



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

JOÃO PAULO AGUIAR SAMPAIO

**IMUNOEXPRESSÃO DE CADERINA-E NO CÂNCER COLORRETAL PRIMÁRIO E
NAS METÁSTASES LINFONODAIS**

FORTALEZA
2013

JOÃO PAULO AGUIAR SAMPAIO

IMUNOEXPRESSÃO DE CADERINA-E NO CÂNCER COLORRETAL PRIMÁRIO E NAS
METÁSTASES LINFONODAIS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida (UFC)

FORTALEZA
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- S183i Sampaio, João Paulo Aguiar.
Imunoexpressão de caderina-E no câncer colorretal primário e nas metástases linfonodais. / João Paulo Aguiar Sampaio. – 2013.
66 f. : il. color., enc. : 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Mestrado em Patologia, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Oncologia.
Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida.
1. Neoplasias Colorretais. 2. Caderinas. 3. Transição Epitelial-Mesenquimal. I. Título.

CDD 616.994347

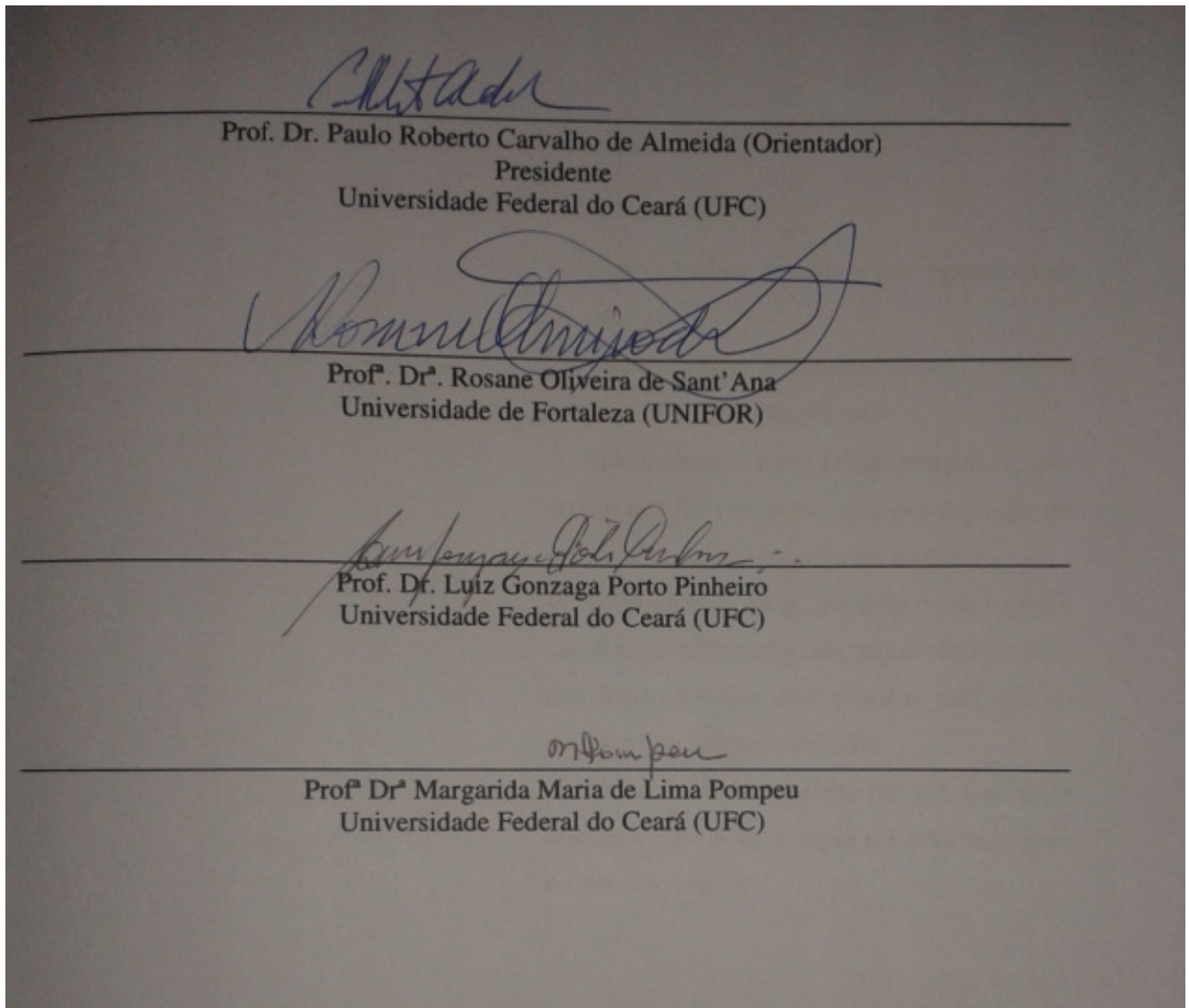
JOÃO PAULO AGUIAR SAMPAIO

IMUNOEXPRESSÃO DE CADERINA-E NO CÂNCER COLORRETAL PRIMÁRIO E
NAS METÁSTASES LINFONODAIS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de Concentração: Oncologia

Aprovada em: 24/07/2013

BANCA EXAMINADORA



A Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de estar aqui.

Ao meu irmão Eduardo Reges Pinheiro Bezerra Filho (*In memoriam*).

À minha amada avó, Dona Margarida, por tudo o que fez por mim e que, por mais que eu possa fazer, nunca conseguirei retribuir.

À minha esposa, Anny, por todo o seu suporte, carinho, compreensão, encorajamento e ajuda que foram *conditio sine qua non* para que eu pudesse concluir este trabalho.

À minha mãe, Margarida, por ter sido uma mãe exemplar e ter sempre me orientado para os bons caminhos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Paulo Roberto Carvalho de Almeida**, pela sua generosidade, pela sua compreensão, por ter me conferido a oportunidade ímpar de ser seu orientando, pelos ensinamentos acadêmicos, filosóficos e por ser um exemplo a ser seguido como professor, pesquisador e como ser humano.

Ao grande amigo que fiz nesse mestrado, **José Roosevelt Cavalcante**, pelas inúmeras horas de agradável conversa e companhia, pelas brincadeiras e pelo total apoio que me deu nessa árdua caminhada.

Aos membros da banca examinadora, **Prof^ª. Dr^ª. Margarida Maria de Lima Pompeu**, **Prof. Dr. Luiz Gonzaga Porto Pinheiro**, **Prof^ª. Dr^ª. Rosane Oliveira de Sant'Ana**, e aos suplentes **Dr. Markus Andret Cavalcante Gifoni** e **Prof. Dr. José Telmo Valença Júnior**, pela aceitação e disponibilidade de participar e contribuir para o melhoramento deste trabalho.

Ao Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer, especialmente na pessoa do **Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro** e do **Prof. Dr. Roberto Cesar Pereira Lima Júnior**.

Aos recém-adquiridos amigos e colegas, estudantes de Medicina da Universidade Federal do Ceará, **João Tarcísio Alves Maia Filho** e **Renato Braga Vieira** pela inestimável participação na seleção de peças para a pesquisa e na confecção do *Tissue microarray*.

Aos servidores do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, **Cássia Lilian Soares de Almeida**, **Francisco José Oliveira de Queiroz**, **Igor Chalderst Gomes da Silva**, **José Saliésio de Moraes Freitas**, **Luiz Duarte de Menezes** e **Mila Maria Teixeira Aragão** que tanto colaboraram para a concretização deste projeto.

À servidora **Débora Rejane Alves Cavalcante** e à bolsista **Ana Graziely Alves Cavalcante**, que me prestaram um auxílio fundamental no processo de confecção do *Tissue Microarray*.

A duas servidoras em especial, **Paula da Paz Palácio**, que sempre me ajudou da melhor forma possível nas mais diversas ocasiões e **Susana Moreira Souza**, pelo seu trabalho criterioso e competente na realização da imunohistoquímica.

Ao servidor **Alceu Machado de Sousa** pela sua valiosa contribuição na microtomia do *Tissue Microarray*.

“A arte é longa, a vida é curta, a ocasião fugidia, a experiência é enganadora e o juízo dificultoso”

Hipócrates

RESUMO

A Caderina-E está intimamente relacionada com a transição epitelial-mesenquimal e com a progressão tumoral em muitos tipos de câncer, inclusive no câncer colorretal. O objetivo deste trabalho foi avaliar a imunexpressão de Caderina-E no câncer colorretal primário e nas respectivas metástases linfonodais, na mucosa colônica normal, e investigar possíveis correlações desta expressão com parâmetros clinicopatológicos. Setenta e sete casos de colectomias por carcinoma colorretal e dez casos de linfonodos metastáticos, dos arquivos do Departamento de Patologia e Medicina Legal/Universidade Federal do Ceará, foram utilizados. Realizou-se o Tissue Microarray e imunohistoquímica, com anticorpo monoclonal anti-Caderina-E. Foram avaliados os seguintes escores: 0 = ausência de expressão; 1 = expressão citoplasmática; 2 = expressão mista (citoplasmática e membranar); 3 = expressão membranar pura. Foi utilizada tanto a classificação proposta por Jawhari et al., agrupando os casos em expressão anormal (escores 0, 1 e 2) e expressão normal (escore 3), como os critérios propostos por Almeida et al., agrupando os casos como expressão não-membranar (escores 0 e 1) e expressão membranar (escores 2 e 3). Os tumores primários tiveram mais casos de expressão de Caderina-E anormal em comparação com a mucosa normal ($p < 0.0001$). Não houve diferença significativa entre expressão de Caderina-E no tumor intestinal e em metástases linfonodais, embora nestas a expressão membranar tenha sido mais frequente do que no sítio primário. Tumores de células agrupadas apresentaram maior expressão de Caderina-E membranar do que os de células isoladas, tanto utilizando a classificação de Jawhari et al. ($p = 0.0230$), como os critérios propostos por Almeida et al. ($p = 0.0043$). Em conclusão, a expressão anormal de Caderina-E no tumor primário, com persistência frequente da imunomarcagem membranar associada à marcação citoplasmática (marcação anormal heterogênea ou mista), reforça as evidências de que esta alteração no câncer é mais qualitativa do que propriamente quantitativa. O predomínio da expressão membranar no sítio primário da neoplasia e na metástase, com ou sem expressão citoplasmática associada, principalmente em tumores de células agrupadas, sugere que a presença da Caderina-E é essencial para a invasão local e progressão tumoral, em oposição ao clássico paradigma de que a progressão tumoral se exacerba com a perda desta molécula de adesão.

Palavras-chave: Neoplasias colorretais. Caderinas. Transição epitelial-mesenquimal.

ABSTRACT

E-cadherin is closely related to epithelial-mesenchymal transition and tumor progression in many cancers, including colorectal cancer. The aim of this study is to evaluate the expression of E-cadherin in primary colorectal cancer as well as in lymph node metastasis, establishing also a comparison with the expression of E-cadherin in normal colonic mucosa. We utilized 77 cases of colectomies for colorectal carcinoma and 10 cases of metastatic lymph nodes from the files of the Department of Pathology and Forensic Medicine/Federal University of Ceara. Tissue microarray and immunohistochemistry were performed with monoclonal anti-E-cadherin, evaluated using the following scores: 0 = no staining; 1 = cytoplasmic staining; 2 = mixed staining (cytoplasmic and membranous); 3 = membranous staining. It was used the classification proposed by Jawahri *et al.* which includes cases of abnormal expression (0, 1 and 2 scores) and cases of normal expression (3 score), and was also used the classification proposed by Almeida *et al.* which includes cases of non-membranous expression (0 and 1 scores) and membranous expression (2 and 3 scores). Primary tumors presented more cases of abnormal E-cadherin expression in comparison to normal colonic mucosa ($p < 0.0001$). There were no differences between E-cadherin expression in the primary tumor in comparison to lymph node metastasis. The grouped cell tumors showed increased expression of E-cadherin in comparison to isolated cell tumors, either using the classification proposed by Jawhari *et al.* ($p = 0.0230$) and the classification proposed by Almeida *et al.* ($p = 0.0043$). In conclusion, abnormal expression of E-cadherin in the primary tumor, with frequent membranar immunostaining associated with the cytoplasmic marking (abnormal heterogeneous or mixed staining), reinforces the evidence that E-cadherin expression change in cancer is more qualitative than quantitative. The predominance of membranar expression in primary tumor and lymph node metastasis, with or without associated cytoplasmatic expression, particularly in cell-grouped tumors, suggests that E-cadherin presence is essential for local invasion and tumor progression, as opposed to the classical paradigm that tumor progression is exacerbated by the loss of this adhesion molecule.

Keywords: Colorectal neoplasms. Cadherins. Epithelial-mesenchymal transition.

LISTA DE FIGURAS

1	Técnica para a construção do <i>tissue microarray</i>	29
2	Gráfico de recuperação antigênica – <i>Dako</i> [®] <i>PT Link</i>	30
3	Imunoexpressão de Caderina-E: Controle positivo.....	34
4	Imunoexpressão de Caderina-E: Controle positivo - detalhe.....	35
5	Imunoexpressão de Caderina-E: Controle negativo.....	35
6	Imunoexpressão de Caderina-E: Controle positivo interno.....	36
7	Imunoexpressão de Caderina-E no carcinoma colorretal e na mucosa colônica normal.....	39
8	Imunoexpressão de Caderina-E em células agrupadas de padrão glandular e padrão “em blocos” de carcinoma colorretal.....	40
9	Imunoexpressão de Caderina-E em mucosa colônica normal.....	40
10	Imunoexpressão de Caderina-E em metástase linfonodal de carcinoma colorretal.....	42
11	Imunoexpressão de Caderina-E em linfonodo normal.....	42
12	Imunoexpressão de Caderina-E no carcinoma colorretal primário em células agrupadas e em células isoladas (classificação de Jawhari <i>et al.</i>).....	44
13	Imunoexpressão de Caderina-E no carcinoma colorretal primário em células agrupadas e em células isoladas (Critério de Almeida <i>et al.</i>).....	45
14	Imunoexpressão de Caderina-E em células isoladas de carcinoma colorretal.....	46
15	Imunoexpressão de Caderina-E em células agrupadas com padrão “em blocos” e em células isoladas de carcinoma colorretal.....	46
16	Imunoexpressão membranar de Caderina-E: corte tangencial em carcinoma colorretal.....	47
17	Imunoexpressão de Caderina-E em células agrupadas de padrão glandular de carcinoma colorretal.....	48
18	Imunoexpressão de Caderina-E em células isoladas do tipo “anel de sinete” de carcinoma colorretal.....	48
19	Imunoexpressão membranar e citoplasmática de Caderina-E em células neoplásicas de carcinoma colorretal.....	49

LISTA DE QUADROS

1	Superfamília das Caderinas.....	21
2	Desenho Metodológico: Construção do <i>Tissue microarray</i> e imunohistoquímica.....	32

LISTA DE TABELAS

1	Imunoexpressão de Caderina-E no tumor primário e variáveis clínico-patológicas.....	37
2	Imunoexpressão de Caderina-E no carcinoma colorretal primário, em linfonodos metastáticos, em mucosa normal colônica e em linfonodo normal.....	38
3	Imunoexpressão de Caderina-E no carcinoma colorretal e na mucosa normal (Jawhari <i>et al.</i>).....	38
4	Imunoexpressão de Caderina-E no carcinoma colorretal e na mucosa normal (Almeida <i>et al.</i>).....	39
5	Imunoexpressão de Caderina-E em células neoplásicas de carcinoma colorretal primário e nas metástases linfonodais (critério de Jawhari <i>et al.</i>).....	41
6	Imunoexpressão de Caderina-E em células neoplásicas de carcinoma colorretal primário e nas metástases linfonodais (critério de Almeida <i>et al.</i>).....	41
7	Imunoexpressão de Caderina-E no carcinoma colorretal de acordo com o padrão histológico de invasividade no tumor primário.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Caderina	<i>Calcium-Dependent Adherence Protein</i>
CCHNP	Carcinoma Colorretal Hereditário Não Polipóide
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DPML	Departamento de Patologia e Medicina Legal
Erb	<i>Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene</i>
HE	Hematoxilina-Eosina
IC	Intervalo de Confiança
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	Kilodalton (unidade de peso molecular)
Myc	<i>Myelocytomatosis Viral Oncogene</i>
PAF	Polipose Adenomatosa Familiar
RAS	<i>Rat Sarcoma</i>
rpm	Rotações por minuto
TEM	Transição Epitelial-Mesenquimal
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
W	<i>Watt</i> (unidade de potência)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Câncer colorretal.....	13
1.2	Carcinogênese e progressão tumoral.....	16
1.3	Transição epitelial-mesenquimal.....	19
1.4	Caderinas.....	20
1.5	Caderina-E.....	22
1.6	Caderina-E e carcinoma colorretal.....	24
2	OBJETIVOS.....	26
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1	Casos e material utilizado.....	27
3.2	<i>Tissue microarray</i>	27
3.3	Imunohistoquímica.....	29
3.4	Escores	32
3.5	Controles.....	33
3.6	Avaliação intra- e inter-observadores.....	33
3.7	Análise estatística.....	33
3.8	Aprovação no comitê de ética e pesquisa com seres humanos.....	33
4	RESULTADOS.....	34
4.1	Controles.....	34
4.2	Imunomarcção.....	36
4.3	Expressão de Caderina-E nas células neoplásicas do carcinoma colorretal em comparação com o epitélio da mucosa normal.....	38
4.4	Expressão de Caderina-E nas células neoplásicas do carcinoma colorretal em comparação com as células neoplásicas das metástases linfonodais.....	41
4.5	Expressão de Caderina-E de acordo com o padrão histológico do tumor primário (células agrupadas padrão glandular, agrupadas padrão em blocos e células isoladas).....	43
5	DISCUSSÃO.....	50

6 CONCLUSÕES.....	56
--------------------------	-----------

REFERÊNCIAS.....	57
-------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Colorretal

O Câncer Colorretal é o terceiro câncer mais comum e representa a quarta causa de morte por câncer no mundo, com mais de um milhão de casos novos e seiscentos mil óbitos por ano (PATEL; AHNEN, 2012; HAQ *et al.*, 2012). Esse tipo de câncer é mais comum nos países desenvolvidos, no entanto, a sobrevida em cinco anos, que chega a sessenta por cento dos pacientes nos Estados Unidos, não ultrapassa os quarenta por cento nos países em desenvolvimento (WEITZ *et al.*, 2005)

No Brasil, a estimativa é de que, no ano de 2012, houve o aparecimento de 30.140 novos casos de Câncer Colorretal, sendo 14.180 em homens e 15.690 em mulheres. Estima-se também que, no ano de 2012, no Brasil, houve 13.344 mortes por Câncer Colorretal, sendo 6.452 mortes em homens e 6.892 mortes em mulheres. (INCA, 2012).

O crescimento populacional e o aumento da expectativa de vida são fatores que propiciam um aumento no aparecimento das neoplasias malignas em geral e são esperados cerca de quinze milhões de novos casos de câncer e cerca de dez milhões de mortes por câncer até 2020 (YUSOF; ISA; SHAH, 2012).

O desenvolvimento do câncer colorretal está relacionado com a predisposição genética do indivíduo e também com fatores ambientais. Os principais fatores de risco incluem história familiar de câncer colorretal, dieta pobre em fibras e folato e rica em gorduras e carne vermelha, tabagismo, sedentarismo, obesidade, diabetes e doença inflamatória intestinal (AL-SOHAILY *et al.*, 2012; DYSON; RUTTER, 2012).

A maioria dos carcinomas colorretais se desenvolve a partir de pólipos adenomatosos. Os pólipos adenomatosos são lesões benignas, porém, com potencial de malignidade, tanto que cinco por cento desses pólipos irão progredir para tumores malignos em um intervalo de cinco a dez anos. A localização anatômica mais comum dos cânceres colorretais é no reto, seguida pelo colo sigmóide e o restante é igualmente distribuído entre o colo ascendente, transverso e descendente (LYALL *et al.*, 2011).

Dentre as neoplasias malignas, o câncer colorretal é um dos que apresenta a maior influência de alterações genéticas no seu desenvolvimento. Cerca de noventa e cinco por cento destes tumores são do tipo esporádico, ou seja, casos de aparecimento em indivíduos sem uma história familiar da doença, sendo que neste caso as mutações genéticas que dão

origem ao processo de carcinogênese ocorrem em células somáticas. Os cânceres colorretais familiares representam cerca de cinco por cento do total e incluem o Carcinoma Colorretal Hereditário Não Polipoide (CCHNP - síndrome de Lynch) e as síndromes de polipose familiar como a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) e suas variantes, a Síndrome de Peutz-Jeghers e a Síndrome de Polipose Juvenil (CENTELLES, 2012).

A síndrome de Lynch é a forma mais comum de câncer colorretal na forma hereditária e é caracterizada por uma herança autossômica dominante com um padrão de penetrância de oitenta e cinco a noventa por cento (SCHNEIDER *et al.*, 2012). Esta síndrome está relacionada com o aparecimento de diversos tipos de tumores, em especial o câncer colorretal e o câncer endometrial. No caso do câncer colorretal, os tumores são mais frequentes do lado direito (BANNO *et al.*, 2012).

A alteração molecular conhecida como instabilidade de microssatélites está estreitamente relacionada com a síndrome de Lynch. Os microssatélites são regiões do genoma onde ocorrem várias repetições, em geral, de dois a seis pares de bases, ao longo da fita de DNA. Algumas mutações como deleções e inserções nestas regiões de repetição de nucleotídeos geram a instabilidade que sinaliza uma predisposição genômica a este tipo de neoplasia (BOLAND; GOEL, 2010).

A Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) é a segunda causa mais comum de câncer colorretal hereditário e se caracteriza pelo desenvolvimento de centenas de pólipos adenomatosos benignos no começo da adolescência, e esses indivíduos, se não forem submetidos a tratamento, inevitavelmente desenvolvem carcinoma colorretal. Geralmente, o diagnóstico de câncer se dá em torno dos quarenta anos de idade nestes pacientes (LEE *et al.*, 2006; JASPERSON *et al.*, 2010).

A base genética da PAF consiste em mutações no gene supressor tumoral APC e a síndrome possui algumas variantes como a Síndrome de Gardner, onde além dos pólipos colônicos, verifica-se a presença de osteomas de mandíbula e tumores desmóides, bem como a síndrome de Turcot, onde há a presença de tumores primários do sistema nervoso central (JASPERSON *et al.*, 2010; PATEL; AHNEN, 2012).

A despeito da existência dessas síndromes hereditárias, o câncer esporádico representa a grande maioria dos cânceres colorretais, conforme relatado anteriormente. Esse tipo de câncer se desenvolve através de alterações genéticas sucessivas, em um processo conhecido como sequência adenoma – carcinoma. As mutações mais observadas são nos genes APC, K – RAS e P53 (CAPPELL, 2008).

Com relação ao tipo histológico, mais de noventa por cento dos cânceres colorretais são adenocarcinomas, tumores que se originam do epitélio que reveste a mucosa colônica. Os tumores mais bem diferenciados tendem a se apresentar em padrão de células agrupadas, em glândulas ou em blocos, enquanto que os tumores menos diferenciados se apresentam, geralmente, em um padrão de células isoladas. A maioria dos adenocarcinomas colorretais, contudo, cerca de setenta por cento, é diagnosticada como tumores de diferenciação intermediária. Tipos raros de tumores colorretais incluem neoplasias neuroendócrinas, carcinomas de células escamosas e carcinomas indiferenciados. (FLEMING *et al.*, 2012).

Alguns fatores são bem conhecidos como determinantes do prognóstico no câncer colorretal. Características como o tamanho do tumor, tipo e subtipo histológico, presença de células em anel de sinete, grau de diferenciação do tumor, bem como a presença de invasão linfática, invasão vascular e comprometimento de linfonodos são fatores bem estabelecidos como determinantes do desfecho clínico e da sobrevida no câncer colorretal (BOLOCAN *et al.*, 2012).

Nesse sentido, um aspecto relevante a se observar com relação ao carcinoma colorretal é quanto à presença de metástases. O carcinoma colorretal pode originar tanto metástases regionais, para os linfonodos, como também metástases por via hematogênica para outros órgãos. O fígado é o sítio mais comum de metástases de carcinoma colorretal e cerca de um terço dos pacientes terão metástases hepáticas (ISMAILI, 2011).

As metástases podem estar presentes no momento do diagnóstico (sincrônicas) ou surgir no decorso da doença (metacrônicas). A presença de metástases no fígado está associada com um prognóstico bem pior e a sobrevida de pacientes não tratados nesses casos varia de seis a doze meses (SLESSER *et al.*, 2012). Podem ocorrer também metástases para os pulmões, ossos, cérebro e glândula adrenal (HATOUM *et al.*, 2011; WANEBO *et al.*, 2012).

Os sintomas mais comuns na apresentação clínica do câncer colorretal são: dor abdominal, sangramento retal, alteração de hábito intestinal e perda de peso involuntária (CAPPEL, 2005). Sintomas menos comuns incluem náuseas, vômitos, anorexia e distensão abdominal. Sintomas podem variar com a localização do tumor no intestino grosso, sendo que os tumores do lado esquerdo são mais propensos a causar obstrução, tendo em vista o diâmetro menor do colo esquerdo comparado com o colo direito. Os cânceres do lado direito são mais propensos a sangramento (BAZENSKY; SHOOBRIDGE-MOORAN; YODER, 2007; ADELSTEIN *et al.*, 2011).

Com relação ao tratamento, o procedimento cirúrgico para ressecção do tumor colônico, acompanhado da linfadenectomia regional, é o tratamento principal, bem como o tratamento cirúrgico para remoção de metástases. Para pacientes em estágios mais avançados indica-se também a quimioterapia isolada ou associada com a radioterapia. A quimioterapia pode ser indicada antes da cirurgia para melhorar as condições de ressecabilidade, quando é chamada de quimioterapia neoadjuvante, ou após a cirurgia para diminuir a chance de aparecimento de metástases, quando é chamada de quimioterapia adjuvante (PAWLIK; COSGROVE, 2011; SIEGEL *et al.*, 2012).

A prevenção do câncer colorretal envolve a adoção de uma dieta rica em fibras, controle de peso, alimentação balanceada e estudos mostraram redução da incidência de câncer colorretal com o uso continuado de aspirina e antiinflamatórios não esteroidais (CAPPELL, 2008; JANKOWSKI; HUNT, 2008; COOPER *et al.*, 2010). Adicionalmente, diversas diretrizes (*guidelines*) recomendam o rastreamento (*screening*) do câncer colorretal a partir dos cinquenta anos e os exames disponíveis são o teste de sangue oculto nas fezes, retossigmoidoscopia, colonoscopia, enema baritado e tomografia computadorizada (QASEEM, 2012).

1.2. Carcinogênese e Progressão Tumoral

Alguns genes estão diretamente associados com o processo da carcinogênese. Inicialmente temos os protooncogenes que, ao sofrerem mutações, dão origem aos oncogenes, e estes últimos produzem fatores de crescimento de forma indefinida, propiciando divisões celulares descontroladas. Como exemplo de oncogenes, temos: *K-RAS*, *N-RAS*, *c-myc*, *erb-B-2*. Já os genes supressores tumorais são genes que expressam proteínas que inibem o crescimento celular descontrolado e as mutações inativam esses genes. Como exemplo, temos o gene APC. Outra importante categoria de genes são os genes reguladores de apoptose, sendo o mais importante o gene P53, também conhecido como guardião do genoma, que tem uma função importantíssima no reparo de DNA e também na indução de apoptose em células que sofreram mutações irreversíveis (CIVETTA; CIVETTA, 2011).

Os mecanismos pelos quais um câncer se origina são complexos e, ainda hoje, não são totalmente esclarecidos. Vários modelos foram sugeridos ao longo do tempo (VINEIS; SCHATZKIN; POTTER, 2010). O primeiro grande modelo foi o modelo centrado nas mutações a partir de agentes carcinogênicos presentes no meio externo, radiações e vírus. Para este modelo, a ocorrência de uma dada mutação e, conseqüentemente, de aparecimento de um

tumor, é diretamente proporcional à exposição a um determinado fator carcinógeno (ARMITAGE; DOLL, 1954).

O segundo modelo teve como marco a teoria desenvolvida por *Knudson* para explicar a carcinogênese do retinoblastoma, um tumor raro em crianças, onde o desenvolvimento do tumor apenas é observado quando ocorre a mutação nos dois genes que codificam a proteína do retinoblastoma. Essa descoberta formou a base da famosa hipótese dos dois passos (*two-hit hypothesis*), ou seja, no caso de genes supressores tumorais, como o gene da proteína do retinoblastoma, o tumor se desenvolve através de duas etapas: o indivíduo herda um dos genes já com a mutação e, posteriormente, ocorre a mutação no outro alelo, ou ambas as mutações ocorrem na linhagem somática, dando assim origem ao câncer (LOHMANN *et al.*, 1997; KNUDSON, 2005).

Um terceiro modelo leva em consideração fatores de risco moduladores de câncer como dieta, obesidade, hormônios e resistência à insulina. Esses fatores, ao invés de causar mudanças estruturais no DNA, atuam causando mudanças funcionais, o que ficou conhecido como fenômeno epigenético (ESTELLER, 2008).

Um quarto modelo é conhecido como modelo darwiniano, segundo o qual a carcinogênese ocorre através de seleção natural. O processo de tumorigênese para essa teoria é resultado de uma loteria, ou seja, nem todas as mutações evoluem para um câncer, pois, a maioria das células que apresenta mutações não escapa dos mecanismos de controle (mecanismos de reparo no DNA, sistema de imunovigilância). O desenvolvimento de câncer para essa teoria é um evento de probabilidade, onde um clone de células com mutações, por seleção natural, escapa dos mecanismos de controle e se divide indefinidamente (GREAVES, 2007).

Um trabalho clássico e muito citado por pesquisadores em todo o mundo foi o publicado por Hanahan e Weinberg, que estabeleceu as seis marcas da carcinogênese e da progressão tumoral, a saber: auto-suficiência da célula tumoral em produzir fatores de crescimento, insensibilidade aos inibidores de fatores de crescimento, capacidade de se evadir da apoptose, capacidade ilimitada de replicação celular, angiogênese sustentada e invasão tissular e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Posteriormente, surgiram evidências que mostraram que o tecido normal ao redor do tumor não é inerte, mas que, pelo contrário, as células do tecido conjuntivo e moléculas produzidas nesse tecido têm participação direta no processo de carcinogênese, estimulando o crescimento do tumor primário e favorecendo o processo de progressão tumoral, migração celular e formação de metástases. Em 2009, Collota *et al.* publicaram um trabalho onde

descreveram a sétima marca do câncer, que é justamente esse microambiente tumoral (COLLOTA *et al.*, 2009).

Após a formação do tumor primário, o processo de progressão tumoral evolui com a invasão da membrana basal e crescimento das células em direção ao tecido conjuntivo, destacamento de células tumorais a partir do tumor primário e migração dessas células pela matriz extracelular até os vasos, entrada das células nos vasos, um processo conhecido como intravasão, migração das células pela corrente sanguínea ou linfática e saída de células tumorais dos vasos e entrada em outros tecidos, um processo conhecido como extravasão. Chegando aos novos tecidos e órgãos, estas células se reagrupam e ocorre um processo simultâneo de neoformação vascular e de proliferação celular, dando origem às metástases. (WEINBERG, 2008; SLEEMAN, 2012; LANGHEINRICH *et al.*, 2012).

A presença de metástases é a principal causa de morte relacionada ao câncer. Estudos *in vitro* demonstraram que as células tumorais isoladas das metástases são genética e fenotipicamente diferentes das células neoplásicas do tumor primário. A principal teoria é a de que algumas células do tumor primário adquirem mutações diferenciadas, gerando um subclone de células com potencial de metastatização, ou seja, esse subclone de células seria portador de uma “assinatura metastática” (PANTEL; BRAKENHOFF, 2004).

Felizmente, o processo metastático, de uma forma geral, é bastante ineficiente, porquanto apenas um pequeno potencial de células metastáticas consegue progredir com sucesso por todas as etapas necessárias ao desenvolvimento das metástases. Estas células precisam sobreviver às forças de cisalhamento na corrente sanguínea e extravasar para os órgãos secundários, iniciando assim o processo de formação de micrometástases, e ainda dependem da eficiência do processo de vasculogênese e angiogênese no novo órgão (MACDONALD; GROOM; CHAMBERS, 2002).

Alguns tumores mostram um padrão específico de metástases para determinados órgãos secundários. Em 1889, Stephen Paget, analisando o padrão de distribuição de metástases no câncer de mama, propôs a teoria do solo e da semente, sugerindo que o padrão de distribuição de metástases dos diversos tipos de tumor primário se devia ao fato de que a célula tumoral necessita de solo apropriado, ou seja, de determinado órgão secundário, para desenvolver a metástase (PAGET, 1889).

Posteriormente, foi demonstrado que também o padrão de drenagem linfática e venosa dos diversos órgãos tem contribuição importante no processo de disseminação de metástases. Assim é que, por exemplo, no câncer de cólon, que possui drenagem venosa através do sistema porta, as metástases desse tumor se alojam preferencialmente no fígado. O

crescimento de metástases é determinante no prognóstico e, por conseguinte, é de extrema importância o desenvolvimento de tratamentos que possam bloquear o processo metastático (CHAMBERS; GROOM; MACDONALDS, 2002)

1.3. Transição Epitelial-Mesenquimal

A Transição Epitelial-Mesenquimal (TEM) é um processo que ocorre na maioria dos metazoários e consiste no desenvolvimento de células mesenquimais, semelhantes a fibroblastos, a partir de células com fenótipo epitelial. Durante essa transição, as células mesenquimais adquirem a morfologia apropriada para a migração através do meio extracelular. Posteriormente, essas células podem adquirir novamente o fenótipo epitelial em um processo inverso conhecido como Transição Mesenquimal-Epitelial (THIERY, 2002).

A TEM é um processo fundamental na embriogênese, principalmente durante a fase da gastrulação bem como no desenvolvimento da crista neural, coração e sistema muscular esquelético. No entanto, esse mesmo processo também tem sido associado a condições patológicas como fibrose crônica, progressão tumoral e desenvolvimento de metástases (NATALWALA; SPYCHAL; TSELEPIS, 2008; WU; ZHOU, 2008).

Nas doenças fibrosantes crônicas, a Transição Epitelial-Mesenquimal tem um papel crucial, pois, nessas patologias, ocorre a transformação de células epiteliais em células mesenquimais, semelhantes a fibroblastos, e esses fibroblastos serão responsáveis pela deposição excessiva de colágeno que ocorre nessas doenças. A TEM já foi relacionada a quadros de fibrose cardíaca, renal, pulmonar e hepática (PIERA-VELAZQUEZ; LI; JIMENEZ, 2011; IWAISAKO; BRENNER; KISSELEVA, 2012).

As características marcantes da Transição Epitelial-Mesenquimal são a diminuição de expressão de moléculas de adesão intercelular em combinação com a aquisição de propriedades mesenquimais com alto potencial migratório e invasivo (WEVER *et al.*, 2008).

Esse processo ocorre durante a progressão tumoral e, com a perda das moléculas de adesão, as células tumorais se destacam do tumor primário e, adquirindo esse fenótipo mesenquimal, essas células invadem localmente a matriz extracelular adjacente ao tumor primário e se aproximam dos vasos, neste primeiro microambiente tumoral. Depois, podem apresentar capacidade de migração através da parede destes vasos, formando êmbolos intravasculares ou se dispersando no sangue como células isoladas (TIWARI *et al.*, 2012). Ao chegar aos novos tecidos, ocorre o processo inverso, e as células voltam a adquirir o fenótipo

epitelial e ocorre a reexpressão de moléculas de adesão, o que permite a formação das metástases (HENDRIX *et al.*, 2011).

De fato, a Transição Epitelial-Mesenquimal tem sido implicada como coadjuvante do processo de invasão tumoral nos mais diversos tipos de neoplasias malignas como hepatocarcinoma, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de pâncreas, câncer de próstata e câncer colorretal (SIPOS; GALAMB, 2012; BHANGU *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2013; KYUNO *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2013).

No mecanismo de formação de metástases, a Transição Epitelial-Mesenquimal é crucial no processo de migração da célula, desde o destacamento do tumor primário até a intravasão, extravasão e migração no órgão secundário, já que a célula de fenótipo mesenquimal possui uma grande capacidade de mobilidade através da matriz extracelular e entre as células endoteliais, através das paredes dos vasos sanguíneos e linfáticos (LEOPOLD; VINCENT; WANG, 2012).

Já o processo inverso, a Transição Mesenquimal-Epitelial é crucial para o estabelecimento da metástase no órgão secundário, onde a célula readquire um fenótipo epitelial (YAO; DAI; PENG, 2011).

1.4. Caderinas

As caderinas constituem uma extensa família de moléculas de adesão de natureza protéica que promovem a adesão intercelular e sua função é cálcio dependente. As caderinas são encontradas em uma grande variedade de espécies, desde organismos unicelulares até organismos multicelulares como os mamíferos (ABEDIN; KING 2008; HULPIAU; ROY, 2011).

Os mecanismos de adesão intercelular constituem uma característica fundamental dos organismos multicelulares. Nos animais vertebrados existe um conjunto de estruturas localizadas na membrana celular que é chamado de complexo juncional. Esse complexo é formado basicamente por três estruturas principais: as *tight junctions* (junções estreitas), as junções de adesão e os desmossomas. As caderinas foram identificadas como as principais moléculas de adesão das junções de adesão (ODA; TAKEICHI, 2011).

As caderinas podem ser classificadas em três grandes grupos: caderinas clássicas, as principais, caderinas desmossômicas e protocaderinas, as mais numerosas e antigas filogeneticamente (BECKER *et al.*, 2012) Existem diversos tipos de caderinas, como a Caderina-E, presente no epitélio, a Caderina-N, que se expressa no tecido neural, a Caderina-

VE, encontrada no endotélio vascular, a Caderina-P, presente na placenta, a Caderina-R, na retina e a Caderina-K, descrita inicialmente no rim. (HULPIAU; ROY, 2009).

Quadro 1 – Superfamília das Caderinas

Caderinas (Subfamílias)	Tipo	Exemplos
Caderinas	Caderinas Tipo I (Clássicas)	Caderina-E (CDH1)
		Caderina-N (CDH2)
		Caderina-P (CDH3)
		Caderina-R (CDH4)
	Caderinas Tipo II (Atípicas)	Caderina-VE (CDH5)
		Caderina-K (CDH6)
		Caderina-H (CDH13)
Caderinas desmossomais	Desmocolinas	Desmocolinas -1, -2, -3
	Desmogleínas	Desmogleínas -1, -2, -3
Protocaderinas	Protocaderinas α , β , γ	Protocaderina α 3
		Protocaderina β 1
		Protocaderina-1
		Protocaderina-8
Caderinas <i>fat-like</i>	Domínio extracelular extenso	hFat-1
		hFat-2
		Dcad76E
		Fat
		Dachsous
Caderinas Flamingo	Sete domínios transmembrana	hFlamingo-1
		hFlamingo

Adaptado de PEINADO, PORTILLO, CANO, 2004

As caderinas são proteínas transmembrana que possuem um domínio intracitoplasmático, outro transmembranar e um domínio extracelular. O domínio intracelular das caderinas se liga a uma proteína chamada β -catenina (ou γ -catenina), que por sua vez se liga a outra proteína chamada α -catenina, o que é conhecido como complexo caderina-catenina. A α -catenina, por sua vez, se liga a proteínas estruturais como a actina e essa ligação do complexo caderina-catenina ao citoesqueleto da célula é primordial no processo de adesão intercelular. (YONEMURA, 2011).

O domínio extracelular das caderinas consiste de uma proteína de aproximadamente cento e dez resíduos, em forma de preguçamento beta. Em geral, uma molécula de caderina contém cinco desses domínios extracelulares e as caderinas são classificadas em múltiplas subfamílias, classificação essa que é baseada no número e arranjo conformacional desses domínios extracelulares (BRASCH *et al.*, 2012).

As caderinas promovem ligações homofílicas entre células, ligações estas dependentes de cálcio. As ligações são ditas homofílicas porque cada caderina apenas se liga

com outra caderina do seu mesmo tipo. A Caderina-E, por exemplo, apenas tem capacidade de se ligar com outra Caderina-E, bem como a Caderina-N apenas irá se ligar a outra Caderina-N (BECKER *et al.*, 2012).

O complexo Caderina-E e β -catenina está envolvido tanto na Transição Epitelial-Mesenquimal como na Transição Mesenquimal-Epitelial, processos estes que têm um importante papel no desenvolvimento embrionário, nas doenças fibrosantes e na progressão tumoral. No processo de Transição Epitelial-Mesenquimal as células epiteliais deixam de expressar proteínas como a Caderina-E e a citoqueratina e ganham um fenótipo mesenquimal com expressão de proteínas como a Caderina-N, vimentina, α -actina de músculo liso e proteína-1 específica de fibroblastos (TIAN *et al.*, 2011).

1.5. Caderina-E

A caderina-E, uma caderina do tipo I (clássica), é considerada o protótipo das caderinas, pois foi a primeira caderina identificada e caracterizada. Em 1977, Takeichi, analisando células pulmonares de *hamsters*, identificou uma proteína de superfície, de aproximadamente 150 kDa, ligada ao cálcio. Este foi o primeiro relato de caracterização da Caderina-E e de seu potencial de adesividade intercelular dependente de cálcio (TAKEICHI, 1977).

Posteriormente, em 1980, Hyafil *et al.*, em estudos envolvendo células de embriões, descreveu uma proteína de 84-kDa, que foi denominada de gp84. Ao administrar anticorpos que reagem com a proteína gp84, os pesquisadores observaram que havia perda da adesividade celular (HYAFIL *et al.*, 1980). Atualmente, é sabido que a proteína gp84 corresponde ao domínio extracelular da Caderina-E (ROY; BERX, 2008).

A Caderina-E é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso como uma proteína precursora inativa de 135-kDa e, posteriormente, sofre um processo de maturação no complexo de Golgi, processo esse que envolve clivagem proteolítica, e então a Caderina-E madura é transportada até a membrana celular, onde irá exercer sua função de adesividade. A Caderina-E presente na membrana poderá sofrer um processo de internalização em vesículas intracitoplasmáticas e poderá ser digerida no interior dos lisossomos, ou poderá ser reciclada e retornar à membrana plasmática (MASTERSON; O'DEA, 2007).

O processo de reciclagem da Caderina-E em vesículas endocitoplasmáticas, além de proteger a proteína da degradação enzimática, possibilita um remodelamento das interações de adesão célula-célula, permitindo que a Caderina-E seja redirecionada para

outros locais da membrana celular, promovendo uma maior plasticidade em termos de adesão intercelular (NIESSSEN; LECKBAND; YAP, 2011).

A expressão da Caderina-E se dá na membrana das células epiteliais, mais especificamente nas junções de adesão, sendo a principal molécula que mantém a adesão entre essas células. O domínio intracitoplasmático da Caderina-E se liga com a β -catenina ou com a γ -catenina. Outra proteína, a α -catenina, se liga à β -catenina ou à γ -catenina, formando complexos Caderina-E/ β -catenina/ α -catenina ou Caderina-E/ γ -catenina / α -catenina. Esta última, por sua vez, se liga ao citoesqueleto da célula através da actina. Por outro lado, as caderinas se ligam a caderinas de outras células por meio de ligações Caderina-E/Caderina-E. Ao estabelecerem a adesão intercelular, as moléculas de Caderina-E tornam-se essenciais para que as células epiteliais mantenham-se agrupadas (EL-BAHRAWY *et al.*, 2002).

Conforme foi discutido anteriormente, a Transição Epitelial-Mesenquimal está estreitamente relacionada ao processo de invasão tumoral. Os carcinomas que são bem diferenciados ou moderadamente diferenciados, muitas vezes apresentam células epiteliais interligadas de forma coesa, através de ligações estabelecidas pela Caderina-E e estes grupos de células cancerosas são separados do tecido conjuntivo adjacente por uma membrana basal (PEINADO; PORTILLO; CANO, 2004).

Ao se iniciar o processo de invasão tumoral, ocorre uma diminuição da expressão de caderina-E na membrana das células tumorais, o que resulta em um destacamento destas células. Evidenciam-se também alterações fenotípicas, com uma mudança do fenótipo epitelial para o fenótipo mesenquimal e um aumento de expressão de outra caderina, a Caderina-N, e essas características irão proporcionar uma maior motilidade e capacidade migratória dessas células através do tecido conjuntivo e dos vasos. Esse processo migratório também conta com o concurso de diversas proteases, como as metaloproteinases, que são produzidas no microambiente tumoral, e que degradam a membrana basal e a matriz extracelular, facilitando a migração das células tumorais (GUARINO, 2007).

Além da função de adesividade, a Caderina-E parece ter outro possível papel na progressão tumoral: o de molécula sinalizadora, interferindo na produção de fatores solúveis como o fator inibidor de hipóxia, regulando o metabolismo e o crescimento das células tumorais, com efeitos inclusive sobre o processo de consumo de glicogênio. Nesse sentido, a Caderina-E teria também uma função de proteína oncogênica. No entanto, esses mecanismos moleculares ainda não estão bem esclarecidos. (CHU *et al.*, 2013).

A perda de expressão de caderina-E tem sido relacionada à progressão tumoral em diversos tipos de neoplasias malignas, tais como: câncer de mama, melanoma, tumores

cerebrais, tumores gástricos e ao carcinoma colorretal (SCHWECHHEIMER; BIRCHMEIER, 1998; TSANOU *et al.*, 2008; BARANWAL; ALAHARI, 2009; KUPHAL; BOSSERHOFF, 2012; CARNEIRO *et al.*, 2012).

1.6. Caderina-E e Carcinoma Colorretal

As moléculas de adesão celular estão diretamente envolvidas nos processos de invasão e metastatização no câncer colorretal e a perda de função da Caderina-E está relacionada com fenótipos de câncer pouco diferenciados e com maior potencial de invasividade (TSANOU *et al.*, 2008). A perda de expressão de Caderina-E, bem como da β -catenina tem sido associada com o desenvolvimento de metástases no câncer colorretal (SHIONO *et al.*, 2006; FANG *et al.*, 2010; ELZAGHEID *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2012).

Há relatos de que em pacientes portadores de carcinoma colorretal com expressão diminuída de Caderina-E e β -catenina, a sobrevida tende a ser menor (FILIZ *et al.*, 2010). Outros trabalhos têm sugerido a possibilidade de utilizar a dosagem de níveis séricos de Caderina-E como um possível marcador de prognóstico em pacientes com carcinoma colorretal (WILMANNNS *et al.*, 2004; WEIB, 2011).

A localização da Caderina-E, se na membrana ou no citoplasma da célula também é de extrema significância, porquanto é sabido que a Caderina-E apenas mantém sua funcionalidade quando expressa na membrana celular. A Caderina-E de localização citoplasmática, por definição, é não funcional (KHOURSHEED, 2003; ELZAGHEID *et al.*, 2006).

Além disso, também tem sido demonstrado que, no caso das metástases hepáticas de carcinoma colorretal, as células que formam cordões neoplásicos no tecido hepático possuem expressão normal de caderina-E, o que leva a crer que as células cancerosas, ao chegarem ao fígado, sofrem o processo de Transição Mesenquimal-Epitelial, reexpressando caderina-E em suas membranas, o que leva a um reagrupamento celular para a formação da metástase hepática (WELLS; YATES; SHEPARD, 2008).

De fato, alguns estudos demonstraram uma expressão maior de Caderina-E nas metástases hepáticas do que no tumor primário do carcinoma colorretal, sugerindo a reexpressão de Caderina-E estimulada pelo microambiente do tecido hepático. A principal teoria é de que as células tumorais deixam de expressar a Caderina-E apenas transitoriamente, voltando a expressá-la no sítio metastático, ou seja, haveria um processo de Transição Epitelial-Mesenquimal no tumor primário, possibilitando a migração celular e um processo de

Transição Mesenquimal-Epitelial, durante a implantação das células neoplásicas no nicho metastático (BONGIORNO *et al.*, 1995; IKEGUCHI *et al.*, 2000; EL-BAHRAWY, 2001).

Aumento da expressão de Caderina-E em relação aos tumores primários também foi descrito em pacientes com metástases linfonodais de carcinoma colorretal (BATISTATOU *et al.*, 2006).

Os resultados são controversos e alguns estudos demonstraram um aumento de expressão de Caderina-E e cateninas também nos tumores primários do carcinoma colorretal em comparação com o tecido colônico normal, tanto no carcinoma colorretal esporádico como no carcinoma proveniente de polipose adenomatosa colônica (EL-BAHRAWY *et al.*, 2001; EL-BAHRAWY, 2002).

Apesar de haver muitos estudos avaliando a expressão de Caderina-E em tumores primários de carcinoma colorretal, poucos trabalhos estabeleceram uma comparação entre a expressão desta caderina nos carcinomas primários e nas metástases linfonodais (KANAZAWA *et al.*, 2002; BATISTATOU *et al.*, 2006).

Além disso, os padrões de migração celular que ocorrem durante a invasão tumoral no sítio primário neste tipo de câncer são ainda um assunto em aberto. Alguns estudos sugerem que haja infiltração de células isoladas, através de um movimento amebóide, e que haja também a migração de células agrupadas, em blocos ou em cordões (FRIEDL; WOLF, 2003). Estes dois aspectos ainda pouco conhecidos nos motivaram à realização deste estudo.

2. OBJETIVOS

Geral

Avaliar a imunexpressão de Caderina-E no Câncer Colorretal.

Específicos

- Avaliar a imunexpressão de Caderina-E no carcinoma colorretal primário em relação às variáveis clínico-patológicas (sexo, idade, localização anatômica, tamanho do tumor).
- Comparar a expressão de Caderina-E nos carcinomas colorretais primários com a imunomarcção na mucosa colônica normal.
- Comparar a expressão de Caderina-E nos carcinomas colorretais primários com a imunomarcção nas metástases linfonodais.
- Verificar o padrão de marcação celular da Caderina-E nas células cancerosas invasivas, agrupadas *versus* isoladas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Casos e material utilizado

Este estudo, de caráter transversal, foi desenvolvido a partir de um conjunto de 111 casos de carcinoma colorretal utilizando material referente a peças de colectomia no período de 2004-2009, registrados nos arquivos do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML/UFC). Fizeram parte da amostra todos os casos do período citado, fixados em formalina a 10% e incluídos em parafina. Casos com amostras insuficientes, mal fixadas ou inadequadas (por exemplo, com predomínio de áreas necróticas ou de muco) foram excluídos.

Dos 111 casos, 26 apresentavam metástases em linfonodos, dos quais foram obtidos blocos de parafina para a realização de imunohistoquímica. Seguida a microtomia habitual, feita com 3 µm, os cortes foram corados pelo método da Hematoxilina-Eosina (HE), e foi confirmado histologicamente o diagnóstico de adenocarcinoma colorretal. Também foram analisados os 26 blocos de linfonodos comprometidos por metástases. Adicionalmente, foram separados 30 blocos que continham apenas mucosa normal e outros trinta blocos de linfonodos normais, sem metástase.

Durante a análise das lâminas, foram excluídos os casos que apresentavam menos de cem células tumorais, casos autolisados e casos com material insuficiente. A casuística final foi de 77 amostras de tumor primário, 10 amostras de linfonodo metastático, 24 amostras de mucosa normal e 13 amostras de linfonodo normal.

3.2 – *Tissue Microarray*

A técnica de *Tissue Microarray* (TMA) foi descrita pela primeira vez por Battifora em 1986. Posteriormente, Kononen *et al.* desenvolveu uma técnica onde, por meio de uma agulha, cilindros de tecido eram retirados do bloco doador e inseridos em blocos receptores padronizados (KONONEN, 1998; MIETTINEN, 2012).

A construção do TMA por via convencional depende de um *kit* industrial de alto custo e que não está disponível na maioria dos laboratórios de patologia ao redor do mundo. No entanto, essa técnica permite a análise de múltiplos fragmentos de tecido em um único bloco de parafina, permitindo economia de anticorpos e reagentes.

Algumas formas artesanais de construção de TMA têm sido descritas na literatura (CHEN; FORAN, 2006; PIRES; ANDREIUOLO; SOUZA, 2006; SHEBL *et al.*, 2011; GURGEL *et al.*, 2012). Neste projeto de pesquisa foi desenvolvida uma nova variação técnica artesanal para construção dos blocos receptores.

Foi utilizado um vazador manual de couro Graziano[®] (*punch*) adaptado conforme descrito por Gurgel *et al.*, 2012. O vazador, com diâmetro de furo de 2 mm foi usado para retirar os cilindros de tecido dos blocos doadores.

A adaptação do vazador de couro foi realizada com o uso de uma furadeira de impacto de 3/8” e 500 W Skil[®], na velocidade de até 3000 rpm com uma broca Bosch[®] de 4mm para permitir a perfuração do aço inoxidável e, em seguida, foi realizado o acabamento da peça utilizando-se uma lima mecânica meia-cana. Os procedimentos foram necessários para gerar uma abertura lateral de 2 cm e que fica a 4mm de distância da nova ponta, permitindo a remoção de cilindros de 2 mm a partir do bloco doador (GURGEL *et al.*, 2012).

Através da análise das lâminas coradas pelo método HE, foi delimitada a área representativa do material em cada bloco para permitir a retirada dos cilindros no exato local onde se encontrava o tecido a ser analisado.

Durante a retirada dos tecidos dos blocos doadores, o *punch* era inserido de forma perpendicular a fim de proporcionar a adequada retirada do cilindro com a parte previamente selecionada e representativa da amostra.

No tocante à construção do bloco receptor, neste projeto de pesquisa, foi desenvolvida uma técnica artesanal para construção de blocos receptores. Foram utilizados blocos de parafina vazios preparados com o molde padrão, fazendo uso de parafina granulada aquecida a 60°C. Uma caneta Pilot[®] foi utilizada para marcar 24 pontos equidistantes no bloco de parafina a ser usado como bloco receptor (Figura 1A).

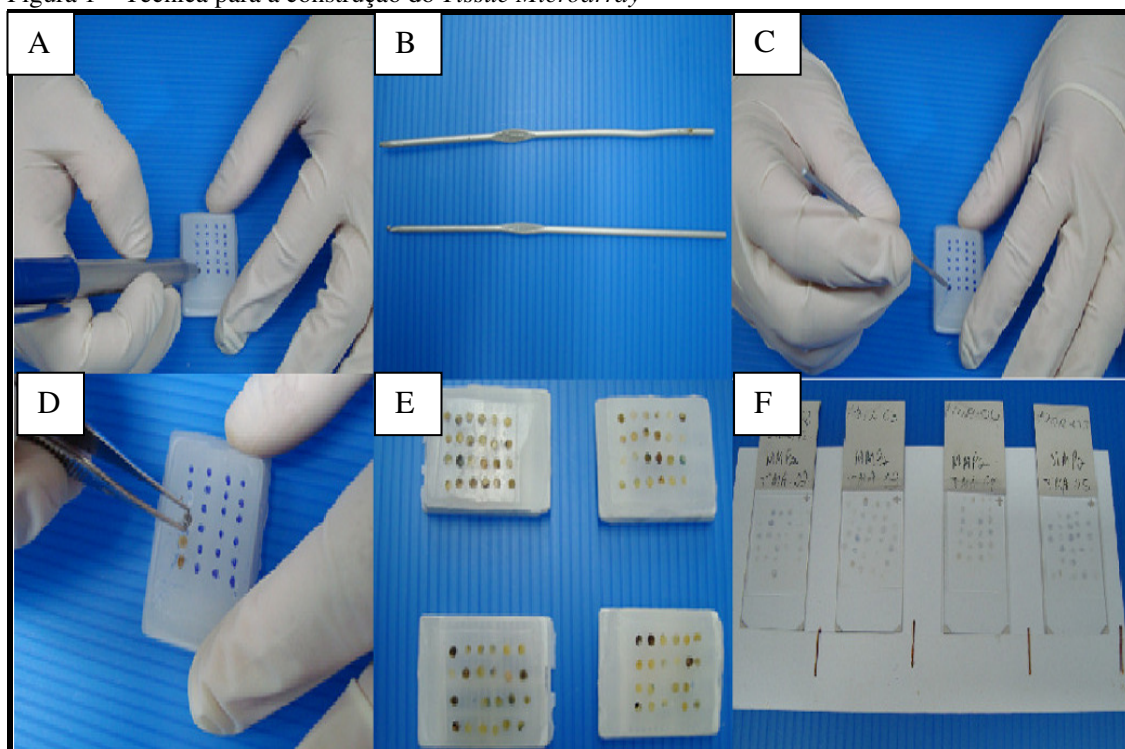
Posteriormente, utilizou-se uma agulha de crochê padrão de 2 mm (Figura 1B) e foram perfurados 24 orifícios, exatamente nos pontos marcados no bloco receptor, realizando-se um delicado movimento giratório da agulha de crochê para obter as perfurações sem provocar rachaduras no bloco de parafina (Figura 1C).

Os cilindros dos blocos doadores foram encaixados cuidadosamente nos orifícios obtidos nos blocos receptores (Figura 1D). Em cada bloco receptor confeccionado, a ordem dos casos no bloco foi cuidadosamente anotada para servir de referencial quando da análise das lâminas. No primeiro orifício de cada bloco foi encaixado um tecido diferente, como fígado, baço e/ou placenta, para facilitar a posterior orientação.

Após o bloco receptor ser preenchido com todos os cilindros, despejou-se uma fina camada de parafina derretida sobre o bloco e o mesmo foi aquecido em uma estufa a 60°C durante quinze minutos, e depois, resfriado em temperatura ambiente, com o objetivo de obter uma melhor aderência dos cilindros no bloco receptor (Figura 1E).

Os cortes dos blocos de *tissue microarray* foram feitos em micrótomo Leica RM2235, com 3 µm de espessura, e encaminhados para realização de imunohistoquímica (Figura 1F).

Figura 1 – Técnica para a construção do *Tissue Microarray*



3.3 – Imunohistoquímica

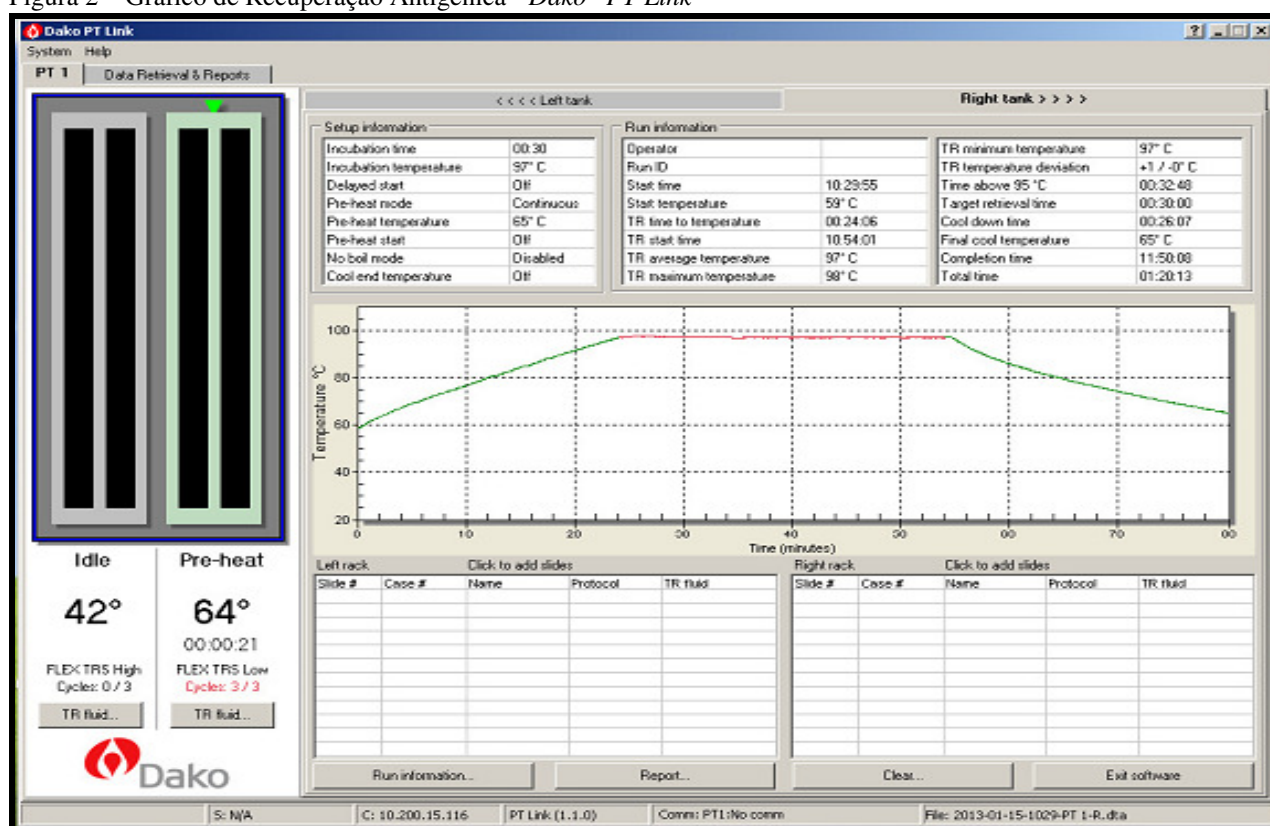
Os blocos de *tissue microarray* foram submetidos à microtomia, realizando-se secções com 3 µm de espessura, e foi realizada a aposição dos cortes histológicos em lâminas silanizadas.

As lâminas silanizadas foram colocadas em um suporte plano e levadas para a estufa, com temperatura estabilizada a 60°C, durante uma hora, com o objetivo de derreter o excesso de parafina e melhorar a aderência dos tecidos à lâmina.

Ao mesmo tempo, iniciou-se a preparação do tampão de recuperação antigênica. Utilizou-se o tampão *Envision Flex Target Retrieval Solution*, pH=9, código de referência K8000 – *Dako*[®], diluição 1:50. O tampão foi conservado na geladeira a 8°C.

Em seguida, essa solução de 1500 ml (30 ml de tampão de recuperação antigênica + 1470 ml de água destilada) foi colocada em um tanque do módulo de pré-tratamento *Dako PT Link*[®], aparelho que proporciona um banho maria fechado, com temperatura monitorizada e controlada por computador. Foi realizado o pré-aquecimento do sistema até 65°C durante trinta minutos.

Figura 2 – Gráfico de Recuperação Antigênica - *Dako*[®] *PT Link*



Retiraram-se as lâminas da estufa. As lâminas foram colocadas em prateleiras, as quais foram posicionadas no tanque do *Dako*[®] *PT Link*, e o sistema aquecido até a temperatura de 97°C, permanecendo nessa temperatura por trinta minutos. A seguir, o sistema foi novamente resfriado até 65°C, com o tempo total do processo de aproximadamente uma hora e meia (Figura 2).

Esta etapa de recuperação antigênica possibilita, através do calor e da solução de tampão, a quebra das pontes e ligações induzidas pela formalina, recuperando assim os

epítomos antigênicos, promovendo também a reidratação dos cortes histológicos, permitindo, posteriormente, uma melhor ligação dos anticorpos aos epítomos (SHI; SHI; TAYLOR, 2011).

O material então foi retirado dos tanques e as lâminas foram colocadas em um borrel contendo tampão de lavagem, durante três minutos. Para a lavagem das lâminas utilizou-se o *Wash Buffer Envision Flex*, pH=7,6, *Dako*[®], na diluição de 1:20.

Após três minutos, as lâminas foram retiradas do tampão de lavagem e submetidas ao bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio a 5% durante dez minutos, com o objetivo de bloquear a peroxidase dos tecidos para evitar reação de fundo quando da etapa de coloração.

Posteriormente, efetuou-se nova lavagem das lâminas com tampão de lavagem por mais três minutos, e então as lâminas foram colocadas nas câmaras de incubação e marcadas com uma caneta especial hidrofóbica (*Dako*[®] *Pen* – referência S2002) que delimita a área em torno do corte histológico impedindo o escoamento das soluções. Em seguida realizou-se a incubação com o anticorpo primário.

Utilizou-se o anticorpo Anti-Caderina-E de camundongo, monoclonal, *Dako*[®], clone NCH-38, em uma diluição de 1:100. Foi realizada a aplicação do anticorpo primário, lâmina por lâmina, e o conjunto permaneceu em incubação *overnight*, por aproximadamente dezenove horas na geladeira, à temperatura de 8°C. No dia seguinte, as lâminas foram retiradas da geladeira, sendo realizadas duas lavagens seguidas com o *Wash Buffer Envision Flex* *Dako*[®], a primeira lavagem durante cinco minutos e a segunda durante três minutos.

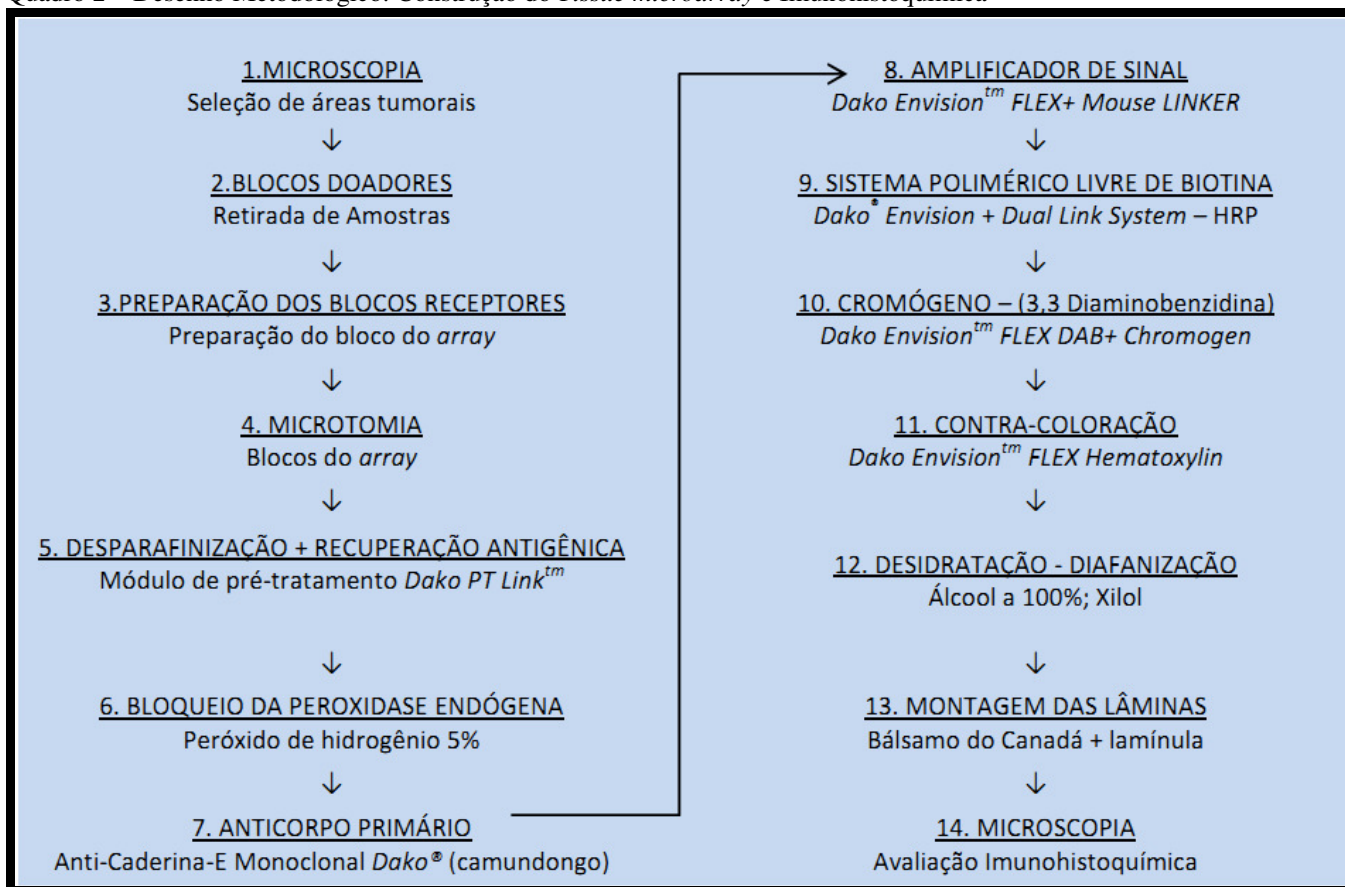
As lâminas então foram colocadas na prateleira e foi realizada a incubação com o *Linker Envision Flex Mouse*, código de referência K8012/K8022 - *Dako*[®], durante quinze minutos. O *Linker* é utilizado com o objetivo de amplificar a ligação entre o anticorpo primário e o polímero, tornando a reação de imunohistoquímica mais sensível.

A etapa seguinte se deu através da incubação com o polímero *Dako*[®] *Envision + Dual Link System* – HRP. A incubação do polímero foi realizada durante quarenta minutos. Em seguida, foram realizadas mais duas lavagens com o tampão de lavagem, durante cinco minutos cada lavagem, e, logo após, foi feita a coloração com a incubação do cromógeno *Dako*[®] DAB durante dez minutos e posterior lavagem das lâminas em água corrente.

A seguir, foi feita a contracoloração com hematoxilina (*EnVision Flex Hematoxylin*) e realizadas três passagens das lâminas em álcool absoluto, para desidratação e três passagens em xilol, para diafanização ou clareamento. Por último, foram realizadas as montagens das lamínulas utilizando o Bálsamo do Canadá.

O quadro seguinte resume o desenho metodológico.

Quadro 2 – Desenho Metodológico: Construção do *Tissue microarray* e Imunohistoquímica



3.4 – Escores

Para atribuição dos escores, foi utilizada uma avaliação semiquantitativa proposta por Jawhari e colaboradores, da seguinte forma: 0 = ausência de coloração ou menos de dez por cento de células coradas; 1 = coloração predominantemente citoplasmática; 2 = padrão misto de coloração; 3 = padrão membranar de coloração. Para atribuição de escores foi sempre considerado o padrão dominante. Casos em que havia mais de dez por cento de células com um padrão diferente do padrão principal foram considerados como padrão misto. Posteriormente, os casos foram classificados em expressão anormal de Caderina-E, representada pelos escores 0, 1 e 2, e expressão normal de Caderina-E, representada pelo escore 3. (JAWHARI *et al.*, 1997).

Utilizou-se também outra abordagem, proposta por Almeida e colaboradores. Os casos com escores 0 ou 1 foram classificados como "Ausência de expressão membranar"

enquanto casos com escores 2 ou 3 foram denominados como "Presença de expressão membranar" (ALMEIDA *et al.*, 2010).

3.5 – Controles

Os controles positivos para Caderina-E foram obtidos a partir de secções de tecido de apêndice cecal, que coram fortemente a proteína de adesão (JAWHARI *et al.*, 1997; HUNT *et al.*, 1997). Os controles negativos foram obtidos a partir da supressão do anticorpo primário.

3.6 – Avaliação intra- e inter-observadores

Os preparados histológicos para Caderina-E foram estudados pelo autor deste trabalho e posteriormente analisados por um patologista, sempre em microscópio Olympus BX41TM, sem conhecimento prévio dos dados clínico-patológicos. Casos em que houve discordância foram reavaliados e definidos por meio de consenso entre os examinadores.

3.7 – Análise Estatística

Neste trabalho utilizou-se o teste exato de *Fisher* para análise estatística das tabelas de contingência. O valor de $p < 0,05$ foi definido como estatisticamente significativo. Foi utilizado o programa *GraphPad Prism*TM 5 para a realização dos testes estatísticos e dos gráficos.

3.8 – Aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa com seres humanos

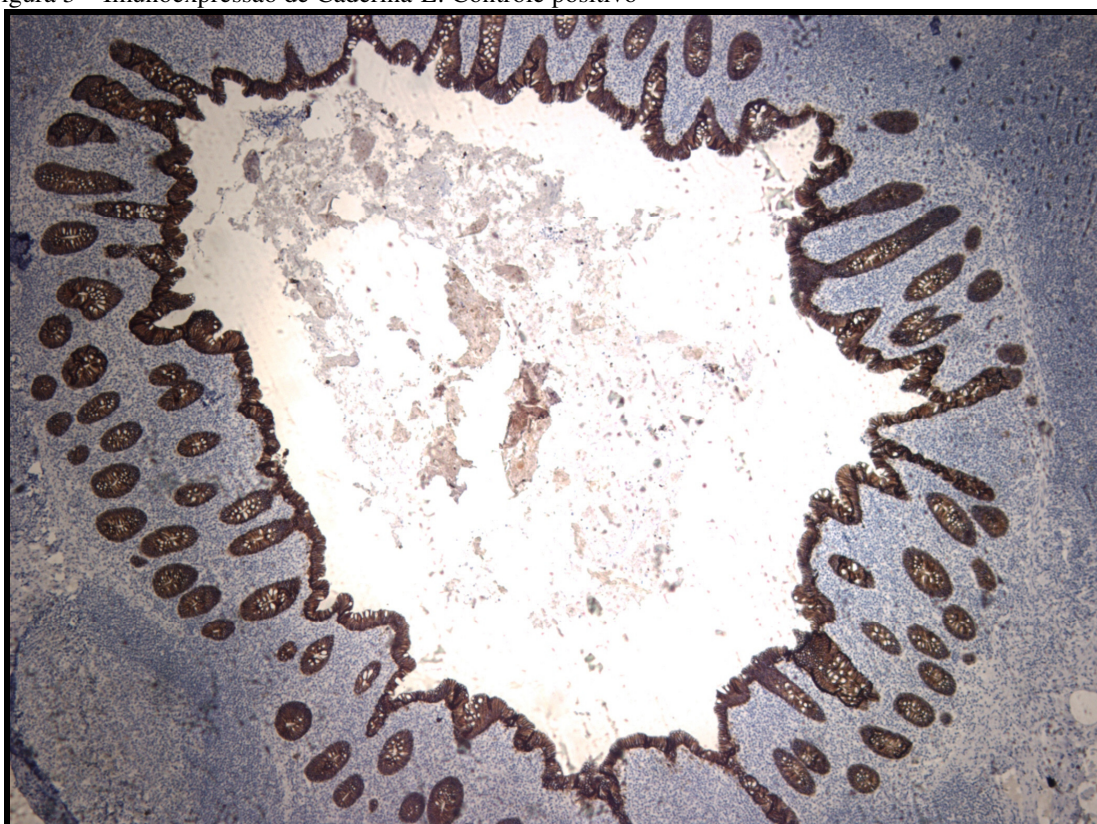
O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio em 26/09/2011, sob o protocolo nº 093.09.11. Foram tomados os devidos cuidados na preservação de condições de biossegurança, incluindo a prevenção de acidentes em laboratório e o manejo e acondicionamento correto dos materiais utilizados. A utilização das amostras do arquivo foi feita após a assinatura do Termo de Fiel Depositário das amostras.

4 RESULTADOS

4.1 Controles

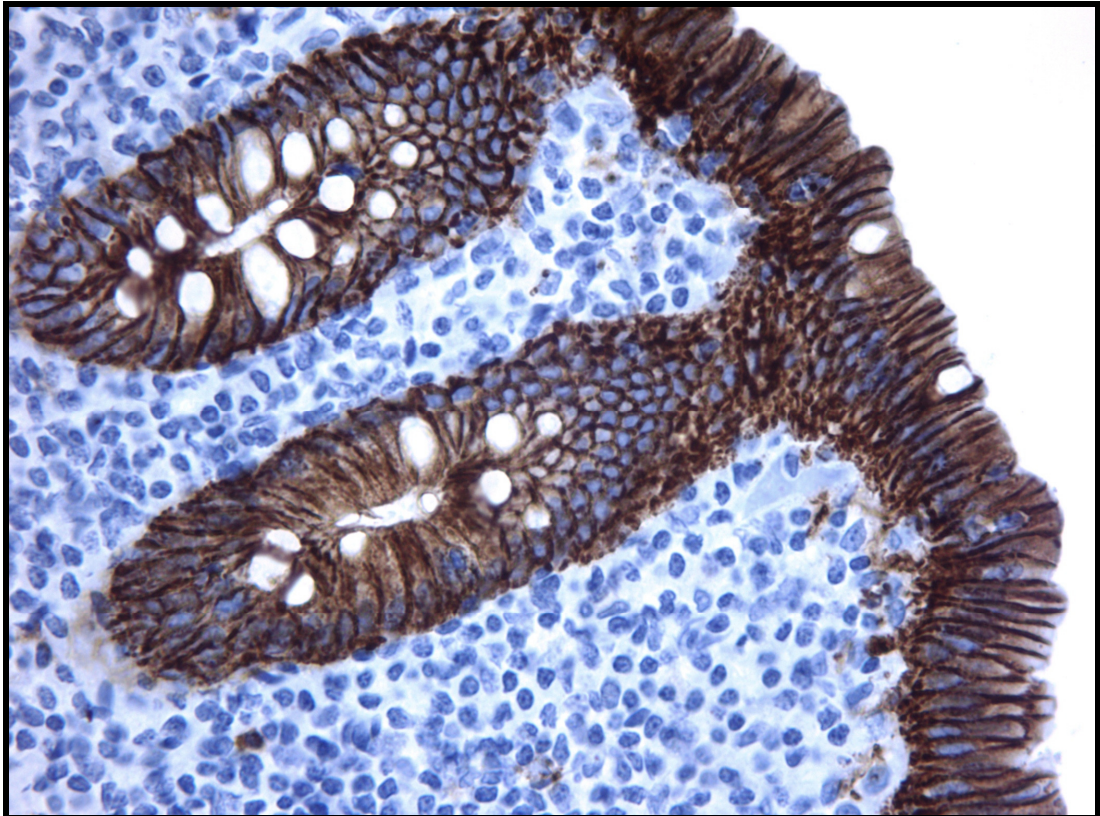
As figuras 3 e 4 mostram os controles positivos e a figura 5 mostra o controle negativo de amostras selecionadas de apêndice cecal, de acordo com sugestão da literatura, para Caderina-E (JAWHARI *et al.*, 1997; HUNT *et al.*, 1997).

Figura 3 – Imunoexpressão de Caderina-E: Controle positivo



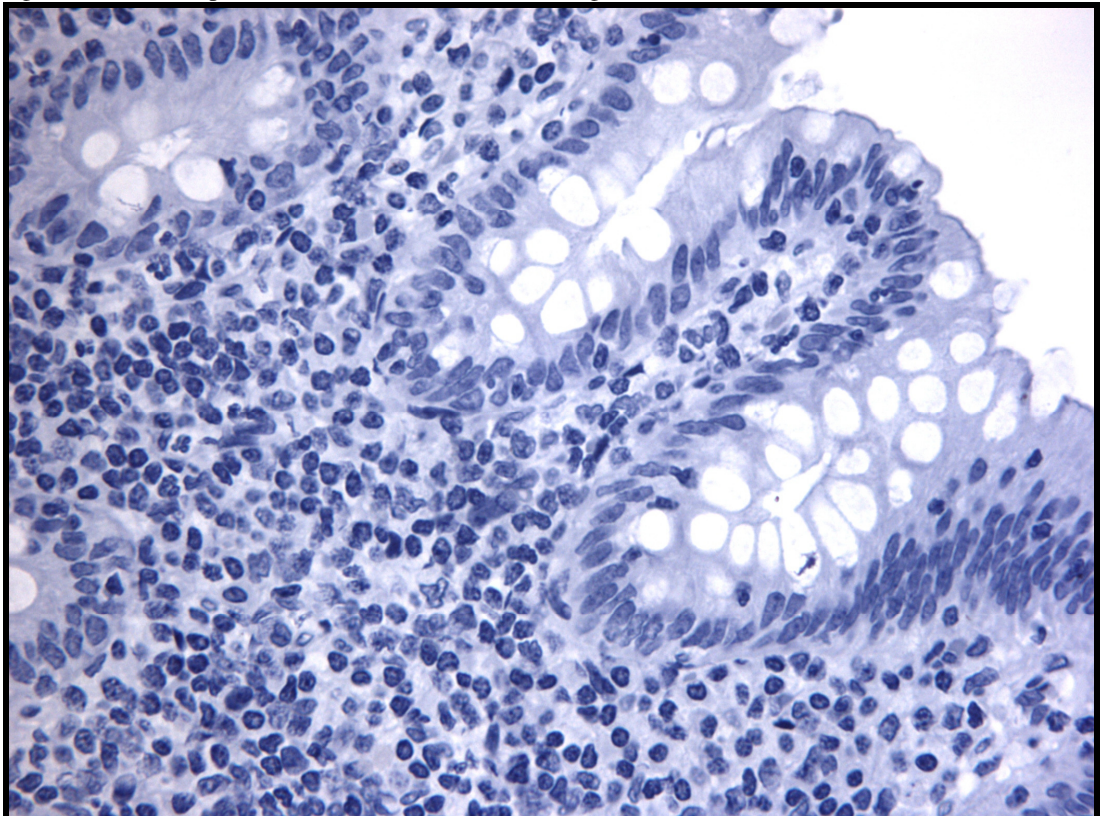
Apêndice cecal com expressão positiva membranar de Caderina-E, 40 X

Figura 4 – Imunoexpressão de Caderina-E: Controle positivo - detalhe



Apêndice cecal com expressão positiva membranar de Caderina-E, 400 X

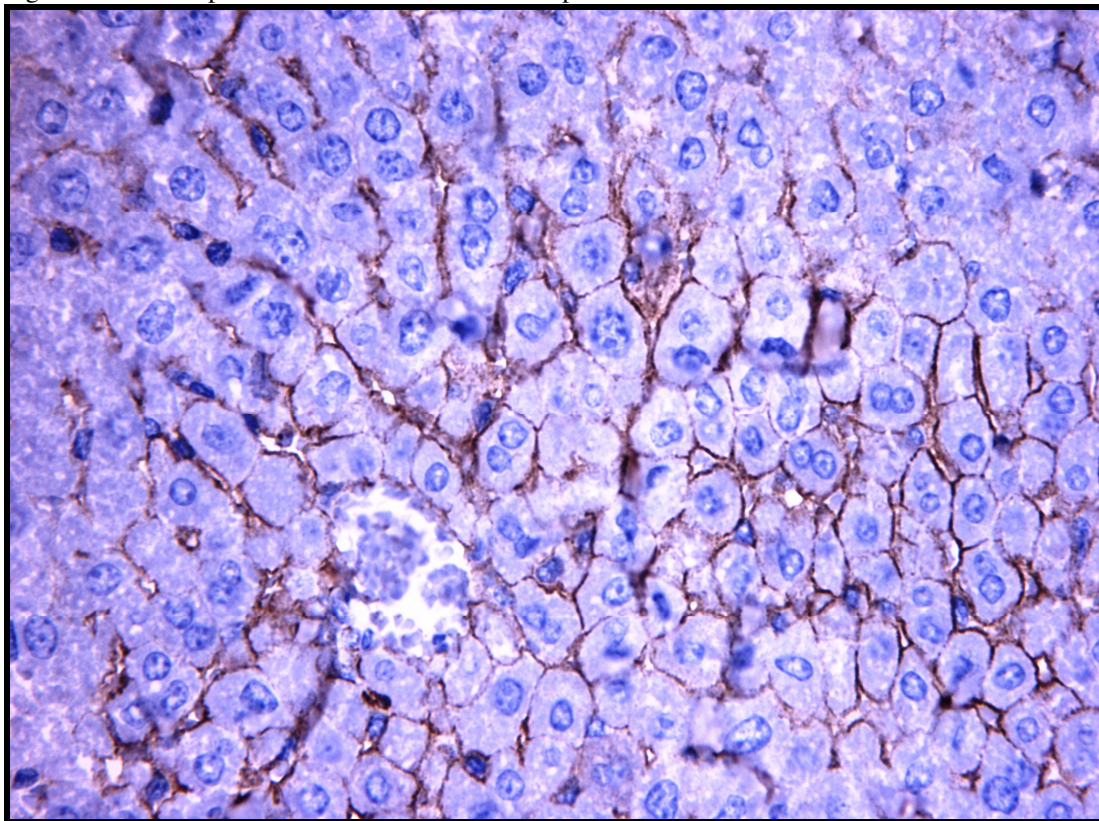
Figura 5 – Imunoexpressão de Caderina-E: Controle negativo



Apêndice cecal com expressão negativa de Caderina-E, 400 X

A figura 6 mostra um controle positivo interno de Caderina-E no tecido hepático normal, com marcação membranar pura nos hepatócitos.

Figura 6– Imunoexpressão de Caderina-E: Controle positivo interno



Hepatócitos com expressão membranar positiva de Caderina-E, 400 X

4.2 Imunomarcção e Variáveis Clínico-Patológicas

Foi realizada a comparação da expressão da Caderina-E em cada variável clínico-patológica estudada: entre sexo masculino e sexo feminino, entre pacientes com idade abaixo de 50 anos e pacientes com 50 anos ou mais, entre pacientes com tumor primário menor que 5 centímetros e maior ou igual a 5 centímetros e entre pacientes com localização do tumor no colo direito e transversal *versus* colo esquerdo e retossigmóide.

Para cada variável analisada, realizamos uma análise estatística considerando a classificação de Jawhari *et al* (p1) e outra utilizando os critérios propostos por Almeida *et al* (p2). Com relação a estas variáveis clínico-patológicas, não encontramos nenhuma diferença estatisticamente significativa (Tabela 1).

Tabela 1 – Imunoexpressão de Caderina-E no tumor primário e variáveis clínico-patológicas

Variáveis Clínico-Patológicas	Expressão de Caderina-E						
	n	0	1	2	3	p1	p2
Sexo							
Masculino	44	12	1	14	17	0.4796	0.6249
Feminino	33	10	2	11	10		
Idade							
< 50	23	10	0	5	8	1.0000	0.1945
≥ 50	54	12	3	20	19		
Localização anatômica							
Colo direito	15	5	1	7	2	0.5448 *	0.7659*
Colo transverso	3	1	0	0	2		
Colo esquerdo	6	4	1	0	1		
Retossigmóide	35	7	1	15	12		
Indeterminada	18	5	0	3	10		
Tamanho do Tumor Primário							
< 5cm	23	5	1	9	8	1.0000	0.5960
≥ 5cm	54	17	2	16	19		
Total	77	22	3	25	27		

p= Teste exato de Fisher (p1 – Jawhari *et al.*; p2 – Almeida *et al.*). *Colo direito + colo transverso *versus* Colo esquerdo + Retossigmóide. IC=95%

A seguir, observa-se a distribuição de escores nos quatro tecidos analisados. Dentre os casos de tumor primário, houve casos com expressão de Caderina-E membranar (escore 3), citoplasmática (escore 1) e mista (escore 2), bem como alguns tumores com ausência de expressão (escore 0).

No entanto, com relação às metástases linfonodais, não houve nenhum caso de expressão de Caderina-E puramente citoplasmática (escore 1).

Já na mucosa normal, a maioria dos casos foi de expressão puramente membranar (escore 3), porém, com alguns casos de ausência de expressão (escore 0), mas não houve expressão citoplasmática e/ou mista (escores 1 e 2). Os linfonodos normais não apresentaram expressão de caderina-E em nenhum dos casos avaliados (Tabela 2).

Tabela 2 – Imunoexpressão de Caderina-E no carcinoma colorretal primário, em linfonodos metastáticos, em mucosa normal colônica e em linfonodo normal

Sítio Anatômico e tecidos analisados	Expressão de Caderina-E				n
	0	1	2	3	
Tumor primário	22	3	25	27	77
Linfonodo metastático	1	0	3	6	10
Mucosa normal	4	0	0	20	24
Linfonodo normal	13	0	0	-	13

0 = Ausência de expressão; 1= Expressão citoplasmática pura; 2= Expressão mista; 3= Expressão membranar pura (JAWHARI, *et al.*, 1997). n= total de casos. IC=95%

4.3 – Expressão de Caderina-E nas células neoplásicas do carcinoma colorretal em comparação com o epitélio da mucosa normal.

Foi realizada a comparação da expressão de Caderina-E no carcinoma colorretal em comparação à mucosa normal, utilizando a classificação proposta por Jawhari *et al.*, onde a expressão é classificada em anormal (escores 0, 1 e 2) e normal (escore 3). Pelos dados da tabela 3 pode-se observar que o tumor primário apresentou mais casos de expressão anormal de Caderina-E em comparação com a mucosa normal, com um resultado estatisticamente significativo ($p < 0.0001$).

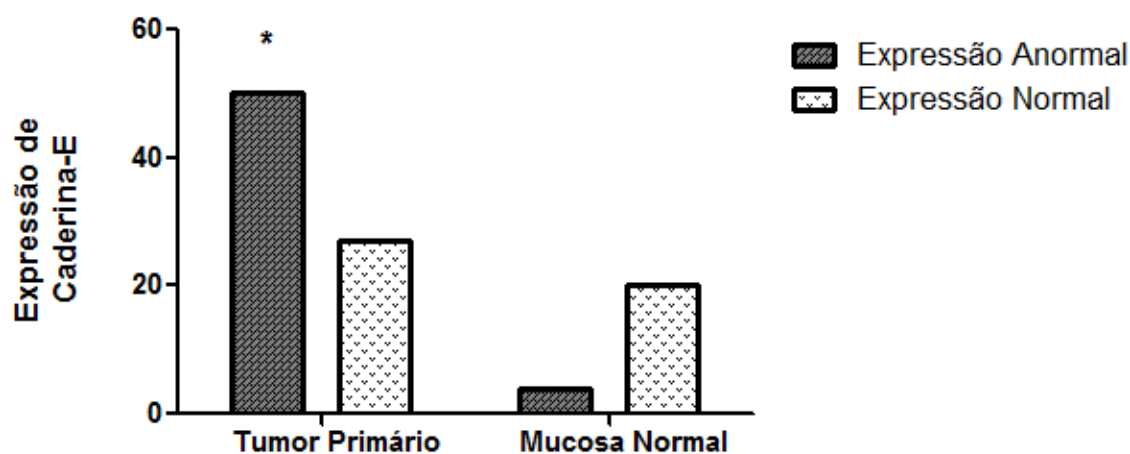
Tabela 3– Imunoexpressão de Caderina-E no carcinoma colorretal e na mucosa normal (Jawhari et al.)

Tecido analisado	Expressão de Caderina-E*			p
	Anormal (0, 1 e 2)	Normal (3)	n	
Tumor primário	50	27	77	p<0.0001
Mucosa normal	4	20	24	

*Classificação proposta por Jawhari *et al.* p = Teste exato de Fisher. IC=95%

A seguir, o mesmo resultado é visto em forma de gráfico, e ilustra com mais precisão esta diferença. Há nítido predomínio de expressão anormal de Caderina-E no tumor primário em comparação com a mucosa normal (50/77 & 4/24; Figura 7).

Figura 7 - Imunoexpressão de Caderina-E no carcinoma colorretal e na mucosa colônica normal



A expressão anormal de Caderina-E foi mais frequente no tumor primário em comparação com a mucosa normal (50/77 & 4/24; * $p < 0.0001$, teste exato de Fisher)

Foi realizada outra comparação entre a expressão de Caderina-E no tumor primário e na mucosa normal, porém, agora usando os critérios propostos por Almeida *et al.*, sendo os casos classificados como expressão não-membranar (escores 0 e 1) e expressão membranar (escores 2 e 3). Não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0.1966$; Tabela 4).

Tabela 4 – Imunoexpressão de Caderina-E no carcinoma colorretal e na mucosa normal (Almeida *et al.*)

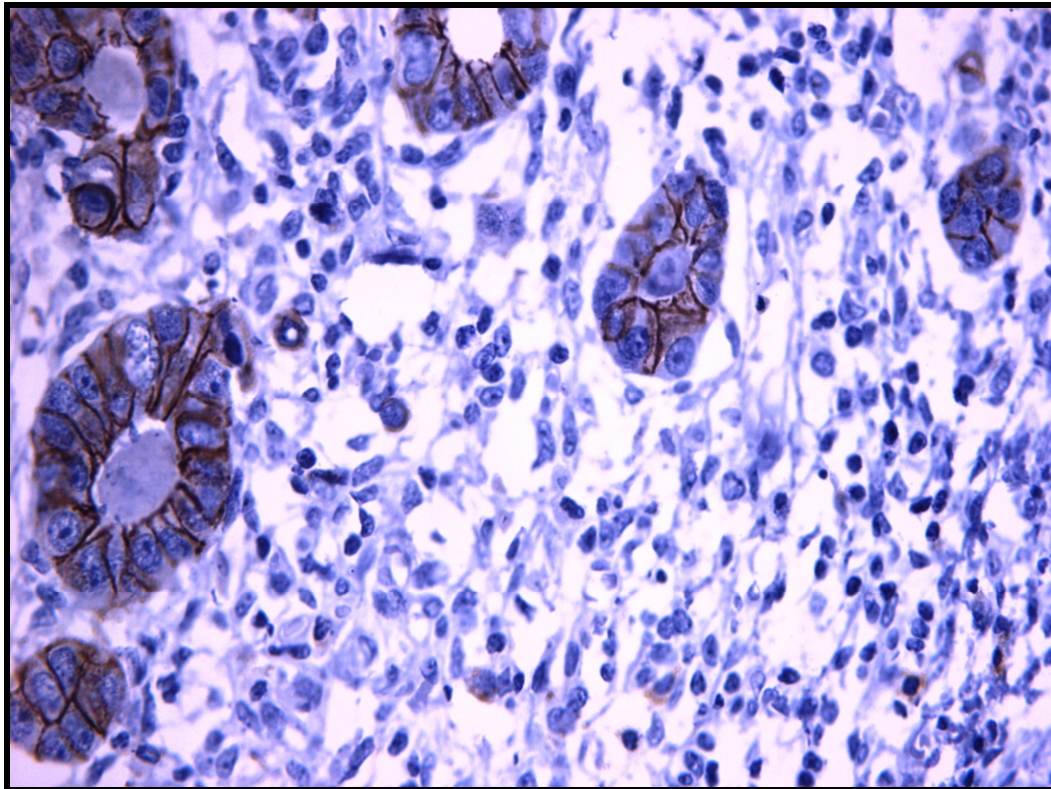
Tecido analisado	Expressão de Caderina-E*			
	Não-membranar (0 e 1)	Membranar (2 e 3)	n	p
Tumor primário	25	52	77	p=0.1966
Mucosa normal	4	20	24	

*Critérios propostos por Almeida *et al.* p = Teste exato de Fisher. IC=95%

Na figura 8, observa-se um caso de carcinoma colorretal bem diferenciado, com um padrão de agrupamento predominantemente glandular, mas também apresentando padrão de agrupamento em blocos celulares, nos quais se visualiza uma forte marcação membranar de Caderina-E.

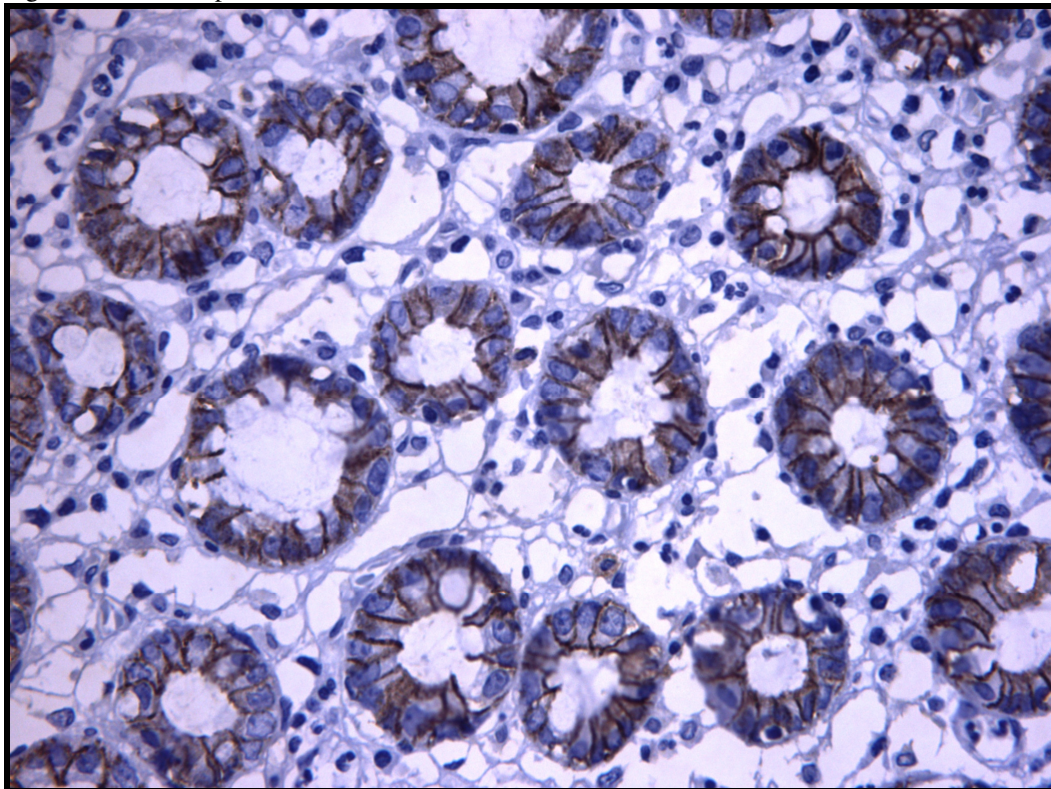
Comparar com a figura 9 que mostra um corte histológico de mucosa colônica normal com marcação membranar pura de Caderina-E nas glândulas (score 3).

Figura 8 – Imunoexpressão de Caderina-E em células agrupadas de padrão glandular e padrão “em blocos” de carcinoma colorretal



Carcinoma colorretal, células agrupadas em glândulas e em blocos, observa-se nítida marcação membranar, 400x

Figura 9 – Imunoexpressão de Caderina-E em mucosa colônica normal



Mucosa colônica normal. Glândulas apresentando marcação membranar pura de Caderina-E, 400x

4.4 – Expressão de Caderina-E nas células neoplásicas do carcinoma colorretal em comparação com as células neoplásicas das metástases linfonodais

Posteriormente, foi realizada uma análise da expressão de Caderina-E no carcinoma colorretal em comparação às células neoplásicas presentes nas metástases linfonodais, utilizando a classificação proposta por Jawhari *et al.* Pelos dados da tabela 5 pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão de Caderina-E no tumor primário e na metástase linfonodal ($p=0.1694$).

Tabela 5 – Imunoexpressão de Caderina-E em células neoplásicas de carcinoma colorretal primário e nas metástases linfonodais (critério de Jawhari et al.)

Tecido analisado	Expressão de Caderina-E*			
	Anormal (0, 1 e 2)	Normal (3)	n	p
Tumor primário	50	27	77	p=0.1694
Linfonodo metastático	4	6	10	

*Classificação proposta por Jawhari *et al.* p = Teste exato de Fisher. IC=95%

A seguir foi estabelecida a mesma comparação, porém, agora utilizando os critérios de Almeida *et al.* Não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0.2698$; Tabela 6).

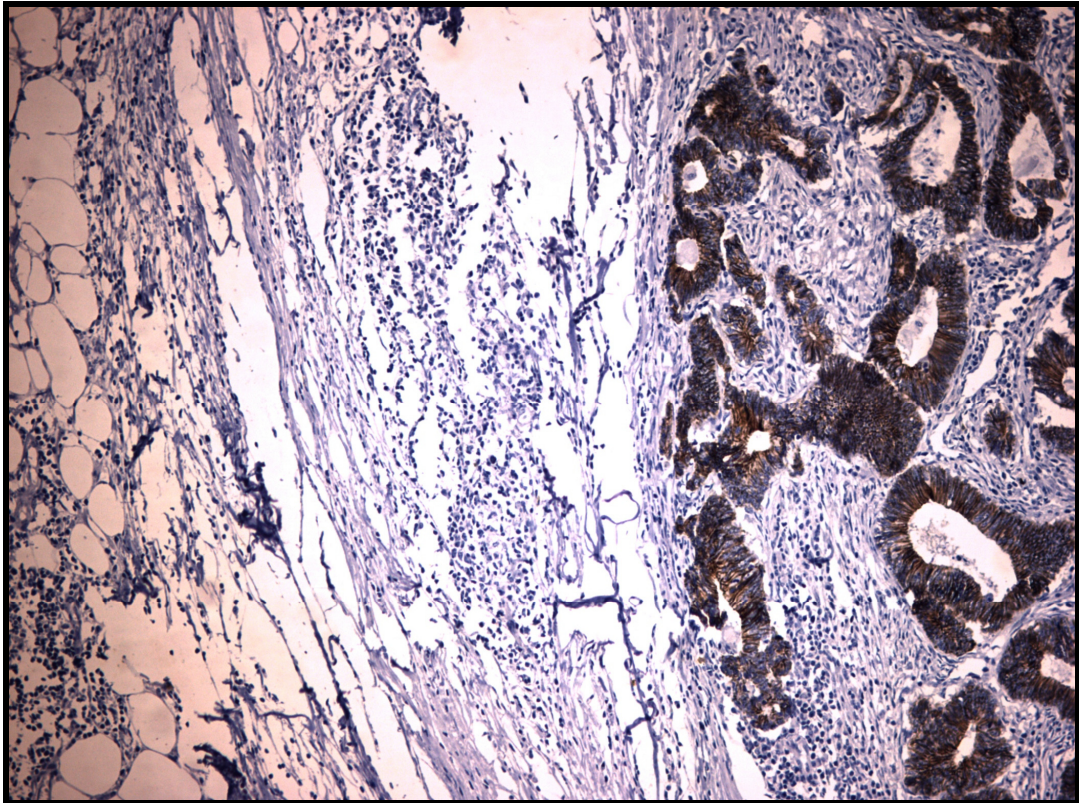
Tabela 6 – Imunoexpressão de Caderina-E em células neoplásicas de carcinoma colorretal primário e nas metástases linfonodais (critério de Almeida et al.)

Tecido analisado	Expressão de Caderina-E*			
	Não-membranar (0 e 1)	Membranar (2 e 3)	n	p
Tumor primário	25	52	77	p=0.2698
Linfonodo metastático	1	9	10	

*Critérios propostos por Almeida *et al.* p = Teste exato de Fisher

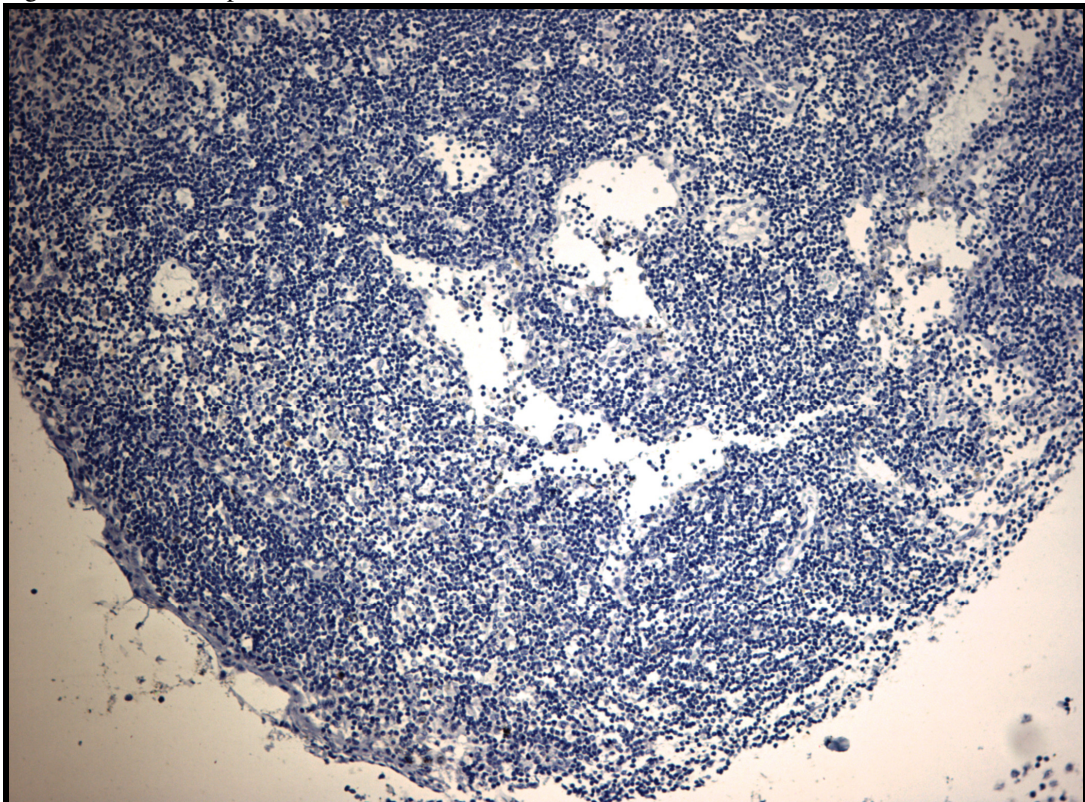
A figura 10 apresenta a expressão de Caderina-E nas células neoplásicas de metástases em linfonodos, com forte marcação membranar. A figura 11 ilustra o controle negativo da reação de imunohistoquímica em linfonodo sem metástase.

Figura 10 – Imunoexpressão de Caderina-E em metástase linfonodal de carcinoma colorretal



Linfonodo apresentando metástase de adenocarcinoma colorretal com expressão membranar de Caderina-E na metástase, 100x

Figura 11 – Imunoexpressão de Caderina-E em linfonodo normal



Linfonodo normal com ausência de expressão de Caderina-E (controle interno negativo), 100x

4.5 – Expressão de Caderina-E de acordo com o padrão histológico do tumor primário (células agrupadas padrão glandular, agrupadas padrão em blocos e células isoladas)

Em seguida, foi analisada a distribuição de escores nos casos de tumor primário, de acordo com o padrão histológico apresentado. Dentre os casos de tumor primário, 68 casos se apresentaram como padrão de células agrupadas, sendo que em 12 casos o tumor apresentou células agrupadas em blocos e em 56 casos o tumor se apresentou formando glândulas. Em 9 casos o tumor consistiu em células neoplásicas isoladas, sem um padrão de agrupamento (Tabela 7).

Os tumores com padrão histológico de células agrupadas, em sua maioria, apresentaram expressão de Caderina-E, tanto membranar pura (escore 3) como mista (escore 2). Já nos tumores formados por células isoladas, a maioria não apresentou expressão de Caderina-E (escore 0), sendo que apenas um caso apresentou expressão citoplasmática (escore 1), dois casos apresentaram expressão mista (escore 2) e entre os casos de células isoladas não houve expressão membranar pura (escore 3).

Considera-se importante relatar que, dentre os casos de tumores que se apresentaram com células neoplásicas isoladas, houve três casos de tumores com células em “anel de sinete”, sendo que, nesses casos, não houve expressão de Caderina-E (escore 0).

Tabela 7 – Imunoexpressão de Caderina-E no carcinoma colorretal de acordo com o padrão histológico de invasividade no tumor primário

Carcinoma colorretal (Tumor Primário)	Expressão de Caderina-E*						p1	p2
	0	1	2	3	n			
Células isoladas (Pouco diferenciado)	6	1	2	-	9			
Total	6	1	2	-	9			
						0.0230*	0.0043*	
Células agrupadas (Bem/Moderadamente diferenciado)	16	2	23	27	68			
Padrão em blocos	4	1	3	4	12			
Padrão glandular	12	1	20	23	56			
						0.7508	0.2778	
Total	16	2	23	27	68			

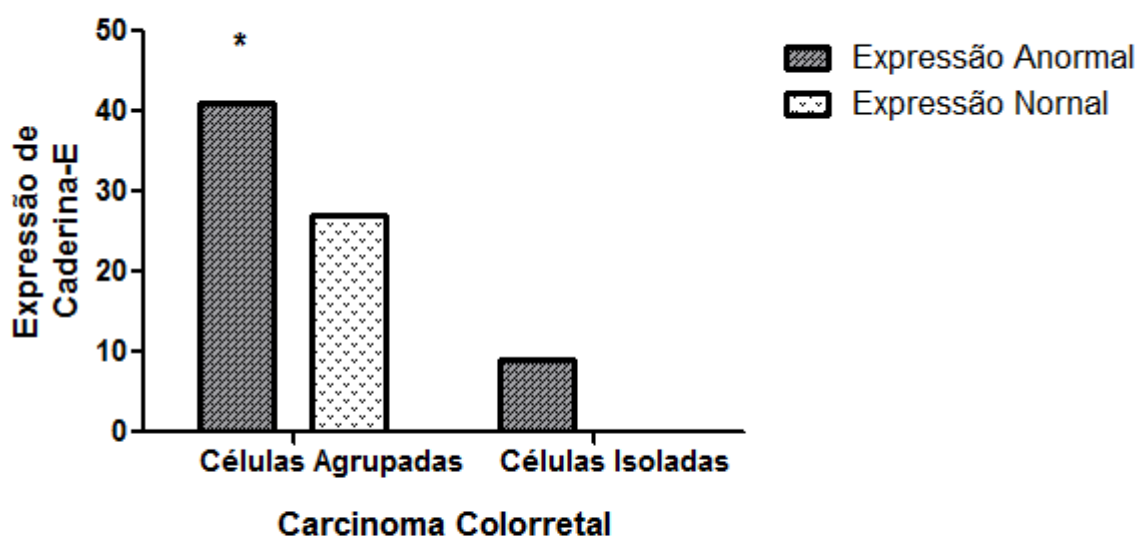
0 = Ausência de expressão; 1= Expressão citoplasmática pura; 2= Expressão mista; 3= Expressão membranar pura. n= total de casos. p= Teste exato de Fisher (p1 – Jawhari *et al.*; p2 – Almeida *et al.*) *p < 0.05. IC=95%.

Foi analisada a expressão de Caderina-E no carcinoma colorretal, estabelecendo uma comparação entre os tumores que apresentaram células em padrão agrupado (padrão glandular e padrão em blocos) e os tumores que apresentaram células isoladas, utilizando a classificação proposta por Jawhari *et al.*, onde a expressão é classificada em anormal (escores 0, 1 e 2) e normal (escore 3).

Observou-se que os tumores com células em padrão agrupado apresentaram maior expressão normal (membranar) de Caderina-E do que os tumores de células isoladas, que em sua maioria não apresentaram expressão de Caderina-E, sendo que alguns apresentaram expressão anormal. A diferença foi estatisticamente significativa ($p=0.0230$; Tabela 7).

Logo abaixo, os dados foram representados em forma de gráfico, ilustrando com mais precisão esta diferença. Há nítido predomínio de expressão normal de Caderina-E nos tumores de células agrupadas em comparação com os tumores de células isoladas (27/68 & 0/9; Figura 12)

Figura 12 - Imunoexpressão de Caderina-E no carcinoma colorretal primário em células agrupadas e em células isoladas (classificação de Jawhari *et al*)



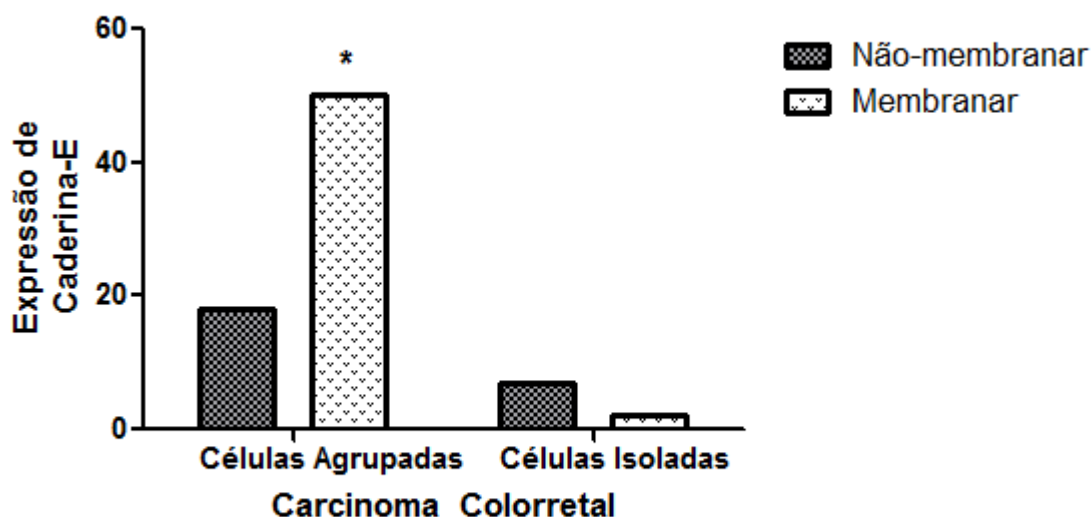
Nos tumores de células agrupadas houve predomínio de expressão normal de Caderina-E em comparação com os tumores de células isoladas (27/68 & 0/9; $*p=0.0230$, teste de exato de Fisher)

A seguir, foi novamente estabelecida uma comparação entre a expressão de Caderina-E no tumor primário, células agrupadas *versus* células isoladas, porém agora usando os critérios propostos por Almeida *et al.*, sendo os casos classificados como expressão não-membranar (escores 0 e 1) e expressão membranar (escores 2 e 3).

Os tumores com padrão de células agrupadas apresentaram maior expressão membranar de Caderina-E que os tumores de células isoladas. A diferença foi estatisticamente significativa (Tabela 7).

Logo abaixo, os dados foram representados em forma de gráfico, o que ilustra com mais precisão esta diferença. Há nítido predomínio de expressão membranar de Caderina-E nos tumores de células agrupadas em comparação com os tumores de células isoladas (50/68 & 2/9; Figura 13).

Figura 13 - Imunoexpressão de Caderina-E no carcinoma colorretal primário em células agrupadas e em células isoladas (critério de Almeida *et al.*)



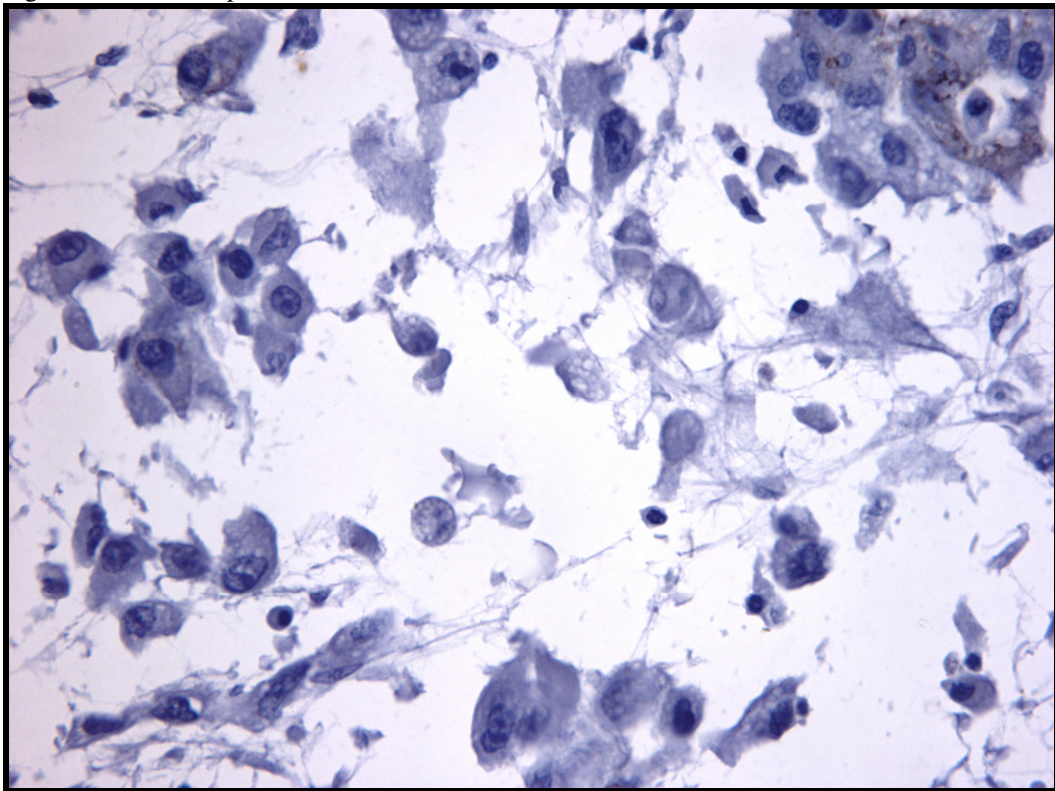
Nos tumores de células agrupadas houve um predomínio de expressão membranar de Caderina-E em comparação com os tumores de células isoladas (50/68 & 2/9; * $p=0.0043$, teste exato de Fisher)

Adicionalmente, estabeleceu-se uma comparação entre a expressão de Caderina-E nos tumores de padrão glandular *versus* tumores de padrão em blocos. Foi utilizada a classificação proposta por Jawhari *et al.*, bem como os critérios propostos por Almeida *et al.* e, em ambas as análises, não foi observada diferença estatisticamente significativa (Tabela 7).

Na figura 14 observa-se um caso de carcinoma colorretal com predominância de células isoladas, as quais não apresentaram expressão de Caderina-E.

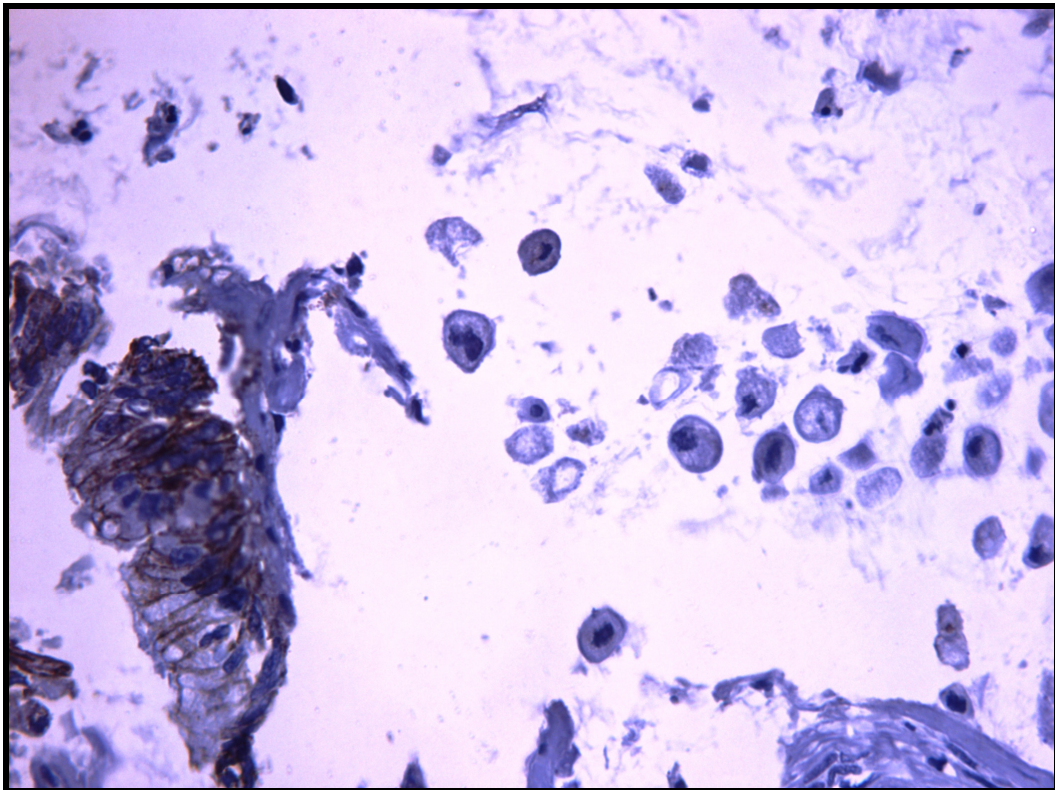
Já na figura 15 visualiza-se um caso de carcinoma colorretal onde há um nítido contraste, apresentando de um lado células agrupadas com forte marcação para Caderina-E e, de outro, células isoladas sem marcação.

Figura 14 – Imunoexpressão de Caderina-E em células isoladas de carcinoma colorretal



Células isoladas de carcinoma colorretal sem expressão de Caderina-E e algumas células agrupadas com expressão membranar (quadrante superior direito); 400x

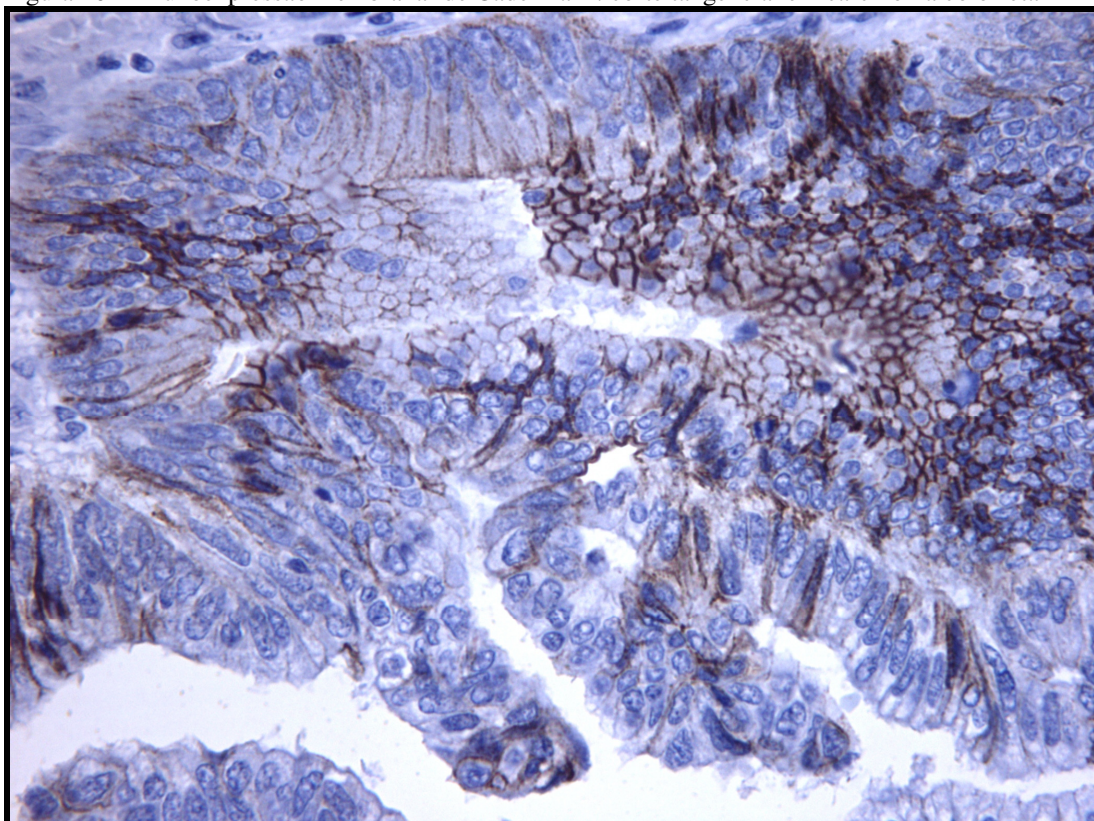
Figura 15 – Imunoexpressão de Caderina-E em células agrupadas com padrão “em blocos” e em células isoladas de carcinoma colorretal



Células agrupadas em blocos, do lado esquerdo da figura, com forte expressão membranar. No lado direito, células isoladas sem marcação de Caderina-E, 400x

Na figura 16, observa-se um caso de carcinoma colorretal com marcação membranar bastante nítida. Nesta ilustração, o agrupamento celular no lado direito da figura, com as membranas demarcadas pela forte expressão de Caderina-E, lembra uma imagem em “favo de mel”.

Figura 16 – Imunoexpressão membranar de Caderina-E: corte tangencial em carcinoma colorretal

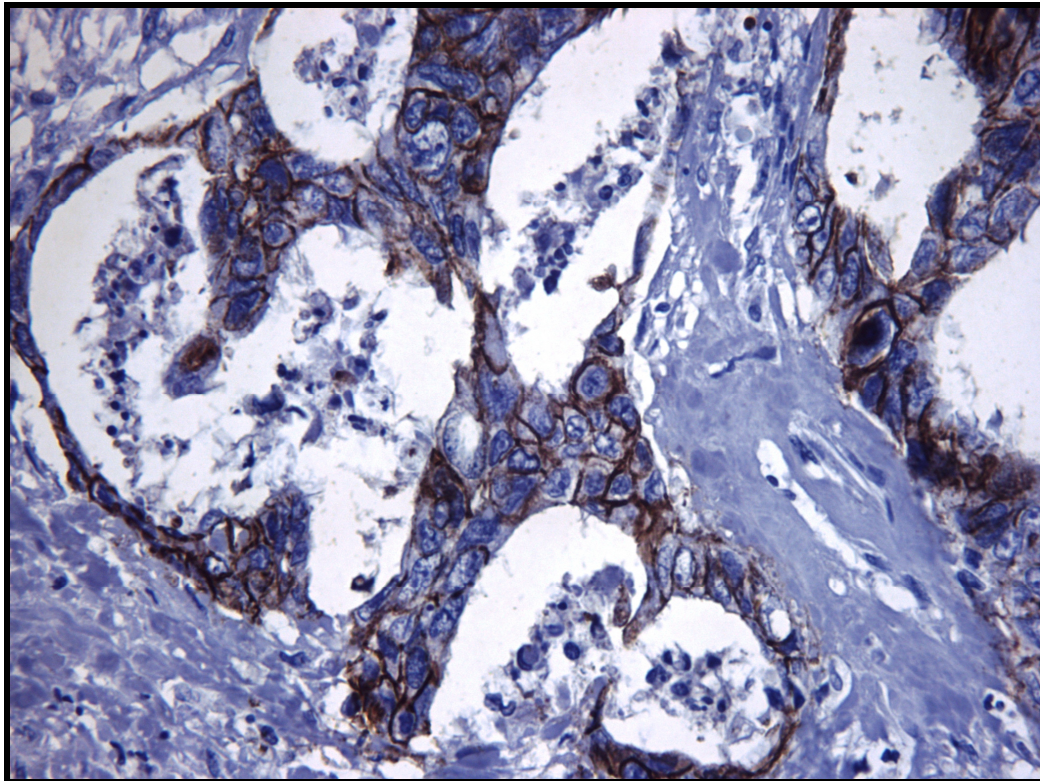


Carcinoma colorretal, expressão membranar de Caderina-E, imagem em “favo de mel”, 400x.

Na figura 17, observa-se um tumor de padrão glandular, onde as células neoplásicas que compõem o adenocarcinoma colorretal, apresentam marcação membranar pura (escore 3).

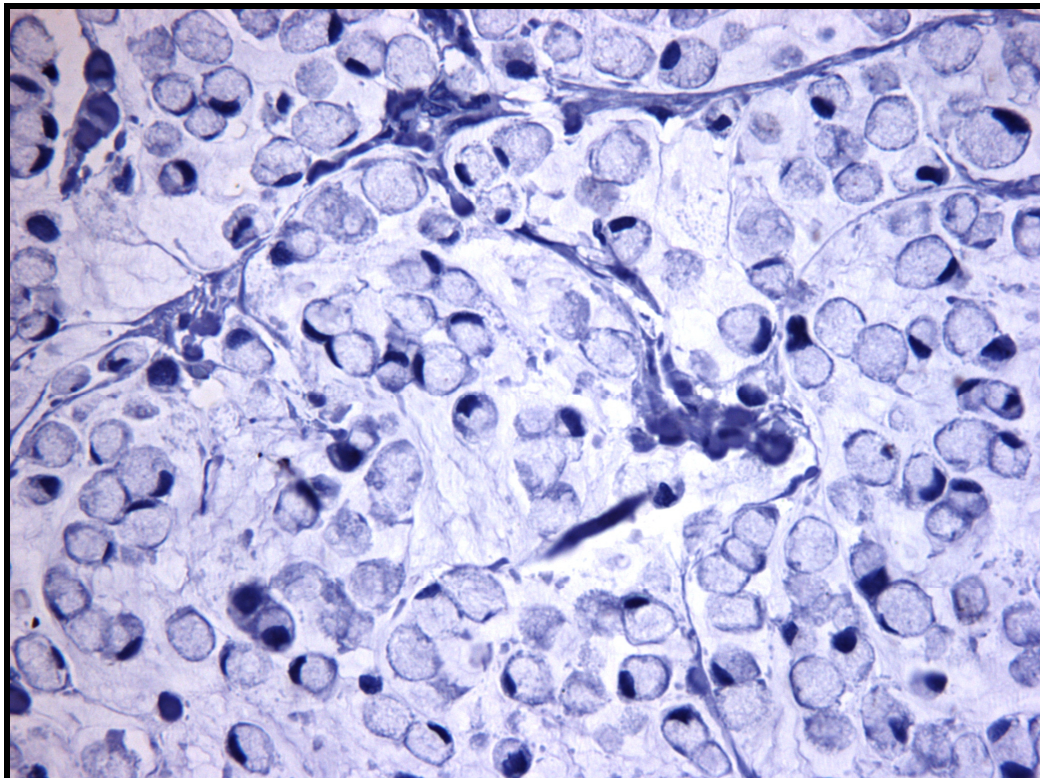
Na figura 18, evidencia-se um caso de carcinoma colorretal com células em “anel de sinete”, células isoladas, que não apresentam nenhuma expressão de Caderina-E (escore 0).

Figura 17 – Imunoexpressão de Caderina-E em células agrupadas de padrão glandular de carcinoma colorretal



Neoplasia de padrão glandular, adenocarcinoma colorretal, com marcação membranar pura de Caderina-E

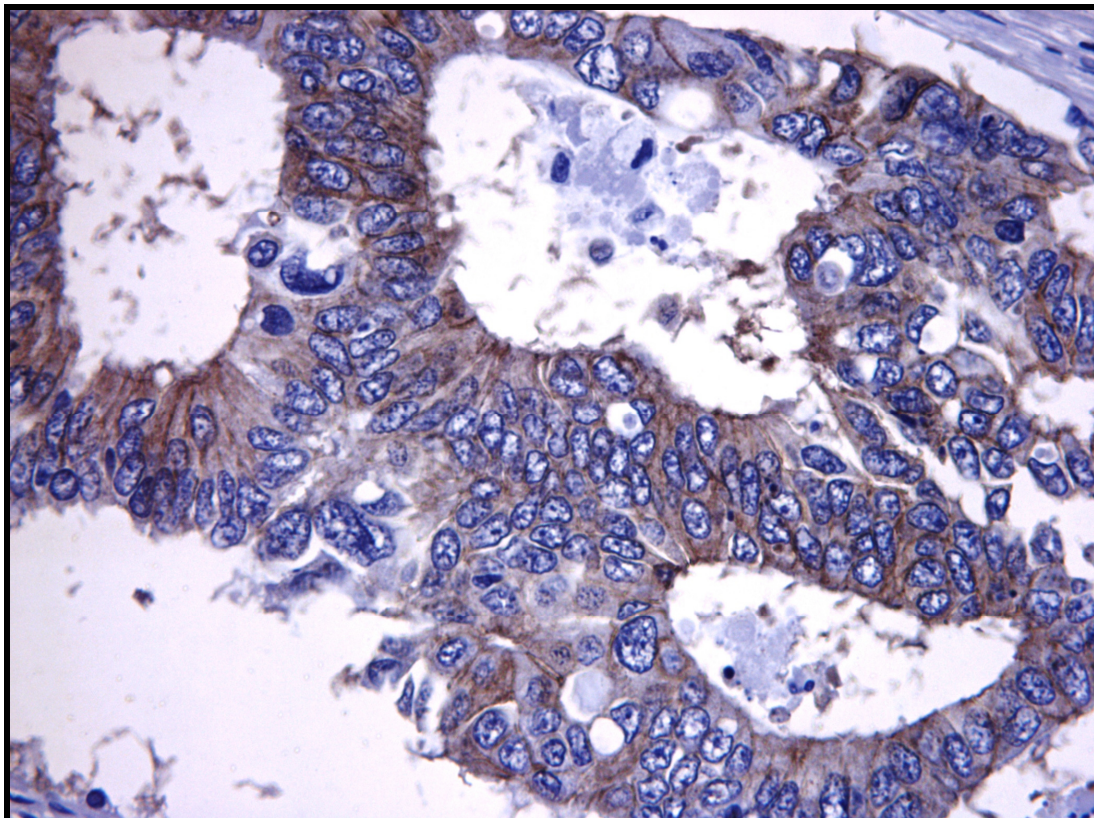
Figura 18 – Imunoexpressão de Caderina-E em células isoladas do tipo “anel de sinete” de carcinoma colorretal



Carcinoma colorretal, células isoladas em “anel de sinete”, sem nenhuma expressão de Caderina-E, 400x

Na figura 19, pode-se observar outro caso de carcinoma colorretal de padrão glandular onde as células apresentaram marcação de Caderina-E, tanto membranar quanto citoplasmática (coloração mista, escore 2).

Figura 19 – Imunoexpressão membranar e citoplasmática de Caderina-E em células neoplásicas de carcinoma colorretal



Adenocarcinoma colorretal apresentando expressão de Caderina-E na membrana e no citoplasma das células neoplásicas, 400x

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, utilizando-se a classificação proposta por Jawhari *et al.* (1997), observou-se que 72% dos casos de tumores primários apresentaram expressão de Caderina-E. No entanto, essa expressão se deu predominantemente em um padrão aberrante. Houve uma maior expressão anormal de Caderina-E no carcinoma colorretal em comparação com a mucosa colônica normal e essa associação foi estatisticamente significativa ($p < 0.0001$; Tabela 3 e figura 7).

Esse resultado está de acordo com os estudos de El-Bahrawy *et al.* (2001), El-Bahrawy *et al.* (2002) e Khoursheed *et al.* (2003). Em todos esses trabalhos foi reportada uma expressão aumentada de Caderina-E no tumor primário, no entanto, essa expressão foi predominantemente anormal (citoplasmática ou citoplasmática e membranar).

No entanto, ao estabelecer a comparação entre expressão de Caderina-E no tumor primário e na mucosa normal utilizando-se os critérios propostos por Almeida *et al.* (2010), não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre expressão membranar e expressão não-membranar de Caderina-E ($p = 0.1966$; Tabela 4). Faz-se mister observar que esta última abordagem agrupa como expressão membranar os escores 2 e 3, ou seja, tanto os casos de expressão mista (membranar e citoplasmática) como os de expressão puramente membranar.

A ausência de diferença estatisticamente significativa quando se utilizam os critérios de Almeida *et al.* retrata um achado interessante dessa pesquisa, qual seja, que 67% dos tumores primários apresentaram expressão membranar de Caderina-E, seja pura ou mista, sugerindo que não há uma perda total de expressão membranar no carcinoma colorretal primário, mas sim uma redistribuição citoplasmática, levando a um padrão de expressão anormal de Caderina-E em comparação com a mucosa normal.

Outro estudo bastante interessante, realizado por Elzagheid *et al.*, mostrou expressão predominantemente membranar de Caderina-E no epitélio colônico normal, porém, nos casos de carcinoma colorretal primário, houve expressão predominantemente mista (membranar e citoplasmática), de acordo, portanto, com os resultados desta pesquisa. Adicionalmente, os autores reportam uma taxa de sobrevida livre de doença menor em associação com a expressão citoplasmática de Caderina-E nos tumores primários (ELZAGHEID *et al.*, 2006).

No entanto, há um estudo recente com resultado controverso. Bezdekova *et al.* (2012), analisando a expressão de Caderina-E em carcinomas colorretais, encontraram forte

expressão de Caderina-E em todos os casos de carcinoma colorretal e reportaram que a expressão encontrada foi puramente membranar, não havendo casos de expressão anormal (localização citoplasmática ou mista).

Outros estudos, com resultados também controversos, demonstraram uma associação entre a diminuição da expressão de Caderina-E e a progressão tumoral no carcinoma colorretal (KHOURSHEED, 2003; SHIONO *et al.*, 2006; FANG *et al.*, 2010; ELZAGHEID *et al.*, 2012). Uma abordagem muito interessante foi a realizada por Masur *et al.* que desenvolveram um estudo com seis linhagens celulares de carcinoma colorretal e encontraram uma associação entre baixa expressão de Caderina-E e um aumento na atividade migratória dessas células (MASUR, *et al.*, 2001).

Os resultados aqui apresentados, comparando a expressão de Caderina-E no carcinoma colorretal primário e na mucosa colônica normal, sugerem que a alteração da expressão de Caderina-E no tumor primário é mais qualitativa do que propriamente quantitativa, pois os tumores continuam a expressar Caderina-E, porém, de maneira aberrante.

Ainda, os tumores primários, em sua maioria, apresentaram expressão membranar de Caderina-E, tanto na forma pura, como na forma mista, o que sugere que a Caderina-E é uma molécula de adesão essencial também para manter coesas as células do tumor primário e que a perda de expressão de Caderina-E na membrana é um evento dinâmico, que ocorre no exato momento da transição epitelial-mesenquimal, em que algumas células neoplásicas se destacam do tumor primário e perdem o fenótipo epitelial.

Estabeleceu-se também uma comparação entre a expressão de Caderina-E no tumor primário do carcinoma colorretal e na metástase linfonodal. Utilizando-se a classificação proposta por Jawhari *et al.* (1997) não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p=0.1694$; tabela 5). De forma semelhante, utilizando-se os critérios propostos por Almeida *et al.* (2010), também não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0.2698$; tabela 6). Portanto, não houve diferenças entre o padrão de expressão de Caderina-E no tumor primário e na metástase linfonodal.

Há poucos trabalhos na literatura que tenham realizado essa comparação entre expressão de Caderina-E nos tumores primários e nas metástases linfonodais de carcinoma colorretal. Ikeguchi *et al.* (2001), não encontraram diferença estatisticamente significativa entre a expressão de Caderina-E no carcinoma colorretal primário e nas metástases linfonodais e nem entre o tumor primário e as metástases hepáticas. Curiosamente, os autores desse estudo relataram ainda que encontraram uma expressão aumentada de Caderina-E em

43% das metástases linfonodais e em 46% das metástases hepáticas, em comparação com a expressão no tumor primário.

Em 1995, Gagliardi *et al.* compararam a expressão de Caderina-E em tumores colorretais primários e nas metástases hepáticas e encontraram expressão membranar de Caderina-E em mais de 50% das metástases. Os autores sugeriram que a perda de expressão de Caderina-E na membrana é um processo transitório, por meio do qual as células se destacam do tumor primário, mas que a reexpressão de Caderina-E na membrana seria necessária para a formação da metástase (GAGLIARDI *et al.*, 1995).

Outro estudo, analisando a expressão de Caderina-E em metástases hepáticas mostrou uma expressão bastante aumentada de Caderina-E nas metástases em comparação com o tecido hepático normal, com mais de 85% dos casos de metástases apresentando superexpressão de Caderina-E. Os autores sugerem que as células neoplásicas, ao chegarem ao sítio metastático, voltam a expressar a Caderina-E, readquirindo o fenótipo epitelial, e se agrupam para formar a metástase. (TRUANT *et al.*, 2008).

Um estudo interessante foi realizado por Kanazawa *et al.* (2002), cujos resultados mostraram que as metástases linfonodais de carcinoma colorretal apresentaram expressão de Caderina-E similar à expressão dos tumores primários e que, mesmo nos casos de tumores primários que apresentaram expressão reduzida de Caderina-E, as metástases linfonodais apresentaram uma expressão normal ou aumentada. Os autores sugerem que a Caderina-E participe na adesão celular com consequente formação de êmbolos de células neoplásicas no tecido linfonodal e que estes êmbolos sejam precursores das metástases nesses linfonodos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Batistatou *et al.* (2006) que mostraram que 82% das metástases linfonodais de carcinoma colorretal apresentaram expressão de Caderina-E semelhante à do tumor primário. De acordo com esses resultados, os autores sugerem que a reexpressão de Caderina-E nos linfonodos metastáticos pode ser um mecanismo essencial para a proliferação das células neoplásicas no sítio metastático e que essa reexpressão de Caderina-E seria uma adaptação vantajosa, em termos de sobrevivência, para as células tumorais.

Os estudos retromencionados mostraram resultados que estão de acordo com os resultados encontrados nesta pesquisa. No entanto, há um estudo com resultado controverso. Dorudi *et al.* (1993) encontraram ausência de expressão de Caderina-E em 62% dos casos de metástases linfonodais e em 87% dos casos de metástases hepáticas analisadas. Mesmo assim, os autores citam que, curiosamente, em nove casos de tumores primários que não

apresentaram expressão de Caderina-E, as metástases linfonodais desses tumores apresentaram forte padrão de coloração para esta caderina.

A reexpressão de Caderina-E nas metástases tem sido encontrada também em outros tipos de neoplasias malignas. Mayer *et al.* (1993) mostraram que, em lesões metastáticas de carcinoma gástrico, a expressão de Caderina-E foi até mais forte do que nos tumores primários. Bongiorno *et al.* (1995) encontraram forte expressão de Caderina-E em metástases linfonodais, tanto em neoplasias de pulmão como em cânceres esofágicos. Bukholm *et al.* (2000) não encontraram diferença estatisticamente significativa entre expressão de Caderina-E no tumor primário e na metástase de carcinoma ductal invasivo da mama.

Nesta pesquisa, na maioria dos casos de linfonodos metastáticos, observou-se a presença de metástases linfonodais com padrão glandular e forte expressão de Caderina-E nas membranas das células neoplásicas (Figura 10). De fato, os resultados deste estudo são compatíveis com a maioria dos resultados encontrados na literatura e sugerem que as células neoplásicas ao chegarem aos linfonodos, readquirem o fenótipo epitelial reexpressando a Caderina-E, no processo conhecido como Transição Mesenquimal-Epitelial. Essa reexpressão de Caderina-E parece ter um papel-chave para que as células neoplásicas possam se reagrupar dando origem aos implantes metastáticos.

Posteriormente, neste estudo, foi realizada uma comparação da expressão de Caderina-E em tumores de carcinoma colorretal de células agrupadas e tumores de células isoladas. Utilizando-se a classificação proposta por Jawhari *et al.* (1997), foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa de expressão ($p=0.0230$), sendo que os tumores de células isoladas apresentaram, em sua maioria, ausência de expressão de Caderina-E, diferentemente dos tumores de células agrupadas, que apresentaram expressão membranar de Caderina-E na grande maioria dos casos (Tabela 7 e figura 12).

Ao utilizar os critérios de Almeida *et al.* (2010), observou-se também um diferença estatisticamente significativa ($p=0.0043$), sendo que os tumores de células isoladas, em sua maioria, não apresentaram expressão de Caderina-E na membrana das células neoplásicas, diferentemente dos tumores de células agrupadas que, em sua maioria, apresentaram expressão membranar de Caderina-E (Tabela 7 e figura 13).

Portanto, nos casos de tumores com células agrupadas em padrão glandular e em padrão de blocos, que são tumores mais bem diferenciados, houve uma maior expressão de Caderina-E do que em tumores de células isoladas, pouco diferenciados. Observaram-se inclusive três casos de carcinoma colorretal com células em “anel de sinete”, que são tumores

bastante indiferenciados e agressivos, e que não apresentaram nenhuma expressão de Caderina-E (Figura 18).

De fato, Pignatelli *et al.* (1992), em um estudo com linhagem de células de carcinoma colorretal, chegaram à conclusão de que a expressão de Caderina-E é necessária para manter o padrão glandular dos carcinomas colorretais bem diferenciados e que a perda da expressão desta caderina está associada com tumores mais indiferenciados e com uma maior capacidade de metastatização. Conforme também já mencionado, Masur *et al.* (2001) mostraram experimentalmente que células de carcinoma colorretal que apresentaram baixa expressão de Caderina-E eram dotadas de uma maior capacidade migratória.

Em outro estudo, Khoursheed *et al.* (2003) observaram que a porcentagem de expressão de Caderina-E em carcinomas colorretais bem diferenciados foi maior do que em tumores moderadamente diferenciados. Recentemente, em um estudo bastante sofisticado, Chen *et al.* (2012), trabalhando com linhagens celulares de carcinoma colorretal, através do uso de técnicas de engenharia genética, suprimiram a expressão de Caderina-E nestas células, e verificaram que houve um aumento do potencial replicativo destas células bem como o aparecimento de uma resistência a inibidores de crescimento e um aumento da capacidade de invasão tecidual.

O resultado desta pesquisa está de acordo com as informações encontradas na literatura. Os carcinomas colorretais menos diferenciados (padrão de células isoladas) apresentaram baixa expressão de Caderina-E em comparação com os carcinomas colorretais bem diferenciados (padrão glandular e/ou em blocos), reforçando a tese de que a perda de expressão da Caderina-E está associada a tumores menos diferenciados.

Em uma recente revisão da literatura, Banghu *et al.* (2012) relataram a importância da Transição Epitelial-Mesenquimal para a progressão tumoral, mostrando que o tumor primário mantém suas células coesas por meio de expressão de Caderina-E na membrana e que, no pólo invasor do tumor primário, as células tumorais perdem a expressão de Caderina-E e se destacam do tumor primário, com consequente ganho do fenótipo mesenquimal e aumento da capacidade migratória.

Neste estudo, alguns tumores que apresentaram predominantemente células em padrão agrupado, seja em blocos ou em glândulas, apresentaram também algumas células isoladas, sendo que os blocos de células agrupadas apresentaram uma forte expressão de Caderina-E e as células isoladas se apresentaram sem nenhuma expressão desta caderina, mostrando a importância da Caderina-E como molécula de adesão intercelular. (Figura 15).

A presença, no mesmo caso, de células tumorais agrupadas com expressão membranar de Caderina-E e células isoladas sem expressão de Caderina-E sugere que estas células isoladas tenham se destacado do tumor primário após a perda de expressão das moléculas de adesão intercelular, compatível com as evidências atuais sobre os mecanismos da Transição Epitelial-Mesenquimal.

Utilizando-se tanto a classificação proposta por Jawhari *et al.* (1997) como os critérios de Almeida *et al.* (2010), não foi encontrada diferença estatisticamente significativa de expressão de Caderina-E entre tumores de padrão glandular e tumores de padrão em blocos (Tabela 7).

O resultado era esperado e pode ser justificado pelo fato de que em ambos os casos (padrão glandular e padrão em blocos), as células estão coesas e expressam a Caderina-E, necessária para manter a adesão entre as células.

6 CONCLUSÕES

- Não houve correlação entre a expressão de Caderina-E no carcinoma colorretal primário e as variáveis clínico-patológicas estudadas (sexo, idade, localização anatômica e tamanho do tumor).
- A maior expressão anormal de Caderina-E, com freqüente coloração membranar associada à citoplasmática no carcinoma colorretal primário em comparação com a mucosa colônica normal, indica que a alteração desta molécula de adesão no câncer é mais qualitativa do que quantitativa.
- A expressão membranar de Caderina-E, pura ou associada à expressão citoplasmática, que foi predominante no carcinoma colorretal primário e na metástase linfonodal, sem diferença significativa entre os dois sítios, sugere que a persistência desta molécula de adesão é essencial na invasão local e progressão tumoral deste tipo de câncer.
- A expressão membranar de Caderina-E revelou-se característica peculiar dos carcinomas colorretais bem ou moderadamente diferenciados, com padrão de invasão em células agrupadas, enquanto a ausência deste tipo de expressão associou-se aos tumores pouco diferenciados, de células isoladas.

REFERÊNCIAS

- ABEDIN, M; KING, N. The premetazoan ancestry of cadherins. **Science**, v. 319, p. 946-948, 2008.
- ADELSTEIN, B.; MACASKILL, P.; CHAN, S. F.; KATELARIS, P. H.; IRWIG, L. Most bowel cancer symptoms do not indicate colorectal cancer and polyps: a systematic review. **BMC gastroenterology**, v. 11, 2011. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-230X/11/65>>. Acesso em: 28. Mar. 2013.
- ALMEIDA, P. R.; FERREIRA, V. A.; SANTOS, C. C.; ROCHA-FILHO, F. D.; FEITOSA, R. R.; FALCÃO, E. A. A.; CAVADA, B. K.; RIBEIRO, R. A. E-cadherin immunoexpression patterns in the characterisation of gastric carcinoma histotypes. **J. Clin. Pathol.**, v. 63, p. 635-639, 2010.
- AL-SOHAILY, S.; BIANKIN, A.; LEONG, R.; KOHONEN-CORISH, M.; WARUSAVITARNE, J. Molecular pathways in colorectal cancer. **Journal of Gastroenterology and Hepatology Foundation and Blackwell Publishing Asia Pty Ltd.**, v. 27, p. 1423-1431, 2012.
- ARMITAGE, P.; DOLL, R. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. **British Journal of Cancer**, v. 8, p. 1-12, 1954.
- BANNO, K.; KISU, I.; YANOKURA, M.; TSUJI, K.; MASUDA, K.; UEKI, A.; KOBAYASHI, Y.; YAMAGAMI, W.; NOMURA, H.; TOMINAGA, E.; SUSUMU, N.; AOKI, D. Epimutation and cancer: a new carcinogenic mechanism of lynch syndrome (review). **International Journal of Oncology**, v. 41, p. 793-797, 2012.
- BARANWAL, S.; ALAHARI, S. K. Molecular mechanisms controlling e-cadherin expression in breast cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 384, p. 6-11, 2009.
- BATISTATOU, A.; CHARALABOPOULOS, A. K.; SCOPA C. D.; NAKANISHI, Y.; KAPPAS, A.; HIROHASHI, S.; AGNANTIS, N. J.; CHARALABOPOULOS, K. Expression patterns of dysadherin and e-cadherin in lymph node metastases of colorectal carcinoma. **Virchows Arch.**, v. 448, p. 763-767, 2006.
- BAZENSKY, I.; SHOOBRIDGE-MORAN, C.; YODER, L. H. Colorectal cancer: an overview of the epidemiology, risk factors, symptoms, and screening guidelines. **Medsurg Nursing**, v. 16, p. 46-51, 2007.
- BECKER, S. F.; LANGHE, R.; HUANG, C.; WEDLICH, D.; KASHEF, J. Giving the right tug for migration: cadherins in tissue movements. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 524, p. 30-42, 2012.
- BEZDEKOVA, M.; BRYCHTOVA, S.; SEDLAKOVA, E.; LANGOVA, K.; BRYCHTA, T.; BELEJ, K. Analysis of snail-1, e-cadherin and claudin-1 expression in colorectal adenomas and carcinomas. **Int. J. Mol. Sci.**, v.13, p.1632-1643, 2012.

BHANGU, A.; WOOD, G.; MIRNEZAMI, A.; DARZI, A.; TEKKIS, P.; GOLDIN, R. Epithelial mesenchymal transition in colorectal cancer: seminal role in promoting disease progression and resistance to neoadjuvant therapy. **Surgical Oncology**, v. 21, p. 316-323, 2012.

BOLAND, C. R.; GOEL A. Microsatellite instability in colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 138, p. 2073-2087, 2010.

BOLOCAN, A.; ION, D.; CIOCAN, D. N.; PADURARU, D. N. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. **Chirurgia**, v. 107, p. 555-563, 2012.

BONGIORNO, P. F.; AL-KASSPOOLES, M.; LEE, S. W.; RACHWAL, W. J.; MOORE, J. H.; WHYTE, R. I.; ORRINGER, M. B.; BEER, D. G. E-cadherin expression in primary and metastatic thoracic neoplasms and in barrett's oesophagus. **British Journal of Cancer**, v. 71, p. 166-172, 1995.

BRASCH, J.; HARRISON, O. J.; HONIG, B.; SHAPIRO, L. Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. **Trends in Cell Biology**, v. 22, p. 299-310, 2012.

BUKHOLM, I. K.; NESLAND, J. M.; BORRESEN-DALE, A. L. Re-expression of e-cadherin, α -catenin and β -catenin, but not of γ -catenin, in metastatic tissue from breast cancer patients. **Journal of Pathology**, v. 190, p. 15-19, 2000.

CAPPELL, M. S. From colonic polyps to colon cancer: pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis. **Clin. Lab. Med.**, v. 25, p. 135-177, 2005.

CAPPELL, M. S. Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer. **Gastroenterol. Clin. N. Am.**, v. 37, p. 1-24, 2008.

CARNEIRO, P.; FERNANDES, M. S.; FIGUEIREDO, J.; CALDEIRA, J.; CARVALHO, J.; PINHEIRO, H.; LEITE, M.; MELO, S.; OLIVEIRA, P.; SIMÕES-CORREIA, J.; OLIVEIRA, M. J.; CARNEIRO, F.; FIGUEIREDO, C.; PAREDES, J.; OLIVEIRA, C.; SERUCA, R. E-cadherin dysfunction in gastric cancer – cellular consequences, clinical applications and open questions. **FEBS Letters**, v. 586, p. 2981-2989, 2012.

CENTELLES, J. J. General aspects of colorectal cancer. **International Scholarly Research Network Oncology**, v. 10, p. 1-19, 2012.

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALDS, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 563-572, 2002.

CHEN, W.; FORAN, D. J. Advances in cancer tissue microarray technology: towards improved understanding and diagnostics. **Analytica Chimica Acta**, v. 564, p. 74-81, 2006.

CHEN, X.; WANG, Y.; XIA, H.; WANG, Q.; JIANG, X.; LIN, Z.; MA, Y.; YANG, Y.; HU, M. Loss of e-cadherin promotes the growth, invasion and drug resistance of colorectal cancer cells and is associated with liver metastasis. **Mol. Biol. Rep.**, v. 39, p. 6707-6714, 2012.

CHU, K.; BOLEY, K.; MORAES, R.; BARSKY, S.; ROBERTSON, M. The paradox of e-cadherin: role in response to hypoxia in the tumor microenvironment and regulation of energy metabolism. **Oncotarget**, v. 4, p. 446-462, 2013.

CIVETTA, M. T. M.; CIVETTA, J. D. Carcinogenesis. **Salud Pública de México**, v. 53, p. 405-414, 2011.

COLOTTA, F.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. 30, p. 1073-1081, 2009.

COOPER, K.; SQUIRES, H.; CARROLL, C.; PAPAIOANNOU, D.; BOOTH, A.; LOGAN, R. F.; MAGUIRE, C.; HIND, D.; TAPPENDEN, P. Chemoprevention of colorectal cancer: systematic review and economic evaluation. **Health Technology Assessment**, v. 14, p. 1-205, 2010.

DORUDI, S.; SHEFFIELD, J. P.; POULSOM, R.; NORTHOVER, J. M. A.; HART, I. R. E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study. **American Journal of Pathology**, v. 142, p. 981-986, 1993.

DYSON, J. K.; RUTTER, M. D. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk? **World J. Gastroenterol.**, v. 18, p. 3839-3848, 2012.

EL-BAHRAWY, M. A.; POULSOM, R.; JEFFERY, R.; TALBOT, I.; ALISON, M. R. The expression of e-cadherins and catenins in sporadic colorectal carcinoma. **Human Pathology**, v. 32, p. 1216-1224, 2001.

EL-BAHRAWY, M. A.; TALBOT, I. C.; POULSOM, R.; JEFFERY, R.; ALISON, M. R. The expression of e-cadherin and catenins in colorectal tumours from familial adenomatous polyposis patients. **Journal of Pathology**, v. 198, p. 69-76, 2002.

ELZAGHEID, A.; ALGARS, A.; BENDARDAF, R.; LAMLUM, H.; RISTAMAKI, R.; COLLAN, Y.; SYRJANEN, K.; PYRHONEN, S. E-cadherin expression pattern in primary colorectal carcinomas and their metastases reflects disease outcome. **World J. Gastroenterol.**, v. 12, p. 4304-4309, 2006.

ELZAGHEID, A.; BUHMEIDA, A.; LAATO, M.; EL-FAITORI, O.; SYRJÄNEN, K.; COLLAN, Y.; PYRHÖNEN, S. Loss of e-cadherin expression predicts disease recurrence and shorter survival in colorectal carcinoma. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 120, p. 539-548, 2012.

ESTELLER, M. Epigenetics in cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 1148-1159, 2008.

FANG, Q.; LÜ, L.; YANG, B.; ZHAO, Z.; WU, Y.; ZHENG, X. L1, β -catenin, and e-cadherin expression in patients with colorectal cancer: correlation with clinicopathologic features and its prognostic significance. **Journal of Surgical Oncology**, v. 102, p. 433-442, 2010.

FILIZ, A. I.; SENOL, Z.; SUCULLU, I.; KURT, Y.; DEMIRBAS, S.; AKIN, M. L. The survival effect of e-cadherin and catenins in colorectal carcinoma. **Colorectal Dis.**, v. 12, p. 1223-1230, 2010.

FLEMING, M.; RAVULA, S.; TATISHCHEV, S. F.; WANG, H. L. Colorectal carcinoma: pathologic aspects. **J. Gastrointest. Oncol.**, v. 3, p. 153-173, 2012.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nat Rev Cancer.**, v. 3(5), p. 362-374, 2003.

GAGLIARDI, G.; KANDEMIR, O.; LIU, D.; GUIDA, M.; BENVESTITO, S.; RUERS, T. G. M.; BENJAMIN, I. S.; NORTHOVER, J. M. A.; STAMP, G. W. H.; TALBOT, I. C.; PIGNATELLI, M. Changes in e-cadherin immunoreactivity in the adenoma-carcinoma sequence of the large bowel. **Virchows Archiv.**, v. 426, p. 149-154, 1995.

GREAVES, M. Darwinian medicine: a case for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 213-221, 2007.

GUARINO, M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 2153-2160, 2007.

GUO, W.; REN, D.; CHEN, X.; TU, X.; HUANG, S.; WANG, M.; SONG, L.; ZOU, X.; PENG, X. HEF1 promotes epithelial mesenchymal transition and bone invasion in prostate cancer under the regulation of microRNA-145. **Carcinogenesis**, fev. 2013. Disponível em: <<http://carcin.oxfordjournals.org/content/early/2013/03/13/carcin.bgt063.long>>. Acesso em: 28. Mar. 2013.

GURGEL, D. C.; DORNELAS, C. A.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; RIBEIRO, R. A.; ALMEIDA, P. R. C. An adapted tissue microarray for the development of a matrix arrangement of tissue samples. **Pathology – Research and Practice**, v. 208, p. 167-168, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HAQ, S.; ALI, S.; MOHAMMAD, R.; SARKAR, F. H. The complexities of epidemiology and prevention of gastrointestinal cancers. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, p. 12556-12572, 2012.

HATOUM, H. A.; SAAD, G. S. A.; OTROCK, Z. K.; BARADA, K. A.; SHAMSEDDINE, A. I. Metastasis of colorectal carcinoma to the testes: clinical presentation and possible pathways. **Int. J. Clin. Oncol.**, v. 16, p. 203-209, 2011.

HENDRIX, A.; GESPACH, C.; BRACKE, M.; WEVER, O. D. The tumor ecosystem regulates the roads for invasion and metastasis. **Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.**, v. 35, p. 714-719, 2011.

HULPIAU, P.; ROY, F. V. Molecular evolution of the cadherin superfamily. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, p. 349-369, 2009.

HULPIAU, P.; ROY, F. V. New insights into the evolution of metazoan cadherins. **Mol. Biol. Evol.**, v. 28, p. 647-657, 2011.

HUNT, N. C. A.; DOUGLAS-JONES, A. G.; JASANI, B.; MORGAN, J. M.; PIGNATELLI, M. Loss of e-cadherin expression associated with lymph node metastases in small breast carcinomas. **Virchows Arch.**, v. 430, p. 285-289, 1997.

HYAFIL, F.; MORELLO, D.; BABINET, C.; JACOB, F. A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. **Cell**, v. 21, p. 927-934, 1980.

IKEGUCHI, M.; MAKINO, M.; KAIBARA, N. Clinical significance of e-cadherin-catenin complex expression in metastatic foci of colorectal carcinoma. **Journal of Surgical Oncology**, v. 77, p. 201-207, 2001.

IKEGUCHI, M.; TANIGUCHI, T.; MAKINO, M.; KAIBARA, N. Reduced e-cadherin expression and enlargement of cancer nuclei strongly correlate with hematogenic metastasis in colorectal adenocarcinoma. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 35, p. 839-846, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2012: incidência de câncer colorretal no Brasil. Rio de Janeiro (RJ), 2011. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal>>. Acesso em: 20 dez. 2013.

ISMAILI, M. Treatment of colorectal liver metastases. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 9, 2011. Disponível em: <<http://www.wjso.com/content/9/1/154>>. Acesso em: 28. Mar. 2013.

IWAISAKO, K.; BRENNER, D. A.; KISSELEVA, T. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 27, p. 65-68, 2012.

JANKOWSKI, J.; HUNT, R. Cyclooxygenase-2 inhibitors in colorectal cancer prevention: counterpoint. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 17, p. 1858-1861, 2008.

JASPERSON, K.; TUOHY, T. M.; NEKLASON, D. W.; BURT, R. W. Hereditary and familial colon cancer. **Gastroenterology**, v. 138, p. 2044-2058, 2010.

JAWHARI, A.; JORDAN, S.; POOLE, S.; BROWNE, P.; PIGNATELLI, M.; FARTHING, M. J. G. Abnormal immunoreactivity of the e-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma: relationship with patient survival. **Gastroenterology**, v. 112, p. 46-54, 1997.

KANAZAWA, N.; ODA, T.; GUNJI, N.; NOZUE, M.; KAWAMOTO, T.; TODOROKI, T.; FUKAO, K. E-cadherin expression in the primary tumors and metastatic lymph nodes of poorly differentiated types of rectal cancer. **Surg. Today**, v. 32, p. 123-128, 2002.

KHOURSHEED, M. A.; MATHEW, T. C.; MAKAR, R. R.; LOUIS, S.; ASFAR, S. K.; AL-SAYER, H. M.; DASHTI, H. M.; AL-BADER, A. Expression of e-cadherin in human colorectal cancer. **Surg. J. R. Coll. Surg. Edinb. Irel.**, v. 1, p. 86-91, 2003.

KNUDSON, A. Retinoblastoma: teacher of cancer biology and medicine. **Public Library of Science**, v. 2, p. 953-954, 2005.

KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIEMI, A.; BARLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; TORHORST, J.; MIHATSCH, M. J.; SAUTER, G.; KALLIONIEMI, O. P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nature Medicine**, v. 4, p. 844-847, 1998.

KUPHAL, S.; BOSSERHOFF, A. K. E-cadherin cell-cell communication in melanogenesis and during development of malignant melanoma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 524, p. 43-47, 2012.

KYUNO, D.; KOJIMA, T.; YAMAGUCHI, H.; ITO, T.; KIMURA, Y.; IMAMURA, M.; TAKASAWA, A.; MURATA, M.; TANAKA, S.; HIRATA, K.; SAWADA, N. Protein kinase $C\alpha$ inhibitor protects against downregulation of claudin-1 during epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer. **Carcinogenesis**, mar. 2013. Disponível em: <<http://carcin.oxfordjournals.org/content/early/2013/03/18/carcin.bgt057.long>>. Acesso em: 28. Mar. 2013.

LANGHEINRICH, M. C.; SCHELLERER, V.; PERRAKIS, A.; LOHMÜLLER, C.; SCHILDBERG, C.; NASCHBERGER, E.; STÜRZL, M.; HOHENBERGER, W.; CRONER, R. S. Molecular mechanisms of lymphatic metastasis in solid tumors of the gastrointestinal tract. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 5, p. 614-623, 2012.

LEE, S.; BANG, S.; SONG, S.; LEE, I. Differential expression in normal-adenoma-carcinoma sequence suggests complex molecular carcinogenesis in colon. **Oncology Reports**, v. 16, p. 747-754, 2006.

LEOPOLD, P. L.; VINCENT, J.; WANG, H. A comparison of epithelial-to-mesenchymal transition and re-epithelization. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, p. 471-483, 2012.

LI, J.; YANG, B.; ZHOU, Q.; WU, Y.; SHANG, D.; GUO, Y.; SONG, Z.; ZHENG, Q.; XIONG, J. Autophagy promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through activation of epithelial-mesenchymal transition. **Carcinogenesis**, fev. 2013. Disponível em: <<http://carcin.oxfordjournals.org/content/early/2013/03/13/carcin.bgt063.long>>. Acesso em: 28. Mar. 2013.

LOHMANN, D. R.; GERICK, M.; BRANDT, B.; OELSCHLÄGER, U.; LORENZ, B.; PASSARGE, E.; HORSTHEMKE, B. Constitutional RB-1 gene mutations in patients with isolated unilateral retinoblastoma. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 61, p. 282-294, 1997.

LYALL, M. S.; DUNDAS, S. R.; CURRAN, S.; MURRAY, G. Profiling markers of prognosis in colorectal cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, p. 1184-1191, 2006.

MACDONALD, I. C.; GROOM, A. C.; CHAMBERS, A. F. Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models. **Bioessays**, v. 24, p. 885-893, 2002.

MASTERSON, J.; O'DEA, S. Posttranslational truncation of e-cadherin and significance for tumour progression. **Cells Tissues Organs**, v. 185, p. 175-179, 2007.

MASUR, K.; LANG, K.; NIGGEMANN, B.; ZANKER, K. S.; ENTSCHLADEN, F. High PKC α and low e-cadherin expression contribute to high migratory activity of colon carcinoma cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, p. 1973-1982, 2001.

MAYER, B.; JOHNSON, J. P.; LEITL, F.; JAUCH, K. W.; HEISS, M. M.; SCHILDBERG, F. W.; BIRCHMEIER, W.; FUNKE, I. E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. **Cancer Research**, v. 53, p. 1690-1695, 1993.

MIETTINEN, M. A simple method for generating multitissue blocks without special equipment. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, v. 20, p. 410-412, 2012.

NATALWALA, A.; SPYCHAL, R.; TSELEPIS, C. Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, p. 3792-3797, 2008.

NIESSEN, C. M.; LECKBAND, D.; YAP, A. S. Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. **Physiol. Rev.**, v. 91, p. 691-731, 2011.

ODA, H.; TAKEICHI, M. Structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. **J. Cell Biol.**, v. 193, p. 1137-1146, 2011.

PAGET, S. Distribution of secondary growths in cancer of the breast. **The Lancet**, v. 133, p. 571-573, 1889.

PANTEL, K.; BRAKENHOFF, R. H. Dissecting the metastatic cascade. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 449-456, 2004.

PATEL, S. G.; AHNEN, D. J. Familial colon cancer syndromes: an update of a rapidly evolving field. **Curr Gastroenterol Rep.**, v. 14, p. 428-438, 2012.

PAWLIK, T. M.; COSGROVE, D. The role of peri-operative chemotherapy for resectable colorectal liver metastasis: what does the evidence support? **J. Gastrointes. Surg.**, v. 15, p. 410-415, 2011.

PEINADO, H.; PORTILLO, F.; CANO, A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 48, p. 365-375, 2004.

PIERA-VELAZQUEZ, S.; LI, Z.; JIMENEZ, S. A. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. **The American Journal of Pathology**, v. 179, p. 1074-1080, 2011.

PIGNATELLI, M.; LIU, D.; NASIM, M. M.; STAMP, G. W. H.; HIRANO, S.; TAKEICHI, M. Morphoregulatory activities of e-cadherin and beta-1 integrins in colorectal tumour cells. **Br. J. Cancer**, v. 66, p. 629-634, 1992.

PIRES, A. R. C.; ANDREIUOLO, F. M.; SOUZA, S. R. TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built needles. **Diagnostic Pathology**, v. 1, p. 1-5, 2006.

QASEEM, A.; DENBERG, T. D.; HOPKINS JR., R. H.; HUMPHREY, L. L.; LEVINE, J.; SWEET, D. E.; SHEKELLE, P. Screening for colorectal cancer: a guidance statement from the american college of physicians. **Annals of Internal Medicine**, v. 156, p. 378-386, 2012.

ROY, E. V.; BERX, G. The cell-cell adhesion molecule e-cadherin. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 65, p. 3756-3788, 2008.

SCHNEIDER, R.; SCHNEIDER, C.; KLOOR, M.; FÜRST, A.; MÖSLEIN, G. Lynch syndrome: clinical, pathological and genetic insights. **Langenbecks Arch. Surg.**, v. 397, p. 513-525, 2012.

SCHWECHHEIMER, K.; BIRCHMEIER, L. Z. W. E-cadherin in human brain tumours: loss of immunoreactivity in malignant meningiomas. **Virchows Arch.**, v. 432, p. 163-167, 1998.

SHEBL, A. M.; ZALATA, K. R.; AMIN, M. M.; EL-HAWARY, A. K. An inexpensive method of small paraffin tissue microarrays using mechanical pencil tips. **Diagnostic Pathology**, v. 6, p. 1-5, 2011.

SHI, S. R.; SHI, Y.; TAYLOR, C. R. Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 59, p. 13-32, 2011.

SHIONO, S.; ISHII, G.; NAGAI, K.; MURATA, Y.; TSUTA, K.; NITADORI, J.; KODAMA, T.; OCHIAI, A. Immunohistochemical prognostic factors in resected colorectal lung metastases using tissue microarray analysis. **EJSO**, v. 32, p. 308-309, 2006.

SIEGEL, R.; DESANTIS, C.; VIRGO, K.; STEIN, K.; MARIOTTO, A.; SMITH, T.; COOPER, D.; GANSLER, T.; LERRO, C.; FEDEWA, S.; LIN, C.; LEACH, C.; CANNADY, R. S.; CHO, H.; SCOPPA, S.; HACHEY, M.; KIRCH, R.; JEMAL, A.; WARD, E. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. **CA Cancer J. Clin.**, v. 62, p. 220-241, 2012.

SIPOS, F.; GALAMB, O. Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. **World J. Gastroenterol.**, v. 18, p. 601-608, 2012.

SLEEMAN, J. P. The metastatic niche and stromal progression. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 31, p. 429-440, 2012.

SLESSER, A. A. P.; GEORGIU, P.; BROWN, G.; MUDAN, S.; GOLDIN, R., TEKKIS, P. The tumour biology of synchronous and metachronous colorectal liver metastases: a systematic review. **Clin. Exp. Metastasis**, nov. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s10585-012-9551-8>>. Acesso em: 28. Mar. 2013.

TAKEICHI, M. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. **The Journal of Cell Biology**, v. 75, p. 464-474, 1977.

THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 442-454, 2002.

TIAN, X.; LIU, Z.; NIU, B.; ZHANG, J.; TAN, T. K.; LEE, S. R.; ZHAO, Y.; HARRIS, D. C. H.; ZHENG, G. E-cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

TIWARI, N.; GHELDOLF, A.; TATARI, M.; CHRISTOFORI, G. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, p. 194-207, 2012.

TRUANT, S. C.; GOUYER, V. P.; LETEURTRE, E. A.; ZERIMECH, F.; HUET, G. M.; PRUVOT, F. R. E-cadherin and β -catenin mRNA levels throughout colon cancer progression. **Journal of Surgical Research**, v. 150, p. 212-218, 2008.

TSANOU, E.; PESCHOS, D.; BATISTATOU, A.; CHARALABOPOULOS, A.; CHARALABOPOULOS, K. The e-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach. **Anticancer Research**, v. 28, p. 3815-3826, 2008.

VINEIS, P.; SCHATZKIN, A.; POTTER, J. D. Models of carcinogenesis: an overview. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 1703-1709, 2010.

WANEBO, H. J.; LEGOLVAN, M.; PATY, P. B.; SAHA, S.; ZUBER, M.; D'ANGELICA, M. I.; KEMENY, M. E. Meeting the biological challenge of colorectal metastases. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 29, p. 821-839, 2012.

WEIB, J. V.; KLEIN-SCORY, S.; KÜBLER, S.; REINACHER-SCHICK, A.; STRICKER, I.; SCHMIEGEL, W.; SCHWARTE-WALDHOFF, I. Soluble e-cadherin as a serum biomarker candidate: elevated levels in patients with late-stage colorectal carcinoma and FAP. **International Journal of Cancer**, v. 128, p. 1384-1392, 2011.

WEINBERG, R. A. Mechanisms of malignant progression. **Carcinogenesis**, v. 29, p. 1092-1095, 2008.

WEITZ, J.; KOCH, M.; DEBUS, J.; HÖHLER, T.; GALLE, P. R.; BÜCHLER, M. W. *et al.* Colorectal cancer. **Lancet**, v. 365, p. 153-165, 2005.

WELLS, A.; YATES, C.; SHEPARD, C. R. E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 25, p. 621-628, 2008.

WEVER, O. D.; PAUWELS, P.; CRAENE, B. D.; SABBAH, M.; EMAMI, S.; REDEUILH, G.; GESPACH, C.; BRACKE, M.; BERX, G. Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. **Histochem. Cell Biol.**, v. 130, p. 481-494, 2008.

WILMANN, C.; GROSMANN, J.; STEINHAEUER, S.; MANTHEY, G.; WEINHOLD, B.; SCHMITT-GRÄFF, A.; SPECHT, B. U. Soluble serum e-cadherin as a marker of tumour progression in colorectal cancer patients. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 21, p. 75-78, 2004.

WU, Y.; ZHOU, B. P. New insights of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, v. 40, p. 643-650, 2008.

YAO, D.; DAI, C.; PENG, S. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. **Mol. Cancer Res.**, v. 9, p. 1608-1620, 2011.

YONEMURA, S. Cadherin-actin interactions at adherens junctions. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 23, p. 515-522, 2011.

YU, M.; BARDIA, A.; WITTNER, B. S.; STOTT, S. L.; SMAS, M. E.; TING, D. T.; ISAKOFF, S. J.; CICILIANO, J. C.; WELLS, M. N.; SHAH, A. M.; CONCANNON, K. F.; DONALDSON, M. C.; SEQUIST, L. V.; BRACHTEL, E.; SGROI, D.; BASELGA, J.; RAMASWAMY, S.; TONER, M.; HABER, D. A.; MAHESWARAN, S. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. **Science**, v. 339, p. 580-584, 2013.

YUSOF, A. S.; ISA, Z.; SHAH, S. A. Dietary patterns and risk of colorectal cancer: a systematic review of cohort studies (2000-2011). **Asian Pacific J. Cancer Prev.**, v. 13, p. 4713-4717, 2012.