



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO – 2012/2016

**Associação de marcadores de células tronco-tumorais com variáveis clínicas
no adenocarcinoma colorretal humano**

Ana Cristina Seixas Greca
ORIENTADORA: Dra. Andréa Novais Moreno-Amaral

ANA CRISTINA SEIXAS GRECA

**Associação de marcadores de células tronco-tumorais com variáveis clínicas
no adenocarcinoma colorretal humano**

Tese apresentada como requisito para grau de
Doutorado pelo Programa de Pós Graduação em
Ciências da Saúde, Escola de Medicina,
Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Novais Moreno-Amaral

CURITIBA
Dezembro / 2016

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB 9/1118

G789a Greca, Ana Cristina Seixas
2016 Associação dos marcadores de células-tronco tumorais com variáveis clínicas no adenocarcinoma colorretal humano / Ana Cristina Seixas Greca ; orientadora: Andréa Novais-Amaral. – 2016.
51 f. ; il. : 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2016
Bibliografia: f. 44-51

1. Neoplasias colorretais. 2. Células-tronco neoplásicas. 3. Receptores de hialuronatos. 4. Proteínas proto-oncogênicas c-kit. 5. Antígenos AC133.
I. Novais-Amaral, Andréa. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD. 20. ed. – 616.994347



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

Aos 14 dias do mês de dezembro de 2016, realizou-se a sessão pública de defesa de tese, "Associação de marcadores de células-tronco tumorais com variáveis clínicas no adenocarcinoma colorretal humano" apresentado por Ana Cristina Seixas Greca para obtenção do título de Doutor, Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. ^o Dr. ^a Andrea Novais Moreno do Amaral (PUCPR) –	
Prof. ^o Dr. ^a Lucia de Noronha (PUCPR)	
Prof. ^o Dr. ^a Patricia Maria S. Campelo (PUCPR)	
Prof. ^o Dr. ^a Iris Rabinovich (UFPR)	
Prof. Dr. Raul Alberto Anselmi Junior (HNSG)	

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

Prof. ^o Dr. ^a Andrea Novais Moreno do Amaral	Conceito: <u>APROVADA</u>
Prof. ^o Dr. ^a Lucia de Noronha	Conceito: <u>APROVADO</u>
Prof. ^o Dr. ^a Patricia Maria S. Campelo	Conceito: <u>A PROVADO</u>
Prof. ^o Dr. ^a Iris Rabinovich	Conceito: <u>APROVADA</u>
Prof. Dr. Raul Alberto Anselmi Junior	Conceito: <u>Aprovada</u>

Parecer Final: Aprovada

Observações da Banca Examinadora:

Prof.^o Dr.^a Andrea Novais Moreno do Amaral
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho
Coordenador do PPGCS PUCPR

Aos meus pais Aracy e Evandro *in memoriam*,
meus exemplos de generosidade, integridade e
amor a esta filha. Aos meus amados filhos
Marianna e Leonardo, por iluminarem e darem
sentido à minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná- PUCPR, pela concessão de bolsa-professor, que permitiu a realização do Doutorado no Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Escola de Medicina desta Universidade.

À Professora Doutora Andrea Novais Moreno-Amaral por ter aceitado o desafio da minha orientação e pela sua significativa dedicação na produção deste trabalho.

À Professora Doutora Lúcia de Noronha pela valiosa colaboração técnico-científica que viabilizou o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em especial às biólogas Ana Paula Camargo e Marina Luise Viola de Azevedo pela fundamental ajuda na confecção dos TMA e na aplicação dos marcadores imunohistoquímicos.

À aluna do curso de Ciências Biológicas da PUCPR, Ana Carolina Gadotti pelo inestimável trabalho na realização da morfometria e na colaboração para a confecção do artigo científico.

À Professora Doutora Marcia Olandoski pela realização da análise estatística deste estudo.

Ao laboratório Multiusuário de Microscopia de Fluorescência Convencional e Confocal do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, em especial ao Professor Doutor Edvaldo Silva Trindade, pela permissão para utilização do scanner de lâminas.

Ao professor Doutor Cláudio de Paula Soares Greca, meu marido, pelo incentivo e apoio incondicional à minha carreira acadêmica-científica.

À Marianna Seixas Greca e Leonardo Seixas Greca, meus preciosos filhos, pelo amor e incentivo incondicionais demonstrados a mim, todos os dias.

SUMÁRIO

1. Introdução	7
1.1 Câncer	7
1.2 Câncer Colorretal	9
1.3 Carcinogênese	12
1.4 Correlação entre Câncer Colorretal e Célula Tronco Tumoral	14
1.5 Marcadores de Célula Tronco Tumoral.....	15
2. Justificativa.....	19
3. Objetivos.....	20
4. Desenvolvimento.....	21
4.1 Amostras.....	21
4.2 Construção dos <i>Tissue Microarrays</i> (TMA)	21
4.2.1 Seleção dos Tecidos para Construção do TMA	21
4.2.2 Montagem dos TMAs.....	21
4.2.3 Corte do Bloco de TMA	22
4.3 Método Imunohistoquímico	23
4.4 Morfometria.....	23
4.5 Análise Estatística	25
5. Resultados.....	26
5.1 Artigo.....	26
6. Considerações Finais	41
7. Conclusões.....	43
Referências Bibliográficas.....	44

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Dez tipos de câncer mais comuns diagnosticados no mundo	7
FIGURA 2 – Distribuição de câncer por continente	8
FIGURA 3 – Modelo dos passos na Carcinogênese do Câncer Colorretal	13
FIGURA 4 – Teorias da Carcinogênese	14
FIGURA 5 – Diagrama da estrutura das criptas do cólon humano	15
FIGURA 6 – Terapias direcionadas às células-tronco do câncer	19
FIGURA 7 – Processo de montagem do <i>Tissue MicroArrays</i> (TMA)	22
FIGURA 8 – Imunohistoquímica para marcadores de células tronco tumorais em amostras de Câncer Colorretal	24

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Classificação TNM	8
------------------------------------	---

LISTA DE ABREVIATURAS

CCR Câncer Colorretal

CD Grupamento ou Cluster de Diferenciação

CEP Comitê de Ética em Pesquisa

CTT Células Tronco Tumorais

HC-UFPR Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

INCA Instituto Nacional do Câncer

LFN Linfonodos

TMA Microarranjo de Tecidos (*Tissue Microarrays*)

TNM Sistema de Estadiamento Tumor/ Linfonodos regionais/Metástase

RESUMO

Introdução: O câncer colorretal é uma das neoplasias mais comumente diagnosticadas com uma das mais altas taxas de mortalidade no mundo. A hipótese das células tronco tumorais para a carcinogênese forneceu uma explicação para a metástase e recorrência do câncer. Assim, o objetivo deste estudo foi correlacionar os marcadores de célula tronco tumorais CD133+, CD44+, CD44v6+ e CD117+ com variáveis conhecidas de adenocarcinomas colorretais humanos e associá-los com o prognóstico da doença. **Materiais e métodos:** Amostras de carcinoma colorretal (n=73) foram processados em Microarranjos de Tecidos e as imagens de imunohistoquímica para os marcadores avaliados foram selecionadas através do programa MetaViewer para posterior análise no programa Image Pro Plus. O programa SPSS Statistics foi utilizado para análise estatística com valores significativos de $p < 0.05$. **Resultados:** todos os marcadores tiveram positividade similar em todas as partes do tumor e alguns deles estão associados com características clinicopatológicas. Ambos CD133 e CD44 estavam correlacionados com idade, mas CD44 esteve mais especificamente com indivíduos com mais de 45 anos e também com a presença de linfonodos. CD117 estava correlacionado com tumores não-diferenciados, assim como CD133. Não foi encontrada correlação para o marcador CD44v6. **Conclusão:** é possível sugerir com esses resultados que os marcadores de células tronco tumorais positivos estavam relacionados a um pior prognóstico nesta população estudada.

Palavras-chave: câncer colorretal, células tronco tumorais, prognóstico de câncer, CD44, CD133, CD117.

ABSTRACT

Background: Colorectal cancer is one of the most commonly diagnosed neoplasms with the highest mortality rates in the world. The tumor stem cell (TSC) hypothesis to carcinogenesis provided an explanation for cancer metastasis and recurrence. Thus, the aim of the present study was to correlate the CD133 +, CD44 +, CD44v6 + and CD117 + TSC markers with known variables of human colorectal adenocarcinoma and to associate them with the prognosis of the disease. **Materials and Methods:** Colorectal carcinoma samples (n=73) were processed in Tissue Microarray and the immunohistochemistry images for the markers evaluated were selected through the MetaViewer program for further analysis in the Image-Pro Plus program. The SPSS Statistics program was used for statistical analysis, with significant values of $p < 0.05$. **Results:** All markers had similar positivity in all tumor parts and some of them were associated with clinicopathological characteristics. Both CD133 and CD44 were correlated with age, but CD44 was more specific with individuals with more than 45 years old and also with the presence of lymph nodes. CD117 was correlated with non-differentiated tumor as well as CD133. No correlation was found for the CD44v6 marker. **Conclusion:** It is possible to suggest with these results that the positive TSC markers were related to a worse prognosis in this studied population.

Key Words: Colorectal cancer, Tumor Stem Cells, Cancer prognostic, CD44, CD133, CD117.

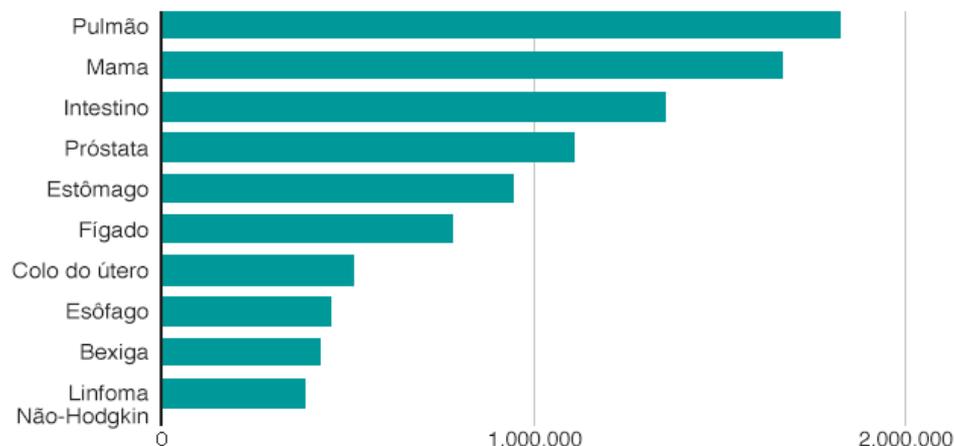
1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Células com crescimento desordenado, com potencial de invadir tecidos e órgãos, definem um conjunto de mais de 100 doenças que afetam os seres humanos. As causas para o aparecimento do câncer em um indivíduo são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando inter-relacionadas. As causas externas referem-se ao ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Os tumores iniciados em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas, enquanto os iniciados nos tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas (INCA 2016). O tratamento do câncer depende do tumor inicial, estadiamento no diagnóstico e é realizado por meio de uma ou várias modalidades combinadas. A principal é a cirurgia, que pode ser empregada em conjunto com radioterapia, quimioterapia ou, em alguns casos específicos como leucemias, o transplante de medula óssea pode ser viável como tratamento. O médico determina o tratamento mais adequado de acordo com a localização, o tipo do câncer e a extensão da doença, sendo todas as modalidades de tratamento, oferecidas pelo Sistema Único de Saúde Brasileiro (SUS) (INCA 2016).

Segundo a OMS, 14,1 milhões de novos casos de câncer aparecerão a cada ano no mundo e 8,2 milhões de pessoas morrem da doença a cada ano. A Figura 1 relata os dez tipos de câncer mais comuns diagnosticados no mundo:

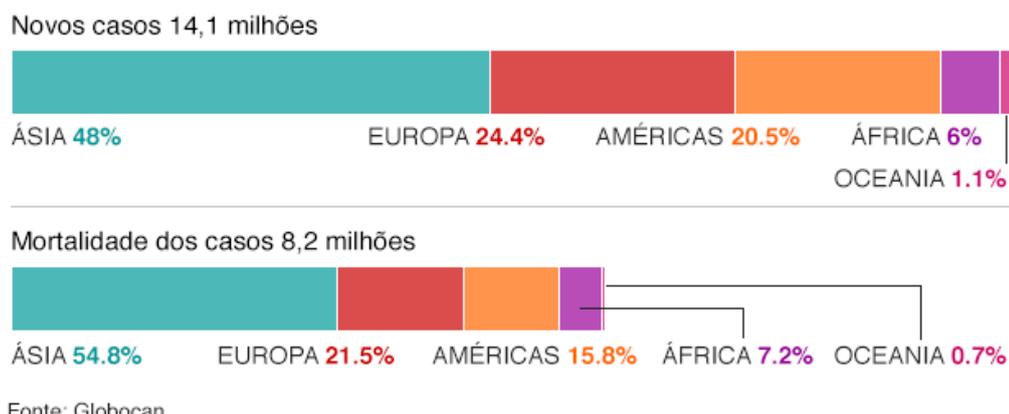
Figura 1: Dez tipos de câncer mais comuns diagnosticados no mundo todo



Fonte: Cancer Research UK, Globocan, Estimativas de 2012

De modo geral, estimou-se em escala mundial que, dos 14 milhões de casos novos estimados, mais de 60% ocorreram em países em desenvolvimento (Figura 2). Para a mortalidade, a situação agrava-se quando se constata que, dos 8 milhões de óbitos previstos, 70% ocorreram nesses mesmos países. Os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências encontradas foram mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%). Na região da América Latina e do Caribe, estimou-se, para 2012, a ocorrência de 1,1 milhão de casos novos de câncer, sendo os tipos de câncer mais incidentes os de próstata (152 mil) em homens e mama (152 mil) em mulheres (IARC, Globocan, 2012).

Figura 2: Distribuição de câncer por continente



A estimativa brasileira para o biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer. Excluindo o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes. Novamente, sem contar os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) figurarão entre os principais (INCA Estimativa 2016).

1.2 Câncer Colorretal

O câncer colorretal (CCR) abrange tumores que acometem o cólon do intestino e o reto, sendo considerado o terceiro tipo de câncer mais comum e a quarta causa de morte por câncer mais frequente no mundo (FERLAY et al., 2013). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que no Brasil ocorrerão 32.6 mil novos casos, sendo 15,1 mil em homens e 17,5 em mulheres e 15.415 mil mortes (INCA, 2016). Estima-se ainda que 20 a 50% dos pacientes com CCR devem ir a óbito dentro dos primeiros 5 anos do diagnóstico, geralmente como resultado de doença metastática avançada (BACKUS et al., 2002).

Em países com IDH baixo, o prognóstico da doença é ruim. Apesar de o padrão da incidência ser semelhante entre os sexos, as maiores taxas foram do sexo masculino na maioria das regiões geográficas. Assemelhando-se à incidência, as taxas de mortalidade foram mais baixas em mulheres do que nos homens, exceto no continente africano. Em alguns países desenvolvidos, observa-se um padrão estável ou de diminuição da incidência (Estados Unidos) nos últimos anos, reflexo, em grande parte, da detecção e remoção de lesões pré-cancerosas. Em contrapartida, nos países em desenvolvimento, esse comportamento é de crescimento (América Central e do Sul e Leste Europeu) (INCA-Estimativa 2016).

Os vasos linfáticos são os primeiros caminhos em que as células que compõem o CCR percorrem para distanciar-se do tumor primário, sendo portanto a metástase linfonodal um indicativo de pior prognóstico (LIANG et al., 2006).

Diversos fatores de risco têm sido associados ao desenvolvimento do CCR, dentre os epidemiologicamente estabelecidos estão: histórico familiar de CCR, doença inflamatória crônica do intestino, história de adenoma colorretal, tabagismo, consumo excessivo de álcool, obesidade e diabetes mellitus (AMERSI et al., 2005). A dieta tem sido sugerida como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença (NISTAL et al, 2015), sendo que o consumo de vegetais e frutas está associado a menor risco de câncer colônico (MICHELS et al, 2006) e o demasiado consumo de carne vermelha, embutidos, bebidas alcoólicas, tabagismo e a obesidade favorecem o aparecimento desse tipo de câncer (PELUCCHI et al, 2011; AUNE et al, 2013; BARDOU et al, 2013). A história familiar do câncer de colón e reto, a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino e a idade são outros fatores de risco para o desenvolvimento da doença. Tanto na incidência quanto na mortalidade, observa-se aumento nas taxas com o avanço da idade (MORRIS et al., 2013). Apesar disso, a maioria dos cânceres de cólon e reto se dá de forma esporádica, surgindo de mutações somáticas e evolução do clone celular tumoral. Os casos esporádicos ocorrem em aproximadamente 70% a 75% das vezes e cerca de 25% dos casos

ocorrem em pacientes com histórico familiar (AMERSI et al., 2005). Portanto, acredita-se que os fatores ambientais e estilo de vida são os responsáveis pela maioria dos casos. Adicionalmente, as infecções com *Helicobacter pylori*, *Fusobacterium* spp. ou outros potenciais agentes infecciosos podem estar associadas ao aumento do risco de CCR (BOLEIJ et al., 2011; KOSTIC et al., 2012).

A história natural dessa neoplasia propicia condições ideais à sua detecção precoce. A pesquisa de sangue oculto nas fezes e métodos endoscópicos são considerados meios de detecção precoce para esse câncer, pois são capazes de diagnosticar e remover pólipos adenomatosos colorretais (precursores do câncer do cólon e reto), bem como tumores em estádios bem iniciais. A sobrevida do câncer de colón e reto é altamente dependente do estágio da doença. Em geral, quanto mais cedo diagnosticada a doença, maior a sobrevida. Países com alta expectativa de vida e com bom acesso aos serviços de saúde apresentam melhores taxas de sobrevida. Mesmo nestes países, a relação custo-benefício em investimentos para estratégias apropriadas de prevenção e detecção precoce do câncer do cólon e reto tem impossibilitado a implantação de rastreamento populacional. Essas estratégias não têm o objetivo de diagnosticar mais pólipos ou lesões, mas sim de diminuir a incidência e a mortalidade por esse tipo de neoplasia (INCA 2003). Mesmo assim, no momento do diagnóstico cerca de 20% dos pacientes já apresentam metástase hepática, que é o sítio predominante de metástase à distância do CCR (WEISS et al., 1986).

O sistema de estadiamento Tumor/Linfonodo/Metástase (TNM) (Tabela 1) ainda se mantém como padrão ouro para fatores prognósticos do CCR (COMPTON et al., 2002; COMPTON, 2006). Como citado anteriormente, a taxa de sobrevida para pacientes com CCR é altamente dependente do estadiamento do TNM (Tabela 1), o qual foi inicialmente desenvolvido para prever prognóstico, mas sua função foi expandida para auxiliar na escolha da forma de tratamento e para seleção de pacientes para estudos clínicos (ZOBLEC et al., 2008).

Tabela 1 – Classificação TNM

Tumor Primário (T)	
Tx	Tumor Primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidências de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : intra-epitelial ou invasão da lâmina própria
T1	Tumor invade submucosa
T2	Tumor invade a muscular própria
T3	Tumor invade a muscular própria, sem ultrapassar a subserosa ou os tecidos perirretais
T4	Tumor invade diretamente outros órgãos ou estruturas e/ou perfura o peritônio visceral
Linfonodos Regionais (N)	
NX	Não pode ser avaliado
N0	Ausência de metastase linfonodal
N1	Mestástase para 1 a 3 linfonodos
N2	Mestástase para mais de 4 linfonodos
Metástase (M)	
MX	Não pode ser avaliado
M0	Ausência de metastase
M1	Presença de metastase

Fonte: União Internacional Contra o Câncer (UICC).

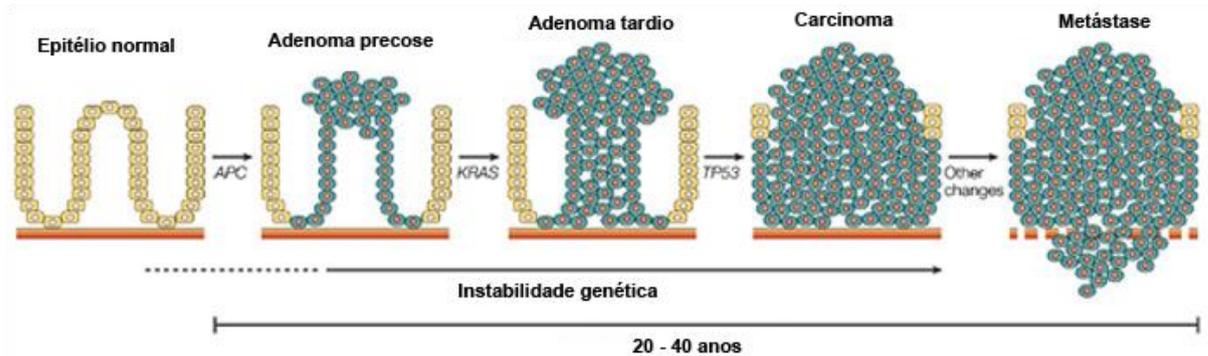
Os tipos histológicos atualmente definidos como os adenomas (neoplasias intraepiteliais localizadas na massa de tecido que faz protusão no lúmen do intestino grosso) tumores epiteliais, tumores de estroma, tumores glandulares, tumores de estroma e de células imunes, tumores de aglomerados de células imunes, tumores mucinosos não discriminam prognóstico de modo independente do estadiamento, na maioria dos CRR. (Kather et al., 2016) Fazem exceção alguns tipos raros como o carcinoma medular, carcinoma em anel de sinete e carcinoma de pequenas células, sendo o primeiro o de melhor prognóstico e os outros dois relacionados a prognósticos desfavoráveis. Carcinomas mucinosos (referentes a produção de muco glicoproteico) representam de 8 a 20% de todos os CCR (KREBS et al., 2006), e em qualquer grau de diferenciação, é considerado como fator localmente agressivo e de pior prognóstico (FARHOUD et al., 2002). Já no que se refere ao grau de diferenciação tumoral, existe uma intensa associação entre esse e o estadio do tumor no momento da ressecção (GAGLIARDI et al., 1995). Tumores indiferenciados e pouco diferenciados foram associados a uma maior extensão local, invasão de vasos e linfonodos, além de maior risco de recidiva e metástases hepáticas, atribuindo-se a esses um prognóstico mais reservado (GREEN et al., 2007). Logo, quanto mais indiferenciado for o tumor, pior será seu prognóstico. Mesmo porque, tumores bem diferenciados respondem melhor à terapêutica adjuvante e têm velocidade de crescimento mais lenta, podendo ser detectados ainda em fases precoces (COMPTON et al., 2000).

1.3 Carcinogênese

O modelo clássico de carcinogênese, ou modelo estocástico, considera que qualquer célula de um órgão pode sofrer mutações e dar início a um clone de células malignas (MARTINEZ-CLIMENT, 2006). Neste caso, todas ou quase todas as células de um câncer seriam igualmente malignas, e deveriam, portanto, ser combatidas de maneira igual no tratamento (KAKARALA et al., 2008). Neste modelo, a carcinogênese do CCR é iniciada pelo acúmulo esporádico de mutações específicas em oncogenes tais como KRAS e supressores de tumor tais como APC e TP53 (Deming et al., 2014). Estas mutações surgem dentro do tumor numa sequência característica. Uma única célula dentro de uma população heterogênea adquire uma mutação em um tal gene, e esta mutação logo alcança a fixação devido à vantagem de crescimento proporcionada à célula pela mutação. Acredita-se que a instabilidade genética ocorra em genes específicos durante o processo de tumorigênese colorretal para acelerar a taxa de mutação na divisão de células cancerosas (Zoratto et al., 2014). A evidência experimental da presença de instabilidade cromossômica (CIN) nos tumores precoces é limitada devido ao pequeno tamanho das amostras (Bruce WR, van der Gaag H, 1963) e a possibilidade de que alterações cromossômicas ainda não possam ser encontradas na maioria das células de uma lesão jovem (Fearon et al., 1990). No entanto, existem fortes evidências de que a CIN ocorre cedo no processo tumorigênico.

Em nível molecular, as vias de transdução de sinal são consideradas como tendo papéis de regulação importantes. Na pesquisa da síndrome de CCR familiar, foram encontradas alterações de diferentes genes-chave; sendo que pesquisas posteriores também revelaram que esses genes tinham mudanças óbvias no câncer esporádico. Na carcinogênese da CCC, a via de sinalização Wnt é a causa da síndrome predisponente do câncer hereditário e da polipose adenomatosa familiar (FAP), que desempenha um papel importante na mutação genética anormal da polipose adenomatosa coli (APC) (Kinzler et al., 2014; Nishisho et al., 1991; Farkas et al., 2014). Se CIN é o primeiro evento em tumorigênese, e, portanto, precede a mutação da APC, ainda é uma questão de muito debate (Figura 3) (revisito por Hajagopalan et al., 2003).

Figura 3: Modelo dos passos na Carcinogênese do CCR

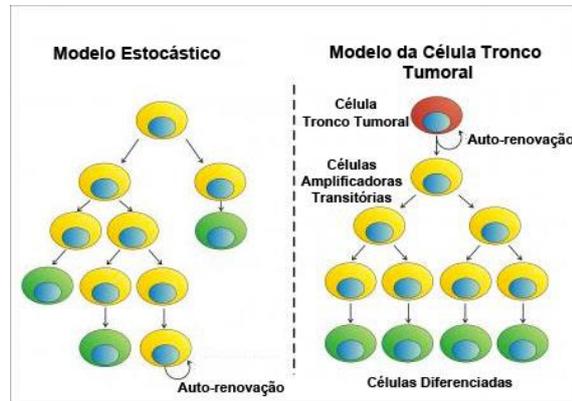


Fonte: Adaptado de Hajagopalan et al., 2003

De modo geral, o câncer humano pode ser composto de células com heterogeneidade fenotípica (Bruce et al., 1963), assim, a célula tumoral pode apresentar heterogeneidade funcional, como a diferença de características de crescimento e de proliferação durante a determinação *in vitro*, (Hamburger & Southam, 1965) ou a diferença de tumorigenicidade *in vivo* e potencial de manutenção do crescimento tumoral (Brunschwing et al., 1965). Neste contexto, a descrição de uma pequena população de células tronco tumorais com uma baixa taxa de proliferação e um elevado potencial tumorigênico, seja responsável pelo desenvolvimento de tumor, das metástases e da resistência à terapia, têm sido explorada nos últimos anos. Este nicho celular é a base do modelo de células-tronco do câncer (CSC).

A hipótese de carcinogênese para as células-tronco implica em uma mudança completa no pensamento clássico da oncogênese (WICHA et al., 2006). Neste modelo, o tumor se origina a partir de uma pequena população de células tronco e/ou progenitoras, que perdem o mecanismo de regulação da auto-renovação (GRAZIANO et al., 2008; KAKARALA et al., 2008), levando à expansão dessa população, seguida da ocorrência de alterações genéticas e epigenéticas adicionais (Figura 4). Esta pequena população de células tronco é então chamada de células-tronco cancerosas. A natureza dessas mudanças genéticas e epigenéticas e o tipo de progenitor em que ocorrem, provavelmente contribuem para a heterogeneidade celular encontrada nos tumores (CHARAFE-JAUFFRET et al., 2008). Como consequência, os tumores apresentam um componente celular com propriedades de células-tronco de auto renovação que pode se manter indefinidamente (WICHA et al., 2006). Estas células tronco cancerosas se julga serem responsáveis pela reincidência do tumor, uma vez que podem eficientemente iniciar e regenerar a doença após a intervenção terapêutica. Portanto, neste caso, nenhum tratamento alcançará a cura do câncer, se não for capaz de destruir este núcleo de células.

Figura 4 – Teorias da Carcinogênese: O modelo estocástico prediz que o crescimento tumoral é um processo aleatório em que todas as células podem contribuir. O modelo da célula tronco tumoral por sua vez, sugere uma hierarquia clara de células dentro do tumor.



Fonte: Adaptado pelo Autor de Euro Stem Cell Organization.

Não há nenhuma prova definitiva em favor de qualquer teoria do crescimento do câncer. No entanto, uma quantidade crescente de evidências sugere que a teoria de células tronco tumoral é verdade em alguns casos. A primeira evidência em favor de células-tronco cancerosas vieram de estudos de leucemia humana (LAPIDOT et al., 1994; BONNET & DICK, 1997). Os pesquisadores descobriram que apenas um subconjunto de células leucêmicas pode causar leucemia quando transplantadas para um corpo saudável, a característica-chave de células-tronco do câncer.

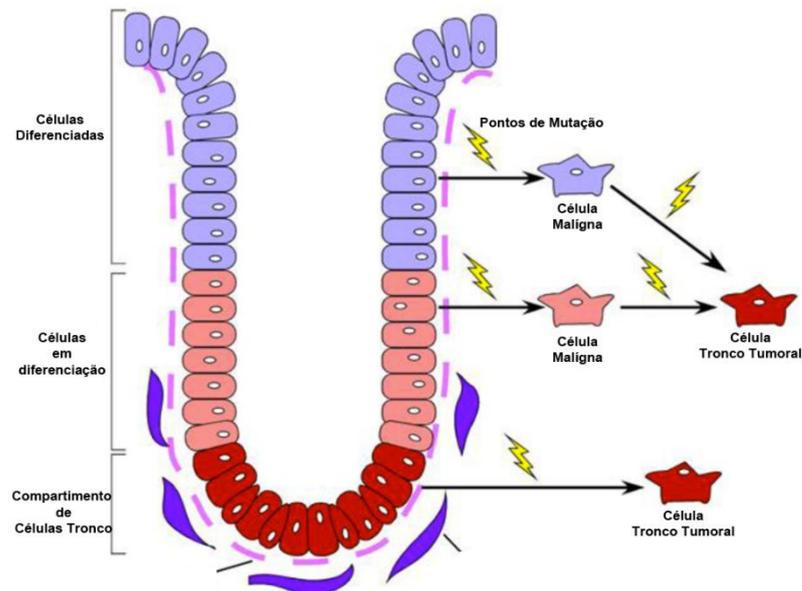
Desde essa descoberta, muitos pesquisadores descobriram células com características de células tronco tumoral em uma grande variedade de cânceres em humanos, incluindo mama (AL-HAJJ et al., 2003); cérebro (SINGH et al., 2003; SINGH et al., 2004); próstata (COLLINS et al., 2005) e câncer de cólon (RICCI-VITIANI et al., 2007).

1.4 Correlação entre o Câncer Colorretal e Células Tronco Tumorais

Acredita-se que o evento carcinogenético inicial atinja as células-tronco encontradas na base das criptas intestinais que após múltiplas mutações, perdem a capacidade de regular sua proliferação, podendo levar a oncogênese (TANAKA, 2009; CHERCIU et al., 2014; FORMICA et al., 2014). Essa pequena porção de células é conhecida como células-tronco tumorais ou células iniciadoras de tumor, devido a sua capacidade de iniciar o câncer, além de estar relacionada também com a progressão e metástase (Figura 5). Sua habilidade de auto renovação, proliferação ilimitada e multipotência são fenótipos conhecidos desse tipo celular e parecem estar envolvidos com a reincidência e metástase devido à resistência aos tratamentos tradicionais (HONG et al., 2015). Além disso, estudos recentes apontam a

existência de correlação entre alguns tipos de marcadores e o avanço da idade, demonstrando que há um aumento gradual de células-tronco tumorais nas criptas colônicas, o que pode contribuir, em partes, para o aumento da incidência do câncer colorretal em idosos (NANGIA-MAKKER et al., 2015).

Figura 5 – Diagrama da estrutura das criptas do cólon humano. O compartimento de células tronco reside na base das criptas. As células que se dividem rapidamente e estão em diferenciação surgem a partir desta população e diferenciam-se em células funcionais do cólon (células diferenciadas). A fonte de células tronco tumorais permanece controverso. Uma mutação única em uma célula tronco poderia dar origem ao seu clone tumoral, enquanto duas mutações (transformação de de-diferenciação), seria necessário para mudar uma célula em diferenciação e/ou diferenciada em célula tronco tumoral.



Fonte: Adaptado pelo Autor de Stem Cell & Colon Cancer; Johns Hopkins Medicine.

1.5 Marcadores de células tronco tumorais

A identificação de células-tronco tumorais de cólon vem recebendo grande atenção devido ao seu grande potencial para o tratamento da doença (CHOI et al., 2009). Para tanto, estudos estão sendo realizados para o reconhecimento de marcadores de superfície celular específicos para este tipo celular em câncer colorretal. Diversos marcadores já foram investigados e propostos, dentre eles: CD133, CD166, CD44, CD24, beta1 integrina-CD29, Lgr5, EpCAM (ESA), ALDH-1, Msi-1, DCAMLK1 ou receptores EphB (CHERCIU et al., 2014; HONG et al., 2015).

Neste sentido, um estudo identificando possíveis células tronco tumorais foi descrito como sendo as que expressam a proteína CD133. Estas células representam cerca de 2,5% do total de células tumorais e uma vez injetadas no subcutâneo de camundongos

imunodeficientes foram capazes de reproduzir tumores com as mesmas características do tumor original (RICCI-VITIANI et al., 2007). O CD133 é um dos marcadores mais bem caracterizados, sendo descrito como uma proteína transmembrana de superfície celular, também conhecida como AC133, localizada principalmente nas protrusões de membrana. Este marcador tem caracterizado células normais e tumorais em muitos tecidos humanos, incluindo a mucosa colônica (O'BRIEN et al., 2007; MIRAGLIA et al., 1997; CORBEILL et al., 2001).

Muitos estudos foram feitos usando-se métodos imunoistoquímicos e mostraram que o antígeno CD133 estava localizado exclusivamente na membrana celular da face luminal de glândulas cancerosas (HORST et al., 2009; KOJIMA et al., 2008; ZHANG et al., 2012), enquanto outros mostraram que o CD133 pode se localizar tanto na membrana quanto no citoplasma das células tumorais de colón (HANG et al., 2012; REGGIANI et al., 2012). Localizações diferentes para o CD133 estão associadas com diferentes significados clínicos: a expressão na membrana está relacionada com sobrevida do paciente, reincidência da doença e quimioresistência, enquanto a expressão citoplasmática apenas deste não é suficiente para relacionar com sobrevida e reincidência do câncer. A mudança de localização do CD133 do citoplasma para a membrana parece estar relacionada com uma transição das células epiteliais para um fenótipo mais invasivo (CHERCIU et al., 2014).

Esse antígeno de superfície de célula-tronco já foi caracterizado como potencial célula-tronco tumoral em câncer de cérebro, cólon, próstata, fígado, pâncreas, rim, pulmões, endométrio, ovário e ossos (CHOI et al., 2009). Alguns estudos sugerem que a positividade para este marcador possui aspectos consistentes com os descritos para células-tronco tumorais como iniciação do tumor, proliferação, invasão, diferenciação e capacidade de auto renovação. Ainda, diversos autores já relacionaram a expressão de CD133 à menor sobrevivência do paciente (sobrevida inferior a 5 anos), reincidência da doença e resistência a quimioterápicos (tumores de categorias T3/4, linfonodo+ e invasão vascular). Células tronco tumorais colorretais não podem ser identificadas apenas pela expressão de CD133 (REN et al., 2013; CHERCIU et al., 2014), uma vez que têm se questionado a fidelidade do CD133 como um apropriado marcador em células tumorais colorretais, visto a diminuição na expressão deste, parece não afetar a proliferação, invasão e capacidade de formar tumores destas células (RASSOULI et al., 2015).

Outro marcador para células tronco tumorais, o CD44 é uma glicoproteína transmembrana que participa de muitos processos celulares, incluindo crescimento, sobrevivência, diferenciação e movimentação (VIGETTI et al., 2008). É uma molécula de

adesão celular, um receptor para o ácido hialurônico que foi proposto como um marcador alternativo para as células tronco tumorais colorretais. É conhecido por estar envolvido no crescimento celular, diferenciação e sobrevida dos pacientes. Como uma importante molécula de adesão, o CD44 exerce seu principal papel na migração das células tumorais associada com a formação de um tumor em enxertos e formações de colônias, assim como estágio tumoral, infiltração linfonodal, prognóstico e sobrevida (DOU et al., 2010; MOOSSAVI et al., 2013).

Células colorretais tumorais CD44+ apresentam uma alta capacidade para formação de tumores, especialmente em combinação com células CD133+, ao passo que células CD44- não podem formar novos tumores (VAIOPOULOS et al., 2012). Tem sido proposto que a regulação aumentada de uma ou mais das variantes CD44, pode alterar a regulação, proliferação, e migração celular, levando à progressão de alguns tipos de tumores.

As isoformas do CD44 que contém a variante exon 6 (CD44v6) são as variantes que tem sido estudadas mais extensivamente neste contexto de célula tronco tumoral. As isoformas CD44v6 tem demonstrado mediar o processo de metástase nas linhagens celulares do câncer de mama e câncer pancreático em ratos, e a sua expressão tem sido associada a um pior prognóstico no linfoma não-Hodgkin e carcinoma colorretal. Estudos clínicos confirmaram o significado das variantes CD44 no câncer colorretal; CD44V6 foi recomendado com um marcador funcional e um alvo terapêutico em células de câncer colorretal, relatadas como recorrentes (RASSOULI et al., 2015). Um estudo recente demonstrou o papel do CD44V6 na resistência aos tratamentos quimioterápicos (Lv Lin, 2016).

A proteína c-kit (também conhecida como CD117), uma proteína transmembrana, receptor tipo II para tirosina kinase, está envolvido em muitos tipos de câncer, incluindo carcinoma de células pulmonares, com a presença de 40 a 89% de carcinomas pouco diferenciados de pulmão (Kimiloglu et al 2015). O papel do CD117 também foi explorado em tumores do trato gastrointestinal para avaliar suas correlações com parâmetros clinicopatológicos e de prognóstico, na esperança de que terapias alvo para estes tumores sejam possíveis. Os autores concluíram que a expressão e a incidência de CD117 em tumores endócrinos colorretais é baixa em relação aos tumores de pulmão (Kimiloglu et al 2015).

Entretanto, diagnósticos positivos para tumores gastrointestinais tem se tornado mais precisos em anos recentes com a introdução de imunohistoquímica para identificar a positiva expressão de CD 117 (Pandey et al, 2010), e assim este marcador foi indicado como um novo potencial alvo terapêutico em câncer colorretal (Shah et al 2015)

Nos carcinomas micropapilares colorretais, uma variação agressiva de adenocarcinoma que tem uma elevada incidência de metástases linfonodais, a presença células tronco tumorais foi demonstrada utilizando método de imunohistoquímica para os marcadores CD44v6, CD166, ALDH1, SOX2 e NOTCH3 (LEE et al., 2013). Os autores observaram que carcinomas micropapilares são caracterizados por invasão linfática mais frequente e metástase linfonodal, maior T na patologia e metástase, além da expressão aumentada de SOX2 e Notch3. A taxa de sobrevida global em 5 anos para pacientes com carcinoma micropapilar (37%) foi significativamente menor do que para o carcinoma de alta instabilidade de microssatélites em pacientes com carcinoma estáveis (92 e 72%). A presença do componente de carcinoma micropapilar foi mostrado estar associado com uma taxa de sobrevivência significativamente pior em análises univariadas e multivariadas. Em conclusão, o reconhecimento do componente de carcinoma micropapilar de adenocarcinoma do cólon é muito importante, pois o carcinoma micropapilar tem sido associado com um prognóstico significativamente pior. Ainda, maior nível de expressão de marcadores de células-tronco cancerosas em carcinomas micropapilares sugerem a potencial contribuição destas células na pior sobrevida de pacientes com carcinoma micropapilar (LEE et al., 2013).

A expressão, bem como o significado clínico dos marcadores (CD44v6, EGF, EGFR, MMP-2, COX-2 e VEGF) de célula tronco tumoral, angiogênese e metástase no câncer colorretal foram avaliados numa tentativa de suprir a carência de informações moleculares sobre o estadiamento dos tumores para auxiliar no prognóstico da doença (WAN et al., 2009). Alta expressão de CD44v6, EGF e EGFR foram relacionados com um mau prognóstico para a classificação A/B de Duke para o carcinoma colorretal, enquanto que a alta expressão de MMP-2, COX-2 e VEGF foram relacionados com um mau prognóstico para o estadiamento C de Duke (WAN et al., 2009).

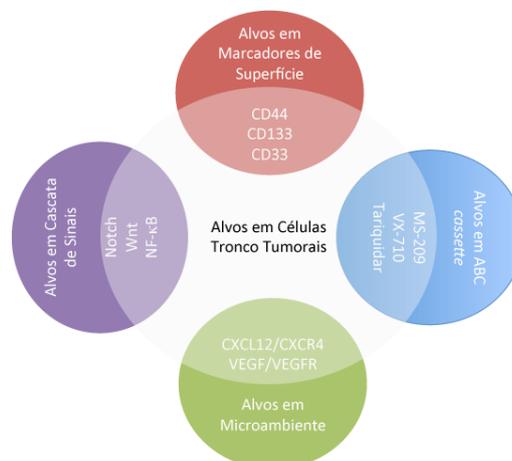
Muitos marcadores foram propostos para definir as células tronco tumorais colorretais, mas nenhum deles caracterizou completamente uma distinta população destas células (CHERCIU et al., 2014). Assim, de acordo com a heterogeneidade das células tronco e as diferentes características de expressão dos marcadores, fica clara a necessidade de correlação entre os diversos marcadores para uma melhor eficiência na marcação das células tronco colorretais. Somente a precisa identificação destas células e de suas propriedades, pode ajudar na formação de uma efetiva terapia anticâncer (KOSOVSKA Z, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que as células tronco adultas são as únicas entre as células somáticas responsáveis pela auto-renovação e reparação de tecidos ao longo da vida. Ao longo dos últimos anos tornou-se cada vez mais evidente que tipos diferentes de tumores contêm populações de células com características de células tronco, que podem ser, em parte, responsáveis pela reincidência do tumor por sua característica única de iniciar e propagar a doença, mesmo após intervenções terapêuticas tradicionais.

Pouco ainda se entende as correlações entre este pequeno nicho de células tronco tumorais em eventos como progressão do tumor, recidiva da doença e até mesmo na resistência aos tratamentos disponíveis. Sabe-se que com a identificação precisa de marcadores de células tronco tumorais e suas correlações com variáveis clínicas já conhecidas e utilizadas para o estadiamento da doença em si, estes marcadores poderão ser incorporados à detecção precoce do câncer. Além disso, muito têm se descrito na formação de terapias alvos utilizando esses marcadores de superfície (Figura 6), visando diminuir a recorrência e as metástases, melhorando o prognóstico e a sobrevida dos pacientes com câncer colorretal.

Figura 6 - Terapias direcionadas às células-tronco do câncer. Numerosos tratamentos com o objetivo de erradicar células-tronco de câncer foram desenvolvidos durante estes anos. Quatro áreas diferentes poderiam resumir as propostas recentes. Através da seleção seletiva de marcadores de superfície de CSC (área vermelha), efeitos mais precisos e menos efeitos colaterais poderiam ser alcançados. Com a ajuda de modernas técnicas de biologia molecular, elementos das cascatas de sinalização cada vez mais cruciais, foram desenterrados (área púrpura). Através de vias aberrantes intervenientes, as características específicas das CSCs são suprimidas e resultados promissores têm sido relatados. As drogas moleculares que inibem a ABC *cassette* ABC (área azul) atingiram a terceira geração (tariquidar) e algumas estão em ensaios clínicos. Além disso, os microambientes do tumor também chamam muita atenção (área verde), inibindo o crescimento de vasos sanguíneos ou explorando vias de proliferação, mostrou perspectivas sedutoras.



Fonte: Adaptado de Chen et al., 2013.

3. OBJETIVOS

Geral: Evidenciar a presença de células-tronco tumorais nos diferentes estadios do adenocarcinoma colorretal humano e correlacionar com melhor ou pior prognóstico da doença.

Específicos:

- Descrever as características clínico-patológicas dos pacientes que compõe a amostra.
- Estabelecer correlação entre o perfil positivo CD44, CD44v6, CD117 e CD133 em material histológico de câncer de cólon nos diferentes estadios clínicos através da marcação imunohistoquímica.
- Correlacionar a imunohistoquímica dos marcadores de células tronco tumorais com dados clínicos como idade, sexo, estadiamento, tratamento e sobrevida.
- Estabelecer correlação entre as variáveis grau histológico, metástase linfonodal e os marcadores de células tronco tumorais.

4. DESENVOLVIMENTO

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

4.1 Amostras

Foram inicialmente selecionados 73 casos diagnosticados com adenocarcinomas colorretais do Serviço de Anatomia Patológica do HC-UFPR. O material biológico (blocos parafinados dos tumores) dos pacientes selecionados foram provenientes de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos, que foram submetidos à cirurgia eletiva entre os anos 2007 – 2011 e que permaneceram em segmento no HC-UFPR. Além disso, deveriam apresentar material histológico em condições e quantidades adequadas para a avaliação da expressão das proteínas pelo método imunohistoquímico. As variáveis clínicas incluídas nesse estudo foram: idade, sexo, comprometimento de linfonodos (LFN), localização do tumor, grau de diferenciação, tipo histológico, classificação de Dukes, tamanho do tumor, área tumoral, data do diagnóstico, desfecho, data da última consulta, data do óbito e tempo de sobrevivência.

4.2 Construção dos *Tissue Microarrays* (TMA)

4.2.1 Seleção dos Tecidos para a Construção do TMA

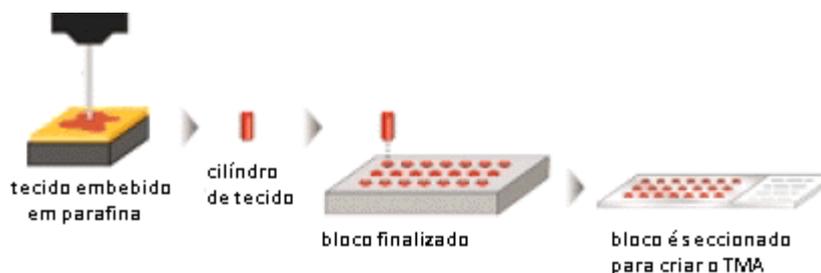
A partir dos blocos de tecidos doadores, foram realizados cortes histológicos de 4µm para coloração Hematoxilina-Eosina (HE). As novas lâminas foram sequencialmente analisadas ao microscópio óptico por um patologista, e uma ou duas áreas morfológicamente significativas do componente tumoral foram selecionadas na lâmina de vidro. Posteriormente, foram delimitados dois círculos (correspondentes às áreas significativas) em cada bloco doador sobrepondo as lâminas marcadas, para assim marcar a área de extração do material dos blocos doadores.

4.2.2 Montagem dos TMAs

A partir do número de áreas selecionadas em cada bloco doador, foram construídos mapas com as coordenadas de localização de cada caso nos blocos receptores seguindo criteriosamente a confecção dos TMAs.

Os blocos receptores do TMA foram construídos manualmente no Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, e foram compostos por um arranjo das amostras dos blocos doadores, como previamente estabelecido nos mapas. De cada bloco doador foram extraídos um ou dois cilindros de 4mm de diâmetro com o auxílio de uma broca Trefina, acoplada a uma caneta pino chave e a um motor de suspensão de 130 watts, da marca Bethil®. Depois de retirados todos os cilindros, e reorganizados em uma forma metálica para confecção de blocos histológicos, os blocos receptores, agora TMA foram preenchidos com parafina líquida, a 60°C e levados a uma placa de gelo para solidificar a parafina e concluir a confecção do TMA (Figura 7).

Figura 7 - Processo de montagem do TMA



Fonte: Adaptado de: www.bio-itworld.com

4.2.3 Corte do Bloco de TMA

Antes de realizar os cortes histológicos, os TMA foram resfriados a -10°C durante 30 minutos para após, realizar-se o corte sequencial de 4µm de espessura. Foi feita a coloração Hematoxilina Eosina do primeiro corte de cada TMA para controle morfológico da presença de tumor.

Foram utilizados uma placa fria (Leica EG1130, Germany) e um micrótomo (Reichert-Jung 2030, Bicut, Germany) para a realização dos cortes histológicos. Foram usados dois tipos de lâminas, conforme o destino dos cortes histológicos: para coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) (Marienfeld, Germany) ou para imunohistoquímica (Superfrost®Plus, Germany), apresentando estas um maior poder de adesão dos cortes histológicos.

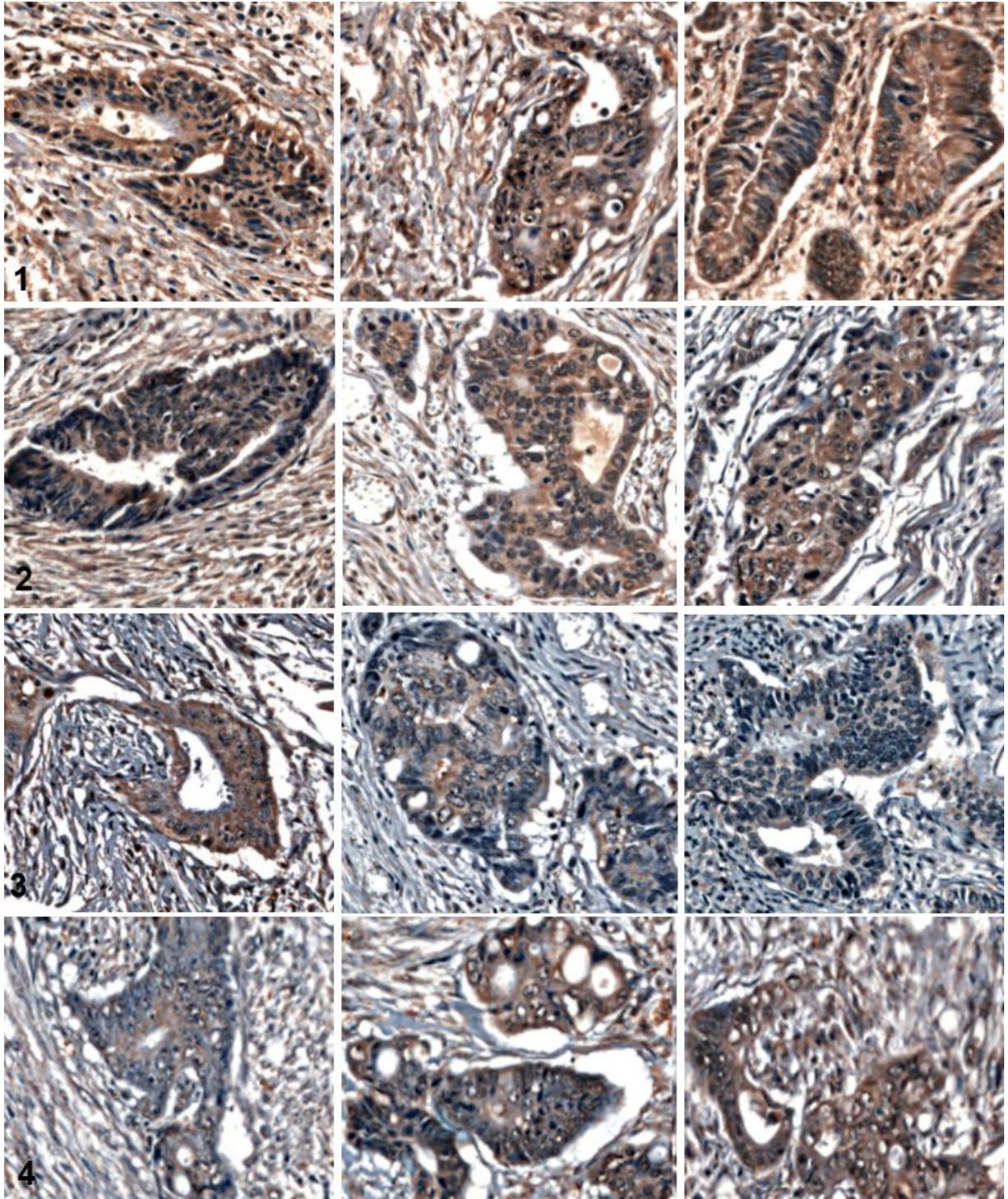
4.3 Método Imunohistoquímico

Todos os casos foram processados de acordo com o método da Estreptavidina-Biotina-Peroxidase utilizando-se anticorpos primários anti-CD44; - CD117 (ambos da DakoCytomation®); -CD44v6 (LeicaBiosystems®) e -CD133 (Abnova) e anticorpo secundário conjugado a peroxidase (advance+/peroxidase DakoCytomation®) segundo protocolo de rotina estabelecido e padronizado pelo Setor de Imunohistoquímica do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR (Chong, Raboni et al. 2009). A leitura das lâminas foi realizada pela pesquisadora, e por uma Patologista simultaneamente, em microscópio de multi-observação (Olimpus).

4.4 Morfometria

A partir das amostras e captura das imagens, as mesmas foram selecionadas através do programa MetaViewer V2.0.117 (para Windows), os 10 melhores campos, para posterior análise da camada superficial, intermediária e profunda de cada amostra biológica. A máscara foi criada através do programa Image-Pro Plus 4.5.0.29 (para Windows) com ajuda da equipe do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR e aplicada em cada uma das imagens para a obtenção das médias de marcação de cada marcador de célula tronco tumoral analisada (Figura 8).

Figura 8 – Imunohistoquímica para marcadores de células tronco tumorais em amostras de CCR, sendo: 1. CD44; 2. CD44v6; 3. CD117 e 4. CD133, nas áreas superficial (esquerda), intermediária (central) e profunda (direita).



4.5 Análise Estatística

Os resultados de variáveis quantitativas foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Variáveis qualitativas foram descritas por frequências e percentuais. Em relação a variáveis quantitativas, para a comparação de dois grupos foi considerado o teste t de Student para amostras independentes ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Mais de dois grupos foram comparados usando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Para avaliação da associação entre duas variáveis quantitativas, foram estimados coeficientes de correlação de Spearman. Para a determinação de pontos de corte para a expressão dos marcadores, associados à diferenciação do tumor, foram ajustadas curvas ROC. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Para a análise foi utilizado o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.

5. RESULTADOS

5.1 Artigo

Association of tumor stem markers with clinical variables in human colorectal adenocarcinoma in a population attends by the Brazilian National Health System on Parana State.

Ana Cristina Seixas Greca¹, Ana Carolina Gadotti¹, Giovana Beatriz Silva¹, Lucia de Noronha¹, Andréa Novais Moreno-Amaral¹

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUCPR, Brazil

*Corresponding author:

Andréa N. Moreno-Amaral

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUCPR

Escola de Medicina

Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Rua Imaculada Conceição, 1500

Prado Velho, Curitiba, Paraná

CEP: 80215-901

Phone/Fax: (55) (41) 3271 2285

E-mail: andrea.moreno@pucpr.br

Abstract

Background: Colorectal cancer is one of the most commonly diagnosed neoplasms with the highest mortality rates in the world. The tumor stem cell (TSC) hypothesis to carcinogenesis provided an explanation for cancer metastasis and recurrence. Thus, the aim of the present study was to correlate the CD133+, CD44+, CD44v6+ and CD117+ TSC markers with known variables of human colorectal adenocarcinoma and to associate them with the prognosis of the disease. **Materials and Methods:** Colorectal carcinoma samples (n=73) were processed in Tissue Microarray and the immunohistochemistry images for the markers evaluated were selected through the MetaViewer program for further analysis in the Image-Pro Plus program. The SPSS Statistics program was used for statistical analysis, with significant values of $p < 0.05$. **Results:** All markers had similar positivity in all tumor parts and some of them were associated with clinicopathological characteristics. Both CD133 and CD44 were correlated with age, but CD44 was more specific with individuals with more than 45 years old and also with the presence of lymph nodes. CD117 was correlated with non-differentiated tumor as well as CD133. No correlation was found for the CD44v6 marker. **Conclusion:** It is possible to suggest with these results that the positive TSC markers were related to a worse prognosis in this studied population.

Key Words: Colorectal cancer; Tumor Stem Cells, Cancer prognostic, CD44, CD133, CD117.

Introduction

Colorectal cancer is one of the neoplastic disease most commonly diagnosed and with higher mortality in the world, caused by interaction between genetic and environmental factors. In Brazil, 34,280 new cases and 15,415 deaths were estimated in 2016^[1,2]. Some studies identified a colorectal cancer cells subpopulation more resistant to treatments such as chemotherapeutics and radiation^[3,4]. It is essential that the effective treatment with the elimination of these highly resistant subpopulations, and not only the main tumor mass happens.

In an attempt to elucidate the consequences of these highly resistant cells subpopulations, the tumor stem cell (TSC) hypothesis to carcinogenesis was hypothesized

because of its ability to initiate cancer, in addition to being also related to progression, metastasis and, cancer recurrence^[5]. In this hypothesis, it is believed that a small portion of stem cells located at the base of the intestinal crypt that, after multiple mutations, lose the ability to regulate their proliferation and, thus, have an increased ability to start the tumor when compared to rest of the tumor cells^[6]. In this way, no treatment will reach the cancer cure if it is not able to destroy this nucleus of cells^[7].

These TSC or tumor-initiating cells possess several cell surface markers shows to be expressed in these cell populations^[8]. CD133, CD44 (and its variant CD44v6) and CD117 are proposed stem cell markers in colorectal cancer with different associations with clinical variables, specially recurrence and survival of patients^[9,10].

The aim of the present study was to comprise the correlation between the markers of TSC: CD133, CD44, CD44v6 and CD117 with clinical variables in a specific Brazilian population with human colorectal adenocarcinoma.

Materials and Methods

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Clinical Hospital of the Federal University of Parana (HC-UFPR) with registration number 820432.

Samples

Initially was selected 73 patients diagnosed with colorectal adenocarcinomas of the Pathology Department of HC-UFPR. The biological material of selected patients from both sexes; aged over 18 years; who underwent elective surgery between the years 2007-2011 and remained in

segment in the HC-UFPR without any previous treatment. Furthermore, histological material should present conditions and amounts suitable for the evaluation of protein expression by immunohistochemistry. The variables included in this study were age, gender, lymph node involvement (LFN), tumor location, degree of differentiation, histological type, Dukes classification, tumor size, tumor area, date of diagnosis, outcome, date of last visit, date of death and survival time.

Construction of Tissue Microarray (TMA)

From the donor tissue blocks were performed histological sections of 4µm to hematoxylin-eosin staining (HE). The new slides were sequentially analyzed by optical microscope by a pathologist, and the three most representative areas of the tumor - superficial, tumor bulk or invasive front, depending on their degree of invasion - were selected. From the number of selected areas in each donor block maps were constructed with the location coordinates of each case the recipient blocks carefully following the preparation of TMA. Before performing the histological sections, the TMA were cooled to -10°C for 30 minutes to after, take place the sequential cutting 4µm thick. The HE staining was performed the first cut of each TMA for morphological control of tumor presence.

Immunohistochemical Staining Method

All cases were processed according to the HRP/peroxidase method. Experimental Pathology Laboratory in PUCPR carried out the technique according to established and standardized protocol. In this study we were performed immunostaining for CD44, CD44v6, CD117 and CD133.

Statistical Analysis

Qualitative variables were described as frequencies and percentages. Quantitative variables, described as mean, median, minimum and maximum values, and standard deviations for the comparison of two groups was considered by Student t test for independent samples or the non-parametric Mann-Whitney test. More than two groups were compared using the nonparametric Kruskal-Wallis. To evaluate the association between two quantitative variables, they were estimated by Spearman correlation coefficients. For the determination of cutoff points for the expression of marked associated with the differentiation of the tumor, ROC curves were adjusted. The condition of normality of the variables was evaluated by the Kolmogorov-Smirnov test. P values <0.05 were considered statistically significant. For the analysis we used the computer program IBM SPSS v.20.

Results

All clinical characteristics were described in Table 1, showing the clinical variables used to the association with the TSC markers. The median age of patients was 61 years (minimum of 18 and maximum of 90). The age was analyzed according to Bethesda classification, which divides into two groups: ≤ 45 to >45 , and the first difference observed in this population studied is the highest percentage of patients over 45 years of age attended by the Brazilian single health system (SUS). Less differentiated tumors are also increased in this population, as well as tumor size having greater% in the stratification 3 and 4 of TNM (Table 1).

The immunohistochemistry analyzes of CD44, CD44v6, CD117, and CD133 markers showed similar positivity in all parts of the tumor analyzed endorsing the presence of TSC in

these tumors (Table 2). A total immunolabeling was obtained by the mean of all tumor parts analyzed (superficial, tumor bulk or invasive front) to each marker.

There was no correlation between the TSC markers studied and the clinical variables gender, histological type (non-mucinous and mucinous), invasion, tumor size, Dukes classification and tumor site (data not shown). As well as, no correlation between the TSC markers in superficial or tumor bulk and all clinical variables analyzed (data not shown).

In the comparative analysis between markers and age, significance was observed regarding CD44 immunopositivity, in the age variable in both analyzes, total age and using the Bethesda classification, all in the invasive front. According to Bethesda classification, the significance association between CD44 immunolabeling and young patients (Table 3). For the other markers CD133, CD117 and CD44v6, no significant correlation was observed between their immunopositivity and the age variable (data not shown) in any part of the tumor analyzed.

For the differentiation variable, significance was observed for the invasive front for CD117 and CD133 markers with non-differentiated tumor (Table 4). For the other markers studied (CD44 and CD44v6) there was no significant association with the differentiation variable (data not shown).

Significant positive immunohistochemistry for the correlation between invasive front CD44 and the lymph nodes involvement was observed (when cancer cells was found in 1 to 3 nearby lymph nodes [N1] or in 4 or more nearby lymph nodes [N2] (Table 5). No other marker studied had significant immunoexpression for this variable (data not shown).

Discussion

Over the years, all cells accumulate genetic and epigenetic alterations. However, the stem cells have a longer life than the others, enough to allow this process to occur, and also present, as main characteristics, the self renewal and differentiation, which allow the mutations acquired there, to be propagated and still, introduce an ideal cell target for the accumulation of precancerous damage^[11,12]. The present study showed some correlations, which follow this rationale, with presence of immunohistochemistry positive to TSC markers, CD44, CD117 and CD133, and clinical variables (age, TNM classification, tumor differentiation and morphologic type) that determine the good or worse prognosis.

The incidence of tissue dysfunction, diseases and many types of cancer, such as colorectal cancer, increases exponentially with age and aging represents the greatest risk factor for the appearance of tumors^[13]. Most persons diagnosed with colorectal cancer are older than 45 years and several studies have demonstrated the relationship between age and the expression of tumor stem markers. Recently, Nangia-Makker et al^[14] in a study with young rats (4-5 months) and the elderly (22-24 months), demonstrated that there is a gradual increase of tumor stem cells in the intestinal crypts with advancing age, which may contribute, in part, to a higher incidence of this type of cancer in the elderly.

Mieog et al.^[15] using the breast cancer cell line marker ALDH1, analyzed its expression in young and elderly patients and observed that the positivity for this marker and the prognosis of the individuals are associated with age.

When analyzing polyps of patients with colorectal cancer, Patel et al.^[16], observed that the expression of CD44, CD116 and ESA was greater in individuals over 55 years and apparently normal mucosa than in those under 55 with adenomas, suggesting that with the age is an increase in the number of stem cells, which can lead to a greater pre-disposition of the

colonic mucosa to a subsequent transformation of the same. For the other hand, younger persons (younger than 20 years), if diagnosed to have colorectal cancer, are likely to have the hereditary form of colorectal cancer such as familial adenomatous polyposis^[17]. Some studies suggested that younger age was a poor prognostic factor ^[18, 19, 20], but other studies have suggested that this is not the case and, young patients are comparable, and possibly better, than their older counterparts ^[21, 22, 23]. Our results showed a positive correlation between CD44 and young patients, suggesting that the presence of TSC in these patients may indicate a poor prognosis to them.

Several tumor markers have already been described because they are related to tumor differentiation. In general, poorly differentiated tumors are those that contain more tumor stem cells and therefore are more aggressive. Jiang et al. ^[24] in their study with gastric cancer and the TSC markers ABCB1, ABCB2 and CD133, demonstrated that there was a significant increase in the degrees of malignancy of this neoplasm when a greater expression of these markers was observed. Another search, also with the marker CD133, by Choi et al. ^[9] identified in its results several patterns that correspond to the behavior of cells positive for it, such as invasiveness and differentiation. Huang et al. ^[25] when analyzing the association between CD117 expression in fibroblasts present in the stromal samples of ovarian carcinoma and clinicopathological variables, found that CD117+ cells were significantly associated with advanced staging, poor differentiation and histological subtypes. Moreover, for Mărgăritescu et al. ^[26] this marker is highly expressed in poorly differentiated metastases of oral cancer, thus contributing to invasion, malignancy and a worse prognosis for the patient.

It is believed that the CD44 tumor stem cell marker has the ability to mimic the T cell receptor and assist tumor access to the lymph node in some types of carcinoma^[27]. Huh et al. ^[28] in colorectal carcinoma tumors and Xie et al. ^[29] in gastric cancer tumors, found that there is a correlation between the expression of this marker and the presence of lymph node

involvement and depth of invasion, thus being an unfavorable prognostic factor of the disease. However, no correlation was observed with CD44v6, which was not expected, since there are several studies reporting its role in metastasis and in a worse prognosis of the patients, besides being closely associated with a more aggressive behavior of the tumor and correlated with depth of invasion, metastasis to the lymph nodes and staging TNM^[29,30,31].

Our study showed the correlation between TSC markers with some clinical variables that were closely related with poorer prognosis in a Brazilian population of colorectal tumor patients. Even so, there is still a paucity of data that determines the prognostic significance of co-expression of TSC markers within the same tumor. But, until now, we can hypothesized is that TSC demand a paradigm shift both in the diagnosis and in the treatment of this pathology.

Table 1. Characteristics of the Participants

	Variables	n	%
Age	≤ 45	13	17.8
	> 45	60	82.2
Gender	Mam	34	46.6
	Female	39	53.4
Differentiation	Non-well differentiated	62	86.1
	Well differentiated	10	13.9
Histologic Type	Mucinous	11	15.3
	Non-mucinous	61	84.7
Lymph Nodes	Present	28	38.9
	Absent	44	61.1
Invasion	Present	44	61.1
	Absent	28	38.9
Tumor Size	1	2	2.7
	2	14	19.2
	3	42	57.5
	4	15	20.5
Side	Right	18	24.7
	Left	55	75.3

Table 2 - Immunohistochemical characterization of the analyzed markers.

TSC Marker	Tumor Part	n	Mean	Median	Minimum	Maximum	Standard deviation
CD44	Superficial	65	1.94	1.66	0.11	7.77	1.52
	Tumor Bulk	61	2.01	1.66	0.11	5.27	1.36
	Invasive Front	44	1.92	1.79	0.08	4.68	1.23
	Total (mean)	72	1.90	1.80	0.11	4.46	1.07
CD44v6	Superficial	38	2.53	2.27	0.17	5.39	1.50
	Tumor Bulk	58	1.88	1.10	0.11	7.67	1.85
	Invasive Front	56	1.98	1.70	0.18	6.56	1.62
	Total (mean)	70	1.95	1.69	0.11	5.28	1.31
CD117	Superficial	42	0.70	0.67	0.10	1.73	0.47
	Tumor Bulk	55	1.06	0.90	0.10	3.55	0.74
	Invasive Front	58	1.00	0.85	0.07	2.68	0.64
	Total (mean)	71	0.91	0.75	0.07	2.51	0.54
CD133	Superficial	44	1.07	0.87	0.10	3.95	0.77
	Tumor Bulk	52	1.40	1.08	0.14	4.64	1.06
	Invasive Front	57	1.26	1.23	0.13	4.10	0.84
	Total (mean)	71	1.21	1.07	0.13	3.56	0.71

Table 3 - Association between CD44 and CD133 immunoexpression and age.

Variable	n	Spearman correlation coefficient					p Value	
Age x invasive Front CD44	44	-0.35					0.019	
Variable	Age	n	Mean	Median	Minimum	Maximum	Standard Deviation	p Value*
Invasive Front CD44	≤ 45	7	2.77	2.39	1.63	3.98	0.90	0.029
	> 45	37	1.76	1.67	0.08	4.68	1.22	

* Non-parametric Mann-Whitney test, p<0.05

Table 4 - Association between CD117 and CD133 immunoexpression and differentiation.

Variable	Differentiation	n	Mean	Median	Minimum	Maximum	Standard deviation	p* Value
Invasive Front CD117	No	48	1.08	0.97	0.07	2.68	0.65	0.016
	Yes	10	0.60	0.45	0.28	1.65	0.40	
Invasive Front CD133	No	48	1.36	1.29	0.13	4.10	0.85	0.049
	Yes	8	0.77	0.69	0.15	1.50	0.48	

* Non-parametric Mann-Whitney test, p<0.05

Table 5 - Association between CD44 positive immunohistochemistry and Lymph Nodes (LFN).

Variable	LFN	n	Mean	Median	Minimum	Maximum	Standard deviation	p* Value
Invasive Front CD44	Absent	30	1.63	1.57	0.08	4.68	1.21	0.018
	Present	14	2.54	2.22	1.17	4.37	1.05	

* Non-parametric Mann-Whitney test, p<0.05

References

1. Instituto Nacional do Câncer. Colorretal. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal>. Acesso em: 16 fev. 2016.

2. Binefa G, Rodríguez-Moranta F, Teule À, Medina-Hayas M. Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2014;20(22):6786-6808. doi: 10.3748/wjg.v20.i22.6786

3. Rich JN. Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer Research*. 2007;67(19):8980-8984. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0895

4. Abdullah LN, Chow EK-H. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and Translational Medicine*. 2013;2(3). doi:10.1186/2001-1326-2-3.

5. Hong I, Hong SW, Chang YG, et al. Expression of the Cancer Stem Cell Markers CD44 and CD133 in Colorectal Cancer: An Immunohistochemical Staining Analysis. *Annals of Coloproctology*. 2015;31(3):84-91. doi:10.3393/ac.2015.31.3.84.

6. Cherciu I, Bărbălan A, Pirici D, Mărgăritescu C, Săftoiu A. Stem Cells, Colorectal Cancer and Cancer Stem Cell Markers Correlations. *Current Health Sciences Journal*. 2014;40(3):153-161. doi:10.12865/CHSJ.40.03.01.

7. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea - a paradigm shift. *Cancer Research*. 2006;66(4):1883-1890. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3153

8. Chu P, Clanton DJ, Snipas TS, et al. Characterization of a subpopulation of colon cancer cells with stem cell-like properties. *International Journal of Cancer*. 2009;124(6):1312–1321. doi: 10.1002/ijc.24061

9. Choi D, Lee HW, Hur KY, et al. Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2009;15(18):2258-2264. doi:10.3748/wjg.15.2258.

10. Du L, Wang H, He L, et al. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(21):6751–6760. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1034
11. Franco SS, Raveh-Amit H, Kobolák J, Alqahtani MH, Mobasher A, Dinnyes A. The crossroads between cancer stem cells and aging. *BMC Cancer*. 2015;15(Suppl 1):S1. doi:10.1186/1471-2407-15-S1-S1.
12. Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL. Stem Cells and the Pathways to Aging and Cancer. *Cell*. 2008;132(4):681-696. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.036
13. Adams PD, Jasper H, Rudolph KL. Aging-Induced Stem Cell Mutations as Drivers for Disease and Cancer. *Cell Stem Cell*. 2015;16(6):601-612. doi:10.1016/j.stem.2015.05.002.
14. Nangia-Makker P, Yu Y, Majumdar AP. Role of cancer stem cells in age-related rise in colorectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. 2015;6(4):86-89. doi:10.4291/wjgp.v6.i4.86.
15. Mieog JSD, de Kruijf EM, Bastiaannet E, et al. Age determines the prognostic role of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase-1 in breast cancer. *BMC Cancer*. 2012;12:42. doi:10.1186/1471-2407-12-42.
16. Patel BB, Yu Y, Du J, Levi E, Phillip PA, Majumdar APN. Age-Related Increase in Colorectal Cancer Stem Cells in Macroscopically Normal Mucosa of Patients with Adenomas: A Risk Factor for Colon Cancer. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;378(3):344-347. doi:10.1016/j.bbrc.2008.10.179.
17. McKay A, Donaleshen J, Helewa RM, et al. Does young age influence the prognosis of colorectal cancer: a population-based analysis. *World Journal of Surgical Oncology*. 2014;12(370). doi:10.1186/1477-7819-12-370.
18. Taylor MC, Pounder D, Ali-Ridha NH, et al. Prognostic factors in colorectal carcinoma of young adults. *Cancer Journal of Surgery*. 1988;31(3):150-153.
19. Palmer ML, Herrera L, Petrelli NJ. Colorectal adenocarcinoma in patients less than 40 years of age. *Diseases of the Colon and Rectum*. 1991;34(4):343-346. doi: 10.1007/BF02050596.

20. Marble K, Banerjee S, Greenwald L. Colorectal carcinoma in young patients. *Journal of Surgical Oncology*. 1992;51(3):179-182. doi: 10.1002/jso.2930510311.
21. Cusack JC, Giacco GG, Cleary K, et al. Survival factors in 186 patients younger than 40 years old with colorectal adenocarcinoma. *Journal of the American College of Surgeons*. 1996;183(2): 105-112.
22. Heys SD, Sherif A, Bagley JS, et al. Prognostic factors and survival of patients aged less than 45 years with colorectal cancer. *The British Journal of Surgery*. 1994;81(5):685-688. doi: 10.1002/bjs.1800810519.
23. Lee PY, Fletcher WS, Sullivan ES, Vetto JT. Colorectal cancer in young patients: characteristics and outcome. *The American Surgeon*. 1994; 60(8):607-612.
24. Jiang Y, He Y, Li H, et al. Expressions of putative cancer stem cell markers ABCB1, ABCG2, and CD133 are correlated with the degree of differentiation of gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2012;15(4):440-450. doi:10.1007/s10120-012-0140-y
25. Huang R, Wu D, Yuan Y, et al. CD117 Expression in Fibroblasts-Like Stromal Cells Indicates Unfavorable Clinical Outcomes in Ovarian Carcinoma Patients. Lee JW, ed. *PLoS ONE*. 2014;9(11):e112209. doi:10.1371/journal.pone.0112209.
26. Mărgăritescu C, Pirici D, Simionescu C, Stepan A. The utility of CD44, CD117 and CD133 in identification of cancer stem cells (CSC) in oral squamous cell carcinomas (OSCC). *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 2011;52(3):985–993.
27. Jalkanen S, Saari S, Kalimo H, et al. Lymphocyte migration into the skin: The role of lymphocyte homing receptor (CD44) and endothelial cell antigen (HECA-452). *The Journal of Investigative Dermatology*. 1990;94(6):786–792. doi:10.1111/1523-1747.ep12874646
28. Huh JW, Kim HR, Kim YJ, et al. Expression of standard CD44 in human colorectal carcinoma: Association with prognosis. *Pathology International*. 2009;59(4):241-246. doi: 10.1111/j.1440-1827.2009.02357.x

29. Xie JW, Huang CM, Zheng CH, et al. Expression tumor stem cell surface marker CD44 in gastric cancer and its significance. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*. 2013;16(11):1107-1112.
30. Xie JW, Chen PC, Zheng CH, et al. Evaluation of the prognostic value and functional roles of CD44v6 in gastric cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2015;141(10):1809-1817. doi: 10.1007/s00432-015-1964-8
31. Ni J, Cozzi PJ, Hao JL, et al. CD44 variant 6 is associated with prostate cancer metastasis and chemo-/radioresistance. 2014;74(6):602-617.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A incidência de disfunção tecidual, doenças e muitos tipos de câncer, como o câncer colorretal, aumentam exponencialmente com a idade e o envelhecimento representa o maior fator de risco para o surgimento dos tumores (Adams *et al.*, 2015). Com o passar dos anos, todas as células acumulam alterações genéticas e epigenéticas. No entanto, as células tronco possuem uma vida útil maior que as demais, suficiente para permitir que esse processo ocorra, e apresentam também, como características principais, a auto renovação e diferenciação, as quais permitem que as mutações adquiridas ali, sejam propagadas para suas descendentes tornando assim, esse tipo celular um alvo ideal para o acúmulo de danos pré-cancerosos (Franco *et al.*, 2015; Rossi *et al.*, 2008).

Há fortes evidências que indicam que a gênese e o progresso da neoplasia dependem desse processo, os quais podem afetar a funcionalidade celular, molecular e fisiológica dos tecidos. Além disso, os efeitos associados à idade, quando concomitantemente com uma desregularização da sinalização celular e mudanças no microambiente das células tronco, elevam o risco de tumorigênese, já que aumentam a resistência à senescência celular e à apoptose, podendo levar à transformação maligna das células tronco normais para células tronco tumorais (Adams *et al.*, 2015; Franco *et al.*, 2015).

Assim, acredita-se que o declínio da capacidade funcional e integridade genética das células tronco do tecido adulto é o maior fator envolvido na formação do tumor durante o envelhecimento. Dessa forma, estudos recentes propõem que o acúmulo de mutações através de divisões das células tronco é o maior determinante do risco de câncer durante a vida, pois, eventualmente, a aquisição de certas modificações podem levar à características como proliferação descontrolada e metástase (Adams *et al.*, 2015; Ajani *et al.*, 2015).

Durante a vida, as células tronco do organismo são sujeitas à danos no DNA, resultantes de efeitos endógenos e exógenos, agentes genotóxicos, encurtamento do telômero e degradação do DNA, direcionando para uma instabilidade do genoma e, conseqüentemente, redução de sua capacidade de reparo (Franco *et al.*, 2015). Um estudo de Welch *et al* (2012) revelou, em sua pesquisa com leucemia mielóide aguda, que as células tronco hematopoiéticas e as células progenitoras provenientes de indivíduos saudáveis acumulam mutações com a idade, correspondendo à 0,13 mutações exônicas por ano de vida, o que pode resultar, depois de muitos anos, dependendo da proporção das alterações, na formação de tumores.

Diversas pesquisas demonstraram a relação entre idade e a expressão de marcadores de células tronco tumorais, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho.

Recentemente, Nangia-Makker *et al* (2015), em um estudo com ratos jovens (4-5 meses) e idosos (22-24 meses), demonstraram que há um aumento gradual de células tronco tumorais nas criptas intestinais com o avanço da idade, o que pode contribuir, em parte, para uma maior incidência desse tipo de câncer em idosos.

7. CONCLUSÕES

- As correlações significativas foram observadas principalmente na região profunda do tumor.
- Houve correlação significativa entre a expressão de CD133 total com a variável idade e CD44 profundo com a variável idade e na estratificação da idade em igual ou menor de 45 anos.
- A imunopositividade de CD117 e CD133 foi correlacionada em tumores pouco/moderadamente diferenciados, sendo esses considerados mais agressivos e associados a um pior prognóstico.
- Correlação significativa foi determinada pela imunopositividade de CD44 e a presença de linfonodos positivos, outro fator de mau prognóstico para o câncer colorretal.
- Não foi encontrada nenhuma correlação entre as variáveis estudadas e o marcador CD44v6.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, P. D.; JASPER, H., & RUDOLPH, K. L. Aging-Induced Stem Cell Mutations as Drivers for Disease and cancer. *Cell Stem Cell*, v. 16, n. 6, p. 601-602, 2015.

AJANI, J.A.; SONG, S; HOCHSTER, H.S.; STEINBERG, I.B. Cancer stem cells: the promise and the potential. *Seminars in oncology, suppl 1 42*, p 3-17, 2015

AL-HAJJ, M.; WICHA, M.S; BENITO-HERNANDEZ, A; MORRISON, S.J; CLARKE, M.F.. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 100, n. 7, p. 3983-3988, 2003

AMERSI, F1; AGUSTIN, M; KO, CY. Colorectal cancer: epidemiology, risk factors, and health services. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, v. 18, n. 3, p. 133-140, 2005.

AUNE, D. Red and processed meat intake and risk of colorectal adenomas: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer Causes Control*, v. 24, n. 4, p. 611-627, 2013.

BACKUS, H.H ;VAN GROENINGEN, C.J; VOS, W; DUKERS, D.F; BLOEMENA, E; WOUTERS, D; PINEDO, H.M; PETERS, G.J. Differential expression of cell cycle and apoptosis related proteins in colorectal mucosa, primary colontumours, and liver metastases. *Journal of Clinical Pathology*, v. 55, n. 3, p 206-211, 2002.

BARDOU, M. Obesity and colorectal cancer. *Gut*, v. 62, n. 6, p. 933-947, 2013.

BOLEIJ, A1; VAN GELDER, M.M; SWINKELS, D.W; TJALSMA, H. Clinical Importance of Streptococcus gallolyticus infection among colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 53, n. 9, p. 870-878, 2011.

BONNET, D; DICK, J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, v.3, n.7, p. 730-737, 1997.

BRUCE WR, VAN DER GAAG H. A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature*, v.199, p. 79-80, 1963.

BRUNSCHWIG, A., SOUTHAM, C.M., LEVIN, A.G. *Host resistance to cancer. Clinical experiments by homotransplants, autotransplants and admixture of autologous leucocytes. Annals of Surgery*, v. 162, p. 416-425, 1965.

CHARAFE-JAUFFRET, E; MONVILLE, F; GINESTIER, C; DONTU, G; BIRNBAUM, D; WICHA, M.S. Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology*, v. 75, n. 2, p. 75-84, 2008.

CHERCIU, I. Stem Cells, Colorectal Cancer and Cancer Stem Cell Markers Correlations. *Current Health Sciences Journal*, v. 40, n. 3, p. 153-161, 2014.

CHOI, D.; LEE, H. W.; HUR, K. Y.; KIM, J. J.; PARK, G. -S. & JANG, S-H. Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, v. 15, n. 18, p. 2258-2264, 2009.

COMPTON, C.C1; FIELDING, L.P; BURGART, L.J; CONLEY, B; COOPER, H.S; HAMILTON, S.R; HAMMOND, M.E; HENSON, D.E; HUTTER, R.V; NAGLE, R.B; NIELSEN, M.L; SARGENT, D.J; TAYLOR, C.R; WELTON, M; WILLETT, C. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Archives of pathology & laboratory medicine*, v. 124, n. 7, p. 979-984, 2000.

COMPTON C.C1. Pathologic prognostic factors in the recurrence of rectal cancer. *Clinical colorectal cancer*, v. 2, n. 3, p. 149-160, 2002.

COMPTON C.C1. Key issues in reporting common cancer specimens: problems in pathologic staging of colon cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Archives of pathology & laboratory medicine*, v. 130, n. 3, p. 318-324, 2006.

COLLINS, A.T; BERRY, P.A; HYDE, C; STOWER, M.J; MAITLAND, N.J. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Research*, v. 65, n. 23, p. 10946-10951, 2005.

DEMING, D.A., LEYSTRA, A.A., NETTEKOVEN, L., SIEVERS, C., MILLER, D., MIDDLEBROOKS, M., et al. *PIK3CA and APC mutations are synergistic in the development of intestinal cancers. Oncogene*, v. 33, p. 2245-2254, 2014.

DOU, J; GU, N. Emerging strategies for the identification and targeting of cancer stem cells. *Tumour Biology: the journal of the international Society for oncodevelopmental Biology and Medicine*, v. 31, n. 4, p. 243-253, 2010.

FARHOUD, S; BROMBERG, S. H; BARRETO, E; GODOY, A.C. Clinical and macroscopic variables that influence the prognosis of colorectal carcinoma. *Arquivos de gastroenterologia*, v. 39, n. 3, p. 163-172, 2002.

FARKAS, S.A., VYMETALKOVA, V., VODICKOVA, L., VODICKA, P., NILSSON, T.K. *DNA methylation changes in genes frequently mutated in sporadic colorectal cancer and in the DNA repair and Wnt/ β -catenin signaling pathway genes*. *Epigenomics*, v. 6, p. 179-191, 2014.

FEARON, E.R., VOGELSTEIN, B. *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. *Cell*, v. 61, p. 759-767, 1990.

FORMICA, V. Immune reaction and colorectal cancer: Friends or foes?. *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 35, p. 12407-12419, 2014.

FRANCO, S. S.; RAVEH-AMIT, H.; KOBOLÁK, J.; ALQAHTANI, M. H.; MOBASHERI, A & DINNYES, A. The Crossroads between Cancer Stem Cells and Aging. *BMC Cancer*, v. 15, n. 1, p. 1-15. 2015.

GAGLIARDI, G; HAWLEY, P. R; HERSHMAN, M. J; ARNOTT, S. J. Prognostic factors in surgery for local recurrence of rectal cancer. *The British Journal of Surgery*, v. 82, n. 10, p. 1401-1405, 1995.

GRAZIANO, A; D'AQUINO, R; LAINO, G; PROTO, A; GIULIANO, M. T; PIROZZI, G; DE ROSA, A; DI NAPOLI, D; PAPACCIO, G. Human CD34+ stem cells produce bone nodules in vivo. *Cell Proliferation*, v. 41, n. 1, p. 1-11, 2008.

HAMBURGER, A.W., SALMON, S.E. *Primary bioassay of human tumor stem cells*. *Science*, v. 197, p. 461-463, 1977.

HANG, D; DONG, H. C; NING, T; DONG, B; HOU, D. L; XU, W. G. Prognostic value of the stem cell markers CD133 and ABCG2 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Diseases of the Esophagus: official journal of the International Society for Diseases of Esophagus*, v. 27, n. 7. P 638-644, 2012.

HONG, I., HONG S. W., CHANG, Y. G., LEE, W. Y., LEE, B. & KANG, Y. K. ET AL. Expression of the Cancer Stem Cell Markers CD44 and CD133 in Colorectal Cancer: An Immunohistochemical Staining Analysis. *Annals of Coloproctology*, v. 31, n. 3, p. 84-91, 2015.

HORST, D; SCHEEL, S. K; LIEBMANN, S; NEUMANN, J; MAATZ, S; KIRCHNER, T; JUNG, A. The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer. *The Journal of Pathology*, v. 219, n. 4, p. 427-434, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Colorretal. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal>>. Acesso em: 16 fev. 2016.

KAKARALA, M; WICHA, M. S. Implications of the Cancer Stem-Cell Hypothesis for Breast Cancer Prevention and Therapy. *Journal of Clinical Oncology*, v. 26, n. 17, p. 2813-2820, 2008.

KATHER, J.N., WEIS C.A., BIANCONI F., MELCHERS S.M., SCHAD L.R., GAISER T, MARX A, ZÖLLNER F.G. Multi-class texture analysis in colorectal cancer histology. *Scientific Reports*, v. 16, n. 6, p. 27988, 2016.

KE CHEN, YING-HUI HUANG AND JI-LONG CHEN. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 34, p. 732-740, 2013.

KIMILOĞLU ŞAHAN E, ERDOĞAN N, ULUSOY İ, SAMET E, AKYILDIZ İĞDEM A, GÖNÜLLÜ D. P53, KI67, CD117 expression in gastrointestinal and pancreatic neuroendocrine tumours and evaluation of their correlation with clinicopathological and prognostic parameters. *The Turkish journal of gastroenterology*, v. 26, n. 2, p. 104-111, 2015.

KINZLER, K.W., NILBERT, M.C., VOGELSTEIN, B., BRYAN, T.M., LEVY, D.B., SMITH, K.J., et al. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science*, v. 251, p. 1366-1370, 1991.

KOJIMA, M1; ISHII, G; ATSUMI, N; FUJII, S; SAITO, N; OCHIAI, A. Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: a clinicopathological study. *Cancer Science*, v. 99, n. 8, p. 1578-1583, 2008.

KOZOVSKA, Z; GABRISOVA, V; KUCEROVA, L . Colon cancer: cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. *Biomedicine & pharmacotherapy*, v. 68, n. 8, p. 911-916, 2014.

KOSTIC, A. D1; GEVERS, D; PEDAMALLU, C. S; MICHAUD, M; DUKE, F; EARL, A. M; OJESINA, A. I; JUNG, J; BASS, A. J; TABERNERO, J; BASELGA, J; LIU, C; SHIVDASANI, R. A; OGINO, S; BIRREN, B. W; HUTTENHOWER, C; GARRETT, W. S; MEYERSON, M. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome research*, v. 22, n. 2, p. 292-298, 2012.

KREBS, B1; KOZELJ, M; KAVALAR, R; GAJZER, B; GADZIJEV, E. M. Prognostic value of additional pathological variables for long-term survival after curative resection of rectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, v. 12, n. 28, p.4565-4568, 2006.

LAPIDOT, T; SIRARD, C; VORMOOR, J; MURDOCH, B; HOANG, T; CACERES-CORTES, J; MINDEN, M; PATERSON, B; CALIGIURI, M. A; DICK, J. E. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, v. 367, n. 6464, p. 645-648, 1994.

LEE, H. J; EOM, D. W; KANG, G. H; HAN, S. H; CHEON, G. J; OH, H. S; HAN, K. H; AHN, H. J; JANG, H. J; HAN, M. S. Colorectal micropapillary carcinomas are associated with poor prognosis and enriched in markers of stem cells. *Modern Pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology*, v. 26, n. 8, p. 1123-1131, 2013.

LI, A.F., TSAY, S.H., LIANG, W.Y., LI, W.Y., CHEN, J.Y. Clinical significance of p16INK4 and p53 overexpression in endocrine tumors of the gastrointestinal tract. *American journal of clinical pathology*, v. 126, n. 6, p. 856-865, 2006.

LIANG, S. Y1; PHILLIPS, K. A; NAGAMINE, M; LADABAUM, U; HAAS, JS. Rates and predictors of colorectal cancer screening. *Preventing Chronic Disease*, v. 3, n. 4, A117, 2006.

LV, L; LIU, H. G; DONG, S. Y; YANG, F; WANG, Q. X; GUO, G. L; PAN, Y. F; ZHANG X. H. Upregulation of CD44v6 contributes to acquired chemoresistance via the modulation of autophagy in colon cancer SW480 cells. *Tumour Biology: the journal of International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, v.37, n. 7, p. 8811-8824, 2016.

MARTÍNEZ-CLIMENT, J. A1; ANDREU, E. J; PROSPER, F. Somatic stem cells and the origin of cancer. *Clinical & Translational Oncology: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer institute of Mexico*, v. 8, n. 9, p. 647-663, 2006.

MICHELS, K. B. Fruit and Vegetable Consumption and Colorectal Adenomas in the Nurses' Health Study. *Cancer Research*, v. 66, n. 7, p. 3942-3953, 2006.

MIRAGLIA, S1; GODFREY, W; YIN, A. H; ATKINS, K; WARNKE, R; HOLDEN, J. T; BRAY, R. A; WALLER, E. K; BUCK, D. W. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, v. 90, n. 12, p. 5013-5021, 1997.

MOOSSAVI, S; ANSARI R. Intestinal stem cell imaging in colorectal cancer screening. *Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine*, v. 9, n. 2, p. 37-39, 2013.

MORRIS, E. J1; PENEGAR ,S; WHITEHOUSE, L. E; QUIRKE, P; FINAN, P; BISHOP, D. T; WILKINSON, J; HOULSTON, R. S. A retrospective observational study of the relationship between family history and survival from colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, v. 108, n. 7, p. 1502-1507, 2013.

NANGIA-MAKKER, P. Role of cancer stem cells in age-related rise in colorectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, v. 6, n. 4, p. 86-89, 2015.

NISHISHO, I., NAKAMURA, Y., MIYOSHI, Y., MIKI, Y., ANDO, H., HORII, A., et al. *Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients*. *Science*, v.253, p. 665-669,1991.

NISTAL, E. Factors Determining Colorectal Cancer: The Role of the Intestinal Microbiota. *Frontiers in Oncology*, v. 5, n. 220, 2015.

O'BRIEN, C. A1; POLLETT, A; GALLINGER, S; DICK, J. E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, v. 445, n. 7123, p. 106-110, 2007.

PANDEY, S, AGARWAL, T, JAIN, V, MISHRA, S. Malignant CD 117 negative colonic GIST-a case report. *International journal of surgery*, v. 5, n. 5, p. 395-397, 2010.

PELUCCHI, C. Alcohol Consumption and Cancer Risk. *Nutr Cancer*, v. 63, n. 7, p. 983-990, 2011.

RASSOULI, F. B1,2; MATIN, M. M3,4; SAEINASAB M5. Cancer stem cells in human digestive tract malignancies. *Tumour Biology: the journal of International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, v. 37, n. 1, 2016.

REN, F. CD133: A cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers. *World Journal of Gastroenterology*, v. 19, n. 17, p. 2603-2611, 2013.

RICCI-VITIANI, L1; LOMBARDI, D. G; PILOZZI, E; BIFFONI, M; TODARO, M; PESCHLE, C; DE MARIA, R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, v. 445, n. 7123, p. 111-115, 2007.

ROSS, MICHAEL H. *Histologia: texto e atlas/Michael H. Ross, Wojciech Pawlina*.7.ed.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2016.

ROSSI, D. J.; JAMIESON, C. H. & WEHMAN, I. L. Stem Cells and the pathways to Aging and cancer. *Cell*, v. 132, n. 4, p. 681-696, 2008.

SHAH, Y.M., VAN DEN BRINK, G.R. c-Kit as a Novel Potential Therapeutic Target in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, v.149, n.3, p. 534-537, 2015.

SINGH, S. K1; HAWKINS, C; CLARKE, I. D; SQUIRE, J. A; BAYANI, J; HIDE, T; HENKELMAN, R. M; CUSIMANO, M. D; DIRKS, P. B. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, v. 432, n. 7015, p. 396-401, 2004.

TANAKA, T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental in animal studies. *Journal of Carcinogenesis*, v. 8, n. 5, 2009.

VAIOPOULOS, A. G1; KOSTAKIS, I. D; KOUTSILIERIS, M; PAPAVALASSILIOU, A. G. Colorectal cancer stem cells. *Stem Cells*, v. 30, n. 3, p. 363-371, 2012

VIGETTI, I D1; VIOLA, M; KAROUSOU, E; RIZZI, M; MORETTO, P; GENASETTI, A; CLERICI, M; HASCALL, VC; DE LUCA, G; PASSI, A. Hyaluronan-CD44-ERK1/2 regulate human aortic smooth muscle cell motility during aging. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 7, p. 4448-4458, 2008.

WAN, X.B; PAN, Z.Z; REN, Y.K; DING, P.R; CHEN, G; WAN, D.S. Expression and clinical significance of metastasis-related tumor markers in colorectal cancer. *Chinese Journal of Cancer*, v. 28, n. 9, p. 950-954, 2009.

WEISS, L; GRUNDMANN, E; TORHORST, J; HARTVEIT, F; MOBERG, I; EDER, M; FENOGLIO-PREISER, C.M; NAPIER, J; HORNE, C.H; LOPEZ, M.J, ET AL. Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *The Journal of Pathology*, v. 150, n. 3, p. 195-203, 1986.

WELCH, J. S.; LEY, T. J.; LINK, D. C.; MILLER, C. A.; LARSON, D. E. & KOBOLDT, D. C. The origin and evolution of mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Cell*, v. 150, n. 2, p. 264-278, 2012.

WICHA, M.S.; LIU, S; DONTU, G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Research*, v. 66, n. 4, p. 1883-1890, 2006.

ZHANG, NH; LI, J; LI, Y; ZHANG, X.T; LIAO, W.T; ZHANG, J.Y.; LI, R; LUO, R.C. Co-expression of CXCR4 and CD133 proteins is associated with poor prognosis in stage II-III colon cancer patients. *Experimental and therapeutic medicine*, v. 3, n. 6, p. 973-982, 2012.

ZORATTO, F., ROSSI, L., VERRICO, M., PAPA, A., BASSO, E., ZULLO, A., et al. *Focus on genetic and epigenetic events of colorectal cancer pathogenesis: Implications for molecular diagnosis*. *Tumour Biology*, v. 35, p. 6195-6206, 2014.