

**MUDANÇA TARDIA DA EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS EM MUCOSA ILEAL APÓS
PROCTOCOLECTOMIA TOTAL EM
PACIENTES PORTADORES DE POLIPOSE
ADENOMATOSA FAMILIAR**

MIREILLE DARC CAVALCANTE BRANDÃO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Orientador: Dr. Benedito Mauro Rossi

**Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto
Soares**

São Paulo

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Brandão, Mireille Darc Cavalcante

Mudança tardia da expressão de proteínas em mucosa ileal após proctocolectomia total em pacientes portadores de polipose adenomatosa familiar (FAP) / Mireille Darc Cavalcante Brandão – São Paulo, 2008.
74p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Benedito Mauro Rossi

Descritores: 1. POLIPOSE ADENOMATOSA DO COLON. 2. POLIPOSE INTESTINAL. 3. BOLSAS DO COLO. 4. PROCTOCOLECTOMIA RESTAURADORA. 5. PÓLIPOS ADENOMATOSOS. 6. SÍNDROME DA POLIPOSE FAMILIAR. 7. GENES APC. 8. IMUNOHISTOQUÍMICA.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Jonas e Joana D'arc, que de modo maravilhoso demonstram amor por mim e me inspiram a cada dia a progredir, e ao meu amado esposo Daniel pelo carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus**, primeiramente, pelas bênçãos maravilhosas que ELE me proporcionou a cada dia.

Ao meu orientador, **Dr Benedito Mauro Rossi**, pela ajuda, orientação e paciência em todas as etapas deste mestrado.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr Fernando A. Soares**, pô disponibilizar o departamento de Anatomia Patológica para a realização deste estudo.

A **Dra Renata Coudry**, patologista que ama o seu trabalho e que dedicou tempo e conhecimento para a interpretação dos resultados aqui obtidos.

À amiga **Ligia Petrolina**, braço direito e esquerdo na realização das reações imunoistoquímicas.

À **Sueli Nonogaki**, pelo apoio na realização das reações imunoistoquímicas.

Ao **Departamento de Endoscopia do Hospital A.C. Camargo** na pessoa do **Dr Wilson Nakagawa, Dr. Fábio Ferreira e Dr Samuel Aguiar**.

Aos **meus pais**, pelo amor, incentivo, carinho e oração a todo instante.

Ao **meu amado Dan**, pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis.

À amiga **Isabela**, pela ajuda com a formatação do texto da tese, pelo apoio, incentivo, carinho e paciência.

Aos **amigos da célula**, pelas orações e incentivo.

Ao **corpo docente da Pós-Graduação da Fundação Antonio Prudente** pelo bom trabalho realizado.

À todos do **Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo** pela ajuda e por me acolherem com carinho.

Á todos os **funcionários da Biblioteca do Hospital A.C. Camargo**, pela sua organização e disposição em ajudar.

Aos **funcionários do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Hospital A. C. Camargo** pela ajuda em encontrar e selecionar os prontuários.

RESUMO

Brandão MDC. **Mudança tardia da expressão de proteínas em mucosa ileal após proctocolectomia total em pacientes portadores de polipose adenomatosa familiar (FAP).** São Paulo; 2008. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução. A FAP representa menos de 1% dos tumores colorretais. É uma doença com padrão de transmissão autossômico dominante, rara, com penetrância de praticamente 100%, ocasionada por mutação germinativa no gene supressor de tumor *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*). A expressão fenotípica da FAP inclui o desenvolvimento de mais de 100 adenomas colorretais. Como a principal causa de morte em pacientes com a doença é o câncer colorretal (CCR), a retirada cirúrgica do cólon é parte fundamental do tratamento. A cirurgia consiste na colectomia total com anastomose íleorretal, ou proctocolectomia total com bolsa ileal e anastomose da bolsa ao ânus. Porém, com o decorrer do tempo, observa-se a formação de pólipos na bolsa ileal, demonstrando que a retirada do cólon diminui, mas não elimina o risco de formação de pólipos intestinais. Acredita-se que isto ocorra devido a dois motivos principais: a alteração germinativa do gene *APC* e a um processo de “colonização” da mucosa ileal. Existem hipóteses para explicar esse processo de alteração na mucosa ileal, porém, nenhuma delas foi ainda estudada em humanos. Um estudo experimental em camundongos com mutação no gene *APC* demonstrou uma redução importante na expressão de algumas proteínas kinases C (PKC's) em adenomas, quando comparada à mucosa ileal normal. Visto que a principal expressão fenotípica da mutação do *APC* é o surgimento de adenomas, estas alterações na expressão das PKC's, entre outras proteínas podem refletir a função do gene *APC*, demonstrando o seu envolvimento na carcinogênese ileal. Outras proteínas (mucinas, bcl-2, CDX2, β -catenina, K-ras, p53, APC, COX-2) também podem estar envolvidas neste processo. Não existem estudos avaliando essas alterações na mucosa da bolsa ileal em pacientes com FAP. A literatura restringe-se ao risco de aparecimento de adenomas e possível transformação para adenocarcinoma, mas não busca as possíveis alterações

de expressão de proteínas. **Objetivos.** Avaliar a expressão imunoistoquímica das proteínas específicas, na mucosa da bolsa ileal de pacientes com FAP, submetidos a cirurgia há pelo menos 8 anos, e comparar com a expressão imunoistoquímica da mucosa do íleo e do cólon, na ocasião da cirurgia. **Pacientes e métodos.** Estudo de coorte retrospectivo, incluindo 16 pacientes com FAP, do banco de dados do Registro de Câncer Colorretal Hereditário do Hospital A.C.Camargo, submetidos a proctocolectomia total e reconstrução com bolsa ileal, com seguimento mínimo de 8 anos. Foi realizada a avaliação da mucosa ileal e colônica da peça cirúrgica inicial, e, da mucosa ileal, no mínimo 8 anos após a cirurgia, por meio de biópsias obtidas por endoscopia endoanal. Foi estudada a expressão imunoistoquímica das seguintes proteínas: PKC's α , λ , δ , ϵ , ι , beta-catenina, K-ras, CDX2, p53, APC, bcl-2, COX2, MUC1, MUC2, MUC5AC e MUC6. **Resultados.** Os 16 pacientes tinham idade variando de 24 a 55 anos, com tempo decorrido da cirurgia de 8 a 14 anos. Pólipos adenomatosos foram diagnosticados na bolsa ileal em 43,75% dos casos. Alterações adaptativas na mucosa da bolsa ileal, tais como, atrofia de vilosidades e hiperplasia de criptas ocorreram em 68,75% dos casos. As proteínas MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6, K-ras, COX-2, beta-catenina e APC, tiveram expressão habitual. A proteína bcl2 teve expressão em íleo e mucosa de bolsa ileal. Houve maior expressão de CDX2 em bolsa ileal do que em íleo e cólon. O p53 teve expressão nas células da base das criptas em cólon, íleo e bolsa ileal. Nos três tecidos as PKC's α , λ e ι apresentaram especificidade em tecido linfóide, a PKC δ foi específica para tecido muscular e a PKC ϵ apresentou-se de maneira inespecífica. **Conclusão.** A mucosa da bolsa ileal expressou as PKC's α , λ , δ , ϵ , ι , beta-catenina, K-ras, p53, APC, bcl-2, COX2, MUC2 e CDX2, teve ausência de expressão de MUC1, MUC5AC e MUC6. No estudo comparativo entre a peça cirúrgica inicial e as biópsias recentes de bolsa ileal, houve semelhança de expressão nos marcadores: PKC's α , λ , δ , ϵ , ι , beta-catenina, K-ras, p53, APC, bcl-2, COX2, MUC1, MUC5AC e MUC6. Apenas MUC2 e CDX2 apresentaram uma maior expressão em bolsa ileal. A avaliação das alterações histológicas na mucosa da bolsa ileal demonstrou atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas.

SUMMARY

Brandão MDC. [Late change of protein expression in ileal mucosa after total proctocolectomy in patients with familial adenomatous polyposis (FAP)]. São Paulo; 2008 [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction. Familial Adenomatous Polyposis (FAP) represents less than 1% of colorectal tumors. It's an autosomal dominantly inherited disorder, rare, with almost 100% penetrance, caused by germinative mutation in the APC tumor suppressor gene (*Adenomatous Polyposis Coli*). The phenotypic expression of FAP includes the development of more than 100 colorectal adenomas. As the main cause of death in patients with this disease is the colorectal cancer, the surgical removal of colon is a fundamental part of the treatment. The surgery consists of total colectomy with ileorectal anastomosis, or total proctocolectomy with ileal pouch and ileal pouch-anal anastomosis. However, as time goes by, it is observed the formation of polyps in the ileal pouch, showing that the colon removal decreases but does not eliminate the risk of intestinal polyps formation. It is believed that this occurs due to two main reasons: germinative alteration of the APC gene and a process of colonic metaplasia of the ileal mucosa. There are hypotheses to explain this process of alteration in the ileal mucosa, however, none of them has ever been studied in human beings. An experimental study in mice with mutation in gene APC demonstrated an important reduction in the expression of some protein kinase C (PKC's) in adenomas, when compared with the normal ileal mucosa. Taking into account that the main phenotypic expression of the mutation of the APC is the sprouting of adenomas, these alterations in the expression of the PKC's among other proteins can reflect the function of the APC gene, demonstrating its involvement in ileal carcinogenesis. Other proteins (mucins, bcl-2, CDX2, β -catenin, K-ras, p53, APC, COX-2) also can be involved in this process. There are no studies evaluating these alterations in ileal pouch mucosa in patients with FAP. Literature itself restricts the risk of appearance of adenomas and possible transformation for adenocarcinoma, but it does not search the possible alterations of protein expression. **Objectives.** To evaluate the

immunochemical expression of specific proteins in the ileal pouch mucosa of patients with FAP submitted to the surgery at least 8 years ago, and to compare with the immunochemical expression of the ileal and colon mucosa in the occasion of the surgery. **Patients and methods.** Retrospective coorte study, including 16 patients with FAP, from the Register of Hereditary Colorectal Cancer of A.C.Camargo Hospital database, submitted to the total proctocolectomy and reconstruction with ileal pouch, with a minimum follow-up of 8 years. The evaluation of the ileal and colonic mucosa of the initial surgical piece and of the ileal mucosa, was carried out at least 8 years after the surgery, by means of biopsies obtained by anorectal endoscopy. The immunochemical expression of these proteins was studied: beta-catenina, K-ras, CDX2, p53, PKC's (α , λ , δ , ϵ , ι), APC, bcl-2, COX2, MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6. **Results.** The 16 patients were aged ranging from 24 to 55 years, with postsurgical time ranging from 8 to 14 years. Adenomatous polyps were diagnosed in the ileal pouch in 43,75% of the cases. Adaptative changes in the ileal pouch mucosa, such as, villous atrophy and crypt hyperplasia occurred in 68,75% of the cases. Proteins MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6, K-ras, COX-2, beta-catenina and APC, had habitual expression. The bcl2 protein had expression in ileo and ileal pouch mucosa. There was a greater expression of CDX2 in ileal pouch than in ileo and colon. The p53 had expression in the crypt base cells in colon, ileo and ileal pouch. In the three tissues, the PKC's α , λ e ι presented specificity in lymphoid tissue. The PKC δ was specific for muscle tissue and the PKC ϵ presented itself in a non-specific way. **Conclusion.** The ileal pouch mucosa expressed: PKC's α , λ , δ , ϵ , ι , beta-catenina, K-ras, p53, APC, bcl-2, COX2, MUC2 and CDX2, and there was absence of expression of MUC1, MUC5AC and MUC6. In the comparative study between the initial surgical piece and the recent biopsies of ileal pouch, similarity was found in the expression of the markers: PKC's α , λ , δ , ϵ , ι , beta-catenina, K-ras, p53, APC, bcl-2, COX2, MUC1, MUC5AC and MUC6. Only MUC2 and CDX2 presented a greater expression in ileal pouch. The evaluation of the histological alterations in the ileal pouch mucosa demonstrated atrophy of the villous and a crypts hyperplasia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Organograma do câncer esporádico e hereditário.....	4
Figura 2	Corte de tecido ileal corado com hematoxilina-eosina, demonstrando uma boa orientação do material.....	40
Figura 3	Corte de tecido ileal corado com hematoxilina-eosina demonstrado perda orientação do material.....	40
Figura 4	Corte de tecido de bolsa ileal corado com hematoxilina-eosina com achatamento parcial das vilosidades.....	41
Figura 5	Corte de tecido de bolsa ileal corado com hematoxilina-eosina com achatamento total das vilosidades.....	41
Figura 6	Estudo imunoistoquímico das mucinas.....	42
Figura 7	Estudo imunoistoquímico para proteína beta-catenina.....	43
Figura 8	Imunoistoquímica para APC.....	45
Figura 9	Imunoistoquímica para Ki67 e p53.....	49
Figura 10	Imunoistoquímica das PKC's alfa, iota e lambda.....	50
Figura 11	Imunoistoquímica da PKC delta.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Funções e considerações sobre os marcadores.....	22
Tabela 2	Clones, diluição e fabricantes dos anticorpos utilizados nas reações.....	31
Tabela 3	Dados clínicos da população de estudo.....	37
Tabela 4	Dados dos pacientes pós-cirurgia.....	37
Tabela 5	Expressão das mucinas nas amostras comparativas.....	43
Tabela 6	Resultado da imunoistoquímica no estudo comparativo entre as amostras.....	47
Tabela 7	Expressão das PKC's no tecido linfóide nas amostras de íleo, cólon e bolsa ileal.....	54
Tabela 8	Expressão das PKC's nas amostras de íleo, cólon e bolsa ileal.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Adenomatous Polyposis Coli
AFAP	Polipose Adenomatosa Familiar Atenuada
Bcl2	B-cell lymphoma
β-catenina	Beta-catenina
CCR	Câncer colorretal
CDX2	caudal-related homeobox 2
COX-2	ciclooxigenase 2
FAP	Polipose Adenomatosa Familiar
FCC	Câncer Colorretal Familiar
HNPCC	Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose
MUC	Mucina
p53	Proteína 53Kda
PKC α	Proteína Kinase C alfa
PKC δ	Proteína Kinase C delta
PKC ϵ	Proteína Kinase C épsilon
PKC λ	Proteína Kinase C lambda
PKC ι	Proteína Kinase C iota
SNC	Sistema Nervoso Central
UR	Retocolite Ulcerativa

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos Gerais	2
1.2	HNPCC	5
1.3	FAP	7
1.4	Modelo de Fearon & Volgerstein	12
1.5	Considerações	13
1.5.1	PKC's	17
1.5.2	Mucinas	18
1.5.3	bcl2	21
1.5.4	CDX2	21
2	OBJETIVOS	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	Delineamento do estudo	26
3.2	População de estudo	26
3.3	Critérios de inclusão e exclusão	26
3.4	Metodologia	27
3.5	Análise estatística	34
3.6	Ética	34
4	RESULTADOS	35
5	DISCUSSÃO	56
6	CONCLUSÕES	63
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

ANEXOS

Anexo 1 Ficha de Registro de dados

Anexo 2 Termo de Consentimento Informado

Anexo 3 Porcentagem de intensidade de expressão nas amostras de íleo, cólon e bolsa ileal de acordo com os marcadores.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais comum e a quarta causa mais freqüente de morte por câncer no mundo. É uma doença comum em países desenvolvidos e em desenvolvimento. A sobrevida para este tipo de neoplasia é considerada boa, se a doença for diagnosticada em estágio inicial. A sobrevida média global em 5 anos varia entre 40 a 50%, não sendo observadas grandes diferenças entre países desenvolvidos e países em desenvolvimento. Este relativo bom prognóstico faz com que o câncer de cólon e reto seja o segundo tipo de câncer mais prevalente em todo o mundo (Ministério da Saúde 2007).

Em 2008 no Brasil, são esperados 231.860 casos novos de câncer para o sexo masculino e 234.870 para o sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (115 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (49 mil), mama feminina (49 mil), pulmão (27 mil), cólon e reto (27 mil), estômago (22 mil) e colo do útero (19 mil).

Dos 27 mil casos novos de câncer de cólon e reto estimados para o Brasil no ano de 2008, 12.490 casos são em homens e 14.500 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 13 casos novos a cada 100 mil homens e 15 para cada 100 mil mulheres.

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de cólon e reto em homens é o terceiro mais freqüente na região Sudeste. Nas regiões Sul e Centro-

Oeste ocupa a quarta posição. Nas regiões Nordeste e Norte, ocupam a quinta e sexta posição, respectivamente. Para as mulheres é o segundo mais freqüente na região Sudeste, o terceiro mais freqüente nas regiões Sul, Centro-Oeste e Nordeste, enquanto na região Norte é o quinto mais freqüente (Ministério da Saúde 2007).

O fator de risco mais importante para este tipo de neoplasia é a história familiar, associado a uma dieta com base em gorduras animais, baixa ingestão de frutas, vegetais e cereais; assim como, consumo excessivo de álcool e tabagismo. A prática de atividade física regular está associada a um baixo risco de desenvolvimento do câncer de cólon e reto, e além disso, a idade também é considerada um fator de risco, uma vez que tanto a incidência como a mortalidade aumentam com o avançar da idade (STEIN e COLDITZ 2004).

Exames de rastreamento são efetivos na redução da mortalidade do CCR. Procedimentos como pesquisa de sangue oculto nas fezes, retossigmoidoscopia flexível, enema baritado e colonoscopia devem ser oferecidos para pessoas assintomáticas com 50 anos ou mais. A colonoscopia certamente tem a vantagem de permitir um exame completo do cólon, como também simultaneamente a retirada de pólipos e realização de biópsias. Novas técnicas como a magnificação e a cromoendoscopia aumentam a sensibilidade da colonoscopia pela melhor demarcação e ressecção das lesões (KAHI e REX 2004).

O CCR pode ser esporádico ou hereditário (Figura 1). Os tumores esporádicos respondem pela grande maioria dos casos, em torno de 90%. Por volta de 20% dos casos considerados esporádicos apresentam componente familiar, sem, contudo, preencher os critérios para alguma síndrome hereditária típica (WEITZ et al. 2005).

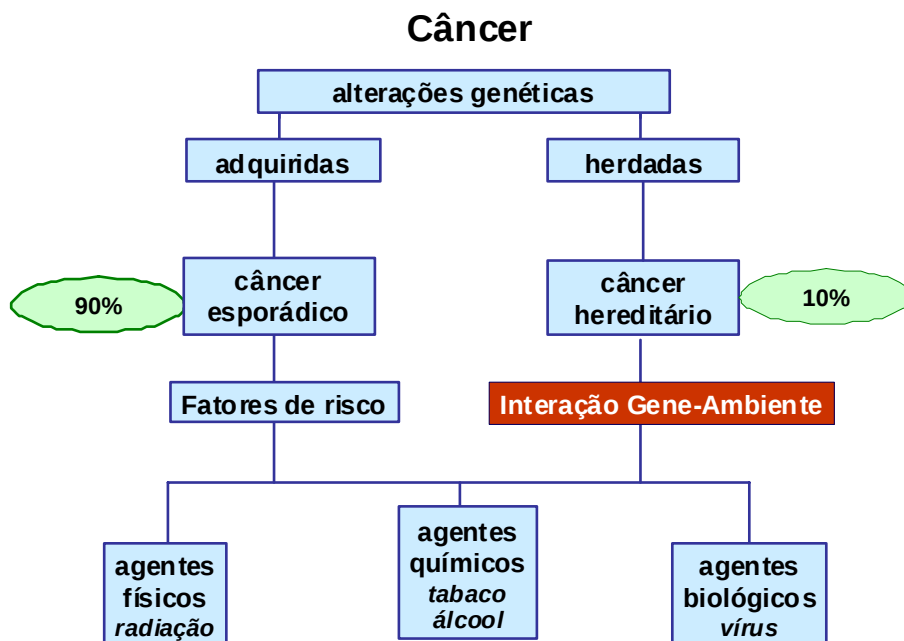


Figura 1 - Organograma do câncer esporádico e hereditário.

Não existem estatísticas brasileiras para os tumores hereditários. Um estudo de FERREIRA et al. (2004), que utilizou o Registro de Câncer Colorretal Hereditário do Hospital A.C. Camargo, avaliou a frequência de tumores extracolônicos em pacientes com HNPCC e Câncer colorretal Familiar (FCC). Foram avaliadas 61 famílias das quais 29 eram de HNPCC, que evidenciou os tumores de endométrio (26,5%) e mama (26,5%) como os mais frequentes nas mulheres, e estômago (35,1%) nos homens. Porém, estatísticas que demonstrem a incidência de FAP na população brasileira ainda não foram publicadas.

Em torno de 5% a 10% dos CCR são definidos como síndromes hereditárias. As duas principais formas são o Câncer Colorretal Hereditário Sem Polipose (HNPCC), ou Síndrome de Lynch, e a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP).

1.2 HNPCC

HNPCC ou Síndrome de Lynch, é uma doença autossômica dominante causada por mutação nos genes de reparo de DNA, principalmente hMSH2, hMLH1, PMS1, PMS2 e MSH6, com penetrância de 70 a 85%. Por volta de 90% das mutações são identificadas nos genes de reparo hMLH1 e MSH2. ROSSI et al. (2002) estudaram a mutação destes dois genes mais freqüentes em 25 famílias brasileiras suspeitas para HNPCC, identificando 10 famílias com mutação: 8 com mutação no gene hMLH1 e 2 no gene hMSH2. HNPCC é a mais comum das síndromes hereditárias representando em torno de 6% dos tumores colorretais. É caracterizada pelo desenvolvimento de CCR em idade precoce, com desenvolvimento freqüente de tumores sincrônicos e metacrônicos, e risco aumentado para tumores gástricos, do aparelho genitourinário, sistema bileopancreático e intestino delgado. Os tumores colorretais exibem uma característica molecular chamada instabilidade microsatélite. Esta instabilidade é definida pelo acúmulo de erros em segmentos contendo múltiplas, curtas e repetidas seqüências de bases de DNA conhecida como microsatélite. Cerca de 90% dos tumores e 80% dos adenomas tem instabilidade microsatélite no paciente com HNPCC (IINO et al. 2000).

O número de pólipos é pequeno na Síndrome de Lynch embora apareçam mais precocemente (3ª a 4ª década de vida), em maior tamanho e freqüência, e tendo mais rápida progressão para câncer. Os tumores surgem em média aos 44 anos, 20 anos mais cedo do que os esporádicos, principalmente no cólon proximal (70%), e

são mucinosos ou pouco diferenciados. O câncer de endométrio é a segunda neoplasia mais comum da síndrome, atingindo 30 a 50% das mulheres.

O critério de diagnóstico da Síndrome de Lynch tem mudado com decorrer do tempo devido ao melhor entendimento da doença. O critério de Amsterdam I de 1990, estabelecia que deveria existir pelo menos três parentes com CCR em duas gerações consecutivas (sendo um parente de primeiro grau dos outros dois), com um diagnóstico de câncer antes de 50 anos (VASEN et al. 1991). Para abranger as famílias pequenas e a presença de tumores extracolônicos, foi proposto os critérios de Amsterdam II (VASEN et al. 1999). O critério de Bethesda, também modificado recentemente, foi desenvolvido para identificar pacientes suspeitos para a síndrome pelo teste da instabilidade microssatélite, que não preenchem os critérios de Amsterdam. Os pacientes selecionados para este teste apresentam características como tumor no cólon direito, histologicamente indiferenciado e de início precoce (RODRIGUEZ-BIGAS et al. 1997; UMAR et al. 2004).

O acompanhamento dos pacientes com diagnóstico ou suspeita de Síndrome de Lynch deve levar em consideração o início precoce das neoplasias. Devido a isso, a colonoscopia é recomendada a cada um ou dois anos iniciando por volta dos 20 a 25 anos de idade. Para o tumor de endométrio indica-se um ultrassom transvaginal anual com início entre 25 e 35 anos de idade. CA 125, endoscopia digestiva alta, citologia urinária e ultrassom de vias urinárias contemplam as demais neoplasias extracolônicas. A data de início e periodicidade dependem do perfil que a síndrome apresenta em cada família (LYNCH e LYNCH 2000).

O tratamento do CCR nos pacientes com HNPCC é a colectomia total com íleoreto anastomose devido ao alto risco de tumores metacrônicos. Quando a

localização do tumor é retal, está indicado a proctocolectomia total com confecção da bolsa ileal. Nos tumores endometriais é indicado histerectomia total com salpingooforectomia bilateral.

1.3 FAP

A FAP representa menos de 1% dos tumores colorretais, acometendo igualmente homens e mulheres. É uma doença autossômica dominante, rara, com penetrância de praticamente 100%, ocasionada por mutação germinativa no gene supressor de tumor *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), que está localizado no braço longo do cromossomo 5. Na grande maioria dos casos, as alterações localizam-se no éxon 15, e o resultado dessas mutações é uma proteína truncada e não funcional. Ao ocorrer, então, uma segunda mutação, agora somática, no segundo alelo do gene, inicia-se o processo de aparecimento de adenomas e progressão para carcinoma. Uma das famílias registradas no Hospital A.C. Camargo, apresenta uma mutação tipo inserção no códon 1291, éxon 15G, do gene *APC*, o que causa uma mudança na fase de leitura na fita de DNA, levando a um “stop codon” precoce, produzindo uma proteína truncada e sem função. Neste caso houve fenótipo agressivo no cólon, com malignização de pólipos e manifestações extra-colônicas (STRATE et al. 2005).

O primeiro relato conhecido sobre lesões polipóides em região colorretal data de 1721, publicado por Menzel em um jornal médico de Berlim. Nesta última década os estudos se multiplicaram na tentativa de melhor estabelecer as bases genéticas, aperfeiçoar o diagnóstico e tratamento desta doença (BÜLOW et al. 2006).

Nos tumores esporádicos, as mutações somáticas do gene *APC* são encontradas em 80% dos casos e parecem estar envolvidas no desencadeamento da tumorigênese (STRATE et al. 2005).

Dentre todos os tumores malignos existentes, o CCR destaca-se pelo maior conhecimento a respeito do processo de carcinogênese, que permitiu uma clara associação entre adenoma e carcinoma. Na compreensão da etiopatogenia do CCR, a FAP representa um verdadeiro modelo in vivo. A FAP caracteriza-se por um epitélio intestinal com um elevado índice de proliferação da mucosa intestinal adquirido de forma hereditária. FEARON e VOLGELSTEIN (1990) propuseram um modelo de progressão tumoral de adenomas para carcinomas em múltiplos passos: mutação do gene *APC* – hipometilação – mutação do gene *K-ras* – mutação do gene *DCC* – mutação do gene *TP53* (FEARON e VOLGELSTEIN 1990).

A expressão fenotípica de pacientes com FAP clássica inclui o desenvolvimento de mais de 100 adenomas colorretais, às vezes até milhares. A idade média de aparecimento dos pólipos é durante a segunda década de vida, porém, podem surgir em idades mais precoces. O número e o tamanho dos pólipos aumentam com o tempo e tem uma ligeira predisposição pelo lado esquerdo do cólon. Os pacientes podem apresentar diarreia, sangramento gastrointestinal e dor abdominal, mas a grande maioria apresenta-se assintomática até o desenvolvimento tumoral. Os adenomas colônicos dos pacientes com FAP são endoscopicamente e histologicamente idênticos aos adenomas esporádicos, porém devido ao grande número de lesões e seu início precoce, os pacientes com FAP desenvolverão câncer de maneira mais precoce (STRATE et al. 2005).

Existem manifestações extra-colônicas como pólipos no trato gastrointestinal superior, sendo a localização duodenal e periampular a mais freqüente e de maior risco para transformação maligna em relação às outras localizações. Há os tumores desmóides que ocorre em 10% dos pacientes e apesar de não metastatizarem, são localmente agressivos e a segunda causa de morte nos pacientes com FAP. Os osteomas também podem ocorrer, geralmente em mandíbula ou maxila, porém, espessamentos corticais são os achados bem comuns. A hipertrofia congênita da retina é um achado comum, chegando a acometer 80% dos casos de FAP ao nascimento. Temos ainda o carcinoma de tireóide, hepatoblastoma, hiperplasia e carcinoma de adrenal, tumores do sistema nervoso central (SNC) e cistos sebáceos.

Existem variantes da FAP, tais como: síndrome de Gardner, síndrome de Turcot e FAP atenuada (AFAP).

A síndrome de Gardner inclui a polipose intestinal e duodeno-gástrica, tumores desmóides, mais o desenvolvimento de tumores ósseos (osteomas) e de partes moles, anormalidades odontológicas, hipertrofia da retina, cistos epidérmicos, lipomas, fibromas. Embora a maioria dos casos tenha mostrado um caráter familiar, em torno de 25% deles ocorre devido à mutação espontânea, sendo o primeiro caso na família. Pelo envolvimento de diferentes órgãos, o tratamento pode tornar-se difícil. A proctocolectomia total com bolsa ileal é o tratamento de escolha para a polipose colônica, embora haja o desenvolvimento de tumor desmóide no sítio cirúrgico com certa freqüência (GU et al. 2008)

A síndrome de Turcot é caracterizada pelo desenvolvimento de tumores do SNC junto ao quadro de FAP. O meduloblastoma é o tumor mais associado embora o astrocitoma e o ependimoma tenham sido descritos em pacientes com mutação no

APC. Em 70% dos casos apresenta mutação do *APC*. Os outros 30% estão associados aos genes de reparo *hMLH1* e *hPMSH2* (HAMADA et al. 1998).

A AFAP é uma forma menos agressiva da FAP, com menos de 100 pólipos colorretais, com uma distribuição mais proximal. Os pólipos ocorrem mais tarde na vida e o câncer em torno da sexta década. Em geral está associada a mutações nos Éxons 3 e 4 do gene *APC*, apesar de não ser uma regra. Quanto menos agressiva é a polipose, mais difícil é o diagnóstico. Pacientes com menos de 100 pólipos adenomatosos podem ter AFAP, HNPCC, mutação bialélica do *MYH* ou uma mutação germinativa desconhecida. *MYH* é um gene de reparação por excisão de base, é uma DNA-glicosilase responsável pela retirada das adeninas que estão desemparelhadas. Na mutação bialélica o sistema de reparação encontra-se deficiente, permitindo o acúmulo de mutações. Nestes casos manifestações extra-colônicas podem ajudar no diagnóstico diferencial (STRATE et al. 2005).

O diagnóstico precoce e screening são muito importantes para o paciente com FAP. Exame endoscópico do cólon deve ser realizado na puberdade, idade de início do aparecimento das lesões. O trato gastrointestinal superior deve ser avaliado por endoscopia digestiva alta no momento do diagnóstico ou pelo menos com 25 anos de idade, e a tireóide pelo exame físico precoce através da palpação (KING et al. 2000).

Como a principal causa de morte na FAP é o CCR, a retirada cirúrgica do cólon é parte fundamental do tratamento. Geralmente este procedimento é feito na adolescência ou em adultos jovens, antes da malignização dos adenomas, pois o risco de câncer aumenta com o tempo. Entretanto, não existe uma idade ideal pré-estabelecida para a cirurgia. A cirurgia consiste na colectomia total com anastomose íleorretal, ou proctocolectomia total com bolsa ileal e anastomose da bolsa ao ânus

com ou sem mucosectomia. A colectomia total com preservação do reto, embora traga melhores resultados funcionais, carrega um alto risco de desenvolvimento de tumor no reto remanescente sendo necessário acompanhamento através de exame endoscópico. A proctocolectomia sem mucosectomia, utiliza a técnica do duplo grampeamento, onde uma pequena faixa de mucosa colorectal doente permanece entre a linha pectínea e a linha de secção do reto. A proctocolectomia com mucosectomia, também conhecida como cirurgia de Parks, retira esta faixa de mucosa, reconstruindo o trânsito através de uma anastomose transanal manual, porém tem resultados funcionais piores e não elimina toda a mucosa dessa região, permanecendo ainda, “ilhas de mucosa”. Em casos de FAP onde já existe transformação maligna dos pólipos adenomatosos, a cirurgia deve seguir os padrões clássicos da cirurgia oncológica, no que diz respeito às margens, linfadenectomias regionais e ressecção completa do mesorreto (VUILLEUMIER et al. 2000). Já o trato gastrointestinal superior, principalmente as lesões ampulares são de difícil manejo e tratamento. Em lesões de baixo grau indica-se ressecções endoscópicas. Em lesões de alto grau ou já transformadas o tratamento requer duodenopancreatectomia. O tratamento através do uso de anti-inflamatórios não-esteróides como o sulindac e inibidores da cicloxigenase-2 (COX2) pode reduzir o tamanho e número de pólipos, porém os pólipos voltam a crescer alguns meses depois da suspensão da medicação (KING et al. 2000 e GIARDIELLO et al. 2002).

1.4 MODELO DE FEARON & VOLGELSTEIN

A mutação do gene *APC* é um evento inicial no surgimento do CCR. Está mutado na grande maioria dos tumores esporádicos e em todos os casos de FAP. É um gene supressor de tumor que tem como papel principal a regulação da proliferação celular. Quando mutado ocorre um desequilíbrio no sentido de uma maior produção celular, a beta-catenina apresenta-se deficiente de fosforilação, aumenta seus níveis citoplasmáticos, interferindo no mecanismo de adesão celular, levando a proliferação celular.

Um dos fatores que regulam intrinsecamente a replicação do DNA é a colocação de um radical metila na cadeia do DNA. Na hipometilação, há falta do radical metila, que leva a mais estímulo proliferativo.

Seguindo nas alterações do modelo, teríamos a mutação no gene *k-ras*. Quando ocorre uma lesão tecidual, instala-se uma proliferação celular para a reparação da lesão, a qual só terminará com o restabelecimento da integridade do epitélio. Neste caso, torna-se essencial que o núcleo seja informado do contato célula-célula, que é feito pela transdução de sinais da membrana celular através do citoplasma, e uma das proteínas que tem essa função é ras. Sua mutação produz uma proteína alterada e mais estímulo de proliferação.

Além disso, pode ocorrer mutação do gene *DCC*, que quando alterado causa perda na capacidade de adesão da célula. Por fim, a mutação do gene *TP53*, que pode ser considerada como a alteração decisiva no processo de malignização, pois a perda de sua função em um tecido, já em estado hiperproliferativo, leva ao acúmulo de mutações cromossômicas, que é característica básica dos carcinomas invasivos. Esta

mutação é encontrada na maioria dos CCR e é infreqüente nos adenomas (FEARON e VOLGELSTEIN 1990).

1.5 CONSIDERAÇÕES

Teoricamente, a proctocolectomia total com bolsa ileal, que implica a retirada de praticamente toda a mucosa colônica, diminui muito o risco de formação de lesões. Contudo, observa-se a formação de pólipos na bolsa ileal, que aumenta com o decorrer do tempo pós-operatório, demonstrando que a retirada do cólon diminui, mas não elimina o risco de formação de pólipos intestinais. Acredita-se que isto ocorra devido a dois motivos principais: a alteração germinativa do gene *APC* e a um processo de “colonização” da mucosa ileal (FRUIN et al. 2003; FRIEDERICH et al. 2007). Alguns autores citam modificações metaplásicas do íleo (atrofia das vilosidades, hiperplasia de criptas) como razão para o desenvolvimento de adenomas no íleo, e eventualmente de carcinomas na bolsa ileal de pacientes com FAP. Alguns autores acreditam que mudanças adaptativas ocorreriam na bolsa ileal, de modo que funcione como um neorreto. Outros acreditam que a transformação é parcial, sendo mais uma expressão fenotípica do que uma transformação funcional. Outra hipótese é que estas alterações podem ser resultado da mudança do conteúdo luminal na bolsa ileal, que atuaria como carcinógeno (THOMPSON-FAWCETT et al. 2001a; LUEBECK e MOOLGAVKAR 2002). De qualquer modo, a história natural do desenvolvimento de pólipos na bolsa ileal de pacientes com FAP é desconhecida.

WU et al. (1998) apresentaram um estudo prospectivo para determinar a incidência de pólipos em bolsa ileal e íleo distal após proctocolectomia. Seguiram 26

pacientes por um período médio de 66 meses (11 a 156 meses) e identificaram uma incidência de 42% neste estudo. Foi observado também que a incidência aumentou com o tempo decorrido da cirurgia e que não houve relação entre o número de pólipos e a severidade da doença em cólon ou duodeno. NUGENT et al. (1993) observaram 38 pacientes em média por 4,7 anos após colectomia, com exames endoscópicos anuais e encontraram uma incidência de 21% de pólipos em bolsa ileal. IIDA et al. (1989) encontraram uma incidência de 50% depois de seguimento médio de 80 meses, mas TONELLI et al. (1997) observando 24 pacientes por 5 anos só obtiveram 4% de incidência. Mais recentemente, em outro estudo prospectivo, GROVES et al. (2005) obtiveram uma incidência de 57% e uma significativa associação entre a presença de adenomas na bolsa com o maior tempo decorrido da cirurgia. Não existiu, neste estudo, correlação entre a severidade da polipose em cólon ou duodeno com a presença de pólipos, concordando com o achado de WU et al. (1998). Observa-se que há uma variação importante (4 a 57%) na incidência, sendo que incidências menores são encontradas em estudos de menor tempo de seguimento (5 anos) em comparação com os de seguimento maior (7 anos). PARC et al. (2001), em estudo retrospectivo, analisou 85 bolsas ileais encontrando forte associação da incidência de pólipos e o tempo de existência da bolsa, tendo em 5, 10 e 15 anos respectivamente uma incidência de 7%, 35% e 75%. Um dado a mais deste estudo foi que não houve relação do desenvolvimento de adenomas e o local da mutação no gene *APC*. Em estudo retrospectivo recente, houve uma ampla incidência de pólipos de baixo grau sem formação de lesão carcinomatosa, levantando mais uma vez o questionamento sobre o comportamento destas lesões (MOUSSATA et al. 2008). Embora estes estudos demonstrem claramente a

formação de pólipos em bolsa ileal, mais pesquisas são necessárias para determinar o potencial de malignidade destes adenomas e quais pacientes carregam esta característica. Todos os estudos prospectivos citados acima, não diagnosticaram caso de câncer em seus pacientes. Se existe uma sequência adenoma-carcinoma em mucosa de bolsa ileal, ela não está definida.

É sabido que adenocarcinoma da bolsa ileal pode surgir em pacientes sem FAP, sem ter o adenoma como lesão precursora, como por exemplo, em retocolite ulcerativa (UC). Há pelo menos 13 casos relatados na literatura de adenocarcinoma em bolsa ileal por retocolite ulcerativa. Isto tem se tornado mais freqüente, podendo está relacionado com a duração do seguimento ou mesmo ao aumento da freqüência do processo. A mucosa sofre uma adaptação caracterizada por atrofia das vilosidades, seguida de severa inflamação da bolsa e displasia, como se fosse uma recorrência da retocolite ulcerativa em bolsa ileal (WALKER et al. 2006). Este processo inflamatório severo é encontrado mais comumente em pacientes operados por UC do que por FAP (MOSKOWITZ et al. 1986). Outro estudo tentando estabelecer o risco de displasia em pacientes com UC, analisaram 106 pacientes dos quais 42 tinham bolsa ileal por mais de 12 anos. Concluíram que a displasia é um evento raro, mesmo com o longo período de existência da bolsa. Neste mesmo estudo foi realizada a imunoistoquímica para p53, onde não foi encontrado nenhum caso de mutação. A maioria apresentou menos de 5% das criptas com expressão forte para p53 e os pacientes com inflamação da bolsa obtiveram uma positividade maior do aqueles que não tinham inflamação (THOMPSON-FAWCETT et al. 2001b). O estudo genético do *TP53* foi feito na mucosa retal residual de pacientes com UC. Houve superexpressão em torno de 50% dos casos e nos três casos de bolsa ileal em

que foram testados como controle (COULL et al. 2007). Um estudo imunoistoquímico da proteína p53 em mucosa de bolsa ileal de pacientes com FAP ainda não foi realizado.

Como vimos anteriormente, a mutação do APC leva a um estado proliferativo. FRIEDERICH et al. (2007) realizaram um estudo imunoistoquímico em mucosa de bolsa ileal e mucosa de alça aferente de íleo de pacientes com FAP, para avaliar proliferação (MIB-1). A bolsa ileal apresentou um alto índice de proliferação em relação ao íleo, com risco para o desenvolvimento de adenomas e posteriormente carcinomas. Este é um dos poucos estudos que faz comparação entre mucosa de íleo e bolsa ileal. O MIB-1, utilizado neste estudo, é um anticorpo monoclonal desenvolvido contra a proteína Ki67, e é um excelente marcador da atividade proliferativa.

Em recente estudo sobre as mudanças ocorridas na cripta colônica durante a formação de adenomas em pacientes com FAP, foi observado que a mutação do gene *APC* causa expansão da população da cripta basal, incluindo as células tronco da cripta. Esse aumento das células tronco pode explicar o padrão proliferativo e a tumorigênese precoce do cólon. Neste mesmo estudo, a imunoistoquímica para p53 mostrou-se positiva em dois terços das amostras em células da base da cripta colônica e é ainda mais freqüente em adenomas (3/4 dos casos). Sabendo que a mutação na FAP é germinativa, a formação de adenomas em bolsa ileal poderia estar relacionado a um estado proliferativo nas criptas das células do íleo, dado este ainda não disponível na literatura (BOMAN et al. 2004).

1.5.1 PKC's

Um estudo experimental em camundongos *APC*^{MIN} demonstrou uma redução importante na expressão de algumas proteínas kinases C (PKC's) em adenomas, quando comparada à mucosa ileal normal. Visto que a principal expressão fenotípica da mutação do *APC* é o surgimento de adenomas, estas alterações na expressão das PKC's, entre outras proteínas, podem refletir a função do gene *APC*, demonstrando o seu envolvimento na carcinogênese. (KLEIN et al. 2000). Outro estudo feito com células epiteliais colônicas, mostra uma redução importante dos níveis das PKC's em células tumorais em comparação com as células normais. (KAHL-RAINER et al. 1994).

A PKC delta age como um supressor de tumor e sua superexpressão atenua o fenótipo transformado de células epiteliais colônicas in vitro (linhagem HCT116), porém sua função é mediada pelo p53, este estado inativo por mutação torna a PKC delta inativa também (PERLETTI et al. 2004).

A PKC épsilon tem atividade oncogênica, sua superexpressão causa transformação maligna em células epiteliais colônicas pela interação com a via de sinalização do *ras* (PERLETTI et al. 1998).

A PKC iota também tem atividade oncogênica e sua elevada expressão em tumores colônicos sugere uma participação importante na carcinogênese do cólon (MURRAY et al. 2004).

A proteína quinase C pertence a uma família de 11-serina-treonina quinase que participa de uma variedade de processos celulares incluindo mitogênese, diferenciação e apoptose. Os membros desta família parecem realizar um importante papel na carcinogênese colorretal. A alteração da expressão das PKC's já foram

associadas a progressão de carcinomas ovarianos e também a um papel influenciador nas vias de regulação da homeostase celular (CORNFORD et al. 1999; CORFIELD et al. 2001; WEICHERT et al. 2003).

1.5.2 Mucinas

As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular. A superfície epitelial, incluindo o epitélio colônico, é revestido e protegido por muco, do qual a maior parte é constituído por mucinas. Ao lado desta função protetora, no cólon normal, alterações na mucina são um achado comum da neoplasia colônica. As proteínas das mucinas contêm resíduos de serina e treonina que funcionam como uma ligação covalente das cadeias de carboidratos. Estas glicoproteínas são um produto multi-génico, que resulta da activação dos genes que codificam as proteínas e dos genes que codificam as enzimas de glicosilação. As mucinas se dividem em duas classes estruturalmente e funcionalmente distintas: mucinas que formam uma matrix gelatinosa (por exemplo: MUC2, MUC5AC e MUC6) e as mucinas transmembranas (por exemplo: MUC1). A maioria dos órgãos parece sintetizar mais do que um tipo de mucina, porém um tipo particular parece predominar em cada órgão. Uma característica comum dos tumores gastrointestinais é a perda desta especificidade órgão-mucina. Por exemplo, temos a MUC5AC expressa normalmente no tecido gástrico e aberrantemente expressa em adenomas colorretais (BYRD e BRESALIER 2004).

O gene da MUC1 pode gerar, por splicing alternativo, isoformas como MUC1/TM, MUC1/Y e MUC/SEC. A expressão destas variantes no CCR não foi bem estudado. Sabe-se que a MUC1 é normalmente detectada na superfície da

mucosa do epitélio do antro, piloro e corpo, e está aumentada em tumores de cólon em relação a mucosa normal. Embora tenham encontrado em células normais do epitélio intestinal pouca ou nenhuma expressão de MUC1, mRNA MUC1 é detectado em cólon normal. Ao ser comparada com os outros epitélios, a MUC1 do cólon é mais intensamente glicosilada, não permitindo a marcação pelo anticorpo específico para MUC1. Em adenocarcinomas colorretais e também em pólipos adenomatosos, a MUC1 é menos glicosilada, permitindo sua imunodeteção. A MUC1 parece funcionar como um marcador de mucosa colônica normal (BYRD e BRESALIER 2004; NAKAMORI et al. 1994).

A MUC2 tem sua expressão diminuída em adenocarcinomas colorretais, mas está preservada em carcinomas mucinosos. Experimentos em animais sugerem que este decréscimo na MUC2 poderia contribuir para a carcinogênese colônica, pois sua inativação causa em camundongos o aparecimento de tumores primeiro no intestino delgado e mais tarde no cólon. Estas alterações são acompanhadas por aumento da proliferação, diminuição da apoptose e aumento da migração de células epiteliais do intestino. Não se sabe se estas alterações são uma resposta primária à ausência de MUC2 ou resposta secundária a uma proteção ou lubrificação inadequada do epitélio intestinal (VELCICH et al. 2002).

Os carcinomas mucinosos de mama usualmente mostram ter menos metástases linfonodal e melhor prognóstico quando comparado com carcinomas ductais invasivos. Pela imunoistoquímica, o carcinoma mucinoso expressa MUC2 e o carcinoma ductal invasivo não tem expressão de MUC2. Isto sugere que a expressão de MUC2 está associada com características biológicas de menor agressividade (MATSUKITA et al. 2003). Há expressão de MUC2 em carcinomas

mucinosos de outros órgãos como pâncreas e ovário (TASHIRO et al. 1994; NAKAMURA et al. 2002). A MUC2 sofre influência também dos ácidos biliares. Células tumorais do cólon quando expostas aos ácidos biliares aumentam a expressão de MUC2 pelo aumento da transcrição do seu gene (SONG et al. 2005).

A MUC5AC é produto normal da mucosa gástrica, expressa na superfície das células da mucosa do cárdia, fundo e antro. As células traqueobrônquicas também a expressam normalmente, porém não está presente no cólon normal. Sabe-se, porém, que em adenomas e tumores colorretais encontra-se freqüentemente expressa. Devido a esta característica, sugere-se que a MUC5AC poderia ser usada como preditor de recorrência de adenomas (BYRD et al. 1998). A imunoreatividade da MUC5AC é maior em pólipos largos de moderado grau histológico e moderada displasia, e sofre um decréscimo em pólipos de alto grau e severa displasia. Outro estudo também demonstra que pacientes com tumores MUC5AC-negativa tem pior prognóstico e sobrevida do que pacientes com tumores MUC5AC-positiva, sugerindo que a ausência de MUC5AC nos tumores é fator para maior agressividade do carcinoma colorretal (BUISINE et al. 1996; KOCER et al. 2002). Em 94 casos de tumores gástricos, mostrou-se que a detecção de mucinas está associada ao tipo de tumor. A MUC5AC foi associada aos carcinomas difusos e infiltrativos, enquanto a MUC2 foi associada aos carcinomas mucinosos. Em tumores de mama, tanto carcinomas mucinosos como carcinomas ductais mostram pouca expressão de MUC5AC (PINTO DE SOUSA et al. 2002; MATSUKITA et al. 2003).

A MUC6 tem pouca ou nenhuma expressão no cólon normal. Em um estudo de BARTMAN et al. (1999), foi detectada a presença desta mucina em adenomas por imunoistoquímica (BARTMAN et al. 1999).

1.5.3 bcl2

Um controle celular é necessário para que células com dano no DNA e conseqüente potencial de promover lesões neoplásicas, tenham sua morte programada conhecida como apoptose.

O bcl2 é um gene anti-apoptótico expresso nas criptas do cólon do ser humano. No intestino delgado, as células basais das criptas tem uma tendência de hiperproliferação. Por esta razão, ocorre uma taxa de 5%-10% de apoptose espontânea nessa região. No cólon, a taxa de apoptose espontânea é baixa. Contudo, em estudo experimental com camundongos *knock-out* para bcl2, houve aumento na taxa de apoptose espontânea de células basais das criptas colônicas. Logo, este estudo sugere que bcl2 pode regular a ação de um gene proliferativo (POTTEN et al. 1992; MERRITT et al. 1995). No intestino delgado a expressão de bcl2 não é vista.

Nos adenomas humanos, a expressão de bcl2 está aumentada, enquanto baixos níveis são geralmente encontrados em carcinomas. Um estudo recente demonstrou que a expressão da proteína p53 e bcl2 é mais elevada nos adenomas(< de P; 0.03), e está correlacionado com a displasia (< de P; 0.03) (TZOUVALA et al. 2008).

1.5.4 CDX2

A CDX2 é uma proteína especificamente expressa no intestino, e é importante para a regulação do desenvolvimento e manutenção da célula epitelial intestinal. Em camundongos, a expressão de CDX2 no embrião, age especificamente na diferenciação das vilosidades do intestino delgado distal e cólon proximal, e sua

mutação leva ao desenvolvimento de tumores colônicos (CHAWENGSAKSOPHAK et al.1997; SILBERG et al. 2000).

O estudo aqui realizado não tem original na literatura. Não existem estudos imunoistoquímicos que comparem a mucosa colônica, ileal e da bolsa ileal em pacientes com FAP, nem tampouco que contemplem todos os marcadores aqui estudados: PKC's α , λ , δ , ϵ , ι , beta-catenina, K-ras, CDX2, p53, APC, bcl-2, COX2, MUC 1, MUC 2, MUC 5AC E MUC 6 (Tabela 1). Mesmo uma análise imunoistoquímica somente da mucosa da bolsa ileal de pacientes com FAP, é escassa. A literatura se restringe a falar sobre o risco de aparecimento de adenomas e possível transformação para adenocarcinoma (VAN DUIJVENDIJK et al. 1999; GULLBERG et al. 2002; CAMPOS et al. 2005).

Tabela 1- Funções e considerações sobre os marcadores.

MARCADORES	CONSIDERAÇÕES
Mucinas	Reveste o epitélio intestinal e é órgão específica. Nos tumores intestinais há perda da especificidade órgão-mucina.
PKC's	Presente nos processos de mitogênese, diferenciação e apoptose. Participação na carcinogênese colorretal.
APC	Quando mutado causa Polipose Adenomatosa Familiar.
Beta-catenina	Diretamente afetada pela perda da função da proteína do gene APC.
Bcl2	Gene anti-apoptótico, expresso nas células basais das criptas do cólon. Não é expresso em intestino delgado.
p53	Gene supressor de tumor, sua mutação é o último passo na seqüência adenoma-carcinoma.
CDX2	Proteína específica do intestino que atua na regulação do desenvolvimento das células intestinais. Sua mutação causa tumores colônicos.
Kras	Responsável pela informação levada ao núcleo sobre o contato célula-célula. Sua mutação é considerada um dos passos na seqüência adenoma-carcinoma.
COX2	Marcador de inflamação.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Este estudo tem por objetivo avaliar pacientes portadores de Polipose Adenomatosa Familiar, submetidos à proctocolectomia total com bolsa ileal, com seguimento mínimo de 8 anos, e estudar:

- 1 A expressão imunoistoquímica de proteínas na mucosa da bolsa ileal: PKC's α , λ , δ , ϵ , ι , beta-catenina, K-ras, CDX2, p53, APC, bcl-2, COX2, MUC 1, MUC 2, MUC 5AC E MUC 6;
- 2 Avaliação comparativa entre a peça cirúrgica inicial e as biópsias recentes dos pacientes, obtidas por endoscopia endoanal. A comparação da expressão imunoistoquímica será realizada entre a mucosa do íleo e do cólon, na ocasião da cirurgia, e a mucosa da bolsa ileal, após no mínimo 8 anos;
- 3 Avaliação das alterações histológicas na mucosa da bolsa ileal após proctocolectomia para Polipose Adenomatosa Familiar.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este é um estudo Coorte retrospectivo.

3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram revistos do banco de dados do Registro das Famílias de Câncer Colorretal Hereditário do Hospital A.C. Camargo pacientes portadores de Polipose Adenomatosa Familiar, com seguimento de no mínimo 8 anos. Todos os pacientes tratados neste hospital.

Os prontuários foram pesquisados para confirmação dos dados e coleta de informações.

Foram selecionados 20 pacientes.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo pacientes portadores de FAP, submetidos a proctocolectomia total com confecção de bolsa ileal, com evolução mínima de 8 anos, tratados no Hospital A.C. Camargo.

Foram excluídos pacientes com outras síndromes hereditárias não FAP, submetidos a colectomia total com íleo reto anastomose, pacientes ileostomizados e com evolução menor que 8 anos.

3.4 METODOLOGIA

Foram revistos os prontuários dos pacientes selecionados através do Registro das Famílias de Câncer Colorretal Hereditário do Hospital A.C. Camargo, para a coleta de informações em formulário específico (Anexo 1) contendo informações sócio-demográficas, clínicas, relacionadas ao tratamento e dados anátomopatológicos. Após revisão dos prontuários, verificou-se que 20 pacientes preenchiam os critérios para a inclusão no estudo. Dos 20 pacientes selecionados, 2 haviam ido a óbito e um não foi encontrado nos endereços e telefones disponíveis. Os 17 pacientes restantes foram contactados em sua maioria por telefone, onde foi dada uma breve explicação do objetivo do estudo e logo em seguida feito o convite para participação no mesmo. Um paciente foi contactado inicialmente por telegrama e outro por e-mail. Após este contato inicial, procedemos o agendamento dos exames de acordo com a possibilidade de cada paciente, visto que a maioria morava fora de São Paulo em cidades como: São Carlos – SP, Rio das Pedras-SP, Jaú-SP, Franco da Rocha-SP e um em Tóquio – Japão. Foram aproveitadas as datas de retorno ambulatorial na maioria das vezes para a realização dos exames. Quinze dos pacientes foram recebidos por mim ao chegarem no departamento de endoscopia do hospital, os outros dois pelos próprios médicos do departamento de exames endoscópicos. Todos receberam e leram o consentimento, e após assinarem foram encaminhados para o exame.

As biópsias de mucosa da bolsa ileal foram obtidas por endoscopia endoanal, em número de 4 a 5 amostras, evitando-se linhas de anastomose, em mucosa aparentemente normal. Os exames foram realizados no Hospital A.C. Camargo, utilizando retossigmoidoscopia flexível. A preparação do intestino consistia na realização de Fleet Enema imediatamente antes do exame. Os pacientes foram numerados de 1 a 17 para melhor identificação do material. As amostras foram encaminhadas ao departamento de anatomia patológica para confecção do bloco de parafina e posteriormente das lâminas para as reações de imunoistoquímica. A amostra do paciente 13 teve seu material danificado, restando 16 amostras viáveis de bolsa ileal. As peças cirúrgicas armazenadas em parafina foram recuperadas dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital A.C. Camargo. Apenas 07 pacientes dos 16 selecionados tinham as amostras do íleo e do cólon da peça cirúrgica. Os outros 09 pacientes faltaram com pelo menos uma das amostras, não participando, por isso, do estudo comparativo. Dentre os motivos estão: não localização de blocos de parafina pela BIOSAFE (empresa responsável pelo armazenamento do material antigo), ausência de margem ileal (não coletada pela patologia na época da cirurgia) e material autolísado.

As lâminas foram vistas por um único patologista, Dra. Renata, titular do Departamento de Patologia do Hospital A.C. Camargo, para confirmar a viabilidade do material e relatar os achados das reações.

O estudo imunoistoquímico foi realizado com os anticorpos que reconhecem as PKC's α (alfa), λ (lambda), δ (delta), ϵ (épsilon), ι (iota), beta-catenina, K-ras,

CDX2, p53, APC, bcl-2, COX2, MUC 1, MUC 2, MUC 5AC E MUC 6, que incluem as proteínas de mesmo nome (Tabela 2).

Os passos técnicos realizados estão abaixo descritos (SOINI et al. 2001):

✓ **DESPARAFINIZAÇÃO DAS LÂMINAS**

Desparafinização dos cortes de 5 µm de espessura, do material incluído em parafina, em lâminas previamente tratadas com 3-Aminopropyltriethoxy-silano (Sigma, A-3648, EUA), e deixadas por 24 horas em estufa 60°C:

Xilol a 60°C por 20 minutos

Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos

Etanol 100% 30 segundos

Etanol 95% 30 segundos

Etanol 70% 30 segundos

Lavar as lâminas em água corrente e destilada.

✓ **RECUPERAÇÃO DE ANTÍGENOS**

Ferver a solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 em panela de pressão (Eterna[®], Nigro) destampada. Mergulhar as lâminas e lacrar a panela com a válvula de segurança aberta. Após a saída do vapor saturado, abaixar a válvula de segurança e aguardar a pressurização total. Contar 4 minutos após esse sinal.

Deixar a panela fechada sob água corrente até a despressurização total. Destampar a panela e lavar as lâminas em água corrente e destilada.

✓ **BLOQUEIO DE PEROXIDASE ENDÓGENA**

Proceder ao bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 3%, (água oxigenada 10 vol) com 4 trocas de 5 minutos cada

Lavar em água corrente e destilada

Lavar com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7.4 por 5 minutos.

Incubar as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido conforme tabela abaixo em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN_3) 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

✓ **SISTEMAS DE AMPLIFICAÇÃO**

Incubar por 30 min a 37° C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer cod # RE7260-k, Reino Unido).

Lavar com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada.

Incubar com o NovoLink Polymer por 30 min a 37° C

Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

Tabela 2 - Clones, diluição e fabricantes dos anticorpos utilizados nas reações.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
Bcl2 oncoproteína	124	1:200	DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca, cod# M0887
β Catenina	14	1:800	BD Transduction, cod #610154
COX-2	4H12	1:5000	Novocastra, New Castle, Reino Unido, cod # NCL-COX2
P53 oncoproteína	DO7	1:4000	DakoCytomation, cód # M7001
MUC-1 glicoproteína	Ma695	1:50	Novocastra, cod # NCL-MUC1
MUC-2 glicoproteína	CCp58	1:1000	Novocastra, cod # NCL-MUC2
MUC-5AC glicoproteína	CLH2	1:500	Novocastra, cod # NCL-MUC5AC
MUC-6 glicoproteína	CLH5	1:600	Novocastra, cod # NCL-MUC6
APC (C20)k	Policlonal coelho	1:600	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, EUA, cod # Sc896
CDX-2	AMT28	1:30	Novocastra, cod # NCL- CDX-2
Ras	GRF1	1:200	Cell signaling, cod # 3322
PKC alfa	3	1:1500	BD Pharmingen, cod # 610107
PKC delta	14	1:500	BD Pharmingen, cod # 610398
PKC lambda	41	1:100	BD Pharmingen, cod # 610208
PKC epsilon	21	1:50	BD Pharmingen, cod # 610086
PKC iota	23	1:500	BD Pharmingen, cod # 87622

✓ REVELAÇÃO COM CROMÓGENO

Incubar as lâminas em solução substrato: 60 mg% 3, 3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H₂O₂ 6% (água oxigenada 20 vol); 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

Observar ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação.

Lavar em água corrente e água destilada por 3 minutos.

✓ **CONTRA COLORAÇÃO**

Contracorar com Hematoxilina de Harris por 1 minuto.

Lavar bem em água corrente e destilada.

Imergir 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada.

✓ **DESIDRATAÇÃO E MONTAGEM**

Desidratar as lâminas em:

Etanol 80%, 30 segundos

Etanol 95%, 30 segundos

Etanol 100% 2 vezes, 30 segundos cada

Xilol 4 vezes, 30 segundos cada

Montagem das lâminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha).

As reações foram acompanhadas de controles positivos, em tecidos conhecidamente positivos para os marcadores e um controle negativo. O controle positivo é realizado pelo uso do anticorpo primário e o controle negativo pela supressão do anticorpo durante os passos da reação.

A avaliação foi qualitativa, considerando-se positivas as células que continham a coloração acastanhada, de acordo com o local de expressão de cada

marcador (citoplasma/membrana/núcleo). Foi avaliada a variação de intensidade da reação utilizando a graduação abaixo. Utilizou-se uma graduação diferente para o p53.

p53:

- - negativo
- ½+ criptas parcialmente coradas
núcleo com positividade fraca
- + criptas totalmente coradas
núcleo com positividade fraca
- ++ criptas totalmente coradas
núcleo com positividade moderada
- +++ criptas totalmente coradas
núcleo com positividade forte

Demais marcadores:

- - negativo
- + positividade fraca
- ++ positividade moderada
- +++ positividade forte

Foi empregado microscópio óptico para avaliação da reação. A leitura da reação foi feita por dois observadores.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A caracterização da população de estudo e dos resultados das reações, foi feita por meio de estatística descritiva (média, mediana, porcentagens).

3.6 ÉTICA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital A.C. Camargo, sob o nº 2006/04024-8.

Foi elaborado termo de consentimento informado para os pacientes presentes neste estudo, devido a realização nos mesmos de biópsias em bolsa ileal (Anexo 2).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Foram analisados 16 pacientes com Polipose Adenomatosa Familiar, tratados no Hospital A.C.Camargo, submetidos a proctocolectomia total com bolsa ileal. Os pacientes apresentaram idades variando de 24 a 55 anos com média de 40,68 anos e mediana de 42,50 anos. Quanto ao sexo, ambos tiveram 8 representantes para cada lado. O tempo decorrido da cirurgia até o presente estudo variou de 8 até 14 anos com média de 10,15 anos. Mesmo após a cirurgia, 43,75% dos pacientes apresentaram pólipos adenomatosos em bolsa ileal que foram ressecados durante o seguimento. As manifestações extra-colônicas foram evidenciadas em 5 dos 16 pacientes (31,25%), sendo o tumor desmóide o mais freqüente. Do ponto de vista funcional, os pacientes mantinham o número de evacuações em torno de 3 a 5 episódios diários em sua maioria (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Dados clínicos dos pacientes.

CASOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15	16	17
Idade (anos)	47	36	26	50	36	25	24	42	46	32	39	53	53	55	43	44
Sexo	F	M	M	F	F	F	F	F	M	M	F	M	F	M	M	M
Uso de AINH	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S
Lesões extra-colônicas	N	S	S	N	S	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N

F = feminino; M = masculino; N = não; S = sim; AINH = anti- inflamatório não-hormonal.

Tabela 4 – Dados dos pacientes pós-cirurgia

CASOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15	16	17
Tempo de cirurgia (anos)	14	12,5	8	11	8,5	8	8	11	12	9,5	9	10,5	9	13	11	13
Pólipos pós-cirurgia	N	S	N	N	S	S	N	N	S	S	N	N	N	S	N	S
nº de evacuações/dia	4	3	4	3	3	*	5	4	**	5	3	2	3	3	3	4

F = feminino; M = masculino; N = não; S = sim; AINH = anti- inflamatório não-hormonal; * = paciente com suboclusão devido a tumor desmóide; ** = constipado

Nas reações de hematoxilina-eosina (HE), observamos os tecidos das biópsias de bolsa ileal para obtermos informações sobre as mudanças morfológicas adaptativas: (atrofia de vilosidade, hiperplasia de criptas). Como o material da bolsa procedia de biópsias, a análise foi realizada nas porções orientadas dos tecidos (Figuras 2 e 3). Dos 16 pacientes 11 apresentaram algum grau de atrofia em suas vilosidades. No estudo comparativo com o íleo da peça cirúrgica inicial, as 7 amostras ileais tinham as vilosidades preservadas enquanto 4/7 amostras das bolsas ileais destes pacientes tinham algum grau de atrofia (Figuras 4 e 5). Foi realizada a contagem do número de criptas em 10 CGA (campos de grande aumento) do íleo e bolsa ileal, onde em 4/7 pacientes havia um número maior de criptas em bolsa ileal (dado não mostrado).

Nas amostras da bolsa ileal, embora tenham sido realizadas em áreas de tecido macroscopicamente normais, em 03 casos houve presença de microadenoma. Interessante é que dois destes pacientes não apresentaram pólipos macroscopicamente identificados no seguimento após a cirurgia. Se levarmos em conta estes dois casos, nossa incidência de pólipos após cirurgia subiria para 56,25%.

As mucinas apresentaram padrão de expressão citoplasmático característico para o intestino, tendo positividade apenas para a MUC2 (Tabela 5). A MUC1, MUC5AC e MUC6 tiveram expressão negativa em cólon, íleo e bolsa ileal. Foi observado que as biópsias de bolsa ileal tiveram uma maior intensidade de expressão para MUC2 em relação ao íleo e cólon, fato que foi atribuído a melhor fixação da amostra e o fato de ser material recente. O íleo e cólon da peça cirúrgico mostraram expressão semelhante. Não houve diferença de intensidade entre os pacientes. MUC5AC foi positiva na porção superficial do epitélio com aparência normal, em

área adjacente ao microadenoma em uma das amostras de bolsa ileal diferentemente da MUC1 e MUC6 que não expressaram em superfície de microadenoma (Figura 6).

A proteína bcl2 teve expressão uniforme no citoplasma das células epiteliais, de fraca intensidade, em todas as amostras, seja íleo, cólon ou bolsa ileal. O citoplasma da porção das criptas apresentava-se com positividade maior que a vilosidade.

A beta-catenina apresentou expressão de membrana preservada, mas também uma discreta positividade em citoplasma com predomínio nos adenomas microscópicos de bolsa ileal (Figura 7). Não foi observado diferença entre os tecidos avaliados ou entre as bolsas ileais.



Figura 2 – Corte de tecido ileal corado com hematoxilina-eosina, demonstrando uma boa orientação do material, aumento de 10x.



Figura 3 – Corte de tecido ileal corado com hematoxilina-eosina demonstrado perda orientação do material, aumento de 10x.

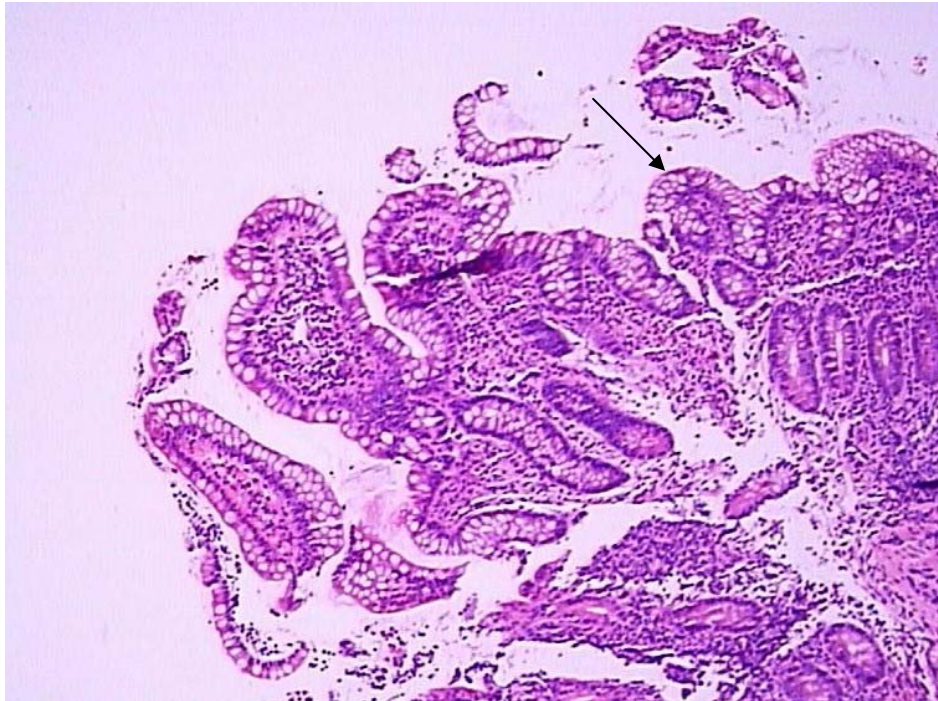


Figura 4 - Corte de tecido de bolsa ileal corado com hematoxilina-eosina com achatamento parcial das vilosidades, aumento de 10x.

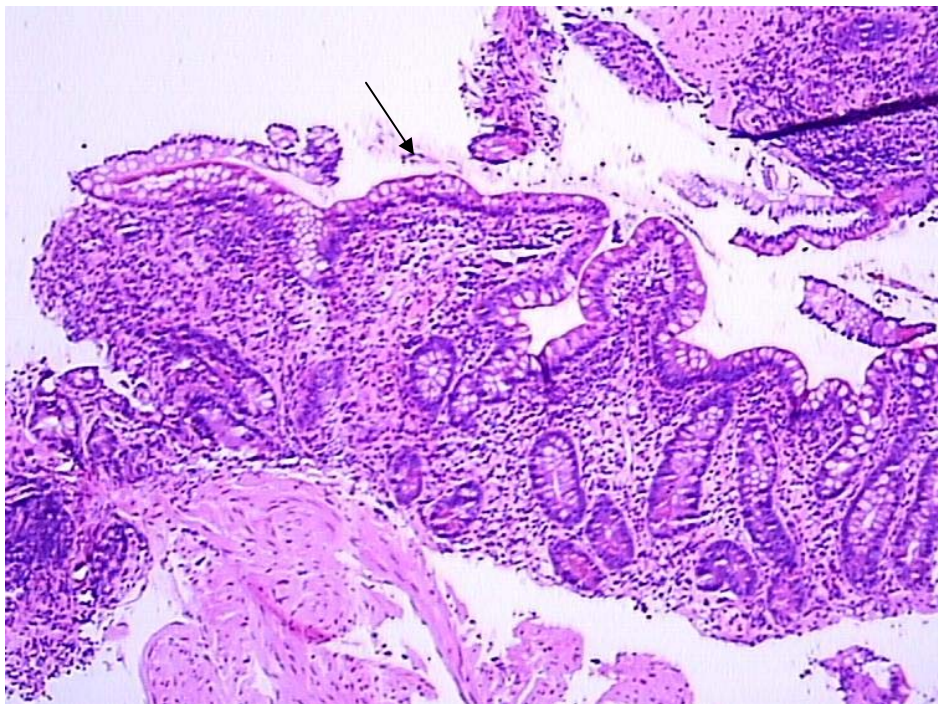


Figura 5 - Corte de tecido de bolsa ileal corado com hematoxilina-eosina com achatamento total das vilosidades, aumento de 10x.

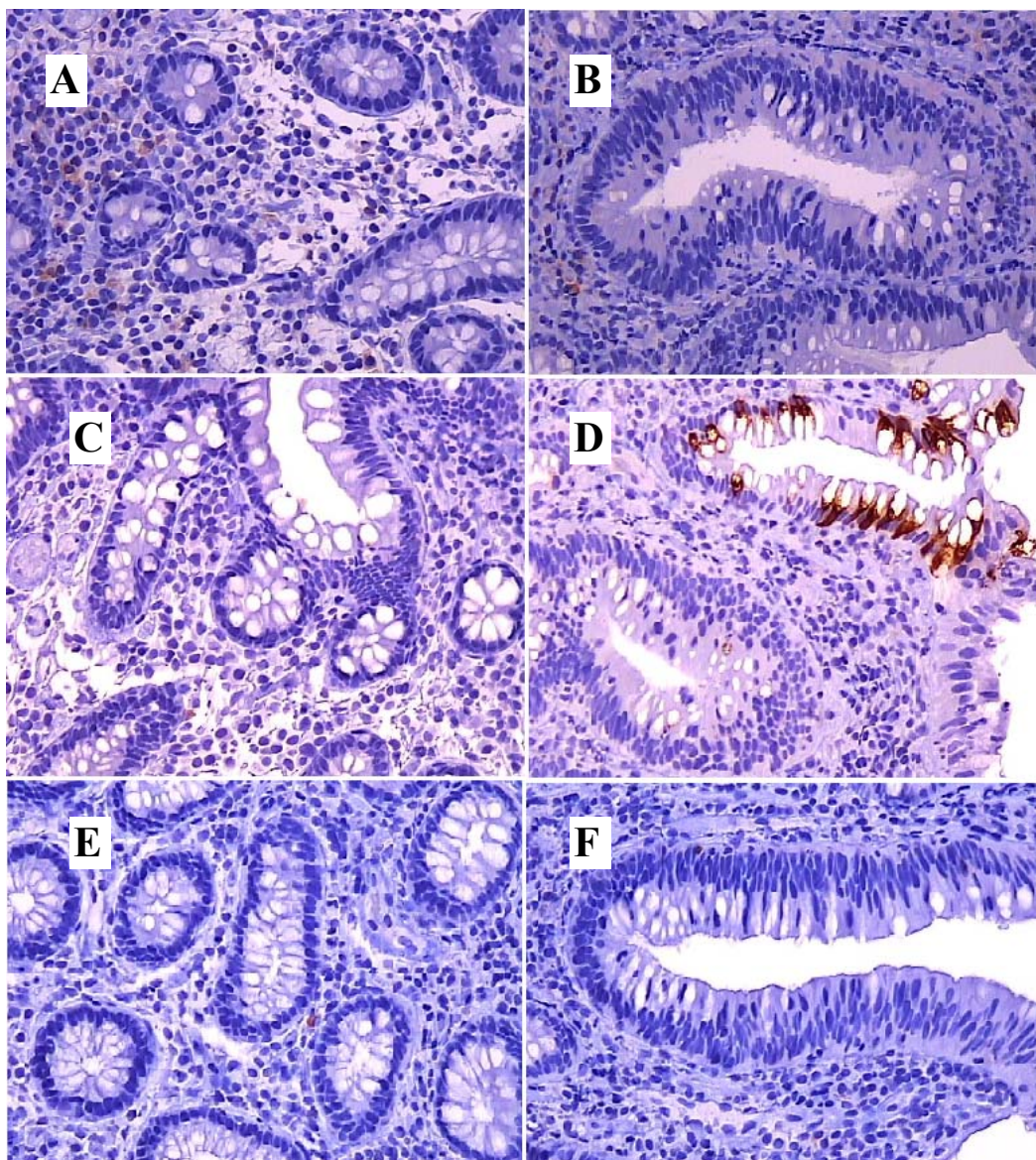


Figura 6 – Estudo imunoistoquímico de tecido de bolsa ileal, aumento de 40x: A e B corados com MUC 1; C e D corados com MUC 5AC; E e F corados com MUC 6. As imagens A, C e E representam epitélio normal; B, D e F representam área de microadenoma. Observa-se em D expressão de MUC 5AC em epitélio superficial em área adjacente ao microadenoma. Não houve expressão nas demais amostras.

Tabela 5 - Expressão das mucinas nas amostras comparativas.

Casos		2			3			7			8			11			14			15		
Amostras		I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI
Marcadores	MUC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MUC2	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++
	MUC5AC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MUC6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

I = íleo; C= cólon; BI = bolsa ileal, MUC = mucina

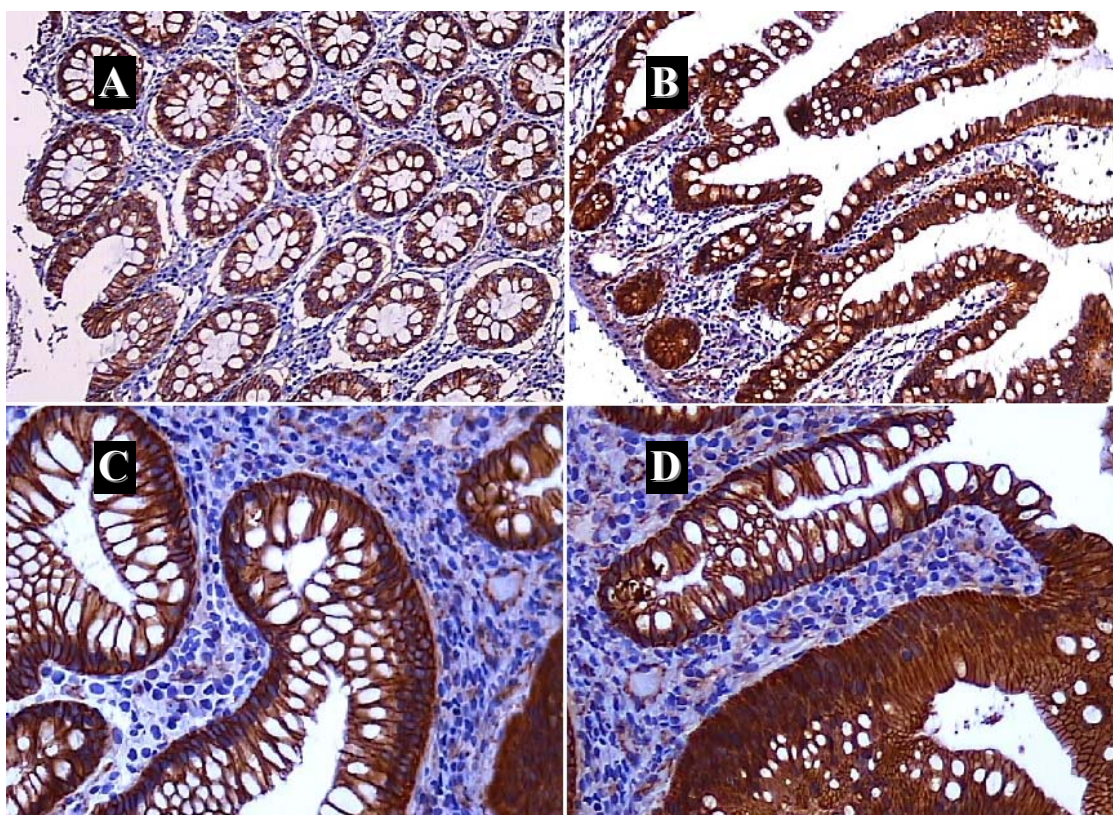


Figura 7 - Estudo imunoistoquímico para proteína beta-catenina: A. Tecido colônico; B. Intestino delgado; C. Bolsa ileal; D. Bolsa ileal com área de microadenoma. Observa-se em D maior acúmulo de beta-catenina em citoplasma na área de microadenoma em relação ao tecido normal.

A proteína COX2 teve expressão predominantemente no citoplasma das células epiteliais. Foi evidenciado imunodeteção de fraca intensidade semelhante entre cólon, íleo e bolsa ileal e semelhante entre todos os pacientes.

As reações imunoistoquímicas para Kras apresentaram um back-ground em estroma e tecido muscular mesmo após repetição destas. A expressão foi citoplasmática nos diversos tecidos de maneira semelhante.

A proteína CDX2 foi expressa no núcleo das células de vilosidades e criptas, e apresentou uma variabilidade importante entre os tecidos, possivelmente devido a sua dependência em relação à fixação do material. Nas amostras recentes de bolsa ileal, em 100% dos casos (16 pacientes) obtivemos forte intensidade de expressão. Já nas amostras antigas de íleo e cólon da peça cirúrgica, houve variação desde a negatividade até expressão de forte intensidade. Houve predomínio da intensidade fraca, principalmente no cólon (5/7 pacientes).

A proteína APC demonstrou expressão citoplasmática fraca em seis amostras de tecido ileal pertencentes a segmentos coletados da peça cirúrgica. No cólon já houve predomínio da reação intensidade moderada (4/7 pacientes). As bolsas ileais acompanharam o íleo, tendo 11 das 16 amostras expressado intensidade fraca na reação. Observando as áreas de microadenoma, não houve expressão da proteína APC (Figura 8).

A fosfoproteína p53 tem expressão nuclear. Obtivemos, mesmo após repetição da reação, expressão de p53 nas criptas da mucosa ileal e criptas basais da mucosa colônica. Na amostra de bolsa ileal, onde também temos área de microadenoma, foi observado positividade nuclear nos microadenomas e ausência desta na vilosidade. De um modo geral, houve predomínio da expressão de

intensidade fraca da reação nas diferentes amostras, diferindo apenas se as criptas estavam parcialmente ou totalmente coradas (Tabela 6). Foi realizado estudo imunoistoquímico também para Ki67 para avaliar áreas de proliferação celular e comparar com os resultados observados com o p53 (Figura 9). Foi observado positividade nuclear para o Ki67, confirmando o estado hiperproliferativo.

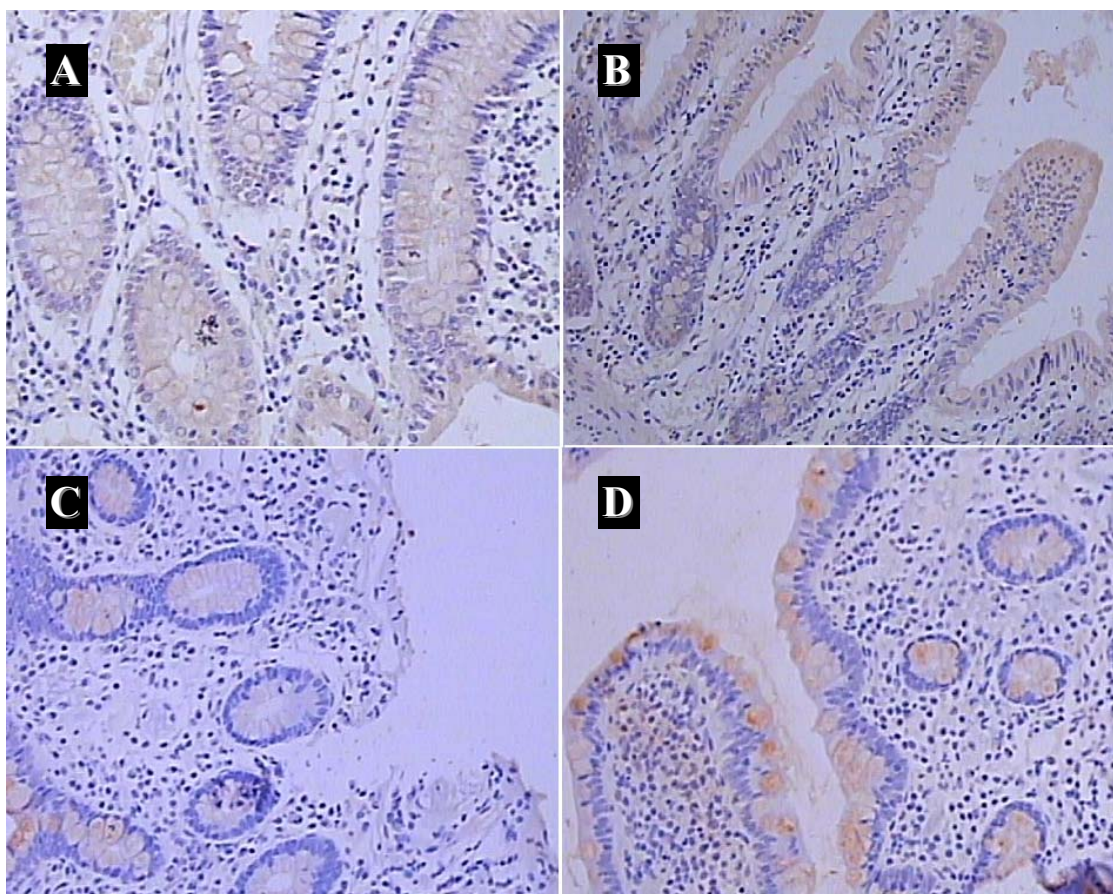


Figura 8 – Imunoistoquímica para APC, com aumento de 20x: A. Cólon; B. Intestino delgado; C. e D. Bolsa ileal.

As PKC's expressaram resultados diferentes entre elas, diferentes entre as estruturas dentro dos tecidos, porém semelhantes entre os tecidos (íleo, cólon e bolsa ileal) e entre os pacientes. Foram realizados dois tipos de análises: uma dando

atenção específica ao tecido linfóide devido à especificidade de expressão das PKC's nestes, e outra onde observamos as áreas das criptas, vilosidades, microadenomas, tecido muscular e plexos mioentéricos. O tecido linfóide foi dividido em: tecido linfóide do córion, centro do folículo linfóide e periferia do folículo linfóide (Figura 10). A camada muscular própria foi avaliada no íleo e cólon porque a biópsia da bolsa ileal pode apresentar apenas muscularis da mucosa (Tabelas 7 e 8).

A PKC alfa teve expressão citoplasmática de fraca intensidade semelhante nas criptas do íleo, cólon e bolsa ileal. A vilosidade presente no íleo e bolsa ileal, expressou a PKC alfa com fraca intensidade em 91% das amostras. O tecido muscular do íleo teve moderada intensidade de expressão em 5/7 pacientes, enquanto o tecido muscular do cólon teve reação de intensidade fraca em 5/7 pacientes. Houve expressão da PKC alfa apenas na área de microadenoma da bolsa ileal. Já em relação ao tecido linfóide, a PKC alfa apresentou uma particularidade, corando com maior intensidade os linfócitos do córion e da periferia dos folículos em relação à porção central destes. O padrão do tecido linfóide foi o mesmo nas amostras do íleo, cólon e bolsa ileal.

Tabela 6 - Resultado da imunoistoquímica no estudo comparativo entre as amostras de íleo, cólon e bolsa ileal.

Casos		2			3			7			8			11			14			15		
Amostras		I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI
Marcadores	COX2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	APC	+	+	+	+	++	++	+	++	+	+	++	+	+	+	+	+	++	+	NA	-	++
	Catenina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	K-ras	++	++	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	++	+	++	+	++
	p53	+	+	1/2+	1/2+	1/2+	1/2+	1/2+	1/2+	1/2+	+	-	-	1/2+	1/2+	1/2+	1/2+	+	+++	+	-	+
	bcl2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CDX2	+++	+++	+++	+	+	+++	++	+	+++	-	-	+++	++	+	+++	+	+	+++	+	+	+++

NA = não avaliável; I = íleo; C = cólon; BI = bolsa ileal

A PKC delta foi a mais específica das PKC's, pois corou fortemente tecido muscular de vasos, camada muscular própria e muscular da mucosa. Os plexos mioentéricos não demonstraram positividade. Em apenas um caso tivemos expressão em cripta e vilosidade, que interpretamos como fundo da reação. Assim como a PKC alfa, apenas um caso de microadenoma apresentou expressão. O tecido linfóide teve expressão negativa em todos os casos (Figura 11).

A PKC epsilon, ao contrário da delta, apresentou-se como a mais inespecífica das PKC's, não tendo um tecido ou estrutura de destaque em sua expressão. As criptas expressaram reação de fraca intensidade em mais ou menos 50% das amostras, sem diferença entre íleo, cólon e bolsa ileal. As vilosidades do íleo e bolsa ileal tiveram padrão semelhante, reação de fraca intensidade em 85% das amostras. O tecido muscular teve expressão apenas em camada muscular própria tanto em cólon como em íleo, e plexo mioentérico positivo. Em relação ao tecido linfóide não foi obtido nenhum padrão de expressão, tendo intensidades variadas em córion e folículo.

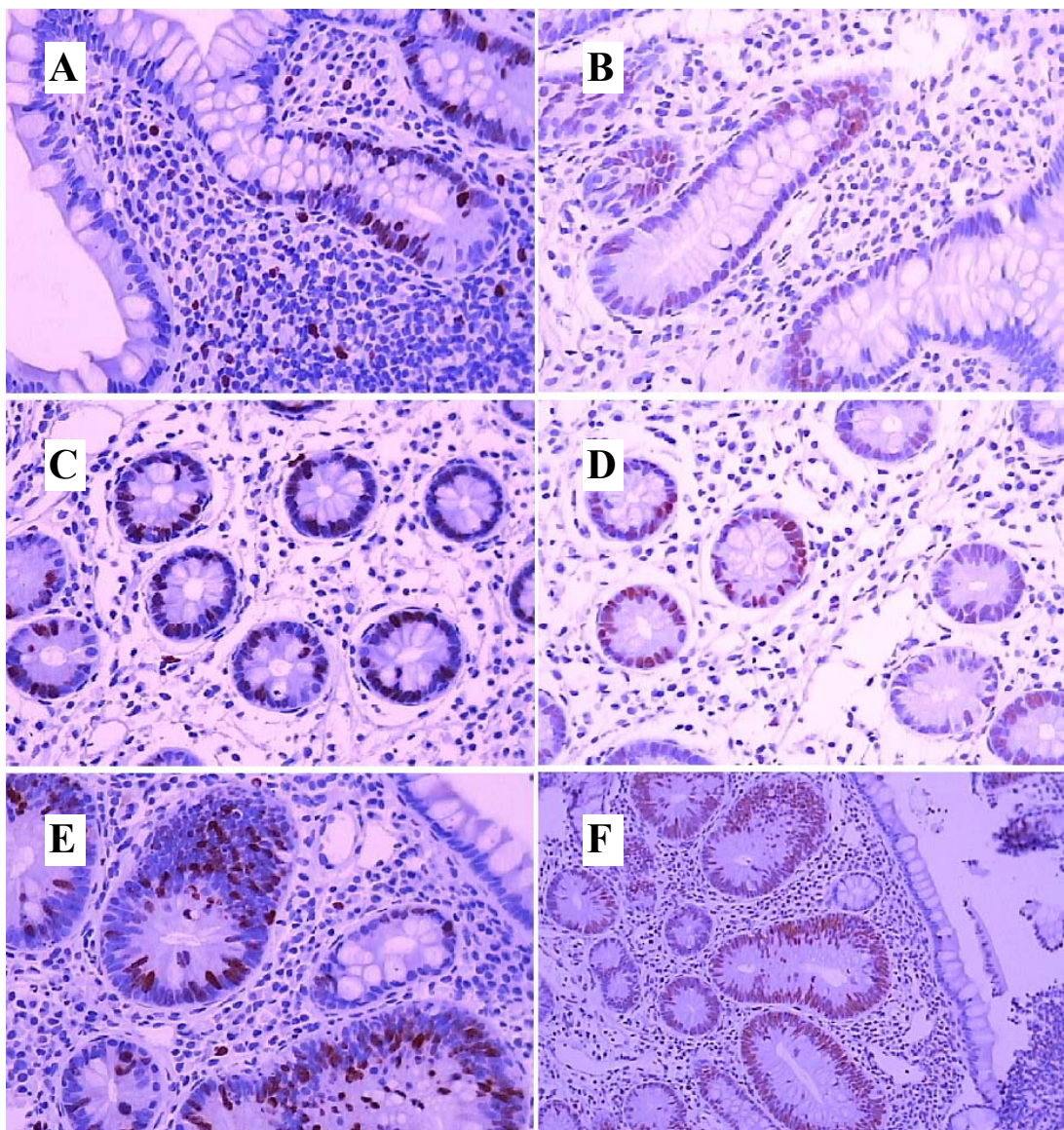


Figura 9 - Imunoistoquímica com aumento de 40x de tecido de bolsa ileal: A, C e E coradas com Ki67; B, D e F coradas com p53. As imagens E e F representam área de microadenoma. Observa-se expressão de maior intensidade nas áreas de microadenoma.

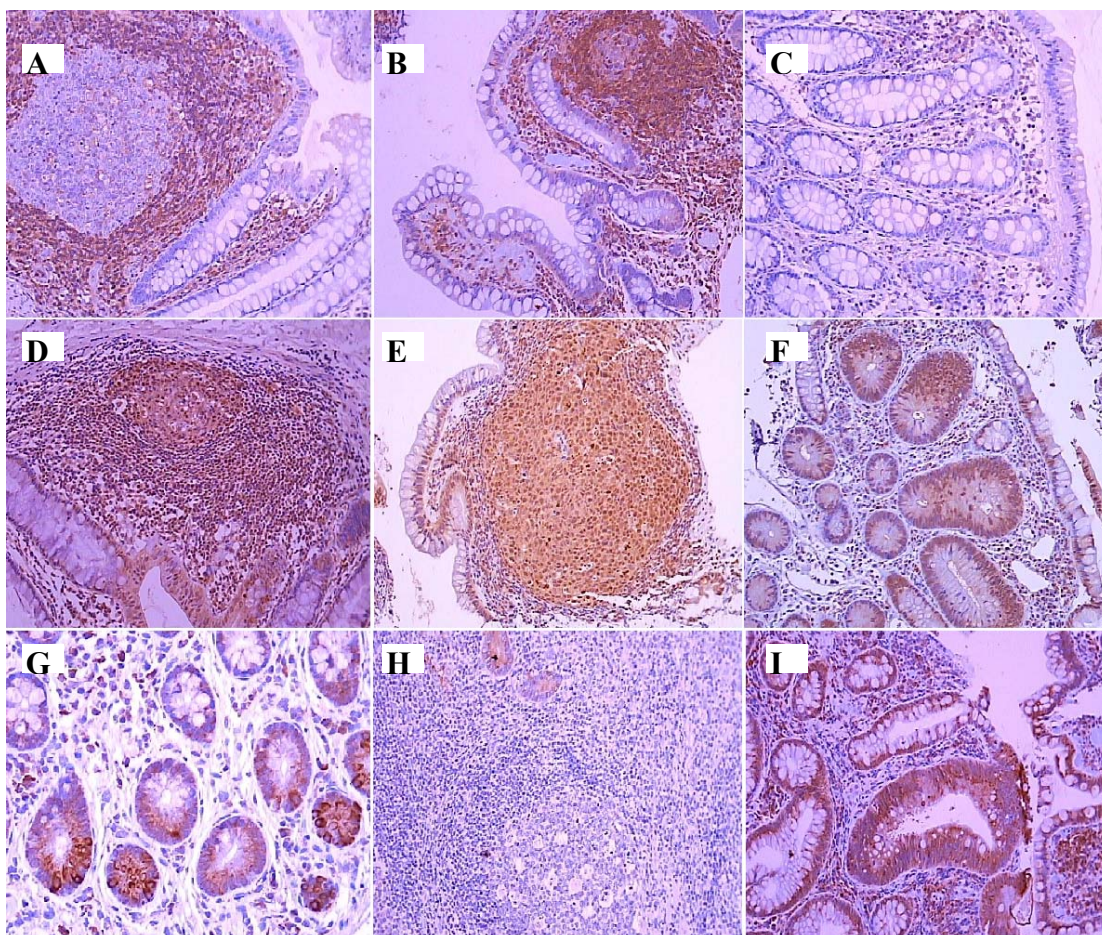


Figura 10 – Imunoistoquímica das PKC's: A, B, C, D, E, F, H, I com aumento de 20x e G com aumento de 40x; A. Expressão de PKC alfa no folículo linfóide do cólon; B. Expressão de PKC alfa no folículo linfóide da bolsa ileal; C. Expressão da PKC alfa no tecido linfóide do córion; D. Expressão de PKC iota no folículo linfóide do cólon; E. Expressão de PKC iota no folículo linfóide da bolsa ileal; F. Expressão de PKC iota em microadenoma da bolsa ileal; G. Expressão da PKC lambda nas células de Paneth; H. Expressão de PKC lambda no folículo linfóide da bolsa ileal; I. Expressão da PKC lambda em microadenoma da bolsa ileal.

A PKC lambda apresentou algumas características interessantes. Nas criptas e vilosidades teve predominantemente reação de moderada intensidade, sem diferença entre os tecidos ou entre os pacientes. Observou-se, porém, em íleo e bolsa ileal,

presença de escassas células da porção basal da cripta que se destacavam por apresentar maior intensidade da reação em relação ao resto da cripta. Ao voltarmos a reação de hematoxilina-eosina percebemos que estas se tratavam de células de Paneth. No cólon a reação foi negativa, possivelmente porque as amostras são provenientes do cólon descendente que não possui células de Paneth. A área de microadenoma teve expressão com moderada intensidade. O tecido muscular apresentou-se negativo na grande maioria das amostras, e plexo mioentérico positivo. Em relação ao tecido linfóide, o córion destacou-se expressando reação de forte intensidade frente a uma expressão de fraca intensidade no folículo, sem diferenças entre íleo, cólon e bolsa ileal.

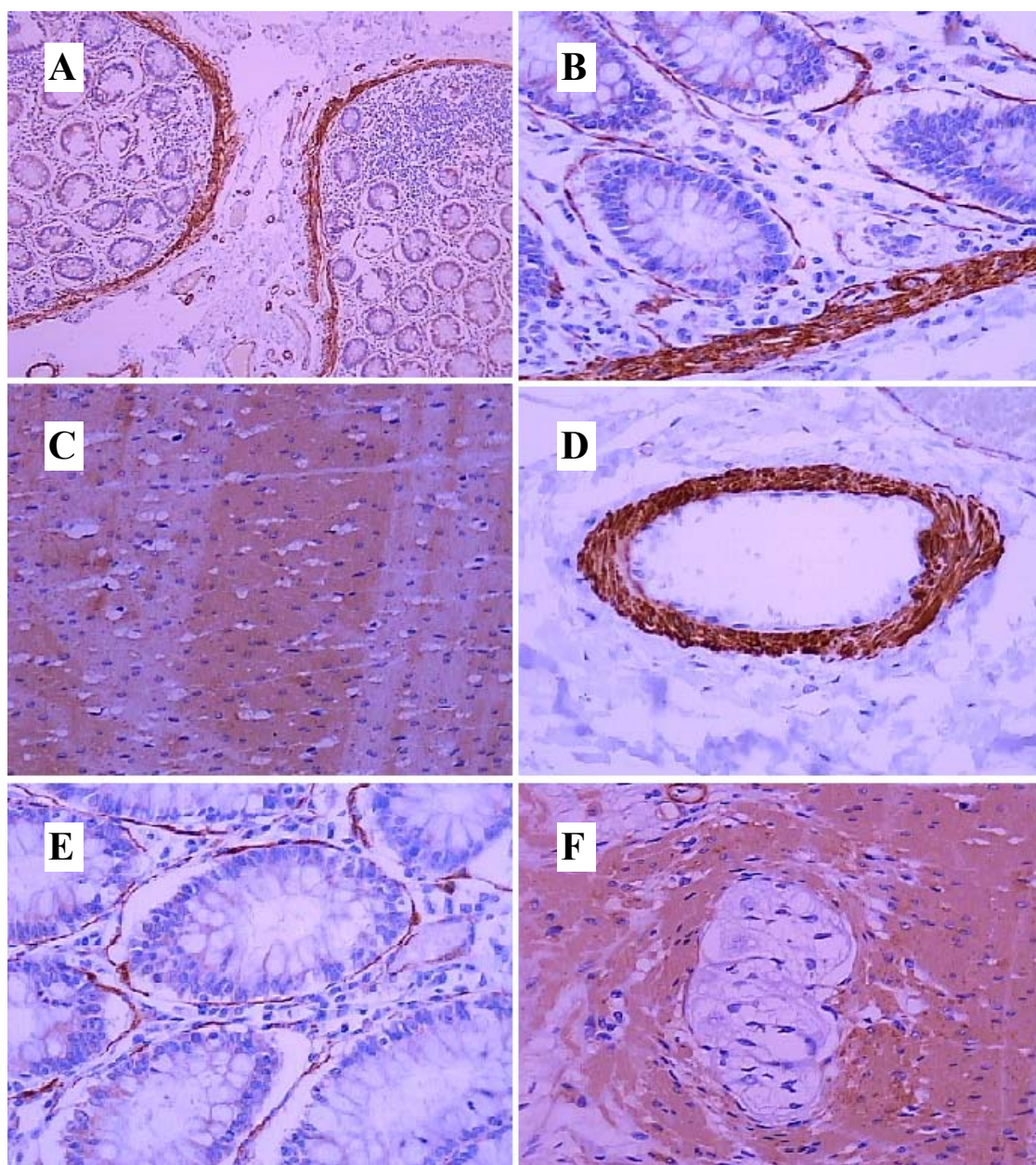


Figura 11 – Imunoistoquímica da PKC delta: A. aumento de 10x; B, C, D, E e F aumento de 40x; A. e B. Expressão na camada muscular da mucosa; C. Expressão na camada muscular própria; D. Expressão na musculatura do vaso; E. Expressão nos feixes musculares ao redor das criptas; F. Plexo mioentérico negativo em meio a tecido muscular positivo.

A PKC iota apresentou nas criptas uma expressão moderada (70%). Nas vilosidades do íleo e bolsa ileal observa-se uma tendência de maior expressão em bolsa ileal do que em íleo da peça cirúrgica, com expressão moderada para bolsa ileal (13/16 pacientes) e fraca para íleo (3/7 pacientes). O tecido muscular encontra-se positivo em todas as amostras, e onde o plexo mioentérico é identificado apresenta-se positivo. As áreas de microadenoma são todas negativas para PKC iota. Em relação ao tecido linfóide esta PKC cora o córion e a porção central do folículo com mais intensidade do que a periferia, estabelecendo um padrão de expressão. Não houve diferença entre os tecidos (íleo, cólon, bolsa ileal), nem entre os pacientes. De um modo geral, não houve diferença nas reações dos diferentes marcadores entre íleo e cólon da peça cirúrgica e a biópsia de bolsa ileal.

Tabela 7 - Expressão das PKC's no tecido linfóide nas amostras de íleo, cólon e bolsa ileal.

Casos		2			3			7			8			11			14			15		
Amostras		I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI
PKCa	Córon/ Tecido Linfóide	++	++	+++	+	++	+++	++	++	+++	++	+	+++	++	+	++	+	++	+++	++	+++	+++
	Centro do Fóliculo linfóide	++	+++	+	-	+	+	-	+	NA	+	+	NA	NA	+	+	+	+	+	+	NA	+
	Periferia do Foliculo Linfóide	-	-	+++	++	+++	+++	++	+++	NA	+++	+++	+++	NA	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
PKCδ	Córon/ Tecido Linfóide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Centro do Fóliculo linfóide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Periferia do Foliculo Linfóide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PKCε	Córon/ Tecido Linfóide	+	+	++	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	++	-	+	+	+	+	+
	Centro do Fóliculo linfóide	-	+	++	-	++	++	-	+	-	-	+	+	NA	+	+++	-	-	++	++	+	+
	Periferia do Foliculo Linfóide	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	NA	-	-	-	-	+	+	NA	NA
PKCλ	Córon/ Tecido Linfóide	++	++	++	-	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	++	++	+++	+	+++	+++	++	+++	+++
	Centro do Fóliculo linfóide	-	+	+	-	+	+	+	+		+	+	+	NA	++	++	-	+	++	+++	+	+
	Periferia do Foliculo Linfóide	+	-	+	-	+	+	+	+	NA	-	-	+	NA	+	+	-	-	+	--	+	-
PKCι	Córon/ Tecido Linfóide	+++	+++	+++	+	+++	+++	++	+++	+++	+	++	++	+	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
	Centro do Fóliculo linfóide	++	-	++	++	+++	+++	++	++	-	++	++	NA	NA	++	++	+	++	++	+++	++	+++
	Periferia do Foliculo Linfóide	-	++	+++	+	++	++	-	-	-	+	++	NA	NA	+	+	-	+	-	++	NA	+

(-) negativo; (+) fraca; (++) moderada; (+++) forte; NA não avaliável; I = íleo; C = cólon; BI = bolsa ileal

Tabela 8- Expressão das PKC's nas amostras de íleo, cólon e bolsa ileal.

		2			3			7			8			11			14			15		
		I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI
PKCα	Cripta	++	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Vilosidade	++	NA	+	+	NA	+	-	NA	+	+	NA	+	+	NA	+	+	NA	+	+	NA	+
	Músculo	++	++	NA	++	++	NA	+	+	NA	++	+	NA	++	+	NA	+	+	NA	++	+	NA
	Adenoma	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PKCδ	Cripta	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vilosidade	+	NA	-	-	NA	-	-	NA	-	-	NA	-	-	NA	-	-	NA	-	-	NA	-
	Músculo	+++	+++	MM	+++	+++	MM	+++	+++	MM	+++	+++	MM	+++	+++	MM	+++	+++	MM	+++	+++	MM
	Adenoma	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PKCϵ	Cripta	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Vilosidade	++	NA	+	+	NA	+	+	NA	+	+	NA	+	-	NA	+	+	NA	+	+	NA	+
	Músculo	+	+	NA	-	+	NA	+	+	NA	NA	-	NA	-	-	NA	+	+	NA	+	+	NA
	Adenoma	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PKCλ	Cripta	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++
	Vilosidade	++	NA	++	++	NA	++	++	NA	++	++	NA	+++	++	NA	++	++	NA	++	+	NA	++
	Músculo	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Adenoma	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Paneth	+++	NA	+++	+++	NA	+++	+++	NA	+++	+++	NA	+++	+++	NA	+++	+++	NA	+++	+++	NA	+++
PKCι	Cripta	+++	++	++	++	++	++	++	+	++	+	++	++	+	++	++	+	++	+++	++	++	++
	Vilosidade	+++	NA	+	++	NA	++	++	NA	++	+	NA	++	+	NA	++	+	NA	+++	++	NA	++
	Músculo	+	+	NA	+	+	NA	+	+	NA	+	+	NA	+	+	NA	+	+	NA	+	+	NA
	Adenoma	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	++	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

(-) negativo; (+) fraca; (++) moderada; (+++) forte; NA não avaliável; MM muscular da mucosa; I = íleo; C = cólon; BI = bolsa ileal.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de pólipos em bolsa ileal continua sendo uma incógnita. Enquanto no cólon de pacientes com FAP a seqüência adenoma-carcinoma é bem documentada, o desenvolvimento e a evolução das lesões adenomatosas de bolsa ileal continua desconhecida. CHURCH (2005) fez uma revisão de todos os estudos que relatassem displasia ou neoplasia em bolsa ileal. Havia seis estudos que relatavam oito pacientes com neoplasia na anastomose da bolsa ileal, diagnosticado em média com 8 anos após a construção da bolsa (variando de 3-20 anos). Metade das neoplasias eram localmente avançadas (T4) ao diagnóstico. Havia também, oito relatos de caso de neoplasia descritos em ileostomia nos pacientes com FAP. O tempo mediano desde a construção da ileostomia até a formação do câncer era 25 anos (variando 9-40 anos).

Temos dois denominadores comuns: a maioria dos estudos aponta para uma maior incidência de adenomas em bolsa ileal com um maior tempo decorrido da cirurgia, e a não correlação entre a severidade da polipose em cólon com o desenvolvimento de adenomas em bolsa. A alteração germinativa do gene APC, ocasiona a formação de pólipos em jejuno e íleo também, porém, são adenomas de comportamento indolente e de transformação maligna rara. Não sabemos então, quando um adenoma de bolsa ileal terá comportamento semelhante ao adenoma colônico, com alta taxa de malignização, ou comportamento semelhante ao intestino delgado, de evolução indolente. Mesmo assim, a formação de adenomas parece ser o destino final da mucosa da bolsa ileal. Já encontramos 43,75% dos pacientes com

ressecção de adenomas no decorrer do seguimento em nossa população de estudo, e mesmo procurando áreas macroscopicamente normais para a realização das biópsias, flagramos dois pacientes com área de microadenoma que não tinham diagnóstico prévio de lesão macroscópica. Outro fato a ser lembrado, é que a falta de entendimento da história natural da formação de adenocarcinomas em bolsa ileal, é um obstáculo no desenvolvimento de uma vigilância programada em pacientes com FAP após proctocolectomia total com a confecção da bolsa ileal. Continua sendo prudente porém, executar avaliação endoscópica da bolsa 3 e 6 meses após a cirurgia e depois anualmente (KING et al. 2000).

Mudanças adaptativas foram observadas na população de estudo (atrofia de vilosidades, hiperplasia de criptas). São mudanças morfológicas atribuídas, geralmente, a uma resposta reparativa do tecido a inflamação. Nas doenças inflamatórias do intestino delgado são achados comuns. Porém, em FAP, aproximadamente 70% dos pacientes apresentam essas mudanças fenotípicas com baixos índices de inflamação, percentual confirmado nos achados deste estudo. A estase do conteúdo fecal está associada a patogênese da inflamação na bolsa, porém este processo é mais presente em paciente com retocolite do que em paciente com FAP. Na verdade, a etiologia da inflamação é ainda desconhecida (YAMAMOTO et al. 2005). A combinação de estase fecal, de epitélio adenomatoso, e de uma mutação germinativa do APC é uma receita poderosa para a neoplasia epitelial.

Outro conceito a se discutir para a formação do adenoma e posterior carcinoma, seria o da célula tronco. HUMPHRIES e WRIGTH (2008) apresentam o câncer como uma doença de células tronco, esta adquire a mutação e se expande. Isso aconteceria na cripta basal. Estas mudanças apareceriam inicialmente como um

adenoma e progrediriam para carcinoma. O interessante é que este conceito poderia ser aplicado a qualquer órgão, inclusive a mucosa ileal. A mutação do *APC*, presente nos pacientes com FAP, levaria a um estado hiperproliferativo com expansão da população de células da cripta basal do íleo, provocando o aparecimento da lesão adenomatosa.

Embora tenhamos um segmento médio de dez anos, não foi observado desenvolvimento de tumor na população de estudo.

Na tentativa de obter informação que esclarecesse melhor as alterações em bolsa ileal, testamos alguns marcadores para tentar obter um perfil imunoistoquímico.

As mucinas apresentaram um padrão característico para o intestino, com expressão de MUC2 e ausência de expressão para MUC1, MUC5AC e MUC6. A MUC2 teve maior expressão em bolsa ileal. Uma diminuição na expressão de MUC2 já foi atribuída ao processo carcinogênico em intestinos, já uma overexpressão foi vista em casos de pseudomixoma peritoneal, que é um tumor mucinoso (O'CONNELL et al. 2002). A expressão de MUC5AC foi positiva na porção superficial de epitélio normal, em área adjacente ao microadenoma, que corresponde a informação presente na literatura. Em grande parte dos adenomas e na maioria dos tumores gastrointestinais há uma perda de especificidade órgão-mucina. Por exemplo, temos a MUC5AC normalmente expressa em tecido gástrico, e aqui aberrantemente expressa em superfície epitelial próxima à adenoma. A MUC1, pela sua maior glicosilação em cólon, não é imunodetectada. Porém, quando há adenomas ou tumores ela encontra-se menos glicosilada e pode ser identificada. Se encararmos

a mucosa de bolsa ileal como uma mucosa doente, poderíamos ver alterações desta mucina, porém isso não foi identificado.

Bcl2 é uma proteína que prolonga a vida celular inibindo a apoptose. A expressão de bcl2 comportou-se de maneira interessante. Houve expressão tanto em íleo como em bolsa ileal. Normalmente há expressão nas criptas colônicas, refletindo em uma baixa taxa de apoptose. Em intestino delgado a sua expressão não é vista, permitindo uma taxa de 5 a 10% de apoptose espontânea. O fato de, tanto o íleo quanto a bolsa ileal expressarem bcl2, pode mostrar uma similarização da apoptose entre cólon e íleo em pacientes com FAP, ocasionando diminuição da apoptose espontânea e aumento do estado hiperproliferativo (MERRITT et al. 1995).

A beta-catenina apresentou expressão de membrana preservada, com discreta positividade em citoplasma. Este acúmulo de proteína no citoplasma pode já significar alteração compartimental desta, pela fosforilação deficiente do APC. Isto é confirmado quando observamos as áreas de microadenomas, onde a concentração citoplasmática aumenta consideravelmente. Em FAP temos alteração germinativa do gene APC, e o adenoma é a expressão fenotípica da perda do segundo alelo.

Estudos clínicos demonstram fraca expressão de COX-2 em mucosa normal de pacientes com FAP. Nosso achado corresponde ao da literatura, demonstrando que a bolsa ileal não tem um comportamento diferente em relação à mucosa colônica, pois manteve o mesmo padrão de expressão. Lembramos que lesões adenomatosas e carcinomas apresentam superexpressão de COX-2, achado este que não obtivemos nas áreas de microadenoma (JUNGCK et al. 2004).

O CDX2 foi expresso no núcleo, tanto do cólon como em íleo e bolsa ileal. Achado esperado devido à sua participação na regulação da proliferação e

diferenciação das células do epitélio intestinal. O que chamou atenção foi a maior intensidade de expressão em bolsa ileal em relação aos outros tecidos, mas que atribuímos à melhor fixação das amostras de bolsa ileal (DANG et al. 2001).

Em FAP temos apenas um alelo mutado do gene *APC*, permitindo a identificação imunoistoquímica da proteína. Isso foi observado pela expressão citoplasmática obtida nas amostras testadas. Como já foi falado antes, a mutação dos dois alelos do gene *APC* tem como expressão fenotípica o adenoma. Esta informação foi confirmada pela expressão negativa nas áreas de microadenomas.

O achado normal da imunoistoquímica para p53, é a sua negatividade de expressão. Mesmo estando presente em uma vasta variedade de células normais, devido à sua meia vida ser muito curta, encontra-se geralmente abaixo dos níveis para imunodetectção. Em tumores, onde há mutação somática do p53, a detecção torna-se possível devido à uma maior estabilidade da proteína, levando ao acúmulo da mesma. Lembramos também, que em estados hiperproliferativos, uma positividade para p53 pode ser obtida, embora não haja mutação (p53 selvagem). Os pacientes com FAP têm um estado hiperproliferativo em sua mucosa intestinal. Atribuímos, portanto, a imunodetectção do p53 em nosso estudo a este estado hiperproliferativo, que foi confirmado pela expressão do ki67.

Nós examinamos a expressão de cinco tipos de PKC's em amostras de cólon, íleo e bolsa ileal, de pacientes com FAP. Devido à não existência de estudos prévios em pacientes com FAP para estes marcadores, o padrão esperado de expressão não é conhecido. Há apenas um estudo experimental em camundongos mutados para *APC*, que contemplam as PKC's alfa, épsilon e delta em íleo normal. Neste estudo, a PKC alfa e delta apresentaram uma maior intensidade de expressão em vilosidade quando

comparada com a cripta, e a PKC épsilon teve fraca expressão em ambas. Em nossos pacientes não houve predomínio da expressão de PKC alfa em vilosidade em relação à cripta. Ambas obtiveram expressão de fraca intensidade. Houve uma maior discrepância em relação à PKC delta, que marcou exclusivamente tecido muscular, não sendo evidenciado expressão em citoplasma de cripta ou vilosidade nas amostras estudadas. A inespecificidade da PKC épsilon foi confirmada em nossos achados, pois não apresentou nenhuma estrutura ou tecido de destaque em sua expressão. Já a PKC lambda teve a peculiaridade de marcar as células de Paneth, achado que com mais estudos pode demonstrar algum significado clínico. O mesmo pode ser falado da especificidade em tecido linfóide das PKC's alfa, lambda e iota. Como avaliamos apenas tecido normal, um próximo passo seria uma comparação com lesões adenomatosas e tumores, onde evidenciaríamos as mudanças na expressão das PKC's nos tecidos linfóides destas lesões.

Não há dúvidas da necessidade de outros estudos para melhor compreensão de todo esse processo.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

A mucosa da bolsa ileal expressou as PKC's α , λ , δ , ϵ , ι , beta-catenina, K-ras, p53, APC, bcl-2, COX2, MUC2 e CDX2, teve ausência de expressão de MUC1, MUC5AC E MUC6.

No estudo comparativo entre a peça cirúrgica inicial e as biópsias recentes de bolsa ileal, houve semelhança de expressão nos marcadores: PKC's α , λ , δ , ϵ , ι , beta-catenina, K-ras, p53, APC, bcl-2, COX2, MUC1, MUC5AC e MUC6. Apenas MUC2 e CDX2 apresentaram uma maior expressão em bolsa ileal.

A avaliação das alterações histológicas na mucosa da bolsa ileal demonstrou atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas.

A compreensão do estado hiperproliferativo do tecido da bolsa ileal parece ser o caminho para as respostas na formação de adenomas e posterior carcinomas.

Os diferentes comportamentos da mucosa de bolsa ileal (surgimento de tumor com 3 anos e com 20 anos de evolução pós-operatória) embora os estímulos sejam os mesmos, nos leva a necessidade de definir uma população de risco.

O papel da célula tronco intestinal em bolsa ileal poderia ser um caminho a ser trilhado no esclarecimento do potencial de formação de neoplasia desta mucosa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bartman AE, Sanderson SJ, Ewing SL, et al. Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucin genes in colorectal polyps. **Int J Cancer** 1999; 80:210-8.

Boman BM, Walters R, Fields JZ, et al. Colonic crypt changes during adenoma development in familial adenomatous polyposis: immunohistochemical evidence for expansion of the crypt base cell population. **Am J Pathol** 2004; 165:1489-98.

Buisine MP, Janin A, Maunoury V, et al. Aberrant expression of a human mucin gene (MUC5AC) in rectosigmoid villous adenoma. **Gastroenterology** 1996; 110:84-91.

Bülow S, Berk T, Neale K. The history of familial adenomatous polyposis. **Fam Cancer** 2006; 5:213-20.

Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. **Cancer Metastasis Rev** 2004; 23:77-99.

Byrd JC, Stenberg L, Yan P, Ho SP, Bresalier RS. Ectopic expression of MUC5 gastric mucin in colorectal adenocarcinoma. **Gastroenterology** 1998; 114:1573.

Campos FG, Habr-Gama A, Kiss DR, et al. Adenocarcinoma after ileoanal anastomosis for familial adenomatous polyposis: review of risk factors and current surveillance apropos of a case. **J Gastrointest Surg** 2005; 9:695-702.

Chawengsaksophak K, James R, Hammond VE, Kontgen F, Beck F. Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. **Nature** 1997; 386:84-7.

Church J. Ileoanal pouch neoplasia in familial adenomatous polyposis: an underestimated threat. **Dis Colon Rectum** 2005; 48:1708-13.

Corfield AP, Carroll D, Myerscough N, Probert CS. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. **Front Biosci.** 2001; 6:1321-57.

Cornford P, Evans J, Dodson A, et al. Protein kinase C isoenzyme patterns characteristically modulated in early prostate cancer. **Am J Pathol** 1999; 154:137-44.

Coull DB, Lee FD, Anderson JH, McKee RF, Finlay IG, Dunlop MG. Long-term cancer risk of the anorectal cuff following restorative proctocolectomy assessed by p53 expression and cuff dysplasia. **Colorectal Dis** 2007; 9:321-7.

Dang DT, Mahatan CS, Dang LH, Agboola IA, Yang VW. Expression of the gut-enriched Krüppel-like factor (Krüppel-like factor 4) gene in the human colon cancer cell line RKO is dependent on CDX2. **Oncogene** 2001; 20:4884-90.

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

Ferreira FO, Ferreira CCN, Rossi BM, et al. Frequency of extra-colonic tumors in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and familial colorectal cancer (FCC) Brazilian families. **Fam Cancer** 2004; 3:41-7.

Friederich P, van Heumen BW, Nagtegaal ID, et al. Increased epithelial cell proliferation in the ileal pouch mucosa of patients with familial adenomatous polyposis. **Virchows Arch** 2007; 451:659-67.

Fruin AB, El-Zammer O, Stucchi AF, O'Brien M, Becker JM. Colonic metaplasia in the ileal pouch is associated with inflammation and is not the result of long-term adaptation. **J Gastrointest Surg** 2003; 7:246-53.

Giardiello FM, Yang VW, Hyland LM, et al. Primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis with sulindac. **N Engl J Med** 2002; 346:1054-9.

Groves CJ, Beveridge G, Swain DJ, et al. Prevalence and morphology of pouch and ileal adenomas in familial adenomatous polyposis. **Dis Colon Rectum** 2005; 48:816-23.

Gu GL, Wang SL, Wei XM, Bai L. Diagnosis and treatment of Gardner syndrome with gastric polyposis: A case report and review of the literature. **World J Gastroenterol** 2008; 14:2121-3.

Gullberg K, Lindforss U, Zetterquist H, et al. Cancer risk assessment in long-standing pouchitis. DNA aberrations are rare in transformed neoplastic pelvic pouch mucosa. **Int J Colorectal Dis** 2002; 17:92-7.

Hamada H, Kurimoto M, Endo S, Ogiichi T, Akai T, Takaku A. Turcot's syndrome presenting with medulloblastoma and familial adenomatous polyposis: a case report and review of the literature. **Acta Neurochir** 1998; 140:631-2.

Humphries A, Wright NA. Colonic crypt organization and tumorigenesis. **Nat Rev Cancer** 2008; 8:415-24.

Iida M, Itoh H, Matsui T, Mibu R, Iwashita A, Fujishima M. Ileal adenomas in postcolectomy patients with familial adenomatosis coli/Gardner's syndrome. Incidence and endoscopic appearance. **Dis Colon Rectum** 1989; 32:1034-8.

Iino H, Simms L, Young J, et al. DNA microsatellite instability and mismatch repair protein loss in adenomas presenting in hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Gut** 2000; 47:37-42.

Jungck M, Grünhage F, Spengler U, et al. E-cadherin expression is homogeneously reduced in adenoma from patients with familial adenomatous polyposis: an immunohistochemical study of E-cadherin, beta-catenin and cyclooxygenase-2 expression. **Int J Colorectal Dis** 2004; 19:438-45.

Kahi CJ, Rex DK. Current and future trends in colorectal cancer screening. **Cancer Metastasis Rev** 2004; 23:137-44.

Kahl-Rainer P, Karner-Hanusch J, Weiss W, Marian B. Five of six protein kinase C isoenzymes present in normal mucosa show reduced protein levels during tumor development in the human colon. **Carcinogenesis** 1994; 15:779-82.

King JE, Dozois RR, Lindor NM, Ahlquist DA. Care of patients and their families with familial adenomatous polyposis. **Mayo Clin Proc** 2000; 75:57-67.

Klein IK, Ritland SR, Burgart LJ, et al. Adenoma-specific alterations of protein kinase C isozyme expression in Apc(MIN) mice. **Cancer Res** 2000; 60:2077-80.

Kocer B, Soran A, Erdogan S, et al. Expression of MUC5AC in colorectal carcinoma and relationship with prognosis. **Pathol Int** 2002; 52:470-7.

Lynch HT, Lynch J. Lynch syndrome: genetics, natural history, genetic counseling, and prevention. **J Clin Oncol** 2000; 18:19S-31S.

Luebeck EG, Moolgavkar SH. Multistage carcinogenesis and the incidence of colorectal cancer. **Proc Natl Acad Sci USA** 2002; 99:15095–100.

Matsukita S, Nomoto M, Kitajima S, et al. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6) in mucinous carcinoma of the breast: comparison with invasive ductal carcinoma. **Histopathology** 2003; 42:26-36.

Merritt AJ, Potten CS, Watson AJ, Loh DY, Nakayama K, Hickman JA. Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia. **J Cell Sci** 1995; 108:2261-71.

Ministério da Saúde. **Estimativa/2008 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2007.

Moskowitz RL, Shepherd NA, Nicholls RJ. An assessment of inflammation in the reservoir after restorative proctocolectomy with ileoanal reservoir. **Int J Colorectal Dis** 1986; 1:167–74.

Moussata D, Nancey S, Lapalus MG, et al. Frequency and severity of ileal adenomas in familial adenomatous polyposis after colectomy. **Endoscopy** 2008; 40:120-5.

Murray NR, Jamieson L, Yu W, et al. Protein kinase C α is required for Ras transformation and colon carcinogenesis in vivo. **J Cell Biol** 2004; 164:797-802.

Nakamori S, Ota DM, Cleary KR, Shirotani K, Irimura T. MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma. **Gastroenterology** 1994; 106:353-61.

Nakamura A, Horinouchi M, Goto M, et al. New classification of pancreatic intraductal papillary-mucinous tumour by mucin expression: its relationship with potential for malignancy. **J Pathol** 2002; 197:201-10.

Nugent KP, Spigelman AD, Nicholls RJ, Talbot IC, Neale K, Phillips RK. Pouch adenomas in patients with familial adenomatous polyposis. **Br J Surg** 1993; 80:1620.

O'Connell JT, Hacker CM, Barsky SH. MUC2 is a molecular marker for pseudomyxoma peritonei. **Mod Pathol** 2002; 15:958-72.

Parc YR, Olschwang S, Desaint B, Schmitt G, Parc RG, Tiret E. Familial adenomatous polyposis: prevalence of adenomas in the ileal pouch after restorative proctocolectomy. **Ann Surg** 2001; 233:360-4.

Perletti G, Marras E, Osti D, Felici L, Zaro S, de Eguileor M. PKC δ requires p53 for suppression of the transformed phenotype in human colon cancer cells. **J Cell Mol Med** 2004; 8:563-9.

Perletti GP, Concari P, Brusaferrri S, Marras E, Piccinini F, Tashjian AH Jr. Protein kinase Cepsilon is oncogenic in colon epithelial cells by interaction with the ras signal transduction pathway. **Oncogene** 1998; 16:3345-8

Pinto-de-Sousa J, David L, Reis CA, Gomes R, Silva L, Pimenta A. Mucins MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6 expression in the evaluation of differentiation and clinico-biological behaviour of gastric carcinoma. **Virchows Arch** 2002; 440:304-10.

Potten CS. The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice. **Cancer Metastasis Rev** 1992; 11:179-95.

Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89:1758-62.

Rossi BM, Lopes A, Ferreira FO, et al. hMLH1 and hMSH2 gene mutation in brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Am Surg Oncol** 2002; 9:555-61.

Silberg DG, Swain GP, Suh ER, Traber PG. Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development. **Gastroenterology** 2000; 119:961-71.

Soini Y, Puhakka A, Kahlos K, et al. Endothelial nitric oxide synthase is strongly expressed in malignant mesothelioma but does not associate with vascular density or the expression of VEGF, FLK1 or FLT1. **Histopathology** 2001; 39:179-86.

Song S, Byrd JC, Koo JS, Bresalier RS. Bile acids induce MUC2 overexpression in human colon carcinoma cells. **Cancer** 2005; 103:1606-14.

Stein CJ, Colditz GA. Modifiable risk factors for cancer. **Br J Cancer** 2004; 90:299-303.

Strate LL, Syngal S. Hereditary colorectal cancer syndromes. **Cancer Causes Control** 2005; 16:201-13.

Tashiro Y, Yonezawa S, Kim YS, Sato E. Immunohistochemical study of mucin carbohydrates and core proteins in human ovarian tumors. **Hum Pathol** 1994; 25:364-72.

Thompson-Fawcett MW, Marcus V, Redston M, Cohen Z, McLeod RS. Risk of dysplasia in long-term ileal pouches and pouches with chronic pouchitis. **Gastroenterology** 2001a; 121:275-81.

Thompson-Fawcett MW, Marcus VA, Redston M, Cohen Z, Mcleod RS. Adenomatous polyps develop commonly in the ileal pouch of patients with familial adenomatous polyposis. **Dis Colon Rectum** 2001b; 44:347-53.

Tonelli F, Valanzano R, Monaci I, Mazzoni P, Anastasi A, Ficari F. Restorative proctocolectomy or rectum-preserving surgery in patients with familial adenomatous polyposis: results of a prospective study. **World J Surg** 1997; 21:653-8.

Tzouvala M, Lazaris AC, Papatheodoridis GV, et al. Potential role of apoptosis and apoptotic regulatory proteins in colorectal neoplasia: correlations with clinico-pathological parameters and survival. **Dig Dis Sci** 2008; 53:451-60.

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.

van Duijvendijk P, Vasen HF, Bertario L, et al. Cumulative risk of developing polyps or malignancy at the ileal pouch-anal anastomosis in patients with familial adenomatous polyposis. **J Gastrointest Surg** 1999; 3:325-30.

Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. **Gastroenterology** 1999; 116:1453-6.

Vasen HFA, Mecklin J-P, Meera Khan P, Lynch HT. The International Collaborative Group on hereditary nonpolyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC) **Dis Col Rectum** 1991; 34:424-5

Velcich A, Yang W, Heyer J, et al. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. **Science** 2002; 295:1726-9.

Vuilleumier H, Halkic N, Ksontini R, Gillet M. Columnar cuff cancer after restorative proctocolectomy for familial adenomatous polyposis. **Gut** 2000; 47:732-4.

Walker M, Radley S. Adenocarcinoma in an ileoanal pouch formed for ulcerative colitis in a patient with primary sclerosing cholangitis and a liver transplant: report of a case and review of the literature. **Dis Colon Rectum** 2006; 49:909-12.

Weichert W, Gekeler V, Denkert C, Dietel M, Hauptmann S. Protein kinase C isoform expression in ovarian carcinoma correlates with indicators of poor prognosis. **Int J Oncol** 2003; 23:633-9.

Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW. Colorectal Cancer. **Lancet** 2005; 365:153-65.

Wu JS, McGannon EA, Church JM. Incidence of neoplastic polyps in the ileal pouch of patients with familial adenomatous polyposis after restorative proctocolectomy. **Dis Colon Rectum** 1998; 41:552-6.

Yamamoto T, Umegae S, Kitagawa T, Matsumoto K. The impact of the fecal stream and stasis on immunologic reactions in ileal pouch after restorative proctocolectomy for ulcerative colitis: a prospective, pilot study. **Am J Gastroenterol** 2005; 100:2248-53.

ANEXOS

Anexo 1 – Ficha de Registro de Dados

FICHA DE PACIENTES - FAP

NOME: _____

ENDEREÇO: _____

TEELFONE: _____

RGH: ____ . ____ - ____

DATA DE NASCIMENTO : ____ / ____ / ____

SEXO: () FEMININO () MASCULINO

DATA DA CIRURGIA: ____ / ____ / ____

ANÁTOMOPATOLÓGICO:

PEÇA: ____ - ____

ILEOSTOMIA: ____ - ____

PÓLIPOS: ____ - ____

TUMORES EXTRA-COLÔNICOS:

() SIM () NÃO

QUAL ? _____

PÓLIPOS PÓS-CIRURGIA:

() SIM () NÃO

NÚMERO DE EVACUAÇÕES DIÁRIAS: __ __

QUIMIOTERAPIA:

() SIM () NÃO

ESQUEMA: _____

USO DE AINH:

() SIM () NÃO

TEMPO: __ __ MESES

Anexo 2 – Termo de Consentimento Informado

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – Resolução N. 196/96 e resolução CNS 252/97 do Ministério da Saúde)

PROJETO: Mudança tardia de expressão fenotípica em mucosa ileal após proctocolectomia total em paciente portadores de polipose adenomatosa familiar

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME DO PACIENTE: _____

Sexo: ☐ masculino ☐ feminino Data de nascimento: ____/____/____

Documento de identidade n.: _____

Endereço: _____

Número: _____ Complemento: _____

Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ TEL: _____

RESPONSÁVEL: _____

Sexo: ☐ masculino ☐ feminino Data de nascimento: ____/____/____

Documento de identidade n.: _____

Endereço: _____

Número: _____ Complemento: _____

Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ TEL: _____

II. OBJETIVOS DO ESTUDO

Você foi convidado a participar deste estudo, pois sua família é portadora polipose adenomatosa familiar e foi operado neste hospital. O objetivo deste estudo é avaliar as mudanças tardias no tecido do intestino fino, que foi colocado como um reservatório no lugar do intestino grosso durante a cirurgia para tratamento da polipose.

III. PROCEDIMENTOS

Após a assinatura deste consentimento (autorização para o estudo), você será encaminhado para um exame de retossigmoidoscopia - exame com aparelho que possibilita ver o intestino delgado usado como reservatório. Neste exame serão realizadas biópsias (retirada de um pedaço de tecido) do tecido normal e de possíveis alterações encontradas durante o exame, que serão encaminhadas para exame anatomopatológico (exame do microscópio). Esta biópsia será feita independente do resultado encontrado no exame de retossigmoidoscopia. Depois do exame anatomopatológico, será realizada imunoistoquímica das biópsias. A imunoistoquímica é um exame realizado no tecido retirado durante exame que pode identificar mudanças sofridas pelas células através de uma coloração especial.

IV - BENEFÍCIOS

A participação estudo pode identificar possíveis mudanças no tecido do reservatório intestinal, que pode ajudar em um seguimento clínico melhor; também pode ajudar aos médicos a compreender as mudanças após o tratamento cirúrgico realizado.

V - RISCOS

Os riscos associados com sua participação nesse estudo estão relacionados ao exame de retossigmoidoscopia: sangramento, cólica, incômodo abdominal. Este exame de retossigmoidoscopia já faz parte da sua rotina normal de seguimento, não sendo necessário custo adicional para você.

Confidencialidade:

A confidencialidade das suas informações será mantida. Apenas as pessoas envolvidas diretamente nesse estudo poderão verificar as informações se necessário. Seu nome e informações pessoais não serão incluídos em nenhum outro estudo de pesquisa que possa fazer uso do pedaço de tecido retirado durante o exame.

A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se do estudo a qualquer momento. Sua recusa ou desistência não irá prejudicar o tratamento.

A identidade dos pacientes será preservada, sendo que somente os membros da equipe médica e da Comissão de Ética terão acesso aos registros.

Qualquer dúvida sobre o estudo, você poderá entrar em contato com doutora Mireille Darc Cavalcante Brandão no telefone 2189 5000 ramal 2304. Se o pesquisador principal não fornecer as informações/esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Coordenador do Comitê de Ética do Hospital do Câncer – SP, pelo telefone 2189-5020.

Declaro que fui esclarecido: sobre os procedimentos, riscos e benefícios sobre este estudo; que tenho liberdade em retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo a continuidade do meu tratamento; que não haverá remuneração financeira para este estudo; a minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial. Concordo em participar deste estudo.

São Paulo, ____ de _____ de ____.

Assinatura do paciente ou responsável/representante local

Assinatura do pesquisador ou representante

Anexo 3

Porcentagem de intensidade de expressão nas amostras de íleo, cólon e bolsa ileal de acordo com os marcadores.

TECIDOS	MARCADORES	COX2		APC		Beta-Catenina		K-ras		p53		bcl2		CDX2	
		I	%	I	%	I	%	I	%	I	%	I	%	I	%
TECIDOS	íleo	Neg	-	Neg	-	Neg	-	Neg	-	Neg	-	Neg	-	Neg	14%
		Fra	100%	Fra	100%	Fra	100%	Fra	57%	Fra	100%	Fra	100%	Fra	43%
		Mod	-	Mod	-	Mod	-	Mod	43%	Mod	-	Mod	-	Mod	29%
		For	-	For	-	For	-	For	-	For	-	For	-	For	14%
	cólon	Neg	-	Neg	14%	Neg	-	Neg	-	Neg	29%	Neg	-	Neg	14%
		Fra	100%	Fra	29%	Fra	100%	Fra	71%	Fra	71%	Fra	100%	Fra	72%
		Mod	-	Mod	57%	Mod	-	Mod	29%	Mod	-	Mod	-	Mod	-
		For	-	For	-	For	-	For	-	For	-	For	-	For	14%
	bolsa ileal	Neg	-	Neg	-	Neg	-	Neg	-	Neg	14%	Neg	-	Neg	-
		Fra	100%	Fra	71%	Fra	100%	Fra	86%	Fra	71%	Fra	100%	Fra	-
		Mod	-	Mod	29%	Mod	-	Mod	14%	Mod	-	Mod	-	Mod	-
		For	-	For	-	For	-	For	-	For	14%	For	-	For	100%

I = intensidade de expressão; % porcentagem de expressão; Neg = negativo; Fra = fraca; Mod = moderada, For = forte