

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RNA DE RECEPTORES DE
ESTROGÊNIO-B (ISOFORMAS 1,2, E 5) EM PÓLIPOS DE
PORTADORES DE POLIPOSE: ADENOMATOSA
FAMILIAR E DE PÓLIPOS ADENOMATOSOS E
CARCINOMAS COLORRETAIS ESPORÁDICOS COMO
MARCADOR DE PROGRESSÃO TUMORAL E SEU
IMPACTO NO PROGNÓSTICO**

PAULO ROBERTO STEVANATO FILHO

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do Título de Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Ademar Lopes

Coorientadora: Dra. Maria Dirlei Begnami

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Stevanato Filho, Paulo Roberto.

Análise da expressão do RNA de receptores de estrogênio- β (isoformas 1,2, e 5) em pólipos de portadores de polipose: adenomatosa familiar e de pólipos adenomatosos e carcinomas colorretais esporádicos como marcador de progressão tumoral e seu impacto no prognóstico / Paulo Roberto Stevanato Filho – São Paulo; 2017.

115p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Ademar Lopes.

Descritores: 1. Neoplasias Colorretais/Colorectal Neoplasms 2. Isoformas de RNA/RNA Isoforms 3. Receptor beta de Estrogênio/Estrogen Receptor beta, 4. Polipose Adenomatosa do Colo/Adenomatous Polyposis Coli. 5. Progressão da Doença/Disease Progression. 6. Prognóstico/Prognosis.

DEDICATÓRIA

À Deus, pela fé que me mantém vivo e fiel à vida honesta de trabalho e de estudo,

Aos meus filhos

João Pedro e Helena,

Que dão Vida a Minha Vida,

*À Ana Rita, minha esposa,
pelo apoio incondicional em todos os momentos,
sem você nenhuma conquista valeria a pena.*

*Aos meus pais, Wania e Paulo,
que dignamente me apresentaram à importância da
família e ao caminho da honestidade e persistência.*

AGRADECIMENTOS

Ao A.C.Camargo Cancer Center, por me oferecer, de maneira integrada, ensino, assistência e pesquisa, dentro do mais alto nível padrão de qualidade.

Ao Prof. Dr. Ademar Lopes, pelos ensinamentos diariamente de cirurgia oncológica, pela amizade e confiança. Agradeço as oportunidades criadas como cirurgião oncologista e na pesquisa científica, que acabaram por orientar meu caminho profissional e pessoal. É um exemplo que personifica o que é ser um cirurgião oncológico, defensor da oncologia cirúrgica, entusiasta da ciência e que compartilha a vontade de saber, e ser o melhor naquilo que faz.

Ao Dr. Samuel Aguiar Júnior, pelas oportunidades e sugestões na atuação como cirurgião oncologista, amizade e confiança. Exemplo de médico, pesquisador e cirurgião. Considero um privilégio participar do Grupo de Tumores Colorretais sob sua liderança, fonte de enriquecimento científico e humano.

À Dra Maria Dirlei Begnami pela orientação, dedicação e paciência. Agradeço também a forma objectiva e construtiva, fundamental para a realização desta tese. O apoio e o empenho com as análises foram a essência para realização do estudo.

À Dra Silvia Regina Rogatto, grande pesquisadora com uma valiosa partilha de conhecimento, agradeço pelo interesse, pela disponibilidade, por orientar e proporcionar um caminho criterioso na medicina molecular, fundamental para realização deste estudo.

A todos os companheiros do Departamento de Cirurgia Pélvica do A.C.Camargo Cancer Center, com os quais tenho o privilégio de trabalhar.

Aos amigos Drs. Wilson Nakagawa, Ranyel Spencer, Tiago Santoro e Renata Maymi por estarem sempre prontos a ajudar, dar conselhos importantes e imprescindíveis para o andamento do projeto.

À Enfermeira de Pesquisa Bruna Catin pela colaboração, confecção dos bancos de dados e aos trabalhos desenvolvidos no núcleo de Tumores Colorretais do A.C.Camargo Cancer Center.

A todos os professores e colegas do curso de Pós-graduação, assim como aos funcionários da biblioteca. A Sra. Suely Francisco, pelo auxílio na revisão das normas e referências bibliográficas. Ao Vinicius Calsavara pela assistência com as análises estatísticas.

Aos residentes de cirurgia oncológica do A.C.Camargo Cancer Center, pelo auxílio nas operações e nos cuidados com os pacientes.

Ao departamento de Anatomia Patológica e do Banco de Tumores do A.C.Camargo Cancer Center pela efetiva participação na seleção, processamento, análises dos casos e disponibilização do material biológico.

Ao Centro Internacional de Pesquisa do AC Camargo-CIPE, representados pela equipe Prof. Dra. Silvia Rogatto, Hellen Kuasne e Mateus Barros, pela criteriosa seriedade na análise de dados, processamento e viabilização de parte deste estudo.

À toda minha família, minha gratidão pelo apoio e compreensão ao longo deste período.

RESUMO

Stevanato Filho PR. **Análise da expressão do RNA de receptores de estrogênio- β (isoformas 1,2, e 5) em pólipos de portadores de polipose: adenomatosa familiar e de pólipos adenomatosos e carcinomas colorretais esporádicos como marcador de progressão tumoral e seu impacto no prognóstico.** São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O câncer colorretal (CRC) é uma doença com alta incidência e mortalidade. As mulheres, o uso de contracepção oral, a terapia de reposição hormonal, multiparidade, gravidez precoce e o consumo de soja estão associados a uma diminuição do risco de CRC. Embora a causa desta associação não seja conhecida, os esteroides sexuais podem ser considerados um fator contribuinte. Por outro lado, o desenvolvimento de múltiplos pólipos em polipose adenomatosa familiar (FAP) começando durante a puberdade, no pico da produção dos esteroides sexuais, sugere que os mesmos possam agir como cofatores no desenvolvimento dos pólipos e na carcinogênese colorretal. Em estudo preliminar, identificamos que hormônios sexuais estão associados à patogênese do CRC. Os níveis de expressão dos receptores de estrogênio (ER), subunidades ER- α e ER- β ; receptores de progesterona e andrógenos foram avaliados por imunoistoquímica com anticorpos monoclonais em pólipos e CRC de pacientes portadores de FAP e de câncer esporádico. Encontramos uma significativa perda de expressão de ER- β nas lesões associadas à carcinogênese com impacto na sobrevida. Não houve correlação significativa nas demais expressões dos receptores sexuais. Subunidades de ER- β são expressas em isoformas de *splicing* alternativos em diferentes tecidos. Essas variantes e suas correlações com a mucosa normal, pólipos da síndrome Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e de carcinomas colorretais esporádicos nunca foram descritas. **Materiais e métodos:** Amostras de tecido fresco de CRC esporádicos de 98 pacientes foram coletadas (48 tumores T1 / T2 e 50 T3 / T4), além de mucosa colônica histologicamente normal. Foram também incluídas amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE), de 52 pólipos esporádicos, 64 pólipos de

pacientes com FAP e 41 de mucosas colônicas de pacientes com FAP. No total, usando RT-PCR quantitativa, foram avaliadas 307 amostras com 921 análises de três transcritos e seus pares de isoformas associadas (ER β 1, ER β 2, ER β 3 and ER β 5).

Resultados: Diminuições das expressões das isoformas ER- β foram identificadas em pólipos esporádicos e em câncer colorretal e também em pólipos de pacientes com FAP em comparação com mucosas intestinais normais ($p < 0,001$). Aumento das expressões das isoformas ER β 1 e ER β 5 foram observadas na mucosa normal intestinal de pacientes com FAP em comparação com a mucosa intestinal normal dos casos esporádicos ($p < 0,001$), sugerindo uma associação com mutações germinativas do gene *APC*. Houve diminuição progressiva da expressão de ER- β em pólipos com displasia de baixo grau, seguidos de tumores T1-T2 e T3-T4 ($p < 0,05$). No câncer colorretal esporádico, a perda de expressão de ER β 1 e ER β 5 foi um preditor independente de recorrência ($p = 0,002$).

Conclusão: Esses achados contribuem para melhor compreensão da expressão do estrogênio e seus potenciais efeitos preventivos e terapêuticos sobre o câncer colorretal esporádico e aqueles associados à síndrome de FAP.

SUMMARY

Stevanato Filho PR. **[Analysis of RNA expression of receptor β (isoforms 1,2 e 5) in polyps of patients with familial adenomatous polyposis and adenomatous polyps and sporadic colorectal carcinomas as a marker of tumor progression and its impact on prognosis]**. São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Colorectal cancer (CRC) is a disease with high incidence and mortality. Oral contraception, hormone replacement therapy, multiparity, early pregnancy, and soy consumption are associated with a decreased risk of CRC in women. Although the cause of this difference is not known, sex steroids can be considered a contributing factor. On the other hand, the development of multiple polyps in familial adenomatous polyposis (FAP) beginning during puberty, at the peak of sex steroid production, suggests that these steroids can act as cofactors in the development of polyps and colorectal carcinogenesis. First, a preliminary study was conducted to identify which sex hormone is associated to the pathogenesis of CRC. Expression levels of estrogen receptors (ER) subunits ER- α and ER- β , progesterone receptors, and androgen receptors were evaluated by immunohistochemistry with monoclonal antibodies in polyps and CRC from FAP and sporadic cancer patients. Significant loss of ER- β expression was found with carcinogenesis and impact on survival. There was no significant correlation with other sex hormone receptors. Subunits ER- β are expressed in alternative splicing isoforms in different tissues. These variants and their correlations with normal mucosa, familial adenomatous polyposis polyps (APF), and sporadic colorectal carcinomas have never been described. **Materials and methods:** Fresh tissue samples from 98 patients with sporadic CRC were collected, including 48 T1-T2 patients and 50 T3-T4 patients. Paired samples of histologically normal mucosa from 52 patients were obtained as reference. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples of 52 sporadic polyps, 64 polyps from FAP patients, and 41 pairs of FAP adjacent normal tissue samples were also included. In total, 307 samples with 921 analyzes of three

transcripts and their associated isoform pairs (ER β 1, ER β 2, ER β 3 and ER β 5) were evaluated by quantitative RT-PCR. **Results:** A decrease in the expression of ER- β isoforms was identified in sporadic polyps and colorectal cancer, and also in polyps from patients with FAP syndrome, compared to normal tissue ($p < 0.001$). ER β 1 and ER β 5 isoforms were more expressed in normal mucosal tissue from FAP patients compared to normal tissue from sporadic cases ($p < 0.001$), which suggests an association in patients affected by germline mutations of the *APC* gene. There was a progressive decrease in ER- β expression in polyps with low-grade dysplasia, followed by T1-T2 and T3-T4 tumors ($p < 0.05$). In sporadic colorectal cancer, the loss of ER β 1 and ER β 5 expression was an independent predictor of recurrence ($p = 0.002$). **Conclusion:** These findings may provide a better understanding of the estrogen and its potential preventive and therapeutic effects on sporadic colorectal cancer and on cancers associated with FAP syndrome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Incidência específica por idade do câncer colorretal de acordo com a faixa etária entre 2004 e 2013.....	8
Figura 2	Modelo genético para tumorigênese colorretal.....	13
Figura 3	Mecanismo da atuação da proteína APC (adenomatous polyposis coli) na modulação da β -catenina e transdução de sinal pela via Wnt.....	15
Figura 4	Os efeitos intracelulares com as principais vias de ação do estrogênio.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

AFAP	Polipose Adenomatosa Familiar Atenuada
AP1	Complexo ativador de proteína-1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ASCO	American Society of Clinical Oncology
CEA	Antígeno Carcinoembrionário
CHRPE	Hipertrofia congênita do epitélio pigmentar da retina
CIMP	Fenótipo Metilador das Ilhotas CpG
CIN	Instabilidade cromossômica
CRC	Câncer Colorretal
CTNNB1	Catenin Beta 1
E2	17 β -estradiol
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EGTM	European Group on Tumour Markers
ER	Receptor de estrógeno
ERE	Elementos de resposta ao estrogênio
FAP	Polipose Adenomatosa Familiar
FXR	Receptor X de farnesóide
HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2
HNPCC	Câncer colorretal hereditário não-polipoide
LXR	Receptor X do fígado
MMR	Mismatch repair
MSI-H	Altos níveis de instabilidade de microssatélites
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
WHI	Women's Health Initiative
WHO	World Health Organization
Wnt	Wingless-type
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
TC	Tomografia computadorizada
Tcf-4	Transcription factor 4
TNM	Tumor-node-metastasis

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Razões do Estudo	1
1.2	Revisão da Literatura	6
1.2.1	Epidemiologia	6
1.2.2	Patogênese do Câncer Colorretal	10
1.2.3	Diagnóstico e quadro clínico do Câncer Colorretal Esporádico	18
1.2.4	Polipose Adenomatosa Familiar	22
1.2.5	Marcadores tumorais laboratoriais	25
1.2.6	Fatores hormonais no Câncer Colorretal	26
1.2.7	Mecanismos de ação dos receptores de estrógenos	28
2	ARTIGO 1	
2.1	Estrogen receptor β as a prognostic marker of tumor progression in colorectal cancer with familial adenomatous polyposis and sporadic polyps	32
3	ARTIGO 2	
3.1	Oestrogen receptor β isoforms expression in sporadic colorectal cancer, familial adenomatous polyposis and progressive stages of colorectal cancer	54
4	CONCLUSÕES	95
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP.

Anexo 2 EstadiamentoTNM para câncer colorretal, 7ª edição.

Anexo 3 Prêmio de melhor tema livre apresentado em sessão plenária -
"Prêmio Fernando Gentil" no Congresso Brasileiro da
Sociedade Brasileira de cirurgia oncológica, de 17 à 19 de

outubro de 2013. Análise da expressão dos receptores hormonais (estrogênio alfa e beta, progesterona e andrógeno) em pólipos adenomatosos e carcinomas colorretais esporádicos e oriundo de pacientes portadores de Polipose Adenomatosa Familiar e seu impacto no prognóstico. Referente ao artigo 1.

Anexo 4 Carta de aprovação da publicação do artigo 1 para **Pathol & Oncol Res** 2017 jun. 23. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s12253-017-0268-5. Enviado set 2015.

Anexo 5 Carta de submissão do artigo 2 para BMC Cancer.

APÊNDICE

Apêndice 1 Formulário de levantamento de dados.

1 INTRODUÇÃO

1.1 RAZÕES DO ESTUDO

O câncer colorretal (CRC) é uma neoplasia de alta incidência e mortalidade. As maiores taxas de incidência estão na Austrália, países da Europa e da América do Norte, as taxas mais baixas são encontradas na África e Sudeste da Ásia Central. Essas diferenças geográficas parecem ser atribuídas à diversidade nas exposições dietéticas e ambientais que são impostas a um fundo com determinada suscetibilidade genética (TORRE et al. 2015).

A idade é o fator de risco mais relevante para o desenvolvimento do CRC, mais de 90% dos casos e das mortes são relatadas em indivíduos com idade superior a 50 anos. Substancialmente, as taxas de incidência são mais elevadas em homens do que em mulheres (JEMAL et al. 2011). A alta paridade, a idade precoce da primeira gravidez, o uso de contraceptivos orais e uso de terapia de reposição de hormonal são fatores associados à diminuição do risco de câncer colorretal esporádico (ANDERSON et al. 2004; NIEUWENHUIS e VASEN 2007; RENNERT et al. 2009; GREEN et al. 2012). Todos estes fatores associados às diferenças de incidência nos gêneros, em várias décadas, em diferentes grupos raciais e em todo o mundo, sugerem que os hormônios sexuais (estrogênio e progesterona) desempenham um papel provavelmente protetor nas vias da carcinogênese do CRC.

Estudos da relação entre gênero e mortalidade do CRC apresentam consistentemente menores taxas de mortalidade para as mulheres, especialmente

pacientes em idade pré-menopausa. Estudos epidemiológicos, ao longo de várias décadas, sugerem um declínio na mortalidade das mulheres com CRC atribuído ao uso da terapia hormonal (FERNANDEZ et al. 2000; HENDIFAR et al. 2009).

5% dos CRC são hereditários, com uma caracterização sindrômica bem definida e relacionada a mutações germinativas. A Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) está associada à mutação do gene supressor tumoral Adenomatous Polyposis Coli (APC) e a Síndrome de Lynch está associada à mutação dos genes de reparo. A carcinogênese colorretal esporádica está relacionada a uma cascata de eventos envolvendo alterações genéticas e epigenéticas. Cada uma das quais, acompanhada por condições patológicas e alterações específicas (GEBERT et al. 1999; KIM et al. 2003).

A progressão tumoral, observada em diferentes estágios da carcinogênese colorretal podem ser consequência de mutações germinativas ou somáticas cumulativas dos genes supressores tumorais, proto-oncogenes, genes de reparação do DNA, de fatores de crescimento, receptores de *checkpoint* do ciclo celular e de genes relacionados com apoptose. Cada uma destas alterações confere uma vantagem de crescimento seletivo na célula epitelial do cólon afetada. Estas alterações podem resultar, em última instância, em crescimento celular, proliferação e desenvolvimento de clone tumoral (FEARON e VOGELSTEIN 1990; KIM et al. 2003).

A Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) é uma síndrome autossômica dominante com penetrância quase completa, caracterizada pelo desenvolvimento de centenas a milhares de pólipos adenomatosos em todo cólon e reto. O risco de desenvolver CRC na forma clássica da doença, ao longo da vida, em pacientes não tratados, com média etária de 39 anos, está próximo de 100%, sendo responsável por

1% de todos os casos de câncer colorretal (GEBERT et al. 1999; GOSS e GRODEN 2000).

A FAP é o modelo de desenvolvimento de doença pré-cancerosa melhor definida em toda a literatura médica. Pois, no mesmo indivíduo, existe uma expressão fenotípica com várias lesões com estádios distintos, possibilitando o estudo do acúmulo de diversas alterações genéticas associadas à carcinogênese colorretal (FEARON e VOGELSTEIN 1990).

Infelizmente, para indivíduos portadores de FAP, o tratamento preventivo, mais efetivo atualmente, do desenvolvimento do CRC ainda é cirúrgico, através da remoção do intestino grosso (VASEN et al. 2015). Assim, é possível perceber a importância do aconselhamento genético familiar e da necessidade de novos estudos que proporcionem um melhor conhecimento sobre os aspectos biomoleculares, proporcionando outros tipos de tratamento como terapias de quimioprevenção.

Na FAP, o surgimento destes pólipos na segunda década de vida, durante a puberdade e o aumento de tamanho e de número das lesões na adolescência, quando há o pico da produção dos esteroides sexuais, sugere que estes possam agir como cofatores no desenvolvimento dos pólipos e na carcinogênese colorretal (SYNGAL et al. 2015; VASEN et al. 2015).

O uso de contraceptivos orais em pacientes portadores de FAP, com o intuito de regressão dos pólipos adenomatosos já foi estudado em casos isolados por LIN et al. (2012) e pode ter papel relevante na interrupção da sequência adenoma-carcinoma. Tais evidências clínicas sugerem que os hormônios sexuais femininos, provavelmente, tenham algum papel de proteção contra o desenvolvimento de câncer colorretal.

A interação funcional entre a proteína APC e o receptor estrogênico nunca foi investigada. Entretanto, alguns autores sugerem que a deficiência na sinalização de estrogênio pode contribuir para o desenvolvimento de tumores colorretais (GRODSTEIN et al. 1999).

Alguns outros estudos pesquisaram a presença de receptores de hormônios sexuais no câncer colorretal esporádico e na mucosa normal do cólon (DAWSON et al. 1990; MEGGOUH et al. 1991; HENDRICKSE et al. 1993; DI LEO et al 1994; SLATTERY et al. 2006; KOUZMENKO et al. 2008), inclusive correlacionando a presença da fração beta do ER com melhor prognóstico (SLATTERY et al. 2005) e, também, a correlação entre a presença de receptores e quimioprevenção (WONG et al. 2001). Porém, ainda não havia sido realizado nenhum estudo avaliando a expressão imunoistoquímica dos receptores de estrógenos, progesterona e de andrógeno em pólipos e no câncer oriundo de pacientes com FAP.

Em nosso primeiro estudo, avaliamos a expressão imunoistoquímica dos receptores de estrógenos α e β , progesterona e andrógeno em pólipos adenomatosos, em neoplasia colorretal esporádica e oriundo de pacientes portadores de Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e, também, o impacto da expressão desses receptores na sobrevida do câncer colorretal (Artigo 1).

Dentre os receptores de hormônios sexuais estudados, os níveis de expressão do ER- β diferiram entre os grupos. O grupo com pólipos FAP apresentou menor expressão de ER- β do que o grupo de pólipos esporádicos. Com a transformação dos pólipos esporádicos para o câncer, houve uma diminuição considerável na expressão de ER- β . A expressão ER- β foi menor nos tumores maiores. A sobrevivência global de 5 anos de pacientes com CRC expressando positivamente ER- β excedeu a dos

pacientes sem níveis de expressão detectável. Não foi encontrada diferença na expressão dos receptores de androgênio, de progesterona e de ER- α entre os grupos (STEVANATO et al. 2017).

Na pesquisa inicial, concluímos que as diferenças de expressão de ER- β nas lesões precursoras e câncer invasivo representam um potencial mecanismo protetor pelo qual o estrogênio pode alterar a susceptibilidade celular para o desenvolvimento do câncer de cólon.

Atualmente, sabe-se que o ER humano pode ser expresso em várias isoformas de *splicing* alternativos que podem ser detectados em células, normais e neoplásicas (COLDITZ 1998; HANKINSON et al. 2004; ASCENZI et al. 2006; ELLEM e RISBRIDGER 2007). A expressão das isoformas de *splicing* alternativos em células de câncer de cólon foi primeiramente relatada por CAMPBELL-THOMPSON et al. (2001), detectando os subtipos ER β 1, ER β 2, e ER β 5 em mucosa normal do cólon humano. Somente em 2005, WONG et al. publicaram um estudo, limitado a uma pequena casuística, sobre a expressão de isoformas ER- β no carcinoma colorretal. Nesse estudo, a expressão total de ER- β 1 e de ER- β 2 foi perdida em 22% e 49% de carcinomas colorretais primários. Mas, em contraste, a isoforma truncada de ER- β 5 foi encontrada em todos os carcinomas colorretais primários e em todas as linhagens celulares de carcinomas. Houve mudanças de expressão da proteína ER- β selvagem com a carcinogênese.

Não existem estudos avaliando a expressão das subunidades das isoformas de ER- β na mucosa colônica normal, de pacientes com FAP, em pólipos adenomatosos e em carcinomas colorretais esporádicos e com FAP correlacionando o nível de expressão das isoformas com a progressão tumoral. Tais resultados podem fornecer

dados para a compreensão de possíveis mecanismos associados com ER e seus potenciais efeitos nas lesões das etapas da carcinogênese colorretal.

Por essa razão, propõe-se a ampliação da casuística desse estudo envolvendo novos pacientes com síndrome FAP e com câncer colorretal esporádico com os seguintes objetivos (Artigo 2):

- Quantificar a expressão gênica por RT-PCR de isoformas variantes de ER- β em mucosa colônica normal, lesões precursoras em indivíduos portadores de Polipose Adenomatosa Familiar e de CRC esporádico, assim como de lesões invasivas no CRC esporádico.
- Verificar o impacto da expressão relativa das isoformas variantes de ER- β com a sobrevida global e livre de doença de pacientes portadores de carcinoma de cólon esporádico.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

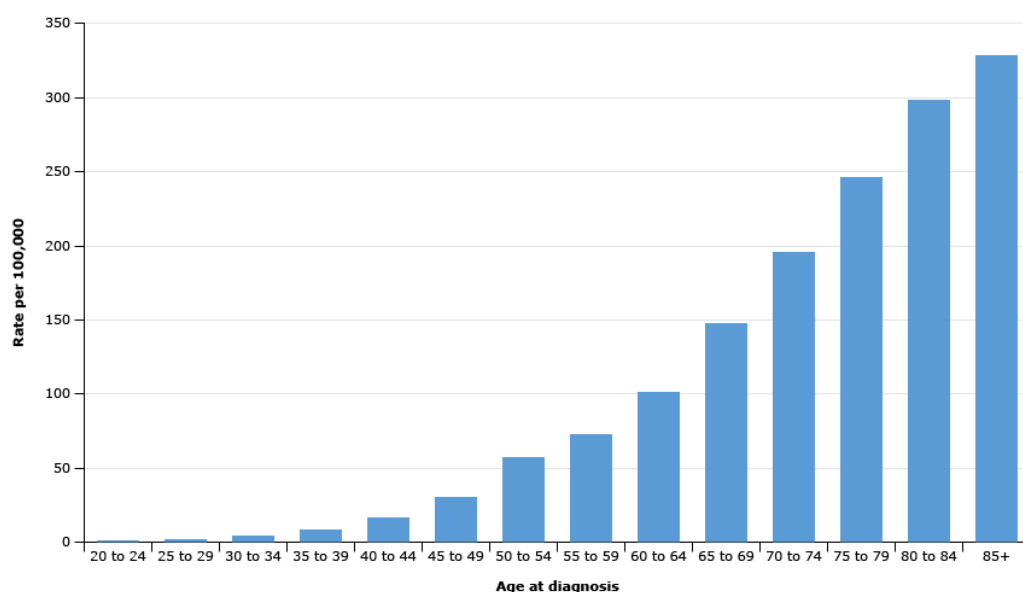
1.2.1 Epidemiologia

Segundo as estimativas de incidência de câncer para 2016, do Instituto Nacional de Câncer, o CRC é, no Brasil e no mundo, o terceiro câncer mais comumente diagnosticado em homens e o segundo em mulheres. Em 2012, foram estimados 1,4 milhões de novos casos e quase 694 mil mortes (TORRE et al. 2015; Ministério da Saúde 2017). Nos dados de 2012, do banco de registros GLOBOCAN, da *World Health Organization* (WHO), as taxas de incidência mais altas foram na Austrália, Nova Zelândia, Europa e América do Norte e as taxas mais baixas foram encontradas na África e no Sul da Ásia Central (FERLAY et al. 2013). As taxas são

substancialmente mais elevadas nos homens (cerca de 25%) do que nas mulheres (JESSUP et al. 1996; TORRE et al. 2015).

Nos Estados Unidos, as taxas de incidência de CRC apresentam queda de cerca de 3 a 4% ao ano nos últimos 15 anos (RYERSON et al. 2016), mas ainda representam a terceira causa de câncer e de morte para ambos os sexos (SIEGEL et al. 2017b). As taxas de incidência, na maioria dos outros países ocidentais, ficaram estáveis ou aumentaram ligeiramente durante este período. Em contraste, as taxas de incidência de CRC aumentaram rapidamente em várias áreas, historicamente de baixo risco, incluindo a Espanha, diversos países do Leste Asiático e da Europa Oriental (JEMAL et al. 2011; CENTER et al. 2009).

A idade do paciente é um importante fator de risco para desenvolvimento do CRC esporádico, sendo incomum nos indivíduos com menos de 40 anos. Os registros da base de dados do *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER), em 2017 (Figura 1), mostram que a incidência começa a aumentar significativamente na faixa etária de 40 e 50 anos, com aumento significante a cada década subsequente.



Fonte: Adaptado de SEER (2017).

Figura 1 - Incidência específica por idade do câncer colorretal de acordo com a faixa etária entre 2004 e 2013.

Segundo dados do SEER (2017) e de outros registros de câncer do Ocidente a incidência de CRC está aumentando nos pacientes abaixo de 50 anos enquanto está diminuindo em grupos etários mais velhos (DAVIS et al. 2011; SIEGEL et al. 2017a). Nos Estados Unidos, a incidência de CRC em homens e mulheres menores de 50 anos aumentou de forma constante, a uma taxa de 2 % por ano, entre 1992 e 2013. Alguns registros relatam uma incidência crescente de CRC em adultos jovens de 20 a 39 anos de idade, embora a incidência absoluta, nesta faixa etária, permaneça muito menor do que para os adultos com 50 anos ou mais (SINGH et al. 2014; TAWADROS et al. 2015; SIEGEL et al. 2017a).

Atualmente, o rastreamento de CRC não é recomendado para indivíduos menores de 50 anos, a não ser que haja um histórico familiar ou síndrome hereditária de predisposição. Assim, a maioria dos diagnosticados com menos de 50 anos são

sintomáticos (86%), com associação ao estágio clínico mais avançado e com piores resultados oncológicos (DOZOIS et al. 2008). Estima-se que 35 % destes tumores em adultos jovens são associados com as conhecidas síndromes hereditárias e as causas para estes aumentos permanecem desconhecidas (DOZOIS et al. 2008; CHANG et al. 2012; AHNEN et al. 2014; MORK et al. 2015). Os atuais esforços para reduzir a incidência e a mortalidade por CRC em adultos jovens estão focados na identificação de pessoas elegíveis para vigilância precoce, com base na história familiar.

A incidência de CRC, no decorrer da vida, é cerca de 5% (SIEGEL et al. 2017 b). A predisposição genética é o fator de risco dominante para uma pequena proporção de indivíduos, embora, os fatores ambientais (incluindo dieta, exercício, tabagismo e obesidade) sejam os fatores de risco mais prevalentes na maioria dos indivíduos (LITTLE et al. 1999; POTTER 1999). Segundo LOWERY et al. (2016), história familiar de CRC é comum na população em geral. Nos Estados Unidos, 5 a 10 % dos adultos (de 20 a 79 anos) possuem parente de primeiro grau com CRC. Em outros países, as taxas são semelhantes ou um pouco maiores, com incidência de 11,7% entre os adultos de 30 a 70 anos (WILSCHUT et al. 2011).

Devido a história familiar, um em cada quatro pacientes com CRC tem risco moderadamente aumentado (WINAWER et al. 1997), correspondendo à alguma agregação genética familiar. No entanto, aproximadamente 5% dos pacientes com CRC têm risco muito alto e uma caracterização sindrômica bem definida. A Síndrome de Lynch, também chamada de câncer de colon não polipóide hereditário (HNPCC) é a mais comum, representando cerca de 2 a 3 % dos casos e a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) cerca de 1% dos CRC (UMAR et al. 2004; MOREIRA

et al. 2012), ambas com mutações germinativas autossômicas dominantes, com penetrância fenotípica quase completa.

Tumores diagnosticados estão predominantemente localizados no reto e no cólon esquerdo (AHNEN et al. 2014). Entretanto, um aumento gradual de tumores localizados proximais à flexura esplênica do cólon vem sendo observado (STEWART et al. 1983; JESSUP et al. 1996; THÖRN et al. 1998; TROISI et al. 1999), principalmente com um aumento relativo na incidência de tumores cecais (MAMAZZA e GORDON 1982; VUKASIN et al. 1990). Esta mudança na distribuição anatômica de CRCs pode ser, em parte, relacionada a melhorias no diagnóstico e tratamento, sobretudo associada ao rastreamento e remoção de pólipos adenomatosos no cólon distal. Outra causa associada pode estar relacionada à qualidade da colonoscopia (preparo colônico ruim, colonoscopia incompleta, variações anatômicas que comprometem a visibilidade), mas a biologia tumoral também pode diferir entre os CRCs do cólon direito e esquerdo, como também nos adenomas serrilhados que são mais planos e difíceis de visualizar endoscopicamente e que, molecularmente apresentam mutações de BRAF do tipo V600E e dão origem a CRC associados à instabilidade de microssatélites, mais comumente localizados no cólon direito.

1.2.2 Patogênese do Câncer Colorretal

As mutações genéticas germinativas específicas são responsáveis pelos CRCs associados às síndromes hereditárias, enquanto que mutações genéticas acumulativas somáticas está associada à maioria dos casos esporádicos. Em contraste, as alterações genéticas associadas à CRC "familiar", caracterizada por agregação familiar,

permanecem desconhecidas e incompletamente compreendidas (YURGELUN et al. 2017).

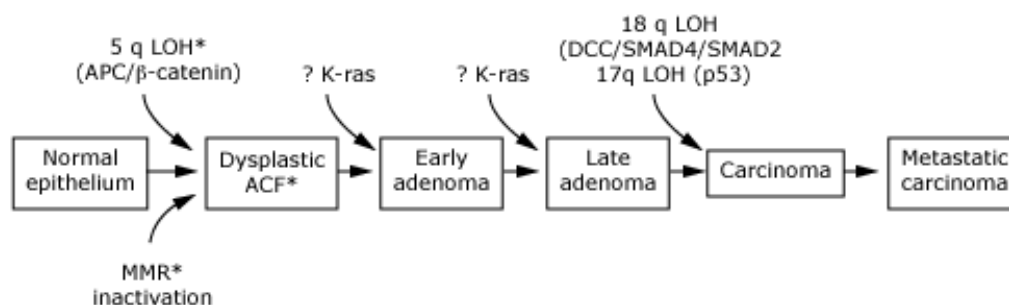
Em 1990, FEARON e VOGELSTEIN descreveram as bases moleculares para o desenvolvimento do CRC sendo caracterizado por um processo de vários passos em que cada evento genético acumulado conferiu uma vantagem de crescimento seletivo à célula epitelial do cólon. Estudos posteriores serviram para aperfeiçoar essas hipóteses.

A quase totalidade dos CRCs está associada à pólipos adenomatosos que se tornam displásicos quando mecanismos normais que regulam a renovação epitelial são interrompidos. As células da superfície que revestem a mucosa, perdidas continuamente no lúmen intestinal devido a apoptose e esfoliação, devendo ser substituídas constantemente. De modo regular, a proliferação ocorre exclusivamente na base da cripta e, à medida que as células se movem para a superfície luminal, param de proliferar e se diferenciam terminalmente. Este processo ordenado é cada vez mais interrompido à medida que os adenomas aumentam de tamanho, tornando-se displásicos e, eventualmente, atingindo o potencial invasivo (FEARON e VOGELSTEIN 1990).

A hipótese que os CRC invasivos se desenvolvem a partir de lesões precursoras (sequencia adenoma-carcinoma) é apoiada por dados clínicos, patológicos, epidemiológicos e observacionais (MARTÍNEZ et al. 2009; LIEBERMAN et al. 2012; COTTET et al. 2012; ZAUBER et al. 2012; LOBERG et al. 2014). Os carcinomas precoces são frequentemente visualizados em grandes pólipos adenomatosos e áreas de alterações adenomatosas podem ser encontradas adjacentes à tumores. Adenomas e carcinomas são encontrados em distribuições

semelhantes ao longo do intestino grosso. Os adenomas, geralmente, são observados entre 10 e 15 anos antes. Em modelos animais, os adenomas se desenvolvem antes dos carcinomas. Por sua vez, estes se desenvolvem, exclusivamente, em tecido adenomatoso. Além disso, existe uma redução da incidência de CRC por meio da remoção de pólipos.

De acordo com o modelo de Vogelstein, mutações germinativas ou somáticas são necessárias para a transformação maligna e o acúmulo de múltiplas mutações genéticas, ao invés de sua sequência, determina o comportamento biológico do tumor (Figura 2) (VOGELSTEIN et al. 1988). O CRC esporádico ocorre, sobretudo, pela ativação de oncogenes como *K-ras*, *BRAF*, *SRC*, *MYC*, receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e à inativação dos genes supressores de tumor como *p53* e *APC* (adenomatous polyposis coli) ou de genes de reparo do DNA, principalmente, o mutL homolog 1 (*MLH1*) e mutS homolog 2 (*MSH2*) (SHERR 1996; BENSON et al. 2004; TANAKA et al. 2006). Cerca de 75% dos tumores colorretais esporádicos apresentam inativação do gene *p53* (CALVERT e FRUCHT 2002). A instabilidade de microssatélite também pode ser encontrada em tumores esporádicos e, diferentemente da Síndrome Lynch, estão associados à mutação no gene *BRAF* e perda de expressão do gene *MLH1* ocasionada pela hipermetilação de seu promotor (VELHO et al.2008).



Fonte: LYNCH e HOOPS (2002)

Figura 2 - Modelo genético para tumorigênese colorretal.

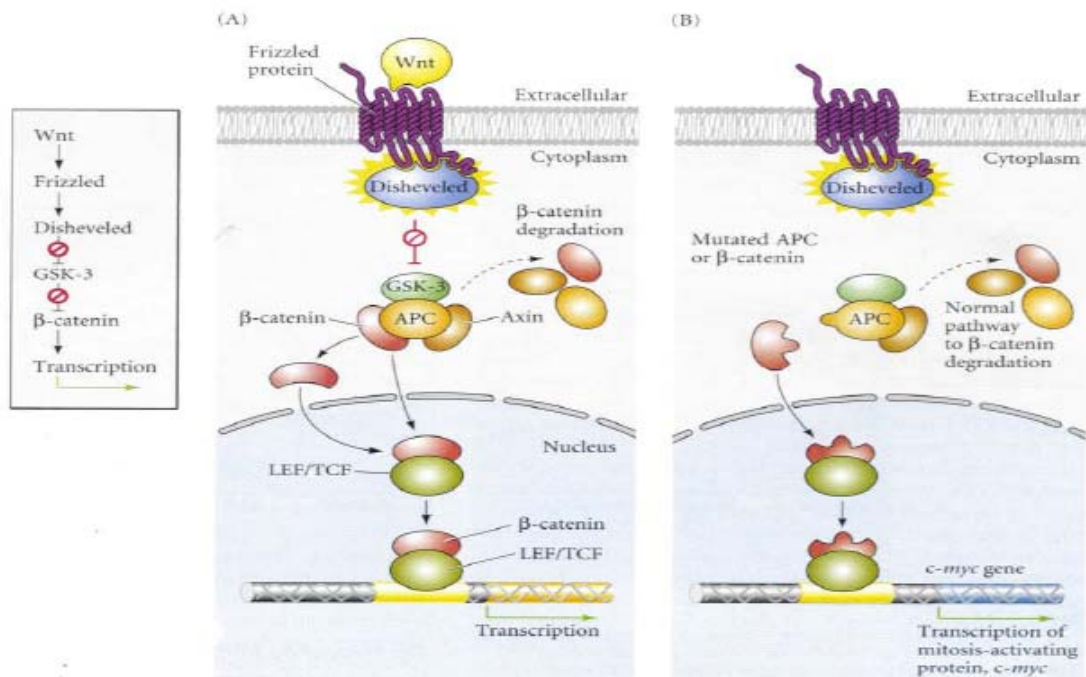
Talvez o gene mais crítico para o desenvolvimento inicial de CRC seja o gene supressor tumoral *APC*. As mutações somáticas, em ambos os alelos, estão presentes em 80% dos casos esporádicos e uma única mutação germinativa neste gene é responsável pela FAP (LAKEN et al. 1997; DRUCKER et al. 2000). Como a Síndrome FAP é caracterizada por diversos pólipos adenomatosos em todo cólon, com densidade de número variável e diferentes manifestações extra-colônicas, foram possíveis o reconhecimento da importância desse gene e a identificação de padrões de mutações, além de permitir o estudo das lesões colônicas com estádios e graus displásicos diferentes no mesmo indivíduo.

As primeiras lesões malignas presentes nos focos de criptas aberrantes displásicas (microadenomas) e em pequenos pólipos adenomatosos, com perda do segundo alelo de *APC* (por deleção ou mutação somática), sugere que a alteração de expressão desse gene é um evento muito precoce nas etapas de tumorigênese do CRC (SPIRIO et al. 1998; LAMLUM et al. 1999), enquanto que as mutações do gene supressor tumoral *p53* ocorrem mais tardiamente e são encontradas em lesões maiores ou com maior grau de displasia (Figura 2).

Um melhor entendimento da função da proteína APC e do mecanismo pelo qual o gene anormal promove a formação tumoral foi possível com a observação de que CRCs esporádicos do tipo selvagem (APC normal) apresentam mutações no gene CTNNB1 (Catenin Beta 1) que codifica a beta-catenina, uma proteína envolvida na mesma cascata de sinalização da proteína APC, por via de sinalização Wnt (*Wingless-type*) (SU et al. 1993; BIENZ e CLEVERS 2000). A maioria dos CRCs esporádicos é iniciada pela ativação de mutações nos genes da via Wnt, responsáveis pela estabilização da beta-catenina e pela transcrição constitutiva ativada pela junção do complexo de fator beta-catenina / Tcf-4 (Transcription factor 4).

A via Wnt é uma via de transdução de sinal responsável pela proliferação celular necessária para a renovação epitelial intestinal (BIENZ e CLEVERS 2000; FEARNHEAD et al. 2001; UTHOFF et al. 2001). A proteína APC normal atua no controle do acúmulo de beta-catenina, mediando sua fosforilação e degradação. A maioria das mutações no gene *APC* (germinativa e somática) produz uma proteína APC truncada com perda de seus domínios reguladores de beta-catenina. Essa perda funcional da proteína APC (e também nas mutações no gene beta-catenina) resulta no acúmulo nuclear de beta-catenina que se liga e ativa o Tcf-4 (Figura 3) (KORINEK et al. 1997; MORIN et al. 1997; GOSS e GRODEN 2000).

O complexo beta-catenina / Tcf-4 atua controlando a proliferação e a diferenciação das células epiteliais da cripta intestinal (VAN DER WETERING et al. 2002; SHIH et al. 2001). A ativação desta via evita que o ciclo celular pare em G1 ou em diferenciação celular terminal, induzindo resistência à apoptose (KIM et al. 2003). O resultado final deste processo é a proliferação celular.



Fonte: GOSS e GRODEN (2000).

Figura 3 - Mecanismo da atuação da proteína APC (adenomatous polyposis coli) na modulação da β -catenina e transdução de sinal pela via Wnt.

A maior parte dos CRC é ocasionada pela progressão da sequência adenoma-carcinoma. No entanto, evidências recentes sustentam, cada vez mais, a existência de uma via alternativa para a carcinogênese colorretal por meio de pólipos serrilhados, um grupo que abrange um espectro morfológico, incluindo pólipos hiperplásicos, pólipo misto e adenomas serrilhados (NOFFSINGER 2009).

Existem pelo menos três vias moleculares associadas à tumorigênese colorretal:

1- Via de instabilidade cromossômica (CIN)

Tipificada pela condição herdada FAP (FEARON e VOGELSTEIN 1990) ou por casos esporádicos caracterizados por alterações cromossômicas, incluindo deleções, inserções e perda de heterozigosidade. As mutações genéticas propiciam ganho de função que podem resultar na ativação de vias de promoção do

crescimento, incluindo os oncogenes, atividade diminuída dos genes supressores ou das vias apoptóticas.

2- Via de mutação em genes de reparo do DNA “mismatched repair” (*MMR*).

Mutações germinativas em um dos genes de reparo de incompatibilidade do DNA, mais comumente o *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2*, provocam um acúmulo de anormalidades em sequências curtas de bases nucleotídicas, constituindo repetições múltiplas dentro do genoma, chamadas de microssatélites. Esses tumores são caracterizados por um fenótipo de altos níveis de instabilidade de microssatélites (MSI-H). Além de serem típicos da síndrome de Lynch (HNPCC), altos níveis de MSI também são encontrados em aproximadamente 15% dos CRC esporádicos. No entanto, na maioria desses casos, o silenciamento de genes não se deve a uma mutação germinativa específica de MMR, mas a um fenômeno epigenético: a hipermetilação do promotor do gene para a enzima MMR (geralmente *MLH1*) que leva ao silenciamento transcricional da expressão gênica (WEISENBERGER et al. 2006).

3- Via de fenótipo de hipermetilação (CIMP+)

Alterações epigenéticas, como hipo e hipermetilação do DNA, podem silenciar a expressão de certos genes, incluindo enzimas MMR (DAS e SINGAL 2004; SHEN et al. 2005; WEISENBERGER et al. 2006; VAN ENGELAND et al. 2011). O pólipó serrilhado e o CRC que está associado a uma frequência particularmente alta de metilação de algumas ilhas CpG (em que uma base de citosina [C] é seguida imediatamente por uma base de guanina [G], unidas por uma ligação fosfodiéster [**CpG**]) são conhecidos como tumores CIMP+ (WEISENBERGER et al. 2006; NOFFSINGER 2009; GOEL et al. 2007).

Segundo RAJAGOPALAN et al. (2002), a ativação oncogênica de *BRAF* (na maioria das vezes pela mutação no códon V600E), um membro da família de cinases *RAS* / *RAF*, é uma característica do CRC esporádico associada à MSI-H por hipermetilação (CIMP+) do gene *MLH1*. DOMINGO et al. (2005) demonstraram que as mutações de *BRAF* estão ausentes em tumores associados à HNPCC (mutações germinativas nos genes *MMR*, *MLH1* e *MSH2*). Esses dados sugerem que a ativação oncogênica do *BRAF* está envolvida apenas na tumorigênese colorretal esporádica. Além disso, estas alterações favorecem um melhor prognóstico que, normalmente, está associado a tumores MSI-H (FRENCH et al. 2008; OGINO et al. 2009). Estes tipos tumorais são particularmente mais prevalentes em fumantes (SAMOWITZ et al. 2006).

Vários oncogenes estão implicados no desenvolvimento do CRC esporádico, sendo o mais importante o *RAS* que possui três variantes celulares, *HRAS*, *KRAS* e *NRAS* (SHIBATA et al. 1993; CARTWRIGHT 1998; TORTOLA et al. 1999; TAKAYAMA et al. 2001). Eles codificam uma família de proteínas homólogas à proteína G que regula a transdução de sinal celular, atuando como um único caminho para a transmissão de sinais de crescimento extracelular para o núcleo (BOURNE et al. 1991).

A identificação das mutações do gene *RAS* no CRC tem relevância clínica, estando significativamente associada à ausência de resposta terapêutica ao uso de agentes que visam o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), como o cetuximab (KARAPETIS et al. 2008; ALLEGRA et al. 2009; VAN CUTSEM et al. 2012).

1.2.3 Diagnóstico e quadro clínico do Câncer Colorretal Esporádico

Não há sintomas clínicos na maioria dos pacientes com câncer de cólon em estágio inicial. Comumente, são diagnosticados por rastreamento. No entanto, segundo MORENO et al. (2016), a maioria dos CRCs (70-90%) são diagnosticados somente após o início dos sintomas causados pelo processo expansivo luminal ou por infiltração de estruturas adjacentes e, como resultado, as manifestações clínicas refletem CRC relativamente avançados (MOIEL e THOMPSON 2011; MORENO et al. 2016).

Os sinais ou a sintomatologia associada ao CRC incluem hematoquezia ou melena, dor abdominal, anemia ou alteração no hábito intestinal (HAMILTON et al. 2005; SAIDI et al. 2008). Os sintomas associados à distensão abdominal, náuseas e vômitos podem ser indicadores de suboclução ou obstrução intestinal.

Nos pacientes sintomáticos, as manifestações clínicas também diferem dependendo da localização do tumor. Alterações do hábito intestinal são mais frequentes em tumores do lado esquerdo, pois além do conteúdo fecal ser mais líquido, o calibre luminal do cólon é maior nos segmentos proximais à flexura esplênica (MOIEL e THOMPSON 2011; MORENO et al. 2016). Em tumores localizados no cólon ascendente, a anemia ferropriva por perda sanguínea é o sintoma mais comum, pois esse segmento está associado a hemorragia diária, quatro vezes maior do que nas demais localizações (MACRAE e ST JOHN. 1982; GOODMAN e IRVIN 1993).

A dor abdominal pode ocorrer em tumores de qualquer localização por causa de obstrução parcial, disseminação peritoneal ou perfuração intestinal. Os tumores do

reto podem causar tenesmo, dor local e diminuição do calibre das fezes (SAIDI et al. 2008).

SIEGEL et al. (2017a) demonstraram que, aproximadamente 20% dos pacientes, nos Estados Unidos, apresentam doença metastática ao diagnóstico, podendo ser por disseminação linfática e hematogênica e, também, por contiguidade transperitoneal. Como a drenagem venosa do trato intestinal se dá através do sistema portal, o primeiro local de disseminação hematogênica, geralmente, é o fígado e, em seguida, os pulmões. No entanto, os tumores do reto distal podem metastizar, inicialmente, para os pulmões, pois os vasos retais inferiores drenam para o sistema da veia cava inferior, ao invés do sistema venoso portal (SIEGEL et al. 2017a). Linfonodos regionais e o peritônio também são sítios metastáticos frequentemente diagnosticados.

Os pacientes sintomáticos ao diagnóstico, normalmente, têm doença mais avançada e de pior prognóstico (MORENO et al. 2016). Em estudo realizado por AMRI et al. (2013) foram avaliados 1071 pacientes com câncer de cólon diagnosticados (217 deles por rastreamento). Aqueles não diagnosticados por triagem apresentaram risco significativamente maior de lesões mais invasivas ($\geq T3$: risco relativo [RR] 1,96), com envolvimento linfonodal (RR 1,92) e doença metastática (RR 3,37). Além disso, os pacientes não diagnosticados por rastreamento apresentaram taxas de mortalidade (RR 3.02) e de recorrência (RR 2.19), significativamente, mais elevadas (AMRI et al. 2013).

Obstrução ou perfuração intestinal está associada a prognóstico ruim, independente do estágio. O número total de sintomas é inversamente relacionado às

taxas de sobrevida (WOLMARK et al. 1983; CRUCITTI et al. 1991; CARRARO et al. 2001).

A colonoscopia é o teste diagnóstico mais útil e preciso para CRC, pois permite localizar e biopsiar lesões, detectar neoplasias sincrônicas (3-5%) e remover pólipos (MULDER et al. 2011). Em uma revisão sistemática de 25 estudos de diagnóstico de CRC realizada por PICKHARDT et al. (2011), em 9223 pacientes, a prevalência cumulativa de CRC foi de 3,6 % (414 tumores) e a sensibilidade da colonoscopia para detecção de CRC foi de 94,7%.

Considerando pacientes sintomáticos, as taxas de não conclusão da colonoscopia diagnóstica são de aproximadamente 11-12 %. As razões incluem a incapacidade do colonoscópio progredir por razões técnicas como obstrução tumoral, angulação do cólon, preparo ruim com persistência de conteúdo fecal e intolerância do paciente ao exame. Nessas situações, a colonografia virtual é altamente sensível para a detecção de CRC e pode fornecer um diagnóstico radiográfico, embora não tenha a capacidade para biopsiar ou remover os pólipos (NERI et al. 2002; ATKIN et al. 2013; PULLENS et al. 2013).

O estadiamento Tumor-node-metastasis (TNM) do *American Joint Committee on Cancer (AJCC) / Unionfor International Cancer Control (UICC)* é o sistema de estadiamento preferido, universalmente utilizado (EDGE et al. 2010) (Anexo 2).

O estadiamento é complementado com tomografia computadorizada (TC) abdominal e pélvica que podem demonstrar a extensão regional do tumor, metástases e complicações relacionadas (HORTON et al. 2000). A sensibilidade da TC para detectar metástases hematogênicas é maior (75 a 87%) do que para a detecção do

envolvimento linfonodal (45 a 73%) e da profundidade de invasão transmural (aproximadamente 50%) (MCANDREW et al. 1999; NERAD et al. 2016).

A TC não é um exame de diagnóstico confiável para pequenas lesões em superfícies peritoneais (JACQUET et al. 1993). Segundo KOH et al. (2009), a sensibilidade para a detecção de implantes peritoneais depende da localização e do tamanho dos implantes. A sensibilidade da TC para nódulos <0,5 cm foi de 11% e de apenas 37% para implantes de 0,5 a 5 cm.

Segundo KIRKE et al. (2007), o benefício do estadiamento clínico de rotina com TC de tórax é controverso nos tumores no cólon, porém são de maior valor no câncer do reto, devido ao maior risco de metástase pulmonar.

A ressonância magnética do abdome superior pode identificar melhor as lesões hepáticas do que a TC (SAHANI et al. 2014). Na prática atual, a ressonância magnética do abdômen superior é, geralmente, reservada para pacientes que apresentam resultados suspeitos na TC.

A TC por Emissão de Pósitrons (PET) não parece adicionar informações significativas aos exames habituais de rotina (FURUKAWA et al. 2006; NAHAS et al. 2008). O melhor papel estabelecido das análises de PET, em pacientes com CRC, são como complemento individualizado no diagnóstico de recorrência e na avaliação da extensão da doença metastática.

Em pacientes com tumores no reto a ultrassonografia endoscópica transretal e a ressonância magnética pélvica podem ajudar a determinar a extensão da doença locorregional (RAFAELSEN et al. 2008).

1.2.4 Polipose Adenomatosa Familiar

A polipose adenomatosa familiar (FAP) é caracterizada pela presença de múltiplos pólipos adenomatosos colorretais (VASEN et al. 2015). Representa menos de 1% de todos os cânceres colorretais e afeta igualmente ambos os sexos (JÄRVINEN et al. 1992).

A FAP possui um padrão hereditário autossômico e dominante, sendo causada por mutações germinativas no gene supressor tumoral Adenomatous Polyposis Coli (*APC*) localizado no cromossomo 5q21 (BURT et al. 1995). A expressão fenotípica é variável, pois resulta de uma penetrância quase completa de polipose do cólon, mas com uma penetrância variável das manifestações extracolônicas da doença. Até 25% dos casos FAP são devidos a mutações *APC* novas (BISGAARD et al. 1994).

Na ausência da proteína *APC* funcional, a proteína truncada não se liga à beta-catenina e não promove sua degradação, ocasionando um acúmulo de beta-catenina que promove uma ativação transcricional da via de sinalização Wnt e seus genes alvo que controlam o crescimento celular (Figura 3).

A localização da mutação no gene *APC* possui implicações fenotípicas e tem sido associada à gravidade da doença (HEINEN et al. 2010). As mutações próximas ao códon 1309 são clinicamente mais agressivas com Polipose clássica e profusa. As mutações entre os códons 463 a 1444 foram associadas à hipertrofia congênita do epitélio pigmentar da retina (CHRPE) (CASPARI et al. 1995; GIARDIELLO et al. 1997; SORAVIA et al. 1998). As localizadas entre os códons 1445 e 1578 foram associadas ao desenvolvimento de tumores desmóides e mutações entre os códons 279 a 1309 foram associados à presença de polipose duodenal (SAURIN et al. 2002).

A maioria dos pacientes com FAP é assintomática até apresentarem complicações associadas ao desenvolvimento do câncer colorretal (75%), comumente diagnosticados entre 20 e 40 anos de idade. Nesses casos, sangramento gastrointestinal, dor abdominal e diarreia são os sintomas mais frequentes (CRONER et al. 2005).

A FAP clássica é caracterizada pela presença de mais de 100 pólipos intestinais e quanto mais densa for a quantidade de pólipos, mais precoce é o seu aparecimento, particularmente em indivíduos mais jovens e associada à mutações localizadas entre os códons 1250 a 1464 (LEOZ et al. 2015).

A polipose profusa geralmente se desenvolve na segunda ou terceira década de vida. A idade média do aparecimento de pólipos é de 16 anos, mas estes já podem ser observados em pacientes com menos de oito anos (PETERSEN et al. 1991).

Se não tratada, 100% dos pacientes com FAP clássica terão câncer até os 40 anos de idade. Cerca de 40% dos indivíduos apresentam tumores sincrônicos e mais de 80% dos tumores estão localizados no segmento do cólon distal. Acredita-se que os adenomas em pacientes com FAP se comportam de forma semelhante aos adenomas esporádicos e não apresentam, intrinsecamente, um maior potencial maligno. O aumento do risco de câncer colorretal na FAP é atribuível à grande quantidade de adenomas em uma idade precoce (SYNGAL et al. 2015).

A FAP atenuada (AFAP) é clinicamente caracterizada pela presença de poucos pólipos (geralmente entre 30-100 adenomas) com distribuição mais proximal no cólon e ausência de manifestações extra-colônicas. Usualmente, os adenomas e o câncer são diagnosticados em uma idade posterior ao da FAP clássica, com idade

média de 44 e 58 anos, respectivamente (HERNEGGER et al. 2002; BURT et al. 2004; SIEBER et al. 2006).

No trato gastrointestinal superior, frequentemente, podem ser encontrados pólipos de glândulas fúndicas com presença de displasia de baixo grau em quase metade dos pólipos, embora mais raramente estes evoluam para o câncer (BURT 2003). Os adenomas gástricos são muito menos comuns, sendo tipicamente isolados, localizados no antro e associados a risco relativamente baixo de progressão neoplásica (BIANCHI et al. 2008).

Os adenomas duodenais apresentam distribuição principalmente periampular, ocorrem na maioria dos pacientes com FAP clássica e tem cerca de 5% de risco de câncer duodenal (WALLACE e PHILLIPS 1998; LEOZ et al. 2015).

Os tumores desmóides ocorrem em 10-15% dos pacientes com FAP. Esses tumores, apesar de não serem metastáticos, causam alta morbidade e mortalidade por comprometimento e infiltração locorregional. O trauma cirúrgico é um fator de risco importante para seu desenvolvimento (SLOWIK et al. 2015). STEVANATO et al. (2015) avaliaram, no A. C. Camargo Cancer Center, que os indivíduos com FAP clássica submetidos a tratamento cirúrgico preventivo ou terapêutico para CRC, evoluíram com uma incidência de 30% de tumores desmóides com mortalidade de 16%.

A Síndrome de Gardner foi originalmente descrita, em 1953, para caracterizar famílias com polipose colônica e manifestações extracolônicas (GARDNER e RICHARDS 1953). Estas manifestações extraintestinais incluem tumores desmóides, cistos sebáceos ou epidermóides, lipomas, osteomas (especialmente da mandíbula), fibromas, dentes supernumerários e pólipos gástricos CHRPE (TOURIÑO et al.

2004; BISGAARD e BÜLOW 2006). A Síndrome de Turcot é caracterizada pela associação de polipose intestinal e tumores cerebrais (ependimomas, astrocitoma e meduloblastoma, principalmente) (GROEN et al. 2008).

O diagnóstico da FAP pode ser clínico ou genético. Deve ser suspeitado em qualquer paciente que tenha 10 ou mais adenomas colorretais ou com história de adenomas em combinação com características extracolônicas. A mutação germinativa do gene *APC* estabelece o diagnóstico de FAP (American Gastroenterological Association-AGA 2001; BURT e NEKLASON 2005).

1.2.5 Marcadores tumorais laboratoriais

Uma variedade de marcadores séricos tem sido associada ao CRC, particularmente o antígeno carcinoembrionário (CEA). No entanto, todos os marcadores, incluindo o CEA, possuem baixa sensibilidade diagnóstica para detectar CRC primário devido à sobreposição significativa com outras patologias e baixa sensibilidade para doença em estágio inicial (MACDONALD 1999; PALMQVIST et al. 2003; LOCKER et al. 2006). Segundo LIU et al. (2014), em uma revisão sistemática, concluíram que a sensibilidade de CEA para o diagnóstico de CRC era de apenas 46% (IC 95%: 0,45-0,47). As causas não relacionadas ao câncer de CEA elevado foram: doença inflamatória gastrointestinal, doença hepática, doença pulmonar obstrutiva crônica, diabetes e qualquer outro estado inflamatório agudo ou crônico. Além disso, os níveis de CEA são significativamente maiores em tabagistas (SAJID et al. 2007). Nenhum outro marcador de tumor convencional apresentou maior sensibilidade diagnóstica para o CRC.

A *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) e o *European Group on Tumour Markers* (EGTM) recomendam que nenhum marcador com dosagem sérica seja utilizado como teste de triagem ou diagnóstico para CRC. No entanto, os níveis de CEA têm valor no prognóstico e no seguimento de pacientes com CRC diagnosticado (DUFFY et al. 2003; LOCKER et al. 2006). Pacientes com dosagem de CEA pré-operatória > 5 ng / mL apresentam pior prognóstico e elevados níveis pré-operatórios que não se normalizam após a ressecção cirúrgica e implicam na presença de doença persistente.

1.2.6 Fatores hormonais no Câncer Colorretal

A terapia hormonal pós-menopausa tanto com estrogênio combinado com progesterona ou com estrogênio sem oposição, tem sido associada a um risco reduzido de CRC (CALLE et al. 1995; FERNANDEZ et al. 1998; GRODSTEIN et al. 1999; ANDERSON et al. 2004; JOHNSON et al. 2009; RENNERT et al. 2009; GREEN et al. 2012; LIN et al. 2012), embora estes dados sejam mais consistentes para o uso hormonal combinado (ANDERSON et al. 2004; LAVASANI et al. 2015). Segundo o *Women's Health Initiative* (WHI), houve redução do risco em mulheres submetidas à terapia combinada (RR 0,56), com o efeito protetor permanecendo, mesmo depois, em mulheres que relataram ter sigmoidoscopia de triagem excluídas (CHLEBOWSKI et al. 2004). Apesar do menor risco de CRC, a WHI não recomenda o uso da reposição hormonal para esta finalidade, já que a terapia hormonal pode causar maior morbidade por outras doenças como coronariopatia, acidente vascular cerebral, tromboembolismo venoso e câncer de mama (ANDERSON et al. 2004).

Recentemente, IVERSEN et al. (2017), com *Royal College of General Practitioners' Oral Contraception Study*, demonstraram que houve um efeito protetor do uso de contraceptivos orais em mulheres pré-menopausadas. Neste estudo, 46.022 mulheres foram recrutadas entre os anos de 1968-1969 e observadas por até 44 anos. Mulheres que haviam utilizado anticoncepcionais orais, em comparação com as que nunca haviam utilizado, apresentaram uma incidência significativamente menor de CRC (taxa de incidência 0,81, IC 95% 0,66-0,99).

Em geral, maior prevalência de doença inflamatória intestinal e de câncer de cólon em homens do que em mulheres (NELSON et al. 1997), sugere que o estrógeno possa ter algum papel na fisiopatologia do cólon. O papel protetor do estrogênio no desenvolvimento do câncer de cólon foi estudado e estabelecido em modelos animais. Estudos com ratas $Apc^{Min/+}$ submetidas a ooforectomia mostraram aumento acentuado de pólipos adenomatosos intestinais, enquanto que a reposição de estrogênio, nessas ratas, reduziu o número de pólipos (WEYANT et al. 2001). Em diversos estudos, a exposição de ratas ooforectomizadas ao estrogênio reduziu a taxa de tumores do cólon em até 71% (SMIRNOFF et al. 1999; GUO et al. 2004; CHO et al. (2007). Ratos geneticamente deficientes em ER (receptores de estrógeno) demonstraram uma maior incidência de adenomas e microadenomas displásicos relacionadas ao ER- β mutados. No entanto, carcinomas invasivos foram encontrados apenas em ratos com ER- β deficientes, sugerindo que esse receptor desempenha papéis autônomos não-celulares adicionais que limitam a progressão tumoral. Análises histológicas de cólon de ratos com deficiência de ER e daqueles ooforectomizados revelaram diferenças significativas na arquitetura de criptas e maior proliferação de enterócitos em relação aos casos selvagens.

A experiência com uso de produtos de soja complementa a hipótese de que os estrogênios tenham um efeito protetor contra o câncer colorretal. A menor incidência de câncer colorretal em asiáticos pode ser atribuída ao alto teor de soja na dieta. Em modelos animais, a genisteína, o estrogênio na soja, inibe a proliferação celular de câncer de cólon e estimula a apoptose por meio da interação com várias vias (KIM et al. 2005; QI et al. 2011).

1.2.7 Mecanismos de ação dos receptores de estrógenos

Os estrogênios são membros da família de hormônios esteróides e, tradicionalmente, estão associados ao desenvolvimento reprodutivo feminino, mas também, atuam em outros sistemas como os cardiovasculares, esqueléticos, imunes, gastrointestinais e neurais (DEROO e KORACH 2006). O estrogênio mais abundante e mais potente em humanos é 17 β -estradiol (E2). Outros estrógenos naturais incluem estrona (E1) e estriol (E3), metabólitos de E2. Suas principais ações são genômicas, mediadas por receptores de estrogênio nuclear (ERs), mas também possuem ações não genômicas.

Os ERs são membros de uma família de receptores hormonais nucleares que incluem receptores que se ligam a outros esteróides, hormônios tireoidianos e retinóides e a receptores como o receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR), o receptor X de farnesóide (FXR) e o receptor de fígado X (LXR) que mediam os processos metabólicos (HUANG et al. 2010). Os ERs também se ligam em famílias de receptores órfãos, cujos ligantes ainda não foram definidos, mas que funcionam como fatores de transcrição nuclear (BRÉLIVET et al. 2012).

A descoberta de ERs diferentes revelou seu papel significativo em tipos de tecido diferentes do trato reprodutivo feminino, incluindo o sistema gastrointestinal (GUSTAFSSON 1999). Os estrógenos regulam estes efeitos celulares por meio dos seus receptores intracelulares, ER α e ER β . Os dois receptores são codificados por genes separados, *ESR1* (ER α) e *ESR2* (ER β), com cada gene produzindo diferentes isoformas de receptor de *splicing* alternativo, resultando em três ER α e cinco variantes de ER β . Estas variações podem determinar diferentes efeitos (DEROO e BUENSUCESO 2010; SPEIRS et al. 2008).

Diferenças na interação do estrogênio ER α e ER β também podem explicar seus efeitos intracelulares distintivos (NILSSON et al. 2001). Segundo HALL e MCDONNELL (1999), a resposta biológica de ER α e ER β , quando ativados, depende da proporção de ER α para ER β na célula uma vez que ER β inibe a atividade transcricional de ER α .

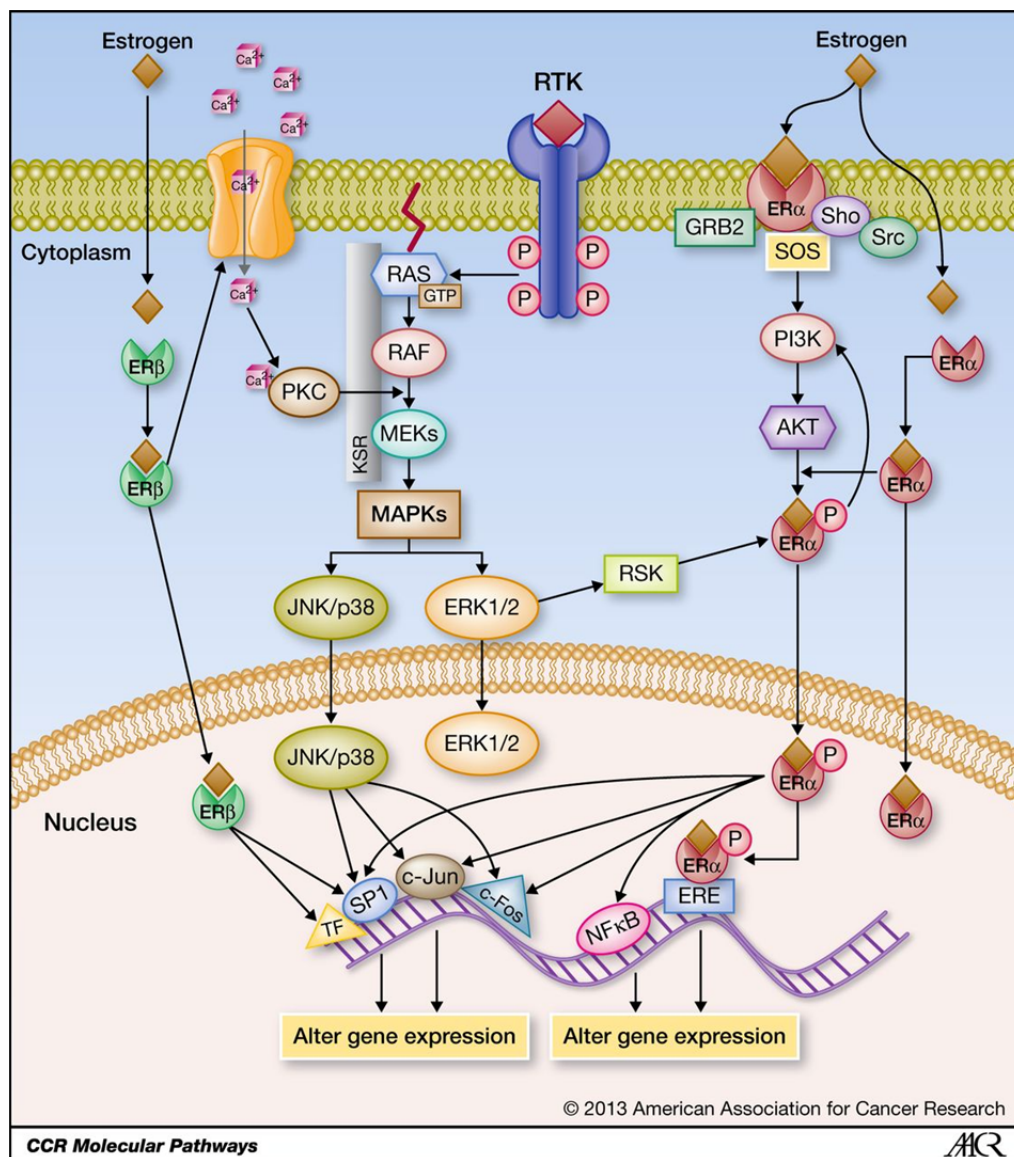
Os efeitos intracelulares do estrogênio são exercidos por meio de duas vias principais: genômicas e não genômicas. O ER funciona como um fator de transcrição gênica dependente do ligante, pela interação direta com elementos de resposta ao estrogênio (ERE) ou outros fatores de transcrição, como C-Fos / C-Jun / AP1, constituindo o principal mecanismo genômico do estrogênio nas células. (HALL e MCDONNELL 1999; KUSHNER et al. 2000; SAFE e KIM 2004). Os efeitos genômicos também podem ser alcançados a partir de interações do receptor sem o ligante, por caminhos independentes, aos quais os ERs são fosforilados por uma via de cinase ativada. Como exemplo, o receptor EGF (EGFR) pode ativar a via Ras / Raf / MAPK que, por sua vez, irá fosforilar o ER resultando em dimerização e

ativação independente do ligando da expressão gênica (DRIGGERS e SEGARS 2002; MARTIN et al. 2005) (Figura 4)

Embora a interação de ambos ERs com ERE seja semelhante, ER α interage com outros fatores de transcrição como c-Jun e c-Fos do complexo ativador de proteína-1 (AP1) e SP1, enquanto que a interação de ER β com esses fatores de transcrição são menos significativos (DEROO e BUENSUCESO 2010). No caso de AP1, mostrou-se que a ligação de 17 β -estradiol (E2) à ER α resulta na ativação da transcrição e que a ligação a ER β inibe a transcrição desviando o estrogênio para longe da via ER α (PAECH et al. 1997; FOLEY et al. 2000).

Os efeitos dos estrógenos mediados por ação genômica resultam na transcrição ativada de uma ampla gama de genes, incluindo genes envolvidos na angiogênese como *VEGF*, na adesão celular como caderinas e lamininas, na proliferação e apoptose, incluindo a família *TGF β* (BARZI et al. 2013).

Além dos efeitos genômico, o estrogênio e seus receptores podem ativar diversas vias de sinalização sem interação direta com o DNA, resultando em modulação de processos celulares adicionais. Os ER de membrana ativam diversas vias intracelulares, incluindo PKC, Ca⁺⁺ intracelular, CAMP citosólico, óxido nítrico e MAPK (BARZI et al. 2013).



Fonte: BARZI et al. (2013)

Figura 4 - Os efeitos intracelulares com as principais vias de ação do estrogênio.

2 ARTIGO 1

2.1 ESTROGEN RECEPTOR β AS A PROGNOSTIC MARKER OF TUMOR PROGRESSION IN COLORECTAL CANCER WITH FAMILIAL ADENOMATOUS POLYPOSIS AND SPORADIC POLYPS

Paulo Roberto Stevanato Filho¹, Samuel Aguiar Júnior¹, Maria Dirlei Begnami², Fábio de Oliveira Ferreira¹, Wilson Toshihiko Nakagawa¹, Ranyell Matheus Spencer¹, Tiago Santoro Bezerra¹, Philip Edward Boggiss¹, Ademar Lopes¹

¹Colorectal Tumor Nucleus of the Pelvic Surgery Department,

²Department of Pathology,

A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil

Publicado: Pathology & Oncology Research 2017 Jun 23. [Epub ahead of print].

DOI: 10.1007/s12253-017-0268-5

Address correspondence to:Colorectal Tumor Nucleus of the A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil. R. Professor Antônio Prudente, 211 Liberdade, São Paulo CEP 01509-010; paulo.stevanato@accamargo.org.br; telephone and fax number: (55) 11 2189-5000. <http://www.accamargo.org.br>

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

3 ARTIGO 2

3.1 OESTROGEN RECEPTOR B ISOFORMS EXPRESSION IN SPORADIC COLORECTAL CANCER, FAMILIAL ADENOMATOUS POLYPOSIS AND PROGRESSIVE STAGES OF COLORECTAL CANCER

Paulo Roberto Stevanato Filho¹, Samuel Aguiar Júnior¹, Maria Dirlei Begnami², Hellen Kuasne^{3,4}, Ranyell Matheus Spencer¹, Wilson Toshihiko Nakagawa¹, Tiago Santoro Bezerra¹, Bruna Catin Kupper¹, Renata Maymi Takahashi¹, Mateus Barros Filho³, Silvia Regina Rogatto^{3,4*}, Ademar Lopes^{1*}

*These authors contributed equally to this work.

¹Colorectal Tumor Nucleus of the Pelvic Surgery Department, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil

²Department of Pathology, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil

³CIPE - International Center for Research, A. C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

⁴Department of Clinical Genetics, Vejle Sygehus, Vejle and Institute of Regional Health Research, University of Southern Denmark, DK

Keywords: colorectal cancer, ER β isoforms, oestrogen receptor, familial adenomatous polyposis, hormone receptors

Corresponding author: Paulo Roberto Stevanato Filho, Colorectal Tumor Nucleus of the A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil. R. Professor Antônio Prudente, 211 Liberdade, São Paulo CEP 01509-010; Paulo. stevanato@accamargo.org.br; telephone and fax number: (55) 11 2189-5000. <http://www.accamargo.org.br>

BMC Cancer.

30 May 2017. BCAN-D-17-00969

ABSTRACT

Background: Among the sex hormones, oestrogen may play a role in colorectal cancer, particularly in conjunction with oestrogen receptor- β (ER β). The expression of ER β isoform variants and their correlations with familial adenomatous polyposis (FAP) syndrome and sporadic colorectal carcinomas are poorly described. **Methods:** This study aimed to investigate the expression levels of the ER β 1, ER β 2, ER β 4 and ER β 5 isoform variants using quantitative RT-PCR (921 analyses) in FAP, normal mucosa, adenomatous polyps and sporadic colorectal carcinomas. **Results:** Decreased expression of ER β isoforms was identified in sporadic polyps and in sporadic colorectal cancer as well as in polyps from FAP syndrome patients compared with normal tissues ($p < 0.001$). In FAP patients, ER β 1 and ER β 5 isoforms showed significant down-expression in polyps ($p < 0.001$) compared with matched normal tissues. However, no differences were observed when sporadic colorectal carcinomas were compared to normal mucosa tissues. These findings suggest an association of the ER β isoform variants in individuals affected by germline

mutations of the APC gene. Progressively decreased expression of ER β was found in polyps at early stages of low-grade dysplasia, followed by T1-T2 and T3-T4 tumours ($p < 0.05$). In sporadic colorectal cancer, the loss of expression was an independent predictor of recurrence, and ER β 1 and ER β 5 expression levels were associated with better disease-free survival ($p = 0.002$). **Conclusion:** These findings may provide a better understanding of oestrogens and their potential preventive and therapeutic effects on sporadic colorectal cancer and cancers associated with FAP syndrome.

4 CONCLUSÕES

- 1 Entre os hormônios sexuais, o estrogênio pode desempenhar um papel no câncer colorretal, particularmente por meio de receptores- β (ER- β).
- 2 As diferenças na expressão imunoistoquímica de ER- β e das variantes isoformas ER- β por RT-PCR, na progressão do câncer colorretal, representam um mecanismo potencial pelo qual o estrogênio pode alterar a susceptibilidade ao câncer de cólon, confirmando assim, a possibilidade de um papel protetor na carcinogênese colorretal.
- 3 Variantes isoformas de ER- β em concentrações distintas podem ser um dos mecanismos da ação diferenciada dos estrógenos em diferentes tecidos. Os altos níveis de expressão das isoformas ER β 5, nos indivíduos com mutação germinativa no gene APC, pode ser um potencial cofator no desenvolvimento de pólipos na puberdade e na carcinogênese colorretal relacionada à FAP.
- 4 No câncer colorretal esporádico, os níveis de expressão de ER β 1 e ER β 5 são fatores independentes de recorrência.
- 5 Esses achados sugerem a necessidade de novos estudos clínicos voltados para estratégias preventivas, especialmente em grupos de pacientes que estão sob privação hormonal.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahnen DJ, Wade SW, Jones WF, et al. The increasing incidence of young-onset colorectal cancer: a call to action. **Mayo Clin Proc** 2014; 89:216.

Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion: Testing for KRAS Gene Mutations in Patients With Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy. **J Clin Oncol** 2009; 27:2091-6.

[AGA] American Gastroenterological Association. American Gastroenterological Association medical position statement: hereditary colorectal cancer and genetic testing. **Gastroenterology** 2001; 121:195-7.

Amri R, Bordeianou LG, Sylla P, Berger DL. Impact of screening colonoscopy on outcomes in colon cancer surgery. **JAMA Surg** 2013; 148:747-54.

Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA** 2004; 291:1701-12.

Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. **Mol Aspects Med** 2006; 27:299-402.

Atkin W, Dadswell E, Wooldrage K, et al. Computed tomographic colonography versus colonoscopy for investigation of patients with symptoms suggestive of colorectal cancer (SIGGAR): a multicentre randomised trial. **Lancet** 2013; 381:1194-202.

Barzi A, Lenz AM, Labonte MJ, Lenz HJ. Molecular pathways: estrogen pathway in colorectal cancer. **Clin Cancer Res** 2013; 19:5842-8.

Benson AB 3rd, Ajani JA, Catalano RB, et al. Recommended guidelines for the treatment of cancer treatment-induced diarrhea. **J Clin Oncol** 2004; 22:2918-26.

Bianchi LK, Burke CA, Bennett AE, Lopez R, Hasson H, Church JM. Fundic gland polyp dysplasia is common in familial adenomatous polyposis. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2008; 6:180-5.

Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. **Cell** 2000; 103:311-20.

Bisgaard ML, Bülow S. Familial adenomatous polyposis (FAP): genotype correlation to FAP phenotype with osteomas and sebaceous cysts. **Am J Med Genet A** 2006; 140:200-4.

Bisgaard ML, Fenger K, Bülow S, Niebuhr E, Mohr J. Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. **Hum Mutat** 1994; 3:121-5.

Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. **Nature** 1991; 349:117-27.

Brélivet Y, Rochel N, Moras D. Structural analysis of nuclear receptors: from isolated domains to integral proteins. **Mol Cell Endocrinol** 2012; 348:466-73.

Burt R, Neklason DW. Genetic testing for inherited colon cancer. **Gastroenterology** 2005; 128:1696-716.

Burt RW, DiSario JA, Cannon-Albright L. Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. **Annu Rev Med** 1995; 46:371-9.

Burt RW, Leppert MF, Slattery ML, et al. Genetic testing and phenotype in a large kindred with attenuated familial adenomatous polyposis. **Gastroenterology** 2004; 127:444-51.

Burt RW. Gastric fundic gland polyps. **Gastroenterology** 2003; 125:1462-9.

Calle EE, Miracle-McMahill HL, Thun MJ, Heath CW Jr. Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:517-23.

Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. **Ann Intern Med** 2002; 137:603-12.

Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B. Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. **Cancer Res** 2001; 61:632-40.

Carraro PG, Segala M, Cesana BM, Tiberio G. Obstructing colonic cancer: failure and survival patterns over a ten-year follow-up after one-stage curative surgery. **Dis Colon Rectum** 2001; 44:243-50.

Cartwright C. Intestinal cell growth control: role of Src tyrosine kinases. **Gastroenterology** 1998; 114:1335-8.

Caspari R, Olschwang S, Friedl W, et al. Familial adenomatous polyposis: desmoid tumours and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with APC mutations beyond codon 1444. **Hum Mol Genet** 1995; 4:337-40.

Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2009; 18:1688-94.

Chang DT, Pai RK, Rybicki LA, et al. Clinicopathologic and molecular features of sporadic early-onset colorectal adenocarcinoma: an adenocarcinoma with frequent signet ring cell differentiation, rectal and sigmoid involvement, and adverse morphologic features. **Mod Pathol** 2012; 25:1128-39.

Chlebowski RT, Wactawski-Wende J, Ritenbaugh C, et al. Estrogen plus progestin and colorectal cancer in postmenopausal women. **N Engl J Med** 2004; 350:991-1004.

Cho NL, Javid SH, Carothers AM, Redston M, Bertagnolli MM. Estrogen receptors alpha and beta are inhibitory modifiers of Apc-dependent tumorigenesis in the proximal colon of Min/+ mice. **Cancer Res** 2007; 67:2366-72.

Colditz GA. Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy, and breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 1998; 90:814-23.

Cottet V, Jooste V, Fournel I, Bouvier AM, Faivre J, Bonithon-Kopp C. Long-term risk of colorectal cancer after adenoma removal: a population-based cohort study. **Gut** 2012; 61:1180-6.

Croner RS, Brueckl WM, Reingruber B, Hohenberger W, Guenther K. Age and manifestation related symptoms in familial adenomatous polyposis. **BMC Cancer** 2005; 5:24.

Crucitti F, Sofo L, Doglietto GB, et al. Prognostic factors in colorectal cancer: current status and new trends. **J Surg Oncol Suppl** 1991; 2:76-82.

Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. **J Clin Oncol** 2004; 22:4632-42.

Davis DM, Marcet JE, Frattini JC, Prather AD, Mateka JJ, Nfonsam VN. Is it time to lower the recommended screening age for colorectal cancer? **J Am Coll Surg** 2011; 213:352-61.

Dawson PM, Shousha S, Blair SD, Carter GD, Jones J, Alaghband-Zadeh J, Theodorou NA. Oestrogen receptors in colorectal carcinoma. **J Clin Pathol** 1990; 43:149-151.

Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. **J Clin Invest** 2006; 116:561-70.

Deroo BJ, Buensuceso AV. Minireview: estrogen receptor-beta: mechanistic insights from recent studies. **Mol Endocrinol** 2010; 24:1703-14.

Di Leo A, Messa C, Russo F, et al. Prognostic value of cytosolic estrogen receptors in human colorectal carcinoma and surrounding mucosa: preliminary results. **Dig Dis Sci** 1994; 39:2038-42.

Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, et al. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. **Oncogene** 2005; 24:3995-98.

Dozois EJ, Boardman LA, Suwanthanma W, et al. Young-onset colorectal cancer in patients with no known genetic predisposition: can we increase early recognition and improve outcome? **Medicine (Baltimore)** 2008; 87:259-63.

Driggers PH, Segars JH. Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling. **Trends Endocrinol Metab** 2002; 13:422-7.

Drucker L, Shpilberg O, Neumann A, et al. Adenomatous polyposis coli I1307K mutation in Jewish patients with different ethnicity: prevalence and phenotype. **Cancer** 2000; 88:755-60.

Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. **Eur J Cancer** 2003; 39:718-27.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7th ed. New York: Springer-Verlag; 2010. Colon and rectum; p.143-64.

Ellem SJ, Risbridger GP. Treating prostate cancer: a rationale for targeting local oestrogens. **Nat Rev Cancer** 2007; 7:621-7.

Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. **Hum Mol Genet** 2001; 10:721-33.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell** 1990; 61:759-67.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. **GLOBOCAN, 2012, cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 11**. 2013. Available from: <URL:<http://globocan.iarc.fr>> [2017 Apr 29].

Fernandez E, Bosetti C, La Vecchia C, Levi F, Fioretti F, Negri E. Sex differences in colorectal cancer mortality in Europe, 1955-1996. **Eur J Cancer Prev** 2000; 9:99-104.

Fernandez E, La Vecchia C, Braga C, et al. Hormone replacement therapy and risk of colon and rectal cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1998; 7:329-33.

Foley EF, Jazaeri AA, Shupnik MA, Jazaeri O, Rice LW. Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. **Cancer Res** 2000; 60:245-8.

French AJ, Sargent DJ, Burgart LJ, et al. Prognostic significance of defective mismatch repair and BRAF V600E in patients with colon cancer. **Clin Cancer Res** 2008; 14:3408-15.

Furukawa H, Ikuma H, Seki A, et al. Positron emission tomography scanning is not superior to whole body multidetector helical computed tomography in the preoperative staging of colorectal cancer. **Gut** 2006; 55:1007-11.

Gardner EJ, Richards RC. Multiple cutaneous and subcutaneous lesions occurring simultaneously with hereditary polyposis and osteomatosis. **Am J HumGenet** 1953; 5:139-47.

Gebert JF, Dupon C, Kadmon M, et al. Combined molecular and clinical approaches for the identification of families with familial adenomatous polyposis coli. **Ann Surg** 1999; 229:350-61.

Giardiello FM, Petersen GM, Piantadosi S, et al. APC gene mutations and extraintestinal phenotype of familial adenomatous polyposis. **Gut** 1997; 40:521-7.

Goel A, Nagasaka T, Arnold CN, et al. The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. **Gastroenterology** 2007; 132:127-38.

Goodman D, Irvin TT. Delay in the diagnosis and prognosis of carcinoma of the right colon. **Br J Surg** 1993; 80:1327-9.

Goss KH, Groden J. Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. **J Clin Oncol** 2000; 18:1967-79.

Green J, Czanner G, Reeves G, et al. Menopausal hormone therapy and risk of gastrointestinal cancer: nested case-control study within a prospective cohort, and meta-analysis. **Int J Cancer** 2012; 130:2387-96.

Grodstein F, Newcomb PA, Stampfer MJ. Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. **Am J Med** 1999; 106:574-82.

Groen EJ, Roos A, Muntinghe FL, et al. Extra-intestinal manifestations of familial adenomatous polyposis. **Ann Surg Oncol** 2008; 15:2439-50.

Guo JY, Li X, Browning JD Jr, et al. Dietary soy isoflavones and estrone protect ovariectomized ERalphaKO and wild-type mice from carcinogen-induced colon cancer. **J Nutr** 2004; 134:179-82.

Gustafsson JA. Estrogen receptor beta-a new dimension in estrogen mechanism of action. **J Endocrinol** 1999; 163:379-83.

Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. **Endocrinology** 1999; 140:5566-78.

Hamilton W, Round A, Sharp D, Peters TJ. Clinical features of colorectal cancer before diagnosis: a population-based case-control study. **Br J Cancer** 2005; 93:399-405.

Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC. Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. **Breast Cancer Res** 2004; 6:213-8.

Heinen CD. Genotype to phenotype: analyzing the effects of inherited mutations in colorectal cancer families. **Mutat Res** 2010; 693:32-45.

Hendifar A, Yang D, Lenz F, et al. Gender disparities in metastatic colorectal cancer survival. **Clin Cancer Res** 2009; 15:6391-7.

Hendrickse CW, Jones CE, Donovan IA, Neoptolemos JP, Baker PR. Oestrogen and progesterone receptors in colorectal cancer and human colonic cancer cell lines. **Br J Surg** 1993; 80:636-40.

Hernegger GS, Moore HG, Guillem JG. Attenuated familial adenomatous polyposis: an evolving and poorly understood entity. **Dis Colon Rectum** 2002; 45:127-34, discussion 134-6.

Horton KM, Abrams RA, Fishman EK. Spiral CT of colon cancer: imaging features and role in management. **Radiographics** 2000; 20:419-30.

Huang P, Chandra V, Rastinejad F. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. **Annu Rev Physiol** 2010; 72:247-72.

Iversen L, Sivasubramaniam S, Lee AJ, Fielding S, Hannaford PC. Lifetime cancer risk and combined oral contraceptives: the Royal College of General Practitioners' Oral Contraception Study. **Am J Obstet Gynecol** 2017; 216:580.e1-e9.

Jacquet P, Jelinek JS, Steves MA, Sugarbaker PH. Evaluation of computed tomography in patients with peritoneal carcinomatosis. **Cancer** 1993; 72:1631-6.

Järvinen HJ. Epidemiology of familial adenomatous polyposis in Finland: impact of family screening on the colorectal cancer rate and survival. **Gut** 1992; 33:357-60.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:69-90.

Jessup JM, McGinnis LS, Steele GD Jr, Menck HR, Winchester DP. The National Cancer Data Base: report on colon cancer. **Cancer** 1996; 78:918-26.

Johnson JR, Lacey JV Jr, Lazovich D, et al. Menopausal hormone therapy and risk of colorectal cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2009; 18:196-203.

Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. **N Engl J Med** 2008; 359:1757-65.

Kim EJ, Shin HK, Park JH. Genistein inhibits insulin-like growth factor-I receptor signaling in HT-29 human colon cancer cells: a possible mechanism of the growth inhibitory effect of Genistein. **J Med Food** 2005; 8:431-8.

Kim PJ, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. **Lancet** 2003; 362:205-9.

Kirke R, Rajesh A, Verma R, Bankart MJ. Rectal cancer: incidence of pulmonary metastases on thoracic CT and correlation with T staging. **J Comput Assist Tomogr** 2007; 31:569-71.

Koh JL, Yan TD, Glenn D, Morris DL. Evaluation of preoperative computed tomography in estimating peritoneal cancer index in colorectal peritoneal carcinomatosis. **Ann Surg Oncol** 2009; 16:327-33.

Korinek V, Barker N, Morin PJ, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. **Science** 1997; 275:1784-7.

Kouzmenko AP, Takeyama K, Kawasaki Y, Akiyama T, Kato S. Ligand-dependent interaction between estrogen receptor alpha and adenomatous polyposis coli. **Genes Cells** 2008; 13:723-30.

Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. **J Steroid Biochem Mol Biol** 2000; 74:311-7.

Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, et al. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. **Nat Genet** 1997; 17:79-83.

Lamlum H, Ilyas M, Rowan A, et al. The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis. **Nat Med** 1999; 5:1071-5.

Lavasani S, Chlebowski RT, Prentice RL, et al. Estrogen and colorectal cancer incidence and mortality. **Cancer** 2015; 121:3261-71.

Leoz ML, Carballal S, Moreira L, Ocaña T1, Balaguer F1. The genetic basis of familial adenomatous polyposis and its implications for clinical practice and risk management. **Appl Clin Genet** 2015; 8:95-107.

Lieberman DA, Rex DK, Winawer SJ, et al. Guidelines for colonoscopy surveillance after screening and polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. **Gastroenterology** 2012; 143:844-57.

Lin KJ, Cheung WY, Lai JY, Giovannucci EL. The effect of estrogen vs. combined estrogen-progestogen therapy on the risk of colorectal cancer. **Int J Cancer** 2012; 130:419-30.

Little J, Faivre J. Family history, metabolic gene polymorphism, diet and risk of colorectal cancer. **Eur J Cancer Prev** 1999; 8 Suppl 1:S61-72.

Liu Z, Zhang Y, Niu Y, et al. A systematic review and meta-analysis of diagnostic and prognostic serum biomarkers of colorectal cancer. **PLoS One** 2014; 9:e103910.

Loberg M, Kalager M, Holme O, Hoff G, Adami HO, Bretthauer M. Long-term colorectal-cancer mortality after adenoma removal. **N Engl J Med** 2014; 371:799-807.

Locker GY, Hamilton S, Harris J, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. **J Clin Oncol** 2006; 24:5313-27.

Lowery JT, Ahnen DJ, Schroy PC 3rd, et al. Understanding the contribution of family history to colorectal cancer risk and its clinical implications: a state-of-the-science review. **Cancer** 2016; 122:2633-45.

Lynch JP, Hoops TC. The genetic pathogenesis of colorectal cancer. **Hematol Oncol Clin North Am** 2002; 16:775-810.

Macdonald JS. Carcinoembryonic antigen screening: pros and cons. **Semin Oncol** 1999; 26:556-60.

Macrae FA, St John DJ. Relationship between patterns of bleeding and hemoccult sensitivity in patients with colorectal cancers or adenomas. **Gastroenterology** 1982; 82:891-8.

Mamazza J, Gordon PH. The changing distribution of large intestinal cancer. **Dis Colon Rectum** 1982; 25:558-62.

Martin LA, Farmer I, Johnston SR, Ali S, Dowsett M. Elevated ERK1/ERK2/estrogen receptor cross-talk enhances estrogen-mediated signaling during long-term estrogen deprivation. **Endocr Relat Cancer** 2005; 12 Suppl 1:S75-S84.

Martínez ME, Baron JA, Lieberman DA, et al. A pooled analysis of advanced colorectal neoplasia diagnoses after colonoscopic polypectomy. **Gastroenterology** 2009; 136:832-41.

McAndrew MR, Saba AK. Efficacy of routine preoperative computed tomography scans in colon cancer. **Am Surg** 1999; 65:205-8.

Meggouh F, Lointier P, Pezet D, Saez S. Status of sex steroid hormone receptors in large bowel cancer. **Cancer** 1991; 67:1964-70.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

Moiel D, Thompson J. Early detection of colon cancer-the kaiser permanente northwest 30-year history: how do we measure success? Is it the test, the number of tests, the stage, or the percentage of screen-detected patients? **Perm J** 2011; 15:30-8.

Moreira L, Balaguer F, Lindor N, et al. Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. **JAMA** 2012; 308:1555-65.

Moreno CC, Mittal PK, Sullivan PS, et al. Colorectal cancer initial diagnosis: screening colonoscopy, diagnostic colonoscopy, or emergent surgery, and tumor stage and size at initial presentation. **Clin Colorectal Cancer** 2016; 15:67-37.

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. **Science** 1997; 275:1787-90.

Mork ME, You YN, Ying J, et al. High prevalence of hereditary cancer syndromes in adolescents and young adults with colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2015; 33:3544-9.

Mulder SA, Kranse R, Damhuis RA, et al. Prevalence and prognosis of synchronous colorectal cancer: a Dutch population-based study. **Cancer Epidemiol** 2011; 35:442-17.

Nahas CS, Akhurst T, Yeung H, et al. Positron emission tomography detection of distant metastatic or synchronous disease in patients with locally advanced rectal cancer receiving preoperative chemoradiation. **Ann Surg Oncol** 2008; 15:704-11.

Nelson RL, Dollear T, Freels S, Persky V. The relation of age, race, and gender to the subsite location of colorectal carcinoma. **Cancer** 1997; 80:193-7.

Nerad E, Lahaye MJ, Maas M, et al. Diagnostic accuracy of CT for local staging of colon cancer: a systematic review and meta-analysis. **AJR Am J Roentgenol** 2016; 207:984-85.

Neri E, Giusti P, Battolla L, et al. Colorectal cancer: role of CT colonography in preoperative evaluation after incomplete colonoscopy. **Radiology** 2002; 223:615-9.

Nieuwenhuis MH, Vasen HF. Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. **Crit Rev Oncol Hematol** 2007; 61:153-61.

Nilsson S, Makela S, Treuter E, et al. Mechanisms of estrogen action. **Physiol Rev** 2001; 81:1535-65.

Noffsinger AE. Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. **Annu Rev Pathol** 2009; 4:343-64.

Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. **Gut** 2009; 58:90-6.

Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. **Science** 1997; 277:1508-10.

Palmqvist R, Engarås B, Lindmark G, et al. Prediagnostic levels of carcinoembryonic antigen and CA 242 in colorectal cancer: a matched case-control study. **Dis Colon Rectum** 2003; 46:1538-44.

Petersen GM, Slack J, Nakamura Y. Screening guidelines and premorbid diagnosis of familial adenomatous polyposis using linkage. **Gastroenterology** 1991; 100:1658-64.

Pickhardt PJ, Hassan C, Halligan S, Marmo R. Colorectal cancer: CT colonography and colonoscopy for detection--systematic review and meta-analysis. **Radiology** 2011; 259:393-405.

Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:916-32.

Pullens HJ, van Leeuwen MS, Laheij RJ, Vleggaar FP, Siersema PD. CT-colonography after incomplete colonoscopy: what is the diagnostic yield? **Dis Colon Rectum** 2013; 56:593-9.

Qi W, Weber CR, Wasland K, Savkovic SD. Genistein inhibits proliferation of colon cancer cells by attenuating a negative effect of epidermal growth factor on tumor suppressor FOXO3 activity. **BMC Cancer** 2011; 11:219.

Rafaelsen SR, Sørensen T, Jakobsen A, Bisgaard C, Lindebjerg J. Transrectal ultrasonography and magnetic resonance imaging in the staging of rectal cancer: effect of experience. **Scand J Gastroenterol** 2008; 43:440-6.

Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. **Nature** 2002; 418:934.

Rennert G, Rennert HS, Pinchev M, Lavie O, Gruber SB. Use of hormone replacement therapy and the risk of colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2009; 27:4542-7.

Ryerson AB, Ehemann CR, Altekruse SF, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2012, featuring the increasing incidence of liver cancer. **Cancer** 2016; 122:1312-37.

Safe S, Kim K. Nuclear receptor-mediated transactivation through interaction with Sp proteins. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol** 2004; 77:1-36.

Sahani DV, Bajwa MA, Andrabi Y, Bajpai S, Cusack JC. Current status of imaging and emerging techniques to evaluate liver metastases from colorectal carcinoma. **Ann Surg** 2014; 259:861-72.

Saidi HS, Karuri D, Nyaim EO. Correlation of clinical data, anatomical site and disease stage in colorectal cancer. **East Afr Med J** 2008; 85:259-62.

Sajid KM, Parveen R, Durr-e-Sabih, et al. Carcinoembryonic antigen (CEA) levels in hookah smokers, cigarette smokers and non-smokers. **J Pak Med Assoc** 2007; 57:595-9.

Samowitz WS, Albertsen H, Sweeney C, et al. Association of smoking, CpG island methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer. **J Natl Cancer Inst** 2006; 98:1731-8.

Saurin JC, Ligneau B, Ponchon T, et al. The influence of mutation site and age on the severity of duodenal polyposis in patients with familial adenomatous polyposis. **Gastrointest Endosc** 2002; 55:342-7.

[SEER] Surveillance, Epidemiology, and End Results. **Program, 2004-2013**. Available from: <URL:<https://seer.cancer.gov>> [2017 mai 6].

Shen L, Kondo Y, Rosner GL, et al. MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. **J Natl Cancer Inst** 2005; 97:1330-8.

Sherr CJ. Cancer cell cycles. **Science** 1996; 274:1672-7.

Shibata D, Schaeffer J, Li ZH, Capella G, Perucho M. Genetic heterogeneity of the c-K-ras locus in colorectal adenomas but not in adenocarcinomas. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:1058-63.

Shih IM, Wang TL, Traverso G, et al. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:2640-5.

Sieber OM, Segditsas S, Knudsen AL, et al. Disease severity and genetic pathways in attenuated familial adenomatous polyposis vary greatly but depend on the site of the germline mutation. **Gut** 2006; 55:1440-8.

Siegel RL, Fedewa SA, Anderson WF, et al. Colorectal cancer incidence patterns in the United States, 1974-2013. **J Natl Cancer Inst** 2017a; 109:djw322.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. **CA Cancer J Clin** 2017b; 67:7-30.

Singh KE, Taylor TH, Pan CG, Stamos MJ, Zell JA. Colorectal cancer incidence among young adults in California. **J Adolesc Young Adult Oncol** 2014; 3:176-84.

Slattery ML, Sweeney C, Murtaugh M, et al. Associations between ERalpha, ERbeta, and AR genotypes and colon and rectal cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2005; 14:2936-42.

Slattery ML, Sweeney C, Murtaugh M, et al. Associations between vitamin D, vitamin D receptor gene and the androgen receptor gene with colon and rectal cancer. **Int J Cancer** 2006; 118:3140-6.

Slowik V, Attard T, Dai H, Shah R, Septer S. Desmoid tumors complicating familial adenomatous polyposis: a meta-analysis mutation spectrum of affected individuals. **BMC Gastroenterol** 2015; 15:84.

Smirnoff P, Liel Y, Gnainsky J, Shany S, Schwartz B. The protective effect of estrogen against chemically induced murine colon carcinogenesis is associated with decreased CpG island methylation and increased mRNA and protein expression of the colonic vitamin D receptor. **Oncol Res** 1999; 11:255-64.

Soravia C, Berk T, Madlensky L, et al. Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. **Am J Hum Genet** 1998; 62:1290-301.

Speirs V, Green AR, Hughes TA, Ellis IO, Saunders PTK, Shaaban AM. Clinical importance of estrogen receptor β isoforms in breast cancer. **J Clin Oncol** 2008; 26:5825-6.

Spirio LN, Samowitz W, Robertson J, et al. Alleles of APC modulate the frequency and classes of mutations that lead to colon polyps. **Nat Genet** 1998; 20:385-8.

Stevanato Filho PR, Aguiar Júnior S, Begnami M.D. et al. Estrogen Receptor β as a Prognostic Marker of Tumor Progression in Colorectal Cancer with Familial Adenomatous Polyposis and Sporadic Polyps. **Pathol. Oncol. Res.** 2017; 17:268-5

Stevanato Filho PR, Aguiar Júnior S, Ferreira FO, et al. Surgical complications and metachronous rectal cancer risk in patients with classic familial adenomatous polyposis. **J Coloproctol** 2015; 35:8:13.

Stewart RJ, Stewart AW, Turnbull PR, Isbister WH. Sex differences in subsite incidence of large-bowel cancer. **Dis Colon Rectum** 1983; 26:658-60.

Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. **Science** 1993; 262:1734-7.

Syngal S, Brand RE, Church JM, et al. ACG clinical guideline: genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. **Am J Gastroenterol** 2015; 110:223-62.

Takayama T, Ohi M, Hayashi T, et al. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. **Gastroenterology** 2001; 121:599-611.

Tanaka H, Deng G, Matsuzaki K, et al. BRAF mutation, CpG island methylator phenotype and microsatellite instability occur more frequently and concordantly in mucinous than non-mucinous colorectal cancer. **Int J Cancer** 2006; 118:2765-71.

Tawadros PS, Paquette IM, Hanly AM, Mellgren AF, Rothenberger DA, Madoff RD. Adenocarcinoma of the rectum in patients under age 40 is increasing: impact of signet-ring cell histology. **Dis Colon Rectum** 2015; 58:474-8.

Thörn M, Bergström R, Kressner U, Sparén P, Zack M, Ekblom A. Trends in colorectal cancer incidence in Sweden 1959-93 by gender, localization, time period, and birth cohort. **Cancer Causes Control** 1998; 9:145-52.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin** 2015; 65:87-108.

Tortola S, Marcuello E, González I, et al. p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. **J Clin Oncol** 1999; 17:1375-81.

Touriño R, Conde-Freire R, Cabezas-Agrícola JM, et al. Value of the congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium in the diagnosis of familial adenomatous polyposis. **Int Ophthalmol** 2004; 25:101-12.

Troisi RJ, Freedman AN, Devesa SS. Incidence of colorectal carcinoma in the U.S.: an update of trends by gender, race, age, subsite, and stage, 1975-1994. **Cancer** 1999; 85:1670-6.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. **J Natl Cancer Inst** 2004; 96:261-8.

Uthoff SM, Eichenberger MR, McAuliffe TL, Hamilton CJ, Galandiuk S. Wingless-type frizzled protein receptor signaling and its putative role in human colon cancer. **Mol Carcinog** 2001; 31:56-62.

van Cutsem E, Tejpar S, Vanbeckevoort D, et al. Intrapatient cetuximab dose escalation in metastatic colorectal cancer according to the grade of early skin reactions: the randomized EVEREST study. **J Clin Oncol**. 2012; 30:2861-8.

van der Wetering M, Sancho E, Verweij C, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. **Cell** 2002; 111:241-50.

van Engeland M, Derks S, Smits KM, Meijer GA, Herman JG. Colorectal cancer epigenetics: complex simplicity. **J Clin Oncol** 2011; 29:1382-91.

Vasen HF, Tomlinson I, Castells A. Clinical management of hereditary colorectal cancer syndromes. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol** 2015; 12:88-97.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **N Engl J Med** 1988; 319:525-32.

Vukasin AP, Ballantyne GH, Flannery JT, Lerner E, Modlin IM. Increasing incidence of cecal and sigmoid carcinoma. Data from the Connecticut Tumor Registry. **Cancer** 1990; 66:2442-9.

Wallace MH, Phillips RK. Upper gastrointestinal disease in patients with familial adenomatous polyposis. **Br J Surg** 1998; 85:742-50.

Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. **Nat Genet** 2006; 38:787-93.

Weyant MJ, Carothers AM, Mahmoud NN, et al. Reciprocal expression of ERalpha and ERbeta is associated with estrogen-mediated modulation of intestinal tumorigenesis. **Cancer Res** 2001; 61:2547-51.

Wilschut JA, Steyerberg EW, van Leerdam ME, et al. How much colonoscopy screening should be recommended to individuals with various degrees of family history of colorectal cancer? **Cancer** 2011; 117:4166-74.

Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, et al. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. **Gastroenterology** 1997; 112:594-642.

Wolmark N, Wieand HS, Rockette HE, et al. The prognostic significance of tumor location and bowel obstruction in Dukes B and C colorectal cancer: findings from the NSABP clinical trials. **Ann Surg** 1983; 198:743-52.

Wong N, Lasko D, Rabelo R, Pinsky L, Gordon PH, Foulkes W. Genetic counseling and interpretation of genetic tests in familial adenomatous polyposis and hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Dis Colon Rectum** 2001; 44:271-9.

Wong NA, Malcomson RD, Jodrell DI, Groome NP, Harrison DJ, Saunders PT. ERbeta isoform expression in colorectal carcinoma: an in vivo and in vitro study of clinicopathological and molecular correlates. **J Pathol** 2005; 207:53-60.

Yurgelun MB, Kulke MH, Fuchs CS, et al. Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer. **J Clin Oncol** 2017; 35:1086-95.

Zauber AG, Winawer SJ, O'Brien MJ, et al. Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. **N Engl J Med** 2012; 366:687-96.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 30 de abril de 2013.

Ao
Dr. Ademar Lopes.

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1453/10

“Expressão imunoistoquímica de receptores de estrogênio, progesterona e andrógeno em pólipos adenomatosos e carcinomas colorretais esporádicos e oriundo de pacientes portadores de Polipose Adenomatosa Familiar”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 23/04/2013, tomaram conhecimento do seguinte documento:

- Comunicação de transferência de pós-graduando; o aluno Paulo Roberto Stevanato Filho irá assumir o projeto em referência como seu projeto acadêmico de Mestrado devido ao desligamento do aluno anterior (Philip Edward Boggiss) do programa de Mestrado da Instituição, em carta datada de 10 de abril de 2013.

Atenciosamente,

Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa



A.C. Camargo
Cancer Center

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 30 de abril de 2013.

Ao
Dr. Ademar Lopes.

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1453/10

“Expressão imunoistoquímica de receptores de estrogênio, progesterona e andrógeno em pólipos adenomatosos e carcinomas colorretais esporádicos e oriundo de pacientes portadores de Polipose Adenomatosa Familiar”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 23/04/2013, tomaram conhecimento do seguinte documento:

- Comunicação de transferência de pós-graduando; o aluno Paulo Roberto Stevanato Filho irá assumir o projeto em referência como seu projeto acadêmico de Mestrado devido ao desligamento do aluno anterior (Philip Edward Boggiss) do programa de Mestrado da Instituição, em carta datada de 10 de abril de 2013.

Atenciosamente,

Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 – Estadiamento TNM para câncer colorretal, 7ª edição.

TUMOR PRIMÁRIO (T)	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Nenhuma evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ: intra-epitelial ou invasão da lâmina própria *
T1	Tumor invade submucosa
T2	Tumor invade muscular própria
T3	Tumor invade através da muscular própria em tecidos pericolônico
T4a	Tumor infiltra serosa
T4b	O tumor invade órgãos ou estruturas adjacentes
NÓDULO LINFÁTICO REGIONAL (N)	
NX	Nódulos linfáticos não podem ser avaliados
N0	Nenhuma metástase linfonodal regional
N1	Metástase em um a três linfonodos regionais
N1a	Metástase em um linfonodo regional
N1b	Metástase em dois a três linfonodos regionais
N1c	Depósito (s) tumoral
N2	Metástase em quatro ou mais linfonodos regionais
N2a	Metástase em quatro a seis gânglios linfáticos regionais
N2b	Metástase em sete ou mais linfonodos regionais
METÁSTASE DISTANTE (M)	
M0	Nenhuma metástase distante
M1	Metástase distante
M1a	Metástases confinadas a um órgão ou local / LND não regional
M1b	Metástases em mais de um órgão / local ou peritônio

Fonte: Adaptado EDGE et al. (2010).

Anexo 3 - Prêmio de "melhor tema livre" apresentado em sessão plenária - "**Prêmio Fernando Gentil**". no Congresso brasileiro da Sociedade Brasileira de cirurgia oncológica, em 17 a 19 de outubro 2013. Referente ao artigo 1.

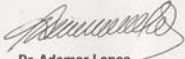


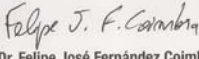
TG1108

XI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA ONCOLÓGICA
IX SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CÂNCER DO APARELHO DIGESTIVO (PECOGI)
VIII GASTRINCA
Data: 17 a 19 de outubro de 2013

Certificamos que o trabalho "**Análise da expressão dos receptores hormonais (estrogênio alfa e beta, progesterona e andrógeno) em pólipos adenomatosos e carcinomas colorretais esporádicos e oriundo de pacientes portadores de Polipose Adenomatosa Familiar e seu impacto no prognóstico**", dos autores: STEVANATO FILHO PR; MARIA DIRLEI BEGNAMI, AGUIAR S JR; SPENCER, RMS; FERREIRA FO; NAKAGAWA WT; LOPES A., foi contemplado o melhor Tema Livre, apresentado durante o **XI Congresso da Sociedade Brasileira de Cirurgia Oncológica, IX Simpósio Internacional de Câncer do Aparelho Digestivo (PECOGI) e VIII Gastrinca**, realizados no período de 17 a 19 de outubro de 2013 no Hotel Maksoud Plaza, São Paulo.

São Paulo, 19 de outubro de 2013


Dr. Ademar Lopes
Presidente da SBCO


Dr. Felipe José Fernández Coimbra
Presidente do XI Congresso da SBCO

Anexo 4 – Carta de aprovação da publicação para Pathology & Oncology Research.
2017 Jun 23. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s12253-017-0268-5

Dear Mr Stevanato Filho,

We are pleased to inform you that your manuscript, "Estrogen receptor beta as a prognostic marker of tumor progression in colorectal cancer in Familial Adenomatous Polyposis and sporadic polyps", has been accepted for publication in Pathology & Oncology Research.

You will receive an email from Springer in due course with regards to the following items:

1. Offprints
2. Colour figures
3. Open choice
4. Transfer of Copyright

For queries regarding your accepted paper, please click the following link <http://www.springer.com/biomed/cancer/journal/12253>; then click on "Contacts", and then "Production Editor". Complete the query form and click "Submit".

Please remember to quote the manuscript number, PORE-D-15-00325R3, whenever inquiring about your manuscript.

With best regards,
Journals Editorial Office
Springer

Anexo 5 - Carta de submissão de artigo 2 para BMC Cancer

MC Cancer Editorial Office em@editorialmanager.com

BCAN-D-17-00969

Oestrogen receptor beta isoforms expression in sporadic colorectal cancer, familial adenomatous polyposis and progressive stages of colorectal cancer

Paulo Roberto Stevanato Filho, MD. Ph.D; Samuel Aguiar Junior, MD. Ph.D; Maria Dirlei Begnami, MD. Ph.D; Hellen Kuasne; Ranyell Matheus Spencer, MD. Ph.D; Wilson Toshihiko Nakagawa, MD. Ph.D; Tiago Santoro Bezerra, MD.; Bruna Catin Kupper, RN; Renata Maymi Takahashi, MD; Mateus Barros Filho; Silvia Regina Rogatto, Ph.D Prof.; Ademar Lopes, MD. Ph.D Prof.

BMC Cancer

Dear Dr Stevanato Filho,

Thank you for submitting your manuscript 'Oestrogen receptor beta isoforms expression in sporadic colorectal cancer, familial adenomatous polyposis and progressive stages of colorectal cancer' to BMC Cancer.

The submission id is: BCAN-D-17-00969

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following website:

<http://bcan.edmgr.com/>

If you have forgotten your username or password please use the "Send Login Details" link to get your login information. For security reasons, your password will be reset.

Best wishes,

Editorial Office

BMC Cancer

<https://bmccancer.biomedcentral.com/>

Apêndice 1 – Formulário de levantamento de dados

- 1 Nome
- 2 RGH
- 3 Data de admissão
- 4 Data de Nascimento
- 5 Gênero: (1) Mas (2) Fem
- 6 Queixa: (0)Não (1)Sim
- 7 Tipo de Queixa (0) Sem queixa; (1) Dor; (2) Sangramento/muco nas fezes; (3) alteração de hábito; (4) anemia/astenia; (5) emagrecimento; (6) tumor/massa; (7) Obstrução/perfuração (abdome agudo); (8) Outro;
- 8 Duração da queixa (em meses) (99) Ign
- 9 Diagnóstico (0) sem pólipos ou câncer; (1) adenoma de baixo grau; (2) adenoma de alto grau; (3) adenoma de baixo grau+adenoma de alto grau; (4) adenocarcinoma invasivo; (5) adenoma (1ou mais) +adenocarcinoma (6) CEC
- 10 Local do primário: (0) não definido; (1) Colon D; (2) Colon T; (3) Colon E; (4) Sigmoides; (5) Reto intraperitoneal; (6) reto extraperitoneal; (7) polipose; (8) Apêndice (99)Ign
- 11 Exame Proctológico: (0) não reto; (1) Móvel; (2) semi-fixo ; (3) Fixo; (99) Ign
- 12 Presença de outros Tumores (0)Não (1)Sim
- 13 Tipo de tumor
- 14 Tratamento prévio (1) Não; (2) Sim
- 15 Tipo de tratamento prévio (0)Não (1) Cirurgia com ressecção do 1; (2) Cirurgia sem ressecção do 1; (3) QT; (4) RDT; (5) QT e RDT; (6) QT+RDT+Cir; (7) QT+CIR; (8) RDT+CIR; (9) Outro; (10)Ressecção endoscópica de lesão (99) ign
- 16 tatus Admissão: (0) sem tto prévio; (1) sem doença; (2) Recorrência local ou locorregional; (3) Recorrência sistêmica (4) Recorrência local e sistêmica
- 17 CEA pré-trat

- 18 Estadio Clinico T (0)To (1)T1 (2)T2 (3)T3 (4)T4 (5)Tis (6)TX
- 19 Estadio Clinico N (0)No (1)N+ (2)NX
- 20 Estadio Clinico M (0)Mo (1)M+ (2)MX
- 21 Tratamento pré-operatório (0)Não (1)Sim
- 22 Tipo de Tratamento pré-operatório (0) Não (1) Radioterapia (2) Quimioterapia (3) Radioquimioterapia (4) outro
- 23 Cirurgia (0)-Não (1)-Sim
- 24 Data da Cirurgia
- 25 Tipo de cirurgia (0) Não operou 1; (1) Colectomia parcial; (2) Retossigmoidectomia; (3) AAP; (4) Colectomia total; (5) Proctoclectomia total; (6) Ressecção local; (7) Ressecção ampliada; (8) Citorredução; (9) Apendicectomia; (10) Hartman; (11) outra (12)Laparotomia Exploratória (13) Citorredução (14)HIPEC (15)Endoscópica
- 26 Intenção Cirúrgica: (0) Não operado; (1) Curativa; (2) paliativa;
- 27 Estadio T patológico Patológico (PT ou ypt): (0) Pto/ypT0; (1) Pt1/ypT1; (2) Pt2/ypT2; (3) Pt3/ypT3; (4) Pt4/ypT4; (5) Ptis/ypTis; (6) ptx/ypTX (7)Não operou
- 28 Linfonodos positivos (0)Não (1)Sim (3)Não Operado
- 29 Número de Linfonodos positivos
- 30 Número de Linfonodos dissecados
- 31 Estadio PN: (0) Pn0/ypN0; (1) Pn1/ypN1; (2) Pn2/ypN2; (3) Pn3/ypN3; (4) Pnx/ypNX (5)Não operou
- 32 Estadio M: (0) M0; (1) M1 fígado; (2) Pulmão; (3) Peritônio; (4) Fígado e peritônio; (5) Fígado e pulmão; (6) Peritônio e pulmão; (7) Fígado, peritônio e pulmão; (8) Outros órgãos. (9) Ignorado
- 33 Grau histológico (peça): (0) Não graduado (1) Bem diferenciado (2) Moderadamente diferenciado (3) Pouco diferenciado/ indiferenciado (4) Não fez cirurgia
- 34 Embolização vascular sanguínea (0) Não; (1) Sim (2) Não fez cirurgia
- 35 Embolização vascular linfática (0) Não; (1) Sim (2) Não Operou
- 36 Invasão Perineural: (0) Não; (1) Sim (2)Não operou
- 37 K-ras: (0) Não; (1) Sim (2) Não realizado teste

- 38 Tratamento adjuvante (1)Não (2)Sim
- 39 Tipo Tratamento Adjuvante (0) Não (1) Quimioterapia (2) Radioterapia (3) Radioquimioterapia (4) Radioquimioterapia seguida de quimioterapia
- 40 Esquema de quimioterapia pós-operatória (0) Não realizado (1) 5FU (2) FOLFOX (3) FOLFIRI (4) FOLFOX + Bevacizumabe (5) FOLFIRI + Bevacizumabe (6) FOLFOX + Cetuximabe (7) FOLFIRI + Cetuximabe (8) 5FU+ LV (9) Oxaliplatina (10)MAYO (11)Xeloda (12)mFOLFOX6 (99)ignorado
- 41 Recorrência local ou locorregional (0) Sem recorrência local ou locorregional; (1) Com recorrência local (2) Com recorrência locorregional
- 42 Data da recorrência local
- 43 Recorrência Distância (0) sem recorrência distancia; (1) Fígado; (2) Peritônio; (3) Pulmão; (4) fígado e peritônio; (5) Fígado e pulmão; (6) Peritônio e pulmão; (7) fígado, peritônio e pulmão; (8) LND; (9) Outro; (99) Ignorado
- 44 Data da recorrência à Distância
- 45 Método diagnóstico da recorrência: (0) Sem recorrência; (1) queixa clinica; (2) aumento CEA; (3) Exame de imagem; (4) colonoscopia; (5) cirurgia; (6) combinações
- 46 Data da última informação
- 47 Status na ultima informação: (1) vivo sem doença (VSED); (2) vivo com doença (VCED); (3) Morte não câncer (MNCA); (4) Morte por câncer (MOCA); (5) Morte por tratamento; (6) morte por outra causa; (7) Perdido de segmento