

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ROBERTA LAÍS MENDONÇA DE MATTOS

**CONTEÚDO TECIDUAL DAS PROTEÍNAS CLAUDINA-3 E
OCLUDINA EM PORTADORES DE CÂNCER COLORRETAL:
RELAÇÃO COM VARIÁVEIS CLÍNICAS, HISTOPATOLÓGICAS
E MARCADORES TUMORAIS**

Bragança Paulista
2022

ROBERTA LAÍS MENDONÇA DE MATTOS – RA 001201914946

**CONTEÚDO TECIDUAL DAS PROTEÍNAS CLAUDINA-3 E
OCLUDINA EM PORTADORES DE CÂNCER COLORRETAL:
RELAÇÃO COM VARIÁVEIS CLÍNICAS, HISTOPATOLÓGICAS
E MARCADORES TUMORAIS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Biologia e Patologia de Tumores

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez

Bragança Paulista
2022

WI 529
M393

Mattos, Roberta Laís Mendonça de

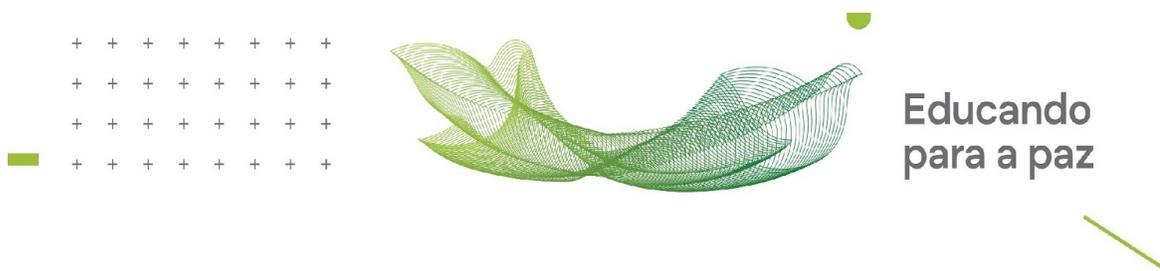
Conteúdo tecidual das proteínas claudina-3 e ocludina em portadores de câncer colorretal: relação com variáveis clínicas, histopatológicas e marcadores tumorais / Roberta Laís Mendonça de Mattos. -- Bragança Paulista, 2022.

93 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Carlos Augusto Real Martinez.

1. Neoplasias colorretais – fisiopatologia. 2. Proteínas de junções íntimas - patologia. 3. Claudina-3 – análise. 4. Ocludina – análise. 5. Metástase neoplástica – fisiopatologia. I. Martinez, Carlos Augusto Real. II. Título.



MATTOS, Roberta Laís Mendonça de. “Conteúdo tecidual das proteínas claudina-3 e ocludina em portadores de câncer colorretal: relação com variáveis clínicas, histopatológicas e marcadores tumorais”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 15 de fevereiro de 2022 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez - Orientador e Presidente
Universidade São Francisco

Prof. Dr. Caled Jaoudat Kadri
Hospital Universitário São Francisco na Providência de Deus

Prof. Dr. Fábio Guilherme Caserta Maryssael de Campos
(por videoconferência)
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz
Universidade São Francisco

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação de mestrado, primeiramente, às duas grandes mulheres da minha vida. A primeira, minha mãe, exemplo de profissional que sempre me incentivou nos estudos e na carreira médica e acadêmica. A segunda, minha avó Adélia, exemplo de mulher forte e batalhadora, que me apoiou em todos os momentos da vida, inclusive durante o mestrado. Ficou muito orgulhosa de ver a neta concluir a pós-graduação. Infelizmente, este ano, ela nos deixou, mas tenho certeza de que, onde estiver, vibrará com esta conquista.

Ao meu querido marido Roque, pelo apoio, carinho e compreensão, principalmente, nos momentos finais da construção desta dissertação.

Ao meu querido professor e orientador Dr. Carlos Augusto Real Martinez, não apenas pela orientação na elaboração deste trabalho, mas por toda a minha formação acadêmica, científica e cirúrgica. Obrigada por nos inspirar a ser profissionais de excelência.

Aos meus queridos alunos por me inspirarem sempre a buscar mais conhecimento e aperfeiçoamento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO (USF)**, pela bolsa de estudos concedida para a realização do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, e por possibilitar a realização e conclusão deste projeto.

Ao **HOSPITAL UNIVERSITÁRIO SÃO FRANCISCO NA PROVIDÊNCIA DE DEUS (HUSF)**, pela autorização para obtenção dos dados clínicos nos prontuários, em especial aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME).

À Profa. **HELENICE PIOVESAN** (*in memoriam*), patologista responsável pelo **CENTRO DE DIAGNÓSTICO EM ANATOMIA PATOLÓGICA (CEDAP)**, pela doação das duplicatas dos blocos de parafina de doentes com câncer colorretal, imprescindível para elaboração deste estudo.

Ao Prof. Dr. **JOSÉ AIRES PEREIRA**, pelo inestimável auxílio e orientação durante a confecção das lâminas histológicas e das técnicas histoquímicas e imuno-histoquímicas.

Aos alunos **MATEUS MAGAMI YOSHITANI** e **GIOVANNA PACCIULLI PEREIRA**, do Programa de Iniciação Científica da USF, pelo auxílio na leitura das lâminas imuno-histoquímicas.

À Dra. **RAYAMA MOREIRA SIQUEIRA**, pela dedicação na revisão dos prontuários e coleta de dados para a realização desta Dissertação, e aos demais residentes de Coloproctologia do Hospital Universitário São Francisco na Providência de Deus.

A todos os Professores do **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS DA SAÚDE DA USF**, em especial à Secretária **ANDREA APARECIDA DE SOUZA FERNANDES**, pela orientação e auxílio durante todo o curso.

E, por fim, agradeço a Deus por mais esta conquista, apesar de algumas turbulências no caminho, ele sempre nos guia para a luz.

*“É preciso ter o caos dentro de si para
gerar uma estrela dançante.”*

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Alterações na junção de oclusão (JO) são descritas nos tecidos com câncer, resultando em um aumento da permeabilidade epitelial e quebra da adesão celular, que se traduz em maior facilidade de migração das células tumorais para outros sítios. Esse aumento da permeabilidade epitelial e a menor adesão intercelular podem desempenhar papel importante na carcinogênese colorretal, particularmente nos tumores malignos metastáticos. Analisar a expressão e o conteúdo tecidual das proteínas ocludina e claudina-3 nos tecidos normais e com adenocarcinoma colorretal, com base em diferentes variáveis clínicas e histopatológicas, verificando sua correlação com o estadiamento da doença e níveis séricos de CEA e CA-19.9. Foram estudados 57 pacientes portadores de CCR submetidos à tratamento cirúrgico pela equipe de Coloproctologia do Hospital Universitário São Francisco na Providência de Deus, no período de 2015 e 2020. Foram analisadas amostras de tecido normal e com adenocarcinoma, obtidas do mesmo paciente. A medida do conteúdo tecidual de ambas as proteínas foi analisada com ajuda de microscopia óptica em uma magnificação final de 200x. Em cada lâmina foram realizadas as colorações de Hematoxilina-Eosina (HE), além de técnica imuno-histoquímica específica para identificar a expressão tecidual das proteínas claudina-3 e ocludina, nos tecidos normal e neoplásico. O conteúdo tecidual de ambas as proteínas foi avaliado por três observadores diferentes que analisaram, em cada lâmina, três campos histológicos distintos. O valor final adotado para cada lâmina analisada foi expresso pela média, com o respectivo desvio padrão, da leitura dos três observadores. O *imunoesscore* final adotado para cada lâmina foi padronizado por escala previamente validada. Para a comparação do conteúdo tecidual de proteínas claudina-3 e ocludina nos tecidos normais e com adenocarcinoma em cada variável histopatológica, foi utilizado o teste de T-Student pareado. Para analisar a correlação entre conteúdo tecidual e o nível de CEA e CA-19.9, foi utilizado o teste de Pearson. Em todos os testes adotou-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As proteínas claudina-3 e ocludina estão localizadas no tecido normal na membrana ápico-lateral, enquanto nos tecidos neoplásicos localizavam-se no citoplasma e no estroma celular. A média do conteúdo tecidual de claudina-3 no tecido normal foi de $2,57 \pm 0,16$, enquanto no tecido neoplásico foi de $1,03 \pm 0,13$. O conteúdo de ocludina foi em média de $2,77 \pm 0,1$ no tecido normal, enquanto no neoplásico foi de $1,08 \pm 0,14$. Em relação as variáveis clínicas, apenas o etilismo apresentou $p < 0,05$ quando comparado o conteúdo tecidual de claudina -3 nos tecidos com adenocarcinoma. Não houve correlação entre o grau de estadiamento e grau de diferenciação tumoral com o conteúdo tecidual de ambas as proteínas. Os valores de CEA elevado mostraram correlação negativa com o conteúdo tecidual de ocludina em tecido normal, enquanto os valores séricos do antígeno CA19.9 mostraram correlação negativa com o conteúdo tecidual de claudina-3 também no tecido normal. O tecido com adenocarcinoma colorretal apresenta menor conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina, independentemente da variável considerada, quando comparado ao tecidual normal.

Palavras-chave: Neoplasias Colorretais. Proteínas de Junções Íntimas. Ocludina. Claudina-3. Metástase Neoplásica.

ABSTRACT

Alterations in occlusion junction (JO) are corrected in cancer tissues, in an increase in epithelial permeability and breakdown of cell adhesion, which translates into easier migration of tumor cells to other sites. This increase in epithelial permeability and reduced intercellular adhesion may play an important role in colorectal carcinogenesis, particularly in metastatic malignant tumors. To analyze the expression and tissue content of occludin and claudin-3 proteins in normal tissues and with colorectal adenocarcinoma in different clinical and histopathological variables, verifying their relationship with disease staging and serum levels of CEA and CA-19.9. Fifty-seven patients with CRC undergoing surgical treatment by the Coloproctology team of Hospital Universitário São Francisco in Providência de Deus, in the period between 2015 and 2020, were studied. Normal tissue and adenocarcinoma obtained from the same patient were analyzed. The measurement of tissue content of both proteins was analyzed using optical microscopy at a final magnification of 200x. In each slide, hematoxylin-eosin (HE) staining and specific immunohistochemical technique were performed to identify tissue expression of claudin-3 and occludin proteins in normal and neoplastic tissues. The tissue content of both proteins was evaluated by three different observers who analyzed three distinct histological fields on each slide. The final value adopted for each analyzed slide was expressed as the mean, with the respective standard deviation, of the reading of the three observers. The final immune score adopted for each slide was standardized by a previously validated scale. To compare the tissue content of claudin-3 and occludin proteins in normal and adenocarcinoma tissues in each histopathological variable used, a paired Student-T test was used. To analyze a correlation between tissue content and the level of CEA and CA-19.9 was used in the Pearson test. In all tests, a significance level of 5% ($p < 0.05$) was adopted. Claudin-3 and occludin proteins are located in the normal tissue on the apical and lateral membrane, while in the neoplastic tissues in cytoplasm and cell stroma. The mean of the tissue content of Claudina-3 in the normal tissue was 2.57 ± 0.16 , while in the neoplastic tissue was 1.03 ± 0.13 . The contents of occludin were 2.77 ± 0.1 in normal tissue, while in the neoplastic was 1.08 ± 0.14 . In relation to clinical variables, only alcohol abuse presented $p < 0.05$ when compared to claudin-3 tissue content in adenocarcinoma tissues. There was no correlation between the degree of staging and degree of tumor differentiation with the tissue content of both proteins. The high CEA values showed a negative correlation with the tissue content of occludin in normal tissue, while the serum values of the CA19.9 antigen showed a negative correlation with the tissue contents of claudin-3 also in the normal tissue. Tissue with colorectal adenocarcinoma has lower tissue content of claudin-3 and occludin regardless of the variable in relation to normal tissue content.

Keywords: *Colorectal Neoplasms. Intimate Junction Proteins. Occludin. Claudin-3. Neoplastic metastasis.*

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

% - Porcentagem

AJCC - *American Joint Committee Cancer*

ANOVA – Análise de Variância

CA19-9 – Antígeno de Câncer 19-9

CAAE – Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

CCR – Câncer colorretal

CEA - Antígeno Carcinoembrionário

CEDAP - Centro de Diagnóstico em Anatomia Patológica

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CIOMS/OMS - Conselho das Organizações Internacionais das Ciências Médicas

CLDN – Genes da família das claudinas

COX-2 – Ciclooxigenase 2

DDS – Sulfato de Dextrana

DII – Doenças Inflamatórias Intestinais

EGF – Fator de Crescimento Epitelial

EUA – Estados Unidos da América

HE - Hematoxilina-Eosina

HUSF – Hospital Universitário São Francisco na Providência de Deus

IH – Imunohistoquímica

INCA – Instituto Nacional do Câncer

JAM – Moléculas de Adesão Juncional

JO – Junções de Oclusão

LIM - Laboratório de Investigação Médica

NCCN - *National Comprehensive Cancer Network*

PET-CT - Tomografia por Emissão de Pósitrons

RNM – Ressonância Nuclear Magnética

SIM – Sistema de Informação sobre Mortalidade

TAMP - Proteínas Integrais Transmembrana

TC – Tecido com Neoplasia

TC – Tomografia Computadorizada

TCDU - Termo de Compromisso de Utilização de Dados

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TN – Tecido normal

TNM – Classificação de Tumores Malignos

USF – Universidade São Francisco

VEGF – Fator de Crescimento Vascular

ZO – Zônula Ocludente

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Junções intercelulares.....	26
FIGURA 2. Mecanismos de disseminação tumoral.....	29
FIGURA 3. Microscopia óptica - Eclipse DS50® - Nikon Inc., Japan.....	36
FIGURA 4. HE do paciente 17, tecido de adenocarcinoma bem diferenciado.....	40
FIGURA 5. HE do paciente 41, tecido de adenocarcinoma moderadamente diferenciado.....	40
FIGURA 6. Imuno-histoquímica de claudina-3 em tecido cólico saudável/normal (paciente 1).....	43
FIGURA 7. Imuno-histoquímica de claudina-3, com aumento 1000X em tecido normal/saudável (paciente 1).....	43
FIGURA 8. Imuno-histoquímica de claudina-3 em tecido cólico com adenocarcinoma (paciente 1).....	44
FIGURA 9. Imuno-histoquímica de claudina-3 em tecido cólico saudável/normal ao lado de tecido com adenocarcinoma bem diferenciado (paciente 17).....	44
FIGURA 10. Imuno-histoquímica de claudina-3 em tecido cólico saudável / normal ao lado de tecido com adenocarcinoma moderadamente diferenciado (paciente 41).....	45
FIGURA 11. Imunohistoquímica de ocludina em tecido cólico normal/saudável (paciente 12).....	45
FIGURA 12. Imuno-histoquímica de ocludina com aumento 1000X, em tecido saudável/normal (paciente 1).....	46
FIGURA 13. Imuno-histoquímica de ocludina em tecido cólico com adenocarcinoma (paciente 1)	46
FIGURA 14. Imuno-histoquímica de ocludina em tecido cólico saudável/ normal ao lado de tecido com adenocarcinoma bem diferenciado (paciente 17).....	47

FIGURA 15. Imuno-histoquímica de ocludina em tecido cólico saudável/normal ao lado de tecido com adenocarcinoma moderadamente diferenciado (paciente 41).....	47
FIGURA 16. Intervalo de Confiança para Conteúdo Tecidual.....	48
FIGURA 17. Gráfico do conteúdo tecidual das proteínas claudina-3 e ocludina em relação ao grau de diferenciação tumoral.....	54

LISTA DE TABELAS E QUADROS

QUADRO 1. Estadiamento do câncer colorretal do tipo adenocarcinoma.....	23
TABELA 1. Distribuição das prevalências dos fatores qualitativos.....	39
TABELA 2. Distribuição da localização do tumor.....	41
TABELA 3. Variáveis histopatológicas	41
TABELA 4. Estadiamento clínico e patológico da amostra - subgrupos.....	42
TABELA 5. Estadiamento reagrupado.....	42
TABELA 6. Análise comparativa do conteúdo tecidual da proteína Claudina-3 entre tecido normal e tumoral e as variáveis analisadas.....	50
TABELA 7. Análise comparativa do conteúdo tecidual da proteína Claudina-3 entre tecido normal e tumoral e as variáveis analisadas.....	52
TABELA 8. Variação das médias do conteúdo tecidual de claudina -3 e ocludina em relação ao grau de diferenciação tanto em tecido saudável, quanto em tecido com adenocarcinoma.....	53
TABELA 9. Correlação entre o conteúdo tecidual de Claudina-3 e Ocludina e o valor sérico de CEA e CA-19-9.....	55
TABELA 10. Correlação entre o conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina e o estadiamento patológico.....	55
TABELA 11. Comparação entre sexo e conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina em tecido normal e tecido com adenocarcinoma.....	56
TABELA 12. Comparação entre etilismo e conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina em tecido norma e tecido com adenocarcinoma.....	56
TABELA 13. Comparação entre tabagismo e conteúdo tecidual de Claudina-3 e Ocludina em tecido normal e tecido com adenocarcinoma.....	57

TABELA 14. Comparação entre doenças associadas e conteúdo tecidual de Claudina-3 e Ocludina em tecido normal e tecido com adenocarcinoma.....	57
TABELA 15. Comparação entre presença de <i>Diabetes Mellitus</i> e conteúdo tecidual de Claudina-3 e Ocludina em tecido normal e tecido com adenocarcinoma.....	58
TABELA 16. Comparação entre presença de HAS e conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina em tecido normal e tecido com adenocarcinoma.....	58
TABELA 17. Comparação entre obesidade e conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina em normal e tecido com adenocarcinoma.....	59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Câncer Colorretal.....	19
1.2. Junção de Oclusão (<i>Tight Junction</i>)	25
1.3. Ocludina e Claudina e sua Relação com a Carcinogênese.....	27
1.4. Mecanismo da Metástase e as Junções de Oclusão.....	28
2. OBJETIVO	31
2.1. Objetivo Geral.....	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODO.....	32
3.1. Ética.....	32
3.2. Casuística.....	32
3.3. Obtenção dos blocos de parafina.....	33
3.4. Técnicas histoquímicas e imuno-histoquímica para confirmação do diagnóstico histológico e identificação da expressão tecidual das proteínas claudina-3 e ocludina.....	33
3.4.1. Fixação e processamento.....	33
3.4.2. Técnica da Hematoxilina-eosina.....	33
3.4.3. Imuno-histoquímica das proteínas claudina-3 e ocludina.....	34
3.4.4. Medida do conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina.....	35
3.5. Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS.....	38
4.1. Casuística.....	38
4.2. Variáveis clínicas.....	38
4.3. Variáveis histopatológicas.....	39

4.3.1 Imuno-histoquímica tecidual de claudina-3.....	43
4.3.2 Imuno-histoquímica do conteúdo tecidual de ocludina.....	45
4.3.3. Conteúdo tecidual das proteínas Claudina-3 e Ocludina.....	48
4.3.4. Avaliação comparativa do conteúdo tecidual de claudina-3 entre tecido normal e tecido com adenocarcinoma e as variáveis.....	48
4.3.5 Avaliação comparativa do conteúdo tecidual de ocludina entre tecido normal e tecido com tumor e as variáveis.....	51
4.3.6 Variância do conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina em comparação com o grau de diferenciação tumoral.....	53
4.3.7 Correlação entre o conteúdo tecidual claudina-3 e ocludina e o valor sérico de CEA e CA19-9.....	54
4.3.8 Correlação entre o conteúdo tecidual claudina-3 e ocludina e o estadiamento clínico patológico.....	55
4.3.9 Avaliação comparativa do conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina e as variáveis clínicas.....	55
4. DISCUSSÃO.....	60
5. CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS.....	72
ANEXOS.....	79
Anexo I: Parecer Consubstanciado do CEP.....	79
Anexo II: Carta de doação dos blocos de parafinas pelo CEDAP.....	83
APÊNDICES.....	84
Apêndice 1 – Tabulação da análise das lâminas atribuída de acordo com o imunoescor utilizado - Examinador 1.....	84
Apêndice 2 - Tabulação da análise das lâminas atribuída de acordo com o imunoescor utilizado - Examinador 2.....	90

Apêndice 3 - Tabulação da análise das lâminas atribuída de acordo com o imunoescor utilizado - Examinador 3.....	92
--	----

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Colorretal

O câncer colorretal (CCR), particularmente os adenocarcinomas são tumores que se desenvolvem na mucosa do colón e do reto. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima-se que, para cada ano do triênio de 2020-2022, 20.520 novos casos de CCR em homens e 20.470 em mulheres serão diagnosticados. Esses valores correspondem a um risco estimado de 19,63 casos novos para cada 100 mil homens, e de 19,03 para cada 100 mil mulheres (1,2). No mundo, anualmente, são diagnosticados cerca de um milhão de novos casos em homens, sendo o segundo tumor mais incidente entre todos os cânceres, com um risco estimado de 26,6/100 mil (3). Nas mulheres, são diagnosticados 800 mil casos novos por ano, sendo o segundo tumor mais frequentemente, com incidência estimada de 21,8/100 mil.

Apesar desses números, a incidência do CCR nos EUA se reduziu a uma taxa de 3% ao ano entre 2011 e 2015, particularmente na população com mais de 50 anos, ao contrário do que ocorreu nos demais países ocidentais, onde houve pequeno aumento da incidência neste mesmo período (3). A queda na mortalidade nos EUA, também foi bastante importante, com redução de 35% entre os anos de 1990 a 2007 (4). No Brasil, o número de mortos, de acordo com o Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), foi de 18.867, sendo 9.207 homens e 9.660 mulheres no ano de 2017. Porém, os índices de mortalidade no Brasil também vêm caindo para ambos os sexos nas últimas décadas (1). São várias as razões para a redução nas taxas de mortalidade e incidência, com destaque para a melhora no diagnóstico precoce por meio dos programas de rastreamento, além do avanço nas modalidades terapêuticas.

Diferentes fatores de risco encontram-se envolvidos no surgimento do CCR. Dentre eles destacam-se os ambientais, genéticos e alimentares, além do histórico de doenças pré-existentes, todos envolvidos com o aumento da incidência do CCR. A predisposição genética está envolvida em apenas 20% dos casos (5), e dentre as síndromes genéticas hereditárias envolvidas merecem destaque a síndrome da polipose adenomatosa familiar e a síndrome de Lynch (antes denominada câncer colorretal não associado à polipose), entre outras (3). Os 80% dos casos restantes de CCR são considerados esporádicos, ou seja, sem correlação com mutações genéticas germinativas, sendo ocasionados por mutações adquiridas ao longo da vida.

O desenvolvimento do CCR é mais incidente a partir dos 50 anos de idade, com uma média de idade de 68 anos para homens e 65 anos para mulheres. Todavia, é importante destacar que a incidência de CCR em pacientes com idade abaixo dos 50 anos vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas (3). Bailey, Hu e You et al. (6), estimam que a incidência

irá aumentar em 90% e 124,2%, para pacientes de 20 e 34 anos, respectivamente, até o ano de 2030. Ainda não se conhecem os motivos para esta maior incidência, porém, a literatura sugere que os achados histopatológicos e genéticos destes tumores são diferentes daqueles que ocorrem nos pacientes mais idosos (7).

Dentre as doenças pré-existentes que apresentam correlação com o aparecimento do CCR, merece destaque as doenças inflamatórias intestinais (DII), nas quais os principais determinantes para o desenvolvimento do CCR são a extensão do acometimento do processo inflamatório ao longo da mucosa cólica, além do tempo de evolução da enfermidade (8). Outras enfermidades também se encontram relacionadas à maior incidência do CCR como: o *diabetes mellitus* do tipo II, a síndrome metabólica e a obesidade (8). Mais recentemente, observou-se que pacientes com deficiência de vitamina D podem apresentar risco mais elevado para o surgimento da doença. Uma metanálise demonstrou que pacientes que apresentam níveis de vitamina D adequados cursam com maior sobrevida e menor taxa de mortalidade quando comparados àqueles com deficiência dessa vitamina (9). Outros possíveis fatores também relacionados à etiopatogenia do CCR são o tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, sedentarismo, consumo de carnes vermelhas em excesso, alimentos defumados, carnes processadas, o excesso de gorduras e a baixa ingestão de fibras vegetais e leite (8).

O CCR é uma doença heterogênea, e para o seu desenvolvimento diversas alterações genéticas estão envolvidas. O câncer é essencialmente um distúrbio proliferativo descontrolado, onde ocorre desequilíbrio entre as proteínas que estimulam a divisão celular (oncogenes) e proteínas que controlam o processo de divisão celular (proteínas supressoras tumorais) (3). Entretanto, somente este desequilíbrio não parece ser suficiente para explicar a rápida progressão tumoral observada nas neoplasias malignas. Para que este grupo de células neoplásicas consiga manter o seu crescimento é necessária uma fonte de suprimento sanguíneo exuberante. A intensa proliferação de vasos sanguíneos, com o intuito de aumentar o aporte de sangue ao tumor e, conseqüentemente, maior oferta de nutrientes, é conhecida como angiogênese. O estímulo para a angiogênese decorre de diversos fatores locais, principalmente representados pela hipóxia e elevação dos níveis de dióxido de carbono (CO₂) ou óxido nítrico, na intimidade do tumor (10). A ciclooxigenase 2 (COX-2) é uma proteína expressa na presença de mediadores locais, fazendo parte da resposta inflamatória mais intensa que ocorre nos tecidos neoplásicos. No CCR, tem sido demonstrado que a maior expressão tecidual COX-2, também está associada à angiogênese estimulando a formação de novos vasos no processo de carcinogênese (11).

A característica mais evidente de um tumor maligno é sua capacidade de invadir tecidos adjacentes, linfonodos loco-regionais e órgãos à distância. As células tumorais podem migrar localmente ou se disseminar pelos vasos linfáticos, venosos, e até mesmo pelos nervos (invasão neural), comprometendo diferentes sítios. Essa capacidade da célula neoplásica é produto de uma série de variações em proteínas específicas. Dentre elas, destacam-se as proteínas que formam os complexos de junções de adesão intercelular, como a β -catenina, E-caderina. No CCR, quando há uma menor expressão dessas proteínas ou modificações no seu padrão de expressão tecidual, ocorre maior potencial metastático das células tumorais. Outras proteínas envolvidas neste processo são as proteases, particularmente as metaloproteinases, enzimas que promovem a digestão do colágeno presente na matriz extracelular e nas membranas celulares (3).

A correta condução clínica dos portadores de CCR direciona que, após o diagnóstico de adenocarcinoma, o tipo histológico mais frequentemente encontrado, deve ser realizado o correto estadiamento clínico da doença, por meio da realização de exames de imagem e dosagem de marcadores tumorais séricos (3). Os exames de imagem disponíveis na atualidade permitem uma avaliação inicial apropriada do grau de penetração do tumor na parede do órgão, presença de linfonodos comprometidos pela neoplasia, e de metástases em outros órgãos (12). Dentre os exames disponíveis, dois merecem atenção especial, sendo eles a tomografia computadorizada (TC) do tórax e abdômen, e a ressonância magnética dedicada da pelve (RNM) naqueles tumores localizados no reto. A tomografia por emissão de pósitrons (PET-CT) não é utilizada de rotina para o estadiamento do CCR. Todavia, a PET-CT está indicada quando existe dúvida na presença de lesões metastáticas, ou na busca de metástases ocultas em doentes que cursam com elevação dos marcadores tumorais, particularmente o antígeno carcinoembrionário (CEA) (12).

A TC do tórax e abdômen é o exame mais utilizado para avaliar a localização do tumor primário e a sua extensão, quando se refere aos tumores de cólon, e a presença de linfonodos aumentados em número e tamanho. O exame tornou-se o principal método utilizado para avaliação inicial da presença metástases pulmonares e hepáticas nos enfermos com CCR (12). Com o advento das TC de grande capacidade de processamento (*multi-slices*) houve melhora da sensibilidade do exame para 85%, com valor preditivo positivo de 96% e valor preditivo negativo de apenas 4% no diagnóstico das metástases hepáticas (13).

A RNM geralmente é utilizada para o estadiamento loco-regional de tumores que acometem o reto, particularmente aqueles localizados abaixo da reflexão peritoneal. É considerado o exame

padrão-ouro para avaliação da penetração da neoplasia na parede do reto e mesorreto (tecido gorduroso perirretal), bem como para a detecção de metástases em linfonodos regionais (mesorretais e pélvicos laterais). A RNM apresenta sensibilidade de 87% e especificidade de 75% na avaliação do tumor primário (14). Porém, o mais importante é que possui especificidade de 94% quanto ao envolvimento circunferencial da margem radial desses tumores, importante fator prognóstico relacionado à maior possibilidade de recidiva loco-regional de doença (12). Para a avaliação do comprometimento de linfonodos, com a melhor qualidade dos equipamentos a RNM, o exame mostrou-se superior à TC pois permite, com a utilização de técnicas funcionais (avaliação da restrição à difusão de água), maior acurácia na distinção entre os linfonodos normais e os comprometidos pela neoplasia. Quanto a sua importância na avaliação de metástases hepáticas, a RNM pode trazer informações adicionais à TC, com o objetivo de aprimorar o conhecimento quanto à ressecabilidade dessas metástases (12). Contudo, apenas o estudo anatomopatológico do espécime cirúrgico pode fornecer essa informação de maneira definitiva (3,12,14). De acordo com as novas diretrizes do *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN-2020), o estadiamento inicial dos portadores de CCR deverá compreender uma TC de tórax e abdome com contraste endovenoso e via oral, e nos casos de tumores de reto extraperitoneal, deve ser acrescentada a RNM dedicada da pelve para o diagnóstico do câncer de reto.

A partir do estadiamento clínico, o especialista tem informações suficientes para propor a conduta terapêutica mais adequada para cada paciente, a depender se ele é portador de uma doença precoce, avançada do ponto de vista loco-regional, ou se há presença de metástases à distância. O tratamento pode ser apenas a ressecção cirúrgica do tumor, podendo ser complementado com quimioterapia adjuvante nos portadores de tumores de cólon avançados. Nos casos dos tumores localizados no reto, particularmente naqueles tumores avançados do ponto de vista loco-regional, o especialista pode indicar a quimioterapia associada à radioterapia neoadjuvante com ressecção ou não do tumor primário, a depender da resposta do tumor à terapia neoadjuvante empregada, demonstrado pelo estadiamento final após o tratamento radioquimioterápico neoadjuvante (3). Após a ressecção cirúrgica do tumor primário, o médico patologista fornece o estadiamento patológico definitivo, segundo as diretrizes presentes na classificação TNM (tumor, linfonodos e metástase), estabelecidas na 8ª edição do *American Joint Committee Cancer (AJCC) Cancer Staging*, publicado em 2017, onde: T1 - o tumor envolve a submucosa; T2 - tumor ultrapassa a submucosa chegando à muscular própria; T3 - tumor penetra através da muscular própria; T4a - tumor penetra o peritônio visceral; T4b - tumor invade órgãos adjacentes (15). Quanto aos linfonodos: N1a - 1 linfonodo positivo; N1b - 2-3 linfonodos positivos;

N1c - quando há presença de implantes tumorais no tecido mesocólico e mesorretal; N2a - 4-6 linfonodos positivos; N2b - 7 ou mais linfonodos positivos. Por fim, a doença metastática é classificada em: M1a - quando está limitada a apenas 1 órgão sólido; M1b - mais de um órgão é acometido; e M1c - na presença de carcinomatose peritoneal (15) (Quadro 1).

QUADRO 1. Estadiamento do câncer colorretal do tipo adenocarcinoma. Fonte: Adaptado da 8ª. ed. *American Joint Committee Cancer (AJCC) Cancer Staging* (15).

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

De acordo com o estadiamento final do tumor, o especialista pode prever o prognóstico do paciente, assim como estimar a possibilidade de recidiva da doença local ou sistêmica. Doentes estratificados em um estadiamento precoce (estádios I e II) apresentam maior potencial de cura da doença. Estima-se que os pacientes com tumores classificados nos estádios I (T1-T2/N0) cursam com uma sobrevida estimada em 5 anos de 93%, para tumores de cólon e, 92% para tumores de reto. De modo distinto, enfermos classificados no estágio II (T3-T4/N0), cursam com sobrevida que varia entre 72%-85% para tumores localizados no cólon, e 56%-73% para aqueles situados no reto. Nos doentes com metástases linfonodais classificados no estágio III, a sobrevida em 5 anos, segundo a literatura, varia de 44%-83% para cólon e 30-67% para o reto. Todavia, naqueles doentes que apresentam metástases à distância (fígado e pulmão, principalmente), portanto classificados no estágio IV, a sobrevida em 10 anos cai para menos 8% (3).

Uma série de alterações avaliadas nos estudos anatomopatológicos também se encontram relacionadas ao prognóstico desfavorável do tumor, mostrando forte associação com a maior chance do desenvolvimento de metástase linfonodais ou à distância. Esses fatores, considerados

de pior prognóstico, podem se apresentar independentemente do estadiamento da doença. Entre eles merecem destaque o grau de diferenciação do tumor (bem, moderadamente, pouco diferenciados e indiferenciados), os subtipos histológicos (carcinoma mucoprodutor, carcinoma com células em anel de sinete), a presença de invasão angiolinfática e perineural, além do *budding* tumoral (ou seja, presença de células isoladas, brotando na margem infiltrativa da neoplasia) (16).

Além das variáveis de valor prognóstico já mencionadas, os níveis séricos de marcadores tumorais como o CEA e o CA-19.9, também se mostram relacionados ao prognóstico da doença. O CEA faz parte da família das imunoglobulinas, sendo considerado uma molécula relacionada aos mecanismos de adesão celular. É produzido pelas células da mucosa normal do trato gastrointestinal, e seus níveis séricos são, geralmente, menores do que 3,5 ng/ml nos indivíduos saudáveis (17). Em determinadas condições, como no adenocarcinoma CCR metastático, seus níveis séricos se elevam em mais de 85% dos casos. O CEA possui uma sensibilidade de 40-47%, e especificidade de 90 a 95% nos portadores de CCR (18). Estes níveis se elevam ainda mais nos doentes com tumores metastáticos que apresentam um maior contingente de células produzindo CEA. Apesar dessa alta especificidade, não é recomendado seu uso para realizar rastreamento de portadores de CCR, pois o marcador também pode se elevar em condições benignas como a cirrose alcoólica, Doença de Crohn, bronquite, tabagismo e insuficiência renal. Todavia, o CEA é um excelente marcador tumoral para estabelecer conduta, prognóstico e seguimento de portadores de CCR.

Em relação ao prognóstico, demonstrou-se que pacientes com CEA elevado no pré-operatório apresentavam maior risco de recidiva da doença quando comparados a pacientes com níveis normais do marcador, além de menor sobrevida em cinco anos (19). No pós-operatório, o CEA é utilizado no seguimento a fim de diagnosticar a presença de recorrência da doença, sendo indicada sua realização a cada três meses nos primeiros dois anos, e após este período, a cada seis meses até se completarem cinco anos do pós-cirúrgico (1). Quando ocorre elevação de seus valores séricos, devem ser realizados exames de imagem para investigação de possível surgimento de metástases. Altos níveis de CEA (> 20ng/ml), geralmente estão relacionados à presença de lesões metastáticas (20), pois esta elevação sanguínea habitualmente está relacionada à maior quantidade de tecido neoplásico produzindo o marcador (17).

O CA19.9 é um antígeno carboidrato de superfície celular, também conhecido como antígeno de Lewis. É liberado na superfície da célula cancerosa e penetra na corrente sanguínea, possibilitando a aferição de seu conteúdo. Este marcador tumoral é utilizado principalmente no

estadiamento e monitorização do câncer de pâncreas e do trato biliar, embora também possa ser empregado nos casos de câncer colorretal, com uma sensibilidade para este último de 30 a 40%. Assim como o CEA, é um marcador de prognóstico e seguimento pós-operatório, e níveis séricos maiores do que o seu valor de referência (37UI/ml) habitualmente estão relacionados a doenças metastáticas e recorrências no pós-operatório (17).

Conhecer os fatores de pior prognóstico dos pacientes é essencial para diminuir o índice de mortalidade devido ao CCR, possibilitando, por exemplo, identificar pacientes estadios II com tais fatores de pior prognóstico e alto risco de recidiva tumoral, além de permitir a indicação de quimioterapia adjuvante (21).

A despeito do vasto conhecimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do tumor primário, o surgimento de metástases linfonodais e à distância ainda é pouco compreendido. A integridade da barreira mucosa do epitélio colônico é mantida por um complexo e intrincado sistema de junções intercelulares. Nos tecidos epiteliais essas junções são representadas pelas junções de oclusão, junções aderentes, junções comunicantes e desmossomos (22). No processo de carcinogênese ocorre a ruptura dessas junções, o que possibilita a migração de células neoplásicas do sítio primário do tumor para órgãos ou estruturas à distância. Entender o comportamento dessas junções no processo carcinogênico é fundamental para elucidar o mecanismo de desenvolvimento de metástases linfonodais e por via hematogênica. Essa melhor compreensão pode contribuir para o desenvolvimento de novos marcadores para o diagnóstico da doença metastática e proposição de novas estratégias terapêuticas.

1.2 Junção de Oclusão (*Tight Junction*)

As junções de oclusão (JO) (*tight junctions*, em inglês) ou zônulas oclusivas, constitui-se numa junção do tipo bloqueadora (23). A característica estrutural desta junção aparece como discretos pontos de fusão entre a membrana plasmática de duas células adjacentes onde, na sua face protoplasmática, aparecem como fios de partículas contínuas que se estendem para o interior das membranas, e na sua face extracelular, aparecem como “ranhaduras”. As JO estão localizadas na porção mais apical das membranas laterais das células que formam o epitélio do trato gastrointestinal (24).

As JO basicamente consistem em três regiões: 1 - as proteínas integrais transmembrana (TAMP), a família das claudinas, a ocludina e as moléculas de adesão juncional (JAM); 2 -

proteínas da periferia que contém a proteína PDZ - zônula ocludente (ZO) -1, -2, -3, e MAGI-1; e 3 - proteínas associadas/reguladoras. As proteínas integrais transmembrana são as principais responsáveis pela organização da estrutura e do controle de sua função via interações homotípicas ou heterotípicas (Figura 1). O sucesso dessa manutenção é possível pela ancoragem das proteínas transmembrana nas proteínas da periferia, como a ZO-1, que funciona como um andaime mantendo unidas as moléculas da JO e promovendo a ligação entre o citoesqueleto e o mecanismo da via de sinalização da célula (25). No epitélio do cólon, a claudina-3 é a proteína presente em maior quantidade na constituição das JO (26).

São descritas quatro principais funções das JO: 1 - a selagem do espaço intercelular e a separação dos fluidos compartimentais, criando uma fronteira entre os domínios apical e basocelular da membrana plasmática, do epitélio e endotélio; 2 - reservatório das moléculas da JO para atuar como mediadores e transdutores de sinalização da célula e, deste modo, atuar no processo de polarização, diferenciação celular, crescimento celular e proliferação através desta via; 3 - mediadora de adesão celular com outras células; 4 - barreira de migração e motilidade celular (25).

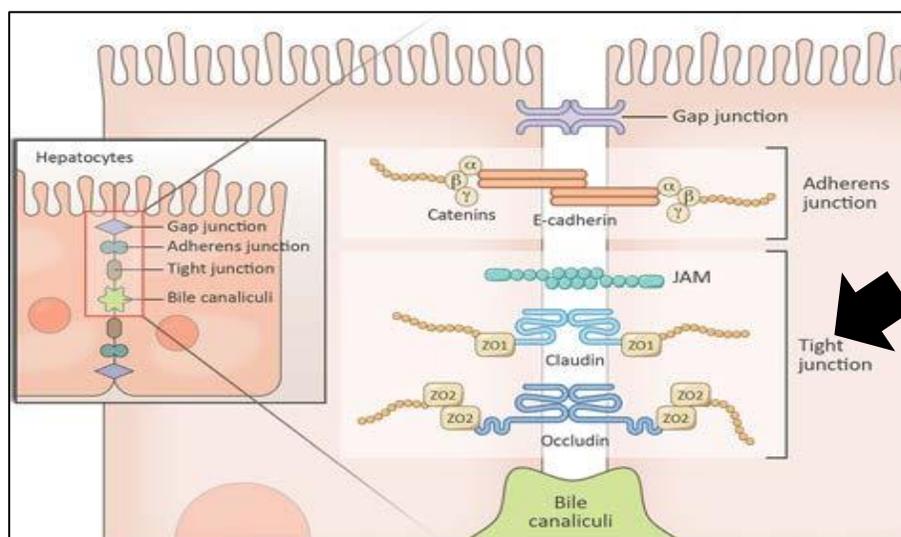


FIGURA 1. Junções intercelulares. Junções celulares na seta preta. Fonte: Pradhan-Sundd e Monga (27).

A adesão das células epiteliais às células vizinhas adjacentes e à matriz extracelular representam o ponto mais importantes para a organização de um tecido epitelial firme. Esta

adesão é essencial para a regulação do processo de diferenciação, expressão de genes, motilidade e crescimento tecidual (28). As funções regulatórias são mediadas pelas moléculas celulares de adesão, por receptores transmembrana e pelas proteínas do citoesqueleto (29). Nas últimas décadas, se tornou evidente que o desenvolvimento de neoplasias está associado à falha das células epiteliais em formarem uma JO eficiente e estabelecer uma correta polaridade apical-basal (25).

1.3 Ocludina e claudina: relação com a carcinogênese

A claudina e a ocludina são as principais proteínas presentes na JO. As claudinas são transcritas a partir de uma família composta por 27 genes que traduzem e transcrevem proteínas homônimas (30). Alterações na JO são descritas nos tecidos com câncer, resultando em um aumento da permeabilidade paracelular e alteração estrutural. Esse aumento da permeabilidade paracelular de certas substâncias de um componente luminal para o interstício, ou vice-versa, podem desempenhar um papel importante na carcinogênese. Dois mecanismos podem estar envolvidos neste fenômeno. Em um primeiro cenário, antígenos, toxinas, ou outras substâncias presentes no lúmen intestinal atravessam a barreira epitelial comprometida e induzem o aparecimento de uma resposta inflamatória no interstício tecidual. Durante essa quebra da barreira, citocinas pró-inflamatórias destroem as junções de oclusão possibilitando a maior permeabilidade e inflamação local, e favorecendo que células neoplásicas possam se desprender do tumor primário. Em seguida, qualquer condição crônica que aumente a permeabilidade do espaço paracelular na mucosa permite a passagem de fator de crescimento epitelial (EGF) e do fator de crescimento vascular (VEGF) através desta barreira epitelial, promovendo a ativação da cascata de mitose e de mobilidade celular (31). Esse aumento da permeabilidade quebra as junções de oclusão das células endoteliais dos vasos sanguíneos circunvizinhos ao tumor, possibilitando a migração da célula neoplásica para o interior dos capilares peritumorais, representando a segunda etapa do processo do desenvolvimento das metástases, a invasão vascular. A seguir, numa terceira etapa, a célula neoplásica migra pela corrente sanguínea até o momento em que se adere à superfície das células endoteliais de um sítio distante. Uma nova quebra das junções de oclusão dessas células endoteliais permite que ocorra a terceira etapa do processo, a migração da célula neoplásica para o tecido onde irá se desenvolver a metástase.

Alguns estudos demonstram que a expressão de genes da família das claudinas (*CLDN*), o *CLDN-3* e *-4*, estão frequentemente alterados em vários tipos de tumores, encontrando-se sobre expressados em tumores de mama, ovário, próstata e pâncreas, enquanto o *CLDN-1*, no

câncer de cólon (32–35). Kinugasa, Huo e Higashi et al. (36), realizaram estudo com 15 espécimes de adenocarcinoma colorretal no qual demonstraram uma sobre expressão de genes relacionados à produção de claudina 1 e -2, e que a sua quantidade dependia do grau de invasão do tumor. Outro estudo, publicado em 2009, analisou em 41 espécimes de tecido humano, com e sem adenocarcinoma, a expressão das claudinas -1, -2, -3 e -4, constatando que o aumento na expressão das claudinas 3 e 4 não foi estatisticamente significativo, enquanto a expressão das claudinas 1 e 2, sim (37).

A ocludina foi a primeira proteína identificada da JO. Trata-se de uma proteína de membrana maior que a claudina, com quatro domínios transmembrana, formando duas alças extracelulares e uma longa cauda citoplasmática. O peptídeo está ligado ao sistema de apoptose envolvido na ativação da proteína quinase, sinalizando a via de mitose (31).

Outra interação descrita é a capacidade que a interleucina-17 possui em manter a função da JO em tecidos epiteliais. Lee, Tato e Joyce-Shaikh et al. (38), demonstraram que a interleucina-17 é capaz de estimular a função de barreira por meio da regulação da localização da ocludina nas JO após o dano epitelial, em tecidos de ratos, pelo sulfato de dextrana (DDS), protegendo o tecido contra o aumento da permeabilidade celular.

Poucos estudos avaliaram a expressão de ocludina comparando tecidos normais e neoplásicos em portadores de CCR. Um deles demonstrou que havia redução da sua expressão nos tecidos com CCR em comparação ao tecido normal, e que esse decréscimo mostrava correlação com o estadio do tumor. Os autores demonstraram que tumores mais avançados cursam com menor expressão tecidual de ocludina (39). Nos tumores colorretais metastáticos, a ocludina não era encontrada nas membranas basolaterais ou ápico-laterais das células, sendo encontrada no estroma tecidual e no interstício do tecido neoplásico (40).

1.4 Mecanismo das metástases e as Junções de Oclusão

O mecanismo para o desenvolvimento de metástases decorre de uma cascata de eventos, que pode ser dividida em três processos: invasão, invasão vascular e a evasão vascular (25).

Mecanismos de ruptura das junções de oclusão

1. Despregamento das células neoplásicas do tumor primário
2. Migração das células neoplásicas através do endotélio capilar
3. Estravazamento da célula neoplásica do interior vaso sanguíneo para os tecidos

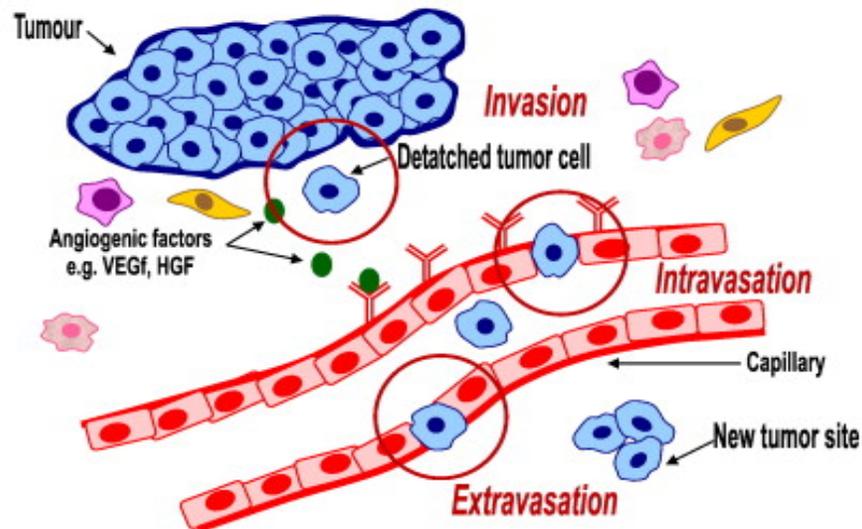


FIGURA 2. Mecanismos de disseminação tumoral. Fonte: Martim (25).

O processo de invasão ocorre quando células tumorais malignas se dissociam da massa primária tumoral devido à perda da adesão célula-célula, seguida da invasão do estroma adjacente. Isso envolve a secreção de substâncias que degradam a membrana basal e a matriz celular e, também, pela supressão ou expressão de proteínas envolvidas na motilidade e migração celular (25).

Os tumores maiores de 2 mm de diâmetro necessitam estabelecer uma conexão com os vasos sanguíneos para aumentar o suprimento de nutrientes ao tumor primário. Essa conexão fornece uma rota para que as células tumorais desprendidas da lesão primária entrem no sistema circulatório e se disseminem para sítios secundários e terciários, ocorrendo o processo de invasão vascular (41). As células tumorais desprendidas no sistema circulatório terão de sobreviver ao sistema imune para que consigam chegar intactas aos tecidos à distância.

O processo de extravasamento, por sua vez, ocorre quando as células tumorais malignas chegam ao receptor endotelial e interagem com ele por meio de reações bioquímicas mediadas por bloqueio de carboidratos, com ligações fracas e rápidas, o que favorece a adesão das células neoplásicas às células endoteliais formando uma forte ligação que, mais tarde, favorece a

penetração dessas células malignas no endotélio e na membrana basal. Quando as células tumorais desprendidas do sítio primário invadem um novo tecido ou órgão, podem ocasionar o desenvolvimento de um novo foco tumoral neste novo tecido invadido (25).

As JO estão localizadas tanto nas células tumorais quanto nas células endoteliais, sendo assim as primeiras estruturas que impediriam a progressão da formação da metástase. Para permitir a penetração de células tumorais é necessário que as proteínas que formam as JO estejam desarranjadas (42). Qualquer alteração das células tumorais, seja por uma maior ou menor regulação das proteínas presentes nas JO, resulta na perda da associação celular e inibição da adesão celular, levando a um crescimento descontrolado, perda de adesão celular e degradação dos demais constituintes da membrana basal.

Mudanças nas células tumorais e endoteliais também são necessárias para o sucesso do crescimento e da propagação das células tumorais para outros locais. Para facilitar a passagem de células tumorais através desta barreira morfofuncional, é preciso ocorrer a perda da associação celular do endotélio e a modulação de proteínas presentes nas JO. Essa perda da estrutura e função das JO não é apenas consequência do processo tumoral, mas sim, essencial para o seu desenvolvimento e persistência, permitindo ainda que o ocorra o processo de desenvolvimento de metástases linfonodais ou hematogênicas (25).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o conteúdo tecidual das proteínas claudina-3 e ocludina, comparando tecidos normal (TN) e neoplásico (TC) em portadores de adenocarcinoma colorretal.

2.2 Objetivos específicos

Comparar o conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina entre TN e TC, em relação às variáveis histopatológicas;

Comparar o conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina no TN e TC, em relação às variáveis clínicas dos doentes;

Comparar e correlacionar o nível sérico dos antígenos CEA e CA19-9 com o conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina nos TN e TC;

Correlacionar o estadiamento clínico patológico com o conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina em TN e TC.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Ética

O projeto de pesquisa relacionado a esta Dissertação foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco (CEP-USF), que segue as Propostas de Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Seres Humanos (Conselho das Organizações Internacionais das Ciências Médicas – CIOMS/OMS, Genebra, 1982 e 1983). O protocolo foi registrado com o CAAE 33278820.1.0000.5514, e aprovado segundo parecer consubstanciado número 4.096.912 emitido em 18 de junho de 2020. (Anexo 1).

3.2 Casuística

Para este estudo descritivo, transversal e retrospectivo, foram selecionados 74 pacientes submetidos a tratamento cirúrgico do câncer colorretal, pela equipe de Coloproctologia do Hospital São Francisco na Providência de Deus (HUSF), no período de 2015 a 2020.

As variáveis clínicas e histopatológicas consideradas para realização deste estudo foram: sexo, idade, etnia, uso de tabaco e álcool, doenças associadas, marcadores tumorais CEA e CA 19-9 e de exames de imagem (para a classificação do estadiamento da doença), presença de metástase linfonodal e/ou hematogênica, dados do estudo anatomopatológico (como grau de diferenciação do tumor e presença de invasão angiolinfática ou perineural). Os dados foram coletados dos prontuários de cada paciente incluído no estudo.

O critério de inclusão estabelecido para seleção dos pacientes com CCR foi a presença de exame histopatológico confirmando o diagnóstico de adenocarcinoma de cólon ou reto, independentemente do grau de diferenciação, do subtipo histológico do tumor ou do estadiamento. Todos os pacientes elegíveis vivos assinaram TCLE. Foram incluídos apenas doentes operados no HUSF pela equipe de Coloproctologia do Hospital.

Foram excluídos os doentes menores de 18 anos, com diagnóstico histológico de neoplasia maligna do cólon e reto diferentes de adenocarcinoma, aqueles que apresentavam uma segunda neoplasia extra intestinal associada, doentes com polipose adenomatosa familiar ou àqueles que preenchessem critérios clínicos suspeitos para a síndrome de Lynch, portadores de CCR associado às DII prévias, os que recusaram assinar o TCLE, e naqueles onde não foi possível levantar no prontuário todas as variáveis clínicas ou histopatológicas consideradas para a elaboração do presente estudo.

3.3 Obtenção dos blocos de parafina

Para a confecção das lâminas histológicas destinadas aos estudos histoquímicos pela coloração pela técnica da Hematoxilina-Eosina (HE), além de imuno-histoquímico para a pesquisa das proteínas claudina-3 e ocludina, foram utilizados blocos de parafina de cada um dos doentes elegíveis para o estudo. Os blocos de parafina (duplicatas) foram cedidos pelo Centro de Diagnóstico em Anatomia Patológica (CEDAP) ao Laboratório de Investigação Médica da Universidade São Francisco (LIM-USF), após o CEDAP ter encerrado suas atividades em Bragança Paulista - SP. Esses blocos de parafina se encontram sob a guarda dos Professores Carlos Augusto Real Martinez e José Aires Pereira, responsáveis pelo LIM-USF. A Carta de Doação assinada dos blocos doados pela Dra. Helenice Piovesan, patologista responsável pelo CEDAP, assim como pelos Professores responsáveis pelo LIM-USF, fiéis depositários do material, encontra-se anexada no final desta Dissertação (Anexo 2)

3.4 Técnicas histoquímicas e imuno-histoquímica para confirmação do diagnóstico histológico e identificação da expressão tecidual das proteínas claudina-3 e ocludina

3.4.1 Fixação e processamento

Cada bloco de parafina, contendo tecido neoplásico e tecido saudável, foi submetido à microtomia, sendo realizados cinco cortes com 5 μ de espessura cada um, para confecção das lâminas destinadas aos estudos histoquímico e imuno-histoquímico. Após processamento histológico, os cortes foram dispostos em lâminas de vidro com extremidades foscas, previamente sinalizadas e identificadas, atribuindo-se um número exclusivo para cada doente.

3.4.2 Técnica da Hematoxilina-eosina

Para a realização da técnica de coloração Hematoxilina-Eosina (HE), os cortes histológicos, depois de colocados em lâminas de vidro, foram expostos à temperatura de 60°C por 12 horas. Concluída esta etapa, para promover a remoção da parafina presente nas lâminas, os cortes histológicos foram submersos em dois banhos de imersão com duração de 10 minutos em xilol, onde permaneceram por 10 minutos. Após a retirada das lâminas do banho em xilol, as lâminas foram submetidas a três banhos de álcool etílico a 70% durante cinco minutos cada. Concluída a hidratação, as lâminas foram submersas no corante Hematoxilina de Harris durante um minuto, sendo posteriormente lavadas em água corrente para remoção do excesso do corante. Finalizada esta etapa, as lâminas foram expostas ao corante Eosina durante dois

minutos e, a seguir, novamente lavadas com água corrente e desidratadas por meio da utilização de três banhos de álcool absoluto, um em xilol/álcool e três de xilol puro. Terminada a técnica de coloração, as lâminas foram montadas utilizando-se lamínulas e resina para o diagnóstico de adenocarcinoma colorretal, bem como para análise de todas as variáveis histopatológicas consideradas para o presente estudo (grau de diferenciação tumoral, tipo histológico do tumor, presença de invasão angiolinfática ou perineural, além do estadiamento TNM).

3.4.3 Imuno-histoquímica das proteínas claudina-3 e ocludina

Após a preparação das lâminas para o estudo imuno-histoquímico, as mesmas foram submersas em solução de *Trilogy* (*Trilogy, Cell Marque, Cod- 920P-04, Lote 1129101B*) em diluição de 1:100 por três vezes, sendo a primeira imersão em banho maria a uma temperatura de 95°C por 45 minutos, a segunda na mesma temperatura por 10 minutos, e a terceira imersão em temperatura ambiente por 30 minutos. Finda esta etapa, as lâminas foram lavadas com dois banhos de água destilada por dois minutos cada, além de dois outros banhos com tampão de PBS com duração de dois minutos cada banho. O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado por meio da incubação das lâminas em uma solução contendo peróxido de hidrogênio 10 V por dez minutos em temperatura ambiente. Terminada esta etapa, as lâminas foram novamente lavadas com dois banhos de água destilada e dois banhos com tampão de PBS, durando dois minutos cada banho. Após disposição dos tecidos a serem estudados, foi realizado o bloqueio de proteínas indesejáveis com a aplicação de leite (Molico, Nestlé do Brasil, Três Corações, MG, Brasil) sobre as lâminas por um período de 30 minutos. Para pesquisa da proteína claudina-3 foi utilizado o anticorpo primário anti-claudina-3, (ABCAM, Referência: ab15102, ABCAM, São Paulo, Brazil), na diluição de 1:300. Para identificar a proteína ocludina foi adotado o anticorpo primário anti-occludina (ABCAM–EPR8208, Referência: ab167161), na diluição de 1:100. Depois de realizada a diluição recomendada para cada anticorpo primário, 100µl do anticorpo primário específico foram adicionados sobre os cortes histológicos em câmara úmida, e expostos por 1 hora à temperatura ambiente. Após a exposição ao anticorpo primário as lâminas foram lavadas com água destilada, dois banhos de dois minutos cada e dois banhos com solução tampão de PBS durando o mesmo tempo. A seguir, foi realizada a incubação com sistema de avidina-biotina (anticorpos secundários) do Kit LSAB+System-HRP (Dako do Brasil, São Paulo, Brasil; Referência K0690, Lote 10068233) com exposição das lâminas por um período de 35 minutos a cada reagente. Concluída esta fase, os cortes foram lavados com dois banhos com solução de tampão de PBS, e revelados com a utilização do *Kit Líquid DAB + Substrate* (Dako do

Brasil, São Paulo, Brasil; Referência K3468, Lote 10066912) na diluição de uma gota de cromógeno em 1 mL de solução tampão, ao qual foi adicionado 100µl do cromógeno sobre os cortes, por um período de incubação de três a cinco minutos à temperatura ambiente. Após a revelação, os cortes foram lavados com água corrente e contra corados com hematoxilina de Harris por 30 segundos. Depois, as lâminas foram novamente lavadas com água corrente até a remoção total do excesso de hematoxilina. Finalmente, foram desidratadas em três banhos de álcool absoluto, um banho de xilol/álcool e dois banhos de xilol, para serem montadas com lamínulas e resina. Como controle positivo da reação imuno-histoquímica utilizou-se tecido de intestino grosso humano que sabidamente expressa ambas as proteínas. Para o controle negativo utilizou-se o mesmo tecido sem, contudo, acrescer o anticorpo primário à reação.

3.4.4 Medida do conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina

A imunocoloração foi considerada positiva quando ocorria coloração acastanhada, com intensidade variada e distribuição homogênea, na região apical e basolateral da membrana celular das células do epitélio cólico. As lâminas foram analisadas com microscópio óptico (Eclipse DS50[®] - Nikon Inc., Japan) com magnificação de imagem de 200x (Figura 3). Para a confirmação do diagnóstico de adenocarcinoma e identificação de todas as variáveis histopatológicas consideradas, todas as lâminas foram revisadas por patologista experiente em neoplasias colorretais que desconhecia o objetivo principal do trabalho.

Para a medida do conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina, utilizou-se uma escala de imunocoloração previamente validada (49). Todas as lâminas foram avaliadas, simultaneamente, por três examinadores independentes, que também desconheciam os objetivos finais do presente estudo. A quantificação do conteúdo tecidual das proteínas foi sempre realizada segundo classificação (*imunoscore*) que considerava a intensidade da coloração na membrana apical e lateral das células presentes nos tecidos normais e neoplásicos (43). Após a seleção de um campo histológico aleatório, cada examinador avaliou individualmente, mas simultaneamente, três campos histológicos distintos em uma mesma lâmina, atribuindo a pontuação da intensidade da coloração obedecendo os seguintes parâmetros: 0 - ausência da coloração acastanhada nas membranas celulares; 1 - coloração acastanhada nas membranas intercelulares em 25% a 50% das células presentes no campo analisado; 2 - coloração acastanhada nas membranas intercelulares presentes em mais de 50% até 75%; e 3 - coloração acastanhada nas membranas intercelulares em mais de 75% do campo estudado. O valor final do conteúdo tecidual encontrado por cada observador em cada lâmina estudada foi a média da soma das três medidas. O valor

final para cada lâmina, tanto no tecido normal quanto neoplásico, foi a soma das leituras dos três observadores, expressa como a média e seu respectivo desvio-padrão. Assim, o cálculo do valor final encontrado tanto no tecido normal quanto no neoplásico, foi constituído pela soma de nove leituras realizadas, obtidas dos três observadores diferentes. Embora os observadores avaliassem um mesmo campo histológico simultaneamente, eles não tinham acesso aos resultados de escore obtido pelos outros dois.



FIGURA 3. Microscópio óptico (Eclipse DS50 - Nikon Inc., Japan). O equipamento foi utilizado para analisar o conteúdo tecidual das proteínas claudina-3, ocludina. Fonte: Acervo dos autores.

3.5 Análise estatística

Para o estudo estatístico foram utilizados os *softwares* SPSS V20, Minitab 16 e Excel Office 2010. Para a análise descritiva dos fatores quantitativos, os resultados foram descritos pela média com seu respectivo desvio padrão. Os fatores qualitativos foram descritos de acordo com sua frequência relativa (percentuais).

Para testar a normalidade das variáveis quantitativas selecionadas foi aplicado o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Após a análise de todas as lâminas de todos os doentes, verificou-se se que havia uma distribuição normal, possibilitando o emprego de teste estatístico paramétrico para

a comparação pareada entre tecido normal e neoplásico. Assim, para análise comparativa do conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina entre os tecidos normal e neoplásico, em cada variável clínica ou histológica considerada, foi aplicado o teste t-Student pareado. Para análise da correlação existente entre conteúdo tecidual da claudina-3 e ocludina no tecido normal e neoplásico, considerando os níveis séricos dos marcadores tumorais CEA e CA19-9, foi utilizado o teste de correlação proposto por Pearson. Por fim, para análise de variância do conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina em tecido normal e neoplásico nos diferentes graus de diferenciação tumoral, foi aplicado o teste de ANOVA. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor do que 0,05 ($p < 0,05$). Os valores de p menores do que 0,05 foram marcados com um asterisco (*), enquanto os valores de p menores do que 0,01 foram marcados com dois (**).

4 RESULTADOS

4.1 Casuística

Dos 74 pacientes inicialmente selecionados para o presente estudo, 16 foram excluídos pois, em cinco pacientes, o estudo histopatológico não confirmou o diagnóstico de adenocarcinoma, sendo um tumor neuroendócrino, um carcinoma espinocelular e três adenomas. Quatro pacientes foram excluídos devido à ausência de dados clínicos ou histopatológicos no prontuário. Oito doentes foram excluídos devido à falha técnica na imunocoloração das lâminas, após três tentativas. Com as exclusões, restaram 57 pacientes elegíveis para o presente estudo, que foram analisados na totalidade de seus dados epidemiológicos e histopatológicos disponíveis.

4.2 Variáveis clínicas

A média de idade da população foi de $64,0 \pm 3,2$ anos. Quanto ao sexo, 54,4% eram mulheres e 45,6% homens. Na amostra, 86% dos pacientes se declararam brancos na admissão hospitalar (Tabela 1).

Com relação aos fatores de risco analisados, encontrou-se a presença de tabagismo em 42,1% e etilismo em 10,5% dos pacientes. Com relação às morbidades relacionadas, 77,2% dos doentes possuíam algum tipo de comorbidades (Tabela 1).

TABELA 1. Distribuição das prevalências das características clínicas da casuística. Fonte: Dados coletados pelos autores.

		n	%
Sexo	Feminino	31	54,4%
	Masculino	26	45,6%
Etnia	Amarela	1	1,8%
	Branca	49	86,0%
	Não declarado	4	7,0%
	Negra	2	3,5%
Tabagismo	Parda	1	1,8%
	Não	33	57,9%
Doenças Associadas	Sim	24	42,1%
	Não	13	22,8%
Diabetes mellitus	Sim	44	77,2%
	Não	48	84,2%
Hipertensão arterial	Sim	9	15,8%
	Não	26	45,6%
Obesidade	Sim	31	54,4%
	Não	53	93,0%
Etilismo	Sim	4	7,0%
	Não	51	89,5%
	Sim	6	10,5%

n = número de casos. % = frequência relativa.

4.3 Variáveis histopatológicas

As Figuras 4 e 5, apresentam, respectivamente, as características histopatológicas presentes no tecido normal e tecido neoplásico, identificados pela técnica histoquímica da HE. Foi possível estabelecer o diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma em 100% dos doentes elegíveis para o presente estudo.

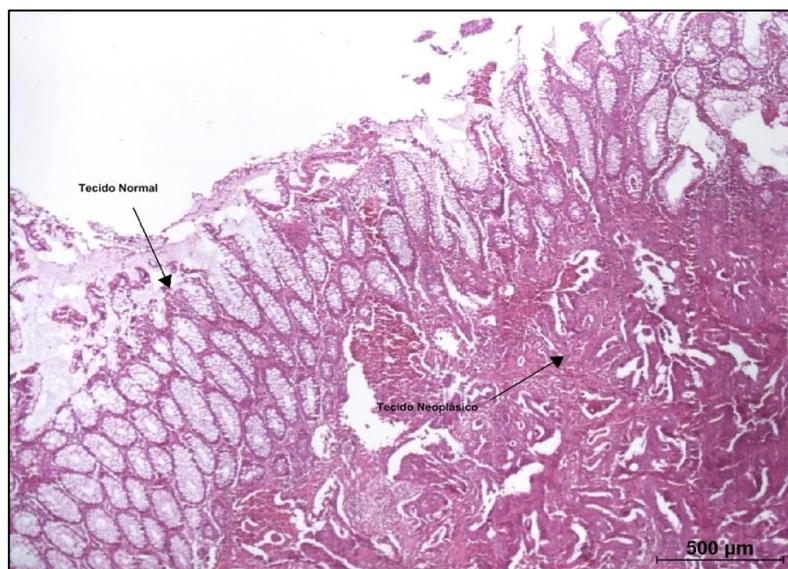


FIGURA 4. Fotomicrografia do doente nº. 41. É possível identificar a presença de tecido normal (seta e legenda) e com adenocarcinoma moderadamente diferenciado (seta e legenda) (HE 40X). Fonte: Acervo dos autores.

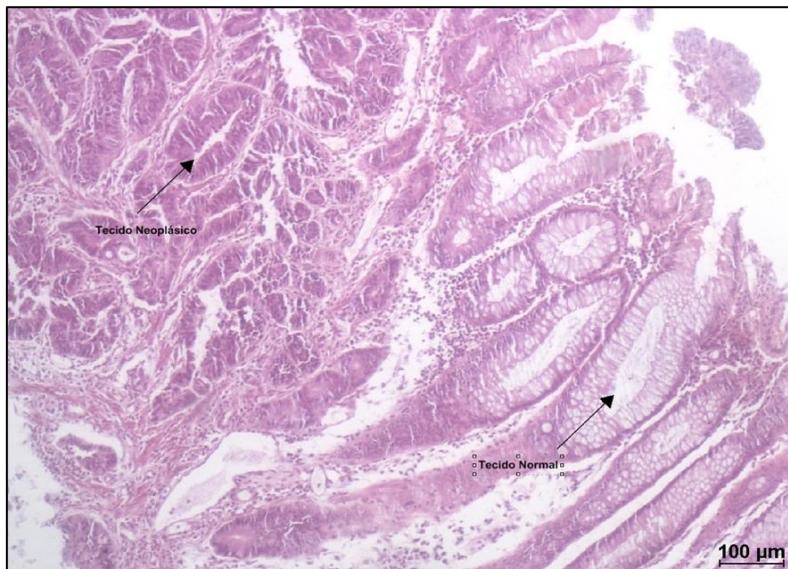


FIGURA 5. Fotomicrografia do doente nº. 17. É possível identificar a presença de tecido normal (seta e legenda) e com adenocarcinoma bem diferenciado (seta e legenda) (HE 100X). Fonte: Acervo dos autores.

Quanto à localização do adenocarcinoma nos diferentes segmentos do intestino grosso, constatou-se que 35,1% dos tumores se localizavam no cólon sigmoide, 19,5% no cólon

ascendente, 13,7% no cólon descendente, 26,1% no reto e 5,4% dos doentes apresentavam tumores sincrônicos (Tabela 2).

TABELA 2. Distribuição da localização do tumor no intestino grosso. Fonte: Dados coletados pelos autores.

Localização do tumor	n	%
Sigmoide	20	35,1%
Reto baixo	6	10,5%
Reto médio	5	8,8%
Reto alto	4	7,0%
Cólon ascendente	11	19,5%
Cólon descendente	8	13,7%
Tumor sincrônico	3	5,4%

n = número de casos. % - frequência relativa.

Quanto ao grau de diferenciação tumoral, 82,5% dos pacientes apresentavam o tipo moderadamente diferenciado, 7% bem diferenciado e 5,3% pouco diferenciado, dados verificados por HE. Nas Figuras 4 e 5, observa-se a diferença de desarranjo celular nos diferentes graus de diferenciação. A invasão perineural está presente em 20% das amostras, e em 24,5% delas foi identificada invasão angiolinfática (Tabela 3).

TABELA 3. Variáveis histopatológicas analisadas. Fonte: Dados coletados pelos autores.

Variável		n	%
Grau de diferenciação	Bem diferenciado	4	7,0%
	Moderadamente	47	82,5%
	Pouco	3	5,3%
Invasão Angiolinfática	Ausente	43	75,5%
	Presente	14	24,5%
Invasão Perineural	Ausente	44	80,0%
	Presente	11	20,0%

n = número de casos. % = frequência relativa

Quanto ao estadiamento clínico e patológico, a nossa amostra apresentou a seguinte distribuição (Tabela 4):

TABELA 4. Estadiamento clínico e patológico da amostra – subgrupos. Fonte: Dados coletados pelos autores.

Estadiamento	n	%
TIS	2	3,5%
1	7	12,3%
2A	1 7	29,8%
2C	1	1,8%
3A	4	7,0%
3B	6	10,5%
3C	5	8,8%
4A	9	15,8%
4B	6	10,5%

n = número de casos. % = frequência relativa

Para realizar o estudo estatístico, reagrupamos o estadiamento dos pacientes em apenas quatro níveis de estadiamento (Tabela 5).

TABELA 5. Estadiamento reagrupado considerado na análise estatística. Fonte: Dados coletados pelos autores.

Estadiamento reagrupado	n	%
Tis	2	3,5%
Estadio 1	7	12,3%
Estadio 2	18	31,6%
Estadio 3	15	26,3%
Estadio 4	15	26,3%

n = número de casos. % = frequência relativa

4.3.1 Imuno-histoquímica tecidual de claudina-3

Nas Figuras 6 e 7, observa-se o conteúdo tecidual de claudina-3 no tecido normal (coloração castanho escuro).

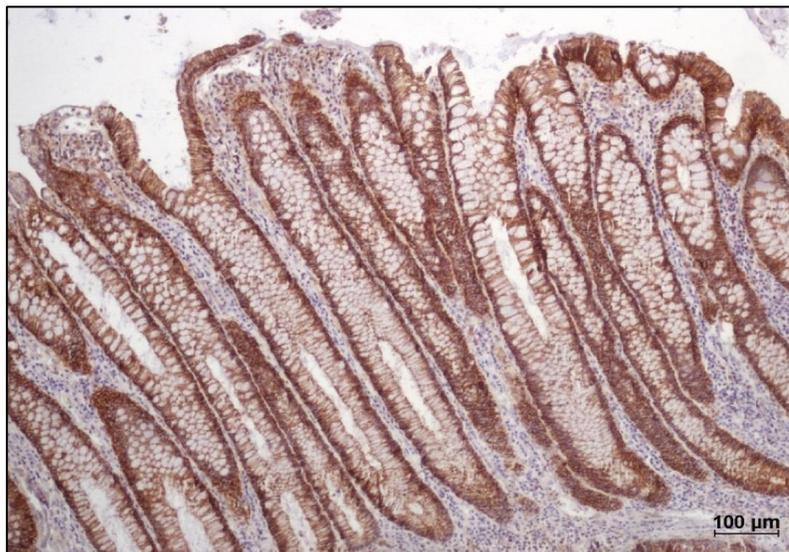


FIGURA 6. Imuno-histoquímica para pesquisa de claudina-3 em tecido cólico normal da doente de nº. 1. A coloração acastanhada representa a expressão tecidual da proteína claudina-3, e em mais de 75% do campo (IH 100X). Fonte: Acervo dos autores.



FIGURA 7. Imuno-histoquímica para pesquisa de claudina-3, em tecido normal da paciente nº. 1. Nota-se a coloração acastanhada presente na membrana lateral e apical das células do epitélio cólico (seta preta) (IH: 1000x). Fonte: Acervo dos autores.

Na Figura 8, observa-se a expressão tecidual da proteína claudina-3 em tecido cólico com adenocarcinoma moderadamente diferenciado. Nas Figuras 9 e 10, observa-se a expressão tecidual de claudina-3 em tecido com adenocarcinoma bem diferenciado e moderadamente diferenciado, respectivamente.

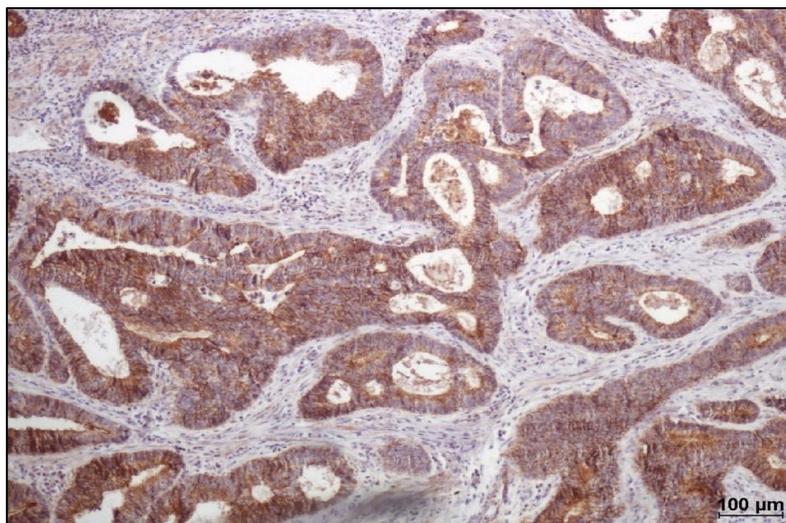


FIGURA 8. Imuno-histoquímica de claudina-3 em tecido com adenocarcinoma da paciente nº.1. A coloração acastanhada fica mais evidente no estroma celular do que na membrana lateral e apical. Fonte: Acervo dos autores.

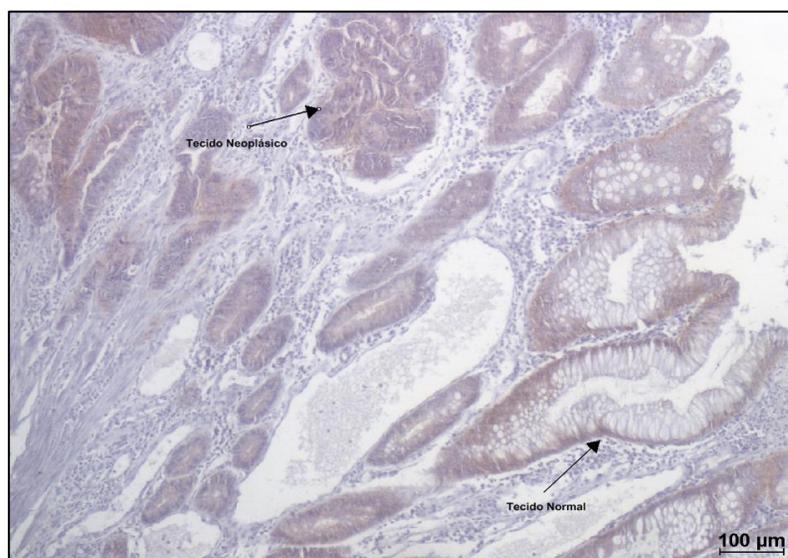


FIGURA 9. Imuno-histoquímica para pesquisa de claudina-3 em tecido cólico normal e neoplásico na doente nº.17. Observa-se distribuição na membrana apical e lateral da coloração acastanhada no tecido saudável, e no citoplasma das células no tecido neoplásico (IH 100x). Fonte: Acervo dos autores.

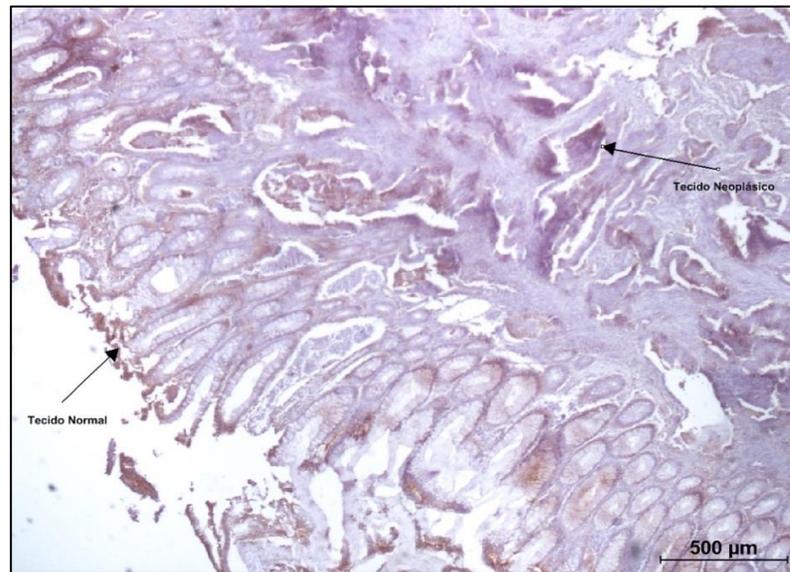


FIGURA 10. Imuno-histoquímica para pesquisa de claudina-3 em tecido cólico normal e neoplásico da paciente nº. 41. Observa-se coloração acastanhada presente no tecido normal na membrana lateral e apical, enquanto no tecido neoplásico a maior expressão ocorre no estroma tecidual (IH 40X). Fonte: Acervo dos autores.

4.3.2 Imuno-histoquímica do conteúdo tecidual de ocludina

Nas Figuras 11 e 12, observa-se o conteúdo tecidual de ocludina em tecido normal.

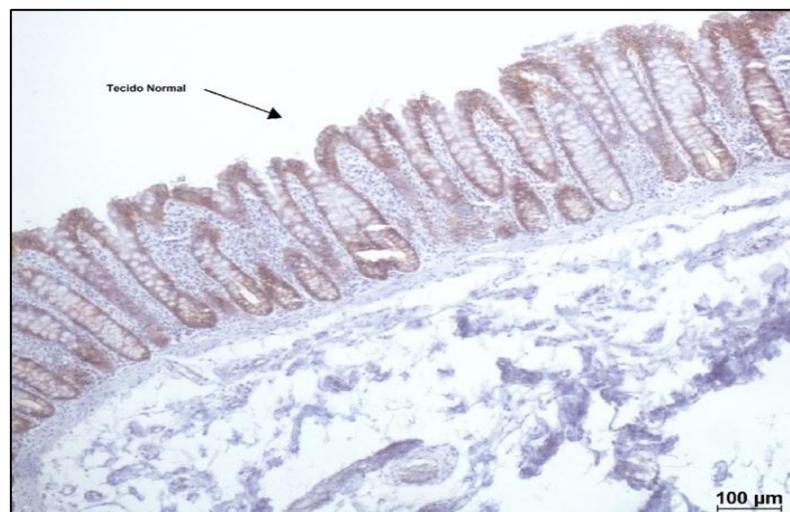


FIGURA 11. Imuno-histoquímica para pesquisa de ocludina no tecido cólico normal da paciente nº.12. A expressão tecidual da ocludina é identificada pela coloração acastanhada presente em maior quantidade nas membranas apical e lateral das células (IH 100X). Fonte: Acervo dos autores.

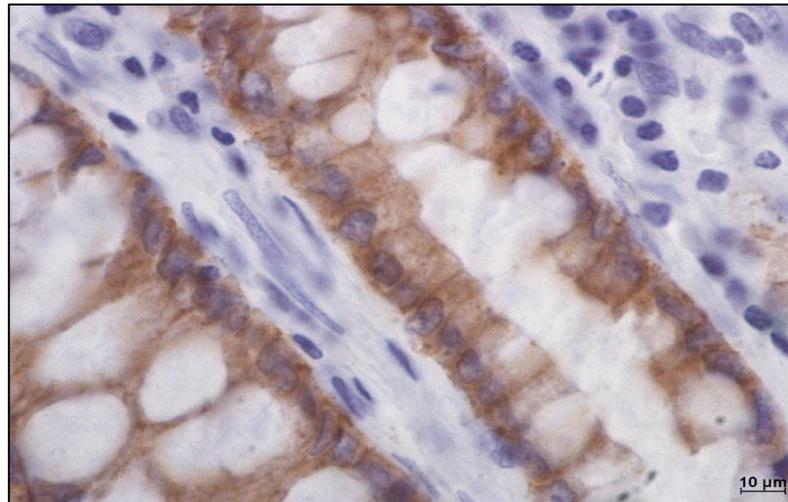


FIGURA 12. Imuno-histoquímica para pesquisa de ocludina no tecido normal da paciente nº. 1. A coloração acastanhada é identificada em maior presença na membrana lateral e apical das células da superfície epitelial do cólon (IH 1000X). Fonte: Acervo dos autores.

Na Figura 13, observa-se a expressão tecidual da proteína ocludina em tecido cólico com adenocarcinoma. Nas Figuras 14 e 15, observa-se tecido com adenocarcinoma bem diferenciado e moderadamente diferenciado, respectivamente.

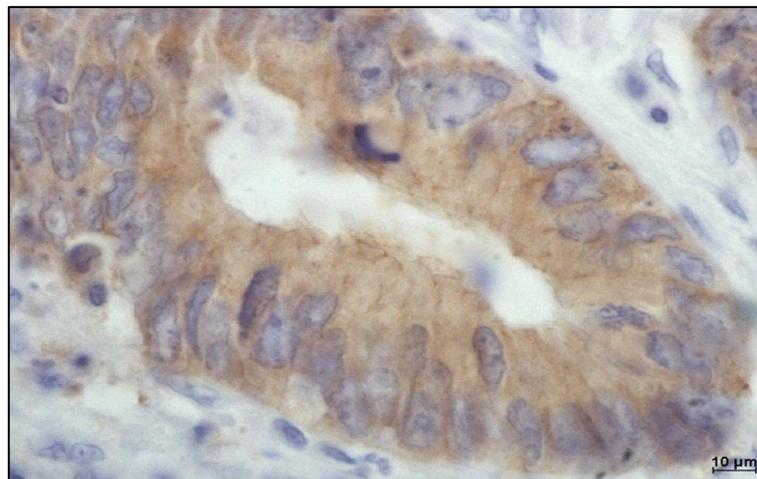


FIGURA 13. Imuno-histoquímica para pesquisa de ocludina no tecido cólico com adenocarcinoma da paciente nº. 1. Existe redução da coloração acastanhada nas membranas apical e lateral das células que se torna mais evidente no citoplasma celular (1000X). Fonte: Acervo dos autores.

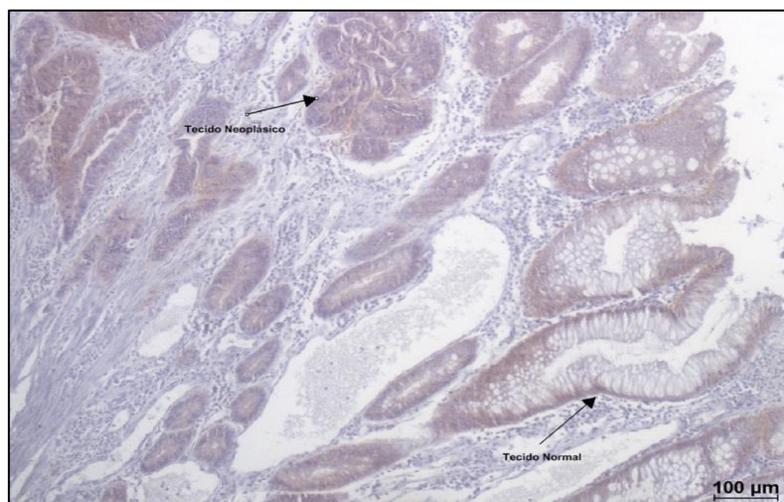


FIGURA 14. Imuno-histoquímica para pesquisa de ocludina no tecido cólico normal (seta e legenda) e neoplásico (seta e legenda) da paciente nº. 17. Observa-se o diferente padrão de distribuição da coloração acastanhada entre os tecidos. No saudável, a coloração se expressa na membrana lateral e apical, enquanto no neoplásico, a expressão ocorre no estroma tecidual (IH 100x). Fonte: Acervo dos autores.

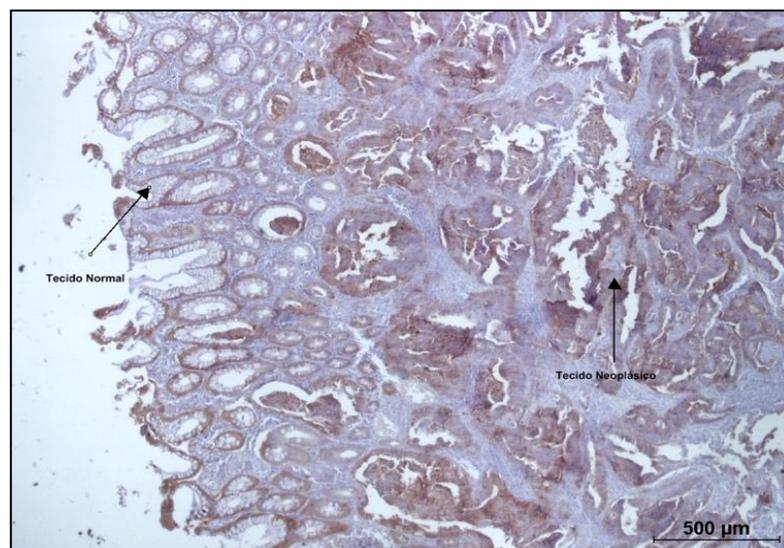


FIGURA 15. Imuno-histoquímica para pesquisa de ocludina em tecido normal e neoplásico na paciente nº. 41. Observa-se que a coloração acastanhada é identificada no tecido normal na membrana lateral e apical das células epiteliais, enquanto no tecido neoplásico a coloração é identificada no estroma tecidual (IH 40X). Fonte: Acervo dos autores.

4.3.3. Conteúdo tecidual das proteínas claudina-3 e ocludina

A medida do *imunoscóreo* mostrou que a média do conteúdo tecidual de ambas as proteínas foi maior no tecido normal, quando comparado ao tecido neoplásico. A média do conteúdo tecidual de claudina-3 no tecido normal foi de $2,57 \pm 0,16$, enquanto no tecido neoplásico foi de $1,03 \pm 0,13$. O conteúdo de ocludina foi em média de $2,77 \pm 0,1$ no tecido normal, enquanto no neoplásico foi de $1,08 \pm 0,14$ (Figura 16).

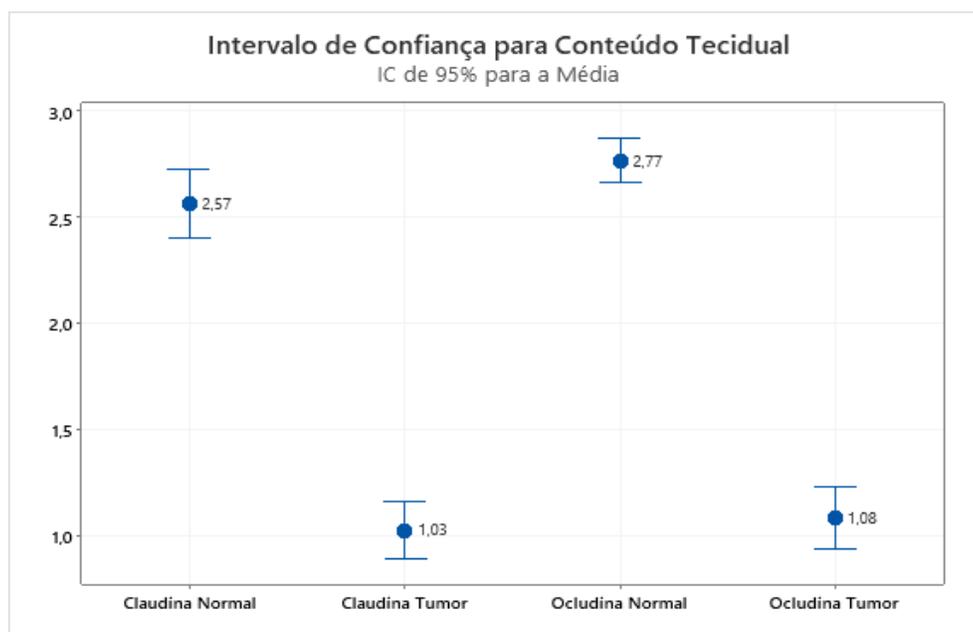


FIGURA 16. Valores médios com respectivo desvio padrão para o conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina. Comparação entre os tecidos normais e neoplásicos. Fonte: Dados coletados pelos autores.

4.3.4. Avaliação comparativa do conteúdo tecidual de claudina-3 entre tecidos normal e neoplásico em relação às variáveis histopatológicas consideradas

Nesta análise foram excluídos os doentes estratificados no estadiamento Tis, pois o número de doentes neste estudo era muito pequeno. Na análise da proteína claudina-3, comparamos as médias dos valores encontrados para os tecidos normal e neoplásico com relação às seguintes variáveis: estadiamento clínico/patológico, grau de diferenciação tumoral, presença de invasão angiolímfática e perineural, além de CEA e CA-19-9. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre o conteúdo tecidual das proteínas no tecido normal e tumoral, em praticamente

todas as variáveis, com exceção dos tumores pouco diferenciados. Esses resultados são demonstrados na Tabela 6.

TABELA 6. Análise comparativa do conteúdo tecidual da proteína Claudina-3 entre tecido normal e tumoral e as variáveis analisadas. Fonte: Dados coletados pelos autores.

			Média	Mediana	Desvio Padrão	CV	Min	Max	n	IC	P-valor
CA19-9	Negativo	Normal	2,67	2,89	0,52	20%	0,44	3,00	42	0,16	<0,001**
		Tumor	1,07	1,00	0,47	44%	0,11	2,00	42	0,14	
	Positivo	Normal	2,21	2,33	0,67	30%	1,11	3,00	9	0,44	
		Tumor	0,94	0,78	0,50	53%	0,44	1,89	9	0,33	
CEA	Negativo	Normal	2,71	2,89	0,42	16%	1,44	3,00	24	0,17	<0,001**
		Tumor	0,99	0,94	0,46	46%	0,11	1,78	24	0,18	
	Positivo	Normal	2,47	2,67	0,66	27%	0,44	3,00	27	0,25	
		Tumor	1,10	1,00	0,49	45%	0,33	2,00	27	0,19	
Estadio	Estadio 1	Normal	2,76	2,72	0,22	8%	2,44	3,00	6	0,17	<0,001**
		Tumor	0,78	0,94	0,35	45%	0,11	1,00	6	0,28	
	Estadio 2	Normal	2,53	2,89	0,73	29%	0,44	3,00	16	0,36	<0,001**
		Tumor	1,12	1,11	0,49	43%	0,22	2,00	16	0,24	
	Estadio 3	Normal	2,70	2,89	0,44	16%	1,67	3,00	15	0,22	<0,001**
		Tumor	1,17	1,33	0,50	43%	0,33	1,89	15	0,25	
	Estadio 4	Normal	2,47	2,89	0,63	26%	1,11	3,00	15	0,32	<0,001**
		Tumor	0,91	0,78	0,50	55%	0,00	2,00	15	0,25	
Grau de Diferenciação	Bem	Normal	1,67	1,67	0,16	9%	1,56	1,78	2	0,22	0,042*
		Tumor	0,83	0,83	0,08	9%	0,78	0,89	2	0,11	
	Moderadamente	Normal	2,65	2,89	0,53	20%	0,44	3,00	45	0,16	<0,001**
		Tumor	1,09	1,00	0,50	46%	0,00	2,00	45	0,14	
	Pouco	Normal	2,37	3,00	1,09	46%	1,11	3,00	3	1,23	0,126
		Tumor	0,48	0,67	0,32	67%	0,11	0,67	3	0,36	
Invasão Angiolinfática	Não	Normal	2,53	2,78	0,61	24%	0,44	3,00	45	0,18	<0,001**
		Tumor	1,06	1,00	0,46	43%	0,11	2,00	45	0,13	
	Sim	Normal	2,90	2,89	0,12	4%	2,67	3,00	7	0,09	
		Tumor	0,81	0,67	0,67	82%	0,00	2,00	7	0,49	
Invasão Perineural	Não	Normal	2,61	2,89	0,52	20%	1,11	3,00	40	0,16	<0,001**
		Tumor	1,09	1,00	0,45	41%	0,22	2,00	40	0,14	
	Sim	Normal	2,45	2,89	0,79	32%	0,44	3,00	11	0,47	
		Tumor	0,86	0,78	0,59	69%	0,00	2,00	11	0,35	

CV = Coeficiente de variação. Min = valor mínimo. Max = valor máximo. n = número total. IC = Intervalo de confiança.

4.3.5 Avaliação comparativa do conteúdo tecidual de ocludina entre o tecido normal e com tumor, com relação às variáveis observadas

Para essa análise foram excluídos os pacientes estratificados no estadiamento Tis, pois o número de doentes neste estadiamento era muito pequeno. Na análise da proteína ocludina, foram comparados os valores médios encontrados para o seu conteúdo nos tecidos normais e neoplásicos, com base nas seguintes variáveis histopatológicas: estadiamento, grau de diferenciação tumoral, presença de invasão angiolímfática e perineural, além de CEA e CA-19-9 (estes valores foram considerados como positivos quando estavam acima do seu valor de referência, e negativos quando abaixo do valor de referência). Foi observada diferença estatisticamente significativa entre o conteúdo tecidual da proteína ocludina no tecido normal e tumoral, em praticamente todas as variáveis, exceto nos tumores classificados como bem e pouco diferenciados. Os resultados são demonstrados na Tabela 7.

TABELA 7. Análise comparativa do conteúdo tecidual da proteína ocludina entre tecido normal e tumoral e as variáveis analisadas. Fonte: Dados coletados pelos autores.

			Média	Mediana	Desvio Padrão	CV	Min	Max	n	IC	P-valor
CA19-9	Negativo	Normal	2,80	2,89	0,35	12%	1,22	3,00	42	0,11	<0,001**
		Tumor	1,06	1,11	0,57	54%	0,00	2,11	42	0,17	
	Positivo	Normal	2,57	2,72	0,57	22%	1,11	3,00	10	0,35	
		Tumor	1,13	1,17	0,48	42%	0,11	1,67	10	0,30	
CEA	Negativo	Normal	2,82	2,94	0,29	10%	1,78	3,00	24	0,12	<0,001**
		Tumor	1,04	1,17	0,62	59%	0,00	1,78	24	0,25	
	Positivo	Normal	2,70	2,89	0,48	18%	1,11	3,00	28	0,18	
		Tumor	1,11	1,06	0,49	44%	0,11	2,11	28	0,18	
Estadio	Estadio 1	Normal	2,79	2,89	0,25	9%	2,33	3,00	7	0,19	<0,001**
		Tumor	0,73	1,00	0,66	90%	0,00	1,67	7	0,49	
	Estadio 2	Normal	2,81	2,94	0,32	12%	1,78	3,00	16	0,16	
		Tumor	1,06	1,11	0,57	53%	0,00	2,11	16	0,28	
	Estadio 3	Normal	2,81	2,89	0,20	7%	2,44	3,00	15	0,10	
		Tumor	1,16	1,11	0,55	47%	0,00	2,00	15	0,28	
	Estadio 4	Normal	2,64	2,89	0,63	24%	1,11	3,00	15	0,32	
		Tumor	1,13	1,22	0,44	39%	0,33	1,89	15	0,22	
Grau de Diferenciação	Bem	Normal	2,59	2,67	0,34	13%	2,22	2,89	3	0,38	0,069
		Tumor	0,70	0,78	0,67	95%	0,00	1,33	3	0,76	
	Moderadamente	Normal	2,80	2,89	0,34	12%	1,22	3,00	45	0,10	
		Tumor	1,10	1,11	0,53	48%	0,00	2,11	45	0,15	
	Pouco	Normal	2,33	2,89	1,06	45%	1,11	3,00	3	1,20	
		Tumor	0,59	0,78	0,53	89%	0,00	1,00	3	0,59	
Invasão Angiolinfática	Não	Normal	2,74	2,89	0,42	15%	1,11	3,00	46	0,12	<0,001**
		Tumor	1,11	1,11	0,55	50%	0,00	2,11	46	0,16	
	Sim	Normal	2,89	3,00	0,20	7%	2,44	3,00	7	0,15	
		Tumor	0,78	0,67	0,41	53%	0,33	1,33	7	0,30	
Invasão Perineural	Não	Normal	2,73	2,89	0,44	16%	1,11	3,00	41	0,14	<0,001**
		Tumor	1,13	1,11	0,54	48%	0,00	2,11	41	0,16	
	Sim	Normal	2,82	2,89	0,19	7%	2,44	3,00	11	0,11	
		Tumor	0,89	0,89	0,51	58%	0,00	1,89	11	0,30	

CV = Coeficiente de variação. Min = valor mínimo. Max = valor máximo. n = número total. IC = Intervalo de confiança.

4.3.6 Variância do conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina em comparação com o grau de diferenciação tumoral

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a variação das médias do conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina nos diferentes graus de diferenciação, como pode ser observado na Tabela 8 e na Figura 16.

TABELA 8. Variação das médias do conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina em relação ao grau de diferenciação nos tecidos normal e neoplásico. Fonte: Dados coletados pelos autores.

	Diferenciação	Média	Mediana	Desvio Padrão	CV	Min	Max	n	IC	P-valor
Claudina normal	Bem	2,33	2,39	0,78	33%	1,56	3,00	4	0,76	
	Moderadamente	2,61	2,89	0,58	22%	0,44	3,00	47	0,17	0,578
	Pouco	2,37	3,00	1,09	46%	1,11	3,00	3	1,23	
Claudina neoplásico	Bem	0,83	0,83	0,08	9%	0,78	0,89	2	0,11	
	Moderadamente	1,09	1,00	0,50	46%	0,00	2,00	45	0,14	0,105
	Pouco	0,48	0,67	0,32	67%	0,11	0,67	3	0,36	
Ocludina normal	Bem	2,69	2,78	0,34	13%	2,22	3,00	4	0,34	
	Moderadamente	2,80	2,89	0,34	12%	1,22	3,00	46	0,10	0,135
	Pouco	2,33	2,89	1,06	45%	1,11	3,00	3	1,20	
Ocludina neoplásico	Bem	0,70	0,78	0,67	95%	0,00	1,33	3	0,76	
	Moderadamente	1,11	1,11	0,53	47%	0,00	2,11	46	0,15	0,147
	Pouco	0,59	0,78	0,53	89%	0,00	1,00	3	0,59	

CV = Coeficiente de variação. Min = valor mínimo. Max = valor máximo. n = número total. IC = Intervalo de confiança.

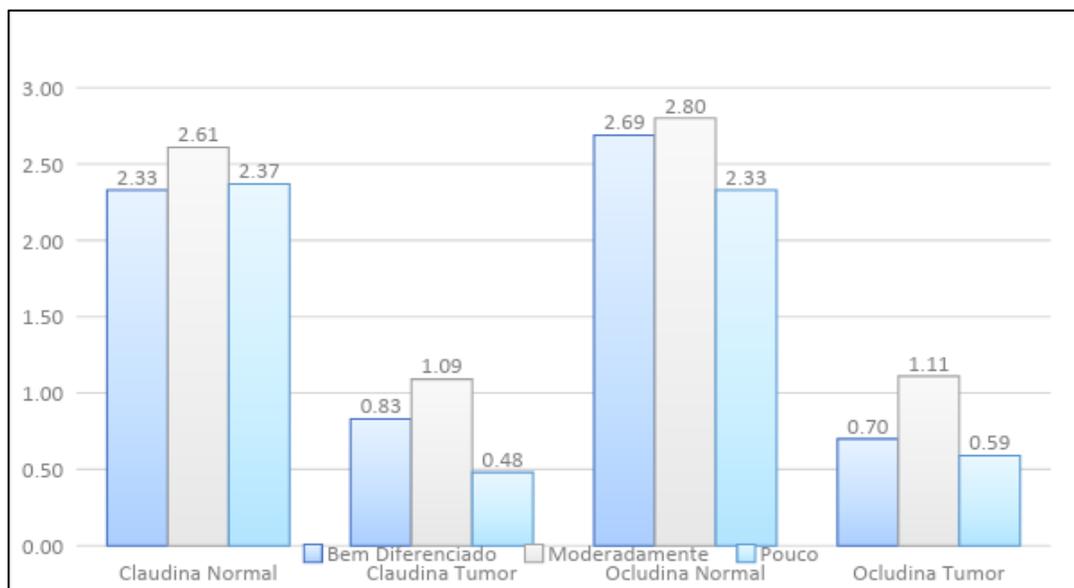


FIGURA 17. Gráfico do conteúdo tecidual das proteínas claudina-3 e ocludina em relação ao grau de diferenciação tumoral. Fonte: Dados coletados pelos autores.

4.3.7 Correlação entre o conteúdo tecidual claudina-3 e ocludina e o valor sérico de CEA e CA19-9

A correlação entre o valor sérico de CEA e o conteúdo tecidual das proteínas demonstrou que, quanto maior o valor de CEA, menor é o conteúdo tecidual de ocludina em tecido normal/saudável e vice-versa, verificando-se uma correlação moderada (Tabela 9). Já a correlação do nível sérico de CA-19.9 e o conteúdo tecidual de ambas as proteínas demonstrou que, quanto maior o valor de CA19-9, menor será o conteúdo tecidual de claudina-3 em tecido saudável (Tabela 9).

TABELA 9. Correlação entre o conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina e o valor sérico de CEA e CA-19-9. Fonte: Dados coletados pelos autores.

		Claudina-3	Claudina-3	Ocludina	Ocludina
		Normal	Tumor	Normal	Tumor
CEA	Corr (r)	-0,198	-0,101	-0,480	0,067
	P-valor	0,148	0,482	<0,001**	0,632
CA19-9	Corr (r)	-0,272	-0,119	-0,181	0,080
	P-valor	0,044*	0,404	0,190	0,569

Corr = correlação. *p < 0,05. **p<0,01.

4.3.8 Correlação entre o conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina e o estadiamento clínico patológico

Não houve diferença estatisticamente significativa, ou seja, não há relação entre o conteúdo tecidual das proteínas claudina-3 e ocludina e o estadiamento clínico patológico (Tabela 10).

TABELA 10. Correlação entre o conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina e o estadiamento clínico patológico. Fonte: Dados coletados pelos autores.

		Claudina	Claudina	Ocludina	Ocludina
		Normal	Tumor	Normal	Tumor
Estadio clínico + patológico	Corr (r)	-0,022	0,012	-0,192	0,132
	P-valor	0,872	0,934	0,157	0,336

Corr = correlação.

4.3.9 Avaliação comparativa do conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina e as variáveis clínicas

Dentre as variáveis clínicas estudadas, o único fator de risco que apresentou significância estatística na comparação com o conteúdo tecidual foi o etilismo, que apresentou um menor conteúdo de claudina-3 no tecido com adenocarcinoma, como pode ser observado nas Tabelas de 11 a 17.

TABELA 11. Comparação entre sexo e conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina em tecido normal e tecido com adenocarcinoma. Fonte: Dados coletados pelos autores.

		Média	Mediana	Desvio Padrão	CV	Min	Max	n	IC	P-valor
Claudina Normal	Feminino	2,58	2,89	0,57	22%	0,89	3,00	31	0,20	0,820
	Masculino	2,55	2,89	0,66	26%	0,44	3,00	26	0,25	
Claudina Tumor	Feminino	1,09	1,00	0,47	43%	0,22	2,00	27	0,18	0,370
	Masculino	0,97	0,89	0,51	52%	0,00	2,00	26	0,19	
Ocludina Normal	Feminino	2,77	2,89	0,36	13%	1,22	3,00	31	0,13	0,957
	Masculino	2,76	3,00	0,44	16%	1,11	3,00	25	0,17	
Ocludina Tumor	Feminino	1,07	1,22	0,58	54%	0,00	1,89	29	0,21	0,887
	Masculino	1,09	1,06	0,51	47%	0,00	2,11	26	0,20	

CV = Coeficiente de variação. Min = valor mínimo. Max = valor máximo. n = número total. IC = Intervalo de confiança.

TABELA 12. Comparação entre etilismo e conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina em tecido normal e tecido com adenocarcinoma. Fonte: Dados coletados pelos autores.

		Média	Mediana	Desvio Padrão	CV	Min	Max	n	IC	P-valor
Claudina Normal	Não	2,59	2,89	0,56	21%	0,89	3,00	51	0,15	0,320
	Sim	2,33	2,72	0,96	41%	0,44	3,00	6	0,77	
Claudina Tumor	Não	1,08	1,00	0,48	44%	0,00	2,00	47	0,14	0,041*
	Sim	0,65	0,61	0,41	64%	0,11	1,22	6	0,33	
Ocludina Normal	Não	2,78	2,89	0,39	14%	1,11	3,00	50	0,11	0,595
	Sim	2,69	2,89	0,47	18%	1,78	3,00	6	0,38	
Ocludina Tumor	Não	1,12	1,11	0,54	48%	0,00	2,11	49	0,15	0,121
	Sim	0,76	0,94	0,48	64%	0,00	1,22	6	0,39	

CV = Coeficiente de variação. Min = valor mínimo. Max = valor máximo. n = número total. IC = Intervalo de confiança.

*p < 0,05.

TABELA 13. Comparação entre tabagismo e conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina em tecido normal e tecido com adenocarcinoma. Fonte: Dados coletados pelos autores.

		Média	Mediana	Desvio Padrão	CV	Min	Max	n	IC	P-valor
Claudina Normal	Não	2,45	2,67	0,62	25%	0,89	3,00	33	0,21	0,081
	Sim	2,73	2,94	0,55	20%	0,44	3,00	24	0,22	
Claudina Tumor	Não	1,10	1,00	0,44	40%	0,33	2,00	31	0,16	0,221
	Sim	0,93	0,83	0,54	58%	0,00	2,00	22	0,22	
Ocludina Normal	Não	2,77	2,89	0,36	13%	1,11	3,00	33	0,12	0,944
	Sim	2,76	3,00	0,44	16%	1,22	3,00	23	0,18	
Ocludina Tumor	Não	1,10	1,11	0,51	46%	0,00	2,00	32	0,18	0,738
	Sim	1,05	1,11	0,60	57%	0,00	2,11	23	0,24	

CV = Coeficiente de variação. Min = valor mínimo. Max = valor máximo. n = número total. IC = Intervalo de confiança.

TABELA 14. Comparação entre as doenças associadas e conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina em tecido normal e tecido com adenocarcinoma. Fonte: Dados coletados pelos autores.

		Média	Mediana	Desvio Padrão	CV	Min	Max	n	IC	P-valor
Claudina Normal	Não	2,58	2,67	0,70	27%	0,44	3,00	13	0,38	0,927
	Sim	2,56	2,89	0,59	23%	0,89	3,00	44	0,17	
Claudina Tumor	Não	1,06	1,06	0,50	47%	0,33	1,67	12	0,28	0,762
	Sim	1,02	1,00	0,49	48%	0,00	2,00	41	0,15	
Ocludina Normal	Não	2,88	2,89	0,15	5%	2,56	3,00	13	0,08	0,240
	Sim	2,73	2,89	0,44	16%	1,11	3,00	43	0,13	
Ocludina Tumor	Não	1,10	1,22	0,63	57%	0,00	2,00	13	0,34	0,881
	Sim	1,08	1,11	0,52	48%	0,00	2,11	42	0,16	

CV = Coeficiente de variação. Min = valor mínimo. Max = valor máximo. n = número total. IC = Intervalo de confiança.

TABELA 15. Comparação entre presença de *Diabetes Mellitus* e o conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina em tecido normal e tecido com adenocarcinoma. Fonte: Dados coletados pelos autores.

		Média	Mediana	Desvio Padrão	CV	Min	Max	n	IC	P-valor
Claudina Normal	Não	2,62	2,89	0,59	23%	0,44	3,00	48	0,17	0,147
	Sim	2,30	2,00	0,65	28%	1,56	3,00	9	0,43	
Claudina Tumor	Não	1,04	1,00	0,48	46%	0,00	2,00	44	0,14	0,613
	Sim	0,95	0,78	0,52	55%	0,44	2,00	9	0,34	
Ocludina Normal	Não	2,80	2,89	0,35	12%	1,11	3,00	47	0,10	0,147
	Sim	2,59	2,89	0,56	22%	1,22	3,00	9	0,37	
Ocludina Tumor	Não	1,07	1,11	0,58	54%	0,00	2,11	46	0,17	0,646
	Sim	1,16	1,11	0,30	26%	0,78	1,78	9	0,20	

CV = Coeficiente de variação. Min = valor mínimo. Max = valor máximo. n = número total. IC = Intervalo de confiança.

TABELA 16. Comparação entre presença de HAS e conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina em tecido normal e tecido com adenocarcinoma. Fonte: Dados coletados pelos autores.

		Média	Mediana	Desvio Padrão	CV	Min	Max	n	IC	P-valor
Claudina Normal	Não	2,52	2,67	0,65	26%	0,44	3,00	26	0,25	0,604
	Sim	2,61	2,89	0,57	22%	1,11	3,00	31	0,20	
Claudina Tumor	Não	1,05	0,94	0,47	45%	0,22	2,00	24	0,19	0,797
	Sim	1,01	1,00	0,51	50%	0,00	2,00	29	0,18	
Ocludina Normal	Não	2,78	2,89	0,36	13%	1,22	3,00	26	0,14	0,860
	Sim	2,76	2,89	0,42	15%	1,11	3,00	30	0,15	
Ocludina Tumor	Não	1,08	1,11	0,57	53%	0,00	2,00	25	0,22	0,930
	Sim	1,09	1,11	0,53	48%	0,00	2,11	30	0,19	

CV = Coeficiente de variação. Min = valor mínimo. Max = valor máximo. n = número total. IC = Intervalo de confiança.

TABELA 17. Comparação entre obesidade e conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina em tecido normal e tecido com adenocarcinoma. Fonte: Dados coletados pelos autores.

		Média	Mediana	Desvio Padrão	CV	Min	Max	n	IC	P-valor
Claudina Normal	Não	2,57	2,89	0,62	24%	0,44	3,00	53	0,17	0,747
	Sim	2,47	2,50	0,37	15%	2,00	2,89	4	0,36	
Claudina Tumor	Não	1,03	1,00	0,50	49%	0,00	2,00	49	0,14	0,727
	Sim	0,94	0,94	0,23	24%	0,67	1,22	4	0,23	
Ocludina Normal	Não	2,77	2,89	0,40	15%	1,11	3,00	52	0,11	0,811
	Sim	2,72	2,72	0,23	8%	2,44	3,00	4	0,23	
Ocludina Tumor	Não	1,08	1,11	0,56	52%	0,00	2,11	51	0,15	0,750
	Sim	1,17	1,11	0,29	25%	0,89	1,56	4	0,29	

CV = Coeficiente de variação. Min = valor mínimo. Max = valor máximo. n = número total. IC = Intervalo de confiança.

4 DISCUSSÃO

O câncer colorretal do tipo adenocarcinoma ocupa a terceira posição dentre as neoplasias responsáveis por óbitos no Brasil, tanto em homens quanto em mulheres (44). A disseminação metastática tumoral está diretamente relacionada com a sobrevida destes pacientes, estando presente em 90% dos que evoluem para óbito. Sendo assim o desenvolvimento de metástases à distância é considerada a variável com maior impacto na sobrevida dos doentes (45).

Em torno de $\frac{1}{4}$ dos pacientes com neoplasia colorretal já apresentam metástases no momento do diagnóstico da doença (45). Estudo retrospectivo com 952 pacientes, submetidos a tratamento cirúrgico no *Memorial Sloan Kettering Cancer Center*, mostrou que 27% dos pacientes operados evoluíram com metástases hematogênicas nos primeiros dois anos após a intervenção (46).

O tratamento do câncer colorretal é baseado no estadiamento da doença, definido pela 8ª. edição do *AJCC Cancer Staging Manual*, por meio de exames clínicos e laboratoriais (47). Após o tratamento cirúrgico, realiza-se o estudo histopatológico, onde se estabelece uma melhor acurácia entre o estadiamento e o prognóstico do doente. Contudo, o estadiamento TNM apresenta algumas limitações para definir o prognóstico do câncer colorretal, conforme observado por O'Connel e Maggard (48). Os autores mostraram que cerca de 30 a 40% dos pacientes estratificados nos estádios I e II da classificação TNM desenvolveram metástases nos meses subsequentes ao tratamento cirúrgico, principalmente nos primeiros dois anos.

O estudo histopatológico permite avaliar outras variáveis, além da invasão do tecido tumoral e da presença de metástases linfonodais. Quah, Chou e Gonen et al. (21), publicaram um estudo prospectivo que analisou outras variáveis clínicas e histopatológicas em portadores de câncer de cólon estadio II (21). Os autores identificaram que a presença de invasão angiolinfática ou perineural, um tumor T4 (aqueles que comprometem estruturas ou órgãos adjacentes ao tumor primário), ou presença de CEA acima de 5 ng/mL, são variáveis independentes que afetam a sobrevida do doente em cinco anos. A presença de duas ou mais variáveis consideradas de mau prognóstico reduz a sobrevida em cinco anos do doente de 95% para 57% (21). Portanto, o estudo criterioso dessas variáveis é essencial para identificar pacientes que cursam com alto risco para o desenvolvimento de metástases, possibilitando complementação terapêutica com a indicação de quimioterapia adjuvante (3).

Apesar dos avanços terapêuticos nas últimas décadas, o tratamento do CCR com disseminação metastática ainda representa um grande desafio. A cascata metastática e suas etapas se encontram bem estabelecidas, todavia, as interações imunogênicas e bioquímicas do

mecanismo que inicia e promove o processo molecular para desenvolvimento das metástases ainda não estão completamente esclarecidos.

Durante o processo celular de invasão e metástase, as células neoplásicas necessariamente têm que se desprender do sítio tumoral primário, transformando o epitélio em tecido mesenquimal de transição. Essa etapa é primordial para que as demais fases do processo de carcinogênese ocorram. Essa transformação tecidual que ocorre no tumor primário é acompanhada por diminuição da expressão tecidual das proteínas claudina e ocludina, principais constituintes das JO intercelulares (49). O crescimento tumoral decorre, primeiramente, da perda de função da JO, tanto de barreira mecânica quanto de polarização celular. Quando essas funções são perdidas, fatores de crescimento existentes na membrana apical podem se ligar a receptores localizados na membrana basolateral das células, tendo como consequência o crescimento celular desordenado. O segundo fator está relacionado ao mecanismo de sinalização de transdução relacionado a outras moléculas. Uma das vias apontadas é a ativação da transcrição de fatores que controlam a expressão de proteínas presentes nas junções aderentes, como a E-caderina e as proteases (metaloproteinases) degradantes do epitélio mesenquimal de transição (25,45,50).

A teoria do aumento de permeabilidade celular nas JO nos tecidos neoplásicos é corroborada pela literatura. Soler, Miller e Laughlin et al. (51), estudaram espécimes de tecido colorretal de humanos e ratos com e sem adenocarcinoma através de difusão de elétrons de rutênio por microscopia óptica, demonstrando que existe aumento da permeabilidade das JO em tecidos cólicos com adenocarcinoma quando comparados ao tecido normal.

As proteínas da família das claudinas foram identificadas como a principal componente estrutural das JO, com função determinante na condução de íons para o espaço paracelular. A mudança da composição da claudina em qualquer tecido existente já demonstrou afetar a permeabilidade e seletividade das JO. Todavia, as claudinas não são expressas de forma uniforme nos diferentes tecidos, e cada um deles expressa diferentes tipos de claudina, explicando o porquê de ainda não se compreender completamente o papel de cada subtipo de claudina nas diferentes células. Da mesma forma, pouco se sabe a respeito dos mecanismos pelos quais esses diferentes tipos de claudinas interagem para favorecer uma permeabilidade celular específica (52).

As claudinas -1, -3, -4, -7 e -8 são as principais proteínas presentes nas JO do epitélio cólico (53). Ahmad, Kumar e Chen et al. (54), analisaram em tecido cólico normal de ratos a expressão de claudina -1, -2, -3, ocludina, ZO-1, E-caderina, beta-catenina e integrina beta-1, pela técnica

de *western-blot*, verificando que a claudina-3 era o subtipo presente em maior quantidade nas JO do tecido cólico. Todavia, a técnica de *western-blot* utilizada pelos autores permite apenas avaliar o conteúdo total da proteína no tecido, não permitindo avaliar o local da célula onde a proteína se expressava em maior quantidade.

A claudina-3 é essencialmente uma proteína de bloqueio da permeabilidade celular. Estudos *in vitro* demonstram que o aumento da expressão de claudina-3 aumenta a resistência da permeabilidade paracelular, e que sua ausência reduz drasticamente a permeabilidade (52). Um destes estudos bloqueou a expressão de claudina-3 em epitélio gástrico, resultando em redução de 70% da resistência transepitelial (55). Já se demonstrou que camundongos nocauteados para produção de claudina-3 morrem em 24 horas em consequência do grave distúrbio hidroeletrólítico que se instala pela falta da principal constituinte das JO (44).

O papel da claudina-3 no mecanismo de permeabilidade celular está bem estabelecido (56), contudo o papel da proteína na etapa de invasão celular e metástases ainda é pouco estudado. Assim, tornou-se necessário conhecer melhor como se comporta o conteúdo tecidual e as eventuais modificações no local de expressão da claudina-3 em portadores de câncer colorretal.

No presente estudo observou-se que, no tecido cólico normal, a maior expressão da claudina-3 estava localizada na porção látero-apical da membrana celular, local onde existe as JO. Todavia, ao avaliar-se o local de expressão tecidual da claudina-3 no tecido com adenocarcinoma, observou-se que em muitos doentes não era possível detectar a presença de claudina-3 nas membranas celulares. Nesses doentes, o maior contingente de claudina-3 era detectado no citoplasma e no estroma tecidual. Esses mesmos achados foram observados por Ahmad, Kumar e Chen et al. (54), ao analisarem 250 espécimes de tecido de pacientes com adenocarcinoma colorretal. Em seu estudo utilizando técnica imuno-histoquímica, os autores também encontraram maior concentração da proteína na porção látero-apical do tecido normal, enquanto no tecido neoplásico a expressão da proteína, quando presente, era detectada no citoplasma e núcleo celular. Várias são as explicações plausíveis para essas diferenças de expressão quando se compara a célula normal da neoplásica. É possível que na célula neoplásica exista menor regulação expressão do gene CLDN3, responsável pela transcrição da proteína claudina-3, nos tecidos neoplásicos. Da mesma forma é possível que a sinalização da proteína após a sua vacuolização do complexo de Golgi esteja comprometida, fazendo com que a proteína não seja direcionada à porção ápico-lateral da membrana celular. É possível ainda, que o menor conteúdo de claudina-3 nas membranas celulares possa estar relacionado a sua maior destruição consequente ao maior processo inflamatório habitualmente encontrado nos tecidos neoplásicos.

Essa possibilidade fica mais evidente com os resultados de estudos que demonstraram que nos tecidos inflamados como ocorre nos portadores de retocolite ulcerativa ou doença de Crohn, existe uma menor quantidade do conteúdo de claudina-3 no tecido inflamado quando comparado ao tecido normal (57). Martinez et al. demonstraram experimentalmente que a simples deficiência no suprimento de ácidos graxos de cadeia curta ao epitélio colônico, é capaz de induzir o aparecimento de processo inflamatório mucoso com redução acentuada do conteúdo das proteínas que formam as JO, particularmente do conteúdo de claudina-3 (20). Também mostraram que a menor concentração da proteína ocorre justamente nas porções ápico-laterais das células do epitélio colônico (20).

Apesar de estar bem estabelecido na literatura que as doenças inflamatórias intestinais são fatores de risco para o aparecimento de adenocarcinoma colorretal, ainda existe muita controvérsia com relação ao papel desempenhado pela perda da função das JO no processo inflamatório, assim como na carcinogênese. Estudos sugerem que às alterações encontradas nas JO precede o processo inflamatório, e conseqüentemente o neoplásico (58,59). Tanaka, Takechi e Kiyonari et al. (60), realizaram o bloqueio da expressão da proteína claudina-7 em ratos observando que, na sua ausência, havia aumento da permeabilidade celular a solutos de produtos bacterianos. Como consequência, ocorre o desenvolvimento de processo inflamatório intestinal devido ao aumento do infiltrado de neutrófilos e citocinas inflamatórias na lâmina própria pela alteração da integridade epitelial. A migração de antígenos e bactérias para o interior da barreira epitelial danificada perpetua o estímulo a maior migração neutrofílica, com produção aumentada de espécies reativas de oxigênio determinando maior estresse oxidativo tecidual. Já se demonstrou que o estresse oxidativo do DNA de células do epitélio intestinal, danifica bases nitrogenadas favorecendo o surgimento de erros de pareamento de bases e, conseqüentemente, o desenvolvimento de mutações (69). Estudos mostraram que os tecidos cronicamente inflamados pelo maior grau de estresse oxidativo, sofrem mutações em proteínas responsáveis pelo controle do ciclo celular, bem como modificação no padrão de expressão de diversas proteínas relacionadas aos mecanismos de adesão celular (20, 68).

Independentemente do processo que ocorra primeiro, se a perda da função da JO ou a inflamação, o fato é que em condições inflamatórias ocorre aumento da permeabilidade celular. E este aumento da permeabilidade permite que ocorra uma alteração na regulação do ciclo celular, além de alterações epigenéticas, que promovem o desenvolvimento de um microambiente favorável à progressão das diferentes etapas da carcinogênese, apesar do conteúdo de claudina-3 ser menor nos tecido com inflamação crônica (57). Mees, Mennigen e

Spieker et al. (61), investigaram as proteínas de adesão e junção celular em portadores de câncer colorretal com história prévia de retocolite ulcerativa. Constataram que as claudinas-1, -3, -4 e a β -catenina apresentaram maior expressão no tecido neoplásico quando comparado ao tecido “saudável” destes pacientes. Constataram ainda que a expressão tecidual de claudina-2 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os tecidos. De modo distinto, outros estudos demonstraram que existe elevação do conteúdo tecidual das claudinas-1 e -2 em portadores de doença inflamatória intestinal e câncer colorretal (62,63). É possível que esses resultados contraditórios possam estar relacionados à metodologia adotada para a avaliação da expressão tecidual das proteínas, bem como o método utilizado para quantificar as proteínas.

Os principais estudos que avaliaram a expressão e o conteúdo tecidual de claudina-3, comparando o tecido colônico com adenocarcinoma com o tecido saudável, também apresentam resultados conflitantes. De Oliveira, de Oliveira e de Souza et al. (64), em seu estudo com 12 espécimes de tecido de cólon normal e com adenocarcinoma. Constataram que a expressão das claudinas-1, -3 e -4 foi regulada positivamente em 5,7, 1,5 e 2,4 vezes, respectivamente, nos tecidos tumorais colorretais quando comparados com os tecidos normais. Verificaram que embora as proteínas componentes das JO pudessem ser encontradas no epitélio neoplásico, sua função de barreira mostrava-se alterada. Apesar da maior expressão de claudinas, a permeabilidade paracelular mostrava-se aumentada com desorganização significativa das JO (59).

Outro estudo avaliando 41 pacientes com CCR submetidos a tratamento cirúrgico analisou o conteúdo tecidual de claudina, ZO-1, ZO-2 e claudinas -1, -2, -3, -4 e -5 pela técnica de PCR-RT, com análise de seu conteúdo tecidual por técnica de imuno-histoquímica. Os autores observaram aumento da expressão da claudina-1 e -2 nos tecidos com neoplasia em relação ao tecido normal, enquanto as claudinas-3 e -4, não apresentaram aumento da sua expressão de forma significativa (31). O estudo constatou ainda que ocorria maior expressão de claudina -1 em tumores que invadem a camada muscular própria quando comparados àqueles restritos à mucosa. Os autores constataram ainda, maior expressão da proteína nos tumores localizados nas porções mais distais do cólon, quando comparados aos tumores com localização proximal. Por fim, não encontraram relação entre o aumento da expressão da claudina-3 com outras variáveis clínicas e patológicas como a presença de metástase linfonodal ou hematogênica, além dos valores do CEA (37). Contudo, estudos que utilizam a técnica da PCR-RT não permitem identificar o local exato onde a proteína se expressa nos tecidos. Foi por esta razão que

preferimos utilizar a técnica imuno-histoquímica, pois além de identificarmos com precisão o local de expressão da proteína nos tecidos, ainda seria possível quantificá-lo.

Estudo avaliando espécimes obtidos de 22 pacientes com câncer colorretal submetidos à ressecção cirúrgica demonstrou, pela técnica de imuno-histoquímica, que a claudina-3 apresentava maior conteúdo tecidual no tecido neoplásico em comparação ao tecido normal. Esses resultados são opostos ao encontrado no presente estudo. Os autores constataram que a maior expressão de claudina-3 não mostrava correlação com variáveis clínicas como sexo, idade, localização e tamanho do tumor. Todavia, nos tumores pouco diferenciados, naqueles doentes com disseminação linfonodal e nos doentes que apresentaram recidiva da doença em 36 meses, os autores verificaram que eles cursavam com maior conteúdo tecidual quando comparados àqueles que não possuíam tais características. Talvez, o pequeno número de doentes estudados possa explicar esses achados.

Na contramão desses autores, Ahmad, Kumar e Chen et al. (54), em estudo com cultura de células de CCR obtidas a partir de tecido cólico de ratos, e em 250 espécimes de tecido cólico humano com e sem adenocarcinoma, encontraram redução significativa do conteúdo da claudina-3 na membrana látero-apical das células neoplásicas em comparação ao tecido saudável. A expressão e o conteúdo da proteína foram analisados por técnicas de m-RNA e imuno-histoquímica. Além de encontrarem redução no conteúdo de claudina-3 no tecido neoplásico, mostraram que ocorria correlação positiva com a sobrevida dos doentes, e que quanto maior o conteúdo tecidual de claudina-3 maior era a sobrevida do doente. Mostraram ainda que a presença de metástase era uma variável, quando presente, que se relacionava com um conteúdo tecidual de claudina-3 significativamente menor. Estes resultados são similares aos encontrados no presente estudo, quando se identificou menor conteúdo tecidual de claudina-3 nos tecidos com adenocarcinoma quando comparados aos tecidos normais. Entretanto, neste estudo, não encontramos correlação dentre o conteúdo de claudina-3 e o estadiamento da doença. É possível que esse resultado possa estar relacionado ao número de doentes incluídos no presente estudo.

A presença ou não de outros fatores de risco para o pior prognóstico da doença, como a presença de invasão angiolinfática ou perineural, e a positividade dos marcadores tumorais séricos, também influenciaram no conteúdo tecidual da claudina-3. Nos doentes portadores de tumores pouco diferenciados não encontramos diferença estatística quanto à quantidade do conteúdo da claudina-3 nos tecidos neoplásicos em relação ao tecido normal. É possível que esses achados estejam relacionados ao pequeno número de doentes com tumores pouco diferenciados considerados na presente casuística (n = 3). Apesar da ausência de diferença

estatisticamente significativa, acreditamos que este resultado não reflete a total realidade. Acreditamos que uma análise feita com um número maior de doentes com tumores pouco diferenciados talvez pudesse apresentar resultados diferentes aos encontrados.

Outras variáveis clínicas como sexo, idade, presença de doenças como o *diabetes mellitus*, hipertensão arterial sistêmica, obesidade e tabagismo, também não apresentaram relação com conteúdo tecidual da claudina-3, tanto no tecido normal quanto no tecido com adenocarcinoma. De modo distinto, verificamos que o etilismo parece influenciar a quantidade do conteúdo tecidual da claudina-3 no tecido com adenocarcinoma.

O consumo de álcool é um fator reconhecidamente relacionado à carcinogênese colorretal, decorrente da metilação do etanol em acetaldeído. O acúmulo de acetaldeído no cólon provoca diversas alterações teciduais, como o aumento da produção de radicais livres que favorecem a migração de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral e a interleucina-6, além de alterar a microbiota intestinal, favorecendo o crescimento de bactérias gram negativas. O álcool promove ainda a expressão de enzimas proteolíticas e a ativação da sinalização de um fator de crescimento do epitélio mesenquimal de transição, induzindo a ruptura das JO com consequente aumento da permeabilidade paracelular (65).

O etanol também pode ser convertido em fosfodietanol por meio de sua ligação com fosfolípidos, e o acúmulo desta substância tem um importante papel nas alterações induzidas pelo álcool nas JO. O consumo de álcool leva à separação da proteína ZO-1 presente nas JO, resultando na formação de grandes espaços intercelulares, o que aumenta a permeabilidade celular (66). Um estudo demonstrou que o álcool é capaz de induzir uma menor expressão da claudina -2 e -4 em tecidos cólicos saudáveis, apontando para a capacidade deletéria do álcool em promover a quebra da JO. Um dado interessante observado no presente estudo é a menor quantidade de claudina-3 no tecido com adenocarcinoma em pacientes etilistas em relação aos não etilistas, corroborando com a hipótese de haver uma disfunção da JO em pacientes que consomem bebidas alcoólicas regularmente. Contudo, esses achados devem ser avaliados com cuidado, pois não se estabeleceu um critério para separar etilistas contumazes dos etilistas sociais. Essa limitação decorre da transcrição dos dados de prontuário onde o doente foi apenas questionado durante à anamnese se fazia ou não o uso regular de bebidas alcoólicas.

O papel da ocludina na JO ainda não foi completamente entendido na carcinogênese colorretal. Apesar de ter sido a primeira proteína constituinte das JO a ser descrita em 1993 (56), é sabido que se encontra presente em todas as JO, e que a sua fosforilação está relacionada à dinâmica de regulação da função da JO. No entanto, sua função como proteína de barreira

epitelial ainda apresenta resultados contraditórios (52). Culturas de células epiteliais *in vitro* onde existe ausência de ocludina ainda se mostram capazes de construir uma JO morfológica e funcionalmente normal. Todavia, se a ocludina estiver presente em abundância nas JO, ela é capaz de aumentar a resistência transepitelial (67). Ratos geneticamente modificados que não expressam ocludina apresentaram o epitélio gástrico com inflamação crônica, hiperplasia celular e completa perda das células parietais, causando uma inabilidade de secretar ácido gástrico, embora as células do epitélio intestinal não demonstrassem alteração funcional (68).

O estudo do conteúdo tecidual da ocludina em tecidos com adenocarcinoma de cólon pode contribuir com um melhor entendimento do papel desta proteína presente nas JO nos portadores de câncer colorretal, bem como nas doenças inflamatórias intestinais.

Martinez, et al. (26) estudaram, por meio de técnica imuno-histoquímica, o conteúdo tecidual de ocludina em tecidos cólicos de ratos providos e desprovidos de trânsito fecal. Demonstraram que a ocludina se expressa de maneira mais evidente na membrana apical. Mostraram que no tecido cólico desprovido de trânsito fecal, ocorre redução do conteúdo da proteína na região apical do epitélio intestinal. Resultado semelhante foi encontrado por Kucharzik, et al. (69), em seu estudo com tecido colorretal humano com e sem doença inflamatória intestinal. Os autores constataram que no tecido normal, a ocludina também se expressava com maior evidência na membrana apical, enquanto no tecido inflamado havia acentuada redução do seu conteúdo no mesmo local. No presente estudo, identificamos que ocorria maior expressão tecidual da ocludina na membrana látero-apical das células do epitélio cólico. De modo distinto, no tecido neoplásico, quando a proteína estava presente, sua maior expressão se dava no citoplasma celular das células neoplásicas, à semelhança do que ocorria com a expressão da claudina-3.

Um dos primeiros estudos que mensurou o conteúdo tecidual de ocludina em tecidos com adenocarcinoma colorretal foi publicado em 1997 (70). Nele, os autores avaliaram, por técnica imuno-histoquímica, a expressão de ocludina em 12 espécimes de tecido humano com e sem neoplasia. Demonstraram que ocorria redução significativa do conteúdo de ocludina nos tecidos com adenocarcinoma quando comparados ao tecido normal. Ainda, mostraram que existia uma correlação negativa com o estadiamento do tumor. Tumores com pior grau de diferenciação celular apresentavam tendência a cursarem com menor expressão da proteína.

Posteriormente, Resnick et al. (39), realizaram estudo analisando 129 espécimes de tecido colorretal com e sem adenocarcinoma de pacientes pertencentes ao estágio II da classificação TNM. Mostraram que a expressão de ocludina no tecido neoplásico apresentava conteúdo

semelhantes nos tecidos normal e neoplásico em 57% dos doentes sem diferença estatística entre eles. Contudo, já chamavam a atenção, para uma tendência à maior expressão de ocludina nos tumores pouco diferenciados.

No presente estudo, encontramos menor conteúdo tecidual de ocludina nos tecidos com adenocarcinoma colorretal em comparação ao tecido saudável. Quando comparamos esse conteúdo nas diferentes variáveis estudadas notamos que nos tumores bem e pouco diferenciados, não existia diferença estatisticamente significativa. Porém, vale ressaltar, da mesma forma como descrevemos com a análise da claudina-3, que a amostra considerada em nosso estudo possuía um número muito pequeno de pacientes com tumores pouco ($n = 3$) e bem diferenciados ($n = 3$), impedindo a realização de uma comparação com poder estatístico confiável. Todavia, quando avaliamos a variância entre as médias do conteúdo tecidual de ocludina entre os diferentes graus de diferenciação celular, encontramos sempre menor conteúdo no tecido tumoral quando comparado ao conteúdo do tecido normal.

Outro aspecto interessante e inédito identificado no presente estudo foi a correlação negativa entre o conteúdo tecidual de ocludina e os níveis séricos do CEA nos tecidos normais. Como se sabe, o CEA é uma imunoglobulina, pertencente à família das moléculas de adesão celular, cuja sua principal função é a contribuir para maior adesão intercelular dos tecidos de todo o trato gastrointestinal (71). Apesar de não ser um marcador específico para o câncer colorretal, seu nível sérico apresenta forte correlação com o prognóstico da doença. Pacientes que, durante os exames de estadiamento, apresentam valores muito elevados do CEA, geralmente podem apresentar doença metastática. Martinez et al. (72), mostraram que o nível sérico do CEA se eleva à medida que os tumores apresentavam piora do grau de diferenciação celular. Mostraram ainda que os valores do CEA eram mais elevados à medida que as células neoplásicas apresentavam perda das características morfofuncionais, perda da capacidade de polarização do CEA, nas neoplasias com maior grau de invasão celular e naqueles doentes onde o estadiamento TNM era mais avançado.

Já a claudina-3 não se mostrou correlacionada aos níveis séricos do CEA. No entanto, apresentou correlação negativa com o CA-19.9 nos tecidos normais de portadores de CCR, outro resultado ainda não descrito na literatura. Esses resultados sugerem que nestes doentes com presença de marcadores tumorais elevados há possível alteração das proteínas da junção de oclusão não somente no tecido tumoral como no tecido normal distante da lesão. Uma das hipóteses para que o mecanismo de extravasamento de células cancerígenas no tecido do novo sítio tumoral seja bem-sucedido seria um desarranjo estrutural da junção de oclusão. Estes dados

corroboram com a hipótese de haver um desarranjo estrutural da JO antes de haver a presença de células cancerígenas locais em pacientes com marcadores tumorais elevados.

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que a menor expressão das proteínas claudina-3 e ocludina nas membranas ápico-laterais das células neoplásicas possa estar relacionada a menor adesão das células neoplásicas no tecido tumoral. Em outras palavras, essa menor adesão poderia ser uma explicação plausível para a maior possibilidade de migração dessas células para o interior de vasos sanguíneos e linfáticos. A penetração mais fácil dessas células neoplásicas no interior do sistema angiolímfático poderia ser uma evidência para a maior possibilidade de metástases linfonodais e à distância. Todavia, essa hipótese ainda merece investigação mais detalhada com estudo que avalie um maior número de doentes.

É importante considerar que presente estudo apresenta algumas limitações metodológicas. Trata-se de um estudo transversal retrospectivo, onde os doentes foram inseridos de forma progressiva. Não se obteve equidade na seleção de um número equitativo de doentes com adenocarcinoma colorretal cujos tumores fossem bem, moderadamente e pouco diferenciados. Contudo, na prática clínica do cirurgião oncológico colorretal, a maioria dos doentes tratados possui tumores moderadamente diferenciados, o que foi encontrado no presente estudo. Os portadores de tumores bem diferenciados, pouco diferenciados e indiferenciados, constituem um menor grupo de doentes em qualquer estudo que avalie o CCR. Assim, a distribuição do presente estudo representa aquela que o cirurgião colorretal enfrenta na prática diária. Outra limitação está representada pelo número dos pacientes estudados. Apesar de termos selecionado inicialmente 74 doentes, a falta de dados clínicos e laboratoriais nos prontuários fez com que tivéssemos de excluir 16 pacientes. Este percalço, reforça a necessidade de se introduzir, na prática clínica, bases eletrônicas para o armazenamento de todos os dados que sejam coletados. Da mesma forma, referenda a necessidade de que o profissional responsável, assim como os médicos assistentes, seja alertado para a importância do preenchimento cuidadoso dos prontuários médicos. Outra limitação deste trabalho em relação a coleta de dados dos prontuários relacionou-se as variáveis clínicas tabagismo e etilismo. Por se tratar de um estudo retrospectivo baseado em dados de prontuários, muitas vezes esse tipo de informação não estava bem definido. Em relação ao tabagismo foi encontrado dados mais consistentes no prontuário, com relatos sobre a carga tabágica, porém quanto ao etilismo em muitos dos casos apenas havia a afirmação positiva ou negativa quanto ao seu consumo. Por fim, outro aspecto que limitou a inclusão de um maior número de doentes foi o custo necessário para a aquisição dos anticorpos primários. Trata-se de anticorpos importados, sem similares produzidos no Brasil. Com a pandemia da COVID-19 e os

altos valores que o dólar atingiu no período que realizamos este estudo, tivemos grande dificuldade na aquisição desses anticorpos. Não obstante, nos testes amostrais para seleção da amostra, o número de doentes incluídos no presente estudo ainda estava acima da estimativa preconizada.

Um aspecto muito interessante observado no presente estudo diz respeito a localização das proteínas de junção de oclusão. Nos tecidos tumorais elas não mais estão presentes nas membranas ápico-lateral das células. Quando presentes, estão localizadas no citoplasma celular ou no estroma. Esse aspecto ainda merece ser estudado mais bem estudado. É possível que a modificação do local de expressão de ambas as proteínas possa estar ligada a modificação de algum mecanismo de sinalização na célula neoplásica. Talvez, de modo distinto, a perda de expressão na membrana ápico-lateral da célula neoplásica possa responsável pela migração dessas proteínas para o citoplasma das células e para o estroma tecidual. É possível que as divergências existentes entre os diferentes estudos quanto ao padrão de expressão dessas proteínas no tecido neoplásico possam estar relacionadas à técnica imuno-histoquímica empregada, ou à escala de imunoescore utilizada para a avaliação do conteúdo tecidual das proteínas. Na maioria dos estudos, os autores mensuraram apenas o conteúdo total da proteína encontrada no tecido, em detrimento à sua localização. Talvez, essas diferentes metodologias de análise possam explicar a discrepância nos resultados descritos na literatura. Para dirimir essas dúvidas novos estudos comparando todas essas metodologias de análise ainda merecem ser feitos. No momento, nas mesmas lâminas utilizadas para a elaboração do presente estudo, estamos mensurando o conteúdo dessas proteínas por processamento de imagem assistida por computador, apenas nas membranas celulares ápico-laterais de um maior número de enfermos portadores de tumores com diferentes graus de diferenciação. Com um método de análise objetivo, talvez seja possível avaliar com maior segurança a modificação no conteúdo e padrão de expressão que ocorre nos tecidos neoplásicos. Pretendemos ainda, analisar as vias de sinalização dessas proteínas com o objetivo de verificar se a perda de expressão nas membranas pode estar relacionada a alterações nos mecanismos de sinalização celular. Da mesma forma, pretendemos mensurar o conteúdo de claudina-3 e ocludina na corrente sanguínea com o objetivo de verificar se valores séricos mais elevados poderiam estar relacionados a neoplasias de comportamento mais agressivo. Essa estratégia tem o objetivo de verificar se os níveis séricos de claudina-3 e ocludina poderiam ser utilizados como marcadores biológicos relacionados ao melhor ou pior prognóstico da doença.

5 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente estudo, considerando o conteúdo tecidual das proteínas claudina-3 e ocludina em tecidos saudáveis e com adenocarcinoma, em doentes portadores de adenocarcinoma colorretal, permitiram concluir que:

- O tecido com adenocarcinoma tem um menor conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina quando comparado ao tecido saudável.
- Tumores moderadamente diferenciados cursam com um menor conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina no tecido com adenocarcinoma quando comparado ao tecido saudável. Tumores pouco diferenciado não apresentam menor conteúdo de ambas as proteínas, quando comparado ao tecido saudável. Tumores bem diferenciados cursam com menor conteúdo tecidual de claudina-3.
- A presença de invasão angiolinfática e perineural, e os níveis séricos de CEA e CA-19.9, não apresentaram relação com o conteúdo tecidual das proteínas claudina -3 e ocludina.
- O etilismo apresentou relação com um menor conteúdo tecidual de claudina-3 nos tecidos com adenocarcinoma.
- Quanto maior o valor sérico de CEA em portadores de adenocarcinoma colorretal, menor será o conteúdo de ocludina em tecido saudável, e o inverso também é verdadeiro. Já um maior nível sérico de CA19.9 está relacionado com um conteúdo reduzido de claudina-3 em tecido normal, e vice-versa.
- O conteúdo tecidual de claudina-3 e ocludina não apresentou correlação com o estadiamento do câncer colorretal.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer. Câncer de intestino. INCA - Instituto Nacional de Câncer. 2018 [citado 9 de novembro de 2021]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-intestino>
2. Oncoguia I. Estatística para Câncer Colorretal. Instituto Oncoguia. [citado 9 de novembro de 2021]. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estatistica-para-cancer-colorretal/7284/178/>
3. de Campos, Regadas, Pinho. Tratado de Coloproctologia. SBCP. 2018 [citado 9 de novembro de 2021]. Disponível em: <https://sbc.org.br/galeria-de-livros/tratado-de-coloproctologia/>
4. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* agosto de 2011;61(4):212–36.
5. Quintero E, Carrillo M, Leoz M-L, Cubiella J, Gargallo C, Lanás A, et al. Risk of Advanced Neoplasia in First-Degree Relatives with Colorectal Cancer: A Large Multicenter Cross-Sectional Study. *PLoS Med.* maio de 2016;13(5):e1002008.
6. Bailey CE, Hu C-Y, You YN, Bednarski BK, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, et al. Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975-2010. *JAMA Surg.* janeiro de 2015;150(1):17–22.
7. Weinberg BA, Marshall JL, Salem ME. The Growing Challenge of Young Adults With Colorectal Cancer. *Oncol Williston Park N.* 15 de maio de 2017;31(5):381–9.
8. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control CCC.* junho de 2013;24(6):1207–22.
9. Ou B, Zhao J, Guan S, Lu A. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and survival of colorectal cancer patients: a meta-analysis. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* abril de 2015;51(6):786–8.
10. Takahashi Y, Ellis LM, Mai M. The angiogenic switch of human colon cancer occurs simultaneous to initiation of invasion. *Oncol Rep.* fevereiro de 2003;10(1):9–13.
11. Joo Y-E, Kim H-S, Min S-W, Lee W-S, Park C-H, Park C-S, et al. Expression of cyclooxygenase-2 protein in colorectal carcinomas. *Int J Gastrointest Cancer.* 2002;31(1–3):147–54.

12. Nasser Y, Langenfeld SJ. Imaging for Colorectal Cancer. *Surg Clin North Am.* junho de 2017;97(3):503–13.
13. Valls C, Andía E, Sánchez A, Gumà A, Figueras J, Torras J, et al. Hepatic metastases from colorectal cancer: preoperative detection and assessment of resectability with helical CT. *Radiology.* janeiro de 2001;218(1):55–60.
14. Al-Sukhni E, Milot L, Fruitman M, Beyene J, Victor JC, Schmocker S, et al. Diagnostic accuracy of MRI for assessment of T category, lymph node metastases, and circumferential resection margin involvement in patients with rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg Oncol.* julho de 2012;19(7):2212–23.
15. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The eighth edition AJCC cancer staging manual: continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(2):93–9.
16. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* abril de 2003;16(4):376–88.
17. Real Martinez CA, Mendes Bartocci PC, Do Carmo CV, Pereira JA, da Conceição Miranda DD, Ribeiro ML. The effects of oxidative DNA damage and mutations in the p53 protein on cells of the colonic mucosa with and without the fecal stream: an experimental study in rats. *Scand J Gastroenterol.* 2010;45(6):714–24.
18. Ribeiro ML, Priolli DG, Miranda DD, Arçari DP, Pedrazzoli Jr J, Martinez CA. Analysis of oxidative DNA damage in patients with colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2008;7(4):267–72.
19. Almeida JRC, Pedrosa NL, Leite JB, Fleming TRP, Carvalho VH, Cardoso AAA. Tumor markers: A literature review. *Rev Bras Cancerol.* 2007;53(3):305–16.
20. Hall C, Clarke L, Pal A, Buchwald P, Eglinton T, Wakeman C, et al. A review of the role of carcinoembryonic antigen in clinical practice. *Ann Coloproctology.* 2019;35(6):294.
21. Quah H-M, Chou JF, Gonen M, Shia J, Schrag D, Landmann RG, et al. Identification of patients with high-risk stage II colon cancer for adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum.* maio de 2008;51(5):503–7.
22. Fletcher RH. Carcinoembryonic antigen. *Ann Intern Med.* 1986;104(1):66–73.

23. Lothhammer, N.; Matte, C.; Cruz, P. F.; Sehn, F.; Fernandes, M. C. *Biologia Celular Atlas Digital*. 2019 [citado 9 de novembro de 2021]. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/biologiacelularatlas/index.htm>
24. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*. 29 de junho de 1998;141(7):1539–50.
25. Martin TA. The role of tight junctions in cancer metastasis. *Semin Cell Dev Biol*. dezembro de 2014;36:224–31.
26. Martinez CAR, de Campos FGCM, de Carvalho VRJ, de Castro Ferreira C, Rodrigues MR, Sato DT, et al. Claudin-3 and occludin tissue content in the glands of colonic mucosa with and without a fecal stream. *J Mol Histol*. abril de 2015;46(2):183–94.
27. Pradhan-Sundd T, Monga SP. Blood-Bile Barrier: Morphology, Regulation, and Pathophysiology. *Gene Expr*. 18 de abril de 2019;19(2):69–87.
28. Shin K, Fogg VC, Margolis B. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22:207–35.
29. Latorre IJ, Roh MH, Frese KK, Weiss RS, Margolis B, Javier RT. Viral oncoprotein-induced mislocalization of select PDZ proteins disrupts tight junctions and causes polarity defects in epithelial cells. *J Cell Sci*. 15 de setembro de 2005;118(Pt 18):4283–93.
30. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. abril de 2001;2(4):285–93.
31. Wang X, Tully O, Ngo B, Zitin M, Mullin JM. Epithelial tight junctional changes in colorectal cancer tissues. *ScientificWorldJournal*. 5 de abril de 2011;11:826–41.
32. Kominsky SL, Vali M, Korz D, Gabig TG, Weitzman SA, Argani P, et al. *Clostridium perfringens* enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol*. maio de 2004;164(5):1627–33.
33. Long H, Crean CD, Lee WH, Cummings OW, Gabig TG. Expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res*. 1º de novembro de 2001;61(21):7878–81.
34. Nichols LS, Ashfaq R, Iacobuzio-Donahue CA. Claudin 4 protein expression in primary and metastatic pancreatic cancer: support for use as a therapeutic target. *Am J Clin Pathol*. fevereiro de 2004;121(2):226–30.

35. Rangel LBA, Agarwal R, D'Souza T, Pizer ES, Alò PL, Lancaster WD, et al. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* julho de 2003;9(7):2567–75.
36. Kinugasa T, Huo QUN, Higashi D, Shibaguchi H, Kuroki M, Tanaka T, et al. Selective up-regulation of claudin-1 and claudin-2 in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2007;27(6A):3729–34.
37. Huo Q, Kinugasa T, Wang L, Huang J, Zhao J, Shibaguchi H, et al. Claudin-1 protein is a major factor involved in the tumorigenesis of colorectal cancer. *Anticancer Res.* março de 2009;29(3):851–7.
38. Lee JS, Tato CM, Joyce-Shaikh B, Gulen MF, Gulan F, Cayatte C, et al. Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability. *Immunity.* 20 de outubro de 2015;43(4):727–38.
39. Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE. Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* abril de 2005;18(4):511–8.
40. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28 de agosto de 2001;98(18):10356–61.
41. Brooks PC. Cell adhesion molecules in angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* junho de 1996;15(2):187–94.
42. Martin TA, Jiang WG. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochim Biophys Acta.* abril de 2009;1788(4):872–91.
43. Lothhammer M, Matte C, Cruz PF, Fernandes MC. *Biologia Celular - Atlas Digital.* Porto Alegre: UFRGS/UFCSPA; 2009.
44. Instituto Nacional de Câncer. Estatísticas de câncer. INCA - Instituto Nacional de Câncer. 2021 [citado 9 de novembro de 2021]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>
45. Arlt F, Stein U. Colon cancer metastasis: MACC1 and Met as metastatic pacemakers. *Int J Biochem Cell Biol.* dezembro de 2009;41(12):2356–9.
46. Butte JM, Gönen M, Allen PJ, Peter Kingham T, Sofocleous CT, DeMatteo RP, et al. Recurrence After Partial Hepatectomy for Metastatic Colorectal Cancer: Potentially Curative Role of Salvage Repeat Resection. *Ann Surg Oncol.* agosto de 2015;22(8):2761–71.

47. Amin MB, Greene FL, Edge S, Schilsky RL, Gaspar LE, Washington MK, et al. Cancer staging manual. 8th. edition. AJCC; 2017. Disponível em: <https://cancerstaging.org/About/news/Documents/amin%20AJCC%20flyer%20revised%207.17.pdf>
48. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst.* 6 de outubro de 2004;96(19):1420–5.
49. Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci.* 15 de maio de 2003;116(Pt 10):1959–67.
50. Sawada N. Tight junction-related human diseases. *Pathol Int.* janeiro de 2013;63(1):1–12.
51. Soler AP, Miller RD, Laughlin KV, Carp NZ, Klurfeld DM, Mullin JM. Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis.* agosto de 1999;20(8):1425–31.
52. Otani T, Furuse M. Tight Junction Structure and Function Revisited. *Trends Cell Biol.* outubro de 2020;30(10):805–17.
53. Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, Hayes KL, Powell RM, MacDonald TT, et al. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* setembro de 2005;85(9):1139–62.
54. Ahmad R, Kumar B, Chen Z, Chen X, Müller D, Lele SM, et al. Loss of claudin-3 expression induces IL6/gp130/Stat3 signaling to promote colon cancer malignancy by hyperactivating Wnt/ β -catenin signaling. *Oncogene.* 23 de novembro de 2017;36(47):6592–604.
55. Ooshio T, Kobayashi R, Ikeda W, Miyata M, Fukumoto Y, Matsuzawa N, et al. Involvement of the interaction of afadin with ZO-1 in the formation of tight junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem.* 12 de fevereiro de 2010;285(7):5003–12.
56. Günzel D, Fromm M. Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol.* julho de 2012;2(3):1819–52.
57. Landy J, Ronde E, English N, Clark SK, Hart AL, Knight SC, et al. Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 21 de março de 2016;22(11):3117–26.

58. Arrieta MC, Madsen K, Doyle J, Meddings J. Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene-deficient mouse. *Gut*. janeiro de 2009;58(1):41–8.
59. Landy J, Al-Hassi HO, Ronde E, English NR, Mann ER, Bernardo D, et al. Innate immune factors in the development and maintenance of pouchitis. *Inflamm Bowel Dis*. novembro de 2014;20(11):1942–9.
60. Tanaka H, Takechi M, Kiyonari H, Shioi G, Tamura A, Tsukita S. Intestinal deletion of Claudin-7 enhances paracellular organic solute flux and initiates colonic inflammation in mice. *Gut*. outubro de 2015;64(10):1529–38.
61. Mees ST, Mennigen R, Spieker T, Rijcken E, Senninger N, Haier J, et al. Expression of tight and adherens junction proteins in ulcerative colitis associated colorectal carcinoma: upregulation of claudin-1, claudin-3, claudin-4, and beta-catenin. *Int J Colorectal Dis*. abril de 2009;24(4):361–8.
62. Dhawan P, Ahmad R, Chaturvedi R, Smith JJ, Midha R, Mittal MK, et al. Claudin-2 expression increases tumorigenicity of colon cancer cells: role of epidermal growth factor receptor activation. *Oncogene*. 21 de julho de 2011;30(29):3234–47.
63. Kinugasa T, Akagi Y, Yoshida T, Ryu Y, Shiratuchi I, Ishibashi N, et al. Increased claudin-1 protein expression contributes to tumorigenesis in ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *Anticancer Res*. agosto de 2010;30(8):3181–6.
64. de Oliveira SS, de Oliveira IM, De Souza W, Morgado-Díaz JA. Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS Lett*. 7 de novembro de 2005;579(27):6179–85.
65. Na H-K, Lee JY. Molecular Basis of Alcohol-Related Gastric and Colon Cancer. *Int J Mol Sci*. 24 de maio de 2017;18(6):E1116.
66. Ma TY, Nguyen D, Bui V, Nguyen H, Hoa N. Ethanol modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol*. abril de 1999;276(4):G965-974.
67. Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, et al. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol*. 20 de abril de 1998;141(2):397–408.
68. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*. dezembro de 2000;11(12):4131–42.

69. Kucharzik T, Walsh SV, Chen J, Parkos CA, Nusrat A. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am J Pathol.* dezembro de 2001;159(6):2001–9.
70. Kimura Y, Shiozaki H, Hirao M, Maeno Y, Doki Y, Inoue M, et al. Expression of occludin, tight-junction-associated protein, in human digestive tract. *Am J Pathol.* julho de 1997;151(1):45–54.
71. Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med.* 1º de setembro de 1965;122(3):467–81.
72. Martinez CAR, Priolli DG, Cardinalli IA, Piovesan H, Pereira JA, Waisberg J, et al. Correlação entre o padrão de expressão tecidual e os valores séricos do antígeno carcinoembrionário em doentes com câncer colorretal. *Rev Bras Coloproctologia.* março de 2006;26(1):41–53.

ANEXOS

Anexo I: Parecer Consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE SÃO
FRANCISCO-SP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Conteúdo tecidual das proteínas claudina-3 e ocludina em portadores de câncer colorretal.

Pesquisador: Roberta Lais dos Santos Mendonça

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 33278820.1.0000.5514

Instituição Proponente: Universidade São Francisco-SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.096.912

Apresentação do Projeto:

O Câncer Colorretal, particularmente os adenocarcinomas, são tumores que se desenvolvem na mucosa do cólon e do reto. O câncer colorretal (CCR), é o terceiro tipo de câncer mais frequente nos homens e o segundo entre as mulheres. Este é um trabalho de pesquisa, sobre câncer colorretal, onde a proposta é avaliar a expressão tecidual das proteínas claudina-3, e ocludina e sua correlação com o estadiamento do CCR e mensurar seu conteúdo tecidual com morfometria computadorizada, comparando tecidos com e sem CCR. Além disso pretende-se ainda, correlacionar o conteúdo de cada proteína com as principais variáveis clínicas e histopatológicas a fim de identificar novas estratégias que possibilitem a identificação de pacientes com maior risco de disseminação loco-regional e a distâncias de células neoplásicas. A melhor compreensão do papel representado por essas proteínas pode propor novas alternativas terapêuticas, como o desenvolvimento de medicações que possam atuar impedindo a propagação de células tumorais e o desenvolvimento de metástases.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral:

O objetivo do presente estudo é avaliar o padrão de expressão e o conteúdo das proteínas ocludina e claudina-3, comparando tecido colorretal com e sem adenocarcinoma e verificar sua correlação com o estadiamento da neoplasia.

Endereço: Av. São Francisco de Assis, 218, sala 35, prédio central

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 12.916-900 BRAGANCA

UF: SP

Município:

PAULISTA

Telefone: (11)2454-8302

E-mail: comiteetica@usf.edu.br

UNIVERSIDADE SÃO
FRANCISCO-SP



Continuação do Parecer: 4.096.912

Objetivos específicos:

Correlacionar a expressão e o conteúdo tecidual de ocludina e claudina-3 com outros fatores prognósticos encontrados na análise histopatológica, como presença de budding tumoral, grau de diferenciação tumoral, subtipo histológico, invasão angiolinfática e perineural.

Correlacionar a expressão e o conteúdo tecidual de ocludina e claudina-3 com características clínicas do paciente, como idade, sexo, doenças associadas, e hábitos de vida como o tabagismo e etilismo.

Correlacionar o nível de marcadores tumorais CEA e CA19-9, com a expressão de ocludina e claudina-3.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ausência de riscos para os participantes envolvidos já que as amostras já foram coletadas a partir de espécimes cirúrgicas, onde nesta pesquisa serão analisadas essas amostras.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador se propõe a analisar 60 prontuários de pacientes doentes portadores de CCR, que foram submetidos ao tratamento cirúrgico, pela equipe de Coloproctologia do HUSF nos últimos 5 anos. Serão coletados dados nos prontuários destes doentes: sexo, idade, etnia, hábitos de vida, doenças associadas, dados laboratoriais, como hemograma, CEA e CA 19-9 e de exames de imagem, presença de metástase linfonodal ou hematogênica, dados do estudo anatomopatológico como grau de diferenciação do tumor, subtipo histológico, presença ou não de budding tumoral, presença de invasão angiolinfática e perineural, e sobrevida do paciente neste período.

Para a confecção das lâminas histológicas destinados ao estudo imunohistoquímico para a pesquisa das proteínas claudina-3 e ocludina, serão utilizadas duplicatas dos blocos de parafina de cada um dos doentes selecionados para o presente estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para o projeto em questão foram apresentados todos os documentos: Folha de Rosto devidamente preenchida e assinada, Informações básicas do Projeto, Projeto detalhado/brochura investigador, Carta de autorização HUSF, TCUD, TCLE, Termo de Confidencialidade, Cronograma, Carta de autorização para realização da pesquisa, e declaração de fiel depositário das amostras a serem utilizadas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado sem óbices éticos.

Endereço: Av. São Francisco de Assis, 218, sala 35, prédio central

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 12.916-900 BRAGANCA

UF: SP

Município:

PAULISTA

Telefone: (11)2454-8302

E-mail: comiteetica@usf.edu.br

UNIVERSIDADE SÃO
FRANCISCO-SP



Continuação do Parecer: 4.096.912

Considerações Finais a critério do CEP:

APÓS DISCUSSÃO EM REUNIÃO DO DIA 18/06/2020, O COLEGIADO DELIBEROU PELA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISAS. APÓS A CONCLUSÃO DO PROJETO É OBRIGATÓRIO O ENVIO DO RELATÓRIO FINAL PARA ENCERRAMENTO DO PROJETO.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1568278.pdf	05/06/2020 19:08:27		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de Pesquisa revisado.docx	05/06/2020 19:06:46	roberta lais dos santos mendonca	Acelto
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	CABlocosdeparafina.docx	05/06/2020 19:01:59	roberta lais dos santos mendonca	Acelto
Outros	cedap.pdf	05/06/2020 19:01:11	roberta lais dos santos mendonca	Acelto
Outros	TermoDeConfidencialidadeassinado.docx	05/06/2020 18:56:09	roberta lais dos santos mendonca	Acelto
Outros	TCUDassinado.pdf	05/06/2020 18:51:48	roberta lais dos santos mendonca	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacaohusf.docx	05/06/2020 18:50:50	roberta lais dos santos mendonca	Acelto
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	05/06/2020 16:37:27	roberta lais dos santos mendonca	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEmodificado.doc	05/06/2020 16:35:23	roberta lais dos santos mendonca	Acelto
Folha de Rosto	folhaderostoassinada.pdf	05/06/2020 16:31:00	roberta lais dos santos mendonca	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. São Francisco de Assis, 218, sala 35, prédio central
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 12.916-900 BRAGANCA
 UF: SP Município: PAULISTA
 Telefone: (11)2454-8302 E-mail: comiteetica@usf.edu.br

UNIVERSIDADE SÃO
FRANCISCO-SP



Continuação do Parecer: 4.096.912

BRAGANCA PAULISTA, 18 de Junho de 2020

Assinado por:

CARLOS EDUARDO PULZ ARAUJO

(Coordenador(a))

Endereço: Av. São Francisco de Assis, 218, sala 35, prédio central

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 12.916-900 BRAGANCA

UF: SP

Município:

PAULISTA

Telefone: (11)2454-8302

E-mail: comiteetica@usf.edu.br

Anexo II: Carta de doação dos blocos de parafinas pelo CEDAP.

	CENTRO DE DIAGNÓSTICO EM ANATOMIA PATOLÓGICA
	Dra. HELENICE PIOVESAN CRM 46.356
RUA CORONEL LEME, Nº 360 - CENTRO BRAGANÇA PAULISTA - SP - CEP 12.900-340 Bragança Paulista, 01/06/2020	
FONE / FAX: (11) 4032-8979 FONE: (11) 2473-1000 cedaplaboratorio@uol.com.br	

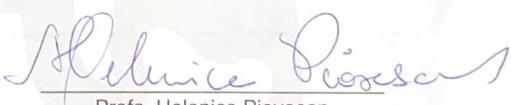
Declaração

Declaro para os devidos fins, que com o encerramento das atividades do Centro de Diagnóstico em Anatomia Patológica (CEDAP) em Bragança Paulista, foram doadas ao Prof. Carlos Augusto Real Martinez, CPF: 884.072.928-34, RG: 5.568.740-4, CRM. 37.663, duplicatas de blocos de parafina de doentes com câncer de cólon e reto que estavam arquivadas no CEDAP, sob nossa responsabilidade.

A doação dessas duplicatas tem como objetivo permitir manter ativa a de Linha de Pesquisa sobre câncer colorretal sob responsabilidade do Professor Carlos Augusto Real Martinez. O CEDAP manterá em seu acervo os blocos originais correspondentes a cada duplicada doada.

As duplicatas dos blocos de parafina doados passarão, a partir desta data a ter o Professor Carlos Augusto Real Martinez como fiel depositário das amostras

É o que me cumpre declarar


Profa. Helenice Piovesan
Médica Patologista Responsável pelo
Centro de Diagnóstico em Anatomia Patológica



APÊNDICES

Apêndice 1 – Tabulação da análise das lâminas atribuída de acordo com o imunoescore utilizado - Examinador 1.

LÂMINA		EXAMINADOR 1			
NÚMERO 1	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	2	1	2	1,66666667
	OCLUDINA NORMAL	3	2	3	2,66666667
	OCLUDINA TUMOR	1	1	0	0,66666667
NÚMERO 8	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	1	2	2	1,66666667
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	2	1	2	1,66666667
NÚMERO 9	CLAUDINA NORMAL	3	2	3	2,66666667
	CLAUDINA TUMOR	2	1	1	1,33333333
	OCLUDINA NORMAL	2	3	3	2,66666667
	OCLUDINA TUMOR	1	1	1	1
NÚMERO 12	CLAUDINA NORMAL	2	3	3	2,66666667
	CLAUDINA TUMOR	0	0	1	0,33333333
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	0	0	0	0
NÚMERO 13	CLAUDINA NORMAL	3	2	2	2,33333333
	CLAUDINA TUMOR	2	2	2	2
	OCLUDINA NORMAL	3	3	2	2,66666667
	OCLUDINA TUMOR	2	2	2	2
NÚMERO 17	CLAUDINA NORMAL	2	1	1	1,33333333
	CLAUDINA TUMOR	2	1	1	1,33333333
	OCLUDINA NORMAL	2	2	2	2
	OCLUDINA TUMOR	3	1	2	2
NÚMERO 18	CLAUDINA NORMAL	2	2	2	2
	CLAUDINA TUMOR	1	1	2	1,33333333
	OCLUDINA NORMAL	2	3	3	2,66666667
	OCLUDINA TUMOR	2	3	2	2,33333333
NÚMERO 19	CLAUDINA NORMAL	2	2	3	2,33333333
	CLAUDINA TUMOR	1	1	1	1
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	1	1	2	1,33333333

NÚMERO 21	CLAUDINA NORMAL	1	2	2	1,66666667
	CLAUDINA TUMOR	2	1	1	1,33333333
	OCLUDINA NORMAL	3	2	2	2,33333333
	OCLUDINA TUMOR	2	1	1	1,33333333
NÚMERO 22	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	2	3	2	2,33333333
	OCLUDINA NORMAL	3	2	3	2,66666667
	OCLUDINA TUMOR	2	2	2	2
NÚMERO 24	CLAUDINA NORMAL	3	1	1	1,66666667
	CLAUDINA TUMOR	1	2	2	1,66666667
	OCLUDINA NORMAL	2	3	3	2,66666667
	OCLUDINA TUMOR	1	2	2	1,66666667
NÚMERO 25	CLAUDINA NORMAL	3	2	3	2,66666667
	CLAUDINA TUMOR	1	2	2	1,66666667
	OCLUDINA NORMAL	3	2	2	2,33333333
	OCLUDINA TUMOR	2	2	2	2
NÚMERO 29	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	2	3	2	2,33333333
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	2	2	1	1,66666667
NÚMERO 41	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	1	2	2	1,66666667
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	2	1	3	2
NÚMERO 42	CLAUDINA NORMAL	2	2	2	2
	CLAUDINA TUMOR	2	1	2	1,66666667
	OCLUDINA NORMAL	3	2	3	2,66666667
	OCLUDINA TUMOR	1	1	2	1,33333333
NÚMERO 43	CLAUDINA NORMAL	2	2	2	2
	CLAUDINA TUMOR	2	2	2	2
	OCLUDINA NORMAL	2	1	2	1,66666667
	OCLUDINA TUMOR	1	1	2	1,33333333
NÚMERO 45	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	3	2	2	2,33333333
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	3	2	2	2,33333333
NÚMERO 46	CLAUDINA NORMAL	1	0	2	1
	CLAUDINA TUMOR	1	1	2	1,33333333
	OCLUDINA NORMAL	1	1	2	1,33333333
	OCLUDINA TUMOR	1	1	2	1,33333333
NÚMERO 47	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	2	2	2	2
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	2	3	2	2,33333333
NÚMERO 48	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	2	3	1	2
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3

	OCLUDINA TUMOR	1	1	2	1,333333333
NÚMERO 49	CLAUDINA NORMAL	3	2	2	2,333333333
	CLAUDINA TUMOR	2	1	1	1,333333333
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	2	2	1	1,666666667
NÚMERO 50	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	1	2	2	1,666666667
	OCLUDINA NORMAL	2	3	3	2,666666667
	OCLUDINA TUMOR	1	2	1	1,333333333
NÚMERO 54	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	2	1	2	1,666666667
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	2	2	2	2
NÚMERO 57	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	0	1	1	0,666666667
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	0	0	1	0,333333333
NÚMERO 59	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	2	1	2	1,666666667
	OCLUDINA NORMAL	3	3	2	2,666666667
	OCLUDINA TUMOR	1	1	1	1
NÚMERO 60	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	0	1	0	0,333333333
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	0	1	0	0,333333333
NÚMERO 62	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	1	1	2	1,333333333
	OCLUDINA NORMAL				0
	OCLUDINA TUMOR	2	2	1	1,666666667
NÚMERO 63	CLAUDINA NORMAL	2	2	3	2,333333333
	CLAUDINA TUMOR	1	1	2	1,333333333
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	1	1	2	1,333333333
NÚMERO 67	CLAUDINA NORMAL	0	0	1	0,333333333
	CLAUDINA TUMOR	0	1	1	0,666666667
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	1	0	2	1
NÚMERO 69	CLAUDINA NORMAL	2	2	1	1,666666667
	CLAUDINA TUMOR	0	1	0	0,333333333
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	2	1	2	1,666666667
NÚMERO 70	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR				0
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR				0
NÚMERO 71	CLAUDINA NORMAL	3	2	3	2,666666667
	CLAUDINA TUMOR	2	2	2	2
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3

	OCLUDINA TUMOR	2	1	2	1,66666667
NÚMERO 72	CLAUDINA NORMAL	3	2	2	2,33333333
	CLAUDINA TUMOR	1	2	0	1
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	2	2	2	2
NÚMERO 73	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR				0
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	0			0
NÚMERO 74	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR				0
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	0	0	0	0
NÚMERO 75	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	1	1	1	1
	OCLUDINA NORMAL	3	1	2	2
	OCLUDINA TUMOR	1	0	1	0,66666667
NÚMERO 78	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	2	2	1	1,66666667
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	1	1	2	1,33333333
NÚMERO 79	CLAUDINA NORMAL	2	3	3	2,66666667
	CLAUDINA TUMOR	2	1	1	1,33333333
	OCLUDINA NORMAL	2	3	2	2,33333333
	OCLUDINA TUMOR	1	2	1	1,33333333
NÚMERO 80	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	2	1	1	1,33333333
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	2	1	1	1,33333333
NÚMERO 81	CLAUDINA NORMAL	1	1	0	0,66666667
	CLAUDINA TUMOR				0
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR				0
NÚMERO 83	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	1	2	2	1,66666667
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	2	1	1	1,33333333
NÚMERO 84	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	1	2	1	1,33333333
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	2	2	1	1,66666667
NÚMERO 85	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	1	2	1	1,33333333
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	1	2	1	1,33333333
NÚMERO 86	CLAUDINA NORMAL	3	2	3	2,66666667
	CLAUDINA TUMOR	1	1	1	1
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3

	OCLUDINA TUMOR	2	1	1	1,333333333
NÚMERO 89	CLAUDINA NORMAL	2	2	2	2
	CLAUDINA TUMOR	2	1	2	1,666666667
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	2	2	1	1,666666667
NÚMERO 99	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	0	0	1	0,333333333
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	0	0	0	0
NÚMERO 105	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	0	0	0	0
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	1	1	0	0,666666667
NÚMERO 106	CLAUDINA NORMAL	2	3	3	2,666666667
	CLAUDINA TUMOR	1	1	1	1
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	0	0	0	0
NÚMERO 107	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	2	2	1	1,666666667
	OCLUDINA NORMAL	3	2	3	2,666666667
	OCLUDINA TUMOR	3	2	2	2,333333333
NÚMERO 108	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	1	1	2	1,333333333
	OCLUDINA NORMAL	3	2	2	2,333333333
	OCLUDINA TUMOR	1	0	0	0,333333333
NÚMERO 109	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	2	1	1	1,333333333
	OCLUDINA NORMAL	3	2	2	2,333333333
	OCLUDINA TUMOR	1	1	2	1,333333333
NÚMERO 110	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	3	2	2	2,333333333
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	0	0	0	0
NÚMERO 113	CLAUDINA NORMAL	1	2	2	1,666666667
	CLAUDINA TUMOR	2	1	1	1,333333333
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	2	2	2	2
NÚMERO 114	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	3	2	2	2,333333333
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	3	2	3	2,666666667
NÚMERO 115	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	2	1	2	1,666666667
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	2	3	2	2,333333333
NÚMERO 117	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	1	1	1	1
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3

	OCLUDINA TUMOR	1	0	1	0,66666667
NÚMERO 119	CLAUDINA NORMAL	3	3	3	3
	CLAUDINA TUMOR	3	3	2	2,66666667
	OCLUDINA NORMAL	3	3	3	3
	OCLUDINA TUMOR	1	2	2	1,66666667

Apêndice 2 - Tabulação da análise das lâminas atribuída de acordo com o imunoescore utilizado - Examinador 2.

LÂMINA	Claudina		Ocludina	
	Normal	Tumor	Normal	Tumor
1	3.3.3	2.2.1	3.3.3	1.0.1
8	3.3.3	2.1.1	3.3.3	2.2.1
9	3.2.3	2.2.2	2.2.3	1.1.0
12	3.3.3	1.0.0	3.2.2	0.0.0
13	3.3.2	2.1.2	3.3.2	1.1.2
17	1.1.2	0.1.0	2.3.2	1.0.1
18	1.2.2	1.1.0	3.3.3	2.1.2
19	3.2.3	0.0.0	2.3.3	1.1.1
21	2.2.2	0.1.0	3.3.2	1.1.1
22	3.3.3	1.2.2	3.3.3	2.2.1
24	2.1.1	0.1.0	3.3.2	1.2.1
25	2.2.3	0.0.1	2.2.2	1.2.2
29	3.3.3	1.2.2	3.3.3	2.3.2
41	2.2.3	0.0.0	3.3.3	1.1.2
42	1.1.2	0.0.1	3.3.3	0.0.0
43	2.3.2	1.1.1	2.1.1	1.1.1
45	3.3.3	1.2.3	3.3.3	2.1.1
46	0.1.2	1.0.0	1.1.1	1.1.0
47	3.3.3	1.1.1	3.3.3	1.2.1
48	3.3.3	2.2.1	3.3.3	1.1.1
49	2.2.2	1.0.0	3.3.3	1.2.1
50	2.3.2	1.1.2	2.3.2	1.1.1
54	2.3.3	2.0.2	3.3.3	2.1.1
57	3.3.2	0.0.0	3.3.3	0.1.0
59	3.3.3	2.2.1	3.3.3	0.1.1
60	3.3.3	0.0.0	3.3.3	0.1.0
63	2.2.3	1.0.1	3.3.3	2.1.1
67	0.1.0	0.0.1	2.3.3	1.0.1
69	2.2.2	1.0.0	3.2.3	0.1.1
71	3.3.2	1.1.1	2.3.3	1.0.0
72	3.3.2	1.1.0	3.3.3	2.2.1

75	3.3.3	0.0.1	2.0.1	1.0.1
78	3.3.3	1.1.0	3.3.3	1.0.1
79	3.3.3	2.1.0	2.3.3	2.0.1
80	3.3.3	0.1.1	3.3.3	1.0.1
83	3.3.3	0.1.1	3.3.3	1.1.1
84	3.3.3	0.1.0	3.3.3	0.1.0
85	3.2.3	1.1.0	3.3.3	2.1.1
86	3.2.3	0.0.0	3.3.3	1.2.1
89	1.2.2	1.0.0	3.2.3	2.1.1
99	3.3.3	0.0.0	3.3.3	0.0.0
105	3.3.3	0.0.0	3.3.3	1.0.1
106	2.3.3	0.0.0	3.3.3	1.0.0
107	3.3.3	1.0.1	2.3.3	1.1.2
108	3.2.3	2.2.1	3.2.2	1.0.0
109	3.3.2	2.1.1	3.3.3	1.0.1
110	3.3.3	2.2.2	3.3.3	0.0.0
113	0.1.2	2.1.0	3.3.3	1.2.2
114	3.3.3	2.3.3	3.3.3	3.3.2
115	3.3.3	2.0.1	3.3.3	1.1.2
117	3.2.3	1.1.0	3.3.3	0.0.1
119	3.3.3	2.2.3	3.3.3	1.2.1

Apêndice 3 - Tabulação da análise das lâminas atribuída de acordo com o imunoescor utilizado - Examinador 3.

Nº DO BLOCO	Tecido normal / claudina	Câncer / claudina	Normal / ocludina	Câncer / ocludina
1	3.3.3	2.2.1	3.3.3	2.1.1
8	3.3.3	2.1.1	3.3.3	2.2.1
9	3.2.3	2.1.2	3.3.3	2.2.1
12	3.3.3	0.1.0	3.2.3	0.0.0
13	3.3.3	1.1.2	3.3.3	2.1.2
17	1.2.3	1.1.0	2.3.2	1.1.2
18	2.3.3	1.1.1	3.3.3	2.2.1
19	3.3.3	0.1.1	3.3.3	1.1.2
21	2.3.2	0.0.1	3.3.3	1.0.1
22	3.3.3	1.1.1	3.3.3	2.1.2
24	3.2.1	1.1.1	3.3.2	1.2.1.
25	3.3.2	0.1.1	3.3.3	1.1.1
29	3.3.3	1.1.1	3.3.3	2.2.2
41	2.3.3	1.0.1	3.3.3	1.1.2
42	1.2.3	1.0.1	3.3.3	1.1.1
43	3.2.2	1.0.1	2.2.3	1.1.1
45	3.3.3	2.1.1	3.3.3	2.1.1
46	1.1.2	0.0.1	0.1.2	1.0.0
47	3.3.3	1.1.1	3.3.3	0.1.1
48	3.3.3	1.1.2	3.3.3	1.2.1
49	2.2.2	0.1.0	3.2.3	2.1.2
50	2.3.2	0.1.0	3.2.2	1.1.1
54	3.3.3	1.0.1	3.3.3	1.1.1.
57	3.3.3	0.1.0	3.3.3.	0.1.0
59	3.3.3	2.2.1	3.3.3	1.1.1
60	3.3.3	0.1.0	3.3.3	0.0.0
63	2.3.3	1.1.1.	3.3.3	1.1.1
67	1.0.1	1.1.1	2.2.2	1.1.1
69	2.1.1	1.1.0	2.2.3	1.1.1
71	2.2.2	1.1.1	2.3.3	1.0.1
72	2.2.2	1.2.0	3.3.3	1.1.2

75	3.3.2	1.1.1	2.0.0	1.2.1
78	3.3.2	0.1.0	3.3.3	1.2.1
79	2.2.3	1.0.0	2.2.2	1.0.1
80	3.3.3	0.1.1	3.3.3	1.1.1
83	3.2.2	1.0.1	3.2.3	1.1.0
84	3.3.3	0.1.0	3.2.3	1.1.1
85	3.3.3	0.0.1	3.3.3	1.0.1
86	3.2.3	0.1.1	3.3.2	1.1.1
89	2.2.1	0.0.0	3.3.3	1.1.0
99	3.3.3	0.0.0	3.3.3	0.0.0
105	3.3.3	0.0.0	3.3.3	1.0.1
106	2.3.3	1.1.1	3.3.3	0.1.0
107	3.3.3	0.1.1	2.3.3	2.1.1
108	3.3.3	1.1.1	3.3.2	1.0.0
109	3.3.3	1.1.1	3.3.3	1.0.1
110	3.3.3	1.1.1	3.3.3	0.0.0
113	0.2.3	1.1.1	3.3.3	1.1.1
114	3.3.3	1.1.1	3.3.3	1.1.1
115	3.3.3	1.0.1	3.3.3	1.1.1
117	3.3.3	1.1.0	3.3.3	1.0.1
119	3.3.3	1.1.1	3.3.3	1.1.1