

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA
MESTRADO INTERINSTITUCIONAL
FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

EDUARDO BRAMBILLA

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA
CICLOOXIGENASE-2 NAS NEOPLASIAS COLORRETAIS**

Porto Alegre

2006

EDUARDO BRAMBILLA

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA
CICLOOXIGENASE-2 NAS NEOPLASIAS COLORRETAIS**

Dissertação de Mestrado em Medicina
Para obtenção do título de Mestre em Cirurgia
Mestrado Interinstitucional
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Universidade de Caxias do Sul
Faculdade de Medicina

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Moreira

Porto Alegre

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B815e	Brambilla, Eduardo Expressão imunoistoquímica da proteína ciclooxigenase-2 nas neoplasias colorretais / Eduardo Brambilla. 2006. xii, 83 f. : il. ; 30 cm. Orientação: Prof. Dr. Luis Fernando Moreira. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Universidade de Caxias do Sul, Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Cirurgia, 2006. 1. Neoplasia colorretal 2. Adenoma 3. Carcinoma 4. Proteína ciclooxigenase-2. I. Moreira, Luis Fernando II. Título. CDU: 616.35
--------------	--

Índice para o catálogo sistemático:

1. Neoplasia corretal	616.35
2. Adenoma	616.35-006.5
3. Carcinoma	616.35-006.6
4. Proteína ciclooxigenase-2	577.112.38

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha mãe Lídia, pela oportunidade de tornar o sonho da medicina uma realidade.

Ao meu filho Daniel Jun, por representar a minha continuidade, solicito compreensão pelas guerras de travesseiro que deixamos de travar.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Moreira por sua atenção, desprendimento e incentivo e pela transmissão de conhecimentos e experiência na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Pretto Serafini pela dedicação e orientação na avaliação das lâminas da patologia bem como sugestões valiosas na realização desta pesquisa.

Aos técnicos da imunohistoquímica da FFFCMPA pela prestimosa dedicação na resolução das dificuldades inerentes ao projeto.

E a todos que em algum momento auxiliaram com idéias ou ações na construção deste texto.

PENSAMENTO

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.

RESUMO

O carcinoma colorretal é um dos tumores malignos mais freqüentes no mundo ocidental. Sua incidência varia mundialmente; nos Estados Unidos (EUA), é o terceiro câncer mais comum entre os homens e o segundo entre as mulheres, sendo a segunda causa de morte por câncer, ficando atrás apenas do tumor de pulmão. No Brasil é a quarta neoplasia mais freqüente em homens e a segunda em mulheres na região sul. Os principais indicadores prognósticos do adenocarcinoma colorretal incluem a diferenciação histológica, profundidade de invasão e ocorrência de metástases. Recentemente, têm sido realizados diversos estudos em biologia molecular objetivando a identificação de novos parâmetros prognósticos. Dentre eles, os fatores que regulam o ciclo celular, influenciam no crescimento e no mecanismo de apoptose têm demonstrado resultados promissores. Os avanços da biologia molecular permitiram demonstrar a carcinogênese como uma série de alterações progressivas e particulares em cada neoplasia. Embora algumas alterações já estejam bem estabelecidas, outras ainda necessitam ser melhor avaliadas e ter assim sua importância determinada. Entre os muitos componentes desse ciclo tem-se destacado como objeto de interesse a proteína ciclooxygenase-2 (COX-2) por seu aparecimento freqüente nas neoplasias colorretais bem como pelos resultados promissores dos estudos com seus inibidores na profilaxia e tratamento das neoplasias colorretais. A ciclooxygenase é uma enzima fundamental na síntese de eicosanóides como as prostaglandinas PGE₂ e PGD₂ a partir do ácido araquidônico. Foi isolada pela primeira vez por Hemler em 1976. Trata-se de um homodímero (complexo formado por duas moléculas) que possui um peso molecular de 71 Kd. A expressão da COX-2 pode ocorrer em uma variedade de tipos celulares e tecidos especializados onde desempenha funções biológicas específicas, tais como reprodução, imunidade, fisiologia renal, reabsorção óssea e secreção pancreática. Freqüentemente encontrada em várias neoplasias, tem como prováveis formas de ação a formação de prostaglandinas e o estímulo das mesmas em mecanismos de angiogênese, crescimento celular, adesão e diferenciação. O objetivo deste estudo é avaliar a prevalência da proteína COX-2 nas neoplasias colorretais e sua relação com parâmetros patológicos prognósticos para o câncer colorretal. Foram avaliadas 65 lesões neoplásicas colorretais através de imunistoquímica para a presença de COX-2. Também analisaram-se fatores patológicos prognósticos e estadiamento das lesões. A COX-2 expressou-se positivamente em 27% dos adenomas tubulares, 40% dos adenomas vilosos e 70% dos carcinomas. Diferença estatisticamente significativa foi obtida na expressão da COX-2 entre adenomas e carcinomas, porém não houve significância nas demais variáveis estudadas. Concluiu-se que a expressão da COX-2 variou progressivamente com a progressão da lesão neoplásica, mas não influenciou os parâmetros patológicos de mau prognóstico.

ABSTRACT

Colorectal carcinoma is among the most frequently diagnosed malignant tumors in the western world. Its occurrence varies worldwide, and in the USA colorectal cancer is the third most common manifestation of cancer among men and the second among women. In the south region of Brazil, colorectal cancer is ranked fourth among men and second among women as the most frequent neoplasia. Prognosis includes mainly the investigation of tumor histology, extent of invasion, and metastases. Several molecular biology studies have been recently conducted to identify novel prognostic parameters, including cell cycle regulating factors that modify growth and apoptosis. These parameters have shown great promise to therapeutic approach in colorectal carcinoma. Advancements in molecular biology have shown that carcinogenesis comprises a series of progressive, specific alterations for different neoplasias. Although some alterations have been steadily characterized, others are still demanding more research to determine their actual role. Among many elements involved in carcinogenic process, expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) has raised considerable interest due to the frequency of enzyme occurrence in colorectal neoplasias and the promising results obtained with COX-2 inhibitors in prophylaxis and treatment of the disease. COX-2 plays a fundamental role in the synthesis of eicosanoids as prostaglandins PGE₂ and PGD₂, starting from arachidonic acid. COX-2 is a 71-kD homodimer (a complex formed by two molecules), and was first isolated by Hemler in 1976. COX-2 is expressed in a variety of cell types and purpose-specific tissues, with particular biological functions such as reproduction, immunoresponse, kidney physiology, bone reabsorption and pancreatic secretion. Often detected in various neoplasias, COX-2 is supposed to act by forming prostaglandins and by stimulating prostaglandin action in angiogenesis, cell growth, adhesion and differentiation. This study aimed at evaluating COX-2 prevalence in colorectal neoplasias, and to establish the relationship with pathologic prognostic parameters for colorectal cancer. Sixty-five neoplastic lesions were immunohistochemically evaluated for COX-2 expression according to lesion stages. COX-2 was positively expressed in 27% of the tubular adenomas, in 40% of the villous adenomas, and in 70% of the carcinomas analyzed. A statistically significant difference was observed for COX-2 expression between adenomas and carcinomas $p=0.002$, but no such significance was seen among the other variables investigated. COX-2 expression was therefore understood to vary progressively with the neoplasia stage, yet with no established influence on pathologic parameters for poor prognosis.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
1 HIPÓTESE E OBJETIVO	12
1.1 HIPÓTESE.....	12
1.2 OBJETIVO.....	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1 O CÂNCER COLORRETAL.....	13
2.2 CARCINOGENESE COLORRETAL	16
2.3 CICLOOXIGENASE	17
2.3.1 Expressão da ciclooxigenase em neoplasias humanas	20
2.3.1.1 Estudos de incidência	22
2.3.1.2 Estudos com pacientes com polipose.....	22
2.3.1.3 Estudos com animais ou cultura	23
2.3.2 Relação da COX-2 na carcinogênese colorretal	23
3 PACIENTES E MÉTODOS	26
3.1 DELINEAMENTO	26
3.2 AMOSTRA.....	26
3.3 ELEGIBILIDADE	26
3.4 VARIÁVEIS	27
3.5 PROTOCOLO DA COX-2 PARA IMUNOISTOQUÍMICA.....	27
3.6 ESTÁGIO DE DUKES MODIFICADO POR ASTLER E COLLER	29
3.7 EXPRESSÃO ONCOGÊNICA.....	29
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4 RESULTADOS	31
5 DISCUSSÃO	40
CONCLUSÃO	47
PERSPECTIVAS	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXO A - ARTIGO	56
ANEXO B - ARTIGO TRADUÇÃO	72

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal é diagnosticado em cerca de 130.000 indivíduos anualmente nos Estados Unidos e é responsável por cerca de 56.000 mortes a cada ano. Esta doença representa a terceira neoplasia mais comum naquele país e a segunda maior causa de morte por neoplasia. (1) O americano possui a chance de 1:20 de apresentar uma neoplasia colorretal em sua vida e de 1:10 se possuir um familiar acometido. (2) No resto do mundo os tumores colorretais constituem a terceira maior causa de mortalidade por câncer, e dados estatísticos evidenciam um progressivo aumento em sua incidência. As estimativas do Instituto Nacional do Câncer para o ano de 2006, no Brasil, apontam um número de casos novos entre homens e mulheres, respectivamente de 11.390 e 13.970; isto corresponde a taxas brutas de incidência de 12/100.000 para homens e de 15/100.000 para mulheres. Para o Rio Grande do Sul a previsão para o ano de 2006 é o surgimento de 1.490 casos novos para homens e 1.570 casos novos para mulheres; isto representando uma taxa bruta de incidência de 27/100.000 para homens e de 28/100.000 para mulheres. (3)

Diante destes dados, conclui-se que o câncer colorretal é doença freqüente em nosso meio e resulta em óbito em mais de 50% dos casos. Observa-se também que esta mortalidade teve pouca variação nas últimas décadas. Tal fato deve-se principalmente ao pequeno impacto produzido pelos avanços da técnica operatória e dos tratamentos adjuvantes nos estágios mais avançados da neoplasia. Casos precoces de câncer colorretal, com taxa de sobrevida acima de 80%, ainda são muito raros entre nós.

Por tais razões, necessita-se de um diagnóstico precoce da doença para se poder realizar intervenções eficazes, melhorando o prognóstico e diminuindo a mortalidade. Avaliando-se os métodos de diagnóstico precoce para o rastreamento de populações, observam-se deficiências na sua utilização tanto isoladamente como em associação. Embora exista uma parcela da população que se beneficie com esse rastreamento, persistem muitas dúvidas e constatam-se inúmeras deficiências no que diz respeito aos diferentes métodos empregados. Dentre as falhas podem-se ressaltar a baixa sensibilidade dos métodos de pesquisa de sangue oculto nas fezes, a pouca adesão da população à retossigmoidoscopia e o alto custo da

colonoscopia. Somando-se a esses motivos, não se conseguiu demonstrar um benefício real com o uso dos métodos de rastreamento nos moldes até agora empregados. Com o reconhecimento de genes associados à susceptibilidade ao câncer colorretal, vislumbra-se uma nova possibilidade de rastreamento em populações consideradas de risco.

A grande maioria dos tumores colorretais tem seu aparecimento esporádico e envolve uma série de alterações genéticas desencadeadas por uma variedade de fatores ambientais. Os resultados de estudos prévios sugerem que 80% dos tumores colorretais são promovidos por fatores exógenos encontrados em nossa dieta e, portanto, preveníveis. (4) Paralelamente aos testes de rastreamento, devem-se adotar medidas que diminuam o surgimento da doença. Assim sendo, mudanças nutricionais, dietéticas e mesmo intervenção farmacológica possuem um grande apelo na prevenção da neoplasia colorretal.

A quimioprevenção consiste no uso de um agente farmacológico ou natural para prevenir, interromper ou reverter o processo da carcinogênese. Dentre as substâncias mais utilizadas para a quimioprevenção encontram-se os antiinflamatórios não esteróides (AINEs), os antioxidantes, como o cálcio e o selênio, e as proteínas, como a vitamina C e a vitamina D, porém com resultados nem sempre positivos na redução do surgimento de neoplasias na população. (5) O baixo custo desses compostos e a ausência de efeitos colaterais significativos e a ocorrência de efeitos benéficos em outras doenças os tornam um método atrativo e possível de ser empregado na prevenção das neoplasias colorretais.

Resultados de estudos epidemiológicos inferem que os AINEs podem ser usados para a quimioprevenção. Vários autores mostram associação entre o uso prolongado do ácido acetilsalicílico ou outros AINEs e a redução do risco de câncer colorretal em até 50% (6, 7), embora nem todos os trabalhos realizados apontem nesse sentido. (8)

Em outras linhas de pesquisa, estudos com portadores de doenças reumatológicas submetidos a terapias com AINEs por longos períodos apresentam índice de câncer colorretal inferior ao da população geral (9). Com o uso de Sulindac, um AINEs administrado para pacientes com de polipose adenomatosa familiar, obteve-se a regressão do tamanho e do número de pólipos nesses pacientes (10). Trabalhos realizados em animais comprovam que AINEs

administrados em diferentes estágios da carcinogênese induzida por drogas levam à prevenção ou inibição do câncer colorretal. (11) Em culturas de células, os AINEs também foram capazes de inibir o crescimento de linhagens celulares de câncer colorretal, principalmente quando as mesmas apresentavam a expressão da proteína ciclooxigenase-2 (COX-2). (12)

O efeito antineoplásico dos AINEs pode estar na inibição da COX-2, provavelmente responsável por restaurar a atividade apoptótica das células neoplásicas e reduzir a mitogênese tumoral e a angiogênese. A COX-2 é altamente induzível por estímulos pró-inflamatórios, e as prostaglandinas produzidas por ela possuem papel central na cascata da inflamação (13).

A COX-2 é altamente expressa em uma grande variedade de neoplasias humanas, como as de mama, ovário, estômago, esôfago e cólon. Nas neoplasias colorretais, a COX-2 pode ser detectada em lesões adenomatosas e, com maior frequência, em carcinomas. (14) Alguns autores, avaliando adenocarcinomas colorretais nos diferentes estágios, verificaram uma piora significativa no prognóstico dos pacientes com expressão elevada de COX-2 quando comparados a indivíduos no mesmo estágio e com baixa expressão dessa proteína. (15)

Os avanços da biologia molecular permitiram demonstrar a carcinogênese como uma série de alterações progressivas e particulares em cada neoplasia. Embora algumas alterações já estejam bem estabelecidas, outras ainda necessitam ser melhor avaliadas e ter sua importância melhor determinada. Entre os muitos componentes desse ciclo tem-se destacado como objeto de interesse a COX-2 por seu aparecimento freqüente nas neoplasias colorretais bem como pelos resultados promissores dos estudos com seus inibidores na profilaxia e tratamento das neoplasias colorretais.

1 HIPÓTESE E OBJETIVO

1.1 HIPÓTESE

H0: A proteína COX-2 não está expressa nas neoplasias colorretais.

H1: A proteína COX-2 está expressa nas neoplasias colorretais.

1.2 OBJETIVO

É objetivo da presente pesquisa determinar a prevalência e a variabilidade da expressão da COX-2 nas lesões neoplásicas colorretais, ressecadas endoscópica ou cirurgicamente.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 O CÂNCER COLORRETAL

O tipo histológico mais freqüente dos tumores colorretais é o adenocarcinoma. Este tumor predomina em indivíduos idosos, com pico de incidência na sétima década de vida. Embora mais de 90% dos casos de câncer colorretal sejam esporádicos, a história familiar passa a ser importante uma vez que existem síndromes familiares de câncer colorretal, como a polipose adenomatosa familiar e a síndrome do câncer colorretal não-polipóide, que aumentam o risco de desenvolver câncer. (16)

O reto é o local mais acometido, mas a distribuição colônica tem sido objeto de pesquisa e mudanças de conceitos. Devido a melhor avaliação colônica com métodos de detecção mais precoce, vem se observando mudança na distribuição das neoplasias no sentido do reto e cólon esquerdo para o cólon direito. (17)

Não existem agentes carcinogênicos claramente definidos para o câncer colorretal, embora uma série de agentes encontrados nas fezes ou transformados pelas bactérias do tubo digestivo possam ser responsáveis pelo estímulo inicial da carcinogênese. Estudos populacionais indicam tendência de dieta rica em gorduras apresentar um potencial carcinogênico, porém ainda se desconhece o mecanismo pelo qual isto ocorre. Algumas teorias, como o efeito direto dos triglicerídios ou a liberação de maior quantidade de ácidos biliares sobre o epitélio, são as mais discutidas. A dieta rica em fibras teria um efeito protetor pela modificação do pH e volume fecal podendo diminuir os efeitos de agentes carcinogênicos sobre a mucosa colônica. (17)

O epitélio intestinal possui uma organização estrutural em forma de criptas, que têm na membrana basal células intestinais primitivas que se diferenciam à medida que se deslocam para a superfície das criptas. Nesse deslocamento gradual, a célula primitiva passa a assumir funções de epitélio intestinal propriamente dito, sendo capazes de produzir muco e de absorver e secretar substâncias. Ao mesmo tempo em que a célula madura passa à superfície, também começa a entrar em contato com os elementos do meio intestinal, sujeitando-se aos eventuais efeitos físicos e químicos dos mesmos. Desta forma, agressões de origem inflamatória,

infecciosa e traumática podem afetar o metabolismo da célula intestinal causando danos estruturais ou até mesmo alterações no DNA. As alterações causadas no DNA, por sua vez podem ser transmitidas na mitose às células filhas sucessivamente por inúmeras gerações. Para reduzir tais riscos, as células, após alguns dias, sofrem um processo de morte celular programada, denominado de apoptose, e são eliminadas para luz intestinal, sendo substituídas por novas células oriundas da porção inferior da cripta. Assim, o ciclo normal de proliferação do epitélio intestinal se completa.

Para que o ciclo celular ocorra de maneira correta, é necessário um conjunto de ações pré-estabelecidas, produzidas por uma série de proteínas responsáveis pela diferenciação celular e preservação da estrutura do DNA. O conhecimento dessas proteínas e suas respectivas funções formam a base para o entendimento da biologia molecular das neoplasias colorretais. (18)

A proteína do gene da polipose adenomatosa do cólon (APC) foi inicialmente encontrada em indivíduos portadores de polipose adenomatosa familiar. Localiza-se no cromossomo 5 e é encontrada em todas as células de indivíduos que adquirem a doença de forma hereditária, porém suas mutações estão presentes mesmo em indivíduos que adquiriram de forma esporádica o câncer colorretal. (19)

O gene *APC* apresenta-se mutado tanto em adenomas como em formas mais avançadas do câncer colorretal, e a incidência dessas mutações aumenta quanto mais avançada for a lesão. Em adenomas tubulares, o aparecimento de mutações situa-se em torno de 30%; esse número aumenta em adenomas vilosos, chegando aos 80% nos casos de câncer colorretais. Acredita-se que a mutação do gene *APC* seja um dos eventos mais precoces na carcinogênese colorretal. Todavia, não se tem ainda claramente estabelecido que funções a proteína APC exerce no equilíbrio celular. Alguns dados mostram que o aumento de sua quantidade produz uma regulação na proliferação celular pelo bloqueio do ciclo celular na fase G1-S.

A proteína ras possui a função de desencadear o processo de crescimento e diferenciação celular, sendo responsável pelo recebimento de estímulos extracelulares como fatores de crescimento, hormônios, neurotransmissores e citocinas, bem como pela transdução desse estímulo pelo citoplasma até o núcleo. A mutação no gene *ras* pode levar ao contínuo estímulo do núcleo, ocasionando a permanente proliferação celular. O gene *ras* é um proto-oncogene e está localizado

no cromossomo 12. Considera-se que o *gene ras* mutante encontra-se em cerca de 40% a 60% dos carcinomas colorretais ou adenomas com mais de 10 mm. Essa mutação representa um passo inicial importante no desenvolvimento da neoplasia colorretal, após hipometilação e mutação do gene APC.

Embora a proteína DCC (*deleted in colorectal cancer*) possa ser encontrada em vários tecidos do organismo, apresenta-se em cerca de 70% dos tumores colorretais malignos. O *gene DCC*, considerado supressor de tumor, está localizado no cromossomo 18 e possui importante função relacionada à adesão celular. Acredita-se que a proteína transmembrana do DCC quando inativada compromete seriamente a adesão celular, o que proporciona aumento no potencial metastático do tumor e, conseqüentemente, piora o prognóstico.

A proteína p53, identificada em 1978, é composta por uma molécula contendo 393 aminoácidos. Formada a partir da codificação contida no *gene p53* situado no braço curto do cromossomo 17 (17p), é encontrada em cerca de 50% de todos os tumores malignos humanos, como os tumores de bexiga, cérebro, mama, cérvix uterina, cólon e reto, entre outros. Nas neoplasias colorretais encontram-se mutações da proteína p53 em cerca de 70% dos casos, estando associadas a tumores avançados.

Segundo o modelo carcinogênico atual, a proteína p53 desempenha a função de detectar eventuais falhas existentes no DNA da célula que está preste a se dividir e de impedir que tais mutações sejam transmitidas à linhagem subsequente.

Essa proteína realiza avaliação do DNA na fase G1-S do ciclo e, caso detecte algum dano, promove a parada antes da duplicação do DNA. Nesse estágio, dois caminhos poderão ser seguidos: o reparo da lesão ou a indução da apoptose, sendo assim reconhecida como guardiã do genoma humano, pois falha de sua expressão pode acarretar o aparecimento de inúmeras anormalidades genéticas.

As proteínas de reparo (*mismatch repair*) constituem um grupo de proteínas que tem por função o reparo do DNA. Elas possuem a capacidade de remover um segmento de DNA com seqüência de bases alteradas e de inserir um novo segmento de seqüência correta, feito a partir de cópia de seqüência existente no molde da fita complementar do DNA.

Até o momento, cinco genes foram descritos como sendo capazes de sintetizar proteínas com função de reparo do DNA: *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2* e *hMSH6*. Essas proteínas desempenham papel essencial na compreensão das alterações genéticas relacionadas à carcinogênese, uma vez que a perda de função levará ao acúmulo de instabilidades genéticas que favorecem o aparecimento do câncer.

2.2 CARCINOGENESE COLORRETAL

A carcinogênese colorretal é o resultado de uma complexa interação de variáveis que incluem elementos externos, como agentes ambientais e dietéticos, bem como elementos internos, de natureza somática ou hereditária. A complexidade de tais eventos, embora não conhecida em sua totalidade, vem aos poucos sendo compreendida com os avanços obtidos pela biologia molecular. (20)

O câncer colorretal destaca-se pelo grande conhecimento que obteve no seu processo de carcinogênese. Isto se deve ao fato de ocorrerem no cólon freqüentes lesões polipóides benignas que permitem uma clara relação entre os adenomas e o câncer colorretal. Essa relação foi enfatizada por Morson (21), que evidenciou a presença de lesões invasivas incipientes em pólipos e a grande freqüência de pólipos em pacientes com câncer colorretal. Outra evidência dessa relação é demonstrada em pacientes com polipose adenomatosa familiar, que representam um modelo *in vivo* de carcinogênese.

Volgenstein (19) propôs um modelo genético capaz de explicar os eventos que levam a progressão da lesão adenomatosa até o carcinoma. Com o estudo de proteínas encontradas em adenomas de diversos tamanhos, foi visto que as lesões aumentavam de tamanho à medida que o número de proteínas mutadas aumentava, estabelecendo-se assim relação entre o tamanho da lesão, os achados histopatológicos e as alterações genéticas.

O primeiro estágio na seqüência adenoma-carcinoma parece ser a mutação da proteína APC, que exerce função reguladora da proliferação epitelial. Após sofrer mutação, leva à perda desse controle, acarretando desequilíbrio celular e um estado hiperproliferativo, ocasionando a formação de pequenos adenomas.

Aparentemente uma das primeiras conseqüências da mutação da proteína APC é a hipometilação do DNA, representada pela perda do radical metila na cadeia do DNA anteriormente a um determinado gene, com o intuito de impedir a leitura e cópia do mesmo. Quando copiado deliberadamente, estabelece um estado hiperproliferativo, contribuindo para o desenvolvimento do adenoma inicial.

O segundo estágio nessa seqüência é a mutação da proteína ras. E existindo um estado hiperploriferativo, a ativação da proteína ras funcionará como um oncogene, causando aumento ainda maior da hiperploriferação e a transformação do adenoma inicial em adenoma intermediário. Tais alterações acarretam também maior hipometilação do DNA.

No terceiro estágio ocorre a mutação do *gene DCC* e, com sua alteração, o adenoma perde a capacidade de aglutinação. Essa mutação está presente em 50% dos adenomas tardios, e em cerca de 70% dos carcinomas colorretais, demonstrando ser uma alteração tardia na seqüência adenoma-carcinoma.

O quarto estágio é caracterizado pelo surgimento da proteína p53, que é pouco encontrada em adenomas porém está presente em cerca de 75% dos carcinomas colorretais. Como essa proteína possui função de proteção no surgimento de novas mutações, a perda de função pode levar ao acúmulo de mutações cromossômicas, característica básica nos carcinomas invasivos.

O modelo descrito por Volgestein (19) é adequado para explicar os casos de transformação maligna dos adenomas, todavia aquelas alterações são raramente encontradas em pacientes acometidos pelo câncer colo-retal hereditário não polipóide (HNPCC). Indivíduos que possuem HNPCC caracteristicamente apresentam perda da função de reparo do DNA que se expressa por defeitos nos *genes hMSH2, hMLH1, hPMS1, hMPS2 e hMSH6*, desencadeando um processo de carcinogênese distinto da seqüência adenoma-carcinoma, sendo responsável por cerca de 15% das neoplasias colorretais esporádicas e que cursa sem o desenvolvimento de pólipos adenomatosos precursores (22).

2.3 CICLOOXIGENASE

A ciclooxigenase é uma enzima fundamental na síntese de eicosanóides como as prostaglandinas PGE2 e PGD2 a partir do ácido araquidônico. Foi isolada

pela primeira vez por Hemler em 1976. (23) Trata-se de um homodímero (complexo formado por duas moléculas) que possui um peso molecular de 71 Kd. Em termos bioquímicos, é um ácido graxo desidrogenase e possui um átomo de ferro formando parte de um grupo heme, co-fator indispensável para o funcionamento da enzima.

O termo eicosanóide é aplicado a um grupo de substâncias de caráter lipídico, que se caracterizam por possuir uma cadeia de 20 átomos de carbono e dispor de várias ligações duplas e insaturações. Possuem origem comum, um ácido graxo poliinsaturado, o qual é liberado a partir dos fosfolipídios que compõem a membrana celular, mediante a ação da fosfolipase A2, a enzima inibida pelos antiinflamatórios hormonais. O mais importante desses ácidos graxos é o ácido araquidônico.

O ácido araquidônico, por sua vez, pode ser transformado em várias vias metabólicas em substâncias diversas, cada uma com propriedades biológicas variadas (Figura 1). A via da ciclooxygenase leva à formação dos prostanóides, um grupo de substâncias muito diversas e que possui, muitas vezes, ações antagônicas, sendo as mais conhecidas delas as prostaglandinas (Figura 2). O termo prostaglandina deriva de próstata, o primeiro tecido do qual se extraíram essas substâncias, porém sabe-se que são encontradas em vários tecidos de ambos os sexos.

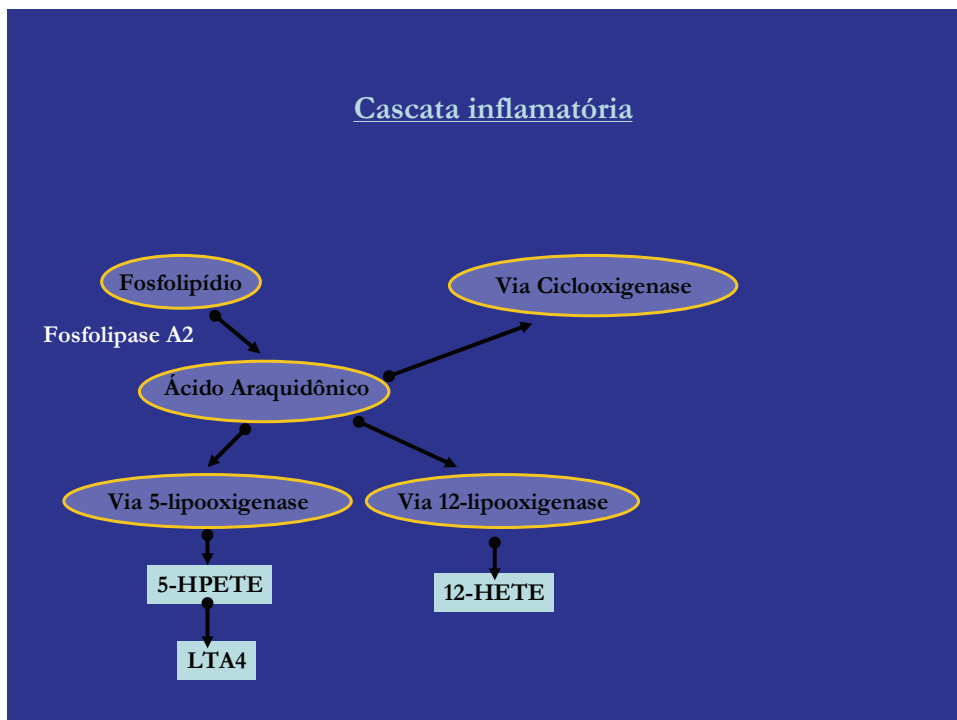


Figura 1: Via metabólica dos Eicosanóides

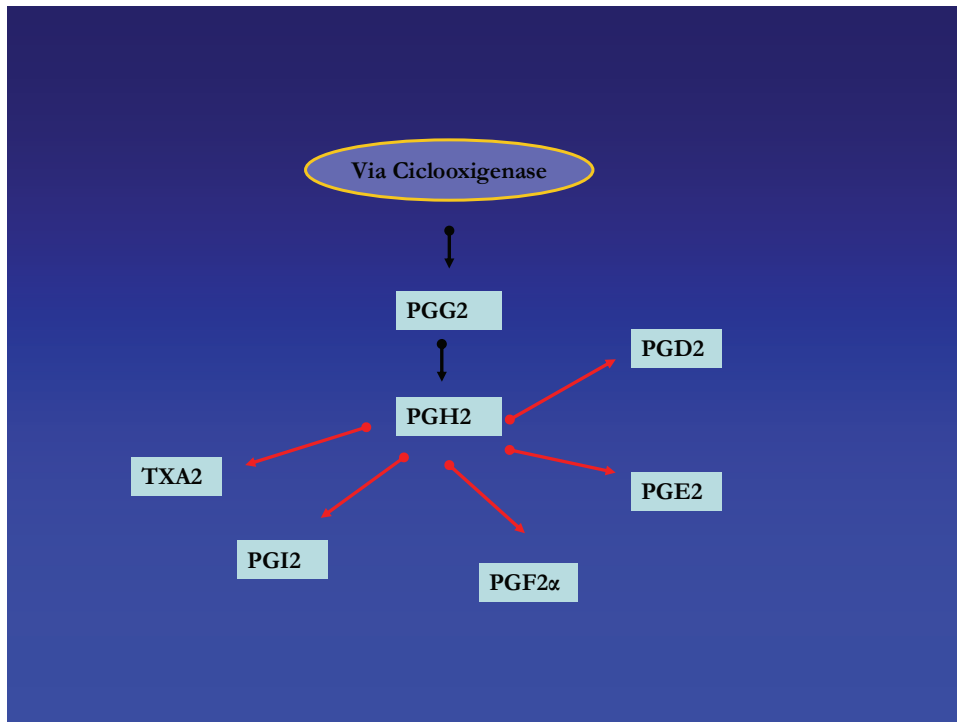


Figura 2: Via metabólica da Ciclooxygenase

A via ciclooxygenase leva à formação das prostaglandinas PGG2 e, em seqüência, da PGH2 e, a partir desta, de seus derivados biologicamente ativos, as prostaglandinas PGD2, PGE2, PGF2 α , PGI2 (prostaciclina) ou TxA2 (tromboxane A2). Existem duas isoformas de ciclooxygenases, cada uma delas codificada por diferentes genes. A seqüência de aminoácidos dessas duas proteínas possui uma homologia de 60%. Ambas têm sítios de atividades comuns e são inibidas por AINEs (24,25,26).

A ciclooxygenase 1 (COX-1), enzima encontrada de forma permanente no retículo endoplasmático da maioria das células e tecidos do organismo, é denominada de constitucional e possui funções fisiológicas importantes, como a produção da prostaciclina que, quando liberada, protege a mucosa gástrica. Em outros locais, como o rim, exerce a função de controle da circulação e do equilíbrio renal de sódio e água, além de contribuir para o controle da agregação plaquetária. (24)

A expressão da COX-2 pode ocorrer em uma variedade de tipos celulares e tecidos especializados onde desempenha funções biológicas específicas, tais como

reprodução, imunidade, fisiologia renal, reabsorção óssea e secreção pancreática. Os fatores que regulam essas funções são específicos para cada processo e tecido envolvido. Na mácula densa renal, por exemplo, sua expressão depende da concentração de sódio no lúmen tubular. Assim, a atividade da COX-2 nos diferentes tipos celulares parece ser sensível a distintos estímulos que regulam cada atividade fisiológica específica. (26)

Embora não seja encontrada em condições basais em muitos tecidos, ela é induzida de forma seletiva por mediadores da resposta inflamatória, como interleucina-1, fator de necrose tumoral α , lipopolissacarídeos, bem como por fatores de crescimento, fatores promotores de tumores e outros estímulos fisiológicos. Além disso glicocorticóides e citocinas antiinflamatórias inibem a expressão da COX-2. Inibição seletiva desta enzima tem demonstrado que ela possui papel importante na resposta inflamatória, na dor e na febre. A regulação feita por fatores de crescimento sobre a COX-2 bem como sua relação com os genes c-fos e c-myc implicam um papel dessa enzima sobre a mitogênese (26). A contribuição da COX-2 para o desenvolvimento de tumores como o câncer do cólon demonstra a existência de uma ligação dessa enzima com o controle do crescimento celular. (26)

2.3.1 Expressão da ciclooxigenase em neoplasias humanas

Uma significativa expressão da COX-2 em diferentes neoplasias sugere ser essa proteína um passo importante na carcinogênese. (27) Diversos autores demonstraram expressão da COX-2 com uma variedade de tumores, como os de cabeça e pescoço, esôfago (28), pulmão (29), mama (30), próstata (31), bexiga (32), pele (33), entre outros. O aumento da expressão da COX-2 está relacionado ao grau de diferenciação dos tumores, em cânceres bem diferenciados de pulmão (29) e no carcinoma hepatocelular, encontra-se aumento de expressão da COX-2 quando comparados com formas menos diferenciadas desses mesmos tumores. Por outro lado, a expressão da COX-2 pode variar em diferentes tipos de neoplasias em um mesmo órgão. No cólon, a variação pode ir de duas até 50 vezes na maioria dos tumores avançados. (13) Alguns autores verificaram aumento da expressão da COX-2 relacionada com a profundidade de invasão no cólon. (13) Dimberg mostrou

relação do grau de expressão de COX-2 da lesão com a localização do mesmo no intestino grosso, com o cólon direito apresentando maior expressão que o reto. (34)

Todavia, não apenas as lesões malignas apresentam expressão da COX-2, lesões adenomatosas também a expressam em menor grau, bem como fibroblastos, células endotélias, células endócrinas. (35, 36, 37, 38, 39)

Nem todos os estudos imunoistoquímicos relacionam uma hiperexpressão da COX-2 com aumento da proliferação celular ou com o grau de malignidade. Essa dúvida é sugerida no trabalho de Sakuma, onde a distribuição da COX-2 não mostrou correlação com a expressão do marcador de proliferação celular, o Ki-67, ou com a proteína p-53. (40) Com outra metodologia através de biópsia foi dosado o nível de prostaglandinas em pacientes com polipose adenomatosa familiar tratados com sulindac, Tendo havido oscilação muito grande nos níveis de prostaglandinas que variaram de um aumento de 19% até redução de 89%. Esses resultados não demonstraram relação da atividade da COX-2 com a carcinogênese. (13)

Uma alta porcentagem de lesões pré-invasivas no cólon expressa a matrilisina, uma importante metaloproteinase envolvida no processo de aparecimento de metástases. O trabalho de Shattuck-brandt para determinar a coexpressão de COX-2 e metaloproteinase revelou que 80% dos espécimes estudados possuíam ambas as proteínas no epitélio neoplásico. Verificou-se que a COX-2 aparecia mais fortemente em regiões bem diferenciadas do tumor enquanto a metaloproteína corava de maneira mais intensa em áreas displásicas e mais invasivas. Os resultados mostraram que a COX-2 e a metaloproteinase não estão fortemente ligadas no processo carcinogênico. (41)

O fator transformador de crescimento beta (TGF- β) está precocemente expresso em estágios iniciais do câncer colorretal. Em estudo similar ao anterior, notou-se distribuição semelhante do TGF- β e da COX-2 em adenocarcinomas de cólon, sugerindo interação de ambos no processo da carcinogênese (42). Em outro estudo, os níveis de TGF- β encontrados em adenomas sem displasias foram menores que em adenomas tubulares com displasia e carcinomas. (13)

Estudos em vários níveis demonstram a relação da COX-2 com as neoplasias colorretais bem como sua inibição por AINEs diminuindo a incidência dessas neoplasias. (43)

2.3.1.1 Estudos de incidência

Nos últimos anos, vários trabalhos têm demonstrado que substâncias antiinflamatórias possuem efeito protetor contra as neoplasias colorretais. Diversos estudos observacionais, com diferentes metodologias apontam que o uso de AINE reduz o aparecimento de câncer colorretal. Estudos populacionais, como o de Giovannucci, mostraram risco relativo de 0,51 no aparecimento de câncer colorretal para homens que usavam regularmente aspirina, bem como menor número de adenomas nesses indivíduos. (6) Em trabalhos realizados em pacientes portadores de doenças reumáticas crônicas em que o uso de AINE era rotineiro, encontrou-se também diminuição no aparecimento de câncer colorretal. (9) No estudo populacional randomizado de 104 217 indivíduos, realizado por Smalley et al. foi encontrado risco relativo de 0,49 no grupo que usou AINE por no mínimo 48 meses. (7) Porém nem todos os trabalhos tendem a mostrar resultados favoráveis em relação aos AINE. Em artigo apresentado por Stumer, realizado prospectivamente e randomizado com 22 071 médicos, não se observou diminuição de risco de câncer colorretal após 5 anos. (8)

2.3.1.2 Estudos com pacientes com polipose

Os pacientes portadores de polipose adenomatosa familiar possuem mutação do gene APC que aumenta a expressão da COX-2. Em muitos estudos com esses pacientes portadores usou-se como AINE padrão o sulindac, tendo se verificado diminuição do número e tamanho dos pólipos. Winde, em estudo realizado em pacientes com polipose submetidos previamente a colectomia total com íleo-reto anastomose, mostrou reversão completa dos pólipos retais num período de 24 semanas com o uso de sulindac por via retal (44). Pasricha, infere a possibilidade de essa redução dos pólipos ser devido a um efeito apoptótico dos AINEs. (45)

Em avaliação de pacientes com focos crípticos aberrantes, lesão precursora de adenomas no cólon, vistos por magnificação endoscópica de imagens, Takayama mostrou que inibidores da COX-2 reduzem significativamente o número desses focos após 8 a 12 meses de uso. (46)

2.3.1.3 Estudos com animais ou cultura

Diversos são os métodos aplicados em estudos com animais. Os mais comuns são a indução de neoplasia com drogas como azoximetano (47) e dimetilbezoantraceno (30), o uso de ratos atímicos e a realização de enxerto (48) e o uso de animais modificados geneticamente (49, 50), sendo a deleção do gene APC a mais comum. Achados constantes nesses estudos são a elevada frequência de tumores COX-2 positivos e a inibição do surgimento e crescimento desses tumores quando os animais são tratados com inibidores da COX-2 ou pela deleção de genes.

Em estudos com linhagens celulares são usadas as linhagens mais diversas e as mais variadas substâncias no meio de cultura a fim de avaliar a capacidade de inibição do crescimento. (51, 52, 53) Em geral, investigam-se também a presença da COX-2, produção de prostaglandinas, apoptose e fatores inibidores de crescimento. A busca por agentes que possam ser utilizados na quimioprevenção das neoplasias colorretais usa constantemente este método de pesquisa. Goldman utilizou linhagens celulares como a HCA-7, que possui a expressão da COX-2, e a HCT-16, que não expressa a COX-2 para testar inibição do crescimento dessas células em concentrações diferentes de meloxicam. (2) Essas pesquisas têm verificado que a inibição da COX-2 leva à diminuição do crescimento celular.

2.3.2 Relação da COX-2 na carcinogênese colorretal

Prostaglandinas são importantes mediadores intercelulares, que podem afetar a diferenciação e a proliferação celular. Um importante passo na biossíntese das prostaglandinas é sua conversão pela ciclooxigenase a partir do ácido araquidônico. Recentes estudos (15, 37, 54) mostram expressão elevada da COX-2 em pacientes com neoplasias de colo e reto, bem como aumento da expressão relacionado com tumores mais agressivos. Estudos epidemiológicos indicam menor risco relativo de câncer colorretal em indivíduos que usam regularmente ácido acetilsalisílico. (6) Investigações laboratoriais com o uso de inibidores da COX-2 têm

demonstrado a supressão de pólipos e a inibição de fatores angiogênicos por células do câncer colorretal. (55)

Enquanto a associação do câncer colorretal com a COX-2 está bem definida, os estímulos e os mecanismos que induzem a expressão do gene permanecem indefinidos quanto aos fatores ambientais, as condições que poderiam induzir a expressão da COX-2 no epitélio colônico ou como essa resposta seria regulada. Arbabi demonstrou que a COX-2 pode ser estimulada por estresse osmótico, mas não por lipopolissacarídeos. Com esses resultados o autor infere que condições ambientais que provoquem hiperosmolaridade no lúmen intestinal poderiam desencadear uma expressão aumentada de COX-2 e, a partir dela, o câncer colorretal(56). Porém outras formas de indução da COX-2 parecem mais plausíveis. Prescott sugeriu um gene supressor, o *APC*, como responsável pelo estímulo inicial. (57) A maneira pela qual esse gene estimula a COX-2 pode ser por aumento da transcrição ou por regulação da tradução. (57)

Tanto o mecanismo pelo qual a expressão da COX-2 é iniciada como sua atuação na formação ou progressão de tumores persistem desconhecidos, porém, de forma geral, sua função pode não só ser responsável pela remoção ou inativação de um agente de proteção como a promoção de um agente oncogênico.

Pela produção de prostaglandinas, a COX-2 pode ativar diversos processos para a progressão da neoplasia. Chan mostrou que níveis elevados de ácido araquidônico são capazes de provocar a apoptose, e dessa forma níveis elevados de COX-2 podem diminuir as reservas intracelulares de ácido araquidônico e preservar a viabilidade da célula. Assim, uma possível ação dos AINEs seria a de manter níveis intracelulares de ácido araquidônico e estimular a apoptose. (58) Cao et al. também trazem esta discussão e referem ainda que a concentração diminuída do ácido araquidônico acarreta menor concentração celular de ceramida, um mensageiro lipídico que está envolvido no evento da apoptose (59). Outra forma seria a inibição da morte celular programada a partir da PGE2 pela indução da expressão do protooncogene *bcl-2*. (59) A PGE2 e outras prostaglandinas freqüentemente elevam a concentração intracelular de AMP cíclico, o que pode suprimir a apoptose. (59)

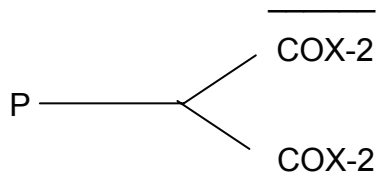
Outras formas de ação possivelmente devem-se à formação de prostaglandinas e ao estímulo das mesmas em mecanismos de angiogênese,

crescimento celular, adesão e diferenciação. (55, 60) A angiogênese pode ser induzida pela COX-2 através de: a) estímulo à expressão de fatores pro-angiogênicos, como o fator de crescimento VEGF; b) produção de produtos eicosanóides, como o tromboxane A₂, PGE₂ e PGI₂, que diretamente estimulam a migração endotelial e a angiogênese induzida por fatores de crescimento; c) inibição da apoptose endotelial por estímulo do gene *bcl-2* ou ativação do gene *Akt*. (61)

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO

Este trabalho consiste em um estudo de prevalência onde os fatores em estudo são as características patológicas do tumor primário e o desfecho é a expressão imunoistoquímica da proteína COX-2.



P = População: pacientes com neoplasia de cólon e reto submetidos a tratamento cirúrgico ou pólipos ressecados via endoscópica e oriundos de Farroupilha, RS.

COX-2 = expressão imunoistoquímica da proteína COX-2.

3.2 AMOSTRA

Foram avaliados 35 pacientes com diagnóstico histológico de adenocarcinoma de cólon ou reto e 30 pacientes com pólipos adenomatosos de cólon e reto, tratados cirúrgica ou endoscopicamente. As lâminas para reação imunoistoquímica da proteína COX-2 foram preparadas a partir de blocos de parafina das peças cirúrgicas ou ressecções endoscópicas estocadas pelo serviço de anatomia patológica do Laboratório Diagnose de Caxias do Sul.

3.3 ELEGIBILIDADE

Foram incluídos os pacientes com adenocarcinoma ou adenoma de cólon e reto da clínica privada do autor e foram excluídos da amostra:

- a) neoplasias outras que não fossem diagnosticadas como adenomas ou adenocarcinoma;
- b) outras neoplasias concomitantes ou tumores prévios;
- c) neoplasia maligna sincrônica ou metacrônica do intestino grosso;
- d) doença inflamatória intestinal;
- e) polipose de qualquer tipo;
- f) casos com história familiar de neoplasia de cólon ou reto;
- g) pacientes tratados com terapia neoadjuvante;
- h) paciente com uso crônico de AINE.

3.4 VARIÁVEIS

Para a caracterização da amostra estudada, foram anotadas as seguintes variáveis: idade, sexo, localização do tumor e estadiamento.

As variáveis: idade, sexo, localização, grau histológico, produção de muco, caráter infiltrativo da lesão, aspecto do estroma, padrão microacinar, presença de metástases linfáticas ou à distância, estágio e expressão imunohistoquímica da proteína COX-2 foram coletadas em duas fases:

- a) revisão de prontuários médicos;
- b) avaliação das lâminas existentes e escolha dos blocos mais representativos de cada lesão e avaliação histopatológica.

3.5 PROTOCOLO DA COX-2 PARA IMUNOISTOQUÍMICA

Cortes de 4mm dos blocos de parafina estocados das peças cirúrgicas foram submetidos à avaliação imunohistoquímica utilizando-se anticorpo monoclonal anti-COX2 (*IBL, Gumma, Japan*) que reconhece a proteína COX-2. Para determinação da positividade destes anticorpos nos tecidos, foi utilizado o método

imunoistoquímico ABC (*avidin-biotin-peroxidase complex; kit LSAB DAKO*), conforme segue.

Para fixação das lâminas foi utilizado o organo selano. Para desparafinização, as lâminas foram colocadas em estufa a 37°C por 24 h e a 56°C por 3 a 12 h. A seguir, foram banhadas seqüencialmente em xilol por 10, 5 e 5 min respectivamente. Para reidratação as lâminas foram colocadas em etanol 100%, 95%, 70% e água corrente e água destilada por 5 min cada. A seguir as lâminas foram lavadas em solução salina tamponada (SST) por 5 min. A fim de realizar a recuperação antigênica, as lâminas foram colocadas em tampão citrato com pH 6,0 e levadas ao forno de banho-maria por 40 min a 95°C. Após a sessão, as lâminas foram deixadas em temperatura ambiente por 20 min. A seguir, foram lavadas com água corrente, água destilada e em SST por 5 min. Para bloquear a peroxidase endógena as lâminas foram tratadas com peróxido de hidrogênio 5% em metanol por 20 min em câmara escura, com uma repetição. Depois foram lavadas em SST por 5 min por 2 vezes. Os cortes foram circulados com caneta Dako Pen (*DAKO lab. Inc., New York, NY, USA*) e incubados em câmara úmida e escura por 16 h com o anticorpo primário anti-COX-2 (IBL, JAPAN) diluído em 1:50, em BSA (albumina bovina 1%). A seguir, foram lavadas com SST por 2 vezes de 5 min. As lâminas foram então incubadas com o anticorpo secundário do *kit LSAB (DAKO)* em câmara úmida durante 30 min. Estes passos foram intercalados por duas ou três lavagens em SST por 5 min, e logo foram incubadas com a streptavidina do *kit LSAB* em câmara úmida por 30 min. O cromógeno tetraidrocloro de diaminobenzedina (DAB) foi pingado nas lâminas para colorir a reação por 5 min e após esta reação bloqueada pela imersão em água destilada. Em seguida, as lâminas foram contra-coradas por 30 seg em hematoxilina de Harris e lavadas em água corrente. Por fim, foram mergulhadas em água amoniacal (20% de hidróxido de amônia em água destilada) e lavadas em água corrente, álcool e xilol, e posteriormente montadas com lamínulas.

3.6 ESTÁGIO DE DUKES MODIFICADO POR ASTLER E COLLER

As lâminas e os prontuários foram avaliados para confirmação do laudo original do estágio e diagnóstico realizado. As lesões adenomatosas foram divididas em tubulares e vilosas. No grupo dos carcinomas o sistema de estagiamento utilizado foi de Dukes modificado por Astler-Coller e este acrescentado convencionalmente do estágio D para traduzir a presença de metástases à distância. Esta etapa foi realizada pelo autor a partir dos prontuários médicos.

O grau histológico foi avaliado a partir do laudo anatomopatológico dos casos de adenocarcinoma. Foram divididos em bem diferenciados, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado. Já os casos de adenomas, foram divididos em displasia de baixo e alto grau. Esta avaliação foi realizada por patologista com experiência em lesões colorretais.

As características patológicas consideraram a presença de componente mucinoso, estroma fibrótico, padrão microacinar, invasão infiltrativa da margem e foram avaliados como presente ou ausente. Toda a avaliação foi realizada por patologista com experiência em neoplasia colorretal.

3.7 EXPRESSÃO ONCOGÊNICA

Avaliada por imunohistoquímica (método descrito anteriormente); a reação imunohistoquímica para COX-2 apresenta imagem granular no citoplasma de coloração acastanhada produzida pelo DAB, com intensidade diversa. Foram considerados positivos os casos em que houve coloração de 10% das células contadas de maneira manual em campo microscópico de 400 aumentos na área total da lâmina. Como controle positivo foi utilizado um caso de adenocarcinoma de reto do arquivo do serviço de patologia. Os controles negativos foram obtidos a partir de biópsias de mucosa normal presente no arquivo do laboratório de patologia Diagnose. Para fins diagnósticos as lâminas foram avaliadas por patologista com experiência em diagnóstico de imunohistoquímica.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística da amostra estudada foram utilizados, para variáveis quantitativas, média aritmética, desvio padrão, valores máximos e mínimos e mediana e, para as variáveis qualitativas percentuais onde aplicável.

A relação entre a expressão imunoistoquímica da proteína COX-2 e as variáveis sexo, idade, localização, grau de displasia, grau histológico, características patológicas e estágio foi avaliada em tabelas de contingência, calculando-se percentuais e estimando a razão de prevalência e seu intervalo de confiança.

A decisão sobre a significância da associação entre as variáveis qualitativas foi determinada pela aplicação do teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando adequados. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

O processamento e a análise dos dados foram executados com o auxílio do programa SPSS v 12.0.

4 RESULTADOS

Foram analisados 65 casos de neoplasias de cólon e reto acompanhados no período de julho de 1997 a dezembro de 2001, segundo os critérios de elegibilidade referidos anteriormente. A distribuição diagnóstica e classificação dos adenocarcinomas foi a seguinte: adenoma tubular e adenoma viloso 15 casos cada, adenocarcinoma Dukes A (n=6), adenocarcinoma Dukes B (n=10), adenocarcinoma Dukes C (n=10), adenocarcinoma Dukes D (n=9). Vinte e sete (41,5%) pacientes eram do gênero masculino e trinta e oito (58,5%) do gênero feminino, com idade variando entre 23 e 91 anos, mediana de 62 e desvio padrão de 15 anos. Ao separar-se os casos de adenomas e carcinomas a média de idade do grupo dos adenomas é 54 anos e a dos carcinomas é 62,5 anos. As características clínico patológicas são apresentadas na Tabela 1.

O diâmetro dos adenomas variou de 3 até 40 mm, com média (DP) de 7,5 mm (4) para os adenomas tubulares e de 15,7 mm (9) os vilosos.

Nos casos de adenocarcinomas as características patológicas observadas mostraram variação de diâmetro de 18 até 80mm com média (DP) de 47(13,2) mm, e a presença de muco foi observada em 12 casos (34%). O padrão infiltrativo das margens tumorais foi encontrado em 21 casos (60%) e o padrão expansivo em 14 casos (40%). Na avaliação do padrão microacinar nove casos mostraram-se positivos (26%), já a presença de estroma fibrótico foi encontrada em 4 casos (11%). A classificação histológica de adenomas e carcinomas é apresentada na Tabela 2.

Tabela 1 Características clinicopatológicas dos pacientes

Característica	N	%
Faixa etária (anos)		
< 40	10	15
41-59	21	32
60-79	31	48
>79	03	05
Sexo		
feminino	38	58
masculino	27	42
Localização		
reto	24	37
sigmóide	24	37
descendente	04	06
transverso	07	11
ascendente	01	01
ceco	05	08
Displasia		
baixo grau	22	73
Alto grau	08	27
Diferenciação*		
bem	10	28
moderado	17	49
pouco	08	23

*bem, bem diferenciado; moderado, moderadamente diferenciado; pouco, pouco diferenciado.

Tabela 2 Classificação histológica das lesões

Diagnóstico	Frequência	Percentual
Adenomas		
Vilosos	15	23
Tubulares	15	23
Carcinomas		
Dukes A	06	10
Dukes B	10	15
Dukes C	10	15
Dukes D	09	14
Padrão mucinoso		
presente	12	34
ausente	23	66
Padrão Microacinar		
presente	09	26
ausente	26	74
Padrão de Crescimento		
infiltrativo	21	60
expansivo	14	40
Padrão do Estroma		
fibrótico	04	11
não fibrótico	31	89

Dos 65 casos avaliados a proteína COX-2 foi encontrada em 35 (54%) casos. Dez (33%) em adenomas e 25 (71%) dos carcinomas (Tabela 3). Houve expressão progressiva e significativamente maior $p=0,002$ nos carcinomas do que nos adenomas (Figura 3). Não houve diferença estatística entre lesões COX-2 positivas localizadas no reto 15 (43%) e lesões localizadas no cólon 20 (57%). As Figuras de 4 a 11 ilustram os casos avaliados.

Tabela 3 Expressão detalhada da COX-2 à imunohistoquímica

Expressão da COX-2	Positiva N (%)	Negativa N (%)
Adenomas		
Tubulares	4(27)	11(73)
Vilosos	6(40)	9(60)
Carcinomas		
Dukes A	4(66)	2(44)
Dukes B	8(80)	2(20)
Dukes C	6(60)	4(40)
Dukes D	7(78)	2(22)

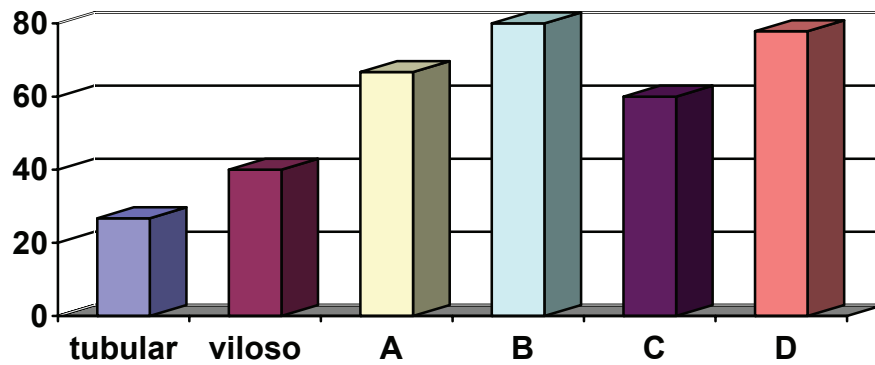


Figura 3: Representação gráfica da expressão da COX-2 nas neoplasias avaliadas

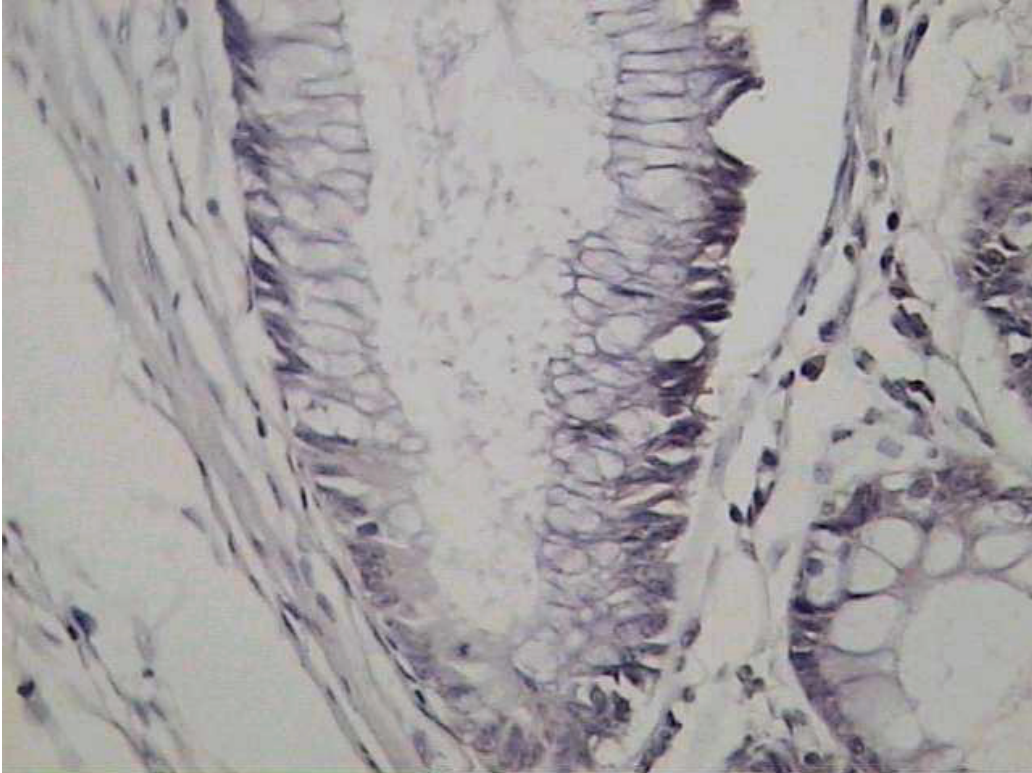


Figura 4: Fotomicrografía de caso representativo de mucosa normal, COX-2 negativa. (IHC-400x)

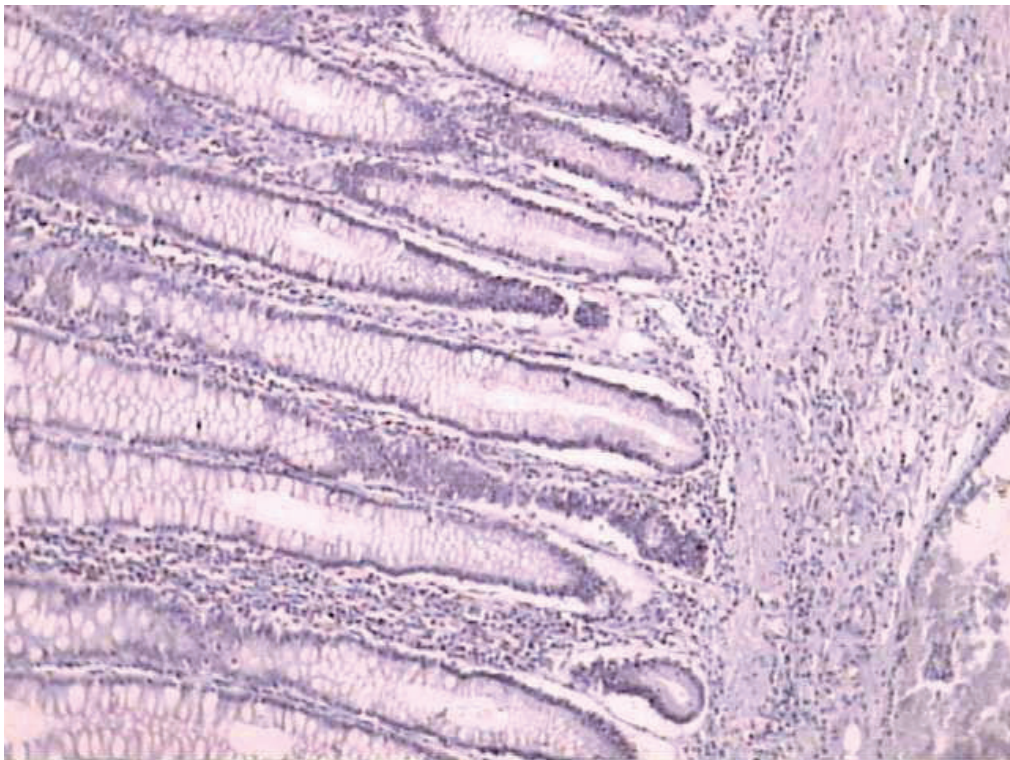


Figura 5: Fotomicrografía de caso representativo de adenoma viloso, COX-2 negativo. (IHC-100x)

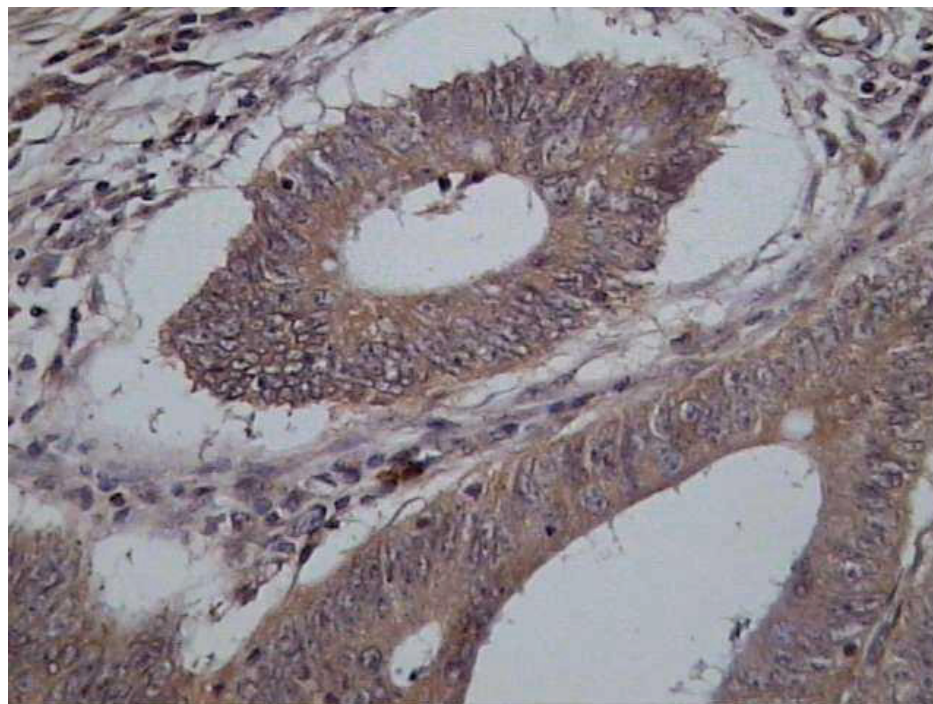


Figura 6: Fotomicrografia de caso representativo de adenoma tubular, COX-2 positivo. (IHC-400x)

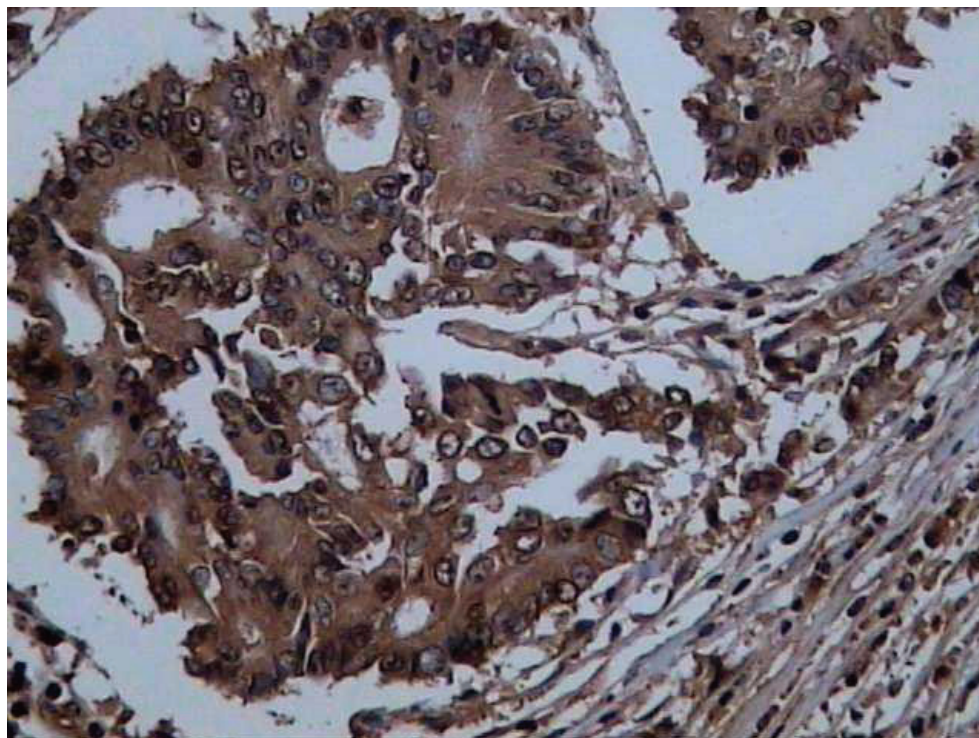


Figura 7: Fotomicrografia de caso representativo de adenocarcinoma, COX-2 positivo. (IHC-400x)

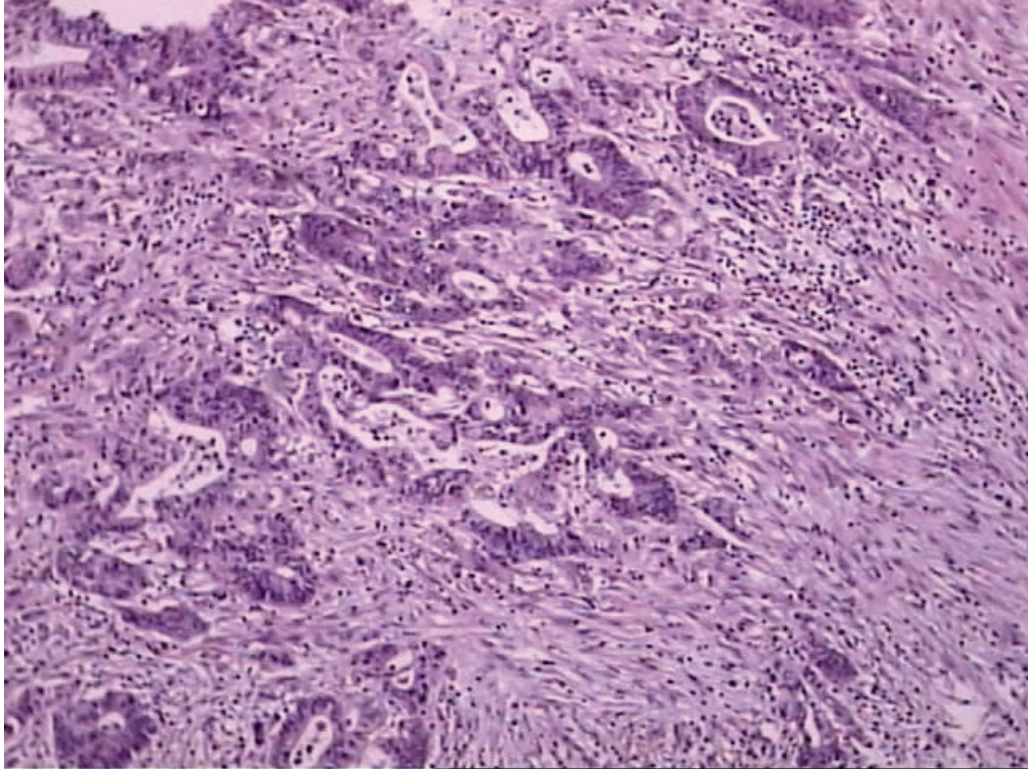


Figura 8: Fotomicrografia de caso representativo de adenocarcinoma de padrão micro-acinar. (HE-100x).

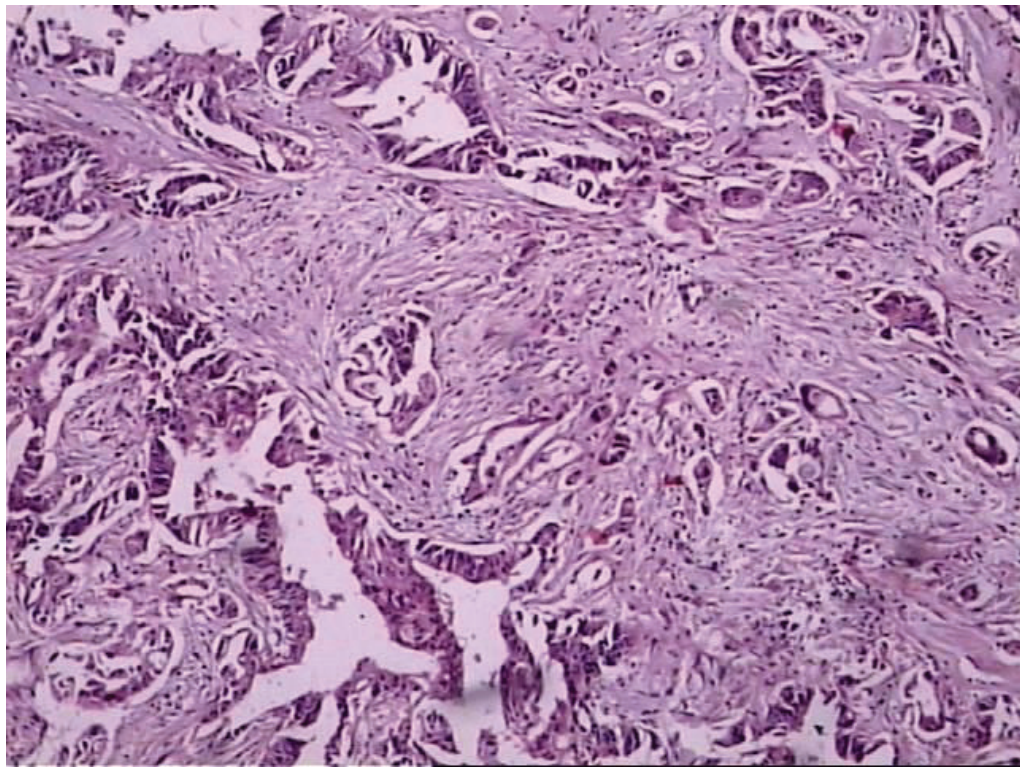


Figura 9: Fotomicrografia de caso representativo de adenocarcinoma com padrão de estroma fibroso. (HE-100x)

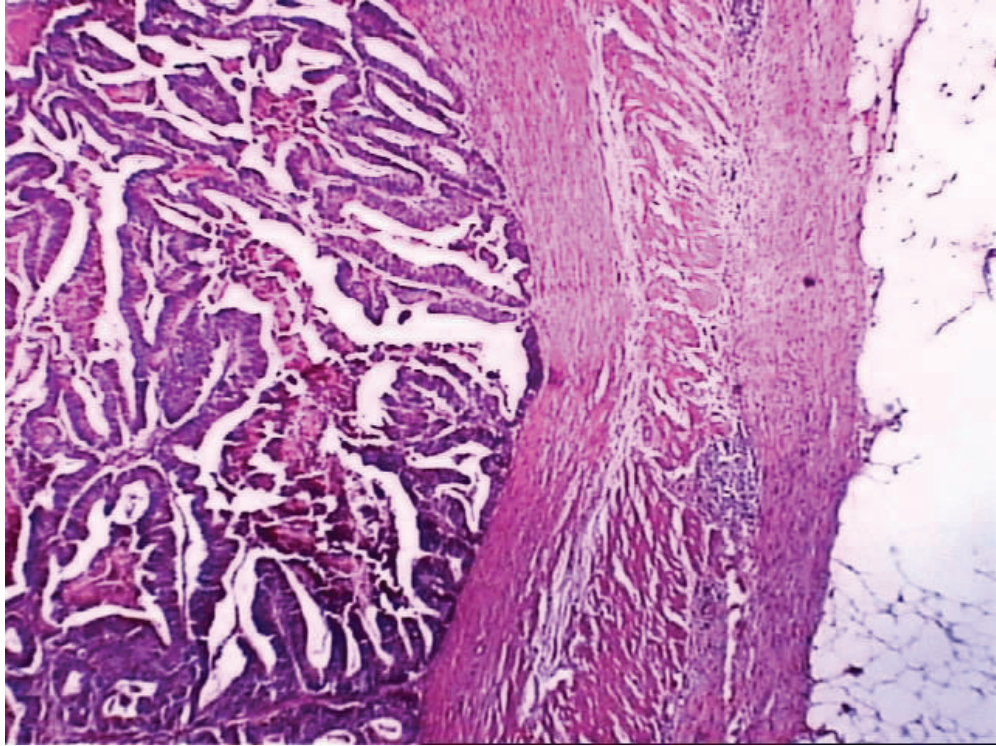


Figura 10: Fotomicrografia de caso representativo de adenocarcinoma com padrão de crescimento expansivo. (HE-100x)

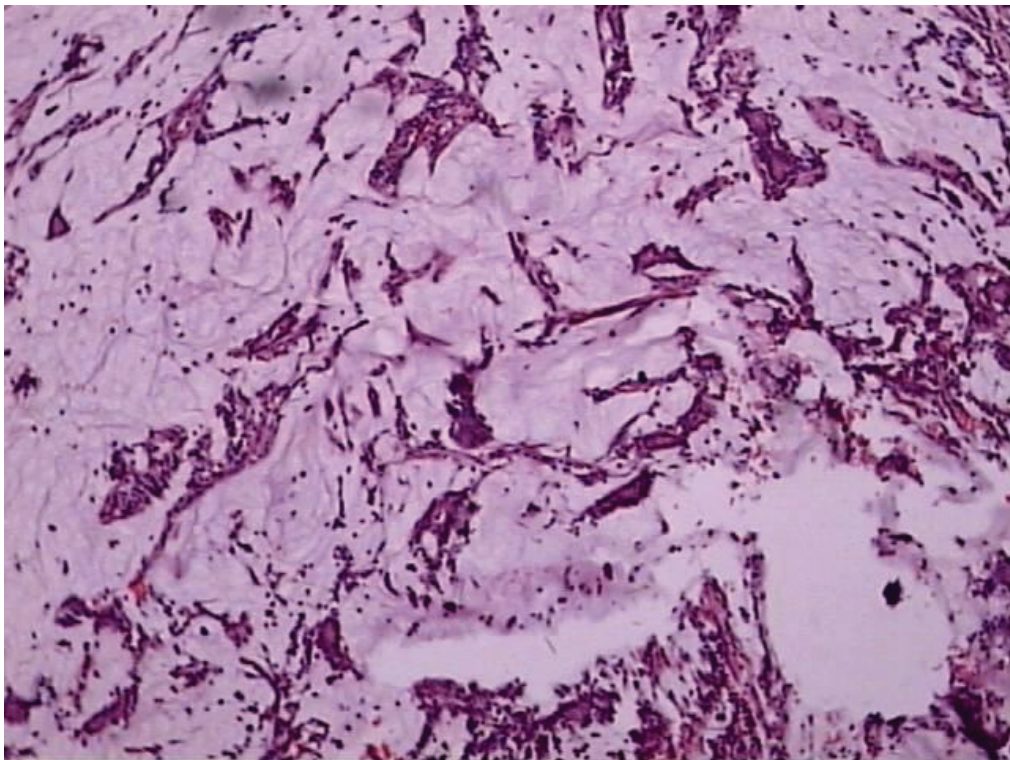


Figura 11: Fotomicrografia de caso representativo de adenocarcinoma mucinoso. (HE-100x)

Quanto ao sexo não se evidenciou diferença estatística entre sexo masculino e o sexo feminino (43% vs 57%; NS), assim como na distribuição das faixas etárias não se encontrou diferença estatística (NS).

Ao avaliar-se a relação diâmetro da lesão com a positividade para a COX-2, diferenciando-os em grupos até 10 mm e com mais de 10 mm, não se obteve diferenças entre os grupos (NS); com o grau de displasia dos pólipos (32% vs 37%; NS).

Nos carcinomas as variáveis patológicas estudadas foram o caráter mucinoso da lesão, a forma de crescimento do tumor (infiltrativo ou expansivo), a presença de padrão micro-acinar e a presença de estroma fibroso, sem no entanto ter se observado diferenças significativas quanto a expressão da COX-2 em relação a estas variáveis. Estes resultados são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 Características patológicas e expressão da COX-2

Característica	COX-2 Positivo N (%)	COX-2 Negativo N (%)
Padrão do estroma		
fibrótico	04 (100)	
não fibrótico	21 (68)	10 (32)
Padrão Microacinar		
presente	06 (67)	03 (33)
ausente	19 (73)	07 (27)
Padrão de Crescimento		
infiltrativo	15 (71)	06 (29)
expansivo	10 (71)	04 (29)
Padrão Mucinoso		
presente	08 (67)	04 (33)
ausente	17 (74)	06 (26)

5 DISCUSSÃO

A identificação de parâmetros que reflitam o comportamento biológico do câncer correlacionando-o com a agressividade do tumor é um determinante fundamental do prognóstico e do incremento da terapia oncológica. Apesar dos recentes progressos na definição dos mecanismos moleculares de desenvolvimento e progressão do câncer, somente alguns marcadores biológicos foram identificados como tendo valor prognóstico.

A literatura mostra que vários autores já realizaram estudos quanto ao valor da COX-2 como fator prognóstico das neoplasias. Ferrandina et al. demonstraram, no carcinoma de ovário, uma maior resistência à quimioterapia em tumores que expressavam COX-2 (62). Denkert et al. estudaram neoplasias de ovário tanto em linhagens celulares como em peças ressecadas e obtiveram como resultado menor sobrevida em tumores que expressavam COX-2 (63). Em editorial, Nasi e Castiglione avaliaram estudos sobre o valor da COX-2 como fator prognóstico em câncer de ovário e sugeriram cuidado ao se avaliarem os resultados da literatura, lembrando que apenas foi encontrada relação de positividade em subgrupos dos estudos até agora realizados (64). Numa revisão empreendida por Singh-Ranger e Mokbel, os autores comentam as relações da COX-2 com o câncer de mama e concluem que existe uma clara e importante relação entre a carcinogênese mamária e a COX-2 e que os AINEs podem ter um imenso valor quando usados em grupos específicos, porém estudos prospectivos em larga escala devem ser realizados (65).

Quanto ao câncer colorretal, muitos trabalhos têm dado ênfase ao valor prognóstico da COX-2. Sheehan et al observaram uma relação do grau de expressão da COX-2 com o estadiamento de Dukes, e com a sobrevida (15). Yamauchi et al. demonstram também uma relação da expressão da COX-2 com pior prognóstico e maior probabilidade de metástase hepática metacrônica (66). Masunaga et al. igualmente encontraram uma relação da expressão da COX-2 com o estadiamento de Dukes e um maior número de linfonodos, porém, em uma análise multivariada de fatores prognósticos, não foi demonstrada associação suficiente para ser um fator prognóstico independente (67). Outro estudo que investigou a relação da expressão da COX-2 com o estadiamento foi o realizado por Zhang et al., não tendo os autores conseguido estabelecer relação da expressão da COX-2 com a

sobrevida, mesmo sendo significativa a relação de expressão da COX-2 com o estadiamento de Dukes (68). No relato de Tomazawa et al., a COX-2 não se correlacionou com o estadiamento de Dukes, porém a recorrência tumoral, principalmente de metástases hematogênicas, e o intervalo livre de doença mostraram diferenças significantes (69). Em estudo de sobrevida realizado por Hull et al. em pacientes com metástase hepáticas submetidos à cirurgia, foi encontrada a presença de COX-2 em 100% dos casos, e o prognóstico não variou com o nível de expressão das lesões (70). Em carcinomas de reto, Petersen et al. demonstraram que a expressão da COX-2 não constitui fator prognóstico na recorrência local e na sobrevida (71). Na presente dissertação, não se estabeleceu relação entre a expressão da COX-2, a classificação de Dukes e parâmetros patológicos de mau prognóstico como os padrões mucinoso, microacinar, estroma fibrótico e margens infiltrativas.

Uma das áreas em recente desenvolvimento em oncologia é o reconhecimento de que diversas drogas que inibem a COX-2 podem retardar ou prevenir certas formas de câncer. AINEs há vários anos vêm demonstrando uma redução dos níveis de neoplasias com seu uso crônico, principalmente no adenocarcinoma de cólon e reto. Estudo de populações usuárias de AINEs por longos períodos, como pacientes com artrite reumatóide, (9), estudo populacional com mais de 100.000 pessoas usuárias de AINEs eventuais, Smalley et al. (7) e em um estudo randomizado com profissionais da área da saúde (10), constatou-se que o uso de AINEs reduz o risco de surgimento de câncer colorretal. Pesquisas com populações formadas por portadores de polipose adenomatosa familiar também mostram o efeito benéfico dos AINEs sobre os pólipos, principalmente com o uso do sulindac (10,44) e o celecoxib (11). Porém um estudo populacional com médicos americanos realizado por Stumer et al. (8), não evidenciou associação entre o uso da droga e o aparecimento de câncer colorretal.

Além das pesquisas anteriores com pacientes, estudos com linhagens celulares mostram a atividade de inibidores da COX-2 sobre a evolução das células neoplásicas de diferentes órgãos (31, 33, 48, 51, 54).

Experimentos em animais também demonstram resultados positivos na quimioprevenção de neoplasias com agentes inibidores da COX-2. Harris et al., usando carcinógenos para produzir câncer de mama em ratas obtiveram redução na

incidência de tumor, na multiplicidade e no volume tumoral quando em comparação com o grupo controle (30). A droga celecoxib também foi usada, com resultados positivos, em ratos submetidos ao azoximetano para a produção de neoplasia colorretal que expressa COX-2, em estudo realizado por Reddy et al. (11).

Embora uma ampla gama de estudos aponte para a importância da inibição da COX-2 para a quimioprevenção do câncer, alguns autores possuem dúvidas. Em revisão apresentada por Rigas e Shiff, os autores abordam alguns aspectos da inibição da COX-2 na profilaxia das neoplasias e sugerem um modelo de ação dos agentes AINEs independente da COX-2 baseados na existência de compostos que não inibem esta proteína e que previnem câncer colorretal e no fato que os AINEs podem inibir a proliferação celular e induzir a apoptose em células que não a expressam (72).

No estudo aqui apresentado, notou-se diferença significativa na expressão da COX-2 em adenomas e carcinomas. Não se constatou, no entanto, diferença estatística entre os adenomas tubulares e vilosos, nem entre os carcinomas em diferentes estágios. Na literatura, há diversos relatos usando diferentes métodos de avaliação de expressão da COX-2 e, conseqüentemente, com resultados conflitantes. Neste trabalho, optou-se pelo método imunistoquímico, freqüentemente utilizado, com resultados possivelmente diferentes, muitas vezes pela interpretação distinta dos resultados ou pela técnica empregada. Diferentes técnicas podem ser observadas nos vários tipos de fixação, tipos de anticorpos, métodos de recuperação antigênica, escores e critérios de positividade. Além das diferenças técnicas, podem-se encontrar diferenças nos métodos empregados, pois, além da reação imunistoquímica os métodos de precipitação em gel para DNA, precipitação em gel para DNA/RNA e *RT-PCR* podem ser usados para a determinação da COX-2.

Empregando a técnica de *Northern blot*, Eberhart revelou a presença da expressão da COX-2 em 43% dos adenomas avaliados (14). Em estudos semelhantes, Maekawa et al. (73) e Hasegawa et al. (74) fizeram uso da técnica da *RT-PCR* para avaliar casos de adenomas e carcinomas com resultados diversos. Maekawa et al. relataram a presença da expressão da COX-2 em 92% dos carcinomas, em 90% dos adenomas e em 60% dos pólipos hiperplásicos (73), enquanto Hasegawa et al. mostraram a expressão da COX-2 em 100% dos

adenomas, com grau de expressão maior nos de maior diâmetro (74). A técnica utilizada por Dimberg et al. foi a de *Western blot*, tendo sido encontrada expressão de COX-2 em 90% dos carcinomas de reto e em apenas 20% dos carcinomas de cólon (34).

Segundo dados da literatura, a técnica de imunistoquímica tem sido a mais empregada, com trabalhos que adotam as mais variadas abordagens. Neste estudo com o método de imunistoquímica obteve-se positividade para COX-2 em 33% dos adenomas e 71% dos carcinomas. Usando apenas carcinomas, resultados semelhantes foram encontrados por Yamauchi et al. que também mostram uma expressão de COX-2 em 71% dos espécimes analisados (66). Por outro lado, Sheehan et al. apresentam resultados de 100% de expressão, com variação de grau de acordo com o estágio da lesão (15). A mesma discordância em frequência pode ocorrer com os adenomas. Fujita (36) relatou uma expressão de 38% e, em outro estudo, Khan demonstrou a presença de 100% de expressão da COX-2 (75). Outro fator que dificulta a avaliação são os escores de positividade, que variam entre os autores. A maioria adota escores semiquantitativos baseados no percentual de células tumorais imunorreativas, os quais muitas vezes diferem entre os autores (15, 66, 75). Em nosso meio, Jurach et al. encontraram pontos de corte apenas aos 10% quando avaliaram a positividade do p53 no prognóstico de tumores de reto (76). No presente estudo, consideraram-se positivos todos os casos que exibiam 10% das células epiteliais coradas, não se utilizando graduação para os mesmos.

Outro ponto de divergência diz respeito às células coradas nos espécimes estudados. Enquanto a maioria dos autores concentra-se em analisar principalmente as células epiteliais neoplásicas (15, 66) alguns enfatizam a presença de células intersticiais como o principal componente de imunorreatividade. De acordo com Fujita, a expressão da COX-2 tem maior grau de importância em células neuroendócrinas nos pólipos estudados, tendo as mesmas a expressão de cromogranina-A (36). Outro estudo demonstrou a intensa imunorreatividade de expressão da COX-2 em células subepiteliais, dando-lhe importância no desenvolvimento da seqüência adenoma-carcinoma (35). Chapple, avaliando a imunorreacção em adenomas, demonstrou predomínio de expressão da COX-2 nos macrófagos localizados no estroma dos adenomas, inferindo com isto função mediadora parácrina da COX-2 pelos macrófagos nas células epiteliais (77). Nesta

dissertação a imunorreatividade foi estudada nas células epiteliais neoplásicas, porém foi verificado, em alguns casos, a presença de imunorreação em células intersticiais bem como em células endoteliais.

Paralelamente à determinação da prevalência da expressão imunoistoquímica da COX-2, procurou-se identificar alguma associação dessa expressão com características clínico - patológicas do adenocarcinoma colorretal na amostra estudada. Na análise univariada, não foi constatada qualquer associação entre a expressão imunoistoquímica da proteína e parâmetros clínico-patológicos. Fatores como o caráter mucinoso, presença de estroma fibrótico, padrão microacinar e crescimento de caráter infiltrativo não diferiram estatisticamente na expressão da COX-2. Mostrou-se, porém, uma tendência sem significância estatística de os adenomas que expressam a COX-2 possuírem um maior diâmetro, dado este que possui correspondência com trabalhos como o de Hasegawa K et al., que demonstra um aumento na expressão da COX-2 relacionada com o diâmetro do adenoma estudado (78). Neste trabalho não se observou diferença na expressão imunoistoquímica da COX-2 em relação ao estadiamento segundo a classificação de Dukes, o que difere dos resultados apresentados por Sheehan et al. (15), Yamauchi et al (66) e Hull et al (70), que verificaram aumento da expressão da proteína associado a um grau de pior prognóstico na classificação de Dukes.

Dimberg J et al. (34) relataram uma diferença significativa na expressão da COX-2 entre neoplasias localizadas em cólon e reto. O autor atribui essa diferença à natureza biológica diversa entre neoplasias de cólon e reto. Esse trabalho é contestado sobretudo por Hull et al. (79), que referem diversos estudos com valores de expressão homogênea entre cólon e reto. Este estudo, concentrou-se na análise de casos de câncer colorretal esporádico e não foi encontrada diferença estatística entre as neoplasias do cólon e reto quanto à expressão da proteína COX-2.

Sinicrope et al. (80) avaliaram três grupos de câncer colorretal: esporádico, relacionado a polipose adenomatosa familiar e câncer colorretal hereditário não polipóide. Os resultados mostraram uma diferença significativa em relação à presença da expressão da COX-2: nos portadores de câncer relacionado à polipose adenomatosa familiar a expressão da COX-2 foi de 100%; nos casos de câncer colorretal esporádico, foi de 92% e nos de carcinoma colorretal hereditário não polipóide, de apenas 67%. Enfatiza-se o fato de todos os pacientes com câncer

colorretal hereditário não polipóide possuem instabilidade de microssatélites. A hipótese aventada por Sinicrope et al. é que mutações inativadoras no *gene TGF- β RII* poderiam diminuir a expressão da proteína COX-2. Porém o estudo dos casos de câncer colorretal hereditário não polipóide com mutações em *hMLH1* e *hMSH2* e mutações *RII* evidenciou não haver diferença significativa na presença ou não da expressão da proteína. Outro estudo que mostra a frequência baixa de COX-2 nas neoplasias colorretais foi realizado por Karnes et al. (81,82), segundo os quais uma frequência dos 65% de adenocarcinomas colorretais não expressa COX-2. Essas neoplasias apresentavam instabilidade de microssatélites e ocorriam predominantemente no cólon direito. Esses dados se contrapõem aos de Shao et al. (42) que evidenciaram 100% de positividade em carcinomas de pacientes portadores de HNPCC e com mutações em *hMLH1* e *hMSH2*. Esses mesmos autores demonstraram também seus resultados com o TGF- β 1, onde o fator de crescimento foi encontrado em 100% das neoplasias com instabilidade de microssatélites além de o mesmo induzir a expressão da proteína COX-2 em cultura de células epiteliais intestinais de ratos.

Como alguns autores (8, 82) sugerem que as neoplasias originadas das instabilidades de microssatélites possuem menor ligação com a COX-2, é possível inferir uma associação com os genes envolvidos da seqüência adenoma-carcinomas. Oshima et al. (49) apresentaram uma interessante pesquisa com ratos modificados para a *gene APC*, onde demonstram a ausência de COX-2 em tecidos normais e sua presença em adenomas precoces. Os autores concluíram que a expressão do *gene COX-2* aumenta o número e o tamanho dos pólipos de uma forma dose-dependente em ratos mutados para o *gene APC* e que essa é uma evidência genética direta de que a COX-2 exerce papel precoce na formação do pólipo. Outro estudo que corrobora a associação do *gene APC* com a COX-2 foi realizado por Yang et al. (83), onde os autores dosando os níveis de prostaglandinas em pólipos de pacientes diagnosticados com FAP, mostraram que estes eram significativamente mais altos que a mucosa normal adjacente às lesões, indicando assim uma associação entre mutação do *gene APC* e aumento da atividade da COX-2. Em uma pequena série de casos, Dobbie et al. (84) avaliaram, a relação do *gene APC* com a expressão da COX-2 em pacientes com PAF tratados com meloxicam. O uso dessa droga produziu um aumento de expressão da COX-2 nos

adenomas avaliados após três meses de tratamento juntamente com uma diminuição de expressão do gene *APC* com a não alteração dos genes *c-myc* e *ciclina D1*. Hsi et al. (85) realizaram estudo em linhagem de células do câncer colorretal HT-29 e introduziram o gene *APC* em seu tamanho original, neste experimento a apoptose foi restaurada após a transfecção com o *gene APC*, mostrando, desse modo, a relação de controle do *gene APC* com a *COX-2*.

Muitas pesquisas apontam para a importância da *COX-2* na carcinogênese colorretal, embora a forma de sua participação ainda não esteja completamente compreendida. O estudo ora apresentado soma-se aos demais na evidência de que a *COX-2* está presente em grande parte das neoplasias colorretais e provavelmente tenha função ativa na carcinogênese. Caberá a investigações posteriores mostrar o real valor da *COX-2* não só como fator prognóstico nos carcinomas colorretais mas também como foco para a ação de agentes quimioprofiláticos dessa neoplasia.

CONCLUSÃO

Uma prevalência de 33% e 70% de expressão da proteína COX-2 foi observada nos adenomas e carcinomas respectivamente, no entanto não foi observada diferença significativa quando se avaliou em subtipos os adenomas e em estágios de Dukes os adenocarcinomas colorretais.

O presente trabalho demonstrou um aumento de expressão da COX-2 quanto maior o grau de alteração neoplásica com expressão moderada em adenomas e alta em carcinomas de cólon e reto.

Características patológicas específicas de valor prognóstico tais como produção de muco, padrão microacinar, tipo de crescimento e estroma tecidual não demonstraram relação direta com a COX-2.

PERSPECTIVAS

A continuidade de trabalhos levando em conta à expressão da COX-2 nas neoplasias colorretais e a possibilidade de encontrar agentes que possam atuar inibindo-a e reduzindo o aparecimento bem como a regressão de adenomas passa a integrar o foco de atuação deste grupo de pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LANDIS, S.H. et al **Cancer Statistics**. CA Cancer J Clin 1999; 49: 8-31.
2. GOLDMAN, A.P. et al. **Meloxicam inhibits the growth of colorectal cancer cells**. Carcinogenesis 1998; 19: 2195-9.
3. BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil (2003)**. Disponível em: <<http://www.inca.org.br/>>. Acesso em: 30 Nov. 2003.
4. BOLAND, C.R. **The biology of colorectal cancer**. Implications for pretreatment and follow-up management. Cancer 1993; 71: 4180-6.
5. GREENBERG, E.R. et al. **A clinical trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma**. The N Eng J Med 1994; 333: 141-7
6. GIOVANNUCCI, E. et al. **Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenomas in male health professionals**. Ann Intern Med 1994; 121: 241-6.
7. SMALLEY, V. et al. **Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and incidence of colorectal cancer: A population-based study**. Arch Intern Med 1999; 159:161-6.
8. STURMER, T. et al. **Aspirin use and colorectal cancer: Post-trial follow-up data from the physician's health study**. Ann Intern Med 1998; 128: 713-20.
9. GRIDLEY, G. et al. **Incidence of cancer among patients with rheumatoid arthritis**. J Natl Cancer Inst 1993; 85: 307-11.
10. GIARDELLO, F.M. et al. **Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis**. N Engl J Med 1993; 328: 1313-6.
11. REDDY, B.S. et al. **Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, administered during different stages of carcinogenesis**. Cancer Res 2000; 60: 293-7.
12. HARA, A. et al. **Apoptosis induced by NS-398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in human colorectal cancer cell lines**. Jpn J Cancer Res 1997; 88: 600-4.
13. FOSSLIEN, E. **Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia**. Ann Clinical Laboratory Science 2000; 30: 3-21.

14. EBERHART, C.E. et al. **Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas.** Gastroenterol 1994;107: 1183-8.
15. SHEEHAN, K.M. et al. **The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer.** JAMA 1999; 282: 1254-7.
16. GORDON, P.H. Malignant neoplasms of the colon. In: **Gordon PH and Nivatvongs S**, eds. Principles and Practice of Surgery for the Colon, Rectum and Anus. 2nd ed. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing; 1999. p. 576-717.
17. SCHOTTENFELD, D. Epidemiology. In: **Cohen AM**, Winawer SJ, eds. Cancer of the colon, rectum and anus. New York, New York: McGraw-Hill; 1995. p. 11-24.
18. BOLAND, C.R. **The biology of colorectal cancer.** Cancer 1993; 71(12 Suppl): 4180-6.
19. VOGELSTEIN, B. et al. **Genetic alterations during colorectal tumor development.** N Eng J Med 1988; 319: 525-32.
20. HAMILTON, S.R. **The molecular genetics of colorectal neoplasia.** Gastroenterology 1993; 105: 3-7.
21. MORSON, B.C. **The polyp-cancer sequence in the large bowel.** Proc R Soc Med 1974; 67: 451-7.
22. LYNCH, H.T.; SMYRK, T. **Hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome): An update review.** Cancer 1996; 78: 1149-67.
23. HEMLER M, LANDS WEM. **Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins.** J Biol Chem 1976; 251: 5575-9.
24. VANE, J.R.; BOTTING, R.M. **Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.** Am J Med 1998; 104: 2s-8s.
25. SMITH, W.L. **Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action.** Am J Physiol 1992; 263: F181-91
26. SMITH, W.L.; DEWITT D.L.; GARAVITO, R.M. **Cyclooxygenase: structural, cellular, and molecular biology.** Annu Rev Biochem 2000; 69: 145-82.
27. RIGAS, B.; GOLDMAN, I.S.; LEVINE, L. **Altered eicosanoid level in human colon cancer.** J Lab Clin Med 1993; 122: 518-23.
28. WILSON, K.T. et al. **Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas.** Cancer res 1998; 58: 2929-34.

29. HIDA, T. et al. **Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas.** Cancer research 1998; 58: 3761-4.
30. HARRIS, R.E. et al. **Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor.** Cancer res 2000; 60: 2101-3.
31. HSU, A. et al. **The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of bcl-2.** J Biol Chem. 2000; 275: 11397-403.
32. SHIRAHAMA, T. **Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in transitional cell carcinoma and its preneoplastic lesions in the human urinary bladder.** Clin Cancer Res 2000; 6: 2424-30.
33. HIGASHI, Y.; KANEKURA, T.; KANZAKI, T. **Enhanced expression of cyclooxygenase (cox)-2 in human skin epidermal cancer cells: evidence for growth suppression by inhibiting cox-2 expression.** Int J Cancer 2000; 86: 667-71.
34. DIMBERG, J. et al. **Differential expression of cyclooxygenase 2 in human colorectal cancer.** Gut 1999; 45: 730-2.
35. BAMBA, H. et al. **High expression of cyclooxygenase-2 in macrophages of human colonic adenomas.** Int J Cancer 1999; 83: 470-5.
36. FUJITA, M. et al. **Immunohistochemical expression of cyclooxygenase (cox)-2 in colorectal adenomas.** J gastroenterol 2000; 35: 488-90.
37. FUJITA, M. et al. **Relationship between cyclooxygenase-2 expression and K-ras gene mutation in colorectal adenomas.** J Gastroenterol Hepatol 2000; 15: 1277-81.
38. HAO, X. et al. **Early expression of cyclooxygenase-2 during sporadic colorectal carcinogenesis.** J Pathol 1999; 187: 295-301
39. HARDWICK, J.C.H. et al. **NF-KappaB, p38 MAPK and JNK are highly expressed and active in the stroma of human colonic adenomatous polyps.** Oncogene 2001; 20: 819-27.
40. SAKUMA, K. et al. **Cyclooxygenase (cox)-2 immunoreactivity and relationship to p53 and ki-67 expression in colorectal cancer.** J Gastroenterol 1999; 34:189-94.
41. SHATTUCK-BRANDT, R.L. et al. **Differential expression of matrix metalloproteinase-2 and cyclooxygenase-2 in intestinal and colorectal neoplasms.** Mol Carcinog 1999; 24: 177-87.

42. SHAO, J. et al. **Coordinate regulation of cyclooxygenase-2 and TGF- β 1 in replication error-positive colon cancer and azoxymethane-induced rat colonic tumors.** *Carcinogenesis* 1999; 20: 185-91.
43. DUBOIS, R.N. **Cyclooxygenase a target for colon cancer prevention.** *Alimen Pharm Therap* 2000; 14: 64-7.
44. WINDE, G. et al. **Complete reversion and prevention of rectal adenomas in colectomized patients with familial adenomatous polyposis by rectal low-dose sulindac maintenance treatment.** *Dis Colon Rectum* 1995; 38: 813-30.
45. PASRICHA, P.J. et al. **The effects of sulindac on colorectal proliferation and apoptosis in familial polyposis.** *Gastroenterol* 1995; 109: 995-8.
46. TAKAYAMA, T. et al. **Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer.** *The N Eng J Med* 1998; 339:1277-84.
47. GUSTAFSON-SVARD, C. et al. **Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 gene expression in human colorectal adenocarcinomas and in azoxymethane induced colonic tumour in rats.** *Gut* 1996; 38: 79-84.
48. SHENG, H. et al. **Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase.** *J clin invest* 1997; 99: 2254-9.
49. OSHIMA, M. et al. **Suppression of intestinal polyposis in APC Δ 716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2).** *Cell* 1996; 87: 803-9
50. ROZIC, J.G.; CHAKRABORTY, C.; LALA, P.K. **Cyclooxygenase inhibitor retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis.** *Int J Cancer* 2001; 93: 497-506.
51. ZHANG, Z.; DUBOIS, R.N. **Par-4, a proapoptotic gene, is regulated by NSAIDs in human colon carcinoma cells.** *Gastroenterology* 2000; 118: 1012-7.
52. MUTOH, M. et al. **Suppression by flavanoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship.** *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 686-91.
53. TSUJII, M.; KAWANO, S.; DUBOIS, R.N. **Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential.** *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 3336-40.
54. CHEN, W.S. et al. **Tumor invasiveness and liver metastasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 (cox-2) expression and inhibited by a cox-2-selective inhibitor etodolac.** *Int J Cancer* 2001; 91: 894-9.

55. TSUJII, M. et al. **Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells.** Cell 1998; 93: 705-16.
56. ARBABI, S. et al. **Epithelial cyclooxygenase-2 expression: a model for pathogenesis of colon cancer.** J Surg Res 2001; 97: 60-4.
57. PRESCOTT, S.M.; FITZPATRICK, F.A. **Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis.** Biochim Biophys Acta 2000; 1470: M69-78.
58. CHAN, G. et al. **Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of head and neck.** Cancer Res 1999; 59: 991-4.
59. CAO, Y.; PRESCOTT, S.M. **Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer.** J Cell Physiol 2002; 190: 279-86.
60. TSUJII, M.; DUBOIS, R.N. **Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2.** Cell 1995; 83: 493-501.
61. GATELY, S. **The contribution of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis.** Cancer and Metas rev 2000; 19: 19-27.
62. FERRANDINA, G. et al. **Increased cyclooxygenase-2 (cox-2) expression is associated with chemotherapy resistance and outcome in ovarian cancer patients.** Ann Oncol 2002; 13: 1205-11
63. DENKER, C. et al. **Expression of cyclooxygenase is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma.** Am J Pathol 2002; 160: 893-903.
64. NASI, M.L.; CASTIGLIONI, M. **Cyclooxygenase-2 a new prognostic and predictive factor for ovarian cancer? Are all the criteria fulfilled?** Ann Oncol 2002; 13: 1169-71.
65. SING-RANGER, G.; MOKBEL, K. **The role of cyclooxygenase-2 (cox-2) in breast cancer, and implications of cox-2 inhibition.** EJSO 2002; 28: 29-737.
66. YAMAUCHI, T. et al. **Cyclooxygenase-2 expression as a new marker for patients with colorectal cancer.** Dis Colon Rectum 2002; 45: 98-113.
67. MASUNAGA, R. et al. **Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients.** Clin Cancer Res 2000; 6: 4064-68.
68. ZHANG, H.; SUN X.F. **Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with advanced stages of colorectal cancer.** Am J Gastroenterol 2002; 97: 1037-41.

69. TOMOZAWA, S. et al. **Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumor recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer.** British J Cancer 2000; 83: 324-8.
70. HULL, M.A. et al. **Cyclooxygenase-2 expression in colorectal cancer liver metastases.** Clinical Experimental Metastasis. 2000; 18: 21-7.
71. PETERSEN, S. et al. **Cox-2 expression in rectal carcinoma: Immunohistochemical pattern and clinical outcome.** Anticancer Reserch 2002; 22: 1225-30.
72. RIGAS, B.; SHIFF, S.J. **Is inhibition of cyclooxygenase required for the chemopreventive effect of NSAIDs in colon cancer? A model reconciling the current contradiction.** Medical Hypotheses 2000; 54(2): 210-5.
73. MAEKAWA, M. et al. **Increasead expression of cyclooxygenase-2 to -1 in human colorectal cancers and adenomas, but not in hyperplasic polyps.** Jpn J Oncol 1998; 28: 421-6.
74. HASEGAWA, K. et al. **Expression of cyclooxygenase-2 (cox-2) mRNA in human colorectal adenomas.** Euro J Cancer 2001; 37: 1469-74.
75. KHAN, K.N.M. et al. **Enhanced cyclooxygenase-2 expression in sporadic and familial adenomatous polyposis of the human colon.** Scand J Gastroenterl 2001; 36: 865-9.
76. JURACH, M.T. **Expressão do P53 e relação clínico-patológica no adenocarcinoma de reto: resultados preliminares.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de pós-graduação em medicina: cirurgia. 2003.
77. CHAPPLE, K.S. et al. **Localization of cyclooxygenase-2 in human sporadic colorectal adenomas.** Am J Pathol 2000; 156: 545-53.
78. HASEGAWA, K.; ICHIKAWA, W.; FUJITA, T. **Expression of cyclooxygenase-2 (cox-2) mRNA in human colorectal adenomas.** Euro J Cancer 2001; 37: 1469-74.
79. HULL, M.; LANGMAN, M. **Differential expression of cyclooxygenase 2 in human colorectal cancer.** Gut 2000; 47: 154-8.
80. SINICROPE, F.A. et al. **Reduced expression of cyclooxygenase 2 protein in hereditary nonpolyposis colorectal cancers relative to sporadic cancers.** Gastroenterol 1999; 117: 350-8.
81. KARNES, W.E. **Implications of low cox-2 expression in colorectal neoplasms with defective DNA mismatch repair.** J Cell Biochem Suppl 2000; 34: 23-7.

82. KARNES, W.E. et al. **Reduced cox-2 protein in colorectal cancer with defective mismatch repair.** *Cancer Res* 1998; 58: 5473-7.
83. YANG, V.W. et al. **Size-dependent increase in prostanoid levels in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis.** *Cancer Res* 1998; 58: 1750-3.
84. DOBBIE, Z. et al. **Expression of cox-2 and wnt pathway genes in adenomas of familial polyposis patients treated with meloxicam.** *Anticancer Res* 2002; 22: 2215-20.
85. HSI, L.C.; ANGERMAN-STEWART, J.; ELING, T.E. **Introduction of full-length APC modulates cyclooxygenase-2 expression in HT-29 human colorectal carcinoma cells at the translational level.** *Carcinogenesis* 1999; 20: 2045-9.

ANEXO A - ARTIGO

A expressão imunoistoquímica da proteína ciclooxygenase-2 nas neoplasias colorretais não possui relação com fatores histopatológicos prognósticos.

Eduardo Brambilla, Luis Fernando Moreira, Eduardo Pretto Serafini

Resumo

Objetivos: Avaliar a prevalência da proteína ciclooxygenase-2 (COX-2) nas neoplasias colorretais e sua relação com parâmetros patológicos prognósticos para o câncer colorretal. **Métodos:** 65 lesões neoplásicas colorretais foram avaliadas através de imunoistoquímica para a presença de COX-2, também foram analisados fatores patológicos prognósticos e estadiamento das lesões. **Resultados:** A COX-2 expressou-se positivamente em 27% dos adenomas tubulares, 40% dos adenomas vilosos e 70% nos carcinomas. Diferença estatisticamente significativa foi obtida na expressão da COX-2 entre adenomas e carcinomas, porém não houve significância nas demais variáveis estudadas. **Conclusão:** A expressão da COX-2 parece variar progressivamente com a progressão da lesão neoplásica, mas não possui relação com os parâmetros patológicos de mau prognóstico estudados.

Palavras-chaves: Ciclooxygenase-2, câncer colorretal, imunoistoquímica, carcinogênese.

Introdução

A neoplasia de cólon e reto constitui a terceira causa de mortalidade por câncer no mundo e nos Estados Unidos é responsável pelo aparecimento de 130.000 novos casos por ano e por cerca de 56.000 mortes. (1) Devido a esta frequência elevada, métodos que possam trazer novas perspectivas nos campos do diagnóstico precoce, estadiamento, tratamento e profilaxia desta doença tornam-se de grande interesse.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma incidência menor de adenomas e carcinomas em indivíduos que usam cronicamente antiinflamatórios não esteróides (AINES). (2, 3, 4) Também trabalhos com indivíduos portadores de polipose adenomatosa familiar, uma doença pré-maligna, mostram uma regressão no número e tamanho dos pólipos quando submetidos ao uso crônico de AINES. (5)

Os AINES possuem como mecanismo de ação a inibição da enzima ciclooxigenase (COX). A COX possui duas isoformas que são derivadas de genes diferentes, mas possuem uma homologia de 60% em sua estrutura. A COX-1 é expressa constitutivamente nos tecidos, enquanto a COX-2 é usualmente ausente ou expressa em quantidades muito pequenas. (6, 7) A COX-2 é induzida por estímulos pró-inflamatórios como citocinas e fatores de crescimento, bem como se apresenta elevada em uma grande variedade de neoplasias como nas lesões colorretais. (8) Em vários experimentos que avaliam a deleção do gene da COX-2 ou a inibição seletiva da proteína COX-2 observou-se redução significativa no crescimento dos pólipos e no desenvolvimento de tumores. (9, 10, 11)

Ainda persistem dúvidas sobre o verdadeiro papel da COX-2 no aparecimento e progressão dos tumores colorretais. Neste estudo avaliou-se a expressão da COX-2 nos diferentes estágios da neoplasia colorretal, relacionando-a também com fatores prognósticos histopatológicos conhecidos como tipo de crescimento tumoral, presença de padrão microacinar, caráter mucinoso do tumor e presença de estroma fibrótico.

Metodologia

Este trabalho consiste em um estudo de prevalência onde os fatores em estudo são as características patológicas do tumor primário e o desfecho é a expressão imunohistoquímica da proteína ciclooxigenase-2.

Foram avaliados 35 pacientes portadores de adenocarcinoma de cólon ou reto e 30 pacientes portadores de pólipos adenomatosos nos mesmos segmentos ressecados cirúrgica ou endoscopicamente. As lâminas para a análise da proteína cox-2 foram preparadas a partir de blocos de parafina das peças cirúrgicas ou ressecções endoscópicas.

Foram incluídos os pacientes com adenocarcinoma ou adenoma de cólon e reto e foram excluídos da amostra os que preenchiam os critérios a seguir: a) neoplasias que não fossem diagnosticadas como adenomas ou adenocarcinoma; b) outras neoplasias concomitantes ou tumores prévios; c) neoplasia maligna sincrônica ou metacrônica do intestino grosso; d) portadores de doença inflamatória intestinal ou; e) polipose de qualquer tipo; f) história familiar de neoplasia de cólon ou reto; g) terapia neoadjuvante; ou ainda h) uso crônico de AINES.

As variáveis estudadas foram: idade, gênero, localização, grau histológico, produção de muco, caráter infiltrativo da lesão, aspecto do estroma, padrão microacinar, presença de metástases linfáticas ou a distância, estágio e expressão imunohistoquímica da proteína cox-2; todas coletadas em revisão de prontuários médicos e avaliação das lâminas existentes e escolha dos blocos mais representativos de cada lesão e avaliação histopatológica, respectivamente.

Os cortes dos blocos de parafina estocados das peças cirúrgicas foram submetidos à avaliação imunohistoquímica utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-cox2 (IgG, Dako Lab., New York, USA). Para determinação da positividade destes anticorpos nos tecidos, foi utilizado o método imunohistoquímico ABC (avidin-biotin-peroxidase complex; kit LSAB DAKO), conforme se segue.

Para aderência dos cortes dos blocos de parafina às lâminas foi utilizado o organo selano. Para desparafinização, as lâminas foram colocadas em estufa a 37°C por 24 h e a 56°C por 3 h. Para reidratação dos cortes as lâminas foram colocadas em etanol 100%, etanol 95%, etanol 70%, água corrente e água destilada por 5 min cada. A fim de realizar a recuperação antigênica, as lâminas foram colocadas em tampão citrato com pH 6,0 e levadas ao forno de banho-maria por 40 min a uma temperatura de 95°C. Para bloquear a peroxidase endógena as lâminas foram tratadas com peróxido de hidrogênio 5% em metanol por 20 min em câmara escura, com uma repetição. Os cortes foram circulados com caneta Dako Pen (DAKO lab. Inc., New York, NY, USA) e incubados em câmara úmida e escura por 16 h com o anticorpo primário anti-cox-2 (IBL, JAPAN) diluído em 1:50, em SAB (albumina bovina 1%). A seguir, as lâminas foram incubadas com o primeiro anticorpo do kit LSAB (DAKO) em câmara úmida durante 30 min. Estes passos foram intercalados por duas ou três lavagens das lâminas em SST por 5 min, que logo foram incubadas com a streptavidina do kit LSAB em câmara úmida por 30 min após terem sido novamente lavadas duas vezes em SST por 5 min. O cromógeno tetrahidrocloreto de diaminobenzedina (DAB) foi pingado nas lâminas para colorir a reação por 5 min e após, a reação foi bloqueada em água destilada. Em seguida as lâminas foram incubadas por 30 s em hematoxilina de Harris e lavadas em água corrente. Por fim, foram mergulhadas em água amoniacal (20% de hidróxido de amônia em água destilada) e lavadas em água corrente, álcool e xilol para posterior montagem.

As lâminas e os prontuários foram avaliados para confirmação do laudo original do estágio e diagnóstico realizado. As lesões adenomatosas foram divididas em tubulares e vilosas. No grupo dos carcinomas o sistema de estadiamento utilizado foi de Dukes modificado por Astler-Coller e este acrescido convencionalmente do estágio D pra traduzir a presença de metástases à distância.

A partir do laudo anatomopatológico os casos de adenocarcinoma, foram divididos em bem diferenciados, moderadamente e pouco diferenciados; e os adenomas classificados em displasias de baixo grau e alto grau. Também foram avaliados a presença de componente mucinoso, estroma fibrótico, padrão microacinar e invasão infiltrativa da margem.

A reação imunoistoquímica para cox-2 apresentou imagem granular no citoplasma de coloração acastanhada produzida pelo DAB, com intensidade variável. Foram considerados positivos os casos em que houve coloração de 10% das células contadas de maneira manual em campo microscópico de 400X na área total da lâmina (Figura 1). Como controle positivo foi utilizado um caso de adenocarcinoma de reto do arquivo do serviço de patologia. Os controles negativos foram obtidos a partir de biópsias de mucosa normal presentes no arquivo do laboratório de patologia. Para fins diagnóstico, as lâminas foram avaliadas por patologista com experiência em diagnóstico por imunoistoquímica.

Análise estatística

Para a análise estatística da amostra estudada foi utilizado, para variáveis quantitativas, média aritmética, desvio padrão, valores máximos e mínimos e mediana e, para as variáveis qualitativas percentuais onde aplicável.

A relação entre a expressão imunoistoquímica da proteína COX-2 e as variáveis sexo, idade, localização, grau de displasia, grau histológico, características patológicas e estágio foi avaliada em tabelas de contingência, calculando-se percentuais e estimando a razão de prevalência e seu intervalo de confiança.

A decisão sobre a significância da associação entre as variáveis qualitativas foi determinada pela aplicação do teste do qui-quadrado ou teste exato de Fischer, quando adequados. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

O processamento e a análise dos dados foram executados com o auxílio do programa SPSS v 6.0.

Resultados

Foram analisados 65 casos de neoplasias de cólon e reto acompanhados no período de julho de 1997 a dezembro de 2001, segundo os critérios de elegibilidade referidos anteriormente. A distribuição diagnóstica e classificação dos adenocarcinomas foram as seguintes: adenoma tubular e adenoma viloso (15 casos cada), adenocarcinoma Dukes A (n=6), adenocarcinoma Dukes B (n=10), adenocarcinoma Dukes C (n=10), adenocarcinoma Dukes D (n=9). Vinte e sete (41,5%) pacientes eram do gênero masculino e 38 (58,5%) do gênero feminino, com idade variando entre 23 e 91 anos, mediana (DP) de 62 (15) anos. Ao se separar os casos de adenomas e carcinomas a média de idade do grupo dos adenomas foi de 54 anos e a dos carcinomas de 62,5 anos. As características clínico-patológicas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 Características clinicopatológicas dos casos

Característica	N	%
Faixa etária (anos)		
< 40	10	15
41-59	21	32
60-79	31	48
>79	03	05
Sexo		
feminino	38	58
masculino	27	42
Localização		
reto	24	37
sigmóide	24	37
descendente	04	06
transverso	07	11
ascendente	01	01
ceco	05	08
Displasia		
baixo grau	22	73
Alto grau	08	27
Diferenciação*		
bem	10	28
moderado	17	49
pouco	08	23

* Carcinoma bem; moderadamente e pouco diferenciado.

O diâmetro dos adenomas variou de 3 até 40 mm, com média (DP) de 7,5 (4) mm para os adenomas tubulares e de 15,7 (9) mm para os vilosos.

Nos casos de adenocarcinomas as características patológicas observadas mostraram uma variação de diâmetro de 18 até 80mm com média (DP) de 47(13,2) mm, e a presença de muco foi observada em 12 casos (34%). O padrão infiltrativo das margens tumorais foi encontrado em 21 casos (60%) e o padrão expansivo em 14 casos (40%). Na avaliação do padrão microacinar nove casos mostraram-se positivos (26%). Já a presença de estroma fibrótico foi encontrada em apenas 4 (11%) casos. A classificação histológica de adenomas e carcinomas é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 Classificação histológica das lesões

Diagnóstico	Frequência	Percentual
Adenomas		
Vilosos	15	23
Tubulares	15	23
Carcinomas		
Dukes A	06	10
Dukes B	10	15
Dukes C	10	15
Dukes D	09	14
Padrão mucinoso		
presente	12	34
ausente	23	66
Padrão Microacinar		
presente	09	26
ausente	26	74
Padrão de Crescimento		
infiltrativo	21	60
expansivo	14	40
Padrão do Estroma		
fibrótico	04	11
não fibrótico	31	89

Dos 65 casos avaliados a proteína cox-2 foi encontrada em 35 (54%) casos; em dez (33%) adenomas e em 25 (71%) carcinomas (Tabela 3). Houve expressão progressiva e significativamente maior ($p=0,002$) nos carcinomas do que nos adenomas (Figura 2). Não houve diferença estatística entre lesões COX-2 positivas localizadas no reto 15 (43%) e lesões localizadas no cólon 20 (57%).

Tabela 3 Expressão detalhada da COX-2 à imunoistoquímica

Expressão da COX-2	Adenomas		Carcinomas			
	Tubular N (%)	Viloso N (%)	A N (%)	B N (%)	C N (%)	D N (%)
Positivo	04(27)	06(40)	04(66)	08(80)	06(60)	07(78)
Negativo	11(73)	09(60)	02(44)	02(20)	04(40)	02(22)

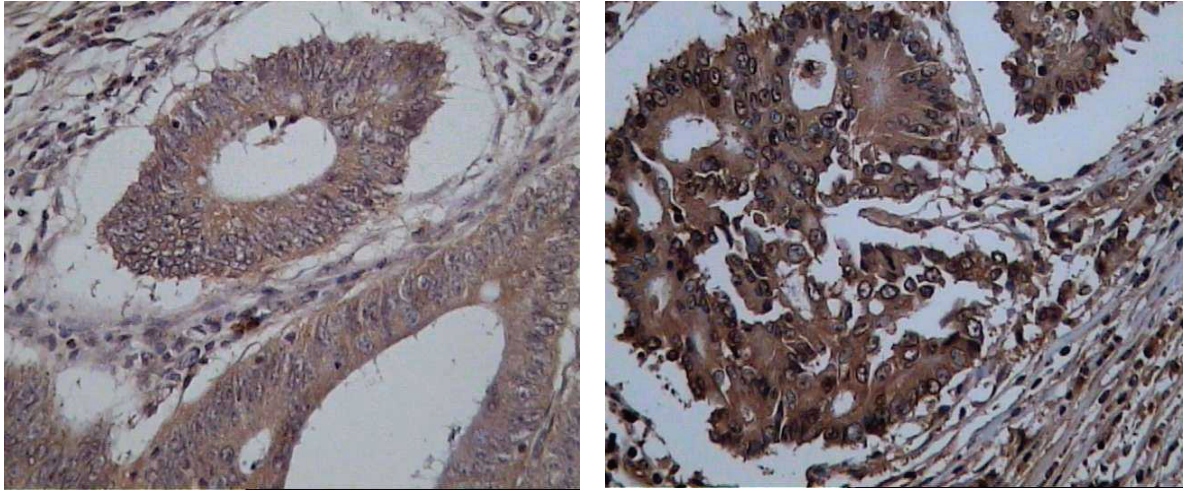


Figura 1: Caso ilustrativo de um adenoma de baixo grau (A) e um adenocarcinoma Dukes C (B) imunorreativos a cox-2 (IHC método ABC, 400X).

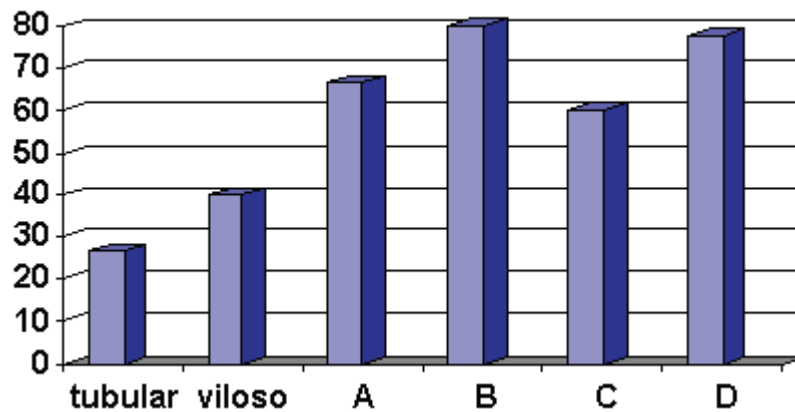


Figura 2: Expressão da COX-2 nas neoplasias avaliadas.

Quanto ao sexo não se evidenciou diferença estatística entre sexo masculino e o sexo feminino (43% vs 57%; NS), assim como na distribuição das faixas etárias não se encontrou diferença estatística (NS).

Ao avaliar-se a relação diâmetro da lesão com a positividade para a COX-2, uma vez classificados os grupos em diâmetros até 10 mm e mais de 10 mm, não se obteve diferenças entre os grupos em relação ao grau de displasia dos pólipos (32% vs 37%; NS).

Nos carcinomas as variáveis patológicas estudadas foram o grau de diferenciação, o caráter mucinoso da lesão, a forma de crescimento do tumor (infiltrativo ou expansivo), a presença de padrão micro-acinar e a presença de

estroma fibroso, sem no entanto, ter se observado diferenças significativas quanto a expressão da COX-2 em relação a estas variáveis. Estes resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 Características patológicas e expressão da COX-2

Característica	COX-2 Positivo N (%)	COX-2 Negativo N (%)
Diferenciação*		
bem	15 (75)	05 (25)
moderadamente	11 (65)	06 (35)
pouco	01 (13)	07 (87)
Padrão do estroma		
fibrótico	04 (100)	00 (0)
não fibrótico	21 (68)	10 (32)
Padrão Microacinar		
presente	06 (67)	03 (33)
ausente	19 (73)	07 (27)
Padrão de Crescimento		
infiltrativo	15 (71)	06 (29)
expansivo	10 (71)	04 (29)
Padrão Mucinoso		
presente	08 (67)	04 (33)
ausente	17 (74)	06 (26)

*Carcinoma bem, moderadamente e pouco diferenciado

Discussão

A identificação de parâmetros que reflitam o comportamento biológico do câncer correlacionando-o com a agressividade do tumor é determinante fundamental do prognóstico e do incremento da terapia oncológica. Apesar dos recentes progressos na definição dos mecanismos moleculares de desenvolvimento e progressão do câncer, somente alguns marcadores biológicos foram identificados como tendo valor prognóstico.

A literatura mostra vários estudos quanto ao valor da COX-2 como fator prognóstico das neoplasias. Ferrandina et al. demonstraram, no carcinoma de ovário, maior resistência à quimioterapia em tumores que expressavam COX-2 (12). Numa revisão empreendida por Singh-Ranger e Mokbel, os autores comentam as relações da COX-2 com o câncer de mama e concluíram que existe uma clara e

importante relação entre a carcinogênese mamária e a COX-2 e que os AINEs podem ter imenso valor quando usados em grupos específicos (13).

Quanto ao câncer colorretal, muitos trabalhos têm dado ênfase ao valor prognóstico da COX-2. Sheehan et al. observaram uma relação do grau de expressão da COX-2 com o estadiamento de Dukes, e com a sobrevida (14). Yamauchi et al. demonstram também relação da expressão da COX-2 com pior prognóstico e maior probabilidade de metástase hepática metacrônica (15). Masunaga et al. igualmente encontraram relação da expressão da COX-2 com o estadiamento de Dukes e maior número de linfonodos comprometidos, porém, em análise multivariada, estes fatores não demonstraram associação suficiente para terem valor prognóstico independente (16). Outro estudo que investigou a relação da expressão da COX-2 com o estadiamento foi o realizado por Zhang et al., não tendo os autores conseguido estabelecer relação da COX-2 com a sobrevida, mesmo sendo significativa a relação de expressão da COX-2 com o estadiamento de Dukes (17). No relato de Tomazawa et al., a COX-2 não se correlacionou com o estadiamento de Dukes, porém a recorrência tumoral, principalmente de metástases hematogênicas, e o intervalo livre de doença mostraram diferenças estatísticas (18). Em estudo de sobrevida realizado por Hull et al. em pacientes com metástase hepáticas submetidos a cirurgia, foi encontrada a presença de COX-2 em 100% dos casos, e o prognóstico não variou com o nível de expressão das lesões (19). Em carcinomas de reto, Petersen et al. demonstraram que a expressão da COX-2 não constitui fator prognóstico na recorrência local e na sobrevida (20). No presente estudo, não se estabeleceu relação entre a expressão da COX-2, a classificação de Dukes e parâmetros patológicos de mau prognóstico.

No estudo aqui apresentado, notou-se diferença significativa na expressão da COX-2 entre adenomas e carcinomas. Não se constatou, no entanto, diferença estatística entre os adenomas tubulares e vilosos, e tampouco entre os carcinomas em diferentes estágios. Na literatura, há diversos relatos usando diferentes métodos de avaliação de expressão da COX-2 e, conseqüentemente, com resultados conflitantes.

Segundo dados da literatura, a técnica de imunoistoquímica tem sido a mais empregada, com trabalhos que adotam as mais variadas abordagens. Neste estudo com o método da imunoistoquímica obteve-se positividade para COX-2 em 33% dos

adenomas e 71% dos carcinomas. Usando apenas carcinomas, resultados semelhantes foram encontrados por Yamauchi et al. que também mostraram uma expressão de COX-2 em 71% dos espécimes analisados (15). Por outro lado, Sheehan et al. apresentaram resultados de 100% de expressão, com variação de grau de acordo com o estágio da lesão (14). A mesma discordância em frequência pode ocorrer com os adenomas. Fujita (21) relatou expressão de 38% e, em outro estudo, Khan demonstrou a presença de 100% de expressão da COX-2 (22). Outro fator que dificulta a avaliação são os escores de positividade, que variam amplamente entre os autores. A maioria adota escores semiquantitativos baseados no percentual de células tumorais imunorreativas, os quais muitas vezes diferem entre os autores (14, 15, 22). Em nosso meio Jurach et al. encontraram pontos de corte apenas aos 10% quando avaliaram a positividade do p53 no prognóstico de tumores de reto (23). No presente estudo, consideraram-se positivos todos os casos que exibiam 10% das células epiteliais coradas, não se utilizando graduação para os mesmos.

Paralelamente a determinação da prevalência da expressão imunohistoquímica da COX-2, procurou-se identificar alguma associação dessa expressão com características clínico-patológicas do adenocarcinoma colorretal na amostra estudada. Na análise univariada, não foi constatada qualquer associação entre a expressão imunohistoquímica da proteína e parâmetros clínico-patológicos. Fatores como o caráter mucinoso, presença de estroma fibrótico, padrão microacinar e crescimento de caráter infiltrativo não diferiram estatisticamente na expressão da COX-2. Mostrou-se, porém, uma tendência, sem significância estatística, de os adenomas que expressam a COX-2 possuírem maior diâmetro, dado este que possui correspondência com trabalhos como o de Hasegawa et al., que demonstraram aumento na expressão da COX-2 relacionada com o diâmetro do adenoma estudado (24). Neste trabalho não se observou diferença na expressão imunohistoquímica da COX-2 em relação ao estadiamento segundo Dukes, o que difere dos resultados apresentados por Sheehan et al. (14), Yamauchi et al. (15). e Hull et al. (25), que verificaram aumento da expressão da proteína associado a um grau de pior prognóstico na classificação de Dukes.

Dimberg et al. (26) relataram diferença significativa na expressão da COX-2 entre neoplasias localizadas em cólon e reto. Os autores atribuem essa diferença à

natureza biológica diversa entre neoplasias de cólon e reto. Esse trabalho é contestado, sobretudo por Hull et al. (27), que referiram diversos estudos com valores de expressão homogênea entre cólon e reto. Este estudo, se concentrou na análise de casos de câncer colorretal esporádico e não foi encontrada diferença estatística entre as neoplasias do cólon e reto quanto à expressão da proteína COX-2.

Sinicrope et al. (28) avaliaram três grupos de câncer colorretal: o esporádico, o relacionado a polipose adenomatosa familiar e o câncer colorretal hereditário não polipóide. Os resultados mostraram diferença significativa em relação à presença da expressão da COX-2; nos portadores de câncer relacionado à polipose adenomatosa familiar a expressão da COX-2 foi de 100%, decaindo para 92% nos casos de câncer colorretal esporádico, e para apenas 67% nos de carcinoma colorretal hereditário não polipóide. Enfatiza-se o fato de todos os pacientes com câncer colorretal hereditário não polipóide possuírem instabilidade de microssatélites. A hipótese aventada por Sinicrope et al. é que mutações inativadoras no *gene TGF- β RII* poderiam diminuir a expressão da proteína COX-2. Porém o estudo dos casos de câncer colorretal hereditário não polipóide com mutações em *hMLH1* e *hMSH2* e mutações *RII* evidenciou não haver diferença significativa na presença ou não da expressão da proteína. Outro estudo que mostra a frequência baixa de COX-2 nas neoplasias colorretais foi realizado por Karnes et al. (29,30), segundo os quais 65% dos adenocarcinomas colorretais não expressaram COX-2. Essas neoplasias apresentavam instabilidade de microssatélites e ocorriam predominantemente no cólon direito. Esses dados se contrapõem aos de Shao et al. (31) que evidenciaram 100% de positividade em carcinomas de pacientes portadores de HNPCC e com mutações em *hMLH1* e *hMSH2*. Esses mesmos autores demonstraram também seus resultados com o TGF- β 1, onde o fator de crescimento foi encontrado em 100% das neoplasias com instabilidade de microssatélites além de o mesmo induzir a expressão da proteína COX-2 em cultura de células epiteliais intestinais de ratos.

Como alguns autores (4,30) sugerem que as neoplasias originadas das instabilidades de microssatélites possuem menor ligação com a COX-2, é possível inferir associação com os genes envolvidos da seqüência adenoma-carcinomas. Oshima et al. (11) apresentaram interessante pesquisa com ratos modificados para o

gene APC, onde demonstram a ausência de COX-2 em tecidos normais e sua presença em adenomas precoces. Os autores concluíram que a expressão do *gene COX-2* aumentava o número e o tamanho dos pólipos de forma dose-dependente em ratos mutados para o *gene APC* sugerindo-a como evidência genética direta de que a COX-2 exerce papel precoce na formação do pólipo. Outro estudo que corrobora a associação do *gene APC* com a COX-2 foi realizado por Yang et al. (32), onde os autores dosando os níveis de prostaglandinas em pólipos de pacientes diagnosticados com PAF mostraram que estes eram significativamente mais altos que a mucosa normal adjacente às lesões, indicando assim associação entre mutação do *gene APC* e aumento da atividade da COX-2. Em uma pequena série de casos, Dobbie et al. (33) avaliaram a relação do *gene APC* com a expressão da COX-2 em pacientes com PAF tratados com meloxicam. O uso dessa droga produziu aumento da expressão da COX-2 nos adenomas avaliados após 3 meses de tratamento juntamente com diminuição de expressão do *gene APC* com a não alteração dos genes *c-myc* e *ciclina D1*. Hsi et al. (34) realizaram estudo em linhagem de células do câncer colorretal HT-29 e introduziram o *gene APC* em seu tamanho original, neste experimento a apoptose foi restaurada após a transfeccção com o *gene APC*, demonstrando, desse modo, a relação de controle do *gene APC* com a COX-2.

Muitas pesquisas apontam para a importância da COX-2 na carcinogênese colorretal, embora a forma de sua participação ainda não esteja completamente compreendida. O estudo ora apresentado soma-se aos demais na evidência de que a COX-2 está presente em grande parte das neoplasias colorretais e provavelmente tenha função ativa na carcinogênese. Caberá a investigações posteriores mostrar o real valor da COX-2 não só como fator prognóstico nos carcinomas colorretais mas também como foco para a ação de agentes quimioproliféricos dessa neoplasia.

Bibliografia

01. LANDIS, S. H. et al. **Cancer Statistics**. 1999. CA Cancer J Clin 1999; 49: 8-31.
02. GIOVANNUCCI, E. et al. **Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenomas in male health professionals**. Ann Intern Med 1994; 121: 241-6.
03. SMALLEY, V. et al. **Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and incidence of colorectal cancer: A population-based study**. Arch Intern Med 1999; 159:161-6.
04. STURMER, T. et al. **Aspirin use and colorectal cancer: Post-trial follow-up data from the physician's health study**. Ann Intern Med 1998; 128: 713-20.
05. GIARDELLO, F.M. et al. **Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis**. N Engl J Med 1993; 328: 1313-6.
06. VANE, J.R; BOTTING, R.M. **Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs**. Am J Med 1998; 104: 2s-8s.
07. SMITH, W.L. **Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action**. Am J Physiol 1992; 263: F181-91.
08. RIGAS, B.; GOLDMAN, I.S.; LEVINE, L. **Altered eicosanoid level in human colon cancer**. J Lab Clin Med 1993; 122: 518-23.
09. WINDE, G. et al. **Complete reversion and prevention of rectal adenomas in colectomized patients with familial adenomatous polyposis by rectal low-dose sulindac maintenance treatment**. Dis Colon Rectum 1995; 38: 813-30.
10. PASRICHA, P.J. et al. **The effects of sulindac on colorectal proliferation and apoptosis in familial polyposis**. Gastroenterol 1995; 109: 995-8.
11. OSHIMA, M. et al. **Suppression of intestinal polyposis in APC Δ 716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2)**. Cell 1996; 87: 803-9.
12. FERRANDINA, G. et al. **Increased cyclooxygenase-2 (cox-2) expression is associated with chemotherapy resistance and outcome in ovarian cancer patients**. Ann Oncol 2002; 13: 1205-1.
13. SING-RANGER, G.; MOKBEL, K. **The role of cyclooxygenase-2 (cox-2) in breast cancer, and implications of cox-2 inhibition**. EJSO 2002; 28: 29-737.

14. SHEEHAN, K.M. et al. **The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer.** JAMA 1999; 282: 1254-7.
15. YAMAUCHI, T. et al. **Cyclooxygenase-2 expression as a new marker for patients with colorectal cancer.** Dis Colon Rectum 2002; 45: 98-113.
16. MASUNAGA, R. et al. **Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients.** Clin Cancer Res 2000; 6: 4064-68.
17. ZHANG, H.; SUN, X.F. **Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with advanced stages of colorectal cancer.** Am J Gastroenterol 2002; 97: 1037-41.
18. TOMOZAWA, S. et al. **Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumor recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer.** British J Cancer 2000; 83: 324-8.
19. HULL, M.A. et al. **Cyclooxygenase-2 expression in colorectal cancer liver metastases.** Clinical Experimental Metastasis. 2000; 18: 21-7.
20. PETERSEN, S. et al. **Cox-2 expression in rectal carcinoma: Immunohistochemical pattern and clinical outcome.** Anticancer Reserch 2002; 22: 1225-30.
21. FUJITA, M. et al. **Immunohistochemical expression of cyclooxygenase (cox)-2 in colorectal adenomas.** J gastroenterol 2000; 35: 488-90.
22. KHAN, K.N.M. et al. **Enhanced cyclooxygenase-2 expression in sporadic and familial adenomatous polyposis of the human colon.** Scand J Gastroenterol 2001; 36: 865-9.
23. JURACH, M.T. **Expressão do P53 e relação clínico-patológica no adenocarcinoma de reto: resultados preliminares.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de pós-graduação em medicina: cirurgia. 2003.
24. HASEGAWA, K; ICHIKAWA, W; FUJITA, T. **Expression of cyclooxygenase-2 (cox-2) mRNA in human colorectal adenomas.** Euro J Cancer 2001; 37: 1469-74.
25. HULL, M.A. et al. **Cyclooxygenase-2 expression in colorectal cancer liver metastases.** Clinical Experimental Metastasis. 2000; 18: 21-7.
26. DIMBERG, J. et al. **Differential expression of cyclooxygenase 2 in human colorectal cancer.** Gut 1999; 45: 730-2.
27. HULL, M.; LANGMAN, M. **Differential expression of cyclooxygenase 2 in human colorectal cancer.** Gut 2000; 47: 154-8.

28. SINICROPE, F.A. et al. **Reduced expression of cyclooxygenase 2 protein in hereditary nonpolyposis colorectal cancers relative to sporadic cancers.** *Gastroenterol* 1999; 117: 350-8.
29. KARNES, W.E. **Implications of low cox-2 expression in colorectal neoplasms with defective DNA mismatch repair.** *J Cell Biochem Suppl* 2000; 34: 23-7.
30. KARNES, W. E. et al. **Reduced cox-2 protein in colorectal cancer with defective mismatch repair.** *Cancer Res* 1998; 58: 5473-7.
31. SHAO, J. et al. **Coordinate regulation of cyclooxygenase-2 and TGF- β 1 in replication error-positive colon cancer and azoxymethane-induced rat colonic tumors.** *Carcinogenesis* 1999; 20: 185-91.
32. YANG, V.W. et al. **Size-dependent increase in prostanoid levels in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis.** *Cancer Res* 1998; 58: 1750-3.
33. DOBBIE, Z. et al. **Expression of cox-2 and wnt pathway genes in adenomas of familial polyposis patients treated with meloxicam.** *Anticancer Res* 2002; 22: 2215-20.
34. HSI, L.C.; ANGERMAN-STEWART, J.; ELING, T.E. **Introduction of full-length APC modulates cyclooxygenase-2 expression in HT-29 human colorectal carcinoma cells at the translational level.** *Carcinogenesis* 1999; 20: 2045-9.

ANEXO B - ARTIGO TRADUÇÃO

Immunohistochemical evaluation of cyclooxygenase-2 in colorectal neoplasias and relationship with pathological factors in prognosis

Eduardo Brambilla, Luis Fernando Moreira, Eduardo Pretto Serafini

Abstract

Objectives: To evaluate the prevalence of cyclooxygenase-2 (COX-2) in colorectal neoplasia and to establish the relationship with pathological factors in the prognosis of colorectal cancer. **Methods:** 65 colorectal neoplastic lesions were investigated by immunohistochemistry for the expression of COX-2, along with the pathological factors in prognosis and staging of lesions. **Results:** COX-2 was positively expressed in 27% of tubular adenomas, 40% of villous adenomas, and 70% of carcinomas. A statistically significant difference was observed between COX-2 expression in adenomas and carcinomas, but no such significance was seen between the other variables studied. **Conclusion:** COX-2 expression seems to correlate positively with the progression of neoplasias, yet with no influence on the pathological patterns of poor prognosis.

Key words: Cyclooxygenase-2; colorectal cancer; immunohistochemistry; carcinogenesis.

Introduction

Colorectal neoplasias are the third cause of death by cancer worldwide, and in the USA alone the illness accounts for 130,000 new cases of cancer and for about 56,000 deaths a year (1). Due to such high occurrence and mortality rates, considerable scientific importance has been given to investigation methods that broaden the horizons of early diagnosis, of disease staging, as well as of treatment and prophylaxis strategies. Epidemiological studies have demonstrated the lower occurrence of adenomas and carcinomas in individuals under chronic use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (2,3,4). Similarly, studies of familial adenomatous polyposis, a premalignant disease, have corroborated the drop in number and size of polyps in chronic users of NSAIDs (5).

NSAIDs act by inhibiting cyclooxygenase (COX). COX presents two isoforms that are derived from different genes and yet are structurally homologous by 60%.

COX-1 is constitutively expressed in tissues, while COX-2 is usually absent or but little expressed (6,7). COX-2 is induced by pro-inflammatory cytokines and growth factors, and is highly expressed in a number of neoplasias and colorectal lesions (8). Several experiments that evaluated the deletion of COX-2 gene or the selective inhibition of COX-2 have reported significantly decreased polyp growth rates along with a slow-down in tumor progression (9,10, 11).

However, doubts over the actual role played by COX-2 persist in the study of the progression of colorectal tumors. This research paper evaluated COX-2 expression at different progression stages of colorectal neoplasias and its correlation with established prognostic factors such as the type of tumoral growth, microacinar patterns, mucinous characteristics of the tumor, and presence of fibrotic stroma.

Material and methods

This study focused on the prevalence of pathologic characteristics of primary tumor occurrences whose outcome is the immunohistochemical expression of COX-2.

The study specimens comprised 35 cases of colonic or rectal adenocarcinomas, and 30 cases of adenomatous polyps in the same surgically or endoscopically resected specimens. Slides were prepared from surgical or endoscopic excisions contained in paraffin blocks.

This study included specimens with colonic or rectal adenocarcinoma or adenoma and excluded the following cases: a) neoplasias that were not diagnosed as adenoma or adenocarcinoma; b) other concomitant neoplasias and previous tumors; c) synchronous malignant or metachronic neoplasias in the large intestine; d) presence of intestinal inflammatory disease; e) presence of polyposis of any kind; f) family history of colonic or rectal neoplasias; g) use of adjuvant chemotherapy; and h) chronic use of NSAIDs.

The variables studied were: age and gender of patients; lesion site; histological status; production of mucus; infiltrative nature of lesions; aspect of the stroma; microacinar pattern; presence of lymphatic or distant metastases; and staging and immunohistochemical expression of COX-2. Data were collected from patient information forms, assessment of existing slides, choice of the most representative sections of each lesion, and histopathological assessment.

The surgical excisions from colorectal cancer patients and embedded in paraffin blocks underwent immunohistochemical evaluations using the anti-COX-2 monoclonal antibody (IgG, Dako Lab., New York, USA). The ABC method (avidin-biotin-peroxidase complex; LSAB DAKO kit, Dako Lab., New York, USA) was used to detect these antibodies in the tissues, as follows.

In order to ensure tissue adherence, silane coated slides were used. Paraffin blocks were melted in a stove at 37° C for 24h and at 56° C for 3h. After, sections were re-hydrated by placing the slides in 100% ethanol, 95% ethanol, 70% ethanol running, water and distilled water, for 5-min periods each. In order to carry out antigen recovery, slides were initially placed in citrate buffer (pH 6.0) and then transferred to a double-bath stove at 95° C for 40 min. Endogenous peroxidase was blocked by treating the slides with 5% hydrogen peroxide in ethanol for 20 min in a dark chamber. One repetition was carried out. Sections were circled using a Dako Pen (Dako Lab. Inc., New York, USA) and incubated in a dark and humid chamber for 16 h with the primary anti-COX-2 antibody (IBL, Guma, Japan) diluted to 1:50 in 1% bovine serum albumin (BSA). Next, slides were rinsed twice or thrice with SST for 5 min. Next, slides were incubated with the first antibody of the kit LSAB (Dako Lab. Inc., New York, USA) in humid chamber for 30 min. Slides were rinsed once again in SST for 5 min. Soon afterwards, slides were incubated with streptavidin from the kit LSAB in humid chamber for 30 min. diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) was added drop-by-drop on to the slides to stain the specimens. The staining procedure lasted 5 min and the reaction was stopped using distilled water. Subsequently, slides were incubated in Harris's hematoxylin for 5 min and then rinsed in running water. Finally, slides were dipped in a 20% ammonium hydroxide solution in distilled water, then rinsed again sequentially in running water, in alcohol and in xylol for ulterior mounting.

Slides and patient files were examined to confirm the original information concerning stage and diagnosis of the neoplasias. Adenomatous neoplasias were sorted under tubular and villous. As for carcinoma lesions, the Dukes staging system for colorectal cancer was used as modified by Astler-Coller. The ranking system received a new class, class D, to address the presence of distant metastases.

Based on the anatomopathologic information, adenocarcinoma cases were sorted under poorly, moderately, and well differentiated. In turn, adenomas were

sorted under low grade and high grade neoplasias. The presence of mucinous component, fibrotic stroma, microacinar pattern and tumor border invasiveness was also evaluated.

The immunohistochemical reaction for COX-2 produced a granular image of varied intensity in the brownish cytoplasm as stained with DAB. Cells were manually counted in microscope under 400 x magnification. Cases in which cell staining cut-off was 10% of the section were considered to express COX-2. The positive control used was a case of rectal adenocarcinoma retrieved from the Hospital Geral Pathology files. Negative controls were obtained from biopsy of normal mucosae stored in the Hospital Geral Pathology Laboratory. Slides were individually inspected by a pathologist experienced in immunohistochemical diagnosis.

Statistical analysis

The quantitative variables of the sample were statistically analyzed by the arithmetic mean, standard deviation, as well as maximum and minimum median values. The qualitative variables were evaluated by the same tests, where applicable.

The relationship between the immunohistochemical COX-2 expression and the variables sex, age, displasia site and severity, histological status, pathologic characteristics, and tumor staging were assessed by contingency tables. The percentages were calculated, and the prevalence ratio and confidence interval estimated.

The decision over the significance of the association between the qualitative variables was established by the chi-square test or Fisher's exact test, when appropriate, with $p < 0.05$ considered statistically significant.

The data processing and analysis were conducted with the SPSS software, version 12.0.

Results

The specimens evaluated in the present study were colonic and rectal neoplasias surgically or endoscopically excised from patients under medical follow-up and that met the inclusion criteria mentioned. Neoplasias were sorted as follows: 15 tubular adenomas, 15 villous adenomas, 6 adenocarcinomas ranked Dukes A, 10 adenocarcinomas ranked B, 10 carcinomas ranked C, and 9 adenocarcinomas

Dukes D. Considering the population of cancer patients, 27 (41.5%) patients were male and 38 (58.5%) female. Age varied between 23 and 91 yrs, with median 62 yrs and standard deviation (SD) 15 yrs. When adenoma cases were reckoned separately from carcinoma cases, average age for the groups was 54 yrs and 62.5 yrs, respectively. Clinical and pathological characteristics of patients and lesions are listed in Table 1.

For adenomas, diameter varied between 3 and 40 mm, with average 7.5 mm (SD= 4 mm) for tubular adenomas, and average 15.7 mm (SD= 9 mm) for villous adenomas.

For adenocarcinomas, diameter ranged from 18 to 80 mm, with average 47 mm (SD= 13.2 mm). Mucus was observed in 12 cases (34%). Infiltrative pattern exhibited by tumor border was observed in 21 cases (60%) and expansive pattern in 14 cases (40%). In the evaluation of microacinar pattern, 9 cases (26%) were positive. As for the presence of fibrotic stroma, the condition was observed in only 4 cases (11%). The histological classification of adenomas and carcinomas is shown in Table 2.

Out of the 65 cases examined, COX-2 was expressed in 35 (54%), distributed as follows: 10 (33%) adenomas and 25 (71%) carcinomas (71%) (Table 3). A progressive and significantly higher expression ($p=0.002$) was observed for adenocarcinomas as compared to adenomas (Figure 2). No statistically significant difference was observed between COX-2-positive neoplasias in the rectum ($n= 15$; 43%) and in the colon ($n=20$; 57%).

In terms of gender, no statistically significant difference was observed between specimens collected from male and female patients (43% versus 57%). The same result was seen between age groups.

When lesion diameter was analyzed in the light of COX-2 expression, sizes under and over 10 mm exhibited no statistical difference considering the stage of polyp displasia (32% versus 37%, respectively).

For carcinomas, the pathological variables studied were staging, mucinous character of the neoplasia, form of tumor growth (infiltrative or expansive), presence of microacinar pattern, and presence of fibrotic stroma. No statistical difference was observed between these variables and COX-2 expression. (Table 4)

Discussion

The identification of patterns that reflect the biological behavior of cancer and correlate the disease with tumor aggressiveness is a fundamental aspect in the prognosis of the disease and in oncologic treatment. In spite of the considerable progress so far made towards the definition of molecular mechanisms of the genesis and progression of cancers, only a few biological markers have been shown to uphold some prognostic worth.

The current literature is rich in reports on the role played by COX-2 in the prognosis of neoplasias. Ferrandina et al have demonstrated a higher resistance to chemotherapy by ovary carcinomas that expressed COX-2 (12). In a review by Singh-Ranger & Mokbel, the authors comment on the correlation between COX-2 and breast cancer, and concluded that there is a clear and important relationship between the breast carcinogenesis and the protein. Another conclusion arrived at in the same study mentions NSAIDs as being a valuable, effective class of drugs when case-specifically used (13).

In like manner, the prognostic worth of COX-2 in colorectal cancer has been the subject of many studies. Sheehan et al observed that there is a relationship between COX-2 expression and Dukes staging system, and with survival (14). Yamauchi et al likewise observed the correlation of COX-2 expression with a poor prognosis, and with a greater probability of metachronic hepatic metastasis to occur (15). Masunaga et al equally have correlated COX-2 expression and Dukes staging system, side by side with a higher number of compromised lymph nodes; nevertheless, when a multivariate analysis was carried out, these factors did not positively correlate to a degree that revealed an independent prognostic significance (16). In a study that also investigated the correlation between COX-2 and Dukes staging system carried out by Zhang et al, no relationship between COX-2 expression and survival was established, even though the positive correlation between COX-2 expression and Dukes staging system found was statistically significant (17). In a different way though, in the study by Tomazawa et al COX-2 did not correlate positively with Dukes staging system, but tumor recurrence – specially when hematogenic metastases are concerned – and the span during which the disease subsided have revealed a statistically significant difference with COX-2 expression (18). In a study of survival rate carried out by Hull et al with patients suffering hepatic metastases and who

underwent surgery, COX-2 was expressed in 100% of the cases examined, and prognosis did not vary with lesion staging (19). Interestingly, in a study of rectal carcinomas, Petersen et al demonstrated that COX-2 expression cannot be interpreted as a prognostic factor for local tumor recurrence and survival (20). In the present study, no correlation was observed between COX-2 expression, Dukes staging system, and poor prognosis parameters.

Considering carcinomas and adenocarcinomas, in the present study a statistically significant difference was observed for COX-2 expression between adenomas and carcinomas. Nevertheless, no statistically significant difference was observed between neither tubular and villous adenomas or carcinomas at different stages. Current literature has vastly reported studies in which different assessment methods for COX-2 expression are employed, with the consequent production of conflicting, contradictory results.

The literature also mentions immunohistochemical methods as the most commonly adopted to take in hand COX-2 expression in tumors, again under a variety of distinct approaches. In the present study the immunohistochemical technique revealed the expression of COX-2 in 33% of adenomas and in 71% of carcinomas. When carcinomas alone are considered, our results match the findings obtained by Yamauchi et al, who also revealed COX-2 expression in 71% of the specimens studied (15). On the other hand, Sheehan et al presented COX-2 expression in 100% of the specimens investigated, with expression figures correlating positively with lesion stage (14). Interestingly, the same discrepancy in occurrence can be observed for adenomas in different studies. Fujita (21) reported COX-2 expression in 38% of specimens studied, and in another study Khan observed COX-2 to be expressed in 100 % of the specimens studied (22). Another factor that makes the evaluation more difficult is the COX-2 expression scores, which diverge considerably between the different studies published. The majority of authors resorts to semi-quantitative scoring methodologies that are based on the percent immunoreactive tumor cells. These percent figures many a time differ from study to study (14, 15, 22). In the investigation of colorectal cancer, Jurach et al have come to cut-off limits of as little as 10% when assessing the positive detection of gene p53 in the prognosis of rectal tumors (23). In the present study, all cancer occurrences that

exhibited a 10% cut-off in stained epithelial cell counts were considered positive; yet no stage characterization was adopted.

Apart from the prevalence of immunohistochemical COX-2 expression, the present study concomitantly endeavored to identify some sort of relationship between the expression of the protein and clinical and pathological characteristics of colorectal cancers in the samples studied. The univariant analysis did not reveal any such correlation between the COX-2 immunohistochemical expression and the clinical and pathological parameters. Factors such as mucinous character of the lesion, presence of fibrotic stroma, microacinar pattern and tumor invasiveness did not differ statistically when these variables are compared for COX-2 expression. Nevertheless, a trend has been observed, though yet again lacking statistical significance, by adenomas that expresses COX-2 to be larger in size. This observation tallies with the findings by other studies such as that by Hasegawa et al, in which COX-2 expression and adenoma diameters were positively correlated (24). The present study did not observe any difference in the immunohistochemical expression of COX-2 in relation to tumor stage as defined by the Dukes staging system. This result disagrees with those reached by Sheehan et al (14), Yamauchi et al (15), and Hull et al (25). These researchers witnessed the increase in COX-2 expression to be directly associated with poor prognosis as defined by Dukes staging system.

Dimberg et al (26) reported a significant difference in COX-2 expression between colonic and rectal neoplasias. The authors impute this difference to the singularities in nature existing between the two cancer types. The results obtained in that study are contested specially by Hull et al (27), who mention several other studies that observed comparable, similar COX-2 expressions for colonic and rectal neoplasias. The present study focused on the analysis of sporadic colorectal cancer, and no statistical difference was found for COX-2 expression when colonic and rectal neoplasias are investigated separately.

Sinicrope et al (28) evaluated three groups of colorectal cancer: sporadic cancer; cancer related to familial adenomatous polyposis, and hereditary nonpolyposis colorectal cancer. The results showed a significant difference for COX-2 expression between the three cancer types. For patients suffering from cancer related to familial adenomatous polyposis, COX-2 expression was 100%, to come down to 92% in cases of sporadic colorectal cancer, and to only 67% in the cases of

hereditary nonpolyposis colorectal cancer. It is important to note that all patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer revealed microsatellite instability. The hypothesis raised by Sinicrope et al is that mutations that inactivate TGF- β RII gene may be able to reduce COX-2 expression. Nevertheless, the study of hereditary nonpolyposis colorectal cancer with mutations in hMLH1 and Hmsh2 and RII mutations has not revealed any significant difference between cases in which COX-2 is expressed or not. One other study that shows the low occurrence of COX-2 in colorectal neoplasias was carried out by Karnes et al (29, 30), and the results show that 65% of colorectal carcinomas did not express COX-2. These neoplasias exhibited microsatellite instability and occurred predominantly in the right colon. These data are contradicted by Shao et al (31), who revealed a 100% COX-2 occurrence in carcinomas of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer and hMLH1 and hMSH2 mutations. The authors also demonstrated the results obtained with TGF β 1, in which the growth factor was found in 100% of the neoplasias with microsatellite instability, and that the growth factor induces COX-2 expression in cultures of intestinal cells in mice.

As some authors (4,30) suggest that the neoplasias originated from microsatellite instability are more weakly related with COX-2 expression, it is possible to conjecture on an association with the genes involved in the adenoma-carcinoma sequence. Oshima et al (11) have arrived at interesting results for mice modified for the adenomatous polyposis coli APC tumor suppression gene, in a study that demonstrated the absence of COX-2 in normal tissues and its expression in early-stage carcinomas. The authors concluded that the expression of the COX-2 gene increased the number and size of polyps in a dose-dependent fashion, in mice mutated for APC gene, and suggested COX-2 expression as playing an initial role in polyp genesis. Another study that corroborates the association of APC gene and COX-2 was carried out by Yang et al (31), in which the authors measured different prostaglandin levels in polyps of patients diagnosed with familial adenomatous polyposis, and observed that these levels were significantly higher as compared to the normal mucosa adjacent to the lesions. This evinced the relationship between the mutation of APC gene and the increased COX-2 activity. In a study with a small number of cases, Dobbie et al (32) evaluated the relationship of APC gene and COX-2 expression in familial adenomatous polyposis patients treated with meloxicam. The

drug produced and increased COX-2 expression in adenomas examined after a 3-month treatment, alongside a decrease in the expression of APC gene, as genes c-myc and cyclin D1 were not altered. Hsi et al (33) carried out a study on HT-29 colorectal carcinoma cells and introduced the full-length APC gene. Apoptosis was restored after the transfection with APC gene, thus demonstrating the controlling relationship of APC gene towards COX-2.

As observed, many studies point to the importance of COX-2 expression in colorectal carcinogenesis, although the action mechanism has not yet been fully understood. The present study joins in the body of evidence that COX-2 is present in the majority of colorectal neoplasias and that the protein plays a likely role in carcinogenesis. Further investigations are nevertheless necessary to illustrate the actual importance of COX-2 not only as a factor of prognostic value in colorectal carcinoma, but also as a focal point to be addressed by chemo-prophylactic agents used to treat the neoplasia.

Table 1: Clinical and pathological characteristics of the colorectal neoplasia cases investigated

Characteristic	N	%
Age group (years)		
< 40	10	15
41-59	21	32
60-79	31	48
>79	03	05
Sex		
Male	38	58
Female	27	42
Tumor site		
Rectum	24	37
Sigmoid colon	24	37
Descending colon	04	06
Transverse colon	07	11
Ascending colon	01	01
Cecum	05	08
Displasia		
Low grade	22	73
High grade	08	27
Differentiation		
Well differentiated	10	28
Moderately differentiated	17	49
Poorly differentiated	08	23

Table 2: Histological classification of the neoplasias studied

Diagnosis	Occurrence	Percent
Adenomas		
Tubular	15	23
Villous	15	23
Carcinomas		
Dukes A	06	10
Dukes B	10	15
Dukes C	10	15
Dukes D	09	14
Mucinous pattern		
Present	12	34
Absent	23	66
Microacinar pattern		
Present	09	26
Absent	26	74
Growth pattern		
Infiltrative	21	60
Expansive	14	40
Stroma pattern		
Fibrotic	04	11
Non-fibrotic	31	89

Table 3: Detailed immunohistochemical COX-2 expression

COX-2 expression	Adenomas		Carcinomas			
	Tubular N (%)	Villous N (%)	A N (%)	B N (%)	C N (%)	D N (%)
Positive	04(27)	06(40)	04(66)	08(80)	06(60)	07(78)
Negative	11(73)	09(60)	02(44)	02(20)	04(40)	02(22)

Figure 1: Illustration showing a low-grade adenoma (A) and a grade-C adenocarcinoma (B) according to the Dukes tumor staging system that reacted positively for COX-2 expression in the immunohistochemical analysis (IHC ABC method, 400 x magnification).

Figure 2: COX-2 expression in the colorectal neoplasias investigated.

Table 4: Pathologic characteristics of the COX-2 expression in the colorectal neoplasias investigated.

Characteristic	COX-2 Positive N (%)	COX-2 Negative N (%)
Stroma pattern		
Fibrotic	04 (100)	00 (0)
Non-fibrotic	21 (68)	10 (32)
Microacinar pattern		
Present	06 (67)	03 (33)
Absent	19 (73)	07 (27)
Growth pattern		
Infiltrative	15 (71)	06 (29)
Expansive	10 (71)	04 (29)
Mucinous pattern		
Present	08 (67)	04 (33)
Absent	17 (74)	06 (26)

Acknowledgements

References

01. LANDIS, S.H. et al. **Cancer Statistics**, 1999. CA Cancer J Clin 1999; 49: 8-31.

02. GIOVANNUCCI, E. et al. **Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenomas in male health professionals.** Ann Intern Med 1994; 121: 241-6.
03. SMALLEY, V. et al. **Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and incidence of colorectal cancer: A population-based study.** Arch Intern Med 1999; 159:161-6.
04. STURMER, T. et al. **Aspirin use and colorectal cancer: Post-trial follow-up data from the physician's health study.** Ann Intern Med 1998; 128: 713-20.
05. GIARDELLO, F.M. et al. **Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis.** N Engl J Med 1993; 328: 1313-6.
06. VANE, J.R.; BOTTING, R.M. **Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.** Am J Med 1998; 104: 2s-8s.
07. SMITH, W.L. **Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action.** Am J Physiol 1992; 263: F181-91.
08. RIGAS, B.; GOLDMAN, I.S.; LEVINE, L. **Altered eicosanoid level in human colon cancer.** J Lab Clin Med 1993; 122: 518-23.
09. WINDE, G. et al. **Complete reversion and prevention of rectal adenomas in colectomized patients with familial adenomatous polyposis by rectal low-dose sulindac maintenance treatment.** Dis Colon Rectum 1995; 38: 813-30.
10. PASRICHA, P.J. et al. **The effects of sulindac on colorectal proliferation and apoptosis in familial polyposis.** Gastroenterol 1995; 109: 995-8.
11. OSHIMA, M. et al. **Suppression of intestinal polyposis in APC Δ 716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2).** Cell 1996; 87: 803-9.
12. FERRANDINA, G. et al. **Increased cyclooxygenase-2 (cox-2) expression is associated with chemotherapy resistance and outcome in ovarian cancer patients.** Ann Oncol 2002; 13: 1205-1.
13. SING-RANGER, G.; MOKBEL, K. **The role of cyclooxygenase-2 (cox-2) in breast cancer, and implications of cox-2 inhibition.** EJSO 2002; 28: 29-737.

14. SHEEHAN, K.M. et al. **The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer.** JAMA 1999; 282: 1254-7.
15. YAMAUCHI, T. et al. **Cyclooxygenase-2 expression as a new marker for patients with colorectal cancer.** Dis Colon Rectum 2002; 45: 98-113.
16. MASUNAGA, R. et al. **Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients.** Clin Cancer Res 2000; 6: 4064-68.
17. ZHANG, H.; SUN, X.F. **Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with advanced stages of colorectal cancer.** Am J Gastroenterol 2002; 97: 1037-41.
18. TOMOZAWA, S. et al. **Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumor recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer.** British J Cancer 2000; 83: 324-8.
19. HULL, M.A. et al. **Cyclooxygenase-2 expression in colorectal cancer liver metastases.** Clinical Experimental Metastasis. 2000; 18: 21-7.
20. PETERSEN, S. et al. **Cox-2 expression in rectal carcinoma: Immunohistochemical pattern and clinical outcome.** Anticancer Reserch 2002; 22: 1225-30.
21. FUJITA, M. et al. **Immunohistochemical expression of cyclooxygenase (cox)-2 in colorectal adenomas.** J gastroenterol 2000; 35: 488-90.
22. KHAN, K.N.M. et al. **Enhanced cyclooxygenase-2 expression in sporadic and familial adenomatous polyposis of the human colon.** Scand J Gastroenterol 2001; 36: 865-9.
23. JURACH, M.T. **Expressão do P53 e relação clínico-patológica no adenocarcinoma de reto: resultados preliminares.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de pós-graduação em medicina: cirurgia. 2003.
24. HASEGAWA, K.; ICHIKAWA, W.; FUJITA, T. **Expression of cyclooxygenase-2 (cox-2) mRNA in human colorectal adenomas.** Euro J Cancer 2001; 37: 1469-74.

25. HULL, M.A. et al. **Cyclooxygenase-2 expression in colorectal cancer liver metastases.** *Clinical Experimental Metastasis*. 2000; 18: 21-7.
26. DIMBERG, J. et al. **Differential expression of cyclooxygenase 2 in human colorectal cancer.** *Gut* 1999; 45: 730-2.
27. HULL, M.; LANGMAN, M. **Differential expression of cyclooxygenase 2 in human colorectal cancer.** *Gut* 2000; 47: 154-8.
28. SINICROPE, F.A. et al. **Reduced expression of cyclooxygenase 2 protein in hereditary nonpolyposis colorectal cancers relative to sporadic cancers.** *Gastroenterol* 1999; 117: 350-8.
29. KARNES, W.E. **Implications of low cox-2 expression in colorectal neoplasms with defective DNA mismatch repair.** *J Cell Biochem Suppl* 2000; 34: 23-7.
30. KARNES, W.E. et al. **Reduced cox-2 protein in colorectal cancer with defective mismatch repair.** *Cancer Res* 1998; 58: 5473-7.
31. SHAO, J. et al. **Coordinate regulation of cyclooxygenase-2 and TGF- β 1 in replication error-positive colon cancer and azoxymethane-induced rat colonic tumors.** *Carcinogenesis* 1999; 20: 185-91.
32. YANG, V.W. et al. **Size-dependent increase in prostanoid levels in adenomas of patients with familial adenomatous polyposis.** *Cancer Res* 1998; 58: 1750-3.
33. DOBBIE, Z. et al. **Expression of cox-2 and wnt pathway genes in adenomas of familial polyposis patients treated with meloxicam.** *Anticancer Res* 2002; 22: 2215-20.
34. HSI, L.C.; ANGERMAN-STEWART, J.; ELING, T.E. **Introduction of full-length APC modulates cyclooxygenase-2 expression in HT-29 human colorectal carcinoma cells at the translational level.** *Carcinogenesis* 1999; 20: 2045-9.