

CRISTOVAM SCAPULATEMPO NETO

Adenocarcinoma colorretal :

aspectos anatomopatológicos e imuno-histoquímicos do crescimento tumoral, do citoesqueleto e de marcadores de regulação do pH intracelular

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Venancio Avancini Ferreira Alves

São Paulo

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Scapulatempo Neto, Cristovam

Adenocarcinoma colorretal : aspectos anatomopatológicos e imuno-histoquímicos do crescimento tumoral, do citoesqueleto e de marcadores de regulação do pH intracelular / Cristovam Scapulatempo Neto. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Venancio Avancini Ferreira Alves.

Descritores: 1.Neoplasias colorretais 2.Adenocarcinoma 3.Imunoistoquímica
4.Queratinas 5.Citoesqueleto 6.Proliferação de células 7.Apoptose 8.Transportadores de ácidos monocarboxílicos

USP/FM/SBD-363/08

À minha esposa, Heloisa, companheira de todas as horas, por sua cumplicidade, dedicação, apoio, amor, compreensão e por me oferecer as minhas jóias mais preciosas: o João Pedro e o bebê que aconchegantemente se desenvolve em seu ventre.

Aos meus pais Raphael e Ilzia; pelo amor e carinho sempre oferecidos e por serem os principais incentivadores para que essa tese fosse realizada.

Aos meus sogros Mário e Sylvia pelo constante apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus por ter sempre me abençoado e por me mostrar sempre a solução para as minhas ansiedades e por me dar sempre serenidade em minhas decisões. Muito obrigado por me ajudar a vencer mais essa batalha na guerra da vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, obrigado pela orientação que não foi somente científica, mas que em muitas horas foi amiga e em alguns momentos até paternal. Obrigado por me ensinar a ser mais crítico com os dados e também por sempre me tranquilizar com as suas rápidas respostas para os meus questionamentos.

Aos meus pais que desde a minha infância me incentivaram a seguir seus passos como amantes da Patologia.

Aos meus amigos patologistas da Fundação Pio XII, Hospital de Câncer de Barretos, Cristiano, Ligia, Sandra e Téo, pela acolhida, pela paciência durante as “semanas” de tese em São Paulo, sempre se sobrecarregando de trabalho para garantirem a minha tranquilidade na realização desta tese.

Ao Dr Marcello Franco e a todos os patologistas do Departamento de Patologia da UNIFESP pelos brilhantes ensinamentos que me passaram durante minha residência, por serem exemplos de profissionais formadores de bons patologistas.

Ao meu amigo Kleber Simões do Espírito Santo pela amizade desinteressada, pelas trocas de experiências em casos difíceis, pelos seus discursos entusiasmados e extremamente realistas sobre a vida e a patologia, sempre abrilhantados pela genialidade de suas idéias.

Ao meu amigo Dr. Evandro Sobroza de Mello que durante os primeiros anos da minha pós graduação me passou preciosos ensinamentos sobre patologia hepática.

Ao meu amigo Adhemar Longatto pela amizade, ajuda com os MCTs e com suas leituras críticas de partes deste trabalho.

À minha querida amiga Alda Wakamatsu pela ajuda na confecção dos TMAS, pelas brilhantes reações imuno-histoquímicas e por todas as palavras de carinho e conforto.

Às amigas Suely Nonogaki e Cristina Kanamura pelo auxílio na realização das reações imuno-histoquímicas.

À amiga Mônica Conte Bela pelo auxílio na confecção dos TMAS.

Aos colegas da Universidade do Minho e do Porto, em Portugal, Fátima Baltazar, Céline Piheiro, Adhemar Longato, Luísa Ferreira, Sandra Martins, Mesquita Rodrigues e Fernando Schmitt, pelo sucesso na nossa cooperação, que por enquanto já resultou em dois bons papers publicados na Virchows Archives sobre carcinomas colorretais. Que publiquemos muitos outros!

À Stela Peres pelo brilhante trabalho estatístico realizado.

Ao Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva (Burns) pelos ensinamentos do SPSS e End Note, softwares que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

4.2.3.3	Apoptose em tecidos epiteliais colorretais detectada pelo anticorpo anti queratina 18 clivada	26
4.2.3.4	Apoptose como fator prognóstico no câncer colorretal	28
4.3	Relação entre apoptose e proliferação celular no epitélio colorretal normal ou neoplásico	29
5.	Tranportadores de monocarboxilatos 1,2 e 4 (MCT1, MCT2 e MCT4).....	30
OBJETIVOS.....		33
1.	Objetivo geral.....	34
1.1	Objetivos específicos.....	34
MÉTODOS		36
1.	Seleção das amostras.....	37
2.	Fixação	37
3.	Variáveis anatomopatológicas utilizadas no estudo.....	37
3.1	Tamanho do tumor	38
3.2	Localização.....	38
3.3	Tipos macroscópicos	38
3.4	Infiltração da serosa.....	39
3.5	Tipos histológicos.....	39
3.6	Grau histológico	40
3.7	Nível da infiltração tumoral na parede do órgão	40
3.8	Infiltrado linfocitário tumoral.....	40
3.9	Desmoplasia.	40
3.10	Borda tumoral.....	41
3.11	Invasão de vasos linfáticos	41
3.12	Invasão de vasos sangüíneos	41
3.13	Invasão perineural	41
3.14	Metástase linfonodal.....	42
3.15	Metástase hepática.....	42
4	Seleção das áreas de interesse e confecção dos blocos de microarranjo de tecidos (Tissue microarray, ou TMA)	42
4.1	Agulhas.....	43
4.2	Grade de papel.....	43
4.3	Molde do bloco de parafina.....	44
4.4	Blocos de TMA	44
4.5	Coleção de lâminas à partir do TMA	46

5.	Coleção de amostras utilizadas para o estudo dos transportadores de monocarboxilato 1, 2 e 4	47
6.	Reação imuno-histoquímica	47
6.1	Anticorpos primários	47
6.1.1	Técnica utilizada para a detecção dos antígenos queratina 18 clivada, Ki-67, queratina 7 e queratina 20	48
6.1.1.1	Controles positivos e negativos.....	50
6.1.2	Técnica utilizada para os anticorpos MCT1, MCT2 e MCT 4	50
7	Avaliação das imuno-expressões	52
7.1	Queratina 7 (K7) e queratina 20 (K20).....	52
7.2	Antígeno Ki-67.....	52
7.3	Queratina 18 clivada.....	53
7.4	MCT 1, MCT 2 e MCT 4	53
8.	Análise estatística.....	54

RESULTADOS..... 56

1.	Características anatomopatológicas	57
1.1	Distribuição das variáveis anatomopatológicas dos adenocarcinomas primários, de acordo com a presença de metástase linfonodal	60
1.2	Distribuição das variáveis anatomopatológicas dos adenocarcinomas primários, de acordo com a presença de metástase hepática	62
2	Queratina 7 (K7).....	64
2.1	Imunoexpressão da queratina 7 nos diferentes tecidos epiteliais estudados	64
2.2	Comparação das imunoexpressões da queratina 7 em amostras pareadas dos diversos tecidos epiteliais estudados.....	65
2.3	Distribuição da imunoexpressão da queratina 7 nos adenocarcinomas primários, de acordo com as variáveis anatomopatológicas	66
3.	Queratina 20 (K 20)	68
3.1	Imunoexpressão da queratina 20 nos diferentes tecidos epiteliais estudados	68
3.2	Comparação entre as imunoexpressões da queratina 20 em amostras pareadas dos diversos tecidos epiteliais estudados	69
3.3	Distribuição da imunoexpressão da queratina 20 nos adenocarcinomas primários, de acordo com as variáveis anatomopatológicas	70

4.	Antígeno de proliferação celular Ki -67.....	72
4.1	Imunoexpressão do antígeno de proliferação celular ki-67 nos diferentes tecidos epiteliais estudados.....	72
4.2	Comparação entre as imunoexpressões do antígeno ki-67 em amostras pareadas dos diversos tecidos estudados.....	73
4.3	Distribuição dos padrões de imunoexpressão do antígeno ki-67 nos adenocarcinomas primários, de acordo com as variáveis anatomopatológicas.....	74
5.	Índice de células em apoptose (IA).....	76
5.1	Índice de células em apoptose nos diferentes tecidos epiteliais estudados.....	76
5.2	Índice de células em apoptose nas diferentes amostras teciduais epiteliais.....	77
5.3	Comparação entre os índices de células em apoptose em amostras pareadas dos diversos tecidos epiteliais estudados.....	78
6.	Transportadores de monocarboxilatos 1, 2 e 4 (MCTs 1, 2 e 4).....	81
6.2	Comparação entre a imunoexpressão do mct 1 entre as amostras pareadas de mucosa normal e adenocarcinoma primário.....	82
6.2.1	Imunoexpressão citoplasmática.....	82
6.2.2	Imunoexpressão membranosa.....	83
6.3	Comparação da imunoexpressão do mct 2 entre as amostras pareadas de mucosa normal e adenocarcinoma primário.....	83
6.3.1	Imunoexpressão citoplasmática.....	83
6.3.2	Imunoexpressão membranosa.....	84
6.4	Comparação da imunoexpressão do mct 2 entre as amostras pareadas de mucosa normal e adenocarcinoma primário.....	85
6.4.1	Imunoexpressão citoplasmática.....	85
6.4.2	Imunoexpressão membranosa.....	86
6.5	Distribuição da imunoexpressão dos transportadores de monocarboxilatos nos adenocarcinomas primários, de acordo com as variáveis anatomo-patológicas.....	86
6.5.1	MCT 1.....	86
6.5.2	MCT 2.....	88
6.5.3	MCT 4.....	90
7	Distribuição das imunoexpressões dos marcadores utilizados nos adenocarcinomas primários de acordo com a presença ou ausência de metástase linfonodal ou hepática.....	93
7.1	Distribuição dos marcadores conforme presença de metástase linfonodal.....	93
7.2	Distribuição dos marcadores conforme presença de metástase hepática.....	95

8.	Relação entre a imuno-expressão dos transportadores de monocarboxilato 1, 2 e 4 e a imuno-expressão do antígeno Ki-67 em amostras de adenocarcinoma primário colorretal.....	96
9	Relação entre a imuno-expressão dos transportadores de monocarboxilato 1, 2 e 4 e o índice de células em apoptose (IA) em amostras de adenocarcinoma primário colorretal.....	98
10.	Relação entre o índice de células em apoptose nos carcinomas primários e as imunoexpressões das queratinas 7 e 20.....	99
11.	Relação entre a imuno-expressão do antígeno ki-67 e a imunoexpressão das queratinas 7 e 20 nos adenocarcinomas primários.....	100
12.	Análise de regressão logística univariada utilizando as variáveis anatomopatológicas e a imunoexpressão dos marcadores utilizados como possíveis fatores associados à presença de metástase linfonodal.....	101
13.	Análise de regressão logística multivariada utilizando as variáveis anatomopatológicas e a imunoexpressão dos marcadores utilizados como possíveis fatores associados à presença de metástase linfonodal.....	104
14.	Análise de regressão logística univariada utilizando as variáveis anatomopatológicas e a imunoexpressão dos marcadores utilizados como possíveis fatores associados à presença de metástase hepática.....	105
15.	Análise de regressão logística multivariada utilizando as variáveis anatomopatológicas e a imunoexpressão dos marcadores utilizados como possíveis fatores associados à presença de metástase hepática.....	108
DISCUSSÃO.....		109
1.	Importância das variáveis histológicas na metastatização para linfonodos .	110
2.	Importância das variáveis histológicas na metastatização para o fígado	112
3.	Queratinas e carcinoma colorretal.....	114
3.1	Queratina 7	114
3.2	Queratina 20	117
4	Antígeno Ki-67.....	118
5.	Índice de células em apoptose.....	120
6.	Pesquisa da imunoexpressão das moléculas regulatórias do ph intracelular (transportadores de monocarboxilato 1, 2 e 4) nos carcinomas colorretais e sua relação com a taxa de proliferação celular e apoptose em amostras de adenocarcinoma primário colorretal.....	122

7. Pesquisa da associação da imunexpressão dos marcadores estudados, em amostras de adenocarcinoma primário, com a presença de metástases linfonodais e hepáticas	126
8. Análise de regressão logística multivariada para a presença de metástase linfonodal	127
9. Análise de regressão logística multivariada para a presença de metástase hepática.....	129
10. Comentários finais e perspectivas	130
CONCLUSÕES	133
ANEXOS	136
Anexo 1. Legendas para Planilha de carcinomas colorretais	137
Anexo 2. Legendas para Planilha de carcinomas colorretais utilizadas para fins estatísticos	139
Anexo 3. Estadiamento patológico e clínico para os carcinomas colorretais.....	141
Anexo 4. Distribuição das variáveis anatomopatológicas.....	143
Anexo 5. Resultado das imunexpressões dos marcadores pesquisados	149
REFERÊNCIAS	154

APÊNDICES

Trabalhos publicados durante a pós-graduação

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Sistema avidina biotina peroxidase
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
AJCC	Comitê da junta americana do câncer
borda tum	Borda tumoral
CCR	Carcinoma colorretal
cm	centímetro
desmopla	Desmoplasia
DNA	Ácido desoxi-ribonucleico
et al	e outros
FI	filamentos intermediários
Grau tumor	Grau tumoral
IA	Índice de células em apoptose
IA F	Índice de células em apoptose na metástase hepática
IA L	Índice de células em apoptose na metástase linfonodal
IA MN	Índice de células em apoptose na mucosa normal
IA T	Índice de células em apoptose no tumor primário
IA TA	Índice de células em apoptose no tumor primário agrupado
IC _(95%)	Intervalo de confiança de 95 %
Infilt. Infla.	Infiltrado inflamatório tumoral
inf. linfat.	Infiltração linfática tumoral
inf. perin.	Infiltração tumoral perineural
inf serosa	Infiltração da serosa
inf. vasc.	Infiltração vascular sanguínea tumoral
K7	Queratina 7
K18	Queratina 18
K20	Queratina 20
MCT 1	Transportador de monocarboxilato 1
MCT 1CT	Expressão citoplasmática do MCT1 no tumor primário
MCT 1MT	Expressão membranosa do MCT1 no tumor primário
MCT 1CM	Expressão citoplasmática do MCT1 na mucosa normal
MCT 1MM	Expressão membranosa do MCT1 na mucosa normal
MCT 2	Transportador de monocarboxilato 2
MCT 2CT	Expressão citoplasmática do MCT2 no tumor primário
MCT 2MT	Expressão membranosa do MCT2 no tumor primário
MCT 2CM	Expressão citoplasmática do MCT2 na mucosa normal
MCT 2MM	Expressão membranosa do MCT2 na mucosa normal
MCT 4	Transportador de monocarboxilato 4
MCT 4CT	Expressão citoplasmática do MCT4 no tumor primário
MCT 4MT	Expressão membranosa do MCT4 no tumor primário
MCT 4CM	Expressão citoplasmática do MCT4 na mucosa normal
MCT 4MM	Expressão membranosa do MCT4 na mucosa normal
meta hep	Metástase hepática.
meta linf.	Metástase linfonodal
OR	“Odds ratio”

prof. Infilt.	Profundidade de infiltração do tumor primário
SOE	Sem outra especificação
tam	Tamanho do tumor primário
tipo histol	Tipo histológico
tipo macro	Tipo macroscópico
TMA	Microarranjo tecidual
TNM	T (tumor) N (status linfonodal) e M (presença ou ausência de metástase)
topo.	Topografia do tumor primário
TP F	Taxa de proliferação na metástase hepática
TP FA	Taxa de proliferação na metástase hepática agrupado
TP L	Taxa de proliferação na metástase linfonodal
TP LA	Taxa de proliferação na metástase linfonodal agrupado
TP MN	Taxa de proliferação na mucosa normal
TP MNA	Taxa de proliferação na mucosa normal agrupado
TP T	Taxa de proliferação no tumor primário
TPT A	Taxa de proliferação no tumor primário agrupado
UICC	União Internacional de Combate ao Câncer

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

- Gráfico 1** Mediana do índice de células em apoptose (IA) em diferentes amostras epiteliais colorretais
- Figura 1** As duas principais vias de apoptose em células de mamíferos
- Figura 2** Passo a passo do preparo da agulha
- Figura 3** Confeção do bloco de TMA
- Figura 4** Adenocarcinoma bem diferenciado
- Figura 5** Adenocarcinoma pouco diferenciado
- Figura 6** Adenocarcinoma mucinoso
- Figura 7** Borda tumoral expansiva
- Figura 8** Borda tumoral infiltrativa
- Figura 9** Infiltração linfática tumoral
- Figura 10** Infiltração vascular tumoral
- Figura 11** Infiltração tumoral perineural
- Figura 12** Positividade para K7 em adenocarcinoma colorretal
- Figura 13** Positividade para K 20 em adenocarcinoma colorretal
- Figura 14** Alta taxa proliferativa (ki-67 > 50%) em adenocarcinoma colorretal
- Figura 15** Positividade para K18 clivada em em mucosacolorretal
- Figura 16** Positividade para K18 clivada em adenocarcinoma colorretal
- Figura 17** Positividade membranosa para MCT 1 em adenocarcinoma colorretal

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variáveis anatomopatológicas X metástase linfonodal
Tabela 2	Variáveis anatomopatológicas X metástase hepática
Tabela 3	Comparação da K7 entre diferentes amostras epiteliais
Tabela 4	K7 X variáveis anatomopatológicas
Tabela 5	Comparação da K20 entre diferentes amostras teciduais
Tabela 6	K20 X variáveis anatomopatológicas
Tabela 7	Comparação do Ag Ki-67 entre diferentes amostras
Tabela 8	Ag Ki-67 X variáveis anatomopatológicas
Tabela 9	Comparação do IAs entre diferentes amostras teciduais
Tabela 10	IA X variáveis anatomopatológicas
Tabela 11	Comparação da imunoexpressão citoplasmática do MCT 1 entre amostras de mucosa normal e adenocarcinoma primário
Tabela 12	Comparação da imunoexpressão membranosa do MCT 1 entre amostras de mucosa normal e adenocarcinoma primário
Tabela 13	Comparação da imunoexpressão citoplasmática do MCT 2 entre amostras de mucosa normal e de adenocarcinoma primário.
Tabela 14	Comparação da imunoexpressão membranosa do MCT 2 entre amostras de mucosa normal e de adenocarcinoma primário
Tabela 15	Comparação da imunoexpressão citoplasmática do MCT 4 entre amostras de mucosa normal e de adenocarcinoma primário
Tabela 16	Comparação da imunoexpressão membranosa do MCT 4 entre amostras de mucosa normal e de adenocarcinoma primário
Tabela 17	MCT 1 X variáveis anatomopatológicas

- Tabela 18** MCT 2 X variáveis anatomopatológicas
- Tabela 19** MCT 4 X variáveis anatomopatológicas
- Tabela 20** Antígenos pesquisados X metástase linfonodal
- Tabela 21** Antígenos pesquisados X metástase hepática
- Tabela 22** MCTs X taxa de proliferação celular
- Tabela 23** MCTs X índice de células em apoptose
- Tabela 24** IA X K7 e K20
- Tabela 25** Taxa de proliferação celular X K7 e K20
- Tabela 26** Regressão logística univariada para metástase linfonodal
- Tabela 27** Regressão logística multivariada para metástase linfonodal
- Tabela 28** Regressão logística univariada para metástase hepática
- Tabela 29** Regressão logística multivariada para metástase hepática

RESUMO

Scapulatempo Neto C. *Adenocarcinoma colorretal: aspectos anatomopatológicos e imuno-histoquímicos do crescimento tumoral, do citoesqueleto e de marcadores de regulação do pH intracelular*[tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 176p.

Centrado no carcinoma colorretal, o presente trabalho visou: 1) Estudar a distribuição das principais variáveis anatomopatológicas, pesquisando sua associação com metástase linfonodal ou hepática. 2) Com base nas eventuais associações encontradas, selecionar um conjunto de variáveis que, estudadas no tumor primário, possam prever a presença de metástase nodal ou hepática. 3) Analisar os perfis de imunoexpressão de alguns marcadores potencialmente relacionados à citoarquitetura (queratina 7 e 20) e ao crescimento tumoral (proliferação através do Ag Ki-67 e apoptose através da queratina 18 clivada) em amostras de mucosa normal, adenocarcinoma primário, metástase linfonodal e metástase hepática, explorando suas eventuais relações com as variáveis histopatológicas e o estadiamento da lesão. 4) Pesquisar possíveis associações entre a expressão dos transportadores de monocarboxilato 1, 2 e 4, moléculas reguladoras do pH intracelular, e os marcadores acima relacionados e as variáveis anatomopatológicas. A casuística foi constituída por 139 adenocarcinomas colorretais, sendo 96 sem metástase hepática e 39 com metástase hepática. Os casos foram revistos e 13 variáveis anatomopatológicas foram selecionadas para fazer parte do estudo. Foram confeccionados manualmente blocos de microarranjos teciduais (TMA) de mucosa normal, tumor primário, metástase linfonodal e metástase hepática, cujos cortes foram submetidos a estudo imuno-histoquímico utilizando anticorpos anti queratina 7 (K7), queratina 20 (K20), Ki-67 e queratina 18 clivada. Em 126 blocos de parafina de tumores, e 86 amostras de mucosa normal correspondentes foram submetidos a estudo imuno-histoquímico utilizando anticorpos anti transportadores de monocarboxilato 1, 2 e 4 (MCT1, MCT2 e MCT 4). A presença de metástase linfonodal associou-se estatisticamente com a presença de infiltração tumoral além da camada muscular própria (T3 ou T4) ($p < 0,001$), presença de desmoplasia tumoral moderada / intensa ($p = 0,043$), presença de infiltração de vasos linfáticos ($p < 0,001$), presença de infiltração venosa ($p < 0,001$) e presença de infiltração tumoral perineural ($p < 0,001$). A presença de metástase hepática teve associação estatisticamente significativa com a presença de infiltração tumoral além da camada muscular própria ($p = 0,004$) e com a presença de bordas tumorais infiltrativas ($p = 0,05$). As amostras de mucosa colorretal normal apresentaram baixa frequência de positividade para a queratina 7, o mesmo ocorrendo com os adenocarcinomas primários e as metástases linfonodais. Detectamos, entretanto, diferença estatística significativa entre a maior imunoexpressão da K7 nas metástases hepáticas quando comparadas aos adenocarcinomas primários ($p < 0,001$) e às metástases linfonodais ($p = 0,015$). Conforme esperado a queratina 20 mostrou-se presente na quase totalidade das amostras de mucosa colorretal normal e em mais de 90% das amostras dos vários tipos de lesão aqui estudadas. A taxa de proliferação nos adenocarcinomas primários foi significativamente superior à da observada na mucosa normal ($p < 0,001$). Não

houve diferenças estatísticas entre as taxas proliferativas das amostras neoplásicas. O índice de células em apoptose foi estatisticamente significativo mais elevado nos adenocarcinomas primários que na mucosa normal ($p < 0,001$), assim como foi mais elevado nas metástases hepáticas em relação aos adenocarcinomas primários ($p = 0,022$). Tumores maiores que 5 cm apresentaram índices apoptóticos mais elevados que aqueles menores que 5 cm ($p = 0,005$). As expressões citoplasmática e membranosa dos MCT1 e 4 foram mais frequentes nos adenocarcinomas que nas mucosas normais ($p < 0,001$). A expressão membranosa do MCT1 associou-se à presença de infiltração linfática ($p = 0,004$), infiltração sangüínea ($p = 0,018$) e à presença de índices apoptóticos mais elevados. Em conclusão, dentre as variáveis histológicas, infiltração linfática tumoral e infiltração de vasos sangüíneos foram fatores de risco independentes para metástase linfonodal e infiltração tumoral além da muscular própria e a presença de bordas tumorais infiltrativas foram fatores de risco independentes para metástase hepática nas análises multivariadas. A queratina 7 foi mais frequentemente expressa nas metástases hepáticas que nas metástases linfonodais e adenocarcinomas primários, indicando que a aquisição da expressão da queratina 7 pode ser uma alteração tardia do citoesqueleto associada a maior agressividade do tumor. A proliferação celular marcada pelo Ag Ki-67 assim como a apoptose, marcada pela queratina 18 clivada mostraram significativo incremento do normal para o adenocarcinoma primário e suas respectivas metástases. Os MCTs foram mais expressos nos adenocarcinomas que nas mucosas normais, sugerindo possível interferência de seu papel no controle do pH intracelular nestas neoplasias.

Descritores: 1.Neoplasias colorretais 2.Adenocarcinoma 3.Imunoistoquímica
4. Queratinas 5.Citoesqueleto 6.Proliferação de células 7.Transportadores de ácidos monocarboxílicos

SUMMARY

Scapulatempo Neto C. *Colorectal adenocarcinoma: anatomopathological and immunohistochemical aspects of tumor growth, cytoskeleton and of intracellular pH regulator markers* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo": 2008. 176p.

The aims of this study in colorectal carcinoma were: 1) Verify the distribution of the most important anatomopathological variables, and identifying their relationship with lymph node or liver metastasis. 2) Considering the associations obtained in the first aim, a group of variables was selected to verify the prediction of lymph node or liver metastasis. 3) Analyze the immunoprofile of both markers associated with cytoarchitecture (keratins 7 and 20) and with tumor growth (proliferation and apoptosis using Ki-67 and cleaved keratin 18, respectively) in samples of non-tumoral mucosa, primary adenocarcinoma, lymph node metastasis and liver metastasis, exploring the eventual relation with anatomopathological variables and tumor stage. 4) Look for possible associations between molecules related to intracellular pH control, as monocarboxylates transporters 1, 2 and 4, and the markers above mentioned and anatomopathological variables. One hundred and thirty nine colorectal carcinomas is the universe of the casuistic, 96 of them without liver metastasis and 39 metastatic to the liver was studied. Thirteen anatomopathological variables were selected and semi-quantified. We manually built tissue microarrays (TMAs) of non tumoral mucosa, primary adenocarcinoma, lymph node metastasis and liver metastasis. The histological sections from the TMAs were submitted to immunohistochemical study using antibodies against keratin 7 (K7), keratin 20 (K20), Ag Ki-67 and cleaved keratin 18. In 126 tumor paraffin blocks, 86 of which also had non tumoral mucosa were submitted to immunohistochemical stain using antibodies against monocarboxylate transportes 1, 2 and 4 (MCT1, MCT2 e MCT 4). Lymph node metastasis was associated with tumor infiltration across muscularis propria ($p < 0,001$), moderate / intense desmoplasia ($p = 0,043$), lymph vessel infiltration ($p < 0,001$), venous infiltration ($p < 0,001$) and perineural infiltration ($p < 0,001$). Liver metastasis was statistically associated with tumor infiltration across muscularis propria and infiltrative tumor borders ($p = 0,05$). Few colorectal mucosa samples, as well as primary tumor and lymph node metastasis showed immunoexpression of K7, although we found statistically significant higher immunoexpression of K7 in liver metastasis as compared with primary carcinomas ($p < 0,001$) and with lymph node metastasis ($p = 0,015$). As expected, K20 was expressed in more than 90% of the samples examined. Higher Ki-67 rates were found in adenocarcinoma compared with normal mucosa ($p < 0,001$). We did not find statistical differences of proliferation rates between neoplastic samples. Apoptotic index were higher in primary adenocarcinomas than in normal mucosa ($p < 0,001$), and was also higher in liver metastasis than in primary adenocarcinoma ($p = 0,022$). We also found higher apoptotic index in tumors that measured more than 5 cm ($p = 0,005$). Membranous and cytoplasmic expression of MCTs 1 and 4 were found more frequently expressed in adenocarcinoma than in non neoplastic mucosa ($p < 0,001$). Membranous MCT1 expression was associated with lymph vessel infiltration ($p = 0,004$), venous

infiltration ($p=0,018$) and with higher apoptotic index. Lymphatic vessel infiltration and venous vessel infiltration were found as independent risk factors for lymph node metastasis. Tumor infiltration across muscularis propria and infiltrative tumor borders were also independent risk factor for liver metastasis by multivariate analysis. Keratin 7 were more frequently expressed in liver metastasis samples than in lymph node metastasis and primary adenocarcinomas, indicating that the acquisition of K7 expression could be a late cytoskeleton alteration associated with higher tumor aggressiveness. Proliferation rates as well as higher frequency of apoptosis, showed increased expression from normal mucosa to primary adenocarcinoma and its respective metastasis. Finally, monocarboxylate transporters were higher expressed in adenocarcinoma samples than in normal mucosa samples indicating a probable role in the intracellular pH in colorectal neoplasia.

Descriptors: 1.Colorectal neoplasia 2.Adenocarcinoma 3.Immunohistochemistry 4.Queratins 5.Cytoskeleton 6.Cell proliferation 7.Apoptosis 8.Monocarboxylic acid transporters

INTRODUÇÃO

1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal (CCR) é a terceira causa mais comum de câncer no mundo em ambos os sexos e a segunda causa de câncer nos Estados Unidos e Europa(1). Os padrões geográficos são bem similares entre homens e mulheres, porém o câncer de reto é cerca de 20 a 50 % mais frequente em homens.

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (2), as estimativas para 2008 é que ocorrerão cerca de 12.490 novos casos em homens e 14.500 em mulheres . Estes valores correspondem a um risco estimado de 13 casos novos a cada 100 mil homens e 15 para cada 100 mil mulheres. Excluindo-se os cânceres de pele não melanoma, o CCR em homens é o terceiro mais frequente na região Sudeste (19/100.000). Nas regiões Sul (21/100.000) e Centro-Oeste (10/100.000) ocupa a quarta posição. Nas regiões Nordeste (4/100.000) e Norte (3/100.000), ocupam a quinta e sexta posição, respectivamente. Nas mulheres, é o segundo mais frequente na região Sudeste (21/100.000), o terceiro mais frequente nas regiões Sul (22/100.000), Centro-Oeste (11/100.000) e Nordeste (6/100.000), enquanto na região Norte (4/100.000) é o quinto mais frequente.

Estima-se que entre 20 e 50% dos pacientes com CCR devam ir a óbito dentro de 5 a partir do diagnóstico, geralmente como resultado de doença metastática avançada(3). Os vasos linfáticos são os primeiros caminhos que o CCR percorre para dar metástase, sendo a metástase linfonodal um indicativo de pior prognóstico(4). No

momento do diagnóstico cerca de 20% dos pacientes já apresentam metástase hepática, que é o sítio predominante de metástase à distância dos CCRs(5)

A avaliação prognóstica dos casos novos de CCR diagnosticados está baseada no estadiamento ou extensão da doença, conforme classificações de estadiamento da União Internacional de Combate ao Câncer (UICC-TNM)(6) e do Comitê da Junta Americana do Câncer (AJCC)(7). , devendo-se, entretanto, reconhecer que o CCR tem componentes que o tornam uma doença heterogênea e multifatorial (8).

Até o presente momento, a cirurgia radical , associada com quimioterapia , quando indicada, é a principal modalidade de tratamento para pacientes com doença localizada. Entretanto, mesmo com adição da quimioterapia, um número considerável de pacientes apresenta recorrência da doença, mais que isso, pacientes com o mesmo estadiamento exibem prognósticos diferentes, indicando que os procedimentos de estadiamento convencionais podem ser incapazes de predizer precisamente o prognóstico do câncer(9).

2. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

2.1 SISTEMA TNM

A AJCC publicou a primeira edição do seu manual de estadiamento em 1977 e começou a utilizar o seu esquema organizado de estadiamentos T (tumor) N (status linfonodal) e M (presença ou ausência de metástases por via sanguínea) para expressar a extensão da doença em vários sítios diferentes. A importância desse sistema foi que

todas as pessoas que lidam com o câncer puderam utilizar uma metodologia útil para planejar tratamento e analisar o prognóstico e resultados(10). O sistema de estadiamento tumor/linfonodo/ metástase (TNM) da UICC/AJCC ainda se mantém como padrão ouro para fatores prognósticos nos CCR(11, 12). A taxa de sobrevida para pacientes com CCR é bastante dependente do estadio TNM, o qual foi inicialmente desenvolvido para prever prognóstico, porém sua função foi expandida para auxiliar na escolha da forma de tratamento e para a seleção de paciente para ensaios clínicos(8). A atual classificação patológica e o estadiamento do CCR revistos na última edição do TNM da UICC/AJCC publicada em 2002 é apresentada no anexo 3.

Vale aqui ressaltar que na última revisão do estadio TNM, o estadio II (pacientes sem metástase linfonodal e hepática) foi dividido em IIA (T3N0M0) e IIB (T4N0M0)(7), devido ao fato que os pacientes com estadio IIB terem pior prognóstico que os pacientes com estadio IIIA (T1-T2N1M0). Mesmo com esse dado, a utilização da quimioterapia adjuvante nos pacientes com estadio III é amplamente aceita e nos pacientes com estadio II ainda não é recomendada(13).

Em adição ao estadiamento TNM, outras variáveis relacionadas ao tumor vêm sendo identificadas como essenciais ou importantes fatores prognósticos(12).

2.2 TAMANHO TUMORAL

O tamanho do maior eixo do tumor geralmente é registrado para fins de documentação do caso e para comparação com os exames de imagem, porém, há diversas evidências demonstrando que o tamanho do tumor não tem significância prognóstica (10, 14).

2.3 INFILTRAÇÃO VENOSA E LINFÁTICA

O processo metastático é complexo e multisequencial. Uma vez estabelecida a neoplasia, as células tumorais são nutridas por difusão simples até o tumor atingir o tamanho de 1 a 2 milímetros; a partir deste ponto, o crescimento do tumor depende da secreção tumoral de moléculas pró-angiogênicas. Com o crescimento, o tumor adquire capacidade para infiltrar o estroma, onde existem vênulas de paredes finas, como os canais linfáticos, que oferecem pouca resistência à penetração das células tumorais que, ao atingir a circulação, podem se desprender, sendo embolizadas. Nesse processo, a maioria dessas células é rapidamente destruída e as sobreviventes devem ser aprisionadas em leitos capilares e se aderir às células endoteliais ou à membrana basal sub-endotelial. Algumas células tumorais conseguem proliferar dentro da veia ou infiltrar o estroma, provavelmente utilizando os mesmos mecanismos que influenciaram a invasão inicial. A proliferação no parênquima do órgão distante completa o processo metastático. Para continuar crescendo, a micrometástase deve promover a angiogênese e conseqüentemente vai infiltrar um novo vaso sanguíneo, provocando adicionais metástases, processo esse conhecido como metástase da metástase (15).

Fidler IJ (16), utilizando células tumorais radiomarcadas, demonstrou que após 24 horas na circulação, menos de 0,1% das células são viáveis e que somente 0,01% das células colocadas na circulação sobreviveram para gerar metástase pulmonar.

Alguns estudos como o publicado por Liotta et al (17) demonstraram que a entrada de células tumorais no sistema vascular é dependente da extensão da

angiogênese e Gimbrone et al (18) mostraram que a efetividade da resposta angiogênica é suspeita de contribuir com a dormência tumoral.

Observações clínicas sugerem que os carcinomas frequentemente metastatizam e crescem através do sistema linfático e que os sarcomas mais frequentemente disseminam por via hematogênica. Entretanto, a presença de numerosas anastomoses venolinfáticas e o conhecimento que as células tumorais podem passar do sistema linfático para o sistema vascular e vice-versa reduzem o impacto desse conceito (15).

Quando a célula tumoral penetra no vaso linfático, é transportada pela linfa, podendo ser aprisionada no primeiro linfonodo da via de drenagem, ou pode passar pelos linfonodos de drenagem regional, gerando metástases em linfonodos mais distantes, evento esse conhecido como metástase saltada ou “skip metastasis”. Mesmo sendo esse evento amplamente conhecido, é também amplamente ignorado no desenvolvimento de abordagens cirúrgicas para o tratamento do câncer. Essa afirmativa foi demonstrada em estudos que mostraram que o esvaziamento axilar em carcinomas de mama não foi associado com melhores taxas de sobrevida (19).

A presença de invasão venosa e linfática pelo tumor já foi demonstrada como um fator adverso independente no prognóstico através de análises multivariadas e univariadas (8, 10, 14, 20). Nosso grupo de estudo, utilizando parte da mesma casuística do presente trabalho, mostrou recentemente que a presença de infiltração linfática tumoral se associou com a maior profundidade de infiltração tumoral, a presença de metástase linfonodal e a presença de metástase hepática (21).

2.4 INFILTRAÇÃO DA SEROSA

A avaliação patológica da infiltração da serosa é importante, podendo ser realizada através das seguintes observações: 1-) Reação inflamatória e/ou hiperplásica com tumor próximo, mas não na superfície serosa; 2-) Tumor presente na superfície serosa com reação inflamatória, hiperplasia mesotelial e/ou erosão/ulceração; 3-) Células tumorais livres na superfície serosa, com ulceração do peritônio visceral (22). Alguns estudos avaliaram a infiltração da serosa como uma variável patológica separada, e demonstraram através de análise multivariada que é um fator prognóstico independente. Pacientes com envolvimento do peritônio visceral por exemplo, têm uma menor sobrevida (23). A infiltração da serosa é frequentemente subdiagnosticada pois demanda uma análise patológica meticulosa e muitas vezes requer uma ampla amostragem tecidual (10).

A serosa recobre o cólon e o mesocólon, ficando o reto livre desse revestimento. Mesmo a infiltração da serosa sendo fator prognóstico adverso, a baixa frequência da observação da infiltração da serosa perde em importância para a infiltração tumoral da gordura mesocólica ou mesorretal, locais ricos em vasos sanguíneos, linfáticos e nervos que sabidamente são as vias para a disseminação tumoral.

2.5 GRAU HISTOLÓGICO TUMORAL

As mais recentes recomendações da Associação Americana dos Diretores de Laboratórios de Patologia Cirúrgica e Anatômica (24) para a confecção dos laudos dos espécimens de CCR ressecados propõem uma mudança na classificação da UICC

(sistema de 4 graus) acerca do grau histológico, com a divisão do grau histológico tumoral em bem, moderadamente e pouco diferenciado. Os adenocarcinomas bem diferenciados são aqueles caracterizados pela presença de túbulos simples e complexos com polarização nuclear mantida, uniformidade do tamanho nuclear, lembrando muito uma lesão benigna precursora. Os tumores moderadamente diferenciados são aqueles onde há uma diferenciação glandular menos regular e com polaridade nuclear perdida ou mal definida. Os adenocarcinomas pouco diferenciados são aqueles compostos por glândulas muito irregulares ou que apresentam perda da diferenciação glandular e que ainda apresentem perda da polaridade nuclear. O Colégio Americano de Patologistas propõe, alternativamente, a divisão dos casos como alto e baixo grau (25). É, então, importante reconhecer que a adoção de diferentes sistemas de graduação dificulta a comparação entre os relatos de diversas origens, virtualmente impedindo meta-análises e conseqüentemente minimizando o possível significado prognóstico do estudo do grau tumoral nos CCRs (8).

2.6 TIPO HISTOLÓGICO

Os tipos histológicos atualmente definidos não discriminam prognóstico de modo independente do estadiamento, na maioria dos CCRs. Fazem exceção alguns tipos raros como o carcinoma medular, carcinoma em anel de sinete e carcinoma de pequenas células; o primeiro tem um prognóstico melhor e os outros dois cursam com evolução muito desfavorável (26, 27). O carcinoma mucinoso vem sendo o tipo histológico mais controverso, de acordo com o prognóstico (23). Poucos estudos, limitados a análises univariadas, têm indicado que o adenocarcinoma mucinoso pode

ser um fator prognóstico adverso(14). Mais especificamente, o adenocarcinoma mucinoso vem sendo associado com pior prognóstico somente se localizado no reto sigmoidéide, ou se ocorrer em pacientes com menos de 45 anos. Em outros estudos uma diminuição na sobrevida vem sendo demonstrada somente quando os carcinomas mucinosos e os em anel de sinete são agrupados e comparados com o adenocarcinoma SOE. Somente um estudo mostrou ser o adenocarcinoma mucinoso um fator prognóstico adverso por análise multivariada, entretanto este estudo só considerou casos com obstrução intestinal, que por si só já é uma característica prognóstica adversa (28). O estudo de Kang et al (29), revendo registro de 16.991 carcinomas mucinosos e 1.522 carcinomas de células em anel de sinete oriundos da Coreia mostrou que os carcinomas em anel de sinete têm um prognóstico pior que os carcinomas mucinosos, os quais, por sua vez, têm comportamento biológico semelhante aos adenocarcinomas SOE.

2.7 BORDAS TUMORAIS

A presença de bordas tumorais infiltrativas é uma observação patológica muito valorizada em termos de fator prognóstico, com estudos apontando para a sua associação com a presença de metástase linfonodal (30) e hepática (10). A borda tumoral infiltrativa pode ser acessada de duas formas:

1- Exame a olho nu da borda tumoral na lâmina:

- Impossibilidade de definir os limites da borda invasiva do tumor e/ou
- Incapacidade de distinguir a resposta tecidual do parênquima neoplásico.

2- Avaliação microscópica da borda tumoral:

- Dissecção tumoral da muscular própria sem causar resposta estromal e/ou
- Dissecção da gordura mesentérica por pequenas glândulas ou pequenos grupamentos ou cordões de células e/ou
- Infiltração perineural.

A borda tumoral expansiva é caracterizada pelo padrão infiltrativo bem delimitado, uniforme, onde facilmente delimita-se o tumor do estroma.

2.8 INVASÃO PERINEURAL

A presença de infiltração perineural é uma das características microscópicas incluídas na definição de borda tumoral infiltrativa, que é um fator prognóstico adverso(31). Muitos trabalhos já mostraram através de análises multivariadas que a invasão perineural por si só é um indicador de mau prognóstico (10, 32).

2.9 FIBROSE PERITUMORAL (DESMOPLASIA)

Estudos *in vivo* e *in vitro* vêm demonstrando que os fibroblastos contribuem para a formação e crescimento tumoral (33) e são utilizados pelos tumores para preparar o microambiente.

Os fibroblastos presentes no estroma tumoral são funcionalmente diferentes daqueles que estão num microambiente não tumoral e também podem realizar funções especializadas para coordenar eventos necessários para a invasão e metástase tumoral.

As células tumorais usam seu microambiente para sintetizar fatores de crescimento, citocinas, moléculas angiogênicas, moléculas de adesão e proteases necessárias para quebrar a matriz extracelular. Caso as células neoplásicas sejam incapazes para ativar essas moléculas, metástases clinicamente evidentes não irão ocorrer e elas permanecerão em uma condição dormente (34). Esse quadro é observado em metástases antes da ativação da angiogênese (35, 36) e foi observado clinicamente em achados de autópsia , com células neoplásicas presentes na vasculatura pulmonar, mas sem infiltração do tumor no sítio metastático (37).

Dingemans et al (38) demonstraram que o implante de células de carcinoma de cólon no tecido de granulação reativo no subcutâneo resultou no fenótipo infiltrativo do câncer de cólon e, quando as mesmas células foram implantadas no subcutâneo íntegro, houve a formação de um tumor bem diferenciado , não infiltrativo e encapsulado. Martin et al (39) propuseram que os miofibroblastos estromais alteram as propriedades migratórias das células de câncer de cólon e desempenham um papel fundamental no processo de invasão e metástase. Lieubeau et al (40) mostraram que os miofibroblastos ativados previnem a penetração dos linfócitos T e macrófagos dentro de nódulos tumorais.

Um pequeno número de estudos já mostrou que a indução da esclerose estromal pelo tumor é um fator prognóstico adverso independente(22, 32), entretanto outros estudos falharam em demonstrar a força prognóstica independente desta

característica ou falharam na demonstração de qualquer significância prognóstica (14). Esses resultados divergentes provavelmente são atribuídos ao pequeno número de casos estudados, à variação inter e intraobservador na semiquantificação e / ou variação na amostragem.

2.10 INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL

A presença de infiltrado linfocitário tumoral ou peritumoral é um indicativo da resposta imunológica do hospedeiro à infiltração tumoral e vem sendo associada através de análises multivariadas como sendo um fator prognóstico favorável (14). A presença de infiltrado linfocitário intratumoral vem sendo relacionado à presença de instabilidade microssatélite do DNA , ocorrendo na Síndrome de Lynch assim como em alguns casos não hereditários (41).

3. QUERATINAS 7 E 20 NOS EPITÉLIOS NORMAIS E TUMORAIS COLORRETAIS

Todas as células dos mamíferos contêm um citoesqueleto complexo composto por 3 unidades estruturais principais que são os microfilamentos contendo actina, microtúbulos contendo tubulina e os filamentos intermediários (FI). Existem 6 tipos diferentes de FI; os tipo I e II são filamentos de queratina (42). Moll et al (43, 44)

categorizaram um total de 20 queratinas das células epiteliais humanas, de acordo com seu ponto isoelétrico.

A queratina 7 (K 7) pertence ao grupo de FI tipo II (tamanho médio e básico) e em um ponto isoelétrico de 6.0. A K 7 é expressa em praticamente todos os epitélios simples, epitélio respiratório pseudoestratificado e transicional.

A queratina 20 (K 20) pertence ao grupo I (tamanho médio e ácido) dos FI e tem um ponto isoelétrico de 5.7. Em tecidos normais, a K 20 é expressa no epitélio foveolar gástrico, nos vilos e criptas intestinais, nas células de Merkel das mucosas e cutâneas, nas papilas gustatórias e nas células umbrela do epitélio transicional. (42).

Os adenocarcinomas colorretais são descritos classicamente como tendo típica imunoposição pra a queratina 20 (K 20) e negatividade para a expressão da citoqueratina 7 (K7) (43, 45). Mesmo com alguns trabalhos mostrando alguma variação na expressão dessas queratinas (42), o perfil de imunoposição K20 negativo e K7 positivo vem sendo amplamente utilizado na rotina diagnóstica para selecionar os sítios primários mais prováveis para tumores que se manifestam inicialmente como metástases hepáticas (46, 47).

A detecção imuno-histoquímica de tipos individuais de queratinas vem sendo aplicada no diagnóstico de carcinomas por várias décadas, especialmente devido ao catálogo organizado por Moll et al (43). Uma grande melhoria ocorreu com a identificação da K20 (44), expressa em relativamente poucos tipos de adenocarcinomas, mais notavelmente em praticamente todos os adenocarcinomas do cólon e em proporções variáveis de adenocarcinomas originados na árvore bileo-pancreática, estômago, bexiga e peculiarmente nos carcinomas de células de Merkel onde exhibe um padrão em ponto para-nuclear (44, 48).

A positividade da K7 vem sendo demonstrada em um grande número de adenocarcinomas, porém a maioria dos estudos mostram que sua imunexpressão é ausente ou somente focal em carcinomas colônicos (49-53). Com base nesses achados, o uso combinado das K 7 e K20 vem sendo utilizado como ferramenta diagnóstica para sugerir o sítio primário de adenocarcinomas se apresentando primeiramente como metástases (46, 47).

Zang et al (53) comparando a expressão da K7 em 42 tumores retais (7 adenomas e 35 carcinomas) e em 11 carcinomas proximais ao reto encontraram imunoreatividade para a K7 em 29 dos 35 cânceres retais (82,8%) e em somente 3 dos 11 carcinomas proximais ao reto (27%).

Na sua maior revisão sobre queratinas, Chu & Weis (42) mostraram expressão da K7 em 27% (109/406 casos) dos carcinomas colorretais

A maioria dos trabalhos mostra que as imunexpressões das K 7 e K 20 se mantêm similar no tumor primário, na metástase linfonodal assim como na metástase hepática (42, 44), reafirmando a estabilidade do padrão de expressão das queratinas ao longo da rota da progressão tumoral.

Yu et al (54) em um recente trabalho reportaram a expressão da K 7 em 35,7% dos CCRs . Essa imunexpressão não se associou ao estadiamento mediante classificação de Dukes, ao grau de diferenciação ou à localização do tumor.

Hernandez et al (55) estudando a imunopositividade das K 7 e K 20 em 286 amostras de CCR encontrou que os tumores mais avançados tendiam a ser K 20 e K 7 positivos quando comparados aos cânceres com estadio precoce, que eram predominantemente K 20 positivos e K 7 negativos e também não encontraram associação entre a positividade da K 7 e a localização anatômica dos carcinomas.

Frente a esses achados conflitantes entre as imunorexpressões da K 20 e principalmente da K 7 nos CCRs resolvemos pesquisar na presente casuística a imunorexpressão das K 7 e K 20 em amostras de mucosa colorretal normal, assim como nos adenocarcinomas primários e suas respectivas metástases linfonodal e hepática, correlacionando com os achados histopatológicos para caracterizar esse perfil em tumores na população brasileira, com especial interesse quanto a possível heterogeneidade decorrente da localização do tumor primário ou a aspectos ligados à progressão tumoral.

4. PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE COMO INDICADORES DO CRESCIMENTO TUMORAL

4.1 ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI-67

4.1.1 ASPECTOS GERAIS

O antígeno Ki-67 é uma proteína não histônica utilizada para identificar células na fase proliferativa. Através de métodos de citometria de fluxo mostrou-se que o Ag Ki-67 é expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G_0 , entretanto sua detecção por método imuno-histoquímico é limitada ao seu aparecimento na fase tardia G_1 , com máxima expressão na prófase e metáfase. Assim, sua imunorexpressão diminui na anáfase e telófase e é praticamente indetectada durante a maior parte da intérfase. Por essas razões, o Ag Ki-67 é

reconhecido como um indicador de mitose. Um aumento da expressão de Ag Ki-67 indica um aumento da atividade mitótica e da proliferação celular. O uso do anticorpo monoclonal MIB-1 permite uma marcação efetiva do antígeno Ki-67 em tecido fixado em formalina e embebido em parafina. Dos vários anticorpos disponíveis o MIB 1 tem a maior sensibilidade e oferece a melhor visualização da imunomarcação. O MIB 1 também é mais útil, comparado a outros anticorpos, quando o índice de marcação é utilizado como critério para a graduação do tumor ou para a avaliação do prognóstico (56)

4.1.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR COMO FATOR PROGNÓSTICO NOS CARCINOMAS COLORRETAIS

Tradicionalmente o aumento na proliferação celular, ao invés das alterações na apoptose vem sendo utilizada para predizer o desenvolvimento tumoral e o prognóstico nos CCRs (57).

Vários trabalhos correlacionam o aumento da proliferação celular nos CCRs com fatores prognósticos adversos. Oshima et al (58) encontraram correlação entre a menor sobrevida e o aumento do índice proliferativo em 89 CCRs, resultado semelhante foi encontrado por Xu et al (59) que estudaram CCRs avançados submetidos à quimioterapia com irinotecan e 5-FU. Ishida et al (60) estudaram a expressão do ki-67 e do antígeno carcinoembrionário (CEA) em tumores colorretais DUKES C e encontraram uma maior expressão do ki-67 nos tumores de pacientes que tiveram uma sobrevida mais curta. Chen YT (61) estudou a significância prognóstica de marcadores tumorais em carcinomas colorretais e encontrou que o índice de proliferação se correlacionou com a recidiva da doença nos pacientes com

estadio II e não nos com estadio III. Rosati et al (62) estudaram 103 CCRs, estadio II e III e encontraram através de análise multivariada que a maior expressão do ki-67 associado à ausência de imunexpressão da p53 nos tumores DUKES C estavam associados a pior prognóstico e a menor média de sobrevida geral. Kaneko et al (63) estudaram 214 CCR que infiltravam a submucosa e encontraram associação entre alta expressão do ki-67 e a presença de metástase linfonodal ($p=0,049$), porém, na análise multivariada, a imunexpressão do Ki-67 não foi considerada um fator independente para a presença de metástase linfonodal.

Alguns trabalhos mostraram associação entre a maior taxa de proliferação dos CCRs e fatores de melhor prognóstico. Garrity et al (64) estudaram o valor prognóstico da proliferação, apoptose, instabilidade microsatélite e hiperexpressão da p53 em 366 CCRs (75% Dukes C e 25% Dukes B) e encontraram através da análise univariada que a imunexpressão do ki-67 em mais de 27% das células tumorais estava associada com a maior sobrevida ($p<0,001$) e com o maior tempo livre de doença ($p=0,003$). Allegra et al (65) estudaram o valor prognóstico da imunexpressão do ki-67 em 291 CCR Dukes B e 415 Dukes C e encontraram maior sobrevida livre de doença e sobrevida global nos pacientes que tinham tumores com altos níveis de ki-67. Os pacientes com imunexpressão do ki-67 em mais de 40% das células tumorais tiveram um risco relativo para a sobrevida livre de doença mais curta de 0,76 ($p=0,05$) e um risco relativo de 0,62 ($p=0,001$) para pior sobrevida. Prall et al (66) pesquisando o perfil de expressão de proteínas regulatórias do ciclo celular e p53, em TMAs, como marcadores prognósticos imuno-histoquímicos nos CCRs, através da análise univariada encontraram uma menor sobrevida nos pacientes cujos tumores tiveram baixa percentagem de células ki-67 positivas. Palmqvist et al (67) estudando a

proliferação celular na borda infiltrativa tumoral de 56 CCRs Dukes B encontraram associação entre a presença de baixa proliferação tumoral com pior prognóstico tanto na análise univariada ($p=0,014$) quanto na análise multivariada ($p=0,042$). Jacob et al verificaram que os tumores retais avançados que tiveram alta regressão histológica pós radio e quimioterapia apresentaram baixa imunexpressão de ki-67 tanto nas amostras pré quanto nas pós tratamento (68).

Também já foram publicados trabalhos onde a taxa de proliferação celular não se correlacionou com fatores prognósticos favoráveis ou desfavoráveis. Hoos et al (69) estudaram 100 tumores retais T2-3 N0 e não encontraram associação entre a taxa de proliferação celular e recorrência tumoral e a sobrevida. Fernebro et al (70) não encontraram qualquer correlação com o prognóstico em relação à imunexpressão do ki-67 em amostras de 269 carcinomas retais estudados.

4.2 APOPTOSE E QUERATINA 18 CLIVADA

4.2.1 ASPECTOS GERAIS DA APOPTOSE

Por muito tempo foi assumido que as células deveriam ser perdidas continuamente em muitos tecidos normais para balancear a divisão celular que era facilmente demonstrada, e existia dúvida se a perda de células acompanhava a atrofia e a involução fisiológica de tecidos e órgãos(71). O termo necrobiose era utilizado para designar a morte celular fisiológica, porém até 1971 as suas características morfológicas ainda não tinham sido definidas. Klion & Schaffner em 1966 (72) estudaram corpúsculos de Councilman através de microscopia

eletrônica e encontraram organelas agrupadas, ocasionais vacúolos citoplasmáticos, mitocôndrias com tamanho variável e com encurtamento das cristas e também observaram a presença de corpúsculos citoplasmáticos compostos principalmente por mitocôndrias encolhidas. Essas mesmas alterações eles também encontraram nos corpúsculos acidofílicos dos hepatomas. As alterações semelhantes observadas por Kerr et al (73) em hepatócitos necróticos devido ao uso de larvicidas Helio-trinos, levaram-nos a descrever um tipo especial de morte celular que foi denominada “shrinkage necrosis” ou necrose por encolhimento (74). Em 1971, Kerr et al (71) rotularam essa forma de morte celular de APOPTOSE, do grego *apo* – de e *ptosis* – cair, ou “ato de cair” ou mais conhecida como morte celular programada. O grupo de Kerr ainda mostrou que esse tipo de morte celular tinha um papel importante na regulação do número de células numa variedade de tecidos em condições fisiológicas e patológicas, estava presente em neoplasias malignas não tratadas e que também participava na regressão tumoral seguida de algumas formas de terapia. Mostraram ainda que a apoptose podia ser ativada por agentes nocivos e que frequentemente aparecia espontaneamente ou em resposta a algum estímulo fisiológico. Nesse mesmo estudo eles descreveram a morfologia da apoptose ao escopo da microscopia eletrônica, dividindo as alterações em dois estágios; o primeiro caracterizado pela formação do corpúsculo apoptótico e o segundo, caracterizado pela fagocitose e degradação dos corpúsculos apoptóticos por outras células.

A apoptose é parte essencial da vida de qualquer organismo multicelular, sendo o modo como a maioria das células morrem, do invertebrado ao mamífero (75).

A apoptose é induzida por uma cascata de eventos moleculares que pode ser iniciada de vários modos e culmina sempre na ativação das caspases. O processo da apoptose pode ser dividido em: 1-) Fase de iniciação; durante a qual as caspases se tornam cataliticamente ativas e, 2-) Fase de execução; fase na qual as caspases atuam para causar a morte celular. A iniciação da apoptose ocorre principalmente por sinais de duas vias que se convergem, a extrínseca, ou iniciada pelo receptor de morte e a intrínseca, ou mitocondrial (76). A **figura 1** esquematiza as vias de apoptose descritas a seguir.

VIA EXTRÍNSECA, OU VIA INICIADA POR RECEPTOR DE MORTE:

Essa via é ativada por membros da superfamília de receptores relacionados à morte, como CD95 e receptor I do Fator de Necrose Tumoral (TNF). A ligação do CD 95 ao seu ligante induz ao agrupamento dos receptores e formação do complexo de sinalização da indução à morte. Esse complexo recruta, via molécula adaptadora FADD (Proteína de domínio da morte associada ao Fas) múltiplas moléculas pró-caspase 8, resultando na ativação da caspase-8 através da indução por proximidade. A ativação da caspase-8 pode ser bloqueada pelo recrutamento do homólogo da caspase degenerada c-FLIP (77).

VIA INTRÍNSECA (VIA MITOCONDRIAL):

Essa via é utilizada extensivamente em resposta a sinais intracelulares e insultos internos como dano do DNA (78). Essas diversas vias de resposta convergem na mitocôndria, frequentemente através da ativação de um membro pró-apoptótico da família Bcl-2. Ao contrário do Bcl-2, que parece passar a maior parte

de sua vida aderido à membrana celular, muitos membros do grupo II e do grupo III, incluindo Bax, Bad, Bim e Bid, podem transitar entre o citosol e as organelas (79-82). As formas citosólicas representam proteínas na forma inativa, porém prontas para a batalha. Sinais pró-apoptóticos redirecionam essas proteínas para a mitocôndria, onde a luta pelo destino da célula vai ocorrer. A ativação de membros pró-apoptóticos pode ocorrer principalmente por proteólise e desfosforilação (83, 84). Membros da família Bcl-2 pró e anti-apoptóticos se encontram na superfície mitocondrial, onde competem para regular a saída do citocromo-c, através de um mecanismo que não está ainda bem definido. Se o campo pró-apoptótico vence, uma gama de moléculas é liberada do compartimento mitocondrial, dentre elas a principal é o citocromo-c, que se associa com Apaf-1 e depois à pró-caspase 9 para formar o apoptossomo.

As vias mitocondrial e do receptor de morte se convergem ao nível da ativação da pró-caspase 3. A atividade e a ativação da caspase-3 é antagonizada por por proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), que por sua vez são antagonizadas pela proteína Smac/DIABLO liberada pela mitocôndria. Caso continue a cascata de ativação da caspase-3, o programa apoptótico se ramifica em múltiplos subprogramas, que culminam com o desmantelamento organizado e remoção celular (76).

A troca de informações entre as vias mitocondrial e de recetor de morte é feita pela Bid, uma proteína pró-apoptótica da família Bcl-2. A clivagem da Bid, mediada pela caspase-8 aumenta muito sua atividade pró-morte e resulta na sua translocação para a mitocôndria, onde promove a saída do citocromo-c. Na maioria das circunstâncias essa interação entre as vias não acontece (79, 85).

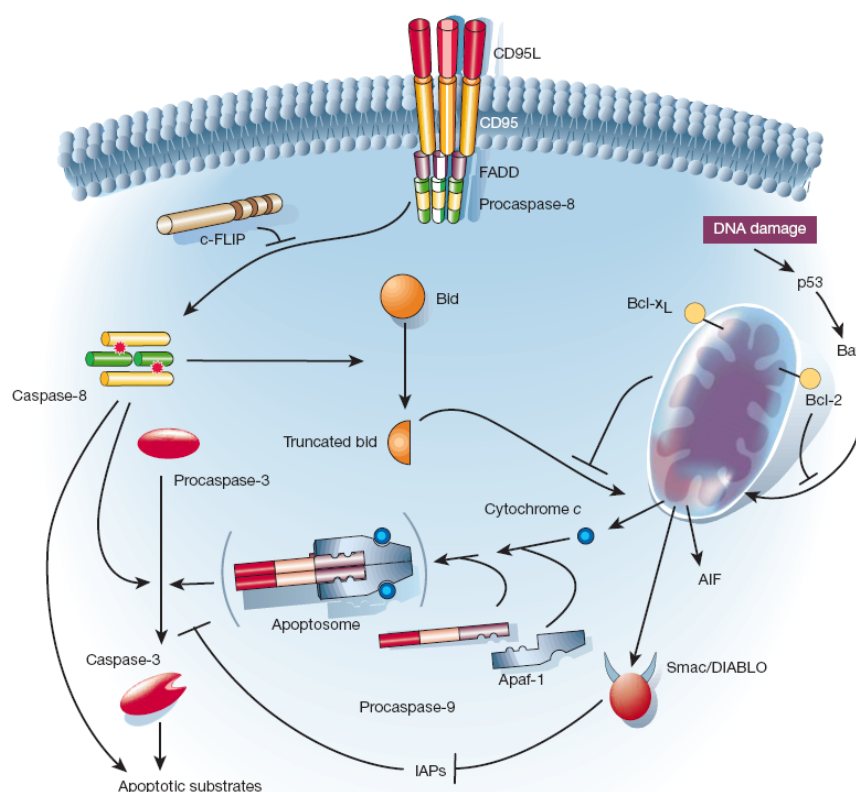


Figura 1: As duas principais vias de apoptose em células de mamíferos (“The Biochemistry of apoptosis”, Hengartner, MO).

4.2.2 DETECÇÃO DE QUERATINA 18 CLIVADA COMO MARCADOR DE APOPTOSE

As duas vias de ativação da apoptose previamente descritas levam a ativação das caspases, uma família de proteases cisteínicas específicas, frequentemente por autoprocessamento ou pelo processamento por outras caspases, gerando uma subunidade grande e outra pequena que juntas formam a enzima ativa (86).

As caspases iniciadoras, como a caspase-8 e a caspase-9 ativam direta ou indiretamente as caspases efetoras como as caspases 3, 6 e 7 (86). Em certos tipos

celulares a mitocôndria pode também amplificar a resposta apoptótica recrutando múltiplas prócaspases-9 para o apoptossomo Apaf-1(87).

A formação do apoptossomo entre a pró-caspase 9 e a Apaf-1 ocorre em íntima relação com a queratina 18 (K18)(88). A pró-caspase 9 é clivada, formando a caspase 9 clivada, que por sua vez cliva e ativa tanto a pró-caspase 3 produzindo a caspase 3 clivada (c-cas-3) e a pró-caspase 7, produzindo a caspase 7 clivada (c-cas-7). Isso é seguido pela clivagem da pró-caspase-6 catalizada pela c-cas-3. Então as c-cas-3, c-cas-6 e c-cas-7, clivam a K18, formando a K18 clivada (c-K18)(89). Outra via, que é caspase independente, é iniciada pela translocação do Fator de inibição da apoptose (AIF) e da endonuclease G para o núcleo, com subsequente quebra da dupla fita de DNA, seguida pela formação da histona (H2AX) fosforilada (γ H2Ax). Ainda uma outra via é implementada através da proteína DEDD (Domínio efetor de morte contendo proteína ligada ao DNA). A DEDD na localização citoplasmática, media o recrutamento de pró-caspase 3 para a K 18 durante a apoptose, levando à clivagem da K18. Uma outra via de clivagem da K18 é através da caspase 6 clivada que é muito eficaz em clivar a K18 (89).

Aproximadamente 5% da queratina 8 (K8) e da K18, os maiores constituintes dos filamentos intermediários das células epiteliais estão em um equilíbrio dinâmico com os componentes filamentosos insolúveis. O remodelamento das fibrilas de queratina, como ocorre durante a mitose requer fosforilação. Isso desestabiliza os filamentos e os dirige ao equilíbrio através da despolimerização (90); a fosforilação também modula a ubiquitinação e a renovação dos filamentos. A hiperfosforilação das queratinas ocorre precocemente na apoptose e parece não ter efeito algum sobre a susceptibilidade das caspases (91), porém pode resultar em oligômeros não capazes

de serem incorporados aos filamentos(92) e assim promover a formação de inclusões citoplasmáticas que contenham tanto a caspase-3 clivada quanto a K18 clivada. A reorganização dos filamentos intermediários durante a apoptose envolve tanto a fosforilação quanto a clivagem das caspases, frequentemente resultando em inclusões citoplasmáticas ricas em queratina (93) .

Em fase precoce na clivagem da caspase durante a apoptose em células que mostram filamentos e agregados citoplasmáticos de queratina, surge o neo-epitopo da K18 , antes da reatividade da anexina V ou da reatividade do DNA nick and labeling. (94). Este epitopo , que não é detectável em células epiteliais íntegras e em células necróticas, é identificado através do anticorpo monoclonal M30.

Antes do desenvolvimento do anticorpo contra o epitopo da K 18 clivada, muitos procedimentos bioquímicos foram desenvolvidos para identificar células apoptóticas in vivo; os métodos mais utilizados foram TUNEL e ISEL. Esses métodos são baseados na suposição que o DNA genômico é fragmentado na célula que está morrendo, produzindo fragmentos de tamanho regular nas células em apoptose, sendo o oposto que ocorre nas células necróticas, onde o DNA é degradado de forma aleatória. Ambas técnicas, TUNEL e ISEL, detectam a quebra da fita de DNA pela adição de nucleotídeos, incluindo os trifosfatos de deoxiuridina marcados com biotina, no final dos fragmentos de DNA. A diferença essencial entre as duas técnicas é que a TUNEL utiliza a enzima terminal deoxiribonucleotidil transferase, enquanto o ISEL usa polimerases I de DNA (57).

Por ser uma técnica mais fácil de ser aplicada e devido aos resultados consistentes quando comparados com as outras técnicas e com a própria microscopia óptica, o estudo imuno-histoquímico para detecção de células em

apoptose utilizando o anticorpo M30 é a técnica de escolha para detectar células epiteliais, que contenham queratina 18 no seu citoesqueleto, que estão efetivamente em apoptose (95)

4.2.3 APOPTOSE NO CÓLON E RETO

4.2.3.1 MUCOSA NORMAL

Na mucosa colônica normal, no estado não estimulado existe uma baixa taxa de apoptose restrita à base das criptas, onde as células totipotentes supostamente residem. Essas células tem uma grande tendência a sofrer apoptose quando há dano no DNA. Alguns constituintes de alimentos, que sabidamente previnem o desenvolvimento do CCR, vêm mostrando aumentar a apoptose que se segue ao dano no DNA, dessa forma refletindo um importante mecanismo de prevenção do câncer. O mecanismo pelo qual o dano no DNA induz à apoptose no intestino ainda não foi completamente elucidada. O que é muito interessante é que as células dos vilos do intestino delgado e as superficiais do cólon são mais resistentes à apoptose (96).

4.2.3.2 APOPTOSE NOS TUMORES PRIMÁRIOS E NAS METÁSTASES

Backus et al (3) encontraram uma taxa apoptótica maior nos tumores primários que nas metástases hepáticas. Ao contrários desses achados, Tatebe et al (97) estudando uma casuística de 15 carcinomas colorretais com metástase linfonodal e/ou hepática encontraram um índice apoptótico mais elevado nas amostras de metástase linfonodal e hepática que nas amostras de tumor primário. A média do IA foi de 3,5%, variando de 1,8 a 7,1% nos carcinomas, 5,6%, variando de 2,4 a 10,6%

nas metástases linfonodais e de 6,2%, variando de 4,8 a 8,2 % nas metástases hepáticas. Não houve diferença estatística significativa entre os IAs das metástases linfonodal e hepática, entretanto houve diferença estatística entre os IAs dos carcinomas primários e as metástases linfonodais ($p < 0,005$) e entre os IA dos tumores primários e das metástases hepáticas ($p < 0,0005$).

4.2.3.3 APOPTOSE EM TECIDOS EPITELIAIS COLORRETAIS DETECTADA PELO ANTICORPO ANTI QUERATINA 18 CLIVADA

Leers et al (94) publicaram um estudo, em 1999, mostrando que o anticorpo M30 é um marcador do neo epitopo do sítio de clivagem da K18, comprovando a sua utilidade na quantificação de células em apoptose através do método imunohistoquímico e, em comparação com a técnica TUNEL, a detecção da imunoreatividade era um evento mais precoce na via apoptótica. No ano seguinte, Carr NJ (98) publicou um estudo, utilizando amostras de carcinomas colorretais, comparando a imunoexpressão do Ag da K18 clivada com os resultados de detecção de apoptose pela técnica “in-situ end-labeling” (ISEL), que era a mais utilizada até aquele momento, técnica esta que não tem especificidade muito elevada em detectar apenas células apoptóticas, já que também marca células necróticas e em autólise. Naquele estudo foi demonstrado que a imunorreação utilizando ISEL e M30 foram semelhantes em amostras de adenomas e carcinomas colorretais. Seus resultados mostraram que por ser uma técnica muito mais simples, a detecção da imunoexpressão do Ag da K18 clivada tinha um grande potencial para ser o método de escolha para demonstrar células em apoptose nos materiais fixados em parafina.

Backus et al (3) comparando a detecção de apoptose em amostras de mucosa colônica normal e tumores colônicos primários, encontraram uma maior expressão, com significância estatística, de proteínas relacionadas à apoptose como Fas, mcl-1, bcl-xl e bax nas amostras de mucosa normal quando comparadas aos tumores primários e que houve positividade para o Anticorpo anti K18 clivada (M30) nas células mais superficiais da mucosa normal e somente em raras células do tumor primário. Nesse mesmo estudo não houve diferença estatística entre as imunopresões das proteínas relacionadas à apoptose entre as amostras de tumor primário e metástase hepática, não tecendo qualquer comentário sobre a imunopresão do M30 entre essas amostras.

Koornstra et al(95) em seu estudo utilizando a imunorreatividade do Ac anti K18 clivada para a quantificação da apoptose em tecidos colorretais (mucosa, adenoma e tumor primário), verificaram que a média do índice apoptótico nas amostras de mucosa normal foi de $0,18 \pm 0,04\%$, nos adenomas foi de $0,42 \pm 0,04\%$ e nos carcinomas foi de $1,97 \pm 0,24\%$. Esses resultados mostraram que houve associação estatística entre o maior índice apoptótico nas amostras de adenoma que nas amostras de mucosa normal ($p < 0,0001$), entre o maior índice apoptótico nas amostras de tumor primário que nas amostras de mucosa normal ($p < 0,0001$) e entre o maior índice apoptótico nos tumores que nas amostras de adenomas ($p < 0,0001$), refletindo que na seqüência adenoma-carcinoma há um aumento significativo do índice apoptótico.

4.2.3.4 APOPTOSE COMO FATOR PROGNÓSTICO NO CÂNCER COLORRETAL

Vários estudos mostram que a cinética tumoral pode ser uma variável prognóstica nos CCR (99-101).

Em modelo animal o melhor preditor de desenvolvimento tumoral foi o grau de apoptose (102). Existe um consenso na literatura que a desregulação na apoptose contribui para a transformação maligna, entretanto o potencial preditivo ou o valor prognóstico do grau de apoptose nos carcinomas colorretais é controverso.

Schwander et al (103) mostraram que o índice apoptótico não foi preditivo no prognóstico de uma série de 160 casos de carcinomas retais. Garrity et al (64) , estudaram uma série de 366 tumores colorretais e não encontraram associação do grau apoptótico com a sobrevida global e nem com a sobrevida livre de doença por análise uni e multivariada.

No estudo realizado por Sinicrope et al (104) onde utilizaram uma casuística de 154 carcinomas colônicos sem metástases linfonodais que foram estatificados pela localização proximal ou distal à flexura esplênica, encontraram associação entre o menor índice apoptótico e menor sobrevida no grupo de pacientes com tumores distais. de Bruin et al (105) utilizando uma série de 1198 tumores retais pertencentes ao trial de excisão total mesorretal holandês, encontraram uma menor taxa de recorrência local em tumores com baixo índice apoptótico que foram submetidos à radioterapia. Kim et al (106) utilizando uma casuística de 57 carcinomas retais encontrou uma associação entre o aumento da apoptose e da proliferação celular e a presença de metástase linfonodal. Rödel et al (107) avaliaram o índice apoptótico em amostras de 44 carcinomas retais pré quimio e radioterapia, e correlacionaram o resultado com a resposta tumoral e o tempo livre de doença após o tratamento

cirúrgico curativo e concluíram que os tumores com resposta boa ou completa à quimiorradioterapia apresentaram índices apoptóticos elevados assim como tiveram maior tempo livre de doença.

4.3 RELAÇÃO ENTRE APOPTOSE E PROLIFERAÇÃO CELULAR NO EPITÉLIO COLORRETAL NORMAL OU NEOPLÁSICO

O balanço entre a produção celular através da proliferação e a perda celular através da apoptose determina a velocidade de crescimento do tumor e é um importante determinante do comportamento tumoral. Sunter et al (108) demonstraram em modelo animal que os tumores benignos e os carcinomas têm um ciclo celular duas vezes mais rápido que o ciclo celular de uma células colônica normal. O aumento na morte celular pode ser uma forma de limitar a velocidade de crescimento tumoral, assim muitos estudos correlacionam a taxa de apoptose com a taxa de proliferação celular dos adenomas e carcinomas colorretais, com resultados conflitantes.

Os níveis de proliferação e de apoptose se correlacionaram em uma série de artigos (97, 98, 109), entretanto outros não encontraram tal relação (110-114). Os estudos que mostram que apoptose e proliferação não se correlacionam usam esse argumento para fortalecer a afirmação que o desbalanço entre os processos ocorre no curso da sequência adenoma-carcinoma (57).

A razão entre o número de células apoptóticas e em proliferação foi proposta como a medida de susceptibilidade à apoptose (110, 112).

5. TRANSPORTADORES DE MONOCARBOXILATOS 1,2 E 4 (MCT1, MCT2 E MCT4)

A glicólise é via metabólica essencial para a obtenção de ATP em todas as células de mamíferos, incluindo as células tumorais. Sendo assim, os transportadores de glicose comumente são hiperexpressos nas neoplasias, promovendo o aumento do influxo de glicose nas células proliferantes (115). Através do ciclo de Krebs em tecidos bem oxigenados, o piruvato entra na mitocôndria, onde através da enzima piruvato desidrogenase, é transformado em acetil-Coa, que é o substrato para produção de ATP. Quando há uma baixa oxigenação celular, o metabolismo celular passa a ser anaeróbico, onde o piruvato é convertido a ácido láctico através da enzima lactato-desidrogenase 5. Por razões ainda desconhecidas, as células tumorais têm uma tendência a preservar a via glicolítica anaeróbia, mesmo em ambiente com alta tensão de oxigênio(116). Mesmo com a preferência da célula tumoral em utilizar a via glicolítica anaeróbia, o baixo pH intracelular é um estímulo para que o processo de apoptose seja iniciado. Para prevenir a acidose intracelular sob estas condições, moléculas reguladoras como bombas de prótons, trocadoras de sódio-próton, transporadores de bicarbonato e também os transportadores de monocarboxilato (MCT) são superexpressos nas células tumorais (117) .

A família dos MCTs é composta por 14 membros, dos quais somente 4 (MCT1-MCT4) vêm sendo demonstrados experimentalmente como sendo catalisadores do transporte de monocarboxilatos metabolicamente importantes como o lactato, piruvato e corpos cetônicos. O MCT1 catalisa tanto a rede de transporte de um monocarboxilato com um próton ou a troca de um carboxilato por outro.

Os MCT2, MCT3 e MCT4 também transportam monocarboxilatos com um próton, porém o mecanismo cinético dessas isoformas ainda não foram estudadas. O MCT1 é encontrado em quase todas as espécies e tecidos (118, 119). A hiperexpressão do MCT1 já foi relatada em neuroblastoma e em linhagens celulares de melanoma, resultando em baixo pH extracelular (120, 121). Em humanos, a expressão do MCT2 é mais restrita que o MCT1, com uma maior expressão ocorrendo principalmente no testículo, mas também é expresso no fígado, rim, músculo esquelético, coração, cérebro, baço e pâncreas. O MCT2 tem uma alta afinidade pelo transporte de piruvato. O MCT3 tem a expressão mais restrita, sendo observado apenas no epitélio pigmentar da retina, plexo coróide, células musculares lisas da aorta e rins. O MCT4 demonstra muita similaridade com MCT1, em respeito à distribuição, regulação e especificidade de substrato/inibidor, porém difere principalmente em relação à localização tecidual específica e afinidade pelo substrato. O MCT4 é predominantemente expresso em células com alta taxa glicolítica como músculo liso e leucócitos, sugerindo que seu papel fisiológico seja o efluxo de lactato(118). Existem evidências do aumento da expressão dos MCTs em outros tumores como sarcoma alveolar de partes moles(122), gliomas de alto grau (123, 124) e CCRs (125).

O estroma tumoral é muito importante no processo de invasão e na progressão da neoplasia. Koukorakis et al (125) comparando as vias metabólicas nas células tumorais e estromais em carcinomas colorretais, demonstraram que enquanto nas células tumorais havia ativação da via glicolítica e um aumento no efluxo de ácidos, o estroma tumoral exibiu um perfil metabólico aeróbico, com alta absorção de glicose e resistência ao influxo de lactato, sugerindo que o estroma e a neovascularização tamponam e reciclam os produtos do metabolismo anaeróbico, para manter a

sobrevivência da célula tumoral. O acúmulo de lactato na neoplasia é associado com a presença de metástase e menor vida livre de doença em carcinomas epidermóides de cabeça pescoço e do colo uterino (126). Já foi demonstrado que o aumento da via glicolítica em neoplasias, como o CCR, traduzida pelo acúmulo de ácido lático está relacionado ao aumento da angiogênese e menor sobrevida (127, 128).

Esses achados nos intrigaram a investigar na presente casuística se a regulação do pH intracelular realizado pelos transportadores de monocarboxilatos (MCTs) exerceria de alguma forma uma função regulatória no processo de ativação de apoptose e da proliferação celular, assim como se estaria associado a variáveis histopatológicas que pudessem prever agressividade do câncer colorretal.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Estudar aspectos do crescimento tumoral (proliferação e apoptose) em amostras de adenocarcinoma colorretal mediante comparação com variáveis anatomopatológicas e marcadores imuno-histoquímicos do citoesqueleto e de regulação do pH intracelular.

1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudar a distribuição das principais variáveis anatomopatológicas nos carcinomas colorretais , pesquisando sua associação com metástase linfonodal ou hepática.
2. Com base nas eventuais associações encontradas, selecionar um conjunto de variáveis que, estudadas no tumor primário, possam predizer a presença de metástase nodal ou hepática.
3. Analisar os perfis de imunoexpressão de alguns marcadores potencialmente relacionados à citoarquitetura e ao crescimento tumoral (proliferação e apoptose) nas amostras de mucosa normal, adenocarcinoma primário, metástase linfonodal e metástase hepática, explorando suas eventuais relações com as variáveis histopatológicas e o estadio da lesão

- 3.a Queratina 7, filamento intermediário considerado pouco usual nos adenocarcinomas colorretais.
 - 3.b Queratina 20, filamento intermediário característico dos adenocarcinomas colorretais.
 - 3.c Antígeno Ki-67, marcador de células em ciclo celular.
 - 3.d Queratina 18 clivada , marcador de células em apoptose.
4. Pesquisar possíveis associações entre a expressão dos transportadores de monocarboxilato 1, 2 e 4, reguladores do ph intracelular e os marcadores acima relacionados.

MÉTODOS

1. SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

O universo do presente trabalho é o conjunto de 139 casos de carcinoma colorretal (CCR) retirados dos arquivos da Divisão de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, operados entre 2002 e 2005. Dos 139 casos, 43 tinham também tinham metástase hepática com amostra tecidual disponível para o estudo e 96 casos não apresentavam metástase hepática ao diagnóstico.

2. FIXAÇÃO

Todas as peças cirúrgicas foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10%.

3. VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS UTILIZADAS NO ESTUDO

Foram realizadas duas reuniões entre patologistas da Faculdade de Medicina da USP e da Escola Paulista de Medicina envolvidos no projeto temático APOPTOSE em Câncer aprovado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de

São Paulo (FAPESP) . Nessas reuniões foi confeccionada uma planilha para a avaliação anatomopatológica dos carcinomas colorretais (**anexo 1**) e gástricos. Depois de preencher as planilhas conforme o anexo 1, as variáveis selecionadas pelo orientador e pelo orientando para serem utilizadas no estudo foram colocadas em uma outra planilha com as variáveis categorizadas e agrupadas para facilitar a análise estatística (**anexo 2**). As variáveis selecionadas para o estudo estão descritas a seguir.

3.1 TAMANHO DO TUMOR

Os tumores foram separados em dois grupos, de acordo com a mediana de seu maior eixo , ou seja em $\leq 5,0$ cm e $>$ que 5 cm .

3.2 LOCALIZAÇÃO

Os tumores acometendo ceco, cólon ascendente, ângulo hepático e cólon transversal foram classificados como localizados no cólon direito e os tumores envolvendo o ângulo esplênico, cólon descendente, sigmóide e reto foram agrupados como localizados no cólon esquerdo.

3.3 TIPOS MACROSCÓPICOS

Foram classificados como exofíticos e úlcero-infiltrativos, conforme a apresentação predominante .

3.4 INFILTRAÇÃO DA SEROSA

A infiltração da serosa foi reportada como presente nos casos que apresentavam pelo menos uma das seguintes características:

- a) Tumores cujos relatos macroscópicos referiam infiltração da serosa.
- b) Nos tumores com evidências histológicas de infiltração ou perfuração da serosa.
- c) Nos tumores que infiltravam órgãos adjacentes.
- d) Nos casos onde observou-se reação inflamatória e/ou hiperplásica com tumor próximo, mas não na superfície serosa;

Nos casos onde nenhuma das características descritas acima foi encontrada, a infiltração da serosa foi reportada como ausente.

3.5 TIPOS HISTOLÓGICOS

De todas as variáveis histológicas pesquisadas como relatado no anexo 1, somente os adenocarcinomas mucinosos foram classificados como um grupo separado, todos os restantes foram classificados como adenocarcinoma SOE, devido ao pequeno número de casos com subtipos específicos. Os outros tipos histológicos encontrados na amostra estudada foram: adenocarcinoma túbulo-papilar (12 casos), adenocarcinoma com células e anel de sinete (1 caso), carcinoma indiferenciado (1 caso) e carcinoma adenoescamoso (1 caso).

3.6 GRAU HISTOLÓGICO

Os tumores foram divididos em baixo grau (bem e moderadamente diferenciados) e alto grau (pouco diferenciados e indiferenciados) conforme o padronizado pelo Colégio Americano de Patologistas .

3.7 NÍVEL DA INFILTRAÇÃO TUMORAL NA PAREDE DO ÓRGÃO

Os tumores que infiltravam até a muscular própria foram agrupados como T1+T2 e os tumores que infiltravam além da muscular própria foram agrupados como T3+T4.

3.8 INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL

O infiltrado linfocitário tumoral foi classificado subjetivamente em ausente, leve/moderado e intenso.

3.9 DESMOPLASIA.

A fibrose peritumoral (desmoplasia) foi graduada subjetivamente como ausente/leve e moderada/intensa.

3.10 BORDA TUMORAL

A borda tumoral foi classificada como infiltrativa ou expansiva de acordo com os critérios descritos previamente na “INTRODUÇÃO”.

3.11 INVASÃO DE VASOS LINFÁTICOS

Quando observamos a presença indubitável de blocos de células tumorais no interior de vasos linfáticos, consideramos o caso como infiltração linfática positiva.

3.12 INVASÃO DE VASOS SANGÜÍNEOS

Os tumores que exibiram agrupamentos de células neoplásicas no interior de vasos sangüíneos com paredes delgadas com hemácias de permeio foram categorizados como infiltração vascular positiva.

3.13 INVASÃO PERINEURAL

Os tumores que infiltraram os filetes neurais ou que indubitavelmente estavam infiltrando o perineuro, circundando total ou parcialmente o filete neural foram considerados como infiltração perineural positiva.

3.14 METÁSTASE LINFONODAL

Os casos foram classificados como metástase linfonodal presente ou ausente.

3.15 METÁSTASE HEPÁTICA

Os casos foram classificados como metástase hepática presente ou ausente.

4 SELEÇÃO DAS ÁREAS DE INTERESSE E CONFECÇÃO DOS BLOCOS DE MICROARRANJO DE TECIDOS (TISSUE MICROARRAY, OU TMA)

Todas as lâminas foram revistas pelo pós-graduando (C.S.N) que, após a avaliação de todas as variáveis anatomopatológicas e preenchimento da planilha com as alterações observadas, selecionou e demarcou as áreas de interesse com uma caneta de retroprojeção de ponta grossa, afim de se extrair dos blocos a área mais representativa .

Mediante sobreposição das lâminas coradas pela Hematoxilina e Eosina, os respectivos blocos foram também marcados. Foram selecionadas áreas de mucosa normal, adenocarcinoma primário, metástase linfonodal e metástase hepática.

Todos os procedimentos de confecção dos TMAs foram realizados no LIM-14- Patologia Hepática – Departamento de Patologia da FMUSP, com participação direta

do pós-graduando C.S.N, da biomédica Mônica Conte Bella e da farmacêutica Alda Wakamatsu. Um ou mais cilindros de cada área selecionada do bloco de parafina foram obtidos e transferidos para blocos de parafina, que receberam coleções de amostras compondo o Microarranjo de Tecidos (blocos de TMA). No presente trabalho, os TMAs foram confeccionados manualmente, conforme a técnica desenvolvida pela Dra Andréa Rodrigues Cordovil Pires (129), método esse sumarizado como se segue:

4.1 AGULHAS

Com uma microretífica cortamos o bixel de uma agulha hipodérmica de calibre 16 (diâmetro interno de 1,1 milímetro) para puncionar os blocos doadores e fizemos uma janela lateral de 8 a 10 mm distando 1 mm da extremidade distal para que o cilindro tecidual fosse retirado. Nas áreas marcadas nos blocos de parafina foram realizadas punções com penetração perpendicular da agulha. No presente estudo, os blocos doadores foram puncionados manualmente, sem a ajuda de uma prensa de botões.

4.2 GRADE DE PAPEL

Em um papel colorido, círculos de 1 mm de diâmetro foram desenhados e alinhados com espaço entre eles de 0,5 a 1 mm., utilizando o software Corel Draw[®]. A grade foi impressa em papel comum.

4.3 MOLDE DO BLOCO DE PARAFINA

As grades de papel foram aderidas a moldes metálicos de blocos de parafina utilizando-se fita adesiva dupla-face Scotch 3M[®] de 12 mm de largura. A fita deve ser mais larga que a grade de papel, pois a borda livre de fita deve prender o molde de papel no molde metálico do bloco de parafina. Nós utilizamos moldes metálicos de parafina de 25,0 x 15,0 mm.

4.4 BLOCOS DE TMA

Quando todos os cilindros de tecido foram colados no molde, paraplast Oxford[®] derretido a 65°C foi derramado com a suavidade possível para prevenir que os cilindros se destacassem da fita adesiva. Desse ponto em diante, os blocos foram manuseados de acordo com os procedimentos histopatológicos rotineiros. Blocos de TMA de mucosas normais, adenocarcinomas primários e metástases linfonodais foram confeccionados dos casos com e sem metástase hepática e, um TMA foi feito com amostras de metástase hepática.

Foram então confeccionados 5 TMAs.

TMA 1- Carcinomas primários com metástase hepática (66 cilindros).

TMA 2- Carcinomas primários sem metástase hepática (117 cilindros).

TMA 3- Metástases linfonodais de carcinomas com metástase hepática (74 cilindros).

TMA 4- Metástases linfonodais de carcinomas sem metástase hepática (66 cilindros).

TMA 5- Metástases hepáticas (105 cilindros).

A figura 2 ilustra o modo de preparo das agulhas, os materiais utilizados para o preparo das agulhas e também mostra exemplos dos moldes de papel e a figura 3 ilustra passo a passo a confecção do bloco de TMA.

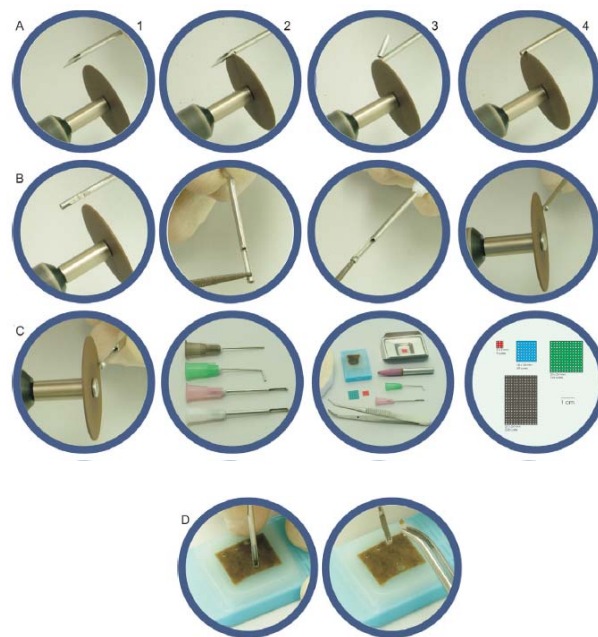


Figura 2: Passo a passo do preparo da agulha. A1-A3: corte da ponta do bixel. A4-B2: abertura da janela lateral, B3-C1: criação do novo bixel, C2 e C3: materiais utilizados para a confecção do TMA, C4: grades de papel, D1 e D2: punção manual do bloco de tecido doador (Pires ARC e cols, Diagn Pathol 1:14)



Figura 3. Confeção do bloco de TMA passo a passo. E1 e E2: posicionamento da grade de papel com a fita dupla-face. E3-F3 punção do bloco doador e retirada do cilindro de tecido puncionado. F4 e G1 colocação dos cilindros retirados do bloco doador na grade de papel. G1-G2: colocação da parafina líquida no molde de 9 cilindros. G3 bloco de TMA com 9 cilindros. Grade de 13x25 completa com 325 cilindros teciduais. H2: bloco de TMA com 325 cilindros teciduais. H3: lâmina corada pela Hematoxilina e eosina com 325 cilindros teciduais. (Pires ARC e cols, Diagn Pathol 1:14)

4.5 COLEÇÃO DE LÂMINAS À PARTIR DO TMA

A partir de cada bloco de TMA, cinquenta lâminas foram confeccionadas, numeradas de 1 a 50. As lâminas 1, 10, 20, 30 e 40 foram coradas pela Hematoxilina e Eosina, permitindo reanálise para garantia de permanência da área representada naquela série. As Lâminas com menor perda de fragmentos foram selecionadas para a realização do estudo imuno-histoquímico. Todas as lâminas remanescentes foram rapidamente submersas uma única vez em paraplast derretido e armazenadas no freezer a menos 20 °C para estudos futuros .

5. COLEÇÃO DE AMOSTRAS UTILIZADAS PARA O ESTUDO DOS TRANSPORTADORES DE MONOCARBOXILATO 1, 2 E 4

Durante a separação dos blocos selecionamos blocos de transição entre tumor e mucosa normal quando possível e enviamos para a Universidade do Minho, em Portugal, onde foi feito o estudo imuno-histoquímico dos transportadores de monocarboxilato 1, 2 e 4. Foram enviados blocos de 126 tumores, 86 dos quais apresentavam também mucosa normal, que também foi avaliada quanto à expressão dos marcadores.

6. REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

6.1 ANTICORPOS PRIMÁRIOS

Anti-queratina 18 clivada, marcador de células epiteliais em apoptose– clone M30; título: 1/100 Roche Diagnostics GmbH.

Anti-antígeno Ki-67 - clone MIB-1, título 1/500, Dako, Dinamarca..

Anti-queratina 7 (K 7) - clone OV-TL 12/30; título 1:6000; Dako, Dinamarca.

Anti-queratina 20 (K 20) - clone KS 20.8; título 1:200; Dako, Dinamarca.

Anti-MCT 1- gentilmente cedido pelo Dr Luc Pelerin(130), título 1/200, Universidade de Lausanne, Suíça..

Anti-MCT 2- gentilmente cedido pelo Dr Luc Pelerin(130), título 1/200
Universidade de Lausanne, Suíça..

Anti-MCT 4- gentilmente cedido pelo Dr Luc Pelerin(130), título 1/200.
Universidade de Lausanne, Suíça..

6.1.1 TÉCNICA UTILIZADA PARA A DETECÇÃO DOS ANTÍGENOS QUERATINA 18 CLIVADA, KI-67, QUERATINA 7 E QUERATINA 20

Todas as reações foram realizadas pelas farmacêuticas Alda Wakamatsu ,
Suely Nonogaki e Cristina Kanamura no laboratório de imuno- histoquímica da
Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz .

Reação imuno-histoquímica com amplificação pelo Polímero Curto de
Dextran + Peroxidase “SuperPicture”

A desparafinação dos cortes foi feita mediante incubação com xilol a 60^o C
por 15 minutos seguido de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 15
minutos.

Hidratação dos cortes em concentrações de Etanol a 100% com 3 banhos de
30 segundos cada, Etanol a 95%, 80% e 70% por 30 segundos, lavagem em água
corrente e água destilada.

Recuperação antigênica em panela a vapor, após a fervura da água da panela,
colocar a cuba com as lâminas em solução de ácido cítrico 10 mM pH 6,0 (Merck,

E.U.A.), por 40 minutos, seguida por resfriamento à temperatura ambiente por 20 minutos. Lavagens em água corrente e água destilada.

Bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) a 6% diluída v/v em metanol, em três banhos de 10 minutos cada.

Lavagens em água corrente e água destilada.

Lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos.

Lavagens em água corrente e água destilada.

Lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos.)

A reação aqui efetuada segue os princípios propostos por HSU et al (131), adaptado às nossas condições laboratoriais:

Incubação das lâminas com anticorpo primário específico diluído em tampão PBS contendo soro-albumina bovina (BSA) (SIGMA, E.U.A.) 1,0% e NaN₃ (Inlab, São Paulo) 0,1%, inicialmente por 30 min. a 37° C e em seguida durante 16 a 18 horas a 4° C.

Lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 3 a 5 minutos cada.

Incubação com o polímero curto de dextran + peroxidase “SuperPicture” (Zymed Laboratories) por 30 minutos a 37° C.

Lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 3 a 5 minutos cada.

Revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma, E.U.A.) a 0,06%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfóxido (Labsynth, Brasil) a 1% em PBS, em banho de 5 minutos, em câmara escura e a 37 °C.

O produto final da reação apresenta coloração acastanhada, depositado na região da célula em que ocorreu a ligação do Ag com o anticorpo primário.

Lavagens em água corrente e água destilada.

Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavagem em água corrente e água destilada. Imersão rápida em água amoniacal (sol. de hidróxido de amônia 0,5%) seguido de lavagens em água corrente e água destilada.

Desidratação dos cortes em banhos de etanol a 80%, a 95% e absoluto (3 trocas de 1 minuto cada), diafanização em banhos de xilol e montagem em Entellan (Merck, Alemanha) com lamínula.

6.1.1.1 CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS

Os controles utilizados na reação imuno-histoquímica compreenderam, um controle positivo e um controle negativo com incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário, sendo efetuados todos os demais procedimentos imuno-histoquímicos. Como as reações foram realizadas em micro-arranjos de tecidos, os demais cilindros representados no TMA serviram também de controle de qualidade da reação

6.1.2 TÉCNICA UTILIZADA PARA OS ANTICORPOS MCT1, MCT2 E MCT 4

Esta reação foi efetuada pela bióloga e pós graduanda da Universidade do Minho, Céline Pinheiro no laboratório do Instituto de ciências da vida e da saúde (ICVS), Escola de ciências da saúde, Universidade do Minho, campus de Gualtar, Braga, Portugal.

A desparafinização e a hidratação dos cortes foi realizado como anteriormente descrito.

A recuperação antigênica foi realizada imergindo as lâminas montadas em solução tampão de citrato a 0,01M (pH 6,0), levadas ao microondas (600W) por 15 minutos e depois lavadas com PBS. As secções foram então incubadas com solução bloqueadora de proteína por 20 minutos e então incubadas com o anticorpo primário overnight à temperatura ambiente. As secções foram então sequencialmente lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário biotilado Vectastain® Elite ABC a 37°C por 45 minutos à temperatura ambiente. Revelação foi feita com 3,3'-diamino-benzidina (DAB+ Substrate System, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) por 10 minutos. Controles negativos foram realizados utilizando soros controles para os anticorpos primários utilizados (N1699 and X0907, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA). Fragmentos de cólon normal, rim e músculo esquelético foram utilizados como controles positivos para os anticorpos MCT1, MCT2 e MCT4, respectivamente. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavagem em água corrente e água destilada. Imersão rápida em água amoniacal (sol. de hidróxido de amônia 0,5%) seguido de lavagens em água corrente e água destilada.

Desidratação dos cortes em banhos de etanol a 80%, a 95% e absoluto (3 trocas de 1 minuto cada), diafanização em banhos de xilol e montagem em Entellan (Merck®) com lamínula.

7 AVALIAÇÃO DAS IMUNO-EXPRESSÕES

7.1 QUERATINA 7 (K7) E QUERATINA 20 (K20)

Foram consideradas imunorreativas para a K7 E K20 todas as células cujo citoplasma apresentaram coloração castanha evidente. A amostra tecidual foi considerada positiva para a imunexpressão das K7 e K20 quando mais de 5% das células exibiram imunorreatividade citoplasmática.

7.2 ANTÍGENO KI-67

A imunorreatividade para o Ag Ki-67 se dá no núcleo das células recrutadas para o ciclo celular, tendo sido inicialmente semi-quantificada em zero a quatro cruces:

- 0: 0 a 5% das células imunorreativas.
- +: 6 a 25% das células imunorreativas.
- ++: 26 a 50% das células imunorreativas.
- +++ : 51 a 75 % das células imunorreativas.
- ++++: 76-100% das células imunorreativas.

Para fins estatísticos, de acordo com as medianas dos adenocarcinomas primários, as amostras foram assim semi-quantificadas:

- 0: $\leq 50\%$ das células imunomarcadas. (“baixo índice de células em proliferação”)
- 1: $> 50\%$ das células imunomarcadas. (“alto índice de células em proliferação”)

7.3 QUERATINA 18 CLIVADA

A queratina 18 clivada é detectada no citoplasma das células que se encontram nas várias fases da apoptose, sendo assim, somente as células que exibiam coloração castanha evidente no citoplasma foram consideradas positivas. Visto ser tal reatividade encontrada em contingente de células relativamente baixo, que impediu a análise apenas semi-quantitativa como a efetuada com os demais marcadores, o pós-graduando C.S.N. capturou as imagens de todos os TMAs (mucosa normal, adenocarcinoma primário, metástase linfonodal e metástase hepática) e contou pelo menos mil células, na tela do computador com ajuda do software Image Pro Plus. A porcentagem do resultado da divisão do número de células positivas para queratina 18 clivada dividida pelo total de células contadas gerou o ÍNDICE DE CÉLULAS EM APOPTOSE (IA). Os casos com menos de 1000 células contadas foram excluídos do estudo.

7.4 MCT 1, MCT 2 E MCT 4

A imuno-expressão dos MCTs foi assim semi-quantificada :

0: 0% de células imuno-reativas.

1: <5% de células imuno-reativas.

2: 5–50% de células imuno-reativas.

3: >50% de células imuno-reativas.

Também a intensidade foi graduada semi-quantitativamente :

0: negativa;

- 1: fraca;
- 2: intermediária;
- 3: intensa .

O escore final da imuno-reação foi definido como a soma dos graus atribuídos à extensão e à intensidade), e agrupado como negativo (0), fraco (2), moderado (3) e forte (4-6). Para fins estatísticos, somente os casos com escore final de imuno-reação moderada e forte foram considerados como positivos. Finalmente, a positividade da membrana citoplasmática foi também avaliada como presente ou ausente.

8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na primeira etapa, foi realizada a análise descritiva dos dados por meio de frequências relativas e absolutas.

Para a análise das variáveis qualitativas foi utilizado o teste de associação pelo qui-quadrado. No caso de alguma casela apresentar valor menor ou igual a 5, utilizou-se o teste exato de Fisher.

Nas variáveis quantitativas foi verificada a aderência a curva normal pelo teste de Komolgorov-Smirnov. Como as variáveis não apresentaram distribuição normal, realizou-se o teste não-paramétrico Wilcoxon para verificar a diferença entre os índices de células em apoptose nos tecidos, num mesmo indivíduo. Para verificar a diferença de médias no índice de células em apoptose entre as variáveis anatomopatológicas, utilizou-se os testes não-paramétrico Mann-Whitney, quando as

variáveis independentes apresentavam duas categorias e Kruskal-Wallis, quando as variáveis independentes apresentavam mais de duas categorias.

Por último, foram utilizados modelos de regressão logística univariados e multivariados para verificar a associação das variáveis independentes com a presença de metástase linfonodal e metástase hepática. As variáveis anatomopatológicas e os marcadores utilizados na análise univariada que exibiram o valor de “p” menor que 0,20 para fator de risco para metástase linfonodal e hepática foram selecionados para entrar na análise de regressão logística multivariada. Como existiam 43 casos com metástase hepática somente 4 variáveis foram selecionadas para entrar na análise multivariada.

Para todas as análises estatísticas, assumiu-se um valor para a significância de $p < 0,05$. Neste estudo foi utilizado o software *SPSS* versão 15.0 para *Windows* para a digitação e análise dos dados.

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS

A distribuição dos achados anatomopatológicos de todos os casos é exposto no **anexo 4**.

Dos 139 casos de carcinoma colorretal (CCR) incluídos no presente estudo, 56 eram localizados, não apresentando metástases linfonodais nem hepáticas. Quarenta casos apresentavam metástases linfonodais, mas não hepáticas

Metástases hepáticas foram detectadas em 43 casos, 30 dos quais tinham também metástases para linfonodos .

Metástases linfonodais foram, portanto, identificadas em 70 casos (50,4%).

As idades dos pacientes variaram de 24 a 95 anos, sendo a média de 61,5 anos e 64 anos a mediana. Setenta e três pacientes (52,5%) tinham até 64 anos e 66 pacientes (47,5%) tinham mais de 64 anos.

Setenta e sete pacientes (55,4%) eram do sexo masculino e 62 pacientes (44,6%) eram do sexo feminino.

Em relação ao tamanho, 64 tumores mediram menos de 5 cm no maior eixo (46%) e 75 eram maiores ou iguais a 5 cm (54%).

Neste estudo retrospectivo, a topografia do carcinoma primário ficou bem definida em 134 casos. Destes, 22 (16,4%) eram do cólon direito e 113 (83,6) eram do cólon esquerdo. Dos 139 carcinomas primários, 29 (20,8%) tinham padrão macroscópico exofítico e 110 (79,2%) tinham padrão úlcero-infiltrativo. Em 131 dos

139 carcinomas primários (94,2%) não foi observada infiltração da serosa e em 8 carcinomas primários (5,8%) observou-se infiltração da serosa.

A revisão histopatológica efetuada pelo pós-graduando demonstrou que 125 carcinomas primários (89,9%) correspondiam ao tipo histológico adenocarcinoma SOE (**figuras 4 e 5**) e 14 (10,1%) eram adenocarcinomas mucinosos (**figura 6**). Em relação ao grau histológico, 120 adenocarcinomas primários (86,3%) tinham baixo grau histológico e 19 (13,7%) alto grau histológico. Vinte e seis adenocarcinomas primários (18,7%) infiltravam até a muscular própria (T1+T2) e 113 (81,3%) infiltravam além da muscular própria (T3+T4). Em 5 adenocarcinomas primários (3,6%) não foi observado infiltrado linfocitário tumoral, em 121 adenocarcinomas primários (94,3%) foi observado infiltrado linfocitário tumoral leve ou moderado e em 3 adenocarcinomas primários (2,1%) foi observado intenso infiltrado linfocitário tumoral. Os 3 casos com intenso infiltrado linfocitário eram adenocarcinomas SOE, não tendo sido observado na presente casuística nenhum carcinoma medular, o qual tem como característica um intenso infiltrado linfocitário associado. Borda tumoral expansiva (**figura 7**) foi observada em 73 CCRs (52,5%) e a presença de borda tumoral infiltrativa (**figura 8**) foi observada em 66 adenocarcinomas primários (47,5%). Em relação à avaliação da desmoplasia do estroma, 34 CCRs (24,5%) não tiveram desmoplasia ou tinham desmoplasia leve e 105 adenocarcinomas primários (75,5%) apresentaram desmoplasia moderada ou acentuada. Setenta e dois adenocarcinomas primários (51,8%) não exibiram infiltração linfática e 67 (48,2%) exibiram infiltração linfática (**figura 9**). O presente estudo histológico identificou infiltração vascular sanguínea (**figura 10**) em 47 CCRs (33,8%), a qual não foi observada nos demais 92 adenocarcinomas primários (66,2%). Trinta e nove CCRs (28,1%) exibiram infiltração tumoral perineural (**figura 11**) e 100 CCRs não exibiram infiltração perineural (71,9%).

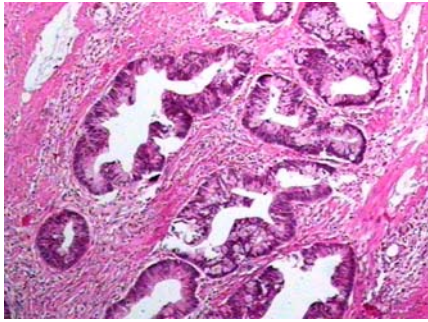


Figura 4: Adenocarcinoma bem diferenciado (HE 100X)

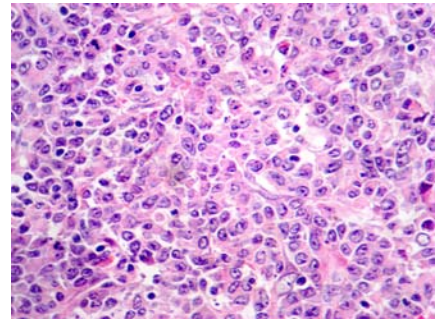


Figura 5: Adenocarcinoma pouco diferenciado (HE 400X)

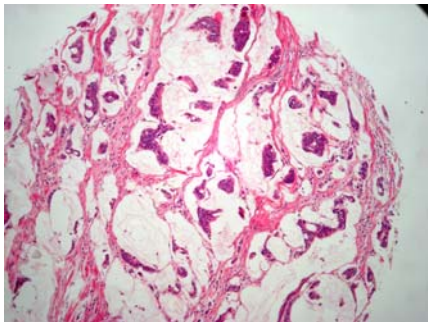


Figura 6: Adenocarcinoma mucinoso (HE 100X)

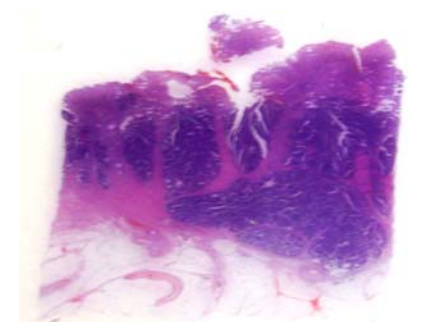


Figura 7: Borda tumoral expansiva (HE)

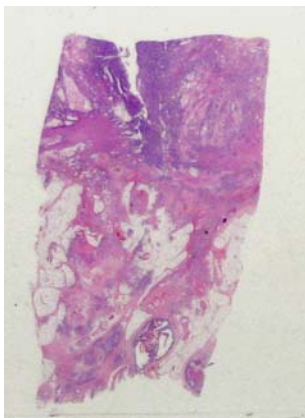


Figura 8: Borda tumoral infiltrativa (HE)

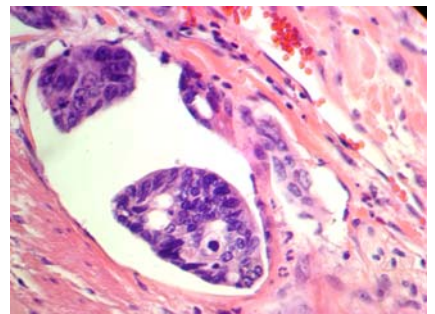


Figura 9: Infiltração linfática tumoral (HE 400X)

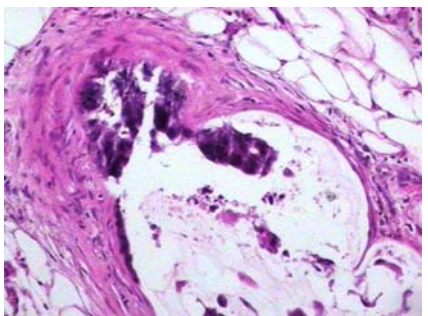


Figura 10: Infiltração vascular tumoral (HE 200X)

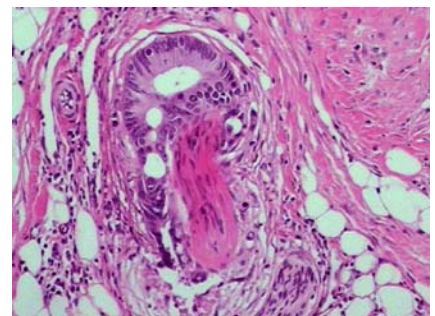


Figura 11: Infiltração tumoral perineural (HE 400X)

1.1 DISTRIBUIÇÃO DAS VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS DOS ADENOCARCINOMAS PRIMÁRIOS, DE ACORDO COM A PRESENÇA DE METÁSTASE LINFONODAL

A tabela 1 mostra o resultado da distribuição das variáveis anatomopatológicas dos adenocarcinomas primários de acordo com a presença ou ausência de metástase linfonodal.

A presença de metástase linfonodal apresentou associação estatisticamente significativa com as seguintes variáveis histológicas estudadas: Presença de infiltração tumoral além da camada muscular própria (T3 ou T4) ($p < 0,001$), presença de desmoplasia tumoral moderada / intensa ($p = 0,043$), presença de infiltração de vasos linfáticos ($p < 0,001$) e presença de infiltração venosa ($p < 0,001$) e presença de infiltração tumoral perineural ($p < 0,001$). Ressalte-se, entretanto, que 13 casos apresentaram metástases hepáticas na ausência de acometimento linfonodal.

Houve uma marcada tendência estatística à associação de metástase linfonodal com a presença de bordas tumorais infiltrativas ($p = 0,050$) e também com a localização da neoplasia no cólon direito ($p = 0,052$).

Mesmo com a grande maioria dos adenocarcinomas primários com infiltração da serosa apresentando metástase linfonodal (75%), não houve associação estatística com a presença de metástase linfonodal ($p = 0,275$) provavelmente porque foram poucos ($n = 8$) os casos com comprovação do acometimento da serosa .

As apresentações desfavoráveis das demais variáveis anatomopatológicas (maior tamanho, tipo macroscópico úlcero-infiltrativo e maior grau histológico) foram mais freqüentes nos casos com metástases linfonodais, mas estes achados não atingiram a significância estatística na presente casuística.

Tabela 1- Distribuição das variáveis anatomopatológicas dos adenocarcinomas primários, de acordo com a presença ou ausência de metástase linfonodal

Variáveis	Categoria	Metástase linfonodal		p
		presença n (%)	ausência n (%)	
Tamanho	≥ 5 cm	41 (54,7)	34 (45,3)	0,272
	<5 cm	29 (45,3)	35 (54,7)	
Localizaçã	cólon direito	15 (68,2)	7 (31,8)	0,052
	cólon esquerdo	51 (45,5)	61 (54,5)	
Tipo macroscópico	exofítico	11 (37,9)	18 (62,1)	0,132
	úlceroinfiltrativo	59 (53,6)	51 (46,4)	
Infiltração da serosa	presente	6 (75,0)	2 (25,0)	0,275
	ausente	64 (48,9)	67 (51,1)	
Tipo histológico	adenocarcinomaSOE	63 (50,4)	62 (49,6)	0,977
	carcinoma mucinoso	7 (50,0)	7 (50,0)	
Grau histológico	Alto	11 (57,9)	8 (42,1)	0,480
	Baixo	59 (49,2)	61 (50,8)	
Profundidade do tumor	T3 + T4	65 (57,5)	48 (42,5)	<0,001
	T1 + T2	5 (19,2)	21 (80,8)	
Infiltrado linfocitário tumoral	intenso	1 (33,3)	2 (66,7)	0,344
	discreto/moderado	65 (49,6)	66 (50,4)	
	ausente	4 (80)	1 (20)	
Borda tumoral	infiltrativa	39 (59,1)	27 (40,9)	0,050
	expansiva	31 (42,5)	42 (57,5)	
Desmoplasia	Moderada/intensa	58 (55,2)	47 (44,8)	0,043
	ausente/leve	12 (35,3)	22 (64,7)	
Infiltração linfática	Presente	54 (80,6)	13 (19,4)	<0,001
	Ausente	16 (22,2)	56 (77,8)	
Infiltração vascular	Presente	37 (78,7)	10 (21,3)	<0,001
	Ausente	33 (35,9)	59 (64,1)	
Infiltração perineural	Presente	30 (76,9)	9 (23,1)	< 0,001
	Ausente	40 (20,8)	58 (59,2)	

1.2 DISTRIBUIÇÃO DAS VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS DOS ADENOCARCINOMAS PRIMÁRIOS, DE ACORDO COM A PRESENÇA DE METÁSTASE HEPÁTICA

A tabela 2 mostra o resultado da distribuição das variáveis anatomopatológicas dos adenocarcinomas primários, de acordo com a presença ou ausência de metástase hepática.

A presença de metástase hepática teve associação estatisticamente significativa com as seguintes variáveis anatomopatológicas: Infiltração tumoral além da camada muscular própria ($p = 0,004$) e presença de bordas tumorais infiltrativas ($p = 0,05$).

Embora não tenha atingido nível de significância estatística, a presença de infiltração da serosa foi muito mais freqüente nos casos com metástase hepática (62,5 % vs 29 %). O baixo número de casos (8) com infiltração comprovada de serosa parece explicar o índice de associação de $p = 0,107$.

Para todas as outras variáveis anatomopatológicas estudadas não houve associação estatisticamente significativa com a presença de metástase hepática.

Tabela 2: Distribuição das variáveis anatomopatológicas dos adenocarcinomas primários, de acordo com a presença ou ausência de metástase hepática

Variáveis	Categoria	Metástase hepática		p
		presença n (%)	ausência n (%)	
Tamanho	≥ 5 cm	22 (29,3)	53 (70,7)	0,658
	< 5 cm	21 (32,8)	43 (67,2)	
Localização	cólon direito	7 (31,8)	15 (68,2)	0,694
	cólon esquerdo	31 (27,7)	81 (72,3)	
Tipo macro	exofítico	8 (27,6)	21 (71,4)	0,661
	úlcero-infiltrativo	35 (31,8)	75 (68,2)	
Infiltração da serosa	presente	5 (62,5)	3 (37,5)	0,107
	ausente	38 (29,0)	93 (71,0)	
Tipo histológico	adenocarcinoma SOE	41 (32,8)	84 (67,2)	0,226
	carcinoma mucinoso	2 (14,3)	12 (85,7)	
Grau histológico	alto	3 (15,8)	16 (84,2)	0,182
	baixo	40 (33,3)	80 (66,7)	
Profundidade do tumor	T3 + T4	41 (36,3)	72 (63,7)	0,004
	T1 + T2	2 (7,7)	24 (92,3)	
Infiltrado linfocitário tumoral	intenso	1 (33,3)	2 (66,7)	0,862
	discreto/moderado	41 (31,3)	90 (68,7)	
	ausente	1 (20)	4 (80)	
Borda tumoral	infiltrativa	28 (42,4)	38 (57,6)	0,005
	expansiva	15 (20,5)	58 (79,5)	
Desmoplasia	moderada/intensa	35 (33,3)	70 (66,7)	0,282
	ausente/leve	8 (23,5)	26 (76,5)	
Infiltração linfática	presente	24 (35,8)	43 (64,2)	0,229
	ausente	19 (26,4)	53 (73,6)	
Infiltração vascular	presente	17 (36,2)	30 (63,8)	0,340
	ausente	26 (28,3)	66 (71,7)	
Infiltração perineural	Presente	11 (28,2)	28 (71,8)	0,664
	Ausente	32 (32,0)	68 (68,0)	

2 QUERATINA 7 (K7)

2.1 IMUNOEXPRESSÃO DA QUERATINA 7 NOS DIFERENTES TECIDOS EPITELIAIS ESTUDADOS

A distribuição semiquantitativa de cada marcador imuno-histoquímico em todos os casos é exposta de maneira completa no anexo 5.

Dos 139 casos, a expressão da K7 pôde ser avaliada em 127 amostras de mucosa normal, 127 amostras de adenocarcinomas primários, 68 amostras de metástase linfonodal e em 42 amostras de metástase hepática

Das 127 amostras de mucosa normal válidas para a avaliação da imunexpressão da K7, 116 foram negativas (91,3%) e 11 (8,7%) foram positivas (imunexpressaram K7 em mais de 5% das células).

Dos 127 adenocarcinomas primários válidos para a avaliação da imunexpressão da K7, 117 foram negativos (92,1%) e 10 (7,9%) exibiram imunexpressão em mais de 5% das células (figura 12).

Das 68 metástases linfonodais válidas para a avaliação da imunexpressão da K7, 59 foram negativas (86,8%) e 9 (6,5%) exibiram imunexpressão em mais de 5% das células.

Das 42 metástases hepáticas válidas para a avaliação da imunexpressão da K7, 26 foram negativas (61,9%) e 16 (38,1%) exibiram imunexpressão em mais de 5% das células.

2.2 COMPARAÇÃO DAS IMUNOEXPRESSÕES DA QUERATINA 7 EM AMOSTRAS PAREADAS DOS DIVERSOS TECIDOS EPITELIAIS ESTUDADOS

A tabela 3 mostra a diferença das imunoexpressões da K7 entre diferentes amostras teciduais, considerando-se apenas os casos onde as duas amostras comparadas foram válidas para a avaliação da imunoexpressão do antígeno.

Tabela 3: Diferença da imunoexpressão da K7 entre diferentes amostras teciduais, considerando-se apenas os casos onde as duas amostras comparadas foram válidas para a avaliação do antígeno

	K 7		P
	POSITIVO n (%)	NEGATIVO n (%)	
mucosa normal vs adenocarcinoma primário			1,000
mucosa normal	9 (15,1)	107 (84,9)	
adenocarcinoma primário	9 (15,1)	107 (84,9)	
adenocarcinoma primário vs metástase linfonodal			0,557
adenocarcinoma primário	5 (8,2)	56 (91,8)	
metástase linfonodal	8 (13,1)	53 (86,9)	
adenocarcinoma primário vs metástase hepática			<0,001
adenocarcinoma primário	2 (5,1)	37 (94,9)	
metástase hepática	15 (38,4)	24 (61,6)	
metástase linfonodal vs metástase hepática			0,015
metástase linfonodal	3 (10,7)	25 (89,3)	
metástase hepática	12 (42,8)	16 (57,2)	

As amostras de mucosa colorretal normal apresentaram baixa frequência de positividade para a queratina 7, o mesmo ocorrendo com os adenocarcinomas primários e as metástases linfonodais. Detectamos, entretanto, diferença estatística significativa entre a maior imunexpressão da K7 nas metástases hepáticas quando comparadas aos adenocarcinomas primários ($p < 0,001$) e às metástases linfonodais ($p = 0,015$).

2.3 DISTRIBUIÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DA QUERATINA 7 NOS ADENOCARCINOMAS PRIMÁRIOS, DE ACORDO COM AS VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS

A tabela 4 mostra a distribuição da imunexpressão da K7 nos adenocarcinomas primários de acordo com as variáveis anatomopatológicas estudadas.

A imunexpressão da K7 não apresentou qualquer associação significativa com as variáveis anatomopatológicas estudadas ($p > 0,05$).

Tabela 4 : Distribuição da imunopressão da K7 nos adenocarcinomas primários de acordo com as variáveis anatomopatológicas

Variáveis	Categoria	K 7		p
		POSITIVO n (%)	NEGATIVO n (%)	
Tamanho	≥ 5 cm	5 (7,1)	65 (92,9)	0,752
	< 5 cm	5 (8,8)	52 (91,2)	
Localização	cólon direito	3 (13,6)	19 (86,4)	0,384
	cólon esquerdo	7 (7,0)	93 (93,0)	
Tipo macroscópico	exofítico	1 (3,6)	27 (96,4)	0,457
	úlceroinfiltrativo	9 (9,1)	90 (90,9)	
Infiltração da serosa	presente	2 (25,0)	6 (75,0)	0,121
	ausente	8 (6,7)	111(93,3)	
Tipo histológico	adenocarcinoma SOE	9 (7,8)	106 (92,2)	1,000
	carcinoma mucinoso	1 (8,3)	11 (91,7)	
Grau histológico	alto	2 (12,5)	14 (87,5)	0,613
	baixo	8 (7,2)	103 (92,8)	
Profundidade do tumor	T3 + T4	7 (6,7)	98 (93,3)	0,376
	T1 + T2	3 (13,6)	19 (86,4)	
Infiltrado linfocitário tumoral	intenso	0 (0)	3 (100)	0,387
	discreto/moderado	9 (7,5)	111 (92,5)	
	ausente	1 (25)	3 (75)	
Borda tumoral	expansiva	6 (9,1)	60 (90,9)	0,746
	infiltrativa	4 (6,6)	57 (93,4)	
Desmoplasia	moderada/intensa	8 (8,5)	86 (91,5)	1,000
	ausente/leve	2 (6,1)	31 (93,9)	
Infiltração linfática	presente	5 (7,9)	58 (92,1)	1,000
	ausente	5 (7,8)	59 (92,2)	
Infiltração vascular	presente	4 (9,3)	39 (90,7)	0,733
	ausente	6 (7,1)	78 (92,9)	
Infiltração perineural	presente	4 (11,4)	31 (88,6)	0,461
	ausente	6 (6,5)	86 (93,5)	

3. QUERATINA 20 (K 20)

3.1 IMUNOEXPRESÃO DA QUERATINA 20 NOS DIFERENTES TECIDOS EPITELIAIS ESTUDADOS

Dos 139 casos, a expressão da K 20 pôde ser avaliada em 130 amostras de mucosa normal, 132 amostras de adenocarcinomas primários, 63 amostras de metástase linfonodal e em 42 amostras de metástase hepática.

Das 130 amostras de mucosa normal válidas para a avaliação da imunopresença da K20, 1 foi negativa (0,8%) e 129 (99,2%) tiveram mais de 5% das células imunomarcadas (figura 13).

Dos 132 adenocarcinomas primários válidos para a avaliação da imunopresença da queratina 20 (K20), 9 (6,8%) foram negativos e 123 (93,2%) tiveram imunopresença em mais de 5% das células.

Das 63 metástases linfonodais válidas para a avaliação da imunopresença da K20, 6 foram negativas (9,5%) e 57 (90,5%) exibiram imunopresença em mais de 5% das células.

Das 42 metástases hepáticas válidas para a avaliação da imunopresença da K20, 1 foi negativa (2,4%) e 41 (97,6%) exibiram imunopresença em mais de 5% das células.

3.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS IMUNOEXPRESSÕES DA QUERATINA 20 EM AMOSTRAS PAREADAS DOS DIVERSOS TECIDOS EPITELIAIS ESTUDADOS

A tabela 5 mostra a comparação das imunoexpressões da K20 entre diferentes amostras teciduais, considerando-se apenas os casos onde as duas amostras comparadas foram válidas para a avaliação da imunoexpressão do antígeno.

Tabela 5: Comparação entre as imunoexpressões da K20 entre diferentes amostras teciduais, considerando-se apenas os casos onde as duas amostras comparadas foram válidas para a avaliação do antígeno

	K 20		P
	POSITIVO n (%)	NEGATIVO n (%)	
mucosa normal vs adenocarcinoma primário			0,023
Mucosa normal	122 (99,1)	1 (0,8)	
adenocarcinoma primário	114 (92,7)	9 (7,3)	
adenocarcinoma primário vs metástase linfonodal			1,000
adenocarcinoma primário	53 (91,4)	5 (8,6)	
metástase linfonodal	53 (91,4)	5 (8,6)	
adenocarcinoma primário vs metástase hepática			1,000
adenocarcinoma primário	39 (95,1)	2 (4,9)	
metástase hepática	40 (97,5)	1 (2,5)	
metástase linfonodal vs metástase hepática			1,000
metástase linfonodal	27 (96,4)	1 (0,6)	
metástase hepática	28 (100,0)	0 (0)	

Conforme esperado a queratina 20 mostrou-se presente na quase totalidade das amostras de mucosa colorretal normal e em mais de 90% das amostras dos vários tipos de lesão aqui estudadas. Ainda assim, 7,3% dos adenocarcinomas primários mostraram-se negativos para a marcação da queratina 20, enquanto apenas 0,8% das amostras de mucosa não neoplásica correspondente mostraram-se negativas ($p=0,023$).

Quanto aos demais pares, não foram constatadas diferenças significativas quanto à imunoexpressão da K20, que foi positiva em mais de 90% das amostras tumorais primárias ou metastáticas.

3.3 DISTRIBUIÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DA QUERATINA 20 NOS ADENOCARCINOMAS PRIMÁRIOS, DE ACORDO COM AS VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS

A tabela 6 mostra a distribuição da imunoexpressão da K20 nos adenocarcinomas primários em relação às variáveis anatomopatológicas estudadas.

Não houve associação estatística entre a imunoexpressão da K20 e nenhuma das variáveis anatomopatológicas estudadas ($p>0,05$), constatando-se que K20 esteve presente em mais de 90 % dos adenocarcinomas colorretais .

Tabela 6: Distribuição da imunexpressão da K20 nos adenocarcinomas primários em relação às variáveis anatomopatológicas

Variáveis	Categoria	K 20		p
		POSITIVO n (%)	NEGATIVO N (%)	
Tamanho	≥ 5 cm	67 (93,1)	5(6,9)	1,000
	< 5 cm	56 (93,3)	4 (6,7)	
Localização	cólon direito	19 (86,4)	3 (13,6)	0,188
	cólon esquerdo	99 (94,3)	6 (5,7)	
Tipo macroscópico	Exofítico	26 (92,9)	2 (7,1)	1,0
	úlcero-infiltrativo	97 (93,3)	7 (6,7)	
Infiltração da serosa	Presente	7 (87,5)	1 (12,5)	0,441
	Ausente	116 (93,5)	8 (6,5)	
Tipo histológico	Adenocarcinoma SOE	110 (93,2)	8 (6,8)	1,000
	carcinoma mucinoso	13 (92,9)	1 (7,1)	
Grau histológico	Alto	17 (94,4)	1 (5,6)	1,000
	baixo	106 (93,0)	8 (7,0)	
Profundidade do tumor	T3 + T4	102 (95,3)	5 (4,7)	0,065
	T1 + T2	21 (84,0)	4 (16,0)	
Infiltrado linfocitário tumoral	Intenso	3 (100,0)	0 (0)	0,311
	discreto/moderado	117 (93,6)	8 (6,4)	
	Ausente	3 (75)	1 (25)	
Borda tumoral	Expansiva	64 (91,4)	6 (8,6)	0,500
	Infiltrativa	59 (95,2)	3 (4,8)	
Desmoplasia	moderada/intensa	94 (94,0)	6 (6,0)	0,452
	ausente/leve	29 (90,6)	3 (9,4)	
Infiltração linfática	Presente	56 (91,8)	5 (8,2)	0,732
	Ausente	29 (90,6)	3 (9,4)	
Infiltração vascular	Presente	40 (90,9)	4 (9,1)	0,480
	Ausente	83 (94,3)	5 (5,7)	
Infiltração perineural	Presente	31 (88,6)	4 (11,4)	0,244
	Ausente	92 (94,8)	5 (5,2)	

4. ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI-67

4.1 IMUNOEXPRESSÃO DO ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI-67 NOS DIFERENTES TECIDOS EPITELIAIS ESTUDADOS

A imunopressão do antígeno relacionado à proliferação celular Ki-67 foi avaliada em 124 amostras de mucosa normal, 126 adenocarcinomas primários, 62 metástases linfonodais e em 42 metástases hepáticas.

Cento e vinte e três (99,2%) amostras de mucosa normal exibiram imunomarcção considerada baixa (até 50 % das células), enquanto 1 (0,8%) imunopressaram Ag Ki-67 em mais de 50% das células. Sessenta e dois adenocarcinomas primários (49,2%) apresentaram Ki-67 em menos de 50 % das células, enquanto em 64 casos (50,8%) a imunomarcção ocorreu em mais de 50% das células (figura 14). Trinta e quatro amostras de metástases linfonodais (54,8%) tiveram até 50% das células positivas para Ki-67 e 28 casos (45,2%) tiveram mais de 50 % das células imunomarcadas. Trinta amostras de metástase hepática (71,4%) tiveram até 50% das células marcadas para Ki -67 e 12 casos (28,6%) tiveram mais de 50% das células marcadas.

4.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS IMUNOEXPRESSÕES DO ANTÍGENO KI-67 EM AMOSTRAS PAREADAS DOS DIVERSOS TECIDOS ESTUDADOS

A tabela 7 mostra a comparação entre as imunoexpressões do Ag ki-67 das diferentes amostras teciduais, considerando-se apenas os casos onde as duas amostras comparadas de um mesmo caso foram válidas para a avaliação da imunoexpressão do antígeno.

Tabela 7: Comparação entre as imunoexpressões do Ag Ki-67 das diferentes amostras teciduais, considerando-se apenas os casos onde as duas amostras comparadas de um mesmo caso foram válidas para a avaliação antígeno

	Ki-67		p
	> 50% n (%)	≤ 50% n (%)	
mucosa normal vs adenocarcinoma primário			<0,001
Mucosa normal	0	114 (100,0)	
Adenocarcinoma primário	58 (50,9)	56 (49,1)	
adenocarcinoma primário vs metástase linfonodal			0,285
adenocarcinoma primário	24 (42,1)	33 (57,9)	
Metástase linfonodal	28 (49,1)	29 (50,9)	
adenocarcinoma primário vs metástase hepática			0,134
Adenocarcinoma primário	18 (42,9)	24 (57,1)	
Metástase hepática	12 (29,6)	30 (71,4)	
metástase linfonodal vs metástase hepática			0,096
Metástase linfonodal	11 (44,0)	14 (56,0)	
Metástase hepática	6 (24,0)	19 (76,0)	

A imunoexpressão do Ag Ki-67 nos adenocarcinomas primários foi significativamente superior à da observada na mucosa normal ($p < 0,001$).

Os presentes resultados mostram que há um aumento da atividade proliferativa nas amostras tumorais em relação à mucosa normal e que a atividade proliferativa dos adenocarcinomas é tão elevada quanto a das metástases.

4.3 DISTRIBUIÇÃO DOS PADRÕES DE IMUNOEXPRESSÃO DO ANTÍGENO KI-67 NOS ADENOCARCINOMAS PRIMÁRIOS, DE ACORDO COM AS VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS

A tabela 8 mostra a distribuição da imunoexpressão do Ag ki-67 nos adenocarcinomas primários, de acordo com as variáveis anatomopatológicas.

Não foi detectada qualquer associação estatística significativa entre o índice de reatividade do Ag Ki-67 no adenocarcinoma primário e as variáveis anatomopatológicas aqui estudadas.

Tabela 8: Distribuição da imunexpressão do Ag Ki-67 nos adenocarcinomas primários de acordo com as variáveis anatomopatológicas

Variáveis	Categoria	Ki-67		p
		> 50% n (%)	≤ 50% n (%)	
Tamanho (cm)	≥ 5	39 (55,7)	31 (44,3)	0,151
	< 5	24 (42,9)	32 (57,1)	
Localização	Cólon direito	8 (38,1)	13 (61,9)	0,214
	Cólon esquerdo	53 (53,0)	47 (47,0)	
Tipo macro	Exofítico	15 (60,0)	10 (40,0)	0,264
	Úlcero-infiltrativo	48 (47,5)	53 (52,5)	
Comprometimento da serosa	Sim	3 (37,5)	5 (62,5)	0,717
	Não	60 (50,8)	58 (49,2)	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	57 (49,6)	58 (50,4)	0,752
	Mucinoso	6 (54,5)	5 (45,5)	
Grau histológico	Alto	8 (57,1)	6 (42,9)	0,571
	Baixo	55 (49,1)	57 (50,9)	
Profundidade do tumor	T3 + T4	51 (49,0)	53 (51,0)	0,639
	T1 + T2	12 (54,5)	10 (45,5)	
Infiltrado linfocitário tumoral	Intenso	2 (75,0)	1 (25,0)	0,342
	discreto/moderado	61 (50,8)	59 (49,2)	
	Ausente	3 (100)	0 (0)	
Borda tumoral	Expansiva	37 (56,9)	28 (43,1)	0,109
	Infiltrativa	26 (42,6)	35 (57,4)	
Desmoplasia	Moderada/intensa	51 (51,5)	48 (48,5)	0,515
	Ausente/leve	12 (44,4)	15 (55,6)	
Infiltração linfática	Presente	28 (45,2)	34 (21,0)	0,285
	Ausente	35 (54,7)	29 (29,7)	
Infiltração vascular	Presente	17 (40,5)	25 (59,5)	0,131
	Ausente	46 (54,8)	38 (45,2)	
Infiltração perineural	Presente	13 (37,1)	22 (62,9)	0,073
	Ausente	50 (54,9)	41 (45,1)	

5. ÍNDICE DE CÉLULAS EM APOPTOSE (IA)

5.1 ÍNDICE DE CÉLULAS EM APOPTOSE NOS DIFERENTES TECIDOS EPITELIAIS ESTUDADOS

Devido ao baixo número de células imunorreativas para o marcador de apoptose queratina 18 clivada, esta contagem foi efetuada pelo pós-graduando em mil células de cada amostra, sendo os dados apresentados em porcentagem. Dentre os 139 casos selecionados para o presente estudo, mil células puderam ser contadas para a obtenção do índice de células em apoptose (IA) em amostras de mucosa normal de 106 casos, em amostras de adenocarcinoma primário de 103 casos e em amostras de metástase nodal de 45 casos. Dos 43 casos de metástase hepática, 41 exibiam mil ou mais células passíveis de serem contadas para a obtenção do índice de células em apoptose (IA).

Dentre 106 amostras de mucosa normal com representação válida para a obtenção do IA, 30 não exibiram imunomarcção para queratina 18 clivada. Quarenta e um casos exibiram de 1 a 5 células positivas. Quatorze casos exibiram positividade entre 6 e 10 células, 12 casos exibiram mais de 10 células positivas. A média do IA nas amostras válidas de mucosa normal foi de 0,612 e a mediana foi de 0,100. A figura 15 ilustra a imunorreatividade para a K18 clivada em amostra de mucosa normal.

Dos 103 adenocarcinomas primários válidos para a obtenção do IA, 42 apresentavam até 10 células imunomarcadas para queratina 18 clivada dentre mil células contadas, outros 23 casos mostraram reatividade em até 20 células. Dezesseis

casos apresentavam até 30 células positivas . Apenas 9 casos mostraram reatividade para queratina 18 clivada em 30 a 50 células e outros 13 apresentara mais de 50 células imunomarcadas. A média do IA nas amostras de adenocarcinoma primário foi de 2,810 e a mediana 1,500. A figura 16 ilustra a imunorreatividade da K18 clivada em adenocarcinoma colorretal.

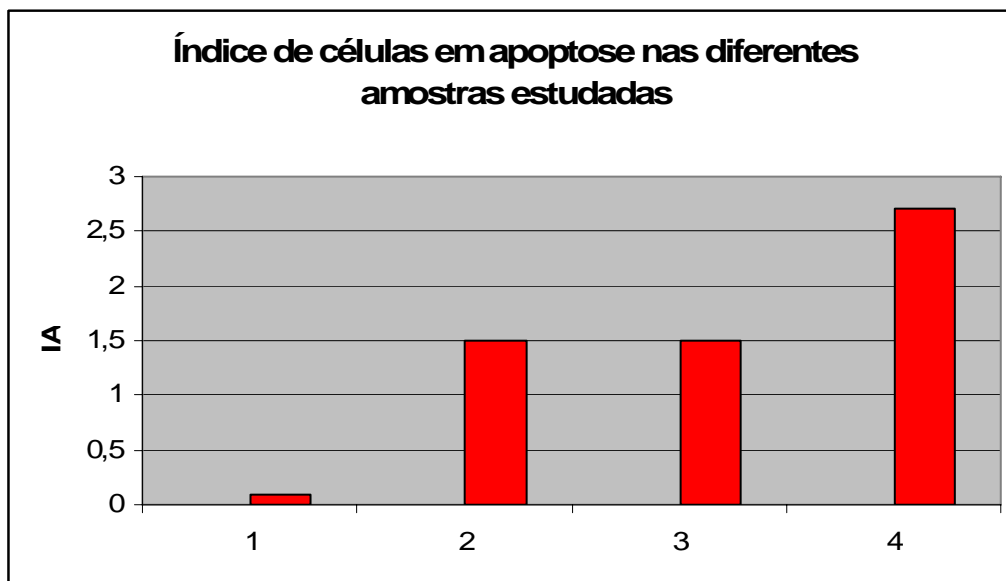
Em amostras de metástase linfonodal de 45 casos puderam ser contadas pelo menos 1000 células. Dezesete casos tiveram até 10 células imunomarcadas para queratina 18 clivada, 14 casos tiveram entre 11 e 30 células imunomarcadas, 7 casos tiveram entre 30 e 60 células positivas, 4 casos tiveram entre 6 e 90 células positivas e 2 casos tiveram mais de 100 células imunoexpressando queratina 18 clivada. A média do IA nas amostras de metástase linfonodal foi de 2,971 e a mediana foi de 1,500.

Dos 41 casos de metástase hepática válidos, 9 tiveram até 10 células imunomarcadas para queratina 18 clivada , 16 casos tiveram entre 11 e 20 células positivas. Oito casos tiveram entre 21 e 40 células imunoexpressando queratina 18 clivada e seis casos tiveram mais de 40 células imunomarcadas A média do IA nas amostras de metástase hepática foi de 2,305 e a mediana foi de 2,700.

5.2 ÍNDICE DE CÉLULAS EM APOPTOSE NAS DIFERENTES AMOSTRAS TECIDUAIS EPITELIAIS

O gráfico 1 mostra as medianas dos índices de células em apoptose (IA) em diferentes amostras epiteliais colorretais.

Gráfico 1: Mediana do índice de células em apoptose (IA) em diferentes amostras epiteliais colorretais



Legenda: IA- índice de células em apoptose; 1- mucosa normal, 2- adenocarcinoma primário, 3- metástase linfonodal, 4- metástase hepática

O presente gráfico mostra um nítido aumento da mediana das amostras de adenocarcinoma primário ou metastático em relação às amostras de adenoma e mucosa normal.

5.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS ÍNDICES DE CÉLULAS EM APOPTOSE EM AMOSTRAS PAREADAS DOS DIVERSOS TECIDOS EPITELIAIS ESTUDADOS

A tabela 9 exhibe a comparação entre os índices apoptóticos das amostras pareadas, dos tecidos estudados.

Tabela 9: Diferença entre os IAs entre as amostras, considerando-se apenas os casos onde as duas amostras (pares) comparadas foram válidas para a avaliação.

variáveis	Índice de células em apoptose		
	n	mediana	p
mucosa normal vs adenocarcinoma primário	77		<0,001
mucosa normal		0,100	
adenocarcinoma primário		1,500	
adenocarcinoma primário vs metástase linfonodal	38		0,223
adenocarcinoma primário		1,400	
metástase linfonodal		1,500	
adenocarcinoma primário vs metástase hepática	37		0,022
adenocarcinoma primário		1,300	
metástase hepática		1,700	
metástase linfonodal vs metástase hepática	19		0,365
metástase linfonodal		2,100	
metástase hepática		1,700	

O estudo das amostras pareadas revelou que o índice de células em apoptose foi estatisticamente significativo mais elevado nos adenocarcinomas primários que na mucosa normal ($p < 0,001$). Também houve associação estatística entre o IA mais elevado nas metástases hepáticas em relação aos adenocarcinomas primários ($p = 0,022$). Não foram detectadas diferenças significantes entre o IA das metástases hepáticas e as linfonodais.

5.4. DISTRIBUIÇÃO DO ÍNDICE DE CÉLULAS EM APOPTOSE NOS ADENOCARCINOMAS PRIMÁRIOS, DE ACORDO COM AS VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS.

A tabela 10 mostra a distribuição dos IA dos adenocarcinomas primários, de acordo com as variáveis anatomopatológicas

Tabela 10: Índice de células em apoptose nos adenocarcinomas primários de acordo com as variáveis anatomopatológicas

variável	categoria	n (%)	IA	
			mediana	p
Tamanho	≥ 5 cm	44 (42,7)	1,600	0,005
	< 5 cm	59 (57,3)	0,800	
Localização	cólon direito	17 (17,3)	1,200	0,183
	cólon esquerdo	81 (82,7)	1,600	
Tipo macroscópico	Exofítico	24 (23,3)	1,250	0,512
	úlcero-infiltrativo	79 (76,7)	1,500	
Infiltração da serosa	Presente	7 (6,7)	1,200	0,521
	Ausente	96 (93,3)	1,500	
Tipo histológico	adenocarcinoma SOE	95 (92,2)	1,500	0,635
	carcinoma mucinoso	8 (7,8)	1,800	
Grau histológico	Alto	11 (10,7)	2,400	0,123
	baixo	92 (89,3)	1,300	
Profundidade do tumor	T3 + T4	85 (82,5)	1,500	0,788
	T1 + T2	18 (17,5)	1,350	
Infiltrado linfocitário tumoral	Intenso	3 (2,9)	5,900	0,339
	discreto/moderado	98 (95,1)	1,500	
	Ausente	2 (2,0)	1,400	
Borda tumoral	Expansiva	60 (58,2)	1,500	0,529
	Infiltrativa	43 (41,8)	1,200	
Desmoplasia	Moderada/intensa	79 (76,7)	1,500	0,876
	ausente/leve	24 (23,3)	1,200	
Infiltração linfática	Presente	50 (48,5)	1,400	0,887
	Ausente	53 (51,5)	1,500	
Infiltração vascular	Presente	32 (31,0)	1,500	0,684
	Ausente	71 (69,0)	1,500	
Infiltração perineural	Presente	27 (26,2)	0,800	0,109
	Ausente	76 (73,8)	1,550	

Os carcinomas primários com tamanho maior que 5 cm tiveram IA estatisticamente significante mais elevado que aqueles menores com até 5 cm ($p=0,005$).

As demais variáveis anatomopatológicas não tiveram associação estatística com o IA.

6. TRANSPORTADORES DE MONOCARBOXILATOS 1, 2 E 4 (MCTs 1, 2 E 4)

6.1 Imunoexpressão dos transportadores de monocarbo-xilato nas mucosas normais e adenocarcinomas primários colorretais

Em 126 amostras de adenocarcinoma primário foram avaliadas as imunoexpressões citoplasmática e membranosa dos MCTs 1,2 e 4. Houve positividade citoplasmática do MCT 1, MCT 2 e MCT4 respectivamente em 108, 118 e 121 casos. A positividade membranosa dos MCT1, MCT2 e MCT 4 ocorreu respectivamente em 65, 7 e 48 casos. A **figura 17** ilustra a imunorreatividade membranosa do MCT 1.

Em 86 casos avaliamos as amostras de mucosa normal quanto a imunoexpressão do MCT 1 que foi positiva no citoplasma de 30 casos e na membrana de 8 casos. O MCT 2 foi avaliado em 84 amostras de mucosa normal, sendo imunoexpresso no citoplasma de 70 casos e na membrana de 12 casos. O MCT 4 foi avaliado em 89 casos, tendo sido imunoexpresso no citoplasma de 49 casos e na membrana de 8 casos.

6.2 COMPARAÇÃO ENTRE A IMUNOEXPRESSÃO DO MCT 1 ENTRE AS AMOSTRAS PAREADAS DE MUCOSA NORMAL E ADENOCARCINOMA PRIMÁRIO

6.2.1 IMUNOEXPRESSÃO CITOPLASMÁTICA

A tabela 11 mostra a comparação da imunexpressão citoplasmática do MCT 1 entre amostras pareadas de mucosa normal e de adenocarcinoma primário.

Tabela 11: comparação da imunexpressão citoplasmática do MCT 1 entre amostras pareadas de mucosa normal e adenocarcinoma primário

Variáveis	MCT 1 citoplasma		p
	Pos (%)	Neg (%)	
Mucosa normal	30 (34,9)	56 (65,1)	<0,001
Adenocarcinoma primário	73 (84,9)	13 (15,1)	

A imunexpressão citoplasmática do MCT 1 foi estatisticamente significante mais freqüente nos adenocarcinoma primários que nas mucosas normais ($p < 0,001$).

6.2.2 IMUNOEXPRESSÃO MEMBRANOSA

A tabela 12 mostra a comparação da imunexpressão membranosa do MCT 1 entre amostras pareadas de mucosa normal e de adenocarcinoma primário.

Tabela 12: comparação da imunexpressão membranosa do MCT 1 entre amostras pareadas de mucosa normal e adenocarcinoma primário, considerando-se apenas casos pareados.

Variáveis	MCT 1 membrana		p
	Pos (%)	Neg (%)	
Mucosa normal	8 (9,3)	78 (90,7)	<0,001
Adenocarcinoma primário	45 (52,3)	41 (47,7)	

A imunexpressão membranosa do MCT 1 foi estatisticamente mais freqüente nos adenocarcinomas que nas mucosas normais ($p < 0,001$).

6.3 COMPARAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DO MCT 2 ENTRE AS AMOSTRAS PAREADAS DE MUCOSA NORMAL E ADENOCARCINOMA PRIMÁRIO

6.3.1 IMUNOEXPRESSÃO CITOPLASMÁTICA

A tabela 13 mostra a comparação da imunexpressão citoplasmática do MCT 2 entre as amostras pareadas de adenocarcinoma primário e de mucosa normal.

Tabela 13: comparação da imunexpressão citoplasmática do MCT 2 entre as amostras pareadas de mucosa normal e de adenocarcinoma primário

Variáveis	MCT 2 citoplasma		p
	Pos (%)	Neg (%)	
Mucosa normal	70 (83,3)	14 (16,7)	0,090
Adenocarcinoma primário	77 (91,7)	7 (8,3)	

Não houve diferença estatística significativa da frequência de imunexpressão citoplasmática do MCT 2 entre as amostras de mucosa normal e adenocarcinoma primário (p=0,090)

6.3.2 IMUNOEXPRESSÃO MEMBRANOSA

A tabela 14 mostra a comparação da imunexpressão membranosa do MCT 2 entre as amostras pareadas de adenocarcinoma primário e de mucosa normal.

Tabela 14: comparação da imunexpressão membranosa do MCT 2 entre as amostras pareadas de mucosa normal e de adenocarcinoma primário

Variáveis	MCT 2 membrana		p
	Pos (%)	Neg (%)	
Mucosa normal	12 (14,3)	72 (85,7)	0,090
Adenocarcinoma primário	5 (6,0)	79 (94,0)	

Não houve diferença estatística significativa da frequência de imunopressão citoplasmática do MCT 2 entre as amostras de mucosa normal e adenocarcinoma primário (p=0,090)

6.4 COMPARAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DO MCT 2 ENTRE AS AMOSTRAS PAREADAS DE MUCOSA NORMAL E ADENOCARCINOMA PRIMÁRIO

6.4.1 IMUNOEXPRESSÃO CITOPLASMÁTICA

A tabela 15 mostra a comparação da imunopressão citoplasmática do MCT 4 entre as amostras pareadas de mucosa normal e tumor primário.

Tabela 15: Comparação da imunopressão citoplasmática do MCT 4 entre as amostras pareadas de mucosa normal e de adenocarcinoma primário

Variáveis	MCT 4 citoplasma		p
	Pos (%)	Neg (%)	
Mucosa normal	49 (55,1)	40 (44,9)	< 0,001
Adenocarcinoma primário	85 (95,5)	4 (4,5)	

As amostras de adenocarcinoma tiveram imunopressão citoplasmática estatisticamente mais frequentes que as amostras de mucosa normal (p<0001)

6.4.2 IMUNOEXPRESSÃO MEMBRANOSA

A tabela 16 mostra a comparação da imunopressão membranosa do MCT 4 entre as amostras pareadas de mucosa normal e tumor primário.

Tabela 16: comparação da imunopressão membranosa do MCT 4 entre as amostras pareadas de mucosa normal e de adenocarcinoma primário

Variáveis	MCT 4 membrana		p
	Pos (%)	Neg (%)	
Mucosa normal	8 (9,0)	81 (91,0)	< 0,001
Adenocarcinoma primário	29 (32,6)	60 (67,4)	

As amostras de adenocarcinoma tiveram imunopressão membranosa estatisticamente mais freqüentes que as amostras de mucosa normal ($p < 0,001$)

6.5 DISTRIBUIÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DOS TRANSPORTADORES DE MONOCARBOXILATOS NOS ADENOCARCINOMAS PRIMÁRIOS, DE ACORDO COM AS VARIÁVEIS ANATOMO-PATOLÓGICAS

6.5.1 MCT 1

A tabela 17 mostra a distribuição das imunopressões citoplasmática e membranosa do MCT 1 nos adenocarcinomas primários, de acordo com as variáveis anatomopatológicas.

Tabela 17: Distribuição das imunopressões citoplasmática e membranosa do MCT 1 nos adenocarcinomas primários, de acordo com as variáveis anatomopatológicas

Variáveis	categoria	MCT 1 CITOPLASMA		MCT 1 MEMBRANA	
		POSITIVO n (%)	P	POSITIVO n (%)	p
tamanho	≥ 5 cm	60 (83,3)	0,378	37 (51,4)	0,959
	< 5 cm	48 (88,9)		28 (51,9)	
Localização	cólon direito	17 (81,0)	0,512	9 (42,9)	0,473
	cólon esquerdo	87 (86,1)		54 (53,5)	
Tipo Macroscópico	exofítico	20 (76,9)	0,150	12 (46,2)	0,534
	úlcero-infiltrativo	88 (88,0)		53 (53,0)	
Infiltração da Serosa	Sim	4 (80,0)	0,544	2 (40,0)	0,673
	não	104 (86,0)		63 (52,1)	
Tipo Histológico	adenocarcinoma SOE	100 (86,2)	0,635	59 (50,9)	0,745
	carcinoma mucinoso	8 (80,0)		6 (60,0)	
Grau Histológico	alto	10 (71,4)	0,116	7 (50,0)	0,900
	baixo	98 (87,5)		58 (51,8)	
Profundidade do tumor	T3 + T4	90 (87,4)	0,321	56 (54,4)	0,186
	T1 + T2	18 (78,3)		9 (39,1)	
Infiltrado linfocitário tumoral	intenso	2 (100,0)	0,128	2 (100,0)	0,319
	discreto/moderado	105 (86,8)		62 (51,2)	
	ausente	1 (33,3)		1 (33,3)	
Borda Tumoral	expansiva	57 (83,8)	0,511	29 (50,0)	0,742
	infiltrativa	51 (87,9)		36 (52,9)	
Desmoplasia	Moderada/intensa	85 (87,6)	0,261	50 (51,5)	0,987
	Ausente/leve	23 (79,3)		15 (51,7)	
Infiltração Linfática	presente	54 (81,8)	0,190	39 (65,0)	0,004
	ausente	54 (90,0)		26 (39,4)	
Infiltração Vascular	presente	37 (84,1)	0,791	29 (65,9)	0,018
	ausente	71 (86,6)		36 (43,9)	
Infiltração Perineural	presente	30 (90,9)	0,398	20 (60,6)	0,228
	ausente	78 (83,9)		45 (48,4)	

A imunexpressão citoplasmática do MCT 1 não se associou estatisticamente com nenhuma das variáveis anatomopatológicas estudadas.

A presença de infiltração linfática tumoral se associou estatisticamente com a presença da imunexpressão membranosa do MCT 1 ($p=0,004$). A presença de infiltração vascular sanguínea também se associou estatisticamente com a imunopositividade membranosa do MCT 1 ($p=0,018$). As outras variáveis anatomopatológicas não se associaram estatisticamente à expressão membranosa do MCT 1.

6.5.2 MCT 2

A tabela 18 mostra a distribuição das imunopresões citoplasmática e membranosa do MCT 2 nos adenocarcinomas primários, de acordo com as variáveis anatomopatológicas.

Não houve associação estatística entre a imunexpressão citoplasmática e membranosa do MCT 2 nos adenocarcinomas primários com nenhuma variável anatomopatológica estudada.

Tabela 18: Distribuição das imunorexpressões citoplasmática e membranosa do MCT 2 nos adenocarcinomas primários, de acordo com as variáveis anatomopatológicas

Variáveis	categoria	MCT 2 CITOPLASMA		MCT 2 MEMBRANA	
		POSITIVO n (%)	P	POSITIVO n (%)	p
Tamanho	≥ 5 cm	65 (90,3)	0,136	6 (8,3)	0,237
	< 5 cm	53 (98,1)		1 (1,9)	
Localização	cólon direito	19 (90,5)	0,346	1 (4,8)	1,000
	cólon esquerdo	96 (95,0)		6 (5,9)	
Tipo macroscópico	exofítico	24 (92,3)	0,669	0 (0)	0,343
	úlcero-infiltrativo	94 (94,0)		7 (7,0)	
Infiltração da serosa	sim	4 (80,0)	0,284	0 (0)	1,000
	não	114 (94,2)		7 (5,8)	
Tipo histológico	adenocarcinoma SOE	108 (93,1)	1,000	6 (5,2)	0,448
	carcinoma mucinoso	10 (100,0)		1 (10,0)	
Grau histológico	alto	12 (85,7)	0,218	1 (7,1)	0,571
	baixo	106 (94,6)		6 (5,4)	
Profundidade do tumor	T3 + T4	97 (94,2)	0,637	7 (6,8)	0,348
	T1 + T2	21 (91,3)		0 (0)	
Infiltrado linfocitário tumoral	intenso	2 (100,0)	0,838	0 (0)	0,100
	discreto/moderado	113 (93,4)		6 (5,0)	
	ausente	3 (100,0)		1 (33,3)	
Borda tumoral	expansiva	64 (94,1)	1,000	5 (7,4)	0,451
	infiltrativa	54 (93,1)		2 (3,4)	
Desmoplasia	Moderada/intensa	91 (93,8)	1,000	5 (5,2)	0,661
	Ausente/leve	27 (93,1)		2 (6,9)	
Infiltração linfática	presente	58 (96,7)	0,278	5 (8,3)	0,256
	ausente	60 (90,9)		2 (3,0)	
Infiltração vascular	presente	42 (95,5)	0,712	4 (9,1)	0,237
	ausente	76 (92,7)		3 (3,7)	
Infiltração perineural	presente	32 (97,0)	0,680	3 (9,1)	0,377
	ausente	86 (92,5)		4 (4,3)	

6.5.3 MCT 4

A tabela 19 mostra a distribuição das imunexpressões citoplasmática e membranosa do MCT 4 nos adenocarcinomas primários, de acordo com as variáveis anatomopatológicas.

Não houve associação estatística entre a imunexpressão citoplasmática e membranosa do MCT 4 e nenhuma variável anatomopatológica estudada.

Tabela 19: Distribuição das imunoexpressões citoplasmática e membranosa do MCT 4 nos adenocarcinomas primários de acordo com as variáveis anatomopatológicas

Variáveis	categoria	MCT 4 CITOPLASMA		MCT 4 MEMBRANA	
		POSITIVO n (%)	P	POSITIVO n (%)	p
tamanho	≥ 5 cm	67 (93,1)	0,070	29 (40,3)	0,560
	< 5 cm	54 (100,0)		19 (35,2)	
Localização	cólon direito	20 (95,2)	1,000	8 (38,1)	0,968
	cólon esquerdo	97 (96,0)		38 (37,6)	
Tipo Macroscópico	exofítico	26 (100,0)	0,583	8 (30,8)	0,388
	úlcero-infiltrativo	95 (95,4)		40 (40,0)	
Comprometimento da Serosa	sim	4 (80,0)	0,186	2 (40,0)	1,000
	não	117 (96,7)		46 (38,0)	
Tipo Histológico	Adenocarcinoma SOE	111 (95,7)	1,000	45 (38,8)	0,741
	carcinoma mucinoso	10 (100,0)		3 (30,0)	
Grau Histológico	alto	12 (85,7)	0,095	3 (21,4)	0,246
	baixo	109 (97,3)		45 (40,2)	
Profundidade do tumor	T3 + T4	98 (95,1)	0,584	40 (38,8)	0,717
	T1 + T2	23 (100,0)		8 (34,8)	
Infiltrado linfocitário tumoral	intenso	2 (100,0)	0,898	2 (100,0)	0,078
	discreto/moderado	116 (95,9)		46 (38,0)	
	ausente	3 (100,0)		0 (0)	
Borda Tumoral	expansiva	66 (97,1)	0,661	25 (36,8)	0,739
	infiltrativa	55 (94,8)		23 (39,7)	
Desmoplasia	Moderada/intensa	93 (95,9)	1,000	41 (42,3)	0,078
	Ausente/leve	29 (96,6)		7 (24,1)	
Infiltração Linfática	presente	57 (95,0)	0,668	21 (35,0)	0,495
	ausente	64 (97,0)		27 (40,9)	
Infiltração Vascular	presente	41 (93,2)	0,342	16 (36,4)	0,769
	ausente	80 (97,6)		32 (39,0)	
Infiltração Perineural	presente	32 (97,0)	1,000	13 (39,4)	0,858
	ausente	89 (95,7)		35 (37,6)	

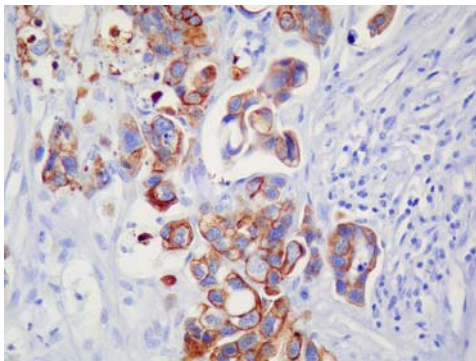


Figura 12: Positividade para K7 em adenocarcinoma colorretal (400X)

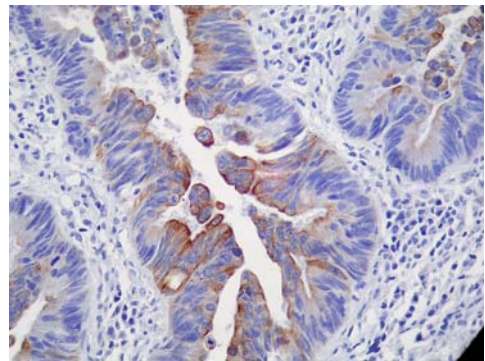


Figura 13: Positividade para K 20 em adenocarcinoma colorretal (400X)

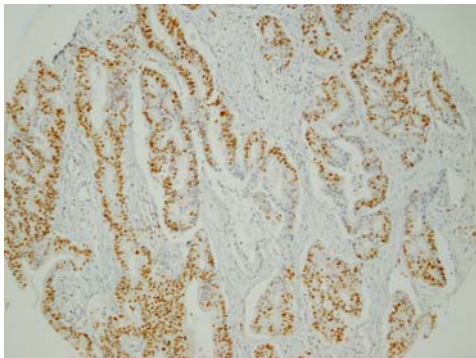


Figura 14: Alta taxa proliferativa (ki-67 > 50%) em adenocarcinoma colorretal (100X)

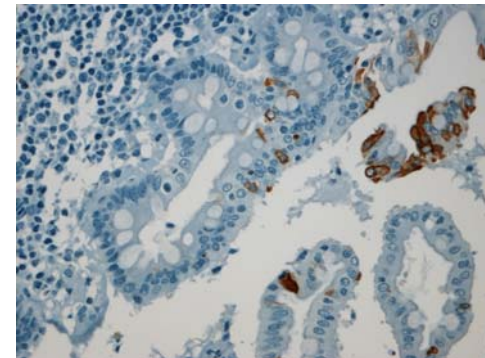


Figura 15: Positividade para K18 clivada em mucosacolorretal (200X)

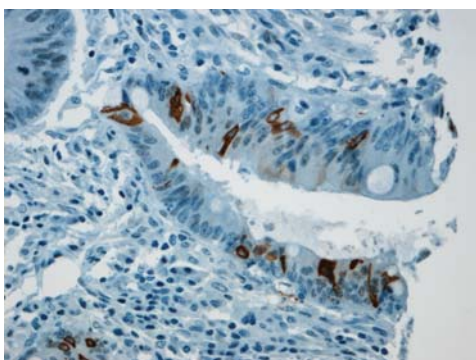


Figura 16: Positividade para K18 clivada em adenocarcinoma colorretal (200X)

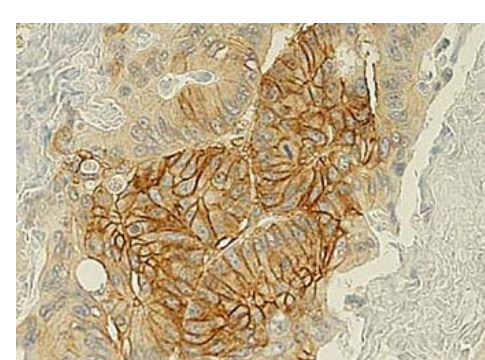


Figura 17: Positividade membranosa para MCT 1 em adenocarcinoma colorretal(400X)

7 DISTRIBUIÇÃO DAS IMUNOEXPRESSÕES DOS MARCADORES UTILIZADOS NOS ADENOCARCINOMAS PRIMÁRIOS DE ACORDO COM A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE METÁSTASE LINFONODAL OU HEPÁTICA

7.1 DISTRIBUIÇÃO DOS MARCADORES CONFORME PRESENÇA DE METÁSTASE LINFONODAL

A tabela 20 mostra a distribuição das imunoexpressões dos marcadores pesquisados nas amostras de adenocarcinoma primário de acordo com a presença ou ausência de metástase linfonodal.

Os achados mostram ausência de associação estatística significativa entre as imunoexpressões dos antígenos pesquisados e a presença de metástase linfonodal.

Tabela 20: Distribuição das imunoexpressões dos antígenos pesquisados nos adenocarcinomas primários de acordo com a presença ou ausência de metástase linfonodal

Variáveis	categoria	Metástase linfonodal		<i>p</i>
		Presença n (%)	Ausência n (%)	
Índice de apoptose	>1,5%	20 (42,6)	27 (57,4)	0,098
	≤ 1,5%	33 (58,9)	23 (41,1)	
Ki67	> 50%	28 (43,8)	36 (56,2)	0,154
	≤ 50%	35 (56,5)	27 (43,5)	
MCT 1 citoplasma	positivo	55 (50,9)	53 (49,1)	0,611
	negativo	8 (44,4)	10 (55,6)	
MCT 1 membrana	positivo	36 (55,4)	29 (44,6)	0,212
	negativo	27 (44,3)	34 (55,7)	
MCT 2 citoplasma	positivo	59 (50,0)	59 (50,0)	1,000
	negativo	4 (50,0)	4 (50,0)	
MCT 2 membrana	positivo	4 (57,1)	3 (42,9)	1,000
	negativo	59 (49,6)	60 (50,4)	
MCT 4 citoplasma	positivo	61 (50,4)	60 (49,6)	1,000
	negativo	2 (40,0)	3 (60,0)	
MCT 4 membrana	positivo	24 (50,0)	24 (50,0)	1,000
	negativo	39 (50,0)	39 (50,0)	
K 7	positivo	6 (60,0)	4 (40,0)	0,744
	negativo	58 (49,6)	59 (50,4)	
K 20	positivo	59 (48,0)	64 (52,0)	0,739
	negativo	5 (55,6)	4 (44,4)	

7.2 DISTRIBUIÇÃO DOS MARCADORES CONFORME PRESENÇA DE METÁSTASE HEPÁTICA

A tabela 21 mostra a distribuição das imunoexpressões dos marcadores pesquisados nas amostras de adenocarcinoma primário de acordo com a presença ou ausência de metástase hepática.

Tabela 21: Distribuição das imunoexpressões dos antígenos pesquisados nos adenocarcinomas primários de acordo com a presença ou ausência de metástase hepática

Variáveis	categoria	Metástase hepática		p
		Presença n (%)	Ausência n (%)	
Índice de apoptose	> 1,5%	26 (46,4)	30 (53,6)	0,050
	≤ 1,5%	13 (27,7)	34 (72,3)	
Ki67	> 50%	18 (41,9)	25 (58,1)	0,188
	≤ 50%	45 (54,2)	38 (45,8)	
MCT 1 citoplasma	positivo	32 (29,6)	76 (70,4)	0,588
	negativo	4 (22,2)	14 (77,8)	
MCT 1 membrana	positivo	20 (30,8)	45 (69,2)	0,573
	negativo	16 (26,2)	45 (73,8)	
MCT 2 citoplasma	positivo	34 (28,8)	84 (71,2)	1,000
	negativo	2 (25,0)	6 (75,0)	
MCT 2 membrana	positivo	2 (28,6)	5 (71,4)	1,000
	negativo	34 (28,6)	85 (71,4)	
MCT 4 citoplasma	positivo	36 (29,8)	85 (70,2)	0,320
	negativo	0 (0,0)	5 (100,0)	
MCT 4 membrana	positivo	18 (37,5)	30 (62,5)	0,082
	negativo	18 (23,1)	60 (76,9)	
K7	positivo	2 (20,0)	8 (80,0)	0,503
	negativo	38 (32,5)	79 (67,5)	
K 20	positivo	40 (32,5)	83 (67,5)	0,718
	negativo	2 (22,2)	7 (77,8)	

A análise revelou significância limítrofe entre maiores índices de células em apoptose e a presença de metástase hepática ($p=0,05$). Nenhum dos outros marcadores tiveram associação com a presença de metástase hepática.

8. RELAÇÃO ENTRE A IMUNO-EXPRESSÃO DOS TRANSPORTADORES DE MONOCARBOXILATO 1, 2 E 4 E A IMUNO-EXPRESSÃO DO ANTÍGENO KI-67 EM AMOSTRAS DE ADENOCARCINOMA PRIMÁRIO COLORRETAL

A tabela 22 mostra a distribuição das imunoexpressões membranosa e citoplasmática dos MCTs 1,2 e 4 nos carcinomas primários, de acordo com a taxa de células em proliferação ($\leq 50\%$ = baixo índice de proliferação e $> 50\%$ = alto índice).

Não houve associação estatisticamente significativa entre os padrões de imunoexpressão dos MCT 1,2 e 4 e a taxa de proliferação celular nos carcinomas colorretais primários.

Tabela 22: Distribuição das imunoexpressões dos MCTs nos carcinomas primários, de acordo com a taxa de proliferação celular

Marcadores	Categoria	Ag Ki-67		p
		> 50% n (%)	≤ 50% n (%)	
MCT 1 citoplasma	Positivo	53 (53,5)	46 (46,5)	0,328
	Negativo	6 (40,0)	9 (60,0)	
MCT1 membrana	Positivo	32 (55,5)	26 (44,5)	0,457
	Negativo	27 (48,2)	29 (51,8)	
MCT 2 citoplasma	Positivo	54 (50,5)	53 (49,5)	0,282
	Negativo	5 (71,4)	2 (28,6)	
MCT 2 membrana	Positivo	4 (57,1)	3 (42,9)	0,768
	Negativo	55 (51,4)	52 (48,6)	
MCT 4 citoplasma	Positivo	58 (52,7)	52 (47,3)	0,276
	Negativo	1 (25,0)	3 (75,0)	
MCT 4 membrana	positivo	24 (53,5)	21 (46,5)	0,785
	negativo	35 (50,7)	34 (49,3)	

9. RELAÇÃO ENTRE A IMUNO-EXPRESSÃO DOS TRANSPORTADORES DE MONOCARBOXILATO 1, 2 E 4 E O ÍNDICE DE CÉLULAS EM APOPTOSE (IA) EM AMOSTRAS DE ADENOCARCINOMA PRIMÁRIO COLORRETAL

A tabela 23 mostra a associação entre as imunoexpressões citoplasmática e membranosa dos antígenos dos transportadores de monocarboxilato (MCT) com o índice de células em apoptose nas amostras de adenocarcinoma primário.

Tabela 23- Associação entre as imunoexpressões citoplasmática e membranosa dos MCTs 1,2 e 4 com o índice de células em apoptose nas amostras de adenocarcinoma primário

Marcadores	Categoria	Índice de Apoptose		
		N (%)	média	p
MCT 1 citoplasma	Positivo	80 (84,2)	3,071	0,327
	Negativo	15 (15,8)	2,347	
MCT1 membrana	Positivo	44 (46,3)	3,664	0,010
	Negativo	51 (53,7)	2,347	
MCT 2 citoplasma	Positivo	88 (92,6)	3,064	0,864
	Negativo	7 (7,3)	1,614	
MCT 2 membrana	Positivo	6 (6,3)	1,233	0,426
	Negativo	89 (93,7)	3,073	
MCT 4 citoplasma	Positivo	92 (96,8)	3,000	0,912
	Negativo	3 (3,2)	1,633	
MCT 4 membrana	positivo	37 (38,9)	2,630	0,852
	negativo	58 (61,1)	3,166	

As amostras de adenocarcinoma primário com positividade para MCT 1 em membrana apresentaram índices de apoptose significativamente mais elevados ($p=0,010$), o mesmo não ocorrendo com a imunexpressão citoplasmática do MCT 1.

Não foi detectada associação significativa entre os padrões de expressão citoplasmática ou de membrana de MCT 2 e de MCT 4 com o índice de apoptose.

10. RELAÇÃO ENTRE O ÍNDICE DE CÉLULAS EM APOPTOSE NOS CARCINOMAS PRIMÁRIOS E AS IMUNOEXPRESSÕES DAS QUERATINAS 7 E 20

A tabela 24 mostra a pesquisa da associação entre o índice de células em apoptose e a imunexpressão das queratinas 7 e 20 nos adenocarcinomas primários colorretais.

Tabela 24: Índice de células em apoptose nos carcinomas colorretais primários, de acordo com a imunexpressão das queratinas 7 e 20

Marcadores	Categoria	Índice de Apoptose		
		N (%)	mediana	p
K7	Positivo	9 (9,3)	2,000	0,589
	Negativo	87 (90,6)	1,500	
K20	Positivo	95 (92,2)	1,500	0,237
	Negativo	8 (7,8)	0,850	

A mediana do IA foi maior nos carcinomas positivos para queratina 7 em relação àqueles que não expressaram a queratina 7. O mesmo ocorreu em relação aos tumores que expressaram a K 20. Mesmo com as medianas tão diferentes,

principalmente em relação à K20, não houve diferença estatística significativa entre o IA nos adenocarcinomas primários de acordo com a imunopressão das K7 e K20.

11. RELAÇÃO ENTRE A IMUNO-EXPRESSÃO DO ANTÍGENO KI-67 E A IMUNOEXPRESSÃO DAS QUERATINAS 7 E 20 NOS ADENOCARCINOMAS PRIMÁRIOS

A tabela 25 mostra a distribuição dos adenocarcinomas colorretais primários de acordo com o índice de proliferação celular e a imunopressão das queratinas 7 e 20.

Tabela 25: Distribuição dos adenocarcinomas primários de acordo com o índice de proliferação celular e as imunopressões das queratinas 7 e 20

Marcadores	Categoria	Ag Ki-67		P
		> 50% n (%)	≤ 50% n (%)	
K7	Positivo	90 (90,0)	1 (10,0)	0,287
	Negativo	77 (72,0)	30 (28,0)	
K20	Positivo	86 (75,4)	28 (24,6)	0,690
	Negativo	6 (66,7)	3 (33,3)	

Não observamos associação estatística entre o índice de proliferação celular e os padrões de imunopressão das K7 e K20.

12. ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA UNIVARIADA UTILIZANDO AS VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS E A IMUNOEXPRESSÃO DOS MARCADORES UTILIZADOS COMO POSSÍVEIS FATORES ASSOCIADOS À PRESENÇA DE METÁSTASE LINFONODAL

A tabela 26 mostra a análise univariada de todas as variáveis anatomopatológicas e das imunorexpressões dos marcadores pesquisados, nos tumores primários, em relação à presença de metástase linfonodal.

O aumento da frequência de metástase linfonodal se associou estatisticamente à presença das seguintes variáveis anatomopatológicas:

- 1- Infiltração tumoral além da camada muscular ($p=0,001$)
- 2- Presença de invasão linfática tumoral ($p<0,001$)
- 3- Presença de infiltração vascular tumoral ($p<0,001$)
- 4- Presença de infiltração tumoral perineural ($p<0,001$)
- 5- Presença de metástase hepática ($p=0,003$)

A localização do tumor no cólon direito ($p=0,058$) e a presença de bordas tumorais infiltrativas ($p=0,051$) foram variáveis anatomopatológicas que exibiram forte tendência a significância estatística para se associarem à presença de metástase linfonodal.

Tabela 26: Resultados da análise de regressão logística univariada para a presença de metástase linfonodal

Variáveis	categoria	metástase linfonodal		
		OR	IC _(95%)	p
Tamanho	> 5 cm	1,4	0,74 – 2,84	0,272
	≤ 5 cm	1,0		
Localização	cólon direito	1,0	0,14 – 1,03	0,058
	cólon esquerdo	0,4		
Tipo macroscópico	exofítico	1,0	0,81 – 4,37	0,136
	úlceroinfiltrativo	1,9		
Comprometimento da serosa	presente	0,3	0,62 – 1,63	0,171
	ausente	1,0		
Tipo histológico	adenocarcinoma SOE	1,0	0,32 – 2,98	0,977
	carcinoma mucinoso	0,9		
Grau histológico	alto grau	0,5	0,53 – 3,78	0,481
	baixo grau	1,0		
Profundidade de infiltração	T3+T4	5,7	2,00 – 16,15	0,001
	T1+T2	1,0		
Infiltrado linfocitário tumoral	intenso	1,2	0,27 – 2,26	0,394
	discreto/moderado	0,2		
	ausente	1,0		
Borda tumoral	Infiltrativa	1,9	0,99 – 3,84	0,051
	Expansiva	1,0		
Desmoplasia	moderada e acentuada	2,2	1,01 – 5,04	0,046
	ausente e leve	1,0		
Infiltração linfática	presente	14,5	6,39 – 33,06	<0,001
	ausente	1,0		
Infiltração vascular	presente	6,6	2,91 – 14,99	<0,001
	ausente	1,0		

Continua...

Conclusão Tabela 26

Variáveis	categoria	metástase linfonodal		
		OR	IC (95%)	p
Infiltração perineural	presente	5,0	2,15 – 11,65	<0,001
	ausente	1,0		
Metástase hepática	presente	3,2	1,50 – 6,95	0,003
	ausente	1,0		
Índice de apoptose	> 1,5%	0,5	0,23 – 1,13	0,099
	≤ 1,5%	1,0		
ki-67	≥ 50%	1,2	0,55-2,76	0,608
	< 50%	1,0		
MCT 1 citoplasma	positivo	1,3	0,47 – 3,53	0,611
	negativo	1,0		
MCT 1 membrana	positivo	1,5	0,77 – 3,15	0,213
	negativo	1,0		
MCT 2 citoplasma	positivo	1,0	0,23 – 4,18	1,000
	negativo	1,0		
MCT 2 membrana	positivo	1,3	0,29 – 6,32	0,698
	negativo	1,0		
MCT 4 citoplasma	positivo	1,5	0,24 – 9,45	0,650
	negativo	1,0		
MCT 4 membrana	positivo	1,0	0,48 – 2,05	1,000
	negativo	1,0		
K7	positivo	1,53	0,41-5,69	0,529
	negativo	1,0		
K20	positivo	0,74	0,19 – 2,88	0,661
	negativo	1,0		

13. ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA MULTIVARIADA UTILIZANDO AS VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS E A IMUNOEXPRESSÃO DOS MARCADORES UTILIZADOS COMO POSSÍVEIS FATORES ASSOCIADOS À PRESENÇA DE METÁSTASE LINFONODAL

A tabela 27 mostra o resultado da análise de regressão logística multivariada das variáveis histológicas e das imunopressões dos marcadores pesquisados, nos adenocarcinomas primários, para a presença de metástase linfonodal.

Tabela 27: Resultados da análise de regressão logística multivariada para a presença de metástase linfonodal

		METÁSTASE LINFONODAL		
variável	categoria	OR	IC _(95%)	P
Infiltração linfática	presente	9,4	3,74 - 23,58	<0,001
	ausente	1,0		
Infiltração vascular	presente	2,7	1,02 - 7,41	0,046
	ausente	1,0		
Profundidade tumoral	T3+T4	1,57	0,47 - 5,18	0,459
	T1+T2	1,0		
Localização do tumor	Cólon E	0,37	0,47 - 5,18	0,374
	Cólon D	1,0		

A análise de regressão logística multivariada revelou que a presença de infiltração linfática ($p < 0,001$) e a presença de infiltração vascular tumoral ($p = 0,046$) são fatores de risco independentes para a ocorrência de metástase linfonodal nos carcinomas colorretais.

14. ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA UNIVARIADA UTILIZANDO AS VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS E A IMUNOEXPRESSÃO DOS MARCADORES UTILIZADOS COMO POSSÍVEIS FATORES ASSOCIADOS À PRESENÇA DE METÁSTASE HEPÁTICA

A tabela 28 mostra os resultados das análises de regressão logística univariada das variáveis anatomopatológicas e das imunorexpressões dos marcadores pesquisados para a presença de metástase hepática.

A análise de regressão logística univariada dos achados anatomopatológicos e das imuno-expressões dos marcadores pesquisados em relação com a presença de metástase hepática revelou que o aumento da frequência de metástase hepática esta associado à presença dos seguintes achados no adenocarcinoma primário:

- 1- Maior profundidade de invasão tumoral ($p=0,012$).
- 2- Presença de borda tumoral infiltrativa ($p= 0,012$).
- 3- Presença de metástase linfonodal ($p=0,004$).

Houve tendência a associação estatística entre a presença de metástase hepática e os seguintes achados:

- 1- Infiltração tumoral da serosa ($p=0,063$)
- 2- Menor índice de células em apoptose. ($p=0,053$).
- 3- Imunoexpressão membranosa do MCT 4 ($p=0,08$).

Todas as outras variáveis pesquisadas não se associaram estatisticamente com a presença de metástase hepática.

Tabela 28: Resultados da análise de regressão logística univariada para a presença de metástase hepática

variáveis	categoria	metástase hepática		
		OR	IC (95%)	p
Tamanho	≥ 5 cm	0,8	0,40 – 1,70	0,613
	< 5 cm	1,0		
Localização	cólon direito	1,0	0,30 – 2,20	0,694
	cólon esquerdo	0,8		
Tipo Macroscópico	exofítico	1,0	0,50 – 3,00	0,661
	úlcero-infiltrativo	1,2		
Comprometimento da serosa	presente	4,1	0,92 – 17,92	0,063
	ausente	1,0		
Tipo histológico	adenocarcinoma	1,0	0,07 – 1,56	0,163
	mucinoso	0,3		
Grau histológico	baixo grau	1,0	0,10 – 1,36	0,136
	alto grau	0,4		
Profundidade de infiltração	T3+T4	6,9	1,53 - 30,39	0,012
	T1+T2	1,0		
Infiltrado inflamatório	intenso	2,0	0,78-51,59	0,595
	leve/moderado	1,8		
	ausente	1,0		
Borda tumoral	Infiltrativa	2,6	1,24 – 5,63	0,012
	expansiva	1,0		
Desmoplasia	moderada/acentuada	1,62	0,67 – 3,95	0,285
	ausente / leve	1,0		
Infiltração linfática	presente	1,5	0,75 – 3,21	0,231
	ausente	1,0		

Continua...

Conclusão Tabela 28

variáveis	categoria	metástase hepática		
		OR	IC (95%)	p
Infiltração perineural	presente	0,8	0,38 – 1,89	0,664
	ausente	1,0		
Infiltração vascular	presente	1,4	0,68 – 3,04	0,341
	ausente	1,0		
Metástase linfonodal	presente	3,1	1,44 – 6,71	0,004
	ausente	1,0		
Índice apoptótico	> 1,5	0,4	0,19 – 1,00	0,053
	≤ 1,5	1,0		
Ki-67	> 50%	0,82	0,36-1,90	0,642
	≤ 50%	1,0		
MCT 1 citoplasma	positivo	1,5	0,45 – 4,80	0,521
	negativo	1,0		
MCT 1 membrana	positivo	1,2	0,57 – 2,71	0,573
	negativo	1,0		
MCT 2 citoplasma	positivo	1,2	0,23 – 6,31	0,818
	negativo	1,0		
MCT 2 membrana	positivo	1,0	0,18 – 5,40	1,000
	negativo	1,0		
MCT 4 citoplasma	positivo	*	*	0,999
	negativo	*		
MCT 4 membrana	positivo	2,0	0,91 – 4,39	0,084
	negativo	1,0		
K7	positivo	0,52	0,10 – 2,56	0,422
	negativo	1,0		
K20	positivo	1,68	0,33 – 8,49	0,526
	negativo	1,0		

* análise inválida.

15. ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA MULTIVARIADA UTILIZANDO AS VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS E A IMUNOEXPRESSÃO DOS MARCADORES UTILIZADOS COMO POSSÍVEIS FATORES ASSOCIADOS À PRESENÇA DE METÁSTASE HEPÁTICA

A tabela 29 mostra o resultado da análise de regressão logística multivariada para a presença de metástase hepática.

Tabela 29 – Resultados da análise de regressão logística multivariada para a presença de metástase hepática.

variável	categoria	METÁSTASE HEPÁTICA		
		OR	IC _(95%)	P
Profundidade tumoral	T3+T4	8,9	1,07 – 74,01	0,043
	T1+T2	1,0		
Borda tumoral	infiltrativa	2,5	1,03 – 6,26	0,042
	expansiva	1,0		
Índice apoptótico	>1,5	0,4	0,17 – 1,03	0,061
	≤ 1,5	1,0		
Comprom. da serosa	presente	0,3	0,57 – 1,98	0,229
	ausente	1,0		

A análise de regressão logística multivariada revelou que a infiltração tumoral além da camada muscular ($p=0,043$) e a presença de borda tumoral infiltrativa ($p=0,042$) são fatores independentes associados à ocorrência de metástase hepática nos carcinomas colorretais.

DISCUSSÃO

No presente estudo exploramos alguns aspectos histopatológicos envolvidos na presença de metástase hepática e linfonodal dos carcinomas colorretais.

Também avaliamos o perfil de expressão das queratinas 7 e 20 buscando alterações desses importantes componentes do citoesqueleto na neoplasia primária e metastática.

Em especial, avaliamos relações entre a imuno-expressão dos transportadores de monocarboxilatos (indutores de variações de pH intracelular), índice de apoptose pela detecção de queratina 18 clivada e de reatividade ao antígeno Ki-67, relacionando a proliferação celular, e seus reflexos na metastatização hepática e linfonodal.

Ao final, selecionamos as variáveis histopatológicas e de imunoexpressão dos marcadores pesquisados que fossem preditivas para a ocorrência de metástase linfonodal e hepática.

1. IMPORTÂNCIA DAS VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS NA METASTATIZAÇÃO PARA LINFONODOS

O sistema de estadiamento TNM para os carcinomas colorretais classifica como carcinoma *in situ* (pTis) os carcinomas que infiltram até a muscular da mucosa, mas não além dela, devido a ausência de potencial metastático decorrente da inexistência de uma

rede de vasos linfáticos nessa região (132) Ao transpor a muscular da mucosa, o tumor atinge um ambiente que tem uma rede de vasos linfáticos que reconhecidamente é a primeira via por onde as células tumorais precisam percorrer para atingirem os linfonodos regionais (4). No presente estudo, a presença de infiltração tumoral além da camada muscular própria (T3+T4) mostrou-se associada estatisticamente com a ocorrência de metástase linfonodal ($p < 0,001$). A maior profundidade de infiltração do tumor na parede do colorreto aumenta a área de contato entre o tumor e estroma onde existe uma ampla rede de vasos linfáticos, facilitando assim a ocorrência de metástase linfonodal. Dentre vários estudos anteriormente demonstrando esta esperada associação, Yashida et al (133) verificaram que a profundidade de invasão tumoral tem impacto na sobrevida : Os tumores que infiltravam além de 4 micrômetros da camada muscular própria tiveram menor sobrevida e menor tempo livre de doença, tanto através de análise uni como multivariada.

Os achados da associação estatística entre a presença de infiltração de vasos linfáticos e de vasos sanguíneos com a presença de metástase linfonodal (ambas com $p < 0,001$) reforçam as observações amplamente reportadas na literatura (8, 10, 12, 14, 20, 21, 25). Pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais as células tumorais conseguem entrar no sistema linfático. Alguns investigadores sugerem que os vasos linfáticos têm um papel passivo na infiltração das células tumorais em linfáticos pré-existent. Opostamente, outros sugeriram que a linfangiogênese (formação de novos vasos linfáticos associados ao tumor) desempenha um papel ativo na disseminação metastática (134).

A ocorrência de metástase linfonodal é um fator essencial no estadiamento, importante indicador de prognóstico desfavorável e é um dos critérios para a seleção

do tratamento dos carcinomas (135), por isso as variáveis histológicas associadas a esse evento como profundidade de infiltração tumoral, a presença de infiltração de vasos linfáticos e sanguíneos devem constar obrigatoriamente nos laudos histopatológicos dos espécimes de ressecção de carcinomas colorretais (8, 24).

A fibrose peritumoral, ou desmoplasia reflete a reação do estroma à presença da infiltração da neoplasia. Seu papel como fator prognóstico no carcinoma colorretal não é bastante estudado. Na nossa casuística, a presença de desmoplasia moderada e acentuada associou-se estatisticamente à ocorrência de metástase linfonodal ($p=0,043$). Esse achado corrobora dois importantes estudos anteriores, o primeiro publicado por Halvorsein & Seim (32), utilizando uma casuística de 527 CCRs onde verificaram uma associação entre a presença de desmoplasia acentuada e o estadió avançado do tumor, sendo a desmoplasia fator independente de pior prognóstico. Outro estudo, publicado por Shepherd et al (22), abordando a importância do comprometimento da serosa no prognóstico dos CCRs, não encontrou associação entre a desmoplasia e o envolvimento peritoneal, porém encontrou associação entre a presença de desmoplasia acentuada e menor sobrevida.

2. IMPORTÂNCIA DAS VARIÁVEIS HISTOLÓGICAS NA METASTATIZAÇÃO PARA O FÍGADO

A presença de metástase hepática estratifica o CCR como estadió IV do sistema TNM/AJCC, conferindo uma sobrevida de 5 anos para apenas 8% desses pacientes (136).

Na presente casuística, verificamos que a infiltração tumoral além da muscular própria (T3+T4) associou-se estatisticamente à presença de metástase hepática. A maior profundidade de infiltração do tumor aumenta a chance do tumor encontrar uma veia na rota de infiltração e a transposição da parede venosa pelo tumor faz com que as células tumorais entrem em contato com o lúmen vascular, onde existe uma pressão que leva o próprio sangue ao sistema portal e conseqüentemente ao fígado. Após a entrada das células tumorais na corrente sanguínea, estas devem superar as adversidades impostas pelo sistema imunológico para que possam continuar viáveis e se implantar no sítio metastático. Quanto maior o tumor, maior a chance de haver mutações genéticas (95) que podem alterar a síntese de proteínas relacionadas à adesão célula-célula, como as caderinas, e àquelas relacionadas à interação célula - matriz, como as integrinas, selecionando assim grupos celulares mais aptos para se implantar no sítio metastático distante (137).

Na presente casuística o comprometimento da serosa não se associou à presença de metástase hepática. As possíveis explicações para a ausência de associação são: 1) Somente 8 casos (5,8%) exibiram comprometimento da serosa e 2) A serosa reveste o cólon, e não o reto, este último foi o sítio primário em 71 tumores aqui estudados, representando 53% da casuística.

A avaliação das bordas tumorais como infiltrativa e expansiva foi primeiramente descrita por Jass et al (138) e parece ser um fator prognóstico independente do estadio do tumor. Mesmo não sendo um critério com definição precisa, a avaliação da borda tumoral infiltrativa mostrou ser concordante entre 70% dos patologistas e, essa concordância aumentou para 90% quando critérios diagnósticos melhor definidos, conforme já mencionados na INTRODUÇÃO do

presente trabalho foram empregados (139). No presente estudo, à semelhança com estudos publicados até o momento (140, 141), houve associação estatística entre o encontro de borda tumoral infiltrativa e a presença de metástase hepática ($p=0,005$).

3. QUERATINAS E CARCINOMA COLORRETAL

O estudo de queratinas na presente pesquisa tem por base a presença de alguns relatos desafiando o conceito mais comum de que a imunoexpressão desses filamentos intermediários é mantida ao longo da transformação e da progressão da carcinogênese colorretal e que tem motivado seu uso na identificação de origem de adenocarcinomas primeiramente diagnosticados em metástases (142). O conceito mais comum é a associação entre achados de reações positivas para K20 e negativa para K7 como característica de origem colorretal (45, 142-144).

3.1 QUERATINA 7

A queratina 7 é uma queratina de ponto isoelétrico relativamente elevado (básico) frequentemente expressa em epitélios simples de ácinos e ductos glandulares. Nas amostras de tecido colorretal aqui estudadas, encontramos imunoexpressão da K7 em 11 das 127 amostras (8,7%). Diante do conceito clássico de escassez de expressão da K7 na mucosa normal colorretal (145, 146) a literatura não tem se voltado a muitos estudos a este respeito. Até o rigoroso trabalho

publicado publicado por Chu & Weiss (42) sobre a expressão das queratinas em tecidos humanos e neoplasias somente refere que a K7 pode ser expressa no epitélio gastrointestinal, mas que tal reação resulta geralmente negativa. Mais ainda, baseado numa definição extrema de positividade (somente casos difusamente corados foram considerados como positivos), Hernandez et al (55) não encontraram nenhuma amostra de mucosa positiva para K7 em seu estudo de base populacional sobre a expressão de K7 e K20 em câncer colorretal.

O presente estudo traz resultados divergentes, até porque valorizamos como positivos os casos onde mais de 5% das células exibiram imunomarcção para a K7. Zhang et al (53) estudando a imunoreatividade da K7 em carcinomas retais, também utilizando como critério de positividade a imunoexpressão da K7 em mais de 5% das células, encontraram positividade em 9 das 18 amostras de mucosa retal (50%).

Já com relação às neoplasias, encontramos aqui expressão da K7 em 10 dos 127 carcinomas colorretais estudados (7,5%), mais aproximada aos achados de Hernandez et al (55) que encontraram positividade para K7 em 28 dos 263 CCRs estudados (11%) e com os de Chu & Weiss (42) que reportaram positividade para K7 em 109 dos 406 CCRs estudados (27%). Yu et al (54) reportaram a positividade de imunoexpressão da K7 em 37% dos casos de carcinoma colônico e em 42,3% dos carcinomas retais.

Das 68 metástases linfonodais estudadas, em 9 (6,8%) encontramos imunomarcção para a K7. Mesmo não tendo encontrado na literatura um trabalho que comparasse a imunoexpressão da K7 entre os CCRs e suas respectivas metástases linfonodais, a porcentagem de casos positivos foi muito próxima daquela encontrada nos carcinomas colorretais primários, não havendo diferença estatística significativa entre a expressão da K7 entre as amostras de casos pareados ($p=0,557$).

Intrigante achado do presente estudo foi a positividade para K7 em dezesseis dentre 42 metástases hepáticas (38,1%), significativamente superior que a encontrada na mucosa normal (8,7%), nos CCRs primários (7,5%) e nas metástases linfonodais (6,8%). Tibor Tot (144) em seu estudo sobre a relevância da imunexpressão das K7 e K20 nas metástases hepáticas verificou que 10% das metástases hepáticas de CCRs expressaram K7. Vale lembrar que nosso estudo é, dentre os citados, o primeiro a usar polímero curto de dextran + peroxidase como sistema de revelação da reação imuno-histoquímica, que, além de evitar indesejável coloração de fundo decorrente da interação de biotina endógena com a avidina (ou streptavidina) do reagente, promove maior amplificação da reação imuno-histoquímica genuína (147).

A relativa freqüência da imuno-reatividade da K7 em metástases hepáticas de CCRs aqui encontrada traz, de uma parte, a necessidade de experimentos futuros que busquem possíveis mecanismos responsáveis por tal modificação neste importante filamento intermediário, o que poderá contribuir no entendimento de mudanças celulares que favoreçam a metastatização. A ausência de associação entre a imunoreatividade da K7 e as variáveis anatomopatológicas dos carcinomas colorretais primários já era esperada, uma vez que esta é um filamento intermediário e, assim sendo tem papel estrutural na célula. A ausência de associação com o perfil de expressão dos transportadores de monocarboxilatos não favorece, nestas evidências preliminares que oferece o presente estudo, eventual relação do pH intracelular com a expressão anômala de queratina 7. Outras vias celulares deverão portanto ser motivo de estudos futuros visando ao esclarecimento deste desvio potencialmente relevante.

Sob o ponto de vista da prática diagnóstica, a expressão da K7 em metástases hepáticas de adenocarcinomas colorretais encontrada em vários de nossos casos deve ser sempre lembrada pelo patologista ao avaliar uma amostra de tecido hepático com informes acerca do desconhecimento do sítio primário da neoplasia, pois, como encontramos nesta pesquisa, a positividade para K7 não exclui a possibilidade de tratar-se de neoplasia com sítio primário no colorreto.

3.2 QUERATINA 20

A queratina 20 é um filamento intermediário de ponto isoelétrico relativamente baixo (ácido), descoberta por Moll et al em 1991 cuja expressão é praticamente restrita ao epitélio gástrico e intestinal, urotélio e células de Merkel (44). Desde a sua descoberta, o anticorpo anti K20 vem sendo amplamente utilizado na prática diária de patologistas do mundo inteiro na determinação do sítio primário em tumores metastáticos (42, 44, 55, 143, 144, 148-151). Na nossa casuística, encontramos imunopositividade da K20 em mais de 90% das amostras de mucosa normal, carcinoma primário, metástases linfonodal e hepática, mostrando a relativa estabilidade de expressão no epitélio colorretal normal e metastático. Esse achado mais uma vez mostra a importância da K20 como ferramenta no diagnóstico de neoplasias de origem colorretal. Tal positividade para K20 na quase totalidade de casos responde pela ausência de associação deste fator com qualquer variável histopatológica estudada.

4 ANTÍGENO KI-67

O processo de diferenciação na mucosa colônica humana tem uma organização espacial relativamente simples dentro da cripta. As células que estão se dividindo normalmente são restritas ao terço profundo da cripta, local este conhecido como compartimento proliferativo da mucosa colônica. A migração das células da porção mais profunda das criptas para a superfície é acompanhada por uma alteração no padrão de síntese e secreção de enzimas, glicoproteínas e mucinas. A porção superior das criptas é designada de compartimento de maturação ou zona funcional. Estudos autoradiográficos já bem demonstraram que a completa renovação celular ocorre de 3 a 5 dias, com as células completamente maduras sofrendo exfoliação na superfície mucosa (152).

No presente estudo, usando a imunodeteção do antígeno Ki-67 como marcador de células em proliferação, obtivemos baixa taxa de proliferação em 123 das 124 amostras de cólon não neoplásico analisadas (99,2%), contrastando com índices elevados (> 50%) em 49,2% dos adenocarcinomas ($p < 0,001$). Tal achado é plenamente esperado, pois o amplo conhecimento biológico justifica que as neoplasias são crescimentos desordenados, com taxas de proliferação altas o suficiente para ser maior que a taxa de apoptose, contribuindo para o crescimento da massa tumoral. Diversos trabalhos, como os de Backus et al e de Koornstra et al (3, 95) mostraram taxas proliferativas mais elevadas nas amostras de carcinomas primários que nas mucosas normais.

Não encontramos diferença entre as taxas de proliferação dos adenocarcinomas primários e suas respectivas metástases linfonodais e hepáticas.

Nanashima et al (153) também não encontraram diferença estatística entre os índices de proliferação dos adenocarcinomas colorretais primários e suas respectivas metástases hepáticas, todas essas condições sabidamente associadas a índices elevados de células em proliferação. De outra parte, Tatebe et al (97) encontraram diferença estatística significativa entre o índice de proliferação dos carcinomas primários e as metástases linfonodais e hepáticas, mas não entre os índices proliferativos das metástases linfonodal e hepática. Esses achados são conflitantes com os resultados aqui obtidos, porque não encontramos diferença estatística entre a taxa de proliferação dos tumores primários e as suas respectivas metástases linfonodais e/ou hepáticas. Backus et al (3) reportaram taxa de proliferação maior na metástase hepática que no tumor primário, utilizando apenas 8 amostras pareadas de tecido congelado. O fato da utilização de tecido congelado e de uma pequena amostra de casos (oito) já são variáveis que podem explicar a diferença de seus resultados com os aqui apresentados.

Para dar maior confiabilidade nos resultados optamos por parear as amostras, excluindo assim a interferência no número diferente entre as amostras comparadas, o que não foi reportado no trabalho de Tatebe et al (97).. Nos trabalhos de Nanashima et al (153) e Tatebe et al (97) foram contadas pelo menos mil células para determinar o índice de células em proliferação, encontrando resultados divergentes, já Backus et al (3) semiquantificaram em quartis a porcentagem de células em proliferação, encontrando o mesmo resultado de Tatebe et al (97), ou seja, maior atividade proliferativa nas metástases linfonodais e hepáticas que nos adenocarcinomas primários.

É preciso entretanto reconhecer que numerosos fatores pré analíticos e analíticos impedem que, mesmo contagens de numerosas células, atinjam a precisão esperada. É nossa expectativa que estudos futuros com colheita prospectiva de amostras, submetidas a protocolos laboratoriais rígidos e quantificados por instrumentos ópticos e softwares de análise de imagem que aparentemente chegam agora ao estado de maturidade, possam se comprovar precisos o suficiente para validar tais análises quantitativas, tanto em relação à proliferação celular quanto à apoptose.

5. ÍNDICE DE CÉLULAS EM APOPTOSE

O principal mecanismo fisiológico envolvido na morte das células epiteliais colônicas é a apoptose. A frequência de células em apoptose em muitos estudos foi correlacionada linearmente com o índice de proliferação celular, porém não somente a proliferação celular está envolvida no evento apoptose, mas também a presença de alterações genéticas (95). É sabido que durante a seqüência adenoma-carcinoma há um acúmulo de alterações genéticas. Como o dano no DNA pode ativar a indução da apoptose, devemos esperar que nos tumores ocorra maiores taxas de apoptose (154). No presente estudo, encontramos índice apoptótico mais elevado nas amostras de tumor que nas amostras de mucosa normal. Não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os índices de apoptose (IA) das metástases linfonodais e hepáticas e entre os adenocarcinomas primários e as metástases

linfonodais, entretanto nas metástases hepáticas o IA foi maior que nas amostras de adenocarcinoma primário. A literatura mostra resultados controversos em relação ao IA dos adenocarcinomas primários e suas respectivas metástases hepáticas. Backus et al (3) encontraram IA menor nas metástases hepáticas que nos adenocarcinomas primários, utilizando o anticorpo M30 (anti-queratina 18 clivada), enquanto Tatebe et al (97) encontraram IA mais elevado nas metástases linfonodais e hepáticas que nos adenocarcinomas primários utilizando a técnica TUNEL. Os nossos resultados são similares aos de estudos anteriores, demonstrando o aumento da frequência de apoptose em amostras tumorais em relação à mucosa normal, demonstrando, juntamente com a maior taxa proliferativa, um estado hiperdinâmico na neoplasia. Consideramos, ainda, que fatores locais no fígado podem contribuir para que ocorra mais apoptose na metástase que nos tumores primários e tal aspecto deve motivar estudos futuros .

Não encontramos na literatura nenhum trabalho associando o aumento do número de células em apoptose nos adenocarcinomas colorretais de acordo com o tamanho do tumor, porém no presente trabalho, os adenocarcinomas primários com mais de 5 cm tiveram índices de células em apoptose maiores que aqueles com até 5 cm. Koornstra et al (95) encontraram associação estatística significativa entre o maior número de células em apoptose nos adenomas com 10 milímetros ou mais, porém não avaliaram a associação entre o IA e o tamanho dos adenocarcinomas colorretais primários.

6. PESQUISA DA IMUNOEXPRESSIONÃO DAS MOLÉCULAS REGULATÓRIAS DO PH INTRACELULAR (TRANSPORTADORES DE MONOCARBOXILATO 1, 2 E 4) NOS CARCINOMAS COLORRETAIS E SUA RELAÇÃO COM A TAXA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE EM AMOSTRAS DE ADENOCARCINOMA PRIMÁRIO COLORRETAL

Recentemente, utilizando a casuística aqui estudada, em uma grandiosa parceria com os pesquisadores da Universidade do Porto e do Minho, demonstramos o aumento da expressão de MCT1, MCT2 e MCT4 nas células tumorais dos CCRs, quando comparados com a mucosa normal e também demonstramos que há um aumento da imunoexpressão membranosa do MCT1 e MCT4 e perda da imunoexpressão membranosa do MCT2 nas células tumorais (130). Esse trabalho encontra-se no **Apêndice**. Os nossos resultados foram conflitantes aos encontrados por Lambert et al (155) que evidenciaram uma redução da expressão da proteína MCT1 durante a transição da normalidade para a malignidade nos tecidos colônicos.

No presente estudo, detectamos que as isoformas 1 e 4 continuaram a mostrar maior frequência mesmo quando o estudo foi feito em pares de amostras (neoplásica vs não-neoplásica) do mesmo paciente ($p < 0,001$). Importa salientar que essa diferença estatística foi mantida quando avaliamos separadamente as imunoexpressões citoplasmática e membranosa. Análises experimentais demonstram que na membrana citoplasmática os MCTs exercem seu papel de transportar monocarboxilatos, como o ácido láctico, para o meio extracelular. O aumento da expressão citoplasmática dos MCTs é uma evidência indireta que a célula está

sintetizando moléculas que ainda não atingiram a localização membranosa para exercerem suas funções metabólicas. Outra interpretação possível, que requer estudos futuros para sua comprovação, seria que o acúmulo citoplasmático poderia decorrer de desvios no transporte dos MCTs de seu local de síntese para seu sítio ideal de ação, a membrana celular.

A associação estatística significativa entre a imunoe expressão do MCT 1 na membrana de células de tumores onde foi observada a presença de infiltração linfática ($p=0,004$) e naqueles que exibiram infiltração venosa ($p=0,018$) são dados que chamam a atenção para a possível associação da mais frequente imunoe expressão membranosa do MCT 1 nos tumores com comportamento biológico mais agressivo. Estudos futuros devem abordar a imunoe expressão do MCT 1 em CCRs com seguimento clínico adequado para avaliação da relação da imunoe expressão de tal transportador com a sobrevida dos pacientes.

A tomografia com emissão de pósitrons acoplados com fluordeoxiglicose (PET) é um exame que vem mostrando ser muito útil na detecção de cânceres pois estes exibem um grande influxo de glicose quando comparado com o tecido normal (156). No ambiente colorretal, tal exame também é útil na distinção entre adenomas e carcinomas invasivos, cujo influxo de glicose é muito mais elevado (157). Como há um aumento da glicólise anaeróbica, conseqüentemente há uma maior produção de íons H^+ , forçando assim com que as células tumorais sejam mais resistentes à acidose que as células não tumorais, o que por si só é uma vantagem na competição pela sobrevivência em comparação com as células não tumorais vizinhas. Gatenby et al (158) propuseram uma hipótese de invasão tumoral mediada pela acidose que tem os seguintes componentes :

- 1- O aumento da glicólise nas neoplasias altera o microambiente, reduzindo substancialmente o pH extracelular.
- 2- Os ions H^+ produzidos pelo tumor difundem-se ao longo de gradientes de concentração para os tecidos normais.
- 3- A acidificação do meio extracelular do ambiente peritumoral é vantajosa para o tumor porque:
 - Induz a célula normal a morrer por necrose ou apoptose, produzindo um espaço em potencial no qual a célula tumoral pode proliferar.
 - A acidose extracelular também promove a angiogênese, através da liberação de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e interleucina-8 induzidos pela acidez.
 - A acidose inibe a resposta imune a antígenos tumorais.

Naquele mesmo trabalho, Gatenby et al (158) referem que as células tumorais sobrevivem e proliferam num pH extracelular inferior que o das células normais provavelmente devido ao aumento da expressão dos transportadores H^+ . O achado da hiperexpressão membranosa do MCT1 nas amostras tumorais que se associaram com fatores adversos como infiltração linfática e venosa é concordante com as observações de Gatenby et al, pois o aumento da expressão membranosa do MCT1 pode conferir à célula um maior controle do pH, diminuindo as chances de morrer por apoptose, aumentando o efluxo de H^+ , com conseqüente degradação da matriz extracelular, propiciando a infiltração do estroma, assim como de vasos linfáticos e sanguíneos.

Em cânceres de colo uterino já foi demonstrado que altas concentrações de lactato teciduais estão associadas com a ocorrência de metástase e conseqüentemente pior prognóstico (126). A explicação mais plausível para este

fato é que o acúmulo de ácido no estroma tumoral cursa com aumento da secreção de VEGF, que culmina com a neoangiogênese venosa e linfática (126). Esses dados mais uma vez podem explicar a associação do aumento da expressão membranosa do MCT 1 com a presença de infiltração linfática e venosa, uma vez que a hiperexpressão membranosa do MCT 1 está associada com o efluxo de íons H^+ , ou seja com a redução do pH extracelular às custas principalmente do acúmulo de ácido láctico. Vários estudos já mostraram a associação do aumento da densidade vascular com o aumento da incidência de metástases e cânceres de mama, cabeça e pescoço, pulmão e mama (159, 160).

Em um trabalho recentemente publicado por nosso grupo utilizando parte da presente casuística, demonstramos que a densidade vascular linfática peritumoral estava associada à presença de metástase linfática e hepática (21).

Até onde temos conhecimento, este é o primeiro trabalho que pesquisou a influência da expressão dos MCTs no índice de proliferação celular e de células em apoptose em carcinomas colorretais. Não encontramos, aqui, associação entre a taxa de proliferação e a imunexpressão dos MCTs. Por outro lado, os tumores que exibiram imunexpressão membranosa para o MCT1 tiveram índices apoptóticos maiores que aqueles que não expressaram MCT1 na membrana. Mesmo com a complexa rede metabólica que funciona para propiciar a viabilidade e a proliferação das células tumorais, a hiperexpressão membranosa do MCT 1 pode ser considerada uma evidência que as células tumorais estão com a via glicolítica muito aumentada, produzindo mais ácido láctico e mesmo com o aumento membranoso dos MCT1, a excreção para o extracelular de íons H^+ não é suficiente para prevenir que a apoptose seja desencadeada.

7. PESQUISA DA ASSOCIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DOS MARCADORES ESTUDADOS, EM AMOSTRAS DE ADENOCARCINOMA PRIMÁRIO, COM A PRESENÇA DE METÁSTASES LINFONODAIS E HEPÁTICAS

Os marcadores aqui estudados por método imuno-histoquímico não mostraram associação estatisticamente significativa com a ocorrência de metástases linfonodais.

No que tange às metástases hepáticas, apenas a imunoexpressão da queratina 18 clivada em mais de 1,5% das células tumorais mostrou uma tendência estatística a associação com a presença de metástase. A importância do índice apoptótico no prognóstico de pacientes com carcinoma colorretal é ainda muito controversa, com a maioria dos artigos não comprovando associação do IA com o prognóstico (104, 161, 162). Nossos achados são, de certo modo, similares aos de Hilska et al (163), que demonstraram associação entre o IA mais elevado e o pior prognóstico. Devemos reconhecer, entretanto, que grande parte desta controvérsia pode se dever a questões técnicas relacionadas à aplicação da imuno-histoquímica a séries retrospectivas de casos, a heterogeneidade de procedimentos, desde a colheita, fixação, área do tumor submetida ao estudo da apoptose, procedimentos para recuperação antigênica, seleção do anticorpo e do sistema de amplificação, entre outras variáveis. Não menos relevante é a heterogeneidade dos métodos de análise das reações, ora quantitativos, ora semi-quantitativos, com pontos de corte até agora não padronizados. Garrity et al (64), Tatebe et al (97) e Hilska et al (163) utilizaram a técnica TUNEL para detectar células em apoptose em tecidos colorretais embebidos

em parafina, entretanto, Garrity et al (64) contaram as células apoptóticas em 200 a 350 imagens capturadas com objetiva de 40X para definir o índice apoptótico, enquanto os dois últimos grupos definiram o IA como a porcentagem de células positivas em mil células contadas. Backus et al (3), Koornstra et al (95) e de Bruin et al (105) utilizaram o método imuno-histoquímico com utilização do anticorpo anti-queratina 18 clivada para identificar as células em apoptose, porém Backus et al (3) utilizaram amostras de tecido colorretal congelado e não reportaram no seu artigo como quantificaram a imunexpressão nos tecidos, Koornstra et al (95) utilizara amostras fixadas em parafina e determinaram o índice de células em apoptose em mil células contadas, já de Bruin et al (105) determinou o índice de células em apoptose através da porcentagem de células imunomarcadas por milímetro quadrado de tecido.

A nosso ver, impõe-se um esforço internacional para a padronização de todos esses procedimentos para permitir que os conhecimentos gerados por esta metodologia possa vir a ser critério relevante para análises de valor prognóstico, podendo vir a contribuir de modo mais consistente na prática clínica de seleção terapêutica.

8. ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA MULTIVARIADA PARA A PRESENÇA DE METÁSTASE LINFONODAL

Visando a um exercício que permitisse a compreensão da força relativa entre as variáveis na progressão dos adenocarcinomas colorretais, eventualmente selecionando critérios do tumor primário com valor preditivo para o surgimento de

metástases, fizemos aqui análise de regressão logística multivariada tanto para a presença de metástase linfonodal como para metástase hepática.

Dentre as variáveis anátomopatológicas aqui estudadas, a presença de infiltração linfática ($p < 0,001$) e a de infiltração venosa ($p = 0,046$) pelo tumor foram fatores independentes associados à presença de metástase linfonodal na análise multivariada. Ishikawa et al (2008), estudando os determinantes histopatológicos de metástase linfonodal em CCR precoces (pTis e pT1) também observaram através da análise de regressão logística multivariada que a presença de infiltração linfática pelo tumor é um fator independente para a ocorrência de metástase linfonodal (164). Yoshida et al, (133) estudando a importância da distância da infiltração tumoral além da camada muscular própria, verificaram que a presença de infiltração linfática tumoral foi associada através de análise uni e multivariada com a menor sobrevida e menor tempo livre de doença. Okabe et al (165) e Sakuragi et al (166) também detectaram através de análise multivariada a presença de infiltração linfática tumoral com fator independente para a ocorrência de metástase linfonodal.

Compton CC (23) em sua revisão acerca do diagnóstico, prognóstico e características moleculares dos carcinomas colorretais encontrou 10 diferentes estudos que demonstraram através de análise multivariada a associação da presença de infiltração linfática tumoral como fator adverso no prognóstico.

9. ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA MULTIVARIADA PARA A PRESENÇA DE METÁSTASE HEPÁTICA

Defensores do estudo detalhado da morfologia como instrumento de compreensão das neoplasias colorretais, já em 1987, Jass et al (139) relataram a importância de avaliar a interface tumor – tecido adjacente, dividindo as bordas tumorais como predominantemente expansivas ou infiltrativas. Desde então, a presença de bordas tumorais infiltrativas vem sendo reportada como fator independente de mal prognóstico e de predição de metástase hepática (23). Os nossos achados estão de acordo com as evidências obtidas nesses trabalhos pois na nossa casuística a ocorrência de borda tumoral infiltrativa aumentou em 2,5 vezes a chance de ocorrência de metástase hepática através da análise multivariada ($p=0,042$). O prognóstico do câncer colorretal vem sendo atualmente associado a duas características morfológicas; a primeira é a presença de bordas tumorais infiltrativas como já reportamos e a segunda é a presença de brotamentos tumorais no fronte de invasão, ou “tumor budding”. Brotamentos tumorais são grupamentos de até cinco células ou células tumorais isoladas em meio ao estroma junto ao fronte de invasão, que são caracterizadas como células indiferenciadas que tem um alto poder de invasividade e de metastatização (167). A sobrevida em 5 anos, para pacientes com câncer retal, quando não existe nenhuma dessas variáveis é de 87%, quando existe uma delas é de 50% e quando as duas estão presentes a sobrevida em 5 anos cai para 28% (168). Os brotamentos tumorais já foram associados à hiperexpressão nuclear da beta catenina, achado esse que se traduz por alteração da via de sinalização WNT, dando um poder maior de infiltração pela neoplasia (169), e com a expressão

membranosa reduzida de E-caderina, que também é um achado correlacionado com menor adesividade celular e maior potencial metastático (170). Mesmo sendo variáveis histológicas distintas, a ocorrência de brotamentos tumorais está associada à presença de bordas tumorais infiltrativas (8).

A profundidade de infiltração do tumor é um fator associado à sobrevida do paciente com carcinoma colorretal, fazendo parte da avaliação TNM que é o sistema de estadiamento ouro para definição do prognóstico dos pacientes com CCR (8, 11, 12, 24). A infiltração do tumor além da muscular da mucosa (T3 + T4) na presente casuística aumentou em 8,9 vezes a chance de desenvolver metástase hepática, sendo fator independente na análise de regressão logística multivariada ($p=0,043$); o que confere uma sobrevida de cinco anos a menos de 3% desses pacientes (11).

10. COMENTÁRIOS FINAIS E PERSPECTIVAS

Na presente pesquisa constatamos uma vez mais que o sistema TNM apresenta-se extremamente útil para prever o comportamento biológico dos carcinomas colorretais, principalmente no que diz respeito a profundidade de infiltração do tumor como fator associado à presença de metástase linfonodal e hepática, que são fatores associados à progressão tumoral e menor sobrevida dos pacientes.

Além da profundidade de infiltração tumoral mostramos que outras variáveis histológicas reportadas como itens obrigatórios a constar nos laudos histopatológicos dos carcinomas colorretais, como a presença de infiltração de vasos linfáticos e

sangüíneos, infiltração perineural, borda tumoral infiltrativa e infiltração da serosa são associadas à presença de metástase linfonodal e hepática.

A queratina 7 embora pouco frequentemente expressa nos carcinomas colorretais (7,9%) pode ser expressa em até 38% das metástases hepáticas, dado este que deve ser levado em consideração na avaliação histológica das metástase hepáticas de sítios indeterminados, devendo nesses casos sempre levarmos em consideração a imunexpressão da queratina 20 e se possível do CDX2, um marcados bastante sensível para determinar a origem intestinal das neoplasias (171).

A queratina 20 foi imunexpressa em mais de 90% de todas as amostras avaliadas dos tecidos colorretais estudados, mostrando sua estabilidade de expressão no CCR e em suas metástases.

O índice de proliferação celular ainda tem resultados divergentes na literatura na comparação entre as amostras de carcinomas primários e e suas respectivas metástases, assim como tem um papel controverso para predizer a progressão tumoral e resposta à terapêutica utilizada nos dias atuais.

O índice de células em apoptose assim como o índice de proliferação celular tem resultados muito divergentes na literatura quando comparados os IAs nas amostras de adenocarcinoma primário e suas respectivas metástases, assim como não tem papel amplamente aceito para a sua quantificação na rotina diária para tentar predizer a progressão tumoral e resposta à quimio e radioterapia.

A avaliação da proliferação celular e do índice de apoptose, devem ser motivos de um esforço internacional para padronização dos métodos de verificação da sua imuno-expressão, assim como de suas quantificações ou semi-quantificações, para a uniformização dos resultados, permitindo assim a verificação dos seus papéis na predição do comportamento biológico tumoral e resposta à terapia.

Os transportadores de monocarboxilato são moléculas controladoras do pH intracelular e indiretamente do extra-celular que ainda foram pouco estudados nos carcinomas colorretais. Sua maior expressão nas amostras tumorais que nas mucosas normais são indícios que eles tem um papel fundamental no controle do pH intracelular, “prevenindo” que as células entrem em apoptose. Dos MCTs, merece maior atenção o MCT 1 cuja expressão membranosa se associou a presença de infiltração linfática e sangüínea, assim como do aumento da apoptose nos CCRs aqui estudados. Esses dados refletem indiretamente o papel do MCT 1 na acidificação do extra-celular estimulando a neoangiogênese e linfangiogênese, que são fatores sabidamente associados com a progressão tumoral, assim como reflete que os tumores com hiperexpressão membranosa do MCT1 estão com a via glicolítica muito aumentada, não conseguindo transportar para o extracelular a quantidade de ácido láctico necessária para prevenir que as células entrem em apoptose devido a queda acentuada do pH intracelular.

Nenhum dos marcadores utilizados na presente pesquisa foi considerado fator de risco independente para a ocorrência de metástase linfonodal ou hepática. Talvez isso possa mudar daqui a alguns anos quando as técnicas de fixação, recuperação antigênica, revelação e quantificação/semi-quantificação forem padronizadas para todos estes marcadores.

De todos os marcadores estudados, o MCT1 parece ter papel promissor para predição do potencial metastático ou de agressividade local dos adenocarcinomas colorretais, no entanto é necessária uma casuística mais robusta com seguimento rigoroso dos pacientes para podermos confirmar ou não essa hipótese. Esse será o propósito de estudos futuros que o nosso grupo pretende fazer.

CONCLUSÕES

1. Nos adenocarcinomas colorretais, a presença de infiltração vascular sangüínea, infiltração linfática e perineural, infiltração tumoral além da camada muscular e desmoplasia moderada/intensa são achados associados com a maior frequência de metástase linfonodal. Dentre estes, somente a infiltração linfática tumoral e infiltração de vasos sangüíneos foram fatores de risco independentes para metástase linfonodal na análise multivariada.

Infiltração do tumor primário além da camada muscular própria, borda tumoral infiltrativa e a presença de metástase linfonodal são achados associados com a maior frequência de metástase hepática. Dentre estes somente a infiltração tumoral além da muscular própria e a presença de bordas tumorais infiltrativas foram fatores de risco independentes para metástase hepática na análise multivariada.

2. Representando possíveis alterações do citoesqueleto ao longo da progressão dos carcinomas colorretais, a queratina 7 foi mais frequentemente expressa nas metástases hepáticas que nas metástases linfonodais e adenocarcinomas primários, indicando que a aquisição da expressão da queratina 7 pode ser uma alteração tardia do citoesqueleto associada a maior agressividade do tumor. Adicionalmente, este padrão anômalo de distribuição da queratina 7 alerta o patologista cirúrgico que tal reatividade não exclui o colorreto como possível sítio primário do carcinoma. A expressão quase universal da queratina 20 comprova sua estabilidade em todas as etapas da progressão do adenocarcinoma colorretal.

3. Refletindo uma cinética celular elevada, tanto a proliferação celular marcada pelo Ag Ki-67 como a apoptose, marcada pela queratina 18 clivada mostraram significativo incremento do normal para o adenocarcinoma primário e suas respectivas metástases. Entretanto, as discrepâncias marcantes com relação à apoptose entre as metástases linfonodal e hepática sugerem a perda do controle deste importante processo durante a progressão tumoral.

4. Dentre os MCTs aqui estudados, tanto a expressão citoplasmática quanto a membranosa dos MCTs 1 e 4 foram estatisticamente mais freqüentes nos adenocarcinomas que nas mucosas normais, sugerindo possível interferência de seu papel no controle do pH intracelular nestas neoplasias. Destacou-se aqui a expressão membranosa da MCT 1, que foi mais freqüente nos tumores com infiltração linfática e vascular, não ficando no presente estudo constatada sua associação direta com a presença de metástases por via linfática ou sanguínea.

ANEXOS

ANEXO 1

Legendas para Planilha de carcinomas colorretais

1) Tamanho (maior eixo em cm).

2) Localização.

- 1- Ceco
- 2- Cólon ascendente
- 3- Flexura Hepática
- 4- Cólon Transverso
- 5- Flexura esplênica
- 6- Cólon descendente
- 7- Sigmóide
- 8- Retossigmóide
- 9- Reto
- 10- Não especificado

3) Tipos Macroscópicos.

- 1- Exofítico (polipóide, séssil)
- 2- Ulcerativo (úlceros - infiltrativo)
- 3- Infiltrativo (anular - constrictivo)
- 4- Séssil-ulcerado.
- 5- outro.

4) Infiltração da Serosa.

- 1- Presente 2- Ausente 3- Não visível

5) Tipos histológicos

- 1- Adenocarcinoma tubular.
- 2- Adenocarcinoma túbulo-papilar.
- 3- Carcinoma mucinoso (colóide) (> 50% do tumor).
- 4- Carcinoma medular.
- 5- Carcinoma de células em anel de sinete (>50% do tumor).
- 6- Carcinoma de pequenas células.
- 7- Carcinoma indiferenciado.
- 8- Carcinoma adenoescamoso.
- 9- Outro (especificar):

6) Grau histológico.

- 1- Baixo grau (adenocarcinoma bem e moderadamente diferenciado).
- 2- Alto grau (adenocarcinoma pouco diferenciado ou indiferenciado).

7) Infiltração.

- 1- Carcinoma *in situ*, intraepitelial (sem infiltração da lâmina própria).
- 2- Carcinoma *in situ*, intramucoso (com infiltração da lâmina própria).
- 3- Infiltração da submucosa.
- 4- Infiltração da muscular própria.
- 5- Infiltração da serosa.
- 6- Infiltração de tecidos moles pericólicos ou perirretais
- 7- Perfuração do peritônio visceral ou invasão direta de órgãos adjacentes

8) Infiltrado inflamatório intratumoral.

- 1- Ausente.
- 2- Discreto a moderado.
- 3- Intenso (agregados linfóides similares à doença de Chron).

9) desmoplasia

- 1- Ausente.
- 2- Discreta.
- 3- Moderada.
- 4- Intensa.

10) Borda tumoral

- 1- Expansiva.
- 2- Infiltrativa

11) Invasão de vasos linfáticos.

- 1- Ausente.
- 2- Presente.

12) Invasão de vasos sangüíneos.

- 1- Ausente.
- 2- Presente.

13) Invasão perineural

- 1- Ausente.
- 2- Presente.

14) Metástase linfonodal.

- 1- Ausência de representação de linfonodos
- 2- Ausência de metástases em linfonodos regionais.
- 3- Metástase em 1 a 3 linfonodos regionais, sem transposição capsular.
- 4- Metástase em 1 a 3 linfonodos regionais, com transposição capsular.
- 5- Metástase em 4 ou mais linfonodos regionais, sem transposição capsular.
- 6- Metástase em 4 ou mais linfonodos regionais, com transposição capsular.

ANEXO 2

Legendas para Planilha de carcinomas colorretais utilizadas para fins estatísticos

1) Tamanho (maior eixo em cm).

0 - ≤ 5 cm.

1 - > 5 cm.

2) Localização.

1 - Cólon direito.

2 - Cólon esquerdo.

3) Tipos Macroscópicos.

1 - Exofítico.

2 - Úlcero – infiltrativo.

4) Infiltração da serosa.

1 - Presente.

2 - Ausente

5) Tipos histológico

1 - Adenocarcinoma SOE.

3 – Adenocarcinoma mucinoso.

6) Grau histológico

1- Baixo grau (adenocarcinoma bem e moderadamente diferenciado)

2- Alto grau (adenocarcinoma pouco diferenciado ou indiferenciado)

7) Infiltração.

1- T1 +T2 (Carcinomas que infiltraram até a camada muscular própria.

3- T3+T4 (Carcinomas que infiltraram além da camada muscular própria.

8) Infiltrado inflamatório intratumoral.

1- Ausente

2- Discreto a moderado

3- Intenso (agregados linfóides similares à doença de Chron)

9) Desmoplasia.

1- Ausente/leve.

2- Moderada/intensa.

10) Borda tumoral

1- Expansiva

2- Infiltrativa

11) Invasão de vasos linfáticos.

- 1- Ausente.
- 2- Presente.

12) Invasão de vasos sanguíneos.

- 1- Ausente.
- 2- Presente.

13) Invasão perineural

- 1- Ausente.
- 2- Presente.

14) Metástase linfonodal.

- 1- Presente.
- 2- Ausente.

15) Metástase hepática.

- 1- Presente.
- 2- Ausente.

ANEXO 3

Estadiamento patológico e clínico para os carcinomas colorretais.

TUMOR PRIMÁRIO (T)

pTx: tumor não pode ser avaliado.

pT0: ausência de tumor primário.

pT1: Carcinoma *in situ*: intra-epitelial ou invasão da lâmina própria*

pT1: Tumor invade a submucosa.

pT2: Tumor invade a muscular própria.

pT3: Tumor invade além da muscular própria, sem ultrapassar a subserosa ou os tecidos desperitonizados pericólicos ou perirretais.

pT4: Tumor invade diretamente outros órgãos ou estruturas e/ou perfura o peritônio visceral** ***

LINFONODOS REGIONAIS (N)

Nx: N não pode ser avaliado.

N0: Ausência de metástase linfonodal.

N1: Metástase para 1 a 3 linfonodos.

N2: Metástase para 4 ou mais linfonodos.

METÁSTASE (M)

Mx: Metástase não pode ser avaliada.

M0: Ausência de metástase.

M1: Presença de Metástase.

Estadiamento clínico para os carcinomas colorretais

Estadio 0: Tis N0 M0.

Estadio I: T1 N0 M0 ou T2 N0 M0.

Estadio IIA: T3 N0 M0.

Estadio IIB: T4 N0 M0.

Estadio IIIA: T1-T2 N1 M0.

Estadio IIIB: T3-T4 N1 M0.

Estadio IIIC: Qualquer T N0 M0.

Estadio IV: Qualquer T Qualquer N M1.

** Tis inclui tumores confinados dentro da membrana basal glandular (intraepitelial) ou tumores que infiltrem a lâmina própria (intramucoso) sem extensão além da muscular da mucosa.*

*** Invasão direta em T4 inclui invasão de outros segmentos colorretais através da serosa.*

**** Tumor aderido a outros órgãos ou estruturas é classificado como T4 se a análise histológica confirmar aderência neoplásica. As letras V e L devem ser utilizadas para indicar invasão vascular e linfática respectivamente.*

Nota: os prefixos y e r devem ser utilizados para o estadiamento após tratamento neoadjuvante e recidiva, respectivamente.

ANEXO 4

Distribuição das variáveis anatomopatológicas

caso	Tam.	topo.	tipo macro	inf serosa	tipo histol.	grau tumor	prof. Infiltr.	Infiltr. Infla.	borda tum.	desmopla.	inf. Linfat.	inf. vasc.	inf. perin.	meta linf.	meta hep.
3323420	1	1	2	2	1	1	3	2	1	2	1	1	1	1	1
3656101	0	2	2	2	1	1	3	2	1	1	2	1	1	0	1
3877469	1	2	2	2	1	1	3	2	1	2	2	2	1	1	1
3892506	0	2	2	2	1	1	3	1	2	1	2	2	1	1	0
3900975	1	2	2	2	3	2	3	1	1	1	2	1	1	1	0
3925390	0	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	2	1	1	0
3947548	0	2	2	1	1	1	3	2	2	1	2	1	2	0	1
3988031	0	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	2	2	1	0
4000269	1	2	2	2	1	1	3	2	1	2	1	2	2	0	0
4016068	0	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0
4036204	1	2	2	2	1	1	3	2	1	2	1	1	1	0	0
4059913	1	1	1	2	1	1	3	2	1	2	2	1	1	1	0
4061373	0	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	2	1	1	1
4072693	0	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	0	0
4078454	0	2	2	2	1	2	3	2	1	2	2	2	2	1	0
4086988	1	2	2	2	1	1	3	3	1	2	2	1	1	0	0
4095081	1	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	1	2	1	0
4103114	0	2	2	2	1	1	3	2	1	2	2	2	2	1	0
4123506	1	2	2	2	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	0
4124820	0	2	1	2	1	1	3	2	2	2	2	1	2	0	0
4133293	0	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	2	0	0

Continua...

Continuação Anexo 4

caso	Tam.	topo.	tipo macro	inf serosa	tipo histol.	grau tumor	prof. Infil.	Infil. Infla.	borda tum.	desmopla.	inf. Linfat.	inf. vasc.	inf. perin.	meta linf.	meta hep.
4181972	1	2	1	1	1	1	3	2	1	2	1	1	1	0	0
4202716	1	2	2	2	1	1	3	2	1	2	2	2	2	1	0
4240073	0	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	2	2	1	0
4264991	0	1	2	2	1	1	3	2	2	2	2	2	1	1	1
4296435	1	2	1	2	1	1	3	2	2	2	1	1	1	0	0
4298977	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0
4304438	1	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	2	2	1	0
4336097	1	2	2	2	1	1	3	2	1	2	1	1	1	0	0
4343859	1	2	2	2	1	1	3	2	2	2	1	1	1	0	1
4345983	0	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0
4355490	0	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	2	2	1	0
4373952	1	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	2	2	0	0
4376153	1	1	2	2	1	1	3	2	2	2	1	1	1	0	0
4405943	0	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1
4458877	1	1	1	2	3	2	3	2	1	1	1	1	1	0	0
4458885	1	1	1	2	3	2	3	2	1	1	2	1	2	1	0
4469577	1	2	1	2	1	1	3	2	1	2	2	1	1	1	0
4487427	1	2	2	2	1	1	3	2	1	2	2	1	1	0	0
4488482	1	2	2	1	1	1	3	2	2	2	2	2	2	1	0
4496230	1	2	2	1	1	1	3	2	2	2	2	2	1	1	1
4500520	0	2	2	2	3	2	3	2	2	1	1	1	2	0	0
4554299	1	2	2	2	1	1	3	2	1	1	2	2	1	1	0
4556410	1	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	1	2	1	0
4558677	1	2	1	2	1	1	3	2	2	2	1	1	1	0	1

Continua...

Continuação Anexo 4

caso	Tam.	topo.	tipo macro	inf serosa	tipo histol.	grau tumor	prof. Infil.	Infil. Infla.	borda tum.	desmopla.	inf. Linfat.	inf. vasc.	inf. perin.	meta linf.	meta hep.
4562925	0	1	2	2	1	2	3	2	2	1	2	2	2	1	0
4579488	1	2	2	2	1	1	3	2	1	2	1	1	1	1	0
4620267	1	2	2	2	1	1	3	2	1	2	1	1	2	1	1
4628993	1	2	2	2	1	1	3	2	1	2	1	1	1	1	0
4635353	0	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	1	1	1	0
4636961	0	2	1	2	3	2	3	2	1	2	1	1	1	0	0
4643046	1	2	2	2	1	1	3	2	1	1	2	1	1	1	0
4645090	0	2	2	2	3	2	1	1	1	1	1	1	1	0	0
4652886	1	2	2	2	1	1	3	2	1	1	1	1	1	0	0
4653106	1	2	2	2	3	2	3	2	2	2	2	2	2	1	0
4659848	1	2	2	2	3	2	3	2	1	2	1	1	1	0	0
4682521	1	2	2	2	1	2	3	2	1	2	1	1	1	0	0
4705963	0	2	2	2	1	1	3	2	1	2	1	1	1	0	0
4715551	0	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	1	0	1
4736893	0	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	0
4739159	0	2	2	2	1	1	3	2	2	1	1	2	1	0	0
4747798	0	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0
4765869	0	2	2	2	1	1	3	2	1	2	1	1	1	0	0
4779347	0	2	1	2	1	1	3	2	1	2	1	1	1	0	0
4785436	0	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	0	0
4804848	0	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	1	2	1	0
4806247	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0
4826906	0	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	1	0	0
4833295	0	1	2	2	1	1	1	2	2	1	1	1	1	0	0

Continua...

Continuação Anexo 4

caso	Tam.	topo.	tipo macro	inf serosa	tipo histol.	grau tumor	prof. Infil.	Infil. Infla.	borda tum.	desmopla.	inf. Linfat.	inf. vasc.	inf. perin.	meta linf.	meta hep.
4846192	0	2	2	2	1	1	3	2	1	2	2	1	1	1	0
4852753	0	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	2	1	1	1
4864514	0	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	0	0
4905300	0	2	2	2	3	2	1	2	1	1	2	1	1	0	0
4917260	0	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	2	2	0	1
4920929	0	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	0	0
4940830	1	2	2	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	0	0
4942825	1	2	2	2	1	1	3	2	2	2	1	1	1	0	0
4964187	0	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	0
5000521	1	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0
5021960	1	2	2	2	1	1	3	2	2	2	1	1	1	0	0
5035309	0	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0
5065372	1	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	2	1	1	0
5075149	1	2	2	2	1	1	3	2	2	2	1	1	1	0	1
5081572	1	2	2	2	1	1	3	2	1	2	2	2	2	1	1
5092400	1	1	2	2	1	1	3	1	2	2	2	2	2	1	0
5144906	1	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	2	2	1	0
5146682	1	2	2	2	1	1	3	2	2	2	1	1	1	0	0
5146690	1	1	2	2	1	1	3	2	2	2	2	2	2	1	1
5148413	1	1	1	2	3	2	3	2	1	2	2	1	2	1	0
5163820	0	2	2	2	1	1	3	2	1	2	1	2	1	0	0
5186811	1	1	2	1	1	2	3	2	2	2	2	2	1	1	0
5232899	0	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0
5271770	1	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	2	2	1	0

Continua...

Continuação Anexo 4

caso	Tam.	topo.	tipo macro	inf serosa	tipo histol.	grau tumor	prof. Infil.	Infil. Infla.	borda tum.	desmopla.	inf. Linfat.	inf. vasc.	inf. perin.	meta linf.	meta hep.
5277876	0	2	2	2	1	1	3	2	2	2	1	2	1	0	0
5277922	1	1	2	2	3	2	3	2	1	1	2	2	2	1	0
5319471	1	1	2	2	1	1	3	2	1	2	2	2	2	1	0
5322260	0	2	2	2	1	1	3	2	2	2	1	1	1	0	0
5335116	0	2	2	2	3	2	3	2	1	1	1	1	2	0	0
5352118	1	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	2	1	1	0
5370680	1	2	2	2	1	1	3	3	1	2	2	2	1	0	0
5382360	0	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	1	2	1	1
5418844	1	2	2	2	1	1	3	2	1	1	1	1	1	1	1
5438349	1	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0
5445523	1	2	2	2	1	1	3	2	1	2	2	1	1	0	0
5468566	0	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	1	2	1	0
5516030	1	2	1	2	1	1	3	2	1	2	2	1	1	0	0
5540232	0	2	2	2	1	1	3	2	2	2	1	2	1	0	0
5559308	0	2	2	2	1	1	3	2	1	2	1	1	2	1	0
5559553	1	2	2	2	1	1	3	2	1	1	1	2	1	0	1
5595177	1	2	2	2	1	1	3	2	1	2	1	1	1	0	0
5612730	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0
5616760	1	1	2	2	1	1	3	2	2	2	2	1	1	0	0
5622778	0	2	2	2	1	1	3	2	1	2	1	1	1	0	0
5624584	1	2	2	2	1	1	3	2	1	2	1	1	1	0	0
5633010	0	2	2	2	1	1	3	2	1	2	1	1	1	0	1
5706971	1	2	2	2	1	1	3	2	2	2	1	1	1	0	0
5720656	0	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	2	1	0	1

Continua...

Conclusão Anexo 4

caso	Tam.	topo.	tipo macro	inf serosa	tipo histol.	grau tumor	prof. Infil.	Infil. Infla.	borda tum.	desmopla.	inf. Linfat.	inf. vasc.	inf. perin.	meta linf.	meta hep.
5732239	1	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	1	2	1	1
5753171	1	2	2	2	3	2	3	2	1	2	2	1	1	1	1
6063829	0	99	1	2	1	1	3	2	2	2	2	2	1	1	1
6092071	0	1	2	2	1	1	3	2	2	2	2	2	1	1	0
6601537	1	2	2	2	1	1	3	2	1	1	2	2	2	1	1
6602711	1	2	2	2	1	1	3	2	1	2	2	1	1	1	1
6643574	1	2	1	2	1	1	3	2	2	2	1	1	1	1	1
6644864	1	2	2	2	1	1	3	2	2	2	1	1	1	1	1
20010774	0	1	2	2	1	1	3	2	2	2	1	1	1	0	1
20023607	1	2	1	1	1	2	3	2	2	1	2	1	1	1	1
20025389	1	99	1	2	1	1	3	2	2	1	1	1	1	0	1
20027466	0	99	2	2	1	1	3	2	1	2	2	2	2	1	1
20032333	0	1	1	1	1	1	3	3	2	2	1	1	1	1	1
20034274	0	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	1	1	1	1
20034610	0	2	2	2	1	1	3	2	2	2	1	2	1	1	1
20034697	1	1	2	2	1	1	3	2	2	2	1	1	1	1	1
20037469	0	99	2	2	1	1	3	2	2	2	1	1	1	1	1
20038707	1	99	2	2	1	1	3	2	1	2	2	2	1	1	1
20043679	0	2	2	2	1	1	3	2	2	2	1	1	2	0	1
20044294	1	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	2	1	1	1
20044731	0	2	1	2	3	2	3	1	2	1	2	1	1	1	1
20050131	0	1	2	1	1	1	3	2	1	2	2	2	2	1	1

ANEXO 5

Resultado das imunoexpressões dos marcadores pesquisados

caso	IA T	IA L	IA F	IA MN	IA TA	TP T	TP TA	TP MN	TP MNA	TP L	TP LA	TP F	TP FA	MCT1 CT	MCT1 MT	MCT1 CM	MCT1 MM	MCT2 CT	MCT2 MT	MCT2 CM	MCT2 MM	MCT4 CT	MCT4 MT	MCT4 CM	MCT4 MM
3323420	0,015	0,037	0,009	0,003	0	3	1	1	0	3	1	2	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
3656101	0,006	999	0,04	0	0	1	0	0	0	99	999	1	0	1	1	99	99	1	0	1	0	1	1	0	0
3877469	0,042	0,035	0,02	0	1	2	0	1	0	2	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
3892506	999	999	999	0	999	99	99	99	999	1	0	99	999	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1
3900975	0,024	999	999	0	1	2	0	0	0	0	0	99	999	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0
3925390	999	999	999	0	999	99	99	1	0	99	999	99	999	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0
3947548	0,001	999	0,022	0,04	0	2	0	1	0	99	999	3	1	999	999	99	99	999	999	99	99	999	999	99	99
3988031	999	0,068	999	0	999	99	99	1	0	3	1	99	999	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0
4000269	0,018	999	999	0,01	1	1	0	1	0	99	999	99	999	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0
4016068	0,007	999	999	0	0	1	0	1	0	99	999	99	999	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
4036204	0,021	999	999	0	1	4	1	1	0	99	999	99	999	1	0	99	99	1	0	99	99	1	1	99	99
4059913	0,035	0,037	999	0	1	4	1	1	0	4	1	99	999	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1
4061373	999	999	0,004	0	999	1	0	99	999	99	999	3	1	1	1	0	0	1	0	99	99	1	0	1	0
4072693	0,021	999	999	0,003	1	3	1	0	0	99	999	99	999	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0
4078454	999	999	999	0,006	999	99	99	0	0	2	0	99	999	1	1	99	99	1	0	99	99	1	0	0	0
4086988	0,069	999	999	999	1	3	1	1	0	99	999	99	999	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
4095081	0,05	0,007	999	0,001	1	2	0	1	0	3	1	99	999	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
4103114	0,015	0,008	999	0,015	0	2	0	1	0	1	0	99	999	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
4123506	999	999	999	0,005	999	2	0	2	0	2	0	99	999	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
4124820	0,008	999	999	0	0	3	1	2	0	99	999	99	999	1	0	99	99	1	0	99	99	1	0	99	99
4133293	999	999	999	999	999	1	0	1	0	99	999	99	999	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
4181972	0,032	999	999	999	1	1	0	0	0	99	999	99	999	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0
4202716	0,015	0,004	999	999	0	2	0	0	0	2	0	99	999	1	1	0	0	1	0	99	99	1	1	0	0
4240073	999	999	999	0	999	1	0	0	0	1	0	99	999	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0

Continua...

Continuação Anexo 5

caso	IA T	IA L	IA F	IA MN	IA TA	TP T	TP TA	TP MN	TP MNA	TP L	TP LA	TP F	TP FA	MCT1 CT	MCT1 MT	MCT1 CM	MCT1 MM	MCT2 CT	MCT2 MT	MCT2 CM	MCT2 MM	MCT4 CT	MCT4 MT	MCT4 CM	MCT4 MM
4264991	0,016	0,008	0,021	0,001	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0
4296435	0,154	999	999	0,003	1	1	0	1	0	99	999	99	999	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
4298977	0,011	999	999	0,006	0	4	1	1	0	99	999	99	999	1	1	99	99	1	0	1	0	1	0	0	0
4304438	999	0,023	999	0,003	999	3	1	2	0	3	1	99	999	1	0	99	99	1	0	1	0	1	1	0	0
4336097	0,021	999	999	0	1	3	1	1	0	99	999	99	999	1	1	99	99	1	0	99	99	1	0	0	0
4343859	0,018	999	0,004	999	1	1	0	99	999	99	999	1	0	1	1	99	99	1	0	99	99	1	1	99	99
4345983	0,003	999	999	0,001	0	3	1	1	0	99	999	99	999	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0
4355490	0,058	999	999	0,004	1	3	1	1	0	4	1	99	999	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
4373952	0,005	999	999	0,001	0	2	0	1	0	99	999	99	999	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
4376153	999	999	999	0,001	999	1	0	0	0	99	999	99	999	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0
4405943	0,02	999	0,082	0	1	2	0	1	0	99	999	1	0	1	0	99	99	1	0	99	99	1	1	99	99
4458877	999	999	999	999	999	1	0	1	0	99	999	99	999	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
4458885	999	999	999	999	999	99	99	3	1	2	0	99	999	1	1	0	0	1	0	99	99	1	0	99	99
4469577	999	0,003	999	0,005	999	99	99	1	0	2	0	99	999	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
4487427	999	999	999	0,002	999	1	0	1	0	99	999	99	999	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
4488482	999	0,004	999	0	999	1	0	1	0	1	0	99	999	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
4496230	0	999	0,02	0,001	0	4	1	1	0	99	999	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
4500520	999	999	999	999	999	99	99	1	0	99	999	99	999	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	99	99
4554299	0,018	0,08	999	0,002	1	2	0	1	0	1	0	99	999	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
4556410	999	999	999	0	999	1	0	1	0	1	0	99	999	999	999	99	99	999	999	99	99	999	999	99	99
4558677	0,046	999	0,017	0	1	3	1	1	0	99	999	2	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
4562925	0,195	0,034	999	0,009	1	2	0	0	0	1	0	99	999	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
4579488	0,006	0,002	999	999	0	1	0	1	0	2	0	99	999	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
4620267	0,004	0	0,014	999	0	3	1	1	0	3	1	1	0	1	1	99	99	1	0	99	99	1	0	99	99
4628993	0,01	999	999	0,004	0	1	0	1	0	99	999	99	999	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
4635353	0,022	999	999	0	1	3	1	1	0	99	999	99	999	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
4636961	0,091	999	999	0,006	1	4	1	1	0	99	999	99	999	1	1	0	0	1	0	99	99	1	0	99	99
4643046	0,005	999	999	0,01	0	3	1	1	0	99	999	99	999	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0

Continua...

Continuação Anexo 5

caso	IA T	IA L	IA F	IA MN	IA TA	TP T	TP TA	TP MN	TP MNA	TP L	TP LA	TP F	TP FA	MCT1 CT	MCT1 MT	MCT1 CM	MCT1 MM	MCT2 CT	MCT2 MT	MCT2 CM	MCT2 MM	MCT4 CT	MCT4 MT	MCT4 CM	MCT4 MM
4645090	999	999	999	0,001	999	99	99	0	0	99	999	99	999	999	999	99	99	999	999	99	99	999	999	99	99
4652886	999	999	999	0,014	999	99	99	0	0	99	999	99	999	1	0	99	99	1	0	99	99	1	1	99	99
4653106	0,002	0	999	999	0	1	0	1	0	1	0	99	999	999	999	99	99	999	999	99	99	999	999	99	99
4659848	0,021	999	999	0	1	3	1	2	0	99	999	99	999	1	0	0	0	1	0	99	99	1	1	99	99
4682521	999	999	999	0,001	999	99	99	0	0	99	999	99	999	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
4705963	0,001	999	999	999	0	1	0	1	0	99	999	99	999	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0
4715551	999	999	0,006	0,005	999	2	0	1	0	99	999	3	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0
4736893	0,027	999	999	0,001	1	4	1	1	0	3	1	99	999	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
4739159	999	999	999	999	999	99	99	99	999	99	999	99	999	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
4747798	0,003	999	999	0,004	0	4	1	1	0	99	999	99	999	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
4765869	999	999	999	0,009	999	2	0	1	0	99	999	99	999	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
4779347	0,001	999	999	999	0	2	0	99	999	99	999	99	999	1	0	99	99	1	0	99	99	1	0	99	99
4785436	0,033	999	999	0,022	1	3	1	1	0	99	999	99	999	999	999	99	99	999	999	99	99	999	999	99	99
4804848	0,01	999	999	0,005	0	2	0	0	0	2	0	99	999	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
4806247	0,077	999	999	0,015	1	1	0	2	0	99	999	99	999	1	0	99	99	1	0	99	99	1	0	99	99
4826906	999	999	999	999	999	2	0	1	0	99	999	99	999	1	1	99	99	1	0	99	99	1	0	99	99
4833295	0,001	999	999	999	0	1	0	2	0	99	999	99	999	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
4846192	0,004	0,034	999	0,001	0	2	0	1	0	2	0	99	999	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
4852753	0,01	0,021	0,017	0	0	3	1	1	0	3	1	2	0	999	999	99	99	999	999	99	99	999	999	99	99
4864514	999	999	999	0	999	1	0	1	0	99	999	99	999	999	999	99	99	999	999	99	99	999	999	99	99
4905300	0,22	999	999	0,002	1	3	1	1	0	99	999	99	999	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
4917260	0,049	999	0,011	0,019	1	2	0	1	0	99	999	2	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
4920929	999	999	999	0,004	999	99	99	1	0	99	999	99	999	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
4940830	0,033	999	999	0,007	1	3	1	0	0	99	999	99	999	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
4942825	0,012	999	999	0,007	1	3	1	0	0	99	999	99	999	1	0	99	99	1	0	0	0	1	1	99	99
4964187	0,002	0,028	999	0,001	0	3	1	1	0	4	1	99	999	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
5000521	0,016	999	999	0,008	1	3	1	2	0	99	999	99	999	1	1	99	99	1	0	99	99	1	0	99	99
5021960	999	999	999	0,008	999	2	0	1	0	99	999	99	999	1	1	99	99	1	0	99	99	0	0	99	99

Continua...

Continuação Anexo 5

caso	IA T	IA L	IA F	IA MN	IA TA	TP T	TP TA	TP MN	TP MNA	TP L	TP LA	TP F	TP FA	MCT1 CT	MCT1 MT	MCT1 CM	MCT1 MM	MCT2 CT	MCT2 MT	MCT2 CM	MCT2 MM	MCT4 CT	MCT4 MT	MCT4 CM	MCT4 MM	
5035309	0,008	999	999	999	0	4	1	2	0	99	999	99	999	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	
5065372	0,031	0,014	999	999	1	2	0	1	0	2	0	99	999	1	1	99	99	1	0	99	99	1	0	99	99	
5075149	0,022	999	0,017	0,004	1	3	1	1	0	99	999	4	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	
5081572	0,002	0,011	0,012	0,026	0	1	0	2	0	1	0	2	0	1	1	0	0	1	1	99	99	1	0	99	99	
5092400	0,004	0,026	999	999	0	2	0	2	0	3	1	99	999	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	
5144906	0,025	0	999	0,004	1	4	1	2	0	4	1	99	999	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	
5146682	0,015	999	999	0,006	0	4	1	2	0	99	999	99	999	1	0	99	99	1	0	99	99	1	1	99	99	
5146690	0,006	999	0,016	0	0	1	0	1	0	3	1	3	1	1	0	99	99	1	0	99	99	1	1	99	99	
5148413	0,008	0	999	999	0	3	1	1	0	3	1	99	999	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	
5163820	0,002	999	999	999	0	4	1	99	999	99	999	99	999	0	0	99	99	1	0	99	99	1	0	99	99	
5186811	0,026	0,012	999	999	1	4	1	2	0	3	1	99	999	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
5232899	0,009	999	999	999	0	2	0	99	999	99	999	99	999	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	
5271770	999	0,053	999	0,001	999	4	1	1	0	4	1	99	999	1	1	99	99	1	0	99	99	1	1	99	99	
5277876	999	999	999	0	999	4	1	1	0	99	999	99	999	1	1	99	99	1	0	99	99	1	1	99	99	
5277922	999	999	999	999	999	3	1	99	999	3	1	99	999	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	
5319471	0,013	0,054	999	999	0	3	1	99	999	1	0	99	999	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
5322260	0,172	999	999	0,013	1	3	1	1	0	99	999	99	999	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	
5335116	0,003	999	999	0,008	0	2	0	1	0	99	999	99	999	999	999	99	99	999	999	99	99	999	999	99	99	
5352118	999	0,022	999	0	999	3	1	1	0	1	0	99	999	1	0	99	99	1	0	99	99	1	0	99	99	
5370680	0,059	999	999	0,001	1	4	1	2	0	99	999	99	999	1	1	99	99	1	0	99	99	1	1	99	99	
5382360	0,007	0,034	0,019	999	0	1	0	0	0	3	1	2	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	
5418844	0,016	0,024	0,011	999	1	4	1	0	0	4	1	4	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	
5438349	0,009	999	999	0,004	0	4	1	1	0	99	999	99	999	0	0	99	99	0	0	99	99	1	1	99	99	
5445523	0,003	999	999	0,003	0	3	1	2	0	99	999	99	999	1	0	0	1	1	0	0	99	99	1	1	0	0
5468566	0,024	0,03	999	0	1	3	1	2	0	3	1	99	999	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	
5516030	0,114	999	999	0	1	4	1	1	0	99	999	99	999	1	1	99	99	1	0	99	99	1	0	99	99	
5540232	999	999	999	0	999	1	0	2	0	99	999	99	999	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	
5559308	0,004	999	999	0	0	3	1	1	0	4	1	99	999	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	
5559553	0,015	999	0,021	0	0	2	0	1	0	99	999	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	
5595177	0,071	999	999	999	1	4	1	2	0	99	999	99	999	1	0	0	0	1	0	99	99	1	1	1	0	

Continua...

Conclusão Anexo 5

caso	IA T	IA L	IA F	IA MN	IA TA	TP T	TP TA	TP MN	TP MNA	TP L	TP LA	TP F	TP FA	MCT1 CT	MCT1 MT	MCT1 CM	MCT1 MM	MCT2 CT	MCT2 MT	MCT2 CM	MCT2 MM	MCT4 CT	MCT4 MT	MCT4 CM	MCT4 MM
5612730	0,184	999	999	999	1	99	99	99	999	99	999	99	999	0	0	99	99	1	0	1	0	1	0	0	0
5616760	0,012	999	999	0,001	0	1	0	99	999	99	999	99	999	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0
5622778	0,018	999	999	0	1	3	1	1	0	99	999	99	999	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1
5624584	0,025	999	999	0,001	1	4	1	1	0	99	999	99	999	1	0	99	99	1	0	99	99	1	1	99	99
5633010	0,025	999	0,051	0,186	1	4	1	0	0	99	999	1	0	1	1	99	99	1	0	99	99	1	0	99	99
5706971	999	999	999	0	999	4	1	2	0	99	999	99	999	1	1	99	99	1	1	99	99	1	1	99	99
5720656	0,012	999	0,012	0,01	0	3	1	1	0	99	999	3	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0
5732239	0,007	0	0,007	0,033	0	3	1	1	0	2	0	3	1	1	0	99	99	1	0	99	99	1	0	99	99
5753171	0,015	0,029	0,067	0	0	3	1	1	0	3	1	4	1	1	0	99	99	1	0	99	99	1	1	1	0
6063829	0,003	999	0,005	0,004	0	3	1	1	0	99	999	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
6092071	999	0,003	999	0	999	2	0	2	0	3	1	99	999	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0
6601537	0,162	0,014	0,006	0,002	1	2	0	99	999	4	1	1	0	1	1	99	99	1	0	99	99	1	1	99	99
6602711	0,023	0,231	0,034	0,019	1	3	1	1	0	2	0	2	0	1	1	99	99	1	0	99	99	1	1	99	99
6643574	0,01	0,008	999	0	0	1	0	2	0	3	1	99	999	0	0	99	99	1	0	99	99	1	1	99	99
6644864	0,023	0,124	0,065	999	1	3	1	0	0	4	1	3	1	1	1	99	99	1	0	1	0	1	0	1	0
2E+07	0,001	999	0,003	999	0	1	0	1	0	99	999	2	0	1	0	99	99	1	0	99	99	1	1	99	99
2E+07	0,028	0,085	0,053	0,001	1	4	1	1	0	2	0	1	0	999	999	99	99	999	999	99	99	999	999	99	99
2E+07	0,013	999	0,007	999	0	4	1	2	0	99	999	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
2E+07	0,001	0,015	999	999	0	2	0	1	0	2	0	1	0	999	999	99	99	999	999	99	99	999	999	99	99
2E+07	0,012	0,005	0,017	0	0	2	0	0	0	1	0	1	0	999	999	99	99	999	999	99	99	999	999	99	99
2E+07	0,008	0,009	0,099	0	0	2	0	99	999	2	0	2	0	0	0	99	99	1	0	1	0	1	0	0	0
2E+07	0,003	0,01	0,026	0,002	0	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
2E+07	0,013	0,015	0,009	0	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
2E+07	0,002	999	0,011	0,037	0	1	0	0	0	2	0	1	0	1	0	0	0	1	0	99	99	1	1	99	99
2E+07	0,015	999	0,013	0,001	0	2	0	99	999	3	1	2	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0
2E+07	999	999	0,026	0,005	999	4	1	99	999	99	999	3	1	999	999	99	99	999	999	99	99	999	999	99	99
2E+07	0,008	0,076	0,014	0	0	3	1	1	0	4	1	1	0	1	1	99	99	1	0	99	99	1	0	99	99
2E+07	999	999	0,002	0	999	2	0	0	0	2	0	2	0	999	999	99	99	999	999	99	99	999	999	99	99
2E+07	0,004	999	0,035	0,001	0	1	0	1	0	2	0	3	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1

REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*. 2007 Mar;18(3):581-92.
2. Estimativa 2008 - Incidência de Câncer no Brasil. 2007 [cited; Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>
3. Backus HH, Van Groeningen CJ, Vos W, Dukers DF, Bloemena E, Wouters D, et al. Differential expression of cell cycle and apoptosis related proteins in colorectal mucosa, primary colon tumours, and liver metastases. *J Clin Pathol*. 2002 Mar;55(3):206-11.
4. Liang P, Hong JW, Ubukata H, Liu HR, Watanabe Y, Katano M, et al. Increased density and diameter of lymphatic microvessels correlate with lymph node metastasis in early stage invasive colorectal carcinoma. *Virchows Arch*. 2006 May;448(5):570-5.
5. Weiss L, Grundmann E, Torhorst J, Hartveit F, Moberg I, Eder M, et al. Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J Pathol*. 1986 Nov;150(3):195-203.
6. Sobin L WCe. TNM classification of malignant tumours. New York: Wiley-Liss; 2002.
7. AJCC. Cancer staging manual. 6th ed. New York: Springer; 2002.
8. Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 2008 May;61(5):561-9.

9. Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, De Vita F, Castellano P, et al. Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2004 May 15;10(10):3490-9.
10. Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. *Cancer*. 2000 Apr 1;88(7):1739-57.
11. Compton C. Colorectal Carcinoma: Diagnostic, Prognostic, and Molecular Features. *Mod Pathol*. 2003;16(4):376-88.
12. Compton C. Prognostic factors in cancer. 3rd ed: John Wiley & Sons; 2006.
13. Benson AB, 3rd, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol*. 2004 Aug 15;22(16):3408-19.
14. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Jul;124(7):979-94.
15. Langley RR, Fidler IJ. Tumor Cell-Organ Microenvironment Interactions in the Pathogenesis of Cancer Metastasis. *Endocrine Reviews*. 2007;28:297-321.
16. Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with ¹²⁵I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst*. 1970;45:773-82.
17. Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 1974;34:997-1004.

18. Gimbrone MA, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. . J Exp Med. 1972;136:261-76.
19. Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Bauer M, Wolmark N, Wickerham DL, et al. Ten-year results of a randomized clinical trial comparing radical mastectomy and total mastectomy with or without radiation. N Engl J Med 1985;312:674-81.
20. Compton CC. Pathology report in colon cancer: what is prognostically important? Dig Dis. 1999;17(2):67-79.
21. Longatto-Filho A, Pinheiro C, Ferreira L, Scapulatempo C, Alves VA, Baltazar F, et al. Peritumoural, but not intratumoural, lymphatic vessel density and invasion correlate with colorectal carcinoma poor-outcome markers. Virchows Arch. 2008 Feb;452(2):133-8.
22. Shepherd NA, Baxter KJ, Love SB. The prognostic importance of peritoneal involvement in colonic cancer: a prospective evaluation. Gastroenterology. 1997 Apr;112(4):1096-102.
23. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. Mod Pathol. 2003 Apr;16(4):376-88.
24. Jass JR, O'Brien J, Riddell RH, Snover DC. Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma: Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. Am J Clin Pathol. 2008 Jan;129(1):13-23.
25. Compton CF, LP; Burgart LJ et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement. Arch Pathol Lab Med. 1999;124:979-94.

26. Gaffey MJ, Mills SE, Lack EE. Neuroendocrine carcinoma of the colon and rectum. A clinicopathologic, ultrastructural, and immunohistochemical study of 24 cases. *Am J Surg Pathol.* 1990 Nov;14(11):1010-23.
27. de Bruine AP, Wiggers T, Beek C, Volovics A, von Meyenfeldt M, Arends JW, et al. Endocrine cells in colorectal adenocarcinomas: incidence, hormone profile and prognostic relevance. *Int J Cancer.* 1993 Jul 9;54(5):765-71.
28. Mulcahy HE, Skelly MM, Husain A, O'Donoghue DP. Long-term outcome following curative surgery for malignant large bowel obstruction. *Br J Surg.* 1996 Jan;83(1):46-50.
29. Kang H OCJ, Maggard MA, Sack J, Ko CY. A 10-year outcomes evaluation of mucinous and signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum.* 2005;48(6):1161-68.
30. Cianchi F, Messerini L, Palomba A, Boddi V, Perigli G, Pucciani F, et al. Character of the invasive margin in colorectal cancer: does it improve prognostic information of Dukes staging? *Dis Colon Rectum.* 1997 Oct;40(10):1170-5; discussion 5-6.
31. Jass JR, Atkin WS, Cuzick J, Bussey HJ, Morson BC, Northover JM, et al. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology.* 1986 May;10(5):437-59.
32. Halvorsen TB, Seim E. Association between invasiveness, inflammatory reaction, desmoplasia and survival in colorectal cancer. *J Clin Pathol.* 1989 Feb;42(2):162-6.
33. Van den Hooff A. Stromal involvement in malignant growth. *Adv Cancer Res.* 1998;50:159-96.

34. Cheng JD, Weiner LM. Tumors and Their Microenvironments: Tilling the Soil
Commentary re: A. M. Scott et al., A Phase I Dose-Escalation Study of
Sibrotuzumab in
Patients with Advanced or Metastatic Fibroblast Activation Protein-positive Cancer.
Clin Cancer Res. 2003;9:1639-47.
35. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. .
Nat Med. 1995;1:27-31.
36. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic
switch during tumorigenesis. . *Cell.* 1996;86:353-64.
37. Tarin D, Price JE, Kettlewell MGW, Souter RG, Vass ACR, Crossley B.
Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous
shunts. . *Cancer Res.* 1984;44:3584-92.
38. Dingemans KP, Zeeman-Boeschoten IM, Keep RF, Das PK. Transplantation of
colon carcinoma into granulation tissue induces an invasive morphotype. *Int J
Cancer* 1993;54:1010-6.
39. Martin M, Pujuguet P, Martin F. Role of stromal myofibroblasts infiltrating
colon cancer in tumor invasion. . *Pathol Res Pract* 1996;192:712-7.
40. Lieubeau B, Heymann M, Henry F, Barbieux I, Meflah K, Grégoire M.
Immunomodulatory effects of tumor-associated fibroblasts in colorectal-tumor
development. . *Int J Cancer* 1999;81:629-36.
41. Gologan A, Krasinskas A, Hunt J, Thull DL, Farkas L, Sepulveda AR.
Performance of the revised Bethesda guidelines for identification of colorectal
carcinomas with a high level of microsatellite instability. *Arch Pathol Lab Med.* 2005
Nov;129(11):1390-7.

42. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*. 2002 May;40(5):403-39.
43. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982 Nov;31(1):11-24.
44. Moll R, Lowe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol*. 1992 Feb;140(2):427-47.
45. Tot T. Adenocarcinomas metastatic to the liver: the value of cytokeratins 20 and 7 in the search for unknown primary tumors. *Cancer*. 1999 Jan 1;85(1):171-7.
46. Cote CRTaRJ. *Immunomicroscopy: A diagnostic tool for the surgical pathologist*. 3rd Ed ed: Saunders; 2005.
47. Dabbs D. *Diagnostic immunohistochemistry*: Churchill Livingstone; 2006.
48. Moll I, Kuhn C, Moll R. Cytokeratin 20 is a general marker of cutaneous Merkel cells while certain neuronal proteins are absent. *J Invest Dermatol*. 1995 Jun;104(6):910-5.
49. Harlamert HA, Mira J, Bejarano PA, Baughman RP, Miller MA, Whitsett JA, et al. Thyroid transcription factor-1 and cytokeratins 7 and 20 in pulmonary and breast carcinoma. *Acta Cytol*. 1998 Nov-Dec;42(6):1382-8.
50. Lagendijk JH, Mullink H, van Diest PJ, Meijer GA, Meijer CJ. Immunohistochemical differentiation between primary adenocarcinomas of the ovary and ovarian metastases of colonic and breast origin. Comparison between a statistical and an intuitive approach. *J Clin Pathol*. 1999 Apr;52(4):283-90.

-
51. Liu LN, Chen GY, Wang P, Zhang CH, Huang SF. [Papillary renal cell carcinoma: clinico-pathologic studies of 33 cases]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2005 Feb;27(2):102-5.
52. Vang R, Whitaker BP, Farhood AI, Silva EG, Ro JY, Deavers MT. Immunohistochemical analysis of clear cell carcinoma of the gynecologic tract. *Int J Gynecol Pathol*. 2001 Jul;20(3):252-9.
53. Zhang PJ, Shah M, Spiegel GW, Brooks JJ. Cytokeratin 7 immunoreactivity in rectal adenocarcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2003 Dec;11(4):306-10.
54. Yu LD, YQ; Xiao, S; Lai, FJ and Lu, X Clinicopathological implications of positive CK7 expression in colorectal carcinoma. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2007 August;27(8):1190-2.
55. Hernandez BY, Frierson HF, Moskaluk CA, Li YJ, Clegg L, Cote TR, et al. CK20 and CK7 protein expression in colorectal cancer: demonstration of the utility of a population-based tissue microarray. *Hum Pathol*. 2005 Mar;36(3):275-81.
56. Georgescu CV, Saftoiu A, Georgescu CC, Ciurea R, Ciurea T. Correlations of proliferation markers, p53 expression and histological findings in colorectal carcinoma. *J Gastrointest Liver Dis*. 2007 Jun;16(2):133-9.
57. Koornstra JJ, de Jong S, Hollema H, de Vries EG, Kleibeuker JH. Changes in apoptosis during the development of colorectal cancer: a systematic review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003 Jan;45(1):37-53.
58. Oshima CT, Iriya K, Forones NM. Ki-67 as a prognostic marker in colorectal cancer but not in gastric cancer. *Neoplasma*. 2005;52(5):420-4.

-
59. Xu JM, Zhu BD, Mangia A, Simone G, Montemurro S, Giuliani F, et al. [Prognostic value of thymidylate synthase, topoisomerase-1 and Ki-67 in advanced colorectal cancer patients on irinotecan and fluorouracil treatment]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2005 May;27(5):312-5.
60. Ishida H, Miwa H, Tatsuta M, Masutani S, Imamura H, Shimizu J, et al. Ki-67 and CEA expression as prognostic markers in Dukes' C colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2004 Apr 15;207(1):109-15.
61. Chen YT, Henk MJ, Carney KJ, Wong WD, Rothenberger DA, Zheng T, et al. Prognostic significance of tumor markers in colorectal cancer patients: DNA index, S-phase fraction, p53 expression, and Ki-67 index. *J Gastrointest Surg*. 1997 May-Jun;1(3):266-72; discussion 73.
62. Rosati G, Chiacchio R, Reggiardo G, De Sanctis D, Manzione L. Thymidylate synthase expression, p53, bcl-2, Ki-67 and p27 in colorectal cancer: relationships with tumor recurrence and survival. *Tumour Biol*. 2004 Sep-Dec;25(5-6):258-63.
63. Kaneko I, Tanaka S, Oka S, Yoshida S, Hiyama T, Arihiro K, et al. Immunohistochemical molecular markers as predictors of curability of endoscopically resected submucosal colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2007 Jul 28;13(28):3829-35.
64. Garrity MM, Burgart LJ, Mahoney MR, Windschitl HE, Salim M, Wiesenfeld M, et al. Prognostic value of proliferation, apoptosis, defective DNA mismatch repair, and p53 overexpression in patients with resected Dukes' B2 or C colon cancer: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol*. 2004 May 1;22(9):1572-82.
65. Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, Parr AL, Kirsch I, Kim G, et al. Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon

cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study. *J Clin Oncol*. 2003 Jan 15;21(2):241-50.

66. Prall F, Ostwald C, Nizze H, Barten M. Expression profiling of colorectal carcinomas using tissue microarrays: cell cycle regulatory proteins p21, p27, and p53 as immunohistochemical prognostic markers in univariate and multivariate analysis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004 Jun;12(2):111-21.

67. Palmqvist R, Sellberg P, Oberg A, Tavelin B, Rutegard JN, Stenling R. Low tumour cell proliferation at the invasive margin is associated with a poor prognosis in Dukes' stage B colorectal cancers. *Br J Cancer*. 1999 Feb;79(3-4):577-81.

68. Jakob C, Liersch T, Meyer W, Becker H, Baretton GB, Aust DE. Predictive value of Ki67 and p53 in locally advanced rectal cancer: correlation with thymidylate synthase and histopathological tumor regression after neoadjuvant 5-FU-based chemoradiotherapy. *World J Gastroenterol*. 2008 Feb 21;14(7):1060-6.

69. Hoos A, Nissan A, Stojadinovic A, Shia J, Hedvat CV, Leung DH, et al. Tissue microarray molecular profiling of early, node-negative adenocarcinoma of the rectum: a comprehensive analysis. *Clin Cancer Res*. 2002 Dec;8(12):3841-9.

70. Fernebro E, Bendahl PO, Dictor M, Persson A, Ferno M, Nilbert M. Immunohistochemical patterns in rectal cancer: application of tissue microarray with prognostic correlations. *Int J Cancer*. 2004 Oct 10;111(6):921-8.

71. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57.

72. Klion FM, Schaffner F. The ultrastructure of acidophilic "Councilman-like" bodies in the liver. *Am J Pathol*. 1966 May;48(5):755-67.

-
73. Kerr JF. An electron-microscope study of liver cell necrosis due to heliotrine. *J Pathol.* 1969 Mar;97(3):557-62.
74. Kerr JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol.* 1971 Sep;105(1):13-20.
75. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):796-801.
76. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):770-6.
77. Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature.* 1997 Jul 10;388(6638):190-5.
78. Rich T, Allen RL, Wyllie AH. Defying death after DNA damage. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):777-83.
79. Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, et al. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem.* 1999 Jan 8;274(2):1156-63.
80. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998 Aug 21;94(4):491-501.
81. Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell.* 1999 Mar;3(3):287-96.

-
82. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol.* 1997 Dec 1;139(5):1281-92.
83. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1322-6.
84. Antonsson B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res.* 2000 Apr 10;256(1):50-7.
85. Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, et al. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature.* 1999 Aug 26;400(6747):886-91.
86. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997 Aug 15;326 (Pt 1):1-16.
87. Kuwana T, Smith JJ, Muzio M, Dixit V, Newmeyer DD, Kornbluth S. Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem.* 1998 Jun 26;273(26):16589-94.
88. Dinsdale D, Lee JC, Dewson G, Cohen GM, Peter ME. Intermediate filaments control the intracellular distribution of caspases during apoptosis. *Am J Pathol.* 2004 Feb;164(2):395-407.
89. Holubec H, Payne CM, Bernstein H, Dvorakova K, Bernstein C, Waltmire CN, et al. Assessment of apoptosis by immunohistochemical markers compared to cellular morphology in ex vivo-stressed colonic mucosa. *J Histochem Cytochem.* 2005 Feb;53(2):229-35.

-
90. Omary MB, Ku NO, Liao J, Price D. Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcell Biochem.* 1998;31:105-40.
91. Ku NO, Omary MB. Effect of mutation and phosphorylation of type I keratins on their caspase-mediated degradation. *J Biol Chem.* 2001 Jul 20;276(29):26792-8.
92. Strnad P, Windoffer R, Leube RE. In vivo detection of cytokeratin filament network breakdown in cells treated with the phosphatase inhibitor okadaic acid. *Cell Tissue Res.* 2001 Nov;306(2):277-93.
93. MacFarlane M, Merrison W, Dinsdale D, Cohen GM. Active caspases and cleaved cytokeratins are sequestered into cytoplasmic inclusions in TRAIL-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 2000 Mar 20;148(6):1239-54.
94. Leers MP, Kolgen W, Bjorklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol.* 1999 Apr;187(5):567-72.
95. Koornstra JJ, Rijcken FE, De Jong S, Hollema H, de Vries EG, Kleibeuker JH. Assessment of apoptosis by M30 immunoreactivity and the correlation with morphological criteria in normal colorectal mucosa, adenomas and carcinomas. *Histopathology.* 2004 Jan;44(1):9-17.
96. Watson AJ. Apoptosis and colorectal cancer. *Gut.* 2004 Nov;53(11):1701-9.
97. Tatebe S, Ishida M, Kasagi N, Tsujitani S, Kaibara N, Ito H. Apoptosis occurs more frequently in metastatic foci than in primary lesions of human colorectal carcinomas: analysis by terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling. *Int J Cancer.* 1996 Jan 17;65(2):173-7.

-
98. Carr NJ. M30 expression demonstrates apoptotic cells, correlates with in situ end-labeling, and is associated with Ki-67 expression in large intestinal neoplasms. *Arch Pathol Lab Med.* 2000 Dec;124(12):1768-72.
99. Bauer KD, Lincoln ST, Vera-Roman JM, Wallemark CB, Chmiel JS, Madurski ML, et al. Prognostic implications of proliferative activity and DNA aneuploidy in colonic adenocarcinomas. *Lab Invest.* 1987 Sep;57(3):329-35.
100. Schutte B, Reynders MM, Wiggers T, Arends JW, Volovics L, Bosman FT, et al. Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA content and proliferative activity in large bowel carcinoma. *Cancer Res.* 1987 Oct 15;47(20):5494-6.
101. Witzig TE, Loprinzi CL, Gonchoroff NJ, Reiman HM, Cha SS, Wieand HS, et al. DNA ploidy and cell kinetic measurements as predictors of recurrence and survival in stages B2 and C colorectal adenocarcinoma. *Cancer.* 1991 Aug 15;68(4):879-88.
102. Chang WC, Chapkin RS, Lupton JR. Predictive value of proliferation, differentiation and apoptosis as intermediate markers for colon tumorigenesis. *Carcinogenesis.* 1997 Apr;18(4):721-30.
103. Schwandner O, Schiedeck TH, Bruch HP, Duchrow M, Windhoevel U, Broll R. Apoptosis in rectal cancer: prognostic significance in comparison with clinical histopathologic, and immunohistochemical variables. *Dis Colon Rectum.* 2000 Sep;43(9):1227-36.
104. Sinicrope FA, Hart J, Hsu HA, Lemoine M, Michelassi F, Stephens LC. Apoptotic and mitotic indices predict survival rates in lymph node-negative colon carcinomas. *Clin Cancer Res.* 1999 Jul;5(7):1793-804.

-
105. de Bruin EC, van de Velde CJ, van de Pas S, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Gosens MJ, et al. Prognostic value of apoptosis in rectal cancer patients of the dutch total mesorectal excision trial: radiotherapy is redundant in intrinsically high-apoptotic tumors. *Clin Cancer Res.* 2006 Nov 1;12(21):6432-6.
106. Kim YH, Lee JH, Chun H, Nam SJ, Lee WY, Song SY, et al. Apoptosis and its correlation with proliferative activity in rectal cancer. *J Surg Oncol.* 2002 Apr;79(4):236-42.
107. Rodel C, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, Bigalke M, Gunther K, Schick C, et al. Apoptosis as a cellular predictor for histopathologic response to neoadjuvant radiochemotherapy in patients with rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002 Feb 1;52(2):294-303.
108. Sunter JP, Hull DL, Appleton DR, Watson AJ. Cell proliferation of colonic neoplasms in dimethylhydrazine-treated rats. *Br J Cancer.* 1980 Jul;42(1):95-102.
109. Hao X, Du M, Bishop AE, Talbot IC. Imbalance between proliferation and apoptosis in the development of colorectal carcinoma. *Virchows Arch.* 1998 Dec;433(6):523-7.
110. Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, Vogt M, Muller C, Dopfer K, et al. Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer.* 1996 Jan 15;77(2):255-64.
111. Kikuchi Y, Dinjens WN, Bosman FT. Proliferation and apoptosis in proliferative lesions of the colon and rectum. *Virchows Arch.* 1997 Aug;431(2):111-7.

-
112. Koike M. Significance of spontaneous apoptosis during colorectal tumorigenesis. *J Surg Oncol*. 1996 Jun;62(2):97-108.
113. Partik G, Kahl-Rainer P, Sedivy R, Ellinger A, Bursch W, Marian B. Apoptosis in human colorectal tumours: ultrastructure and quantitative studies on tissue localization and association with bak expression. *Virchows Arch*. 1998 May;432(5):415-26.
114. Sinicrope FA, Roddey G, McDonnell TJ, Shen Y, Cleary KR, Stephens LC. Increased apoptosis accompanies neoplastic development in the human colorectum. *Clin Cancer Res*. 1996 Dec;2(12):1999-2006.
115. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol*. 2005 Mar;202(3):654-62.
116. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956 Feb 24;123(3191):309-14.
117. Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, Yoshida Y, Tanabe M, et al. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev*. 2003 Dec;29(6):541-9.
118. Morris ME, Felmlee MA. Overview of the Proton-coupled MCT (SLC16A) Family of Transporters: Characterization, Function and Role in the Transport of the Drug of Abuse gamma-Hydroxybutyric Acid. *Aaps J*. 2008 Jun 4.
119. Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch*. 2004 Feb;447(5):619-28.

-
120. Fang J, Quinones QJ, Holman TL, Morowitz MJ, Wang Q, Zhao H, et al. The H⁺-linked monocarboxylate transporter (MCT1/SLC16A1): a potential therapeutic target for high-risk neuroblastoma. *Mol Pharmacol*. 2006 Dec;70(6):2108-15.
121. Wahl ML, Owen JA, Burd R, Herlands RA, Nogami SS, Rodeck U, et al. Regulation of intracellular pH in human melanoma: potential therapeutic implications. *Mol Cancer Ther*. 2002 Jun;1(8):617-28.
122. Ladanyi M, Antonescu CR, Drobnjak M, Baren A, Lui MY, Golde DW, et al. The precystalline cytoplasmic granules of alveolar soft part sarcoma contain monocarboxylate transporter 1 and CD147. *Am J Pathol*. 2002 Apr;160(4):1215-21.
123. Froberg MK, Gerhart DZ, Enerson BE, Manivel C, Guzman-Paz M, Seacotte N, et al. Expression of monocarboxylate transporter MCT1 in normal and neoplastic human CNS tissues. *Neuroreport*. 2001 Mar 26;12(4):761-5.
124. Mathupala SP, Parajuli P, Sloan AE. Silencing of monocarboxylate transporters via small interfering ribonucleic acid inhibits glycolysis and induces cell death in malignant glioma: an in vitro study. *Neurosurgery*. 2004 Dec;55(6):1410-9; discussion 9.
125. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL, Sivridis E. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res*. 2006 Jan 15;66(2):632-7.
126. Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfor K, Rofstad EK, et al. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res*. 2000 Feb 15;60(4):916-21.

127. Azuma M, Shi M, Danenberg KD, Gardner H, Barrett C, Jacques CJ, et al. Serum lactate dehydrogenase levels and glycolysis significantly correlate with tumor VEGFA and VEGFR expression in metastatic CRC patients. *Pharmacogenomics*. 2007 Dec;8(12):1705-13.
128. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Gatter KC, Harris AL. Lactate dehydrogenase 5 expression in operable colorectal cancer: strong association with survival and activated vascular endothelial growth factor pathway--a report of the Tumour Angiogenesis Research Group. *J Clin Oncol*. 2006 Sep 10;24(26):4301-8.
129. Pires AR, Andreiuolo Fda M, de Souza SR. TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built needles. *Diagn Pathol*. 2006;1:14.
130. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Scapulatempo C, Ferreira L, Martins S, Pellerin L, et al. Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas. *Virchows Arch*. 2008 Feb;452(2):139-46.
131. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1981;29:577-80.
132. Jass JR, O'Brien MJ, Riddell RH, Snover DC. Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma. *Virchows Arch*. 2007 Jan;450(1):1-13.
133. Yoshida K, Yoshimatsu K, Otani T, Yokomizo H, Ogawa K. The depth of tumor invasion beyond the outer border of the muscularis propria as a prognostic factor for T3 rectal/rectosigmoid cancer. *Anticancer Res*. 2008 May-Jun;28(3B):1773-8.

-
134. Saad RS, Kordunsky L, Liu YL, Denning KL, Kandil HA, Silverman JF. Lymphatic microvessel density as prognostic marker in colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2006 Oct;19(10):1317-23.
135. Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *Faseb J*. 2002 Jul;16(9):922-34.
136. van der Voort van Zijp J, Hoekstra HJ, Basson MD. Evolving management of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2008 Jul 7;14(25):3956-67.
137. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
138. Jass JR, Love SB, Northover JM. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet*. 1987 Jun 6;1(8545):1303-6.
139. Jass JR, Ajioka Y, Allen JP, Chan YF, Cohen RJ, Nixon JM, et al. Assessment of invasive growth pattern and lymphocytic infiltration in colorectal cancer. *Histopathology*. 1996 Jun;28(6):543-8.
140. Ono M, Sakamoto M, Ino Y, Moriya Y, Sugihara K, Muto T, et al. Cancer cell morphology at the invasive front and expression of cell adhesion-related carbohydrate in the primary lesion of patients with colorectal carcinoma with liver metastasis. *Cancer*. 1996 Sep 15;78(6):1179-86.
141. Roncucci L, Fante R, Losi L, Di Gregorio C, Micheli A, Benatti P, et al. Survival for colon and rectal cancer in a population-based cancer registry. *Eur J Cancer*. 1996 Feb;32A(2):295-302.
142. Park SY, Kim HS, Hong EK, Kim WH. Expression of cytokeratins 7 and 20 in primary carcinomas of the stomach and colorectum and their value in the differential diagnosis of metastatic carcinomas to the ovary. *Hum Pathol*. 2002 Nov;33(11):1078-85.

143. Tot T. The role of cytokeratins 20 and 7 and estrogen receptor analysis in separation of metastatic lobular carcinoma of the breast and metastatic signet ring cell carcinoma of the gastrointestinal tract. *Apmis*. 2000 Jun;108(6):467-72.
144. Tot T, Samii S. The clinical relevance of cytokeratin phenotyping in needle biopsy of liver metastasis. *Apmis*. 2003 Dec;111(12):1075-82.
145. Cooper D, Schermer A, Sun TT. Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations. *Lab Invest*. 1985 Mar;52(3):243-56.
146. Moll R. Cytokeratins in the histological diagnosis of malignant tumors. *Int J Biol Markers*. 1994 Apr-Jun;9(2):63-9.
147. Taylor CR. Principles of immunomicroscopy 3rd Edition ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier; 2006.
148. Chausovsky G, Luchansky M, Figer A, Shapira J, Gottfried M, Novis B, et al. Expression of cytokeratin 20 in the blood of patients with disseminated carcinoma of the pancreas, colon, stomach, and lung. *Cancer*. 1999 Dec 1;86(11):2398-405.
149. Dai L, Song Q, Li L, Zhong D, Hui Y. [Expression of cytokeratin 7 and 20 in ovarian metastatic carcinomas]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2001 Apr;30(2):114-7.
150. Harnden P, Allam A, Joyce AD, Patel A, Selby P, Southgate J. Cytokeratin 20 expression by non-invasive transitional cell carcinomas: potential for distinguishing recurrent from non-recurrent disease. *Histopathology*. 1995 Aug;27(2):169-74.
151. Ji H, Isacson C, Seidman JD, Kurman RJ, Ronnett BM. Cytokeratins 7 and 20, Dpc4, and MUC5AC in the distinction of metastatic mucinous carcinomas in the ovary from primary ovarian mucinous tumors: Dpc4 assists in identifying metastatic pancreatic carcinomas. *Int J Gynecol Pathol*. 2002 Oct;21(4):391-400.

-
152. Chesa PG, Rettig WJ, Melamed MR. Expression of cytokeratins in normal and neoplastic colonic epithelial cells. Implications for cellular differentiation and carcinogenesis. *Am J Surg Pathol*. 1986 Dec;10(12):829-35.
153. Nanashima A, Yamaguchi H, Shibasaki S, Sawai T, Yasutake T, Tsuji T, et al. Proliferation of hepatic metastases of colorectal carcinoma: relationship to primary tumours and prognosis after hepatic resection. *J Gastroenterol Hepatol*. 1999 Jan;14(1):61-6.
154. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 1994 Apr 15;73(8):2013-26.
155. Lambert DW, Wood IS, Ellis A, Shirazi-Beechey SP. Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy. *Br J Cancer*. 2002 Apr 22;86(8):1262-9.
156. Gambhir SS. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer*. 2002 Sep;2(9):683-93.
157. Yasuda S, Fujii H, Nakahara T, Nishiumi N, Takahashi W, Ide M, et al. 18F-FDG PET detection of colonic adenomas. *J Nucl Med*. 2001 Jul;42(7):989-92.
158. Gatenby RA, Gawlinski ET, Gmitro AF, Kaylor B, Gillies RJ. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res*. 2006 May 15;66(10):5216-23.
159. Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, Maluta S, Dalla Palma P, Caffo O, et al. Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol*. 1994 Mar;12(3):454-66.

-
160. Weidner N. Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. *Semin Diagn Pathol*. 1993 Nov;10(4):302-13.
161. Paradiso A, Simone G, Lena MD, Leone B, Vallejo C, Lacava J, et al. Expression of apoptosis-related markers and clinical outcome in patients with advanced colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2001 Mar 2;84(5):651-8.
162. Tenjo T, Toyoda M, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, Tanaka K, et al. Prognostic significance of p27(kip1) protein expression and spontaneous apoptosis in patients with colorectal adenocarcinomas. *Oncology*. 2000;58(1):45-51.
163. Hilska M, Collan YU, VJ OL, Kossi J, Hirsimaki P, Laato M, et al. The significance of tumor markers for proliferation and apoptosis in predicting survival in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2005 Dec;48(12):2197-208.
164. Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Yokoo T, Ishii T. Histopathologic determinants of regional lymph node metastasis in early colorectal cancer. *Cancer*. 2008 Feb 15;112(4):924-33.
165. Okabe S, Shia J, Nash G, Wong WD, Guillem JG, Weiser MR, et al. Lymph node metastasis in T1 adenocarcinoma of the colon and rectum. *J Gastrointest Surg*. 2004 Dec;8(8):1032-9; discussion 9-40.
166. Sakuragi M, Togashi K, Konishi F, Koinuma K, Kawamura Y, Okada M, et al. Predictive factors for lymph node metastasis in T1 stage colorectal carcinomas. *Dis Colon Rectum*. 2003 Dec;46(12):1626-32.
167. Jass JR, Barker M, Fraser L, Walsh MD, Whitehall VLJ, Gabrielli B, et al. APC mutation and tumour budding in colorectal cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 2002;56:69-73.

-
168. Ueno H, Murphy J, Jass JR. Tumor "budding" as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. . *Histopathology*. 2002;40:127-32.
169. Brabletz T, Jung A, Hermann K, Günter K, Hohenberger W, Kirchner T. Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathology Research Practice*. 1998;194(10):701-4.
170. Hori H, Fujiori T, Fujii S, Ichikawa K, Ohkura Y, Tomita S, et al. Evaluation of tumor cell dissociation as a predictive marker of lymph node metastasis in submucosal invasive colorectal carcinoma. *Diseases of the Colon & Rectum*. 2005;48:938-45.
171. Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, Gown AM. CDX2, a Highly Sensitive and Specific Marker of Adenocarcinomas of Intestinal Origin: An Immunohistochemical Survey of 476 Primary and Metastatic Carcinomas. *American Journal of Surgical Pathology*. 2003;27(3):303-10.

APÊNDICES

Peritumoural, but not intratumoural, lymphatic vessel density and invasion correlate with colorectal carcinoma poor-outcome markers

Adhemar Longatto-Filho · Céline Pinheiro ·
Luísa Ferreira · Cristovam Scapulatempo ·
Venancio A. F. Alves · Fátima Baltazar ·
Fernando Schmitt

Received: 3 September 2007 / Revised: 2 November 2007 / Accepted: 10 November 2007 / Published online: 18 December 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract To evaluate whether lymphatic vessel density (LVD) and lymphatic vessel invasion (LVI) are useful markers of worse outcome in colorectal carcinoma and if LVD and LVI correlate to the classical clinical-pathological parameters, we analysed 120 cases of colorectal carcinomas selected from the files of Division of Pathology, Hospital das Clínicas, São Paulo University, Brazil. Assessment of LVD and LVI was performed by immunohistochemical detection of lymphatic vessels, using the monoclonal antibody D2-40. Higher LVD was found in the intratumoural area, when comparing with normal and peritumoural areas ($p < 0.001$). However, peritumoural LVD, but not intratumoural, correlated with both colonic-wall-invasion depth ($p = 0.037$) and liver metastasis ($p = 0.012$). Remarkably, LVI was found

associated with local invasion ($p = 0.016$), nodal metastasis ($p = 0.022$) and hepatic metastasis ($p < 0.001$). Peritumoural LVD and LVI are directly related to histopathological variables indicative of poor outcome such as lymph-node status and liver metastasis.

Keywords D2-40 · Colorectal carcinoma · Metastasis · Lymphatic vessel density · Lymphatic invasion · Lymph-node invasion

Introduction

Colorectal carcinoma is one of the most prevalent malignancies, being a common cause of cancer-related death, and its incidence is continuously increasing worldwide. The estimated 2006 cancer rates in Europe were 3,191,600 cancer cases diagnosed (excluding non-melanoma skin cancer) and 1,703,000 related deaths. Colorectal cancer was the second most common form of cancer (412,900, 12.9% of all cancer cases) and also the second most common cause of death from cancer (207,400 deaths or 12.2%) [6]. Since lymphatic-vessel network is recognized as the first conduit for colon-carcinoma metastasis, lymph-node invasion has been considered a marker of worse prognosis [11], as well as the number of lymph nodes examined and compromised by the carcinoma, distinguishing mesenteric tumour deposits from replaced lymph nodes. These variables should be searched together with the assessment of tumour grade, depth of wall penetration, blood-vessel invasion and tumour stage [21]. It must be acknowledged, however, that accurate identification of each criterion of this traditional checklist may not be straightforward [8]. Moreover, present assessment of these histo-

A. Longatto-Filho (✉) · C. Pinheiro · L. Ferreira · F. Baltazar
Life and Health Sciences Research Institute (ICVS),
School of Health Sciences, University of Minho,
4710-057 Braga, Portugal
e-mail: longatto@ecsau.de.uminho.pt

A. Longatto-Filho
Instituto Adolfo Lutz,
São Paulo, Brazil

C. Scapulatempo · V. A. F. Alves
LIM14-Department of Pathology,
São Paulo University School of Medicine,
São Paulo, Brazil

F. Schmitt
IPATIMUP,
Porto, Portugal

F. Schmitt
Medical Faculty of the University of Porto,
Porto, Portugal

pathological features not always predicts individual outcome; therefore, additional approaches have been studied [4]. It is becoming increasingly clear that additional factors, both morphological and molecular, will be needed for future clinical management. Recent studies have also shown potential approaches for blocking the growth of lymphatic vessels to prevent tumour metastasis [1]. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 pathway by specific antibodies has been reported to efficiently inhibit experimental tumour lymphangiogenesis and metastasis [24]. Moreover, recent experimental data recognized that mice lymphatic vessels have substantial plasticity during the early postnatal period, but not after that, thus suggesting that anti-lymphangiogenic therapy could possibly be safely applied to adults [9].

The search for more reproducible morphological markers and a better understanding of molecular signalling of lymphatic sprout in cancer scenario is a very motivating challenge due to the possible repercussion both in prognostic assessment and in most accurately understanding metastasis mechanisms. Recently, positive correlation between lymphatic vessel density (LVD), lymphatic vessel invasion (LVI), depth of invasion and metastases to regional lymph nodes and the liver has been reported [8]. Also, lymphatic vessel invasion was found to be related with lymph-node metastasis, and both lymphatic microvessel density and lymphatic vessel invasion were also correlated to poor outcome [13]. The preliminary findings have consistently found a positive correlation between LVD and LVI and adverse outcome [13]. However, these results are not unanimously accepted and should be cautiously considered because the degree of lymphangiogenesis alone was not recognised as an independent prognostic factor for colorectal cancer [16]. Furthermore, in spite of the potential usefulness of lymphatic microvessel density evaluations as prognostic factor, no clear-cut positive correlation has been reported between the degree of lymphangiogenesis and clinical outcome, and more data from different series are still necessary to validate these findings [20].

For this reason, herein we investigated if increased LVD as well as LVI in the primary tumour, in a large series of colon carcinomas, correlated to histopathological markers indicative of poor outcome, such as depth of tumour invasion, lymph node and liver metastasis.

Materials and methods

A series of formalin-fixed, paraffin-embedded samples from 120 colorectal carcinoma cases was retrieved from the files of the Division of Pathology, Hospital das Clinicas, São Paulo University School of Medicine (São Paulo, Brazil).

The tumours were primarily categorised according to WHO classification [7] and staged according to Tumor, Node, Metastases (TNM) classification. Clinic-pathological variables included: age, gender, macroscopic presentation, tumour size, depth of invasion, lymph-node status, TNM staging and hepatic metastasis.

D2-40 immunohistochemistry

Immunohistochemistry was carried out using the avidin–biotin–peroxidase complex assay, with the monoclonal antibody D2-40 (DAKO, Carpinteria, CA, USA) raised against an *O*-linked sialoglycoprotein. Briefly, deparaffinized and re-hydrated sections were immersed in 0.01 M citrate buffer (pH 6.0) and heated at 98°C for 20 min; slides were, then, incubated with 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 30 min, followed by incubation with Normal Horse Serum (Vector Laboratories, CA, USA) for 20 min, at room temperature, before incubating with the primary antibody diluted 1:100, overnight at 4°C. Sections were then sequentially washed in phosphate-buffered saline 1× and incubated with Biotinylated Universal Secondary antibody (Vector Laboratories) for 30 min, Vectastain® Elite ABC reagent (Vector Laboratories) for 45 min at 37°C, developed with 3,3'-diamino-benzidine (DAKO) for 10 min and counterstained with hematoxylin–eosin. Negative controls were performed by omitting the primary antibody and, as positive control, tonsil tissue was used.

Immunohistochemical evaluation

Immunohistochemical reaction of D2-40 was evaluated considering its expression in the membrane/cytoplasm of endothelial cells. Evaluation was performed blindly, and LVD was assessed as described by Weidner et al [23] with slight modification. For LVD assessment, microvessel was defined as a single endothelial cell or a cluster of endothelial cells positive for D2-40, sitting around a visible lumen clearly separate from adjacent microvessels and from other connective-tissue components. Additionally, as lymphatic vessels could generally appear as distorted and overlapped structures in cancer setting, the packed vessels were assumed as one lymphatic unit. The number of vessels was quantified at ×200 magnification. The median of microvessels counted in ten hot-spot fields was defined as LVD. Each hot spot corresponds to a number of vessels confined to an area of 0.15 mm². Additionally, a cut-point of 4 micro-vessel invasion (median LVI value, evaluated in the same areas where LVD was analysed) was used for comparison with pathological variables. Both LVD and LVI were evaluated using D2-40 immunostained lymphatic vessels.

Statistical analysis

Data were stored and analyzed using the SPSS statistical software (for Windows, version 14.0, Chicago, IL, USA). The Shapiro–Wilk test was applied to assess normality of the results. Data was examined for statistical significance using the Student's *t*, the one-way analysis of variance (ANOVA), the Mann–Whitney *U*, the Kruskal–Wallis and the Pearson's chi-square (χ^2) tests, as appropriate, being threshold for significance *p* values <0.05.

Results

We have studied 120 colon carcinoma samples from patients with a median age of 64, ranging from 24 to 95 years, which included 53 women and 67 men.

The median value of LVD, assessed by D2-40 immun-expression, in intratumoural areas was significantly higher than those in normal stroma ($p < 0.001$, Fig. 1). In addition, intratumoural LVD counting exhibited about twofold more lymphatics than at the periphery of the tumour ($p < 0.001$, Table 1).

Table 2 depicts the correlation between the clinical-pathological variables and LVD (peri- and intratumoural). No association was found between age or gender of patients and tumoural LVD (data not shown). Peritumoural LVD was associated with depth of wall invasion ($p = 0.037$), hepatic metastasis ($p = 0.012$) and TNM staging ($p = 0.044$). We found significant differences ($p < 0.001$) between the evaluation of lymphatic invasion with the specific lymphatic marker D2-40 and haematoxylin–eosin stain: 74.2% (89 of 120) against 48.3% (58 of 120), respectively.

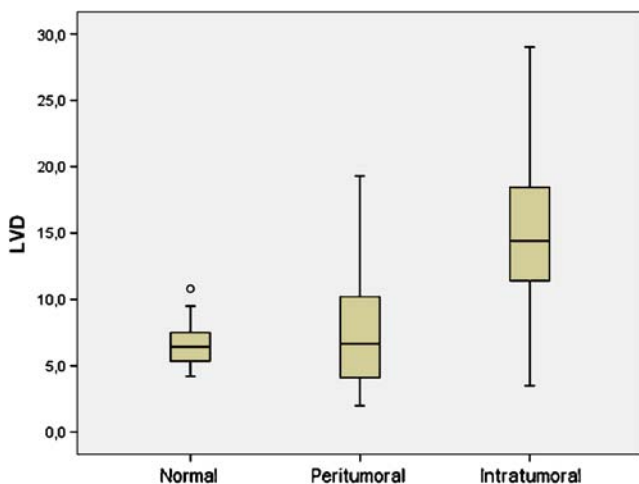


Fig. 1 Representation of lymphatic vessel density among the different colorectal areas

Table 1 Comparison of lymphatic vessel density (LVD) among the different tissue regions using the Student's *t* test

Tissue regions	LVD (median)	<i>p</i>
Normal vs peritumoural	6.4 vs 6.8	0.682
Normal vs intratumoural	6.4 vs 14.6	<0.001
Peritumoural vs intratumoural	6.8 vs 14.6	<0.001

The median values represent the number of lymphatic vessels counted in hot-spot areas.

Table 3 shows the correlation between invasion, presented both as positive and as number of invaded vessels (above the median value), and the histopathological variables. As for vessel density, no correlations were found between lymphatic invasion and age of diagnosis or gender (data not shown). Lymphatic invasion (Fig. 2) was significantly associated with presence of nodal metastasis ($p = 0.022$), and a trend for cases with hepatic metastasis to present lymphatic invasion ($p = 0.064$) was also observed. When considering the number of invaded lymphatic vessels (>4), we found a significant correlation with depth of invasion ($p = 0.018$), the presence of both nodal and hepatic

Table 2 Associations of LVD with the histopathological data

Histopathological variables	<i>n</i>	Peritumoural LVD ^a		Intratumoural LVD ^b	
		Median	<i>P</i>	Mean	<i>p</i>
Tumour size			0.116		0.817
≤5	65	6.1		15.0	
>5	54	7.1		15.2	
Macroscopic type			0.574		0.792
Exofitric	24	6.4		15.6	
Ulcerative	45	6.0		14.5	
Infiltrative	12	8.9		14.5	
Sessile-ulcerated	39	6.8		15.6	
Depth of invasion			0.037		0.551
T1 + T2	22	5.4		14.4	
T3 + T4	98	7.2		15.2	
Nodal metastasis			0.414		0.660
Absent	60	6.8		14.8	
Present	60	6.4		15.3	
TNM			0.044		0.937
I	16	4.8		14.6	
II	33	7.1		14.9	
III	36	5.6		15.0	
IV	35	9.1		15.6	
Hepatic metastasis			0.012		0.559
Absent	85	5.8		14.9	
Present	35	9.1		15.6	

^a Mann–Whitney *U* test and Kruskal–Wallis test were used when sample-grouping >2 (data do not follow a normal distribution)

^b Student's *t* test and one-way ANOVA were used when sample-grouping >2 (data follow a normal distribution)

Table 3 Relationship between lymphatic invasion and clinical-pathological parameters using the Pearson's chi-square (χ^2) test

	<i>n</i>	Positive invasion		Invasion ≥ 4	
		%	<i>p</i>	%	<i>p</i>
Tumour size			0.696		0.790
≤ 5	65	75.4		29.2	
> 5	54	72.2		31.5	
Macroscopic type			0.128		0.943
Exofitic	24	66.7		25.0	
Ulcerative	45	68.9		31.1	
Infiltrative	12	100.0		33.3	
Sessile-ulcerated	39	76.9		30.8	
Depth of invasion			0.212		0.018
T1 + T2	22	63.6		9.1	
T3 + T4	98	76.5		34.7	
Nodal metastasis			0.022		0.046
Absent	60	65.0		21.7	
Present	60	83.3		38.3	
TNM			0.107		0.009
I	16	68.8		12.5	
II	33	60.6		21.2	
III	36	77.8		25.0	
IV	35	85.7		51.4	
Hepatic metastasis			0.064		0.001
Absent	85	69.4		21.2	
Present	35	85.7		51.4	

metastasis ($p=0.046$ and $p=0.001$, respectively) and TNM staging ($p=0.009$).

Discussion

In the present study, we found a significant difference between LVD in the normal mucosa and intratumoural stroma ($p<0.001$). The results herein reported strongly correlated both peritumoural LVD and peritumoural LVI with the presence of hepatic metastasis. This association was already described within tumoural areas and reinforces the importance of our results. Recently, Parr and Jiang [18] elegantly described lymph-vessel expression by using real-time quantitative polymerase chain reaction assay for several lymphangiogenic markers and found that VEGFR-3, Prox-1, podoplanin and 5'-nucleotidase were higher expressed in colorectal carcinoma in comparison to the normal mucosa. Indeed, we found similar LVD in normal and peritumoural area but higher LVD in the intratumoural area ($p<0.001$). This is interesting because one can hypothesise that intratumoural area is more liable to receive lymphangiogenic stimulation during the carcinogenic development [15]. In spite of that, higher LVD does not necessarily mean that these conduits are more prone to facilitate metastatic spread; on the contrary, our results

strengthened that intratumoural lymphatics in fact are not adequate route for malignant-cell escape and that functional lymphatics in the tumour margin are sufficient for lymphatic metastasis [17]. Recently, Kuroyama et al. [10] found higher intratumoural lymphatic density in cases with lymph-node metastasis than in those without metastasis but, as we found in our study, they did not observe correlation with tumour size, depth of tumour invasion, distant metastasis or TNM stage. Interestingly, we did not find significant correlations between both peritumoural and intratumoural LVD and lymph-node metastasis, even considering that we found a higher intratumoural LVD.

The number of lymph nodes evaluated after surgical resection is positively associated with survival of patients with stage II and stage III colon cancer [3]. Saad and collaborators [19] found that high LVD correlates with both depth of invasion and lymph-node metastasis. We found a significant association between peritumoural LVD and depth of invasion ($p<0.037$) and between the number of lymphatic vessels invaded by the tumour and depth of invasion ($p<0.018$). Liang et al. [11] emphasised that lymphatic microvessel density is important in colorectal carcinoma to predict lymph-node metastases mainly associated to lymphatic vessels' diameter (not assessed in the present study).

Importantly, we observed a strong correlation between peritumoural LVD and lymphatic invasion (≥ 4 lymphatic vessels invaded; $p=0.0001$) and hepatic metastasis ($p=0.012$). It is well known that, at the time of diagnosis of colorectal cancer, 20% of the patients already have liver metastasis, and 30% of the patients will develop metastasis afterwards [14, 19]. These findings could be decisive for future investigations regarding the surgical resection options of the colorectal hepatic metastasis [3]. Furthermore, tumour cells metastasized to the liver have certainly

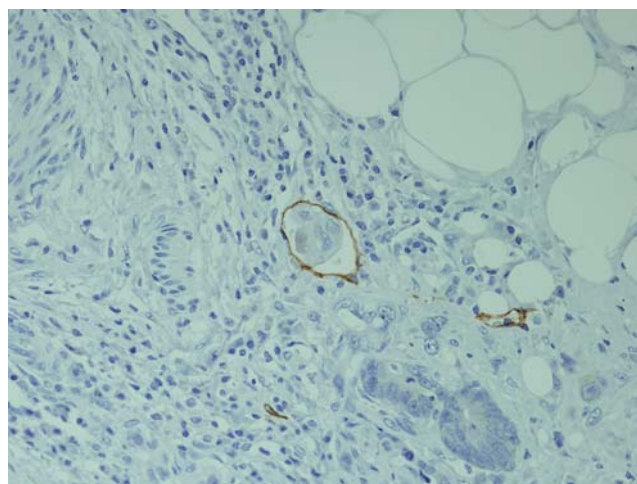


Fig. 2 Peritumoural lymphatic vessel invasion (D2-40 staining, $\times 40$ magnification)

crossed the hepatic sinusoidal endothelial barrier and completed steps of metastatic cascade [2]. Accordingly, further studies exploring the earlier stages of colorectal metastasis, proliferation and new vessel formation as well as mechanisms to disturb cell survival are needed [5]. The more exciting results were observed with lymphatic invasion highlighted by D2-40, which positively correlated with the lymph-node status and liver metastasis. Cases with more than four lymphatic vessels invaded showed significantly more hepatic metastasis. Indeed, the correlation we observed between lymphatic invasion and TNM staging ($p=0.009$) also corroborates the above-mentioned findings. In contrast to these findings, some recent data indicate that extensive lymphangiogenesis indeed occurs in colorectal carcinoma, but there are controversial data concerning the value of the degree of lymphangiogenesis as an independent prognostic factor [13, 16]. The significant differences found between lymphatic invasion evaluated with haematoxylin–eosin stain and with the lymphatic marker D2-40 ($p<0.001$) emphasises the importance of the use of a specific marker to identify lymphatics. As compared with blood capillaries, lymphatic vessels, principally those within the tumour mass, have poorly developed junctions with frequently large inter-endothelial gaps, with discontinuous or completely absent basement membranes. The recent discovery of specific lymphatic vessel markers and their corresponding antibodies have aided the identification of lymphatic vessels. Indeed, D2-40 importantly enhances the lymphatic endothelial cells borders, highlighting the presence of lymphatic invasion in the tumours [19].

Colorectal carcinoma is one of the most prevalent cancers worldwide, and lymphatic metastatic route was long considered as an important parameter of worse outcome [8]. Due to the recent development of finer immunohistochemical markers, lymphangiogenesis was re-discovered in oncologic pathology enabling more accurate counting of LVD in all types of neoplasms, with special emphasis on carcinomas [12]. The results herein presented, using the specific lymphatic marker D2-40, indicate that peritumoural LVD and LVI are reliable parameters to predict poor prognosis and contribute to identify patients more prone to develop hepatic metastasis.

Conflict of interest statement We declare that we have no conflict of interest.

References

- Achen MG, Mann GB, Stacker SA (2006) Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis. *Br J Cancer* 94:1355–1360
- Braet F, Nagatsuma K, Saito M, Soon L, Wisse E, Matsuura T (2007) The hepatic sinusoidal endothelial lining and colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol* 13:821–825
- Chang GJ, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, Moyer VA (2007) Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer: systematic review. *J Natl Cancer Inst* 99:433–441
- Compton CC (2003) Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol* 16:376–388
- Des Guez G, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere JF, Benamouzig R, Breau JL, Perret GY (2006) Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *Br J Cancer* 94:1823–1832
- Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P (2007) Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 18:581–592
- Hamilton SR, Aaltonen LA (eds) (2000). World Health Organization classification of tumours. Tumours of the digestive system. IARC Press, Lyon, France
- Jass JR, O'Brien MJ, Riddell RH, Snover DC, on behalf of the Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology (2007) Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 38:537–545
- Karpanen T, Wirzenius M, Mäkinen T, Veikkola T, Haisma HJ, Achen MG, Stacker SA, Pytowski B, Ylä-Herttuala S, Alitalo K (2006) Lymphangiogenic growth factor responsiveness is modulated by postnatal lymphatic vessel maturation. *Am J Pathol* 169:708–718
- Kuroyama S, Kobayashi N, Ohbu M, Ohtani Y, Okayasu I, Kakita A (2005) Enzyme histochemical analysis of lymphatic vessels in colon carcinoma: occurrence of lymphangiogenesis within the tumour. *Hepatogastroenterology* 52:1057–1061
- Liang P, Hong JW, Ubukata H, Liu HR, Watanabe Y, Katano M, Motohashi G, Kasuga T, Nakada I, Tabuchi T (2006) Increased density and diameter of lymphatic microvessels correlate with lymph node metastasis in early stage invasive colorectal carcinoma. *Virchows Arch* 448:570–575
- Longatto-Filho A, Pinheiro C, Pereira SM, Etlinger D, Moreira MA, Jubé LF, Queiroz GS, Baltazar F, Schmitt FC (2007) Lymphatic vessel density and epithelial D2-40 immunoreactivity in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 107:45–51
- Matsumoto K, Nakayama Y, Inoue Y, Minagawa N, Katsuki T, Shibao K, Tsurudome Y, Hirata K, Nagata N, Itoh H (2007) Lymphatic microvessel density is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 50:308–314
- Nishio H, Hamady ZZ, Malik HZ, Fenwick S, Rajendra Prasad K, Toogood GJ, Lodge JP (2007) Outcome following repeat liver resection for colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 33:729–734
- Oliver G, Alitalo K (2005) The lymphatic vasculature: recent progress and paradigms. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:457–483
- Omachi T, Kawai Y, Mizuno R, Nomiyama T, Miyagawa S, Ohhashi T, Nakayama J (2007) Immunohistochemical demonstration of proliferating lymphatic vessels in colorectal carcinoma and its clinicopathological significance. *Cancer Lett* 246:167–172
- Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC, Mathisen D, Wain J, Mark EJ, Munn LL, Jain RK (2002) Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 296:1883–1886
- Parr C, Jiang WG (2003) Quantitative analysis of lymphangiogenic markers in human colorectal cancer. *Int J Oncol* 23:533–539
- Saad RS, Kordunsky L, Liu YL, Denning KL, Kandil HA, Silverman JF (2006) Lymphatic microvessel density as prognostic marker in colorectal cancer. *Mod Pathol* 19:1317–1323

20. Sugarbaker PH (2007) Peritoneum as the first-line of defense in carcinomatosis. *J Surg Oncol* 95:93–96
21. Sundlisaeter E, Dicko A, Sakariassen PO, Sondenaa K, Enger PO, Bjerkvig R (2007) Lymphangiogenesis in colorectal cancer—Prognostic and therapeutic aspects. *Int J Cancer* 121:1401–1409
22. Walgenbach-Bruenagel G, Tolba RH, Varnai AD, Bollmann M, Hirner A, Walgenbach KJ (2006) Detection of lymphatic invasion in early stage primary colorectal cancer with the monoclonal antibody D2-40. *Eur Surg Res* 38:438–444
23. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991) Tumour angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324:1–8
24. Wissmann C, Detmar M (2006) Pathways targeting tumour lymphangiogenesis. *Clin. Cancer Res* 12:6865–6868

Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas

Céline Pinheiro · Adhemar Longatto-Filho ·
Cristovam Scapulatempo · Luísa Ferreira ·
Sandra Martins · Luc Pellerin · Mesquita Rodrigues ·
Venancio A. F. Alves · Fernando Schmitt ·
Fátima Baltazar

Received: 10 September 2007 / Revised: 5 November 2007 / Accepted: 6 December 2007 / Published online: 10 January 2008
© Springer-Verlag 2007

Abstract Tumour cells are known to be highly glycolytic, thus producing high amounts of lactic acid. Monocarboxylate transporters (MCTs), by promoting the efflux of the accumulating acids, constitute one of the most important mechanisms in the maintenance of tumour intracellular pH.

Since data concerning MCT expression in colorectal carcinomas (CRC) are scarce and controversial, the present study aimed to assess the expressions of MCT1, 2, and 4 in a well characterized series of CRC and assess their role in CRC carcinogenesis. CRC samples (126 cases) were analyzed for MCT1, MCT2, and MCT4 immunoexpression and findings correlated with clinico-pathological parameters. Expression of all MCT isoforms in tumour cells was significantly increased when compared to adjacent normal epithelium. Remarkably, there was a significant gain of membrane expression for MCT1 and MCT4 and loss of plasma membrane expression for MCT2 in tumour cells. Plasma membrane expression of MCT1 was directly related to the presence of vascular invasion. This is the larger study on MCT expression in CRC and evaluates for the first time its clinico-pathological significance. The increased expression of these transporters suggests an important role in CRC, which might justify their use, especially MCT1 and MCT4, as targets in CRC drug therapy.

C. Pinheiro · A. Longatto-Filho · L. Ferreira · S. Martins ·
F. Baltazar (✉)
Life and Health Sciences Research Institute (ICVS),
School of Health Sciences, University of Minho,
Campus de Gualtar,
4710-057 Braga, Portugal
e-mail: fbaltazar@ecsau.de.uminho.pt

A. Longatto-Filho
Instituto Adolfo Lutz,
São Paulo, Brazil

C. Scapulatempo · V. A. F. Alves
Department of Pathology,
University of São Paulo School of Medicine,
São Paulo, Brazil

S. Martins · M. Rodrigues
S. Marcos Hospital,
Braga, Portugal

L. Pellerin
Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne,
Lausanne, Switzerland

F. Schmitt
Institute of Pathology and Immunology of University of Porto
(IPATIMUP),
Porto, Portugal

F. Schmitt
Medical Faculty of the University of Porto,
Porto, Portugal

Keywords Monocarboxylate transporter ·
Colorectal carcinoma

Introduction

Highly proliferative cancer cells maintain a high rate of glycolysis, producing large amounts of acids, mainly lactic acid. Despite this fact, only the interstitial pH of tumours is low, while the intracellular pH of tumours is either normal or higher than that of normal tissues [3, 10]. In order to prevent apoptosis by cellular acidosis, tumour cells increase proton efflux through pH regulators, such as proton pumps, sodium-proton exchangers, bicarbonate transporters, and

monocarboxylate transporters (MCTs), which are described to be up-regulated in tumour cells [11].

MCTs play a central role in cellular metabolism and are essential for transport of monocarboxylates, such as lactate, across the plasma membrane. Based on sequence homologies, 14 MCT family members were identified, although only a few have been functionally characterized. MCT1–MCT4 isoforms are proton symporters, which have lactate as a common substrate, each isoform exhibiting different biochemical properties [9]. Substrate specificity has been associated with the tissue distribution of each transporter, depending on their metabolic activity: MCT1 has an ubiquitous distribution [6], while MCT2, having a high affinity for the substrate, is found in tissues that use lactate as a substrate (e.g., liver) [2]. MCT4, which is a low-affinity transporter, is present in highly glycolytic tissues (e.g., slow-twitch muscle) [4] and MCT3 is exclusively found in the retinal pigment epithelium and in the choroid plexus epithelium [16].

Using *in vitro* and *ex vivo* models, Wahl et al. [19] demonstrated that MCTs are major players in the regulation of pH in melanoma cells and proposed that MCT inhibitors may be particularly effective against malignant melanoma. There are also evidence for the upregulation of MCTs in other tumours such as alveolar sarcoma of soft tissues [13], high grade glial neoplasms [7, 15], and colorectal carcinomas (CRC) [12].

Lactate release from tumour cells is a common endpoint of several metabolic alterations, raising the hypothesis of an association with tumour progression [21]. Some evidence support this hypothesis: low interstitial pH is associated with the upregulation of various angiogenic molecules, which support tumour growth, invasion, and metastasis such as vascular endothelial growth factor [8]. Lactate accumulation has also been associated with metastization and lower disease-free and overall survival in squamous cell carcinomas of the uterine cervix and head and neck carcinomas [1, 20]. Targeting MCT activity would not only induce apoptosis due to cellular acidosis, but would also lead to reduction in tumour angiogenesis, invasion, and metastasis. Thus, MCTs can constitute an attractive target for cancer therapy.

Data concerning expression of MCTs in CRC are scarce and controversial. While Lambert et al. [14] described a decrease in MCT1 expression during transition to malignancy, Koukourakis et al. [12] reported an increase in MCT1 expression in tumour cells, which is supported by the metabolic alterations induced by anaerobic glycolysis. The latter study also assessed the expression of MCT2 and MCT4, finding a strong cytoplasmic expression of MCT2 in cancer cells, but a weak expression of MCT4 in the tumour environment, suggesting a minimal role of this MCT isoform in CRC metabolic homeostasis.

Our study aimed to contribute to the elucidation of the role of MCTs in CRC, by assessing the immunohistochemical expression of the MCT isoforms 1, 2, and 4 in a large and well characterized series of CRC and evaluating its clinico-pathological significance.

Materials and methods

A series of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from 126 CRC was retrieved from the files of the Medical School of the University of São Paulo (Brazil). Tissue samples were analyzed for MCT1, MCT2, and MCT4 immunohistochemical expression using specific antibodies. Comparison of MCT expression in tumour vs normal cells was also possible since, for most cases, the same paraffin section contained both tumour and normal colonic epithelium. MCT immunohistochemical expression was correlated with the available clinico-pathological data, which included: age, gender, tumour size, macroscopic presentation, histological type, tumour localization, depth of invasion, vascular invasion, nodal metastasis, and TNM classification. Normal colorectal mucosa, liver, and skeletal muscle samples were obtained prospectively from patients undergoing surgery: colorectal mucosa and abdominal wall skeletal muscle were obtained from a patient with diagnosis of diverticulosis; liver was from a patient with a diagnosis of metastatic colon carcinoma. Informed written consent was obtained from the individuals prior to removal of the tissue.

Western blotting

The specificity of the antibodies used in immunohistochemistry was evaluated by Western blotting. Tissue samples from human colon, liver, and muscle were used as positive controls for the expression of MCT1, 2, and 4, respectively. Briefly, fresh samples were collected, homogenized in a lysis buffer and then centrifuged at 6,000 rpm, 20 min at 4°C. The supernatants were collected and protein concentrations were determined by the method of Lowry. Protein was separated on a 10% (w/v) polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Membranes were blocked with 1% Tween, 10% milk, and 1% bovine serum albumin in TBS for 1 h. Membranes were then incubated overnight at 4°C with primary polyclonal antibodies for MCT1 (AB3538P, Chemicon International, Temecula, CA, USA), MCT2 (sc-14926, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), and MCT4 (AB3316P, Chemicon International), diluted 1:200 for MCT1 and MCT4, and 1:100 for MCT2. Membranes were then incubated with the secondary

antibody coupled to horseradish peroxidase (SantaCruz Biotechnology) and bound antibodies were visualized by chemiluminescence (Supersignal West Femto kit, Pierce, Rockford, IL, USA).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed according to avidin–biotin–peroxidase complex principle (R.T.U. VECTASTAIN Elite ABC Kit (Universal), Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), with the primary antibodies for MCT1, MCT2, and MCT4, used in Western blotting, diluted 1:200. Briefly, deparaffinized and rehydrated sections were incubated in 0.3% hydrogen peroxide for 30 min, to inactivate endogenous peroxidases, and washed in PBS. Antigen retrieval was performed by immersing slide-mounted sections in 0.01 M citrate buffered solution (pH 6.0) and microwaving (600 W) for 15 min then washed in PBS. Tissue sections were then incubated with a protein blocking solution for 20 min and incubated with the primary antibody overnight at room temperature. Sections were then sequentially washed in PBS and incubated with biotinylated secondary antibody for 30 min, R.T.U. Vectastain® Elite ABC reagent for 45 min at 37°C and developed with 3,3'-diamino-benzidine (DAB+ Substrate System, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) for 10 min. Negative controls were performed by using the adequate serum controls for the primary antibodies used (N1699 and X0907, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA). Normal colon, kidney, and skeletal muscle tissues were used as positive controls for MCT1, MCT2, and MCT4, respectively. Tissue sections were counterstained with haematoxylin and permanently mounted.

Immunohistochemical evaluation

Sections were scored semi-quantitatively for immunoreaction extension as follows: 0: 0% of immunoreactive cells; 1: <5% of immunoreactive cells; 2: 5–50% of immunoreactive cells; and 3: >50% of immunoreactive cells. Also, intensity of staining was scored semi-qualitatively as 0: negative; 1: weak; 2: intermediate; and 3: strong. Immunoreaction final score was defined as the sum of both parameters (extension and intensity), and grouped as negative (0), weak (2), moderate (3), and strong (4–6). For statistical purposes, only moderate and strong immunoreaction final scores were considered as positive. Finally, positive plasma membrane staining was also assessed. Evaluation of MCT immunohistochemical expression was performed blindly by two independent observers and discordant cases were discussed in a double-head microscope in order to determine a final score.



Fig. 1 Western blotting of human tissue lysates for MCT1, 2, and 4. Normal colon, liver, and skeletal muscle were used for MCT1, 2, and 4 detection, respectively

Statistical analysis

Data were stored and analyzed using the SPSS statistical software (version 14.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The comparison of MCT expression between tumour and normal cells as well as the relationship between MCT expressions and the clinico-pathological parameters were examined for statistical significance using Pearson's chi-square (χ^2) test, with the threshold for significant *p* values being <0.05.

Results

One hundred and twenty six cases of CRC, corresponding to 56 women and 70 men with a median age of 64 (range 24–95), were analyzed for MCT1, MCT2, and MCT4 immunohistochemical expression. Western blot analyses of normal human tissues, using the antibodies for the three MCT isoforms, revealed protein bands around 50 kDa (Fig. 1), consistent with the molecular weight described for these membrane proteins [7].

Table 1 summarizes the frequency of MCT isoforms 1, 2, and 4 expressions in tumour cells and normal adjacent epithelium. In positive cases, cytoplasmic staining was always present while the frequency of plasma membrane staining differed for each isoform, being more frequent for

Table 1 Pattern of MCT staining in tumour vs normal adjacent epithelium

Isoform	<i>n</i>	Immunoreaction		Plasma membrane	
		Positive (%)	<i>p</i>	Positive (%)	<i>p</i>
MCT1			<0.001		<0.001
Normal	86	34.9		9.3	
Tumour	126	85.7		51.6	
MCT2			0.017		0.031
Normal	84	83.3		14.3	
Tumour	126	93.7		5.6	
MCT4			<0.001		<0.001
Normal	89	55.1		9.0	
Tumour	126	96.0		38.1	

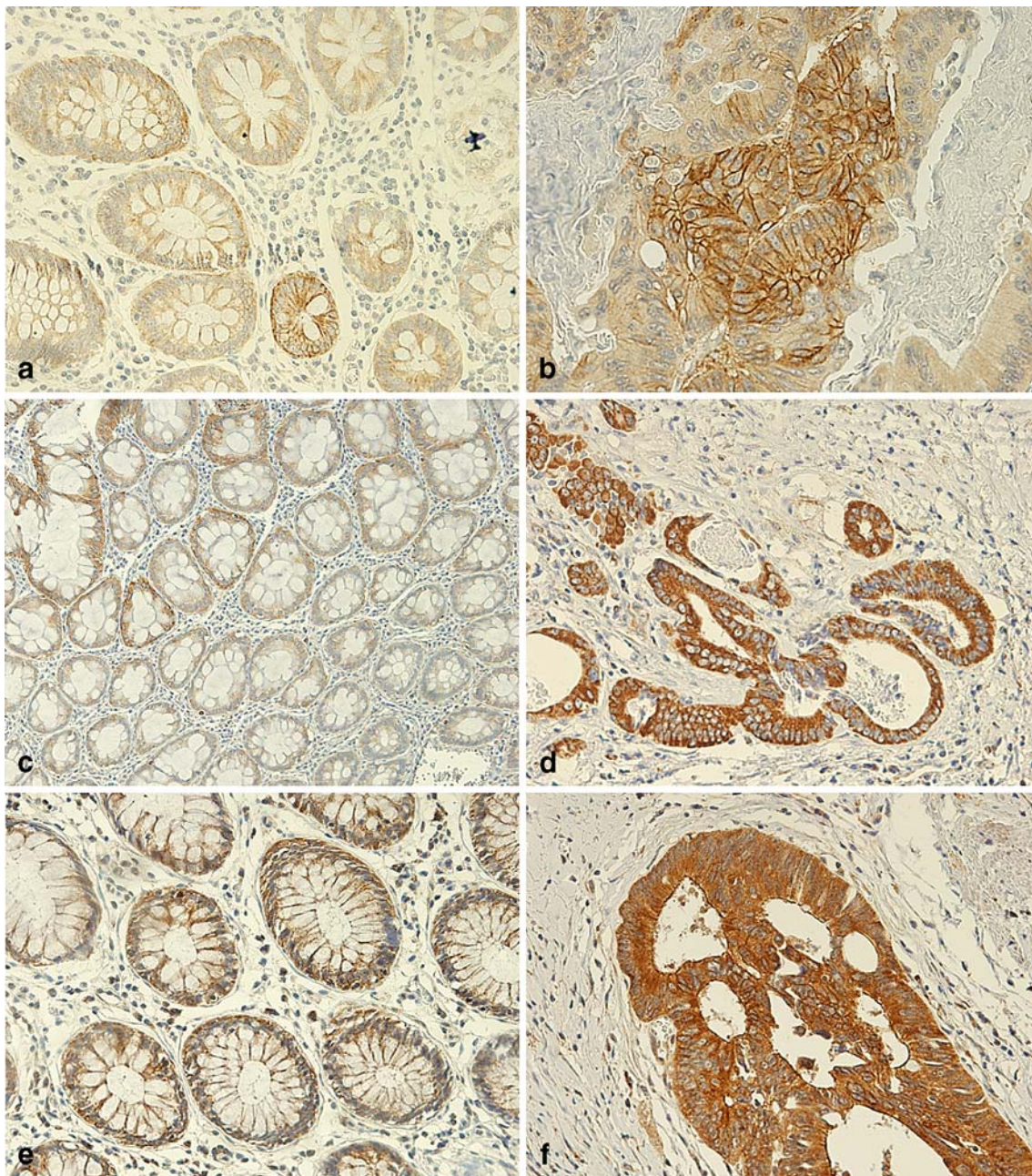


Fig. 2 Immunohistochemical expression of MCT1, 2, and 4 in colon carcinoma samples. Staining in tumour cells (b, d, and f: MCT1, 2, and 4, respectively) was stronger than in the adjacent normal

epithelium (a, c, and e: MCT1, 2, and 4, respectively). MCT1 plasma membrane staining (b) was frequently observed in tumour cells

MCT1 than for the other isoforms (51.6% vs 38.1% for MCT4 vs 5.6% for MCT2).

MCT1 immunoexpression in tumour cells was significantly increased, when compared to adjacent normal epithelium (85.7% vs 34.9%, $p < 0.001$, Table 1). Importantly, plasma membrane staining was also significantly more frequent in tumour than in normal cells (51.6% vs 9.3%, $p < 0.001$, Table 1). Plasma membrane expression of MCT1 (Fig. 2) was directly related to the presence of vascular invasion ($p = 0.003$, Table 2).

Staining for MCT2 in tumour cells was also more frequent than in the adjacent normal epithelium (93.7% vs 83.3%; $p = 0.017$, Table 1). Remarkably, there was a significant loss of plasma membrane staining in tumour cells (14.3% vs 5.6%; $p < 0.001$, Table 1). Although it was possible to observe “granule” like cytoplasmic staining for all MCT isoforms, this pattern was much more common for MCT2 in tumour cells (Fig. 2).

MCT4 was the most frequently expressed isoform in tumour cells, with 96% of the cases showing positive

Table 2 Assessment of correlation between MCTs membrane expression and the clinico-pathological data

Clinical data	Plasma membrane						
	MCT1			MCT2		MCT4	
	<i>n</i>	Positive (%)	<i>p</i>	Positive (%)	<i>p</i>	Positive (%)	<i>p</i>
Tumour size (cm)			0.897		0.117		0.572
<5	53	50.9		1.9		35.8	
≥5	71	52.1		8.5		40.8	
Macroscopic type			0.826		0.360		0.548
Exophytic	26	46.2		0.0		30.8	
Ulcerative	49	55.1		8.2		40.8	
Infiltrative	12	58.3		0.0		25.0	
Sessile-ulcerated	39	48.7		7.7		43.6	
Histological type			0.563		0.551		0.586
Adenocarcinoma	111	50.5		5.4		38.7	
Mucinous	10	60.0		10.0		30.0	
Localization ^a			0.261		0.474		0.923
Right colon	21	42.9		4.8		38.1	
Left colon	40	45.0		2.5		40.0	
Rectum	61	59.0		8.2		36.1	
Invasion			0.251		0.208		0.829
T1+T2	22	40.9		0.0		36.4	
T3+T4	103	54.4		6.8		38.8	
Vascular invasion ^b			0.003		0.090		0.400
Absent	57	36.8		1.8		42.1	
Present	69	63.8		8.7		34.8	
Nodal metastasis			0.212		0.697		1.000
Absent	63	46.0		4.8		38.1	
Present	63	57.1		6.3		38.1	
TNM			0.408		0.722		0.276
Stage I	16	43.8		0.0		31.3	
Stage II	35	42.9		5.7		40.0	
Stage III	38	60.5		7.9		28.9	
Stage IV	36	55.6		5.6		50.0	

^a Tumour localization was grouped as follows: right colon—cecum and ascendant colon; left colon—splenic flexure, descendant colon, sigmoid and rectosigmoid.

^b Vascular invasion includes both lymph and blood vessel invasion.

staining, and expression was significantly more frequent than adjacent normal epithelium ($p < 0.001$, Table 1). Figure 2 shows representative cases of MCT4 positive staining in tumour cells and in adjacent normal epithelium. As observed for MCT1, MCT4 plasma membrane staining in tumour cells was significantly more frequent than in the adjacent normal epithelium ($p < 0.001$, Table 1). Assessment of correlation between MCT4 expression and the clinico-pathological data revealed a positive association between MCT4 positivity and small size tumours ($p = 0.049$, Table 3).

Discussion

Experimental evidence point at MCTs as potential targets for cancer therapy [5, 15, 19]. However, the role of these

membrane proteins in solid tumour development and survival is not fully understood. In the present study, we showed an evident increase in MCT immunorexpression in CRC cells when compared to adjacent normal epithelium. Most importantly, we evaluated the correlation between MCT expression in CRC and clinico-pathological data for the first time.

Although MCT1 is described as having a ubiquitous distribution, it appears that this MCT isoform plays an important role in the bidirectional transport of lactate and other short-chain fatty acids across the colonic luminal membrane [17]. Unexpectedly, when analysing MCT expression in the available adjacent normal epithelium, we found that MCT1 was the least expressed isoform. However, since these normal tissue areas are in the surroundings of tumour cells, we cannot rule out the possibility that these areas are under the influence of

Table 3 Assessment of correlation between MCTs immunoreaction and the clinico-pathological data

Clinical data	Immunoreaction						
	N	MCT1		MCT2		MCT4	
		Positive (%)	<i>p</i>	Positive (%)	<i>P</i>	Positive (%)	<i>p</i>
Tumour size (cm)			0.383		0.117		0.049
<5	53	88.7		98.1		100.0	
≥5	71	83.1		91.5		93.0	
Macroscopic type			0.267		0.967		0.480
Exophytic	26	76.9		92.3		100.0	
Ulcerative	49	89.8		93.9		93.9	
Infiltrative	12	75.0		91.7		91.7	
Sessile-ulcerated	39	89.7		94.9		97.4	
Histological type			0.509		0.413		0.542
Adenocarcinoma	111	87.4		93.7		96.4	
Mucinous	10	80.0		100.0		100.0	
Localization ^a			0.586		0.714		0.900
Right colon	21	81.0		90.5		95.2	
Left colon	40	82.5		95.0		95.0	
Rectum	61	88.5		95.1		96.7	
Invasion			0.220		0.570		0.292
T1+T2	22	77.3		90.9		100.0	
T3+T4	103	87.4		94.2		95.1	
Vascular invasion ^b			0.942		0.081		0.810
Absent	57	86.0		89.5		96.5	
Present	69	85.5		97.1		95.7	
Nodal metastasis			0.611		1.000		0.648
Absent	63	84.1		93.7		95.2	
Present	63	87.3		93.7		96.8	
TNM			0.610		0.591		0.238
Stage I	16	75.0		87.5		100.0	
Stage II	35	85.7		97.1		91.4	
Stage III	38	86.8		92.1		94.7	
Stage IV	36	88.9		94.4		100.0	

^a Tumour localization was grouped as follows: right colon—cecum and ascendant colon; left colon—splenic flexure, descendant colon, sigmoid and rectosigmoid.

^b Vascular invasion includes both lymph and blood vessel invasion.

tumour microenvironment and could show altered MCT expression. It would then be important to further analyze MCT expression in a series of normal colorectal samples. Data concerning MCT1 expression in solid tumours is scarce and there are conflicting data related to CRC [12, 14, 17]. Our immunohistochemical findings are in agreement with the results of Koukourakis et al. [12]. Although using different antibodies from this previous study, we were also able to detect a high percentage of positive cases for MCT1 expression as well as MCT1 plasma membrane expression in a high number of cases. However, these findings diverge from previous reports, where the authors described a decrease in MCT1 expression in CRC during transition from normality to malignancy [14, 17]. Concerning the clinico-pathological data, we found a significant correlation between MCT1 plasma membrane staining and vascular invasion. MCT1 plasma membrane localization is essential

for transporter activity and, assuming a role in the efflux of accumulating acids, MCT1 activity would lead to extracellular acidification. Then, the positive correlation between MCT1 plasma membrane staining and vascular invasion would be in harmony with previous reports which stated that extracellular acidification induces invasion [10].

Data concerning MCT2 expression in solid tumour is also limited. Contrasting with the results presented by Lambert et al. [14], we found expression of MCT2 in both adjacent normal epithelium and tumour cells in CRC. The staining pattern was cytoplasmic and, in a low number of cases, associated with the plasma membrane. Notably, we found a significant decrease in plasma membrane staining in tumour cells, when comparing to adjacent normal epithelium. This finding is in agreement with the results of Koukourakis et al. [12], who described lack of plasma membrane expression in tumour cells but a strong cyto-

plasmic expression. The authors hypothesized that this cytoplasmic expression was probably associated with the presence of MCT2 in mitochondrial membranes. Taking into consideration the physiological role of MCT2 in the transport of pyruvate into the mitochondria, one could hypothesize that the highly glycolytic tumour cell would up-regulate MCT2 in an attempt to oxidize the excess pyruvate produced. This process would also contribute to the “removal” of the acid accumulated in the cytoplasm.

Concerning MCT4, we found it to be the most frequently expressed isoform in tumour cells, an expression which was significantly increased when compared to the adjacent normal epithelium. These findings contrast with the results of Lambert et al. [14], who did not find MCT4 expression in colon carcinoma and with the results of Koukourakis et al. [12], who described weak MCT4 expression in the tumour environment. This discrepancy could be related to the specificity of the antibodies used. In our study, the frequency of MCT4 staining in tumour cells was significantly different from the adjacent normal epithelium, which, together with the Western blot results, led us to believe in the specificity of the antibody used. We also found an increase in MCT4 plasma membrane staining in tumour cells when comparing with the adjacent normal epithelium. This fact supports the hypothesis that MCTs are important in the efflux of accumulated acids in tumour cells, specially MCT4 which, due to its low affinity for lactate, would be important in highly glycolytic cells [4]. We can thus postulate that MCT4 presence in the plasma membrane will allow continuous glycolytic rate (by “removing” the end product), prevention of apoptosis due to intracellular acidification and contribution to cancer cell survival. Evaluation of the correlation between MCT4 expression and clinico-pathological data revealed positive associations with tumour size, however the correlation is weak ($p=0.049$). Nevertheless, assuming that the glycolysis rate in smaller tumours is higher than in bigger tumours [18], and considering the role of MCT4 in lactate efflux, it is understandable that MCT4 activity would not be so crucial in bigger-sized tumours.

One of the most notable findings in this study was the significant gain of MCT1 and MCT4 plasma membrane expression and loss of MCT2 plasma membrane expression in cancer cells. Since MCTs need to be in the plasma membrane in order to export the accumulating acids in highly glycolytic cells, and taking into consideration the substrate affinities of the different isoforms, MCT1 and MCT4 expression in the membrane is in agreement with the metabolic alterations observed in cancer cells. On the other hand, MCT2, which is involved in the uptake of monocarboxylates into the cells in normal cell metabolism [2], does not appear to have an important role in highly glycolytic cancer cells.

This is the most comprehensive study on MCT expression in CRC and the above findings point to MCTs, specially MCT1 and MCT4, as playing an important role in CRC. MCT aberrant expression might justify future studies using these proteins as targets in CRC drug therapy. So far, however, the level of human toxicity and efficacy of the known MCT inhibitors are not currently known [7] and the search for effective and safe inhibitors would be of great value.

Acknowledgments CP received a PhD fellowship from Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/BD/27465/2006).

Conflict of interest statement We declare that we have no conflict of interest.

References

1. Brizel DM, Schroeder T, Scher RL, Walenta S, Clough RW, Dewhirst MW, Mueller-Klieser W (2001) Elevated tumour lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51:349–353
2. Broer S, Broer A, Schneider HP, Stegen C, Halestrap AP, Deitmer JW (1999) Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J* 341:529–535
3. Dang CV, Semenza GL (1999) Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 24:68–72
4. Dimmer KS, Friedrich B, Lang F, Deitmer JW, Broer S (2000) The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J* 1:219–227
5. Fang J, Quinones QJ, Holman TL, Morowitz MJ, Wang Q, Zhao H, Sivo F, Maris JM, Wahl ML (2006) The H⁺-linked monocarboxylate transporter (MCT1/SLC16A1): a potential therapeutic target for high-risk neuroblastoma. *Mol Pharmacol* 70:2108–2115
6. Fishbein WN, Merezhinskaya N, Foellmer JW (2002) Relative distribution of three major lactate transporters in frozen human tissues and their localization in unfixed skeletal muscle. *Muscle Nerve* 26:101–112
7. Froberg MK, Gerhart DZ, Enerson BE, Manivel C, Guzman-Paz M, Seacotte N, Drewes LR (2001) Expression of monocarboxylate transporter MCT1 in normal and neoplastic human CNS tissues. *Neuroreport* 12:761–765
8. Fukumura D, Xu L, Chen Y, Gohongi T, Seed B, Jain RK (2001) Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res* 61:6020–6024
9. Halestrap AP, Meredith D (2004) The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 447:619–628
10. Helmlinger G, Sckell A, Dellian M, Forbes NS, Jain RK (2002) Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clin Cancer Res* 8:1284–1291
11. Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, Yoshida Y, Tanabe M, Ise T, Murakami T, Yoshida T, Nomoto M, Kohno K (2003) Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 29:541–549
12. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL, Sivridis E (2006) Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res* 66:632–637
13. Ladanyi M, Antonescu CR, Drobnjak M, Baren A, Lui MY, Golde DW, Cordon-Cardo C (2002) The precystalline cytoplasmic

- granules of alveolar soft part sarcoma contain monocarboxylate transporter 1 and CD147. *AJP* 160:1215–1221
14. Lambert DW, Wood IS, Ellis A, Shirazi-Beechey SP (2002) Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy. *Br J Cancer* 86:1262–1269
 15. Mathupala SP, Parajuli P, Sloan AE (2004) Silencing of monocarboxylate transporters via small interfering ribonucleic acid inhibits glycolysis and induces cell death in malignant glioma: an in vitro study. *Neurosurgery* 55:1410–1419
 16. Philp NJ, Yoon H, Lombardi L (2001) Mouse MCT3 gene is expressed preferentially in retinal pigment and choroid plexus epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:1319–1326
 17. Ritzhaupt A, Wood IS, Ellis A, Hosie KB, Shirazi-Beechey SP (1998) Identification and characterization of a monocarboxylate transporter (MCT1) in pig and human colon: its potential to transport L-lactate as well as butyrate. *J Physiol* 513:719–732
 18. Vaupel P (2004) The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* 9:10–17
 19. Wahl ML, Owen JA, Burd R, Herlands RA, Nogami SS, Rodeck U, Berd D, Leeper DB, Owen CS (2002) Regulation of intracellular pH in human melanoma: potential therapeutic implications. *Mol Cancer Ther* 1:617–628
 20. Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfor K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W (2000) High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* 60:916–921
 21. Walenta S, Schroeder T, Mueller-Klieser W (2004) Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. *Curr Med Chem* 11:2195–2204

Clinicopathologic and Immunohistochemistry Characterization of Synchronous Multiple Primary Gastric Adenocarcinoma

Ulysses Ribeiro Jr · Uana M. Jorge ·
Adriana V. Safatle-Ribeiro · Osmar K. Yagi ·
Cristovam Scapulatempo · Rodrigo O. Perez ·
Carlos E. P. Corbett · Venâncio A. F. Alves ·
Bruno Zilberstein · Joaquim Gama-Rodrigues

Published online: 22 February 2007
© 2007 The Society for Surgery of the Alimentary Tract

Abstract The aim of this investigation was to evaluate clinicopathologic and immunohistochemical characteristics of synchronous primary gastric adenocarcinomas. Immunohistochemistry for p53 (suppressor pathway) and for hMLH1, hMSH2, and hMSH6 (mutator pathway) was performed using ABC-technique amplification by biotinylated tyramide. Synchronous primary gastric adenocarcinomas were detected in 19/553 (3.43%) of the patients. The tumors were localized in distal stomach in 22, body in 14, and proximal in five. There was a predominance of intestinal type in the group of synchronic tumors compared to the solitary lesions, 73.2 vs 37.3%, $p=0.001$. Synchronous neoplasias were diagnosed in earlier stage than solitary neoplasias, T1–T2=60.9% vs T1–T2=28.4%, $p=0.0001$; and N0=68.4% vs N0=26.2%, $p=0.001$. p53 was detected in 52.6% of the patients with synchronous tumors. Altered hMLH1 immunoreactivity occurred in 26.3% of the patients and hMSH6 in 5.3%. hMSH2 immunoreactivity was positive in all tumors. p53 was solely detected in 17 tumors, while hMLH1 was altered in 10/24 negative p53 tumors, $p=0.01$. Synchronous gastric adenocarcinomas presented higher frequency of intestinal type and early gastric cancer in comparison to solitary gastric cancer. Two routes of carcinogenesis, mutator, and suppressor appear to be involved independently in the development of synchronous tumors.

Keywords Synchronous primary gastric adenocarcinoma · Immunohistochemistry · p53 · hMLH1 · hMSH2 · hMSH6

Introduction

Gastric carcinoma is the fourth most common carcinoma and the second leading cause of cancer death worldwide.¹ The prevalence of multiple independent primary gastric adenocarcinoma is high in Japan, ranging from 4 to 10%^{2–4}; however, in Western patients, the occurrence of these tumors

are largely unknown.^{3,5} Synchronous primary gastric adenocarcinomas (SPGA) are significantly more often associated with adenomas, atrophic gastritis, or intestinal metaplasia than solitary carcinomas, suggesting that multiple primary carcinomas more frequently occur when associated with precancerous conditions.^{5,6} It has also been reported that secondary cancers occur more frequently in patients with multiple primary gastric cancers than in those with a single gastric cancer.⁷ These data may imply that patient with multiple primary gastric cancers may have a genetic predisposition to the development of cancer.

Tumor multiplicity is widely accepted as an indicator of the genetic predisposition for developing a neoplasm.⁸ On the other hand, the routes of carcinogenesis have not been clearly clarified in these multiple gastric tumors: the mutator pathway due to defects in DNA mismatch repair genes, and the suppressor pathway due to defects in tumor suppressor genes.⁹

Moreover, the presence of SPGA in the same stomach at the time of resection may alter the extension of surgical treatment. It is noteworthy to investigate the background of

This manuscript was presented at the 47th Annual Meeting of the Society for Surgery of the Alimentary Tract, Los Angeles, CA, May 20–25, 2006.

U. Ribeiro Jr (✉) · U. M. Jorge · A. V. Safatle-Ribeiro ·
O. K. Yagi · C. Scapulatempo · R. O. Perez · C. E. P. Corbett ·
V. A. F. Alves · B. Zilberstein · J. Gama-Rodrigues
Departments of Gastroenterology and Pathology,
University of São Paulo School of Medicine,
São Paulo, São Paulo 01327-002, Brazil
e-mail: ulyssesribeiro@terra.com.br

synchronous primary carcinomas because this may influence the surgical resection management process.² Nowadays, wedge resection by laparotomy or laparoscopy and endoscopic mucosal resection are performed for well-differentiated lesions of small diameter that are confined to the gastric mucosa. Thus, it is essential to determine that no other malignancy exist in the stomach of a patient who will undergo such a limited procedure.

Thus, the aim of this investigation was to evaluate clinicopathological characteristics of SPGA compared to the solitary adenocarcinomas, and to verify specific immunohistochemical alterations in the SPGA. We performed immunohistochemical analysis on 41 tumors from 19 synchronous gastric cancer patients. We examined hMLH1, hMSH2, and hMSH6 immunohistochemistry, which are representative of the mutator phenotype and p53 immunorepression for the suppressor pathway.

Material and Methods

This study was approved by the Hospital Ethics Committee of the University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil. Hospital records from 1995 to 2003 of the gastric cancer patients regarding the presence of SPGA were retrospectively reviewed, and compared with patients who had solitary adenocarcinomas in the same period. During the studied period, 553 patients were submitted to gastric resections and SPGA were detected in 19 patients (3.43%).

Synchronous primary gastric adenocarcinoma was defined as secondary gastric cancer found simultaneously or within 1 year after the detection of the initial gastric cancer. The diagnosis criteria for multiple gastric cancers were the same as those of Moertel et al.¹⁰: (a) each lesion must be of pathologically proven malignancy; (b) the tumors must be separated by each other by intervals of microscopically normal gastric wall; and (c) the possibility that one of the lesions represents a local extension or a metastatic tumor must be ruled out.

None of the patients with synchronous gastric cancers included in the present series had a family history suggestive of gastric cancer or hereditary colorectal cancer.

Histopathologic and Immunohistochemical Evaluation

Histologic slides were reviewed to confirm the histopathologic diagnosis of SPGA by H&E, and corresponding formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks were sectioned for immunohistochemical analysis. Five to six unstained 4 μ m blank histologic sections were cut from each designated block. One blank was used for p53

immunostaining (suppressor pathway) (p53-NCL p53-DO7, Novocastra, Newcastle, UK) and the others for hMLH1, hMSH2, and hMSH6 (mutator pathway) (hMLH1-clone G168-728, Pharmigen, San Diego, CA, EUA; hMSH2-clone G219-1129, Pharmigen, San Diego, CA, EUA; and hMSH6-Pharmigen, San Diego, CA, EUA), using the ABC-immunohistochemistry technique and amplification by biotinylated tyramide (Dako Cytomation CSA II, Carpinteria, CA, EUA). The microwave oven heating technique for antigen retrieval and immunodetection method has been previously described.^{11,12} Briefly, immunodetection involved the use of 4 μ m thick formalin-fixed paraffin-embedded tissues, treated with 4% hydrogen peroxidase (H_2O_2) in methanol for 35 minutes to eliminate endogenous peroxidase activity. The sections were placed in the microwave oven for 10 minutes for antigen retrieval, rinsed in phosphate-buffered saline (PBS), and incubated with 10% normal horse serum to block nonspecific binding. Upon removal of the serum, the primary monoclonal antibody was applied at room temperature. After further washing with PBS, sections were incubated with biotinylated anti-mouse immunoglobulin for 30 minutes. After washing twice with PBS, the sections were treated with Vectastain Elite horseradish peroxidase complex (Vector Laboratory, Burlingame, CA, USA) for 30 minutes. After another rinse with PBS, the sections were incubated with diaminobenzidine 0.05 and 0.04% H_2O_2 for 20 minutes. After a final wash with distilled water, the sections were counterstained with Harris Alum Hematoxylin, dehydrated through graded alcohols to xylene, and coverslipped. Sections of gastric adenocarcinoma and primary antibody replaced by PBS were used as positive and negative controls, respectively. Specific nuclear immunoreactivity for p53 protein was scored semiquantitatively on a graded scale of 0 through 4 for both intensity and distribution by three investigators in a blinded analysis. p53 was classified solely as positive immunostaining when greater than 2.

hMLH1, hMSH2, and hMSH6 were considered altered when there was a decreased immunorepression or complete absence of the staining. Lymphocytes and normal adjacent epithelium exhibit strong nuclear staining for hMSH2, hMLH1, and hMSH6 and served as positive internal controls for staining these proteins.

Statistical Analysis

Clinicopathological characteristics of the two groups of tumors and immunohistochemical alterations were compared using Fishers' exact probability test and Pearson chi-square test for qualitative data, and Student's *t* test for quantitative data, with two-tailed *p* value at the 5% level considered significant.

Table 1 Clinicopathological Comparisons Between Solitary and Multiple Primary Gastric Adenocarcinomas

	Solitary Tumors	Percentage	Multiple Primary Tumors	Percentage	<i>P</i> Value
Number of patients	553		19		
Mean age	61.2 SD=13.8	–	66.8 SD=15.2	–	0.85 ^a
Gender					
Men	350	63.3	13	68.4	0.60 ^b
Women	203	36.7	6	31.6	
Site of tumor					
Upper third	90	16.3	5	12.2	0.77 ^b
Medium third	110	19.9	14	34.1	
Lower third	337	60.9	22	53.7	
Entire	16	2.9	–	–	
Lauren's classification					
Intestinal	206	37.3	30	73.2	0.001 ^b
Diffuse	307	55.5	11	26.8	
Undifferentiated (mixed)	40	7.2	–	–	
pT (patients)					
T1–T2	167	31.5	9	47.4	0.04 ^b
T3–T4	379	68.5	10	52.6	
pT (tumors)					
T1	66	11.9	24	58.5	0.0001 ^b
T2	91	16.5	1	2.4	
T3	349	63.1	15	36.6	
T4	47	8.5	1	2.4	
pN (patients)					
N0	145	26.2	13	68.4	0.0002 ^b
N1–2	408	73.8	6	31.6	

^a Student's *t* test^b Pearson Chi-square test

Results

The clinicopathological characteristics of the SPGA patients compared to the patients with solitary lesions are presented in Table 1. Thirteen patients (68.4%) were men and the mean age was 66.8 (range=15–81 years old) for SPGA, while there were 350 (63.3%) men and the mean age was 61.2 (SD=13.8) for the solitary adenocarcinoma. Sixteen patients had two separated tumors and three patients had three tumors in the SPGA group. The tumors were located at the upper gastric third in five (12.2%) and 90 (16.3%), medium third in 14 (34.1) and 110 (19.9%), and in the lower third in 22 (52.7) and 337 (60.9%) of the SPGA and solitary tumors, respectively. Figure 1 demonstrates the presence of SPGA in the resected specimen of a patient who underwent total gastrectomy.

In 14 patients, the lesions of SPGA were close to each other (less than 3 cm), while in five patients, the neoplasias were distant in another portion of the stomach (Table 2). SPGA tumors were diagnosed preoperatively by upper endoscopic examination in 38/41 (92.7%); however, in three cases, the second primary was only noted at the pathological examination.

There was no statistical difference between age, gender, and tumor location when a comparison with the solitary lesions was performed (Table 1).

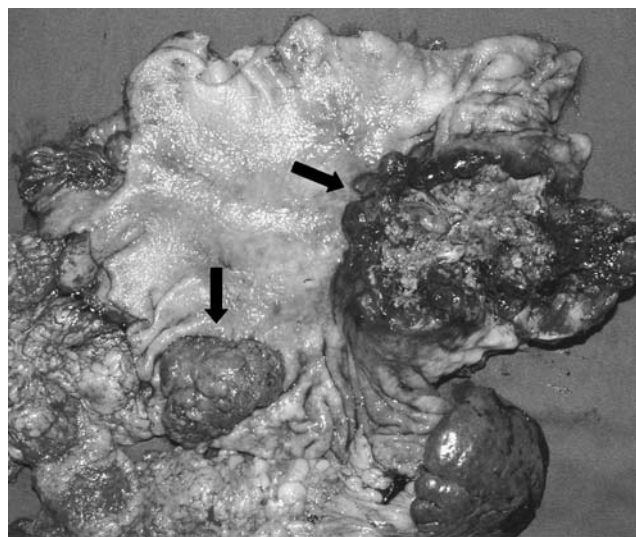


Figure 1 Synchronous primary gastric adenocarcinomas are shown in the resected specimen (arrows).

Table 2 Distribution of 19 Patients with Multiple Primary Gastric Adenocarcinomas According to Clinicopathological Characteristics

Patient	Gender	Age	Lauren			Degree of Differentiation			Site of Tumor			TNM Staging	
			1°	2°	3°	1°	2°	3°	1°	2°	3°	pT	pN
1	F	74	Intes.	Intes.	–	Mod.	Mod.	–	Cardia	Body	–	1	0
2	F	56	Intes.	Intes.	–	Well	Well	–	Antrum	Antrum	–	1	0
3	M	60	Diffuse	Diffuse	–	Poorly	Poorly	–	Antrum	Antrum	–	3	2
4	M	53	Intes.	Diffuse	–	Mod.	Poorly	–	Body	Body	–	4	2
5	M	67	Intes.	Intes.	–	Mod.	Mod.	–	Body	Body	–	3	2
6	F	77	Diffuse	Diffuse	–	Poorly	Poorly	–	Antrum	Antrum	–	3	1
7	M	81	Intes.	Intes.	Intes.	Mod.	Mod.	Mod.	Antrum	Body	Body	3	0
8	F	15	Intes.	Intes.	–	Mod.	Mod.	–	Antrum	Antrum	–	1	0
9	M	52	Intes.	Intes.	Intes.	Mod.	Mod.	Mod.	Antrum	Body	Antrum	3	0
10	M	81	Intes.	Diffuse	–	Poorly	Poorly	–	Antrum	Cardia	–	3	2
11	M	72	Intes.	Intes.	–	Mod.	Mod.	–	Body	Body	–	1	0
12	M	71	Intes.	Intes.	–	Well	Mod.	–	Antrum	Antrum	–	1	0
13	F	74	Intes.	Intes.	–	Mod.	Well	–	Body	Body	–	1	0
14	M	83	Diffuse	Intes.	–	Poorly	Mod.	–	Cardia	Antrum	–	3	0
15	F	74	Intes.	Intes.	–	Well	Well	–	Cardia	Antrum	–	1	0
16	M	61	Intes.	Intes.	–	Mod.	Mod.	–	Antrum	Antrum	–	1	0
17	M	68	Diffuse	Diffuse	–	Poorly	Poorly	–	Antrum	Antrum	–	2	0
18	M	65	Intes.	Intes.	Intes.	Poorly	Poorly	–	Body	Body	–	3	0
19	M	68	Diffuse	Diffuse	–	Poorly	Poorly	–	Cardia	Antrum	Antrum	3	2

F Female, M male, *Intes.* intestinal, *Mod.* moderately

There was a predominance of intestinal type tumors in the group of synchronous tumors compared to the solitary lesions, 73.2 vs 37.3%, $p=0.001$ (Table 1).

Synchronous neoplasias were diagnosed at an earlier stage compared to the solitary neoplasias, so, T1–T2=25 (60.9%) vs T1–T2=157 (28.4%), $p=0.0001$, and N0=13 (68.4%) and 145 (26.2%) vs N1–N2=6 (31.6%) and 408 (73.8%), respectively, $p=0.0002$. The distribution of the clinicopathological characteristics of 19 SPGA are shown in Table 2.

Immunohistochemistry

Nuclear immunoreactivity for p53 was detected in 17 (41.5%) of the SPGA from 10 (52.6%) patients (Fig. 2). In three patients, there was a discordance in the p53 immunoreactivity, i.e., one tumor was immunoreactive and the other negative in the same stomach.

Negative hMLH1 immunoreactivity was noted in 10 (24.4%) tumors from five (26.3%) patients (Fig. 3). There was a concurrence in hMLH1 immunoreactivity in different tumors from the same patient.

Altered hMSH6 immunoreactivity was observed in one patient (5.3%) (Fig. 4). Immunostaining for hMSH2 was positive in all SPGA, indicating absence of alterations of this repair gene marker (Fig. 5).

There was an inverse association between immunoreactivity of hMLH1 and p53 in the diverse tumors from dif-

ferent patients. p53 was solely detected in 17 tumors, while hMLH1 was altered in 10/24 negative p53 tumors, $p=0.01$. Moreover, patients who had positive tumors for p53 did not have any alteration of hMLH1, while patients with hMLH1 alterations did not present any p53 immunoreactivity.

Discussion

Synchronous primary gastric adenocarcinomas may originate from the same genetic background and similar

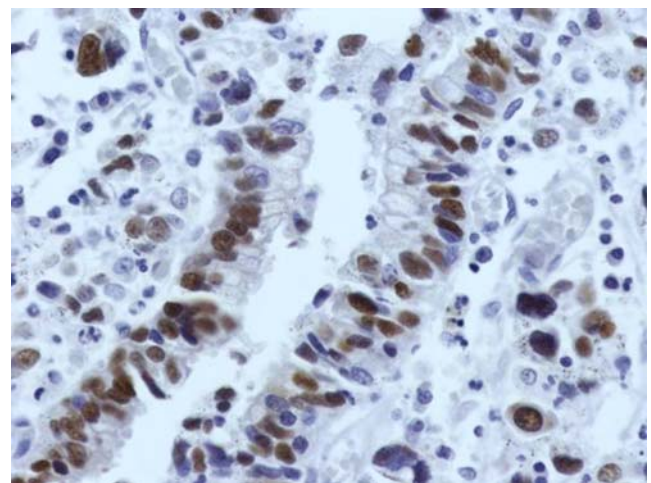


Figure 2 Immunohistochemistry for p53 showing nuclear immunoreactivity in a SPGA (×400).

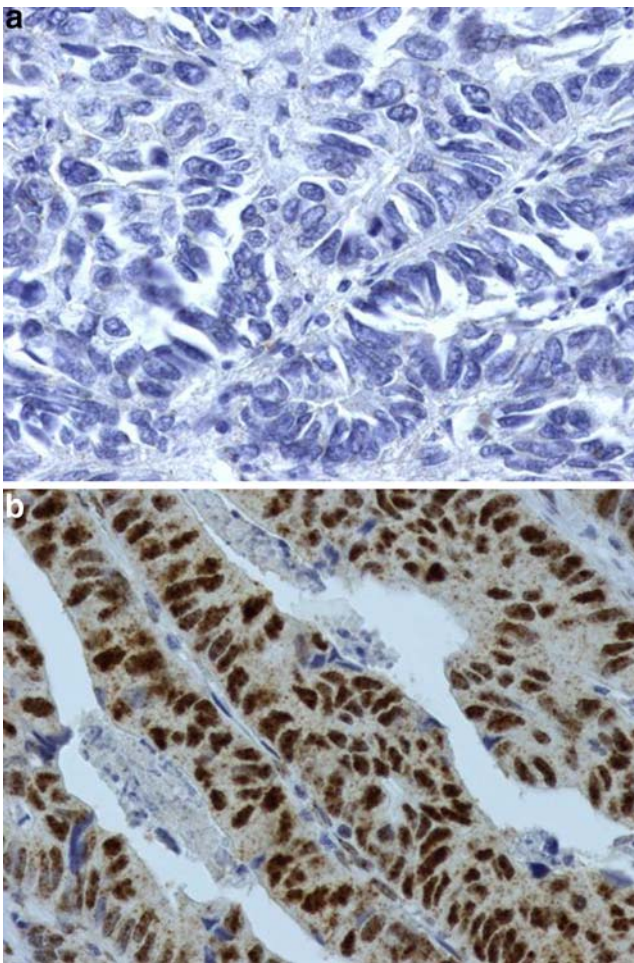


Figure 3 Immunohistochemistry for hMSH1 in SPGA group. **A** Absence of immunoreactivity in altered tumor; and **B** normal tumoral immunoreactivity ($\times 400$).

microenvironment in the stomach.^{2,5} Thus, it might be beneficial to investigate cases of synchronous multiple gastric cancer when considering the mechanisms for carcinogenesis.

Analysis of our data has shown that SPGA occur with similarities regarding age onset, gender, and location of the tumor in the stomach. On the other hand, intestinal type tumors were more frequent in SPGA than in solitary tumors, and the tumors were less invasive, with increased presence of early gastric cancer and N0 tumors in the SPGA group.

In 26% of the cases, the tumors were distant of each other, so the gastric resections have to be enlarged to be effective as R0 resection. Cautious upper endoscopic examination should be performed in all cases of gastric cancer to diagnose secondary lesions, which may affect the surgical management, prognosis, and survival of these patients.

Thus far, no molecular markers have been shown to be clinically useful for predicting which patient will or will not

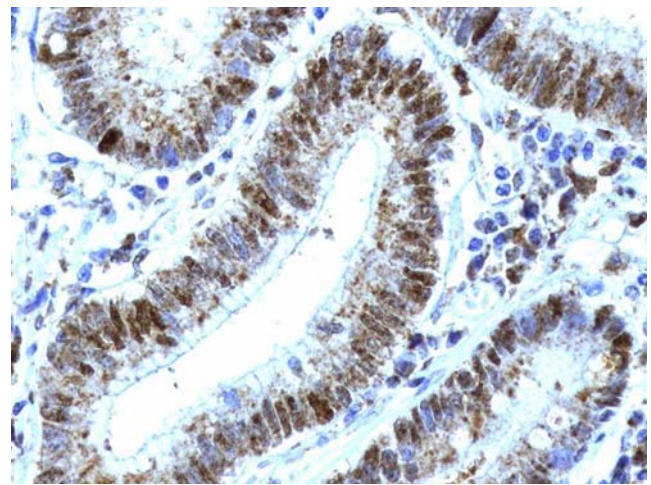


Figure 4 Normal immunohistochemistry for hMSH6 in SPGA ($\times 400$).

have multiple gastric cancers. In this investigation, we explored the two major routes of gastric carcinogenesis, mutator, and suppressor routes in the SPGA to detect alterations that could lead to better knowledge about the carcinogenetic process.

We have used immunohistochemical detection of protein products as an alternative to PCR-based mutational studies, based on the information that: (a) loss of gene expression through epigenetic mechanisms (hMLH1, p16, p21), in the absence of mutations, represents an alternative to germline or somatic mutations in the inactivation of the gene and (b) p53 protein accumulation correlates well with mutational analysis of the gene.¹³

The genetic instability caused by aberrations in mismatch repair genes, including hMSH2, hMLH1, hMSH6, hPMS1, or hPMS2, is characteristic of colorectal carcinomas in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer fami-

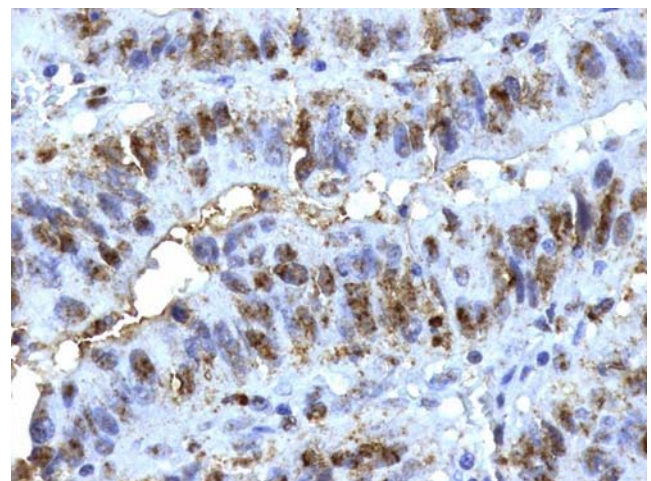


Figure 5 Immunostaining for hMSH2 showing positive nuclei in SPGA, indicating absence of alterations of this repair gene marker ($\times 400$).

lies, but is also found in sporadic forms of colorectal carcinomas and other carcinomas including stomach.^{14,15}

In gastric cancer, the incidence of MSI varies from 15 to 39%^{16–19}; however, there are few reports on MSI in multiple gastric cancers.^{6,20–23} MSI rate in synchronous gastric cancers was higher than that in solitary gastric carcinomas.^{20,22,23}

Although mutations of the hMLH1 or hMHS2 or hMSH6 are rare in gastric cancers; hypermethylation of the promoter region of hMLH1 is the major causative event in the development of human cancers with MSI phenotype.^{12,24} Methylation of the hMLH1 promoter is a frequent event in gastric cancers with MSI-high, both in solitary or multiple primary gastric neoplasias, and the methylation status correlates well with hMLH1 protein expression.^{25–28} Consequently, hMLH1 immunohistochemistry may be used as a marker of MSI-high.

Although there are no researches on methylation of the hMSH6 promoter region in gastric cancers, hypermethylation of the hMSH6 promoter region might also be associated with multiple gastric cancers.

The suppressor pathway has been investigated mainly by p53 immunohistochemical analysis. p53 was positive in 33% of the SPGA.⁵ Kang et al.²⁹ reported that 43% of synchronous gastric carcinomas demonstrated p53 mutations and that most cases showed discordant patterns of mutations in individual cancers.

Our results demonstrate that all patients had concordant immunohistochemistry for hMSH1 (MSI phenotype) and 70% of concordance for p53 immunostaining in cancers of the same individual. These results might be associated with observations that synchronous colorectal cancers showed concordant MSI status.³⁰ There was a concordant protein expression status in the same individual, suggesting a common background of genetic or epigenetic changes of a mismatch repair gene in these cases. Lee et al.⁶ also reported that gastric adenomas and carcinomas in the same individual had the tendency of showing concordant MSI phenotype. Multiple carcinomas and precancerous conditions with MSI phenotype occurred in the same early genetic background. However, the concordant MSI phenotype did not imply a clonal origin because MSI results in multiple cancers showed different patterns.⁶

It is possible that exposure to carcinogens in the same environmental background, rather than genetic factors, is responsible for the development of SPGA. Our data corroborates the hypothesis that multiple gastric cancer is an example of “field cancerization”, i.e., the repeated carcinogenic exposure of an entire field of tissue, which predisposes the field to the development of multiple cancers.²⁹

Previous reports on advanced cancers showed no evidence for the independence of the suppressor pathway, mainly representative of p53 mutations, and the mutator

pathway displaying MSI.³¹ In the present investigation, no cancers displayed p53 or MSI at the same tumor. These data may indicate that the two major pathways are independent of each other, at least in the early stage of multiple gastric cancer development.^{32–34}

Therefore, SPGA presented higher frequency of intestinal type gastric cancer and were diagnosed at lesser advanced stage in comparison to solitary gastric cancer. Careful endoscopic examination of the whole stomach should be performed in patients with gastric cancer, specially for intestinal adenocarcinoma to avoid missed lesions. Two major routes of carcinogenesis, the mutator pathway and the suppressor pathway, appear to be involved independently in the development of SPGA.

Acknowledgements The authors thank Edwin R. Parra for histological review of the specimens and Natália M. Felício and Regina Catarino for their technical assistance.

References

1. Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006;12:354–362.
2. Honmyio U, Misumi A, Murakami A, Hagan Y, Akagi M. Clinicopathological analysis of synchronous multiple gastric carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 1989;15:316–321.
3. Marrano D, Viti G, Grigioni W, Marra A. Synchronous and metachronous cancer of the stomach. *Eur J Surg Oncol* 1987;6:493–498.
4. Kodera Y, Yamamura Y, Torii A, Uesaka K, Iria T, Yasui K. Incidence, diagnosis and significance of multiple gastric cancer. *Br J Surg* 1995;82:1540–1543.
5. Wittekind C, Klimpfinger M, Hermanek P, Tannapfel A. Multiple simultaneous gastric carcinomas. *Br J Cancer* 1997;76:1604–1609.
6. Lee H, Lee BL, Kim SH, Woo DK, Kim HS, Kim WH. Microsatellite instability in synchronous gastric carcinomas. *Int J Cancer* 2001;91:619–624.
7. Kaibara N, Maeta M, Ikeguchi M. Patients with multiple primary gastric cancers tend to develop second primaries in organs other than the stomach. *Surg Today* 1993;23:186–188.
8. Parry DM, Mulvihill JJ, Miller RW, Berg K, Carter CL. Strategies for controlling cancer through genetics. *Cancer Res* 1988;47:6814–6817.
9. Perucho M. Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. *Nat Med* 1996;2:630–631.
10. Moertel CG, Barga JA, Soule EH. Multiple gastric cancers. Review of the Literature and study of 42 cases. *Gastroenterology* 1957;32:1095–1103.
11. Ribeiro U Jr, Finkelstein SD, Safatle-Ribeiro AV, Landreneau RJ, Clarke MR, Bakker A, Swalsky PA, Gooding WE, Posner MC. p53 sequence analysis predicts treatment response and outcome of patients with esophageal carcinoma. *Cancer* 1998;83:7–18.
12. Kang GH, Yoon GS, Lee HK, Kwon YM, Ro JY. Clinicopathologic characteristics of replication error-positive gastric carcinoma. *Mod Pathol* 1999;12:15–20.
13. Fiocca R, Luinetti O, Villani L, Mastracci L, Quilici P, Grillo F, Ranzani GN. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of gastric carcinoma: interactions between genetic alterations, cellular phenotype and cancer histotype. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1523–1530.

14. Dietmaier W, Wallinger S, Blocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 1997;57:4749–4756.
15. Kim WH, Lee HW, Park SH, Kim YI, Chi JG. Microsatellite instability in young age colorectal cancer. *Pathol Int* 1998;48:586–594.
16. Chong JM, Fukayama M, Hayashi Y, Takizawa T, Koike M, Konishi M, Kikuchi R-Y, Miyaki M. Microsatellite instability in the progression of gastric carcinoma. *Cancer Res* 1994;54:4595–4597.
17. Semba S, Yokozaki H, Yamamoto S, et al. Microsatellite instability in precancerous lesions and adenocarcinomas of the stomach. *Cancer* 1996;77:1620–1627.
18. Santos NR, Seruca R, Constancia M, Seixas M, Simões MS. Microsatellite instability at multiple loci in gastric carcinoma: clinicopathologic implications and prognosis. *Gastroenterology* 1996;110:38–44.
19. Perez RO, Jacob CE, D’Ottaviano FL, Alvarenga C, Safatle-Ribeiro A, Ribeiro U Jr, Bresciani C, Zilberstein B, Krieger JE, Habr-Gama A, Gama-Rodrigues J. Microsatellite instability in solitary and sporadic gastric cancer. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 2004;59:279–285.
20. Nakashima H, Honda M, Inoue H, Shibuta K, Arinaga S, Era S, Ueo H, Mori M, Akiyoshi T. Microsatellite instability in multiple gastric cancers. *Int J Cancer* 1995;64:239–242.
21. Chung YJ, Song JM, Lee JY, Jung YT, Seo EJ, Choi SW, Rhyu MG. Microsatellite instability-associated mutations associate preferentially with the intestinal type of primary gastric carcinomas in a high-risk population. *Cancer Res* 1996;56:4662–4665.
22. Yamasita K, Arimura Y, Kurokawa S, et al. Microsatellite instability in patients with multiple primary cancers of the gastrointestinal tract. *Gut* 2000;46:790–794.
23. Miyoshi E, Haruma K, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Shimamoto F, Chayama K. Microsatellite instability is a genetic marker for the development of multiple gastric cancers. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 2001;95:350–353.
24. Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Shi YQ, Rhyu MG, Powell SM, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1999;59(5):1090–1095.
25. Sakata K, Tamura G, Endoh Y, Ohmura K, Ogata S, Motoyama T. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in solitary and multiple gastric cancers with microsatellite instability. *Br J Cancer* 2002;86:564–567.
26. Jung H, Jung K, Shin Y, Ro J, Kang G. Methylation of the hMLH1 promoter in multiple gastric carcinomas with microsatellite instability. *Pathol Int* 2001;51:445–451.
27. Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Cham AS, Ho JC. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 1999;59:159–164.
28. Bevilacqua RA, Simpson AJ. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. *Int J Cancer* 2000;87:200–203.
29. Kang GH, Kim CJ, Kim WH, Kang YK, Kim HO, Kim YI. Genetic evidence for the multicentric origin of synchronous gastric carcinoma. *Lab Invest* 1997;76:407–417.
30. Pedroni M, Tammassia MG, Percesepe A, Roncucci L, Benatti P, Lanza G, et al. Microsatellite instability in multiple colorectal tumors. *Int J Cancer* 1999;81:1–5.
31. Park IJ, Kim HC, Kim JS, Yu ES, Chang SY, Kim JC. Correlation between hMLH1/hMSH2 and p53 protein expression in sporadic colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2005;52:450–454.
32. Ogata S, Tamura G, Endoh Y, Sakata K, Ohmura K, Motoyama T. Microsatellite alterations and target gene mutations in the early stages of multiple gastric cancer. *J Pathol* 2001;194:334–340.
33. Iacopetta BJ, Soong R, House AK, Hamelin R. Gastric carcinomas with microsatellite instability: clinical features and mutations to the TGF- β type II receptor, IGFII receptor, and Bax genes. *J Pathol* 1999;187:428–432.
34. Endoh Y, Sakata K, Tamura G, Ohmura K, Ajioka Y, Watanabe H, Motoyama T. Cellular phenotypes of differentiated-type adenocarcinomas and precancerous lesions of the stomach are dependent on the genetic pathways. *J Pathol* 2000;191:257–263.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)