466-74.
174. Zhao L, Vogt PK. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene*. 2008; 27(41): 5486-96.
175. Zhao L, Vogt PK. Hot-spot mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase (p13K): differential interactions with the regulatory subunit p85 and with RAS. *Cell Cycle*. 2010; 9(3): 596-600.
176. Lindhurst MJ, Parker VE, Payne F, et al. Mosaic overgrowth with fibroadipose hyperplasia is caused by somatic activating mutations in PIK3CA. *Nat Genet*. 2012; 44(8): 928-33.
177. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004;304:554.
178. Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, Hartleb D, Stoecklein NH, Gabbert HE. Prevalence and heterogeneity of *KRAS*, *BRAF*, and *PIK3CA* mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. *Clin Cancer Res* 2010; 16:790–9.
179. Nosho K, Kawasaki T, Ohnishi M, et al. *PIK3CA* mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations. *Neoplasia* 2008; 10:534–41.

180. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13(5): 283-96.
181. Tan MH, Mester JL, Ngeow J, Rybicki LA, Orloff MS, Eng C. Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(2): 400-7.
182. Yin Y, Shen WH. PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene.* 2008; 27(41): 5443-53.
183. Naguib A, Cooke JC, Happerfield L, et al. Alterations in PTEN and PIK3CA in colorectal cancers in the EPIC Norfolk study: associations with clinicopathological and dietary factors. *BMC Cancer.* 2011;11:123.
184. Soumaoro LT, Uetake H, Higuchi T, Takagi Y, Enomoto M, Sugihara K. Cyclooxygenase-2 expression: a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(24): 8465-71.
185. Sheehan KM, O'Connell F, O'Grady A, et al. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and characteristics of malignant transformation in human colorectal adenomas. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004; 16(6): 619-25.
186. Fux R, Schwab M, Thon KP, Gleiter CH, Fritz P. Cyclooxygenase-2 expression in human colorectal cancer is unrelated to overall patient survival. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(13): 4754-60.
187. Brown JR, DuBois RN. COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention. *J Clin Oncol.* 2005; 23(12): 2840-55.
188. Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. Aspirin and the Risk of Colorectal Cancer in Relation to the Expression of COX-2. *New Engl J Med.* 2007; 356(21): 2131-42.

189. Ogino S, Brahmandam M, Kawasaki T, Kirkner GJ, Loda M, Fuchs CS. Combined analysis of COX-2 and p53 expressions reveals synergistic inverse correlations with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Neoplasia*. 2006; 8(6): 458-64
190. Kawasaki T, Nosho K, Ohnishi M, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression is common in serrated and non-serrated colorectal adenoma, but uncommon in hyperplastic polyp and sessile serrated polyp/adenoma. *BMC Cancer*. 2008; 8:33.
191. *PRKN* Gene. The Genetics Home Reference, US National Library of Medicine. Disponível em: <<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PRKN>>. Acesso em 28 jun 2017.
192. Shimura H, Hattori N, Kubo Si, et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet*. 2000 Jul; 25(3): 302-5.
193. Pouligiannis G, McIntyre RE, Dimitriadi M, et al. *PARK2* deletions occur frequently in sporadic colorectal cancer and accelerate adenoma development in *APC* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(34): 15145-50.
194. Denison SR, Callahan G, Becker NA, et al. Characterization of FRA6E and its potential role in autosomal recessive juvenile parkinsonism and ovarian cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003 Sep; 38(1): 40-52.
195. Veeriah S, Taylor BS, Meng S, et al. Somatic mutations of the Parkinson's disease-associated gene *PARK2* in glioblastoma and other human malignancies. *Nat Genet*. 2010 Jan; 42(1): 77-82.
196. Fujiwara M, Marusawa H, Wang H, et al. Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2008; 27: 6002-11.

197. Picchio MC, Martin ES, Cesari R, et al. Alterations of the tumor suppressor gene *Parkin* in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(8): 2720-4.
198. Stieg DC, Cooper KF. Parkin New Cargos: a New ROS Independent Role for Parkin in Regulating Cell Division. *React Oxyg Species (Apex).* 2016; 2(5): 315-24.
199. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature.* 1998; 392: 605-8.
200. Panicker N, Dawson VL, Dawson TM. Activation mechanisms of the E3 ubiquitin ligase parkin. *Biochem J.* 2017; 474(18): 3075-86.
201. Mira MT, Alcaïs A, Nguyen VT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with *PARK2* and *PACRG*. *Nature.* 2004 Feb; 427(6975): 636-40.
202. Lizama BN, Palubinsky AM, McLaughlin B. Alterations in the E3 ligases Parkin and CHIP result in unique metabolic signaling defects and mitochondrial quality control issues. *Neurochem Int.* 2017. pii: S0197-0186(17)30042-6.
203. Agirre X, Román-Gómez J, Vázquez I, et al. Abnormal methylation of the common *PARK2* and *PACRG* promoter is associated with downregulation of gene expression in acute lymphoblastic leukemia and chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer.* 2006; 118(8): 1945-53.
204. Silva, CCV. Estudo imunoistoquímico de PARQUINA em adenocarcinoma colorretal. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2016. Disponível em:

<https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=3628579>. Acesso em 22 jul 2017.

205. Cho KR, Vogelstein B. Suppressor gene alterations in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *J Cell Biochem Suppl.* 1992; 16G:137-41.
206. Polyak K, Li Y, Zhu H, et al. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet.* 1998; 20(3): 291-3.
207. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature.* 1992; 359(6392): 235-7.
208. Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(15): 7950-4.
209. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature.* 1997; 386(6625): 623-7.
210. Nowak MA, Komarova NL, Sengupta A, et al. The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(25): 16226-31.
211. Parsons R, Myeroff LL, Liu B, et al. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1995; 55(23): 5548-50.
212. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature.* 2002; 418(6901):934.

213. Hwang PM, Bunz F, Yu J, et al. Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Nat Med.* 2001; 7(10): 1111-7.
214. Polyak K, Waldman T, He TC, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev.* 1996; 10(15): 1945-52.
215. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993; 9(4): 138-41.
216. Cho KR, Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma - carcinoma sequence. *Cancer.* 1992; 70(6 Suppl): 1727-31.
217. Buckhaults P, Rago C, St Croix B, et al. Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors. *Cancer Res.* 2001; 61(19): 6996-7001.
218. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell.* 1992; 70(4): 523-6.
219. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science.* 1990; 249(4971): 912-5.
220. Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, et al. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res.* 1994; 54(21): 5523-6.
221. Shih IM, Zhou W, Goodman SN, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 2001; 61(3): 818-22.

222. Polyak K, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colorectal neoplasia. *Am J Pathol.* 1996; 149(2): 381-7.
223. Traverso G, Shuber A, Levin B, et al. Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med.* 2002; 346(5): 311-20.
224. Vogelstein B, Kinzler KW. Colorectal cancer and the intersection between basic and clinical research. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1994; 59: 517-21.
225. Anselmi Jr, RA. Expressão imuno-histoquímica da COX2, PIK3CA, PTEN e Ki67 em pólipos colorretais esporádicos. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2016. Disponível em: <https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=3798368>. Acesso em 22 jul 2017.
226. Umar A, Boland CR, Terdiman, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J. Natl. Cancer Inst.* 2004; 96(4): 261–8.
227. Schuler SL, Gurmini J, Cecílio WAC, Viola de Azevedo ML, Olandoski M, de Noronha L. Hepatic and thymic alterations in newborn offspring of malnourished rat dams. *J Parenter Enteral Nutr.* 2008; 32: 184-9.
228. Kampf C, Olsson I, Ryberg U, et al. Production of tissue microarrays, immunohistochemistry staining and digitalization within the human protein atlas. *J Vis Exp.* 2012; 63: e3620.
229. Xu L, Lin DC, Yin D, Koeffler HP. An emerging role of *PARK2* in cancer. *J Mol Med (Berl).* 2014; 92(1): 31-42.

230. Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem.* 2004; 279(18): 18614–22.
231. Ekholm-Reed S, Goldberg MS, Schlossmacher MG, Reed SI. Parkin-dependent degradation of the f-box protein fbw7beta promotes neuronal survival in response to oxidative stress by stabilizing mcl-1. *Mol Cell Biol.* 2013; 33(18): 3627–43.
232. Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, et al. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(19): 8788–93.