

ESCOLA DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

JULIANA LORENZONI ALTHOFF

**EXPRESSÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO DA FAMÍLIA ETS: PDEF NO  
CÂNCER COLO-RETAL IDENTIFICADO ATRAVÉS DE IMUNOHISTOQUÍMICA**

Porto Alegre  
2009

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA MÉDICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EXPRESSÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO DA FAMÍLIA ETS: PDEF NO CÂNCER COLO-RETAL  
IDENTIFICADO ATRAVÉS DE IMUNOHISTOQUÍMICA

JULIANA LORENZONI ALTHOFF

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Garicochea

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do Grau de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2009.

O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,  
mas na intensidade com que acontecem.  
Por isso existem momentos inesquecíveis,  
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".

(Fernando Pessoa)

## AGRADECIMENTOS

Durante o período de execução deste trabalho, pude contar com o auxílio de inúmeras pessoas que me ajudaram nesta tarefa que chega ao seu fim. Com algumas o contato foi intenso, diário; com outras apenas conversas rápidas, mas todas, de sua maneira, me ajudaram a realizar este projeto de muito valor pessoal e profissional.

Deste modo, gostaria de agradecer:

Ao Prof. Dr. Bernardo Garicochea, meu orientador, pelo incentivo, dedicação, confiança e carinho. Agradeço os ensinamentos e a oportunidade oferecida;

Ao Prof. Dr. Vinícius Duval da Silva, que mesmo com seus inúmeros afazeres, disponibilizou seu tempo para realizar a análise imunoistoquímica de meu trabalho; Ao Prof. Eraldo L. Batista Jr. que cedeu seu manuscrito, ainda em análise para publicação, para comparação com meus dados;

Ao Prof. Dr. Mario Wagner, pela importante colaboração na análise estatística;

Ao bioquímico Tiago Giuliani pela simpatia, bom humor e competência profissional;

A Silvana Lunardini Alves pela amizade, empenho e tranquilidade que me transmitiu nos momentos de pessimismo;

Aos alunos do curso de medicina: doutoranda Raquel Breunig que me auxiliou nas revisões dos prontuários dos pacientes. Aos alunos Felipe Loss, Mateus Chissini Paganella e Rafael Costa e Campo que pelos seus conhecimentos em computação me ajudaram na quantificação por imagem dos marcadores. Com esta equipe aprendi que forças individuais se multiplicam quando integradas.

Aos funcionários da pós-graduação, que sempre me atenderam de forma educada e agradável mesmo que, por muitas vezes, as perguntas se repetissem.

As funcionárias da Biblioteca, em especial a Letícia Fernandes que não mediu esforços para encontrar os artigos por mim solicitados;

Aos meus colegas médicos e aos funcionários da clínica onde trabalho, CLION, por entenderem minhas ausências e por cuidar de meus pacientes de forma tão respeitosa;

A minha mãe, Tânia e ao seu namorado Jorge Henrique por nunca duvidarem de que este projeto pudesse ser realizado. Dedico esta dissertação, em especial, a minha mãe, minha melhor amiga e colega de trabalho, pelo carinho, dedicação e exemplo de ética profissional;

Ao meu pai Augusto e a sua esposa Angelita pelo ensinamento de que é possível, em qualquer idade, cursar a Faculdade pela segunda vez e realizar sonhos antigos;

Ao meu irmão Matheus e a sua namorada Patrícia, pelo carinho e interesse demonstrados;

Ao meu namorado Kleber, meu companheiro, amigo, confidente; por sua alegria, espontaneidade e amor. Obrigada por podermos crescer e aprender com a vida juntos, nos tornando melhores oncologistas a cada dia.

Aos pacientes e a suas famílias pela confiança em meu trabalho e pelos ensinamentos diários.

## RESUMO

**Base teórica:** O câncer colorretal é a terceira neoplasia mais freqüente no mundo ocidental com taxas de mortalidade ainda consideradas altas. A progressão do tecido epitelial do cólon normal até o estágio de neoplasia invasiva é acompanhada de uma série de processos celulares chamados carcinogênese que, ao fim, convergem para o potencial de migração celular e metastatização. As vias metabólicas da família dos genes Ets (E26 - sequência específica de transcrição), identificada em uma grande diversidade de espécies, contribuem neste processo, ativando ou reprimindo transcrições de DNA. Em especial o fator derivado prostático (PDEF) cujo prognóstico e mecanismo de ação relacionado ao câncer colorretal, até o momento, não está claramente elucidado.

**Métodos:** Uma coorte retrospectiva de pacientes com carcinoma colorretal estágios de I a III, diagnosticados e tratados na mesma instituição de 2002 a 2008, foi estudada. As características histológicas e clínicas, bem como os dados de evolução e a sobrevida foram revisados. A análise de imunistoquímica com método de matriz de amostras teciduais (TMA) e a quantificação por captura de imagem foram realizadas em blocos representativos do tumor com anticorpos para detecção da expressão da proteína PDEF e Ki-67. Os objetivos eram detectar a prevalência da expressão da proteína PDEF e sua correlação com fatores prognósticos nesta população.

**Resultados:** A amostra foi constituída de 46 pacientes e tempo de seguimento mediano de 23,2 meses. Houve tendência a perda da proteína PDEF conforme o estadiamento dos pacientes sendo a expressão de 30,3%, 25,8% e 14,7% nos estágios I, II e III, respectivamente,  $P=0,416$ . Não encontrou-se associação significativa entre os achados clínico-patológicos, a dosagem do marcador de proliferação celular Ki-67 e a sobrevida global dos pacientes com a perda da expressão da proteína PDEF.

**Conclusões:** Os resultados sugerem que a proteína PDEF, membro da família Ets, atue como gene repressor da carcinogênese do câncer colorretal. A análise de sua expressão pode se tornar um interessante marcador prognóstico e alvo terapêutico. São necessários novos estudos com amostras maiores e tempo de seguimento mais longo a fim de validar estes achados.

**Palavras-chave:** câncer colorretal. Família Ets. PDEF. Imunoistoquímica.

## ABSTRACT

**Background:** The colon-rectal cancer is the third most frequent neoplasia in the western world with the highest mortality rates. The progression of normal colon tissue to invasiveness neoplasia is followed by several processes called carcinogenesis. Afterwards it converges to the cellular migration and metastasis of the tissue. The metabolic ways of the E26 (Ets) transcription factors, identified in a great variety of species, contribute in this process, by activating or repressing the DNA transcription. Specially, the prostate-derived Ets factor (PDEF) which prognosis and cancer colon-rectal relation action is not completely elucidating at the moment.

**Methods:** A retrospective cohort of patients with pathologic stage I – III colon-rectal cancer, diagnosed and treated in the same institution between 2002 and 2008, was studied. Histological and clinical features as well as clinical outcomes and survival were reviewed. The tissue microarrays (TMA), immunohistochemical analysis and image capture quantification were carried out in representative blocks of tumor with antibodies for the detection of the PDEF expression and Ki-67. The endpoints were to determine the prevalence of the PDEF protein expression and its correlation with these population's prognostic factors.

**Results:** The sample was constituted 46 patients and the median follow-up was 23,2 months. There was a trend towards loss of PDEF protein expression according to the patients' clinical stage. PDEF expression values were 30,3%, 25,8% and 14,7% in stages I, II and III, respectively. There was not a significant correlation with the loss of PDEF protein expression and the clinical and pathological characteristics along with the proportion of Ki-67 proliferative marker and the patient's global survival.

**Conclusions:** These results suggest that the PDEF protein, member of the Ets family, act as a repression gene of cancer colon-rectal carcinogenesis. The PDEF expression analysis can be an interesting prognostic marker and a therapeutic target. New studies with more patients and a long follow-up are necessary to validate these results.

**Keywords:** colon-rectal cancer, Ets family, PDEF, immunohistochemistry

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representação espacial da taxa de incidência de câncer colorretal por 100.000 homens, estimadas para o ano de 2008.....	17
<b>Figura 2</b> – Representação espacial da taxa de incidência de câncer colorretal por 100.000 mulheres, estimadas para o ano de 2008.....	17
<b>Figura 3</b> – O papel das mutações no desenvolvimento da neoplasia.....	22
<b>Figura 4</b> - Modelo futuro para determinar a melhor escolha de tratamento adjuvante para cada paciente.....	28
<b>Figura 5</b> – Estruturas proteicas e distribuição dos principais fatores de transcrição ETS.....	31
<b>Figura 6</b> – Intensidade de expressão relativa a 8 genes da família de gene ETS em tecido normal e neoplásico.....	35
<b>Figura 7</b> – Blocos de parafina e TMA.....	40
<b>Figura 8</b> – Coloração hematoxilina/eosina (HE).....	46
<b>Figura 9</b> – Expressão elevada, por imunohistoquímica, do Ki-67.....	47
<b>Figura 10</b> – Expressão baixa, por imunohistoquímica, do Ki-67.....	47
<b>Figura 11</b> - Expressão elevada, por imunohistoquímica, da proteína PDEF.....	48
<b>Figura 12</b> - Expressão baixa, por imunohistoquímica, da proteína PDEF.....	48
<b>Figura 13</b> - Distribuição de frequências da expressão da positividade do PDEF.....	50
<b>Figura 14</b> - Comparação da expressão da positividade do PDEF segundo TNM.....	51
<b>Figura 15</b> - Comparação de curvas de Kaplan-Meier para ocorrência de óbito entre os grupos de alta e baixa expressão da positividade do PDEF.....	52



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Estimativas para o ano de 2008 de número de casos novos de câncer por Região.....	16
<b>Tabela 2</b> – Estimativas para o ano de 2008 das taxas brutas de incidência por 100.000 habitantes e de número de casos novos por câncer, em homens, segundo localização primária.....	18
<b>Tabela 3</b> – Estimativas para o ano de 2008 das taxas brutas de incidência por 100.000 habitantes e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária.....	18
<b>Tabela 4</b> – Incidência de positividade para instabilidade de microssatélites em séries de câncer colorretal esporádico.....	23
<b>Tabela 5</b> – Análise da sobrevida em portadores de câncer colorretais com ou sem instabilidade de microssatélites.....	24
<b>Tabela 6</b> – Estimativa da SLD em 5 anos com cirurgia associada a quimioterapia adjuvante.....	26
<b>Tabela 7</b> - Lista dos genes Ets identificados.....	29
<b>Tabela 8</b> - Redução da expressão da proteína PDEF no câncer de mama in vivo.....	32
<b>Tabela 9</b> – Descrição das características clínico-patológicas dos pacientes com câncer colorretal.....	45
<b>Tabela 10</b> – Comparação dos grupos de baixa positividade (<24%) e alta positividade (≥24%) do PDEF.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

CCR	Câncer colorretal
INCA	Instituto Nacional do Câncer
FAP	Polipose Adenomatosa Familiar
FJP	Polipose Adenomatosa Juvenil
HNPCC	Câncer de Cólon Polipóide Não Familiar
APC	Adenomatosis Polyposis of the Colon
DCC	Deleted in Colorectal Carcinoma
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
P53	Tumor protein p53
MSI	Instabilidade de microssatélite
ASCO	Associação Americana de Oncologia Clínica
TNM	Tumor, Linfonodo, Metástase
SLD	Sobrevida livre de doença
SG	Sobrevida global
HR	Harzard Ratios
IC	Intervalo de confiança
NSABP	Nacional Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
MOF	semustina/vincristina/5FU
5FU	5-Fluorouracil
LV	Leucovorin
NCCTG	North Central Cancer Treatment Group
IMPACT Trials	International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer
FOLFOX	Associação 5FU/LV em infusão contínua e oxaliplatina

MOSAIC	Multicenter International Study of Oxaliplatin/5FU/LV in Adjuvant Treatment of Colon Cancer
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
Ets	E-twenty-six – seqüência específica de transcrição
PNT	Point Domain
PDEF	Fator Derivado Prostático
CP-BMF	Centro de Pesquisas Biológicas e Funcionais
IPB	Instituto de Pesquisas Biomédicas
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PCR	Reação de Cadeia de Polimerase
TMA	Técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais
CEA	Antígeno Carcino-embriônico
DP	Desvio Padrão

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1 – Epidemiologia do câncer colorretal.....	15
2.2 – Carcinogênese do câncer colorretal.....	20
2.3 – Tratamento adjuvante no câncer colorretal.....	24
2.4 – Genes Ets.....	29
2.5 – Estrutura da Família Ets.....	30
2.6 – PDEF .....	31
2.7 – Ets e câncer.....	32
3 – OBJETIVOS.....	37
4 – PACIENTES E MÉTODOS.....	37
4.1 – Delineamento.....	37
4.2 – Amostra.....	37
4.3 – Critérios de inclusão.....	38
4.4 – Critérios de exclusão.....	39
4.5 – Amostras tumorais e imunoistoquímica.....	39
4.6 – Análise estatística.....	42
5 – RESULTADOS.....	43
5.1 – Caracterização da amostra.....	43
5.2 – Análise HE.....	45
5.3 – Expressão do Ki-67.....	46
5.4 – Expressão do PDEF.....	47
5.5 – Expressão do PDEF e achados clínicos-patológicos.....	49
5.6 – Expressão do PDEF e sobrevida.....	51
6 – DISCUSSÃO.....	53
7 – CONCLUSÕES.....	58
8 – REFERÊNCIAS.....	59
9 – SUBMISSÃO (COVER LETTER).....	65
10 – ARTIGO .....	66

## 1 - INTRODUÇÃO

O câncer colorretal é, atualmente, a terceira neoplasia mais freqüente em diversas regiões do mundo ocidental, incluindo o Brasil. Apesar de altamente curável em estágios iniciais, a câncer de cólon, tem impacto negativo nas taxas de morbidade e mortalidade dos pacientes quando comparados a pessoas saudáveis da mesma faixa etária. Após os 50 anos, a mortalidade dos pacientes com câncer colorretal (CCR) situa-se apenas atrás do câncer de pulmão, mama (nas mulheres) e próstata (nos homens).

O prognóstico dos pacientes com CCR é baseado na classificação TNM, incluindo profundidade de invasão e presença de linfonodos metastáticos. Estes parâmetros podem ser determinados por microscopia do tecido neoplásico e dos linfonodos. Entretanto, sabe-se hoje que apenas o exame histopatológico da neoplasia de cólon é pouco para definir o prognóstico com exatidão. A ocorrência e a progressão desta neoplasia envolve uma série de eventos genéticos que afetam a estrutura e/ou a expressão de inúmeros oncogenes e fatores de crescimento.

O tratamento adjuvante do CCR nos estágios II e III está estabelecido por diversos estudos desde a década de 80. O benefício é claro em sobrevida livre de doença e sobrevida global nos pacientes estágio III. Nos pacientes estágio II os estudos não demonstram significância estatística principalmente em sobrevida global. Porém, na prática clínica, a maioria dos oncologistas já discute com o paciente a sua indicação. A Associação Americana de Oncologia (ASCO) recomenda seu uso para o CCR de alto risco, baseado em achados clínicos e anatomopatológicos. Até o momento, o perfil molecular não é utilizado.

Assim, cada vez mais, pesquisa-se visando o descobrimento de novos alvos prognósticos e terapêuticos bem como de biomarcadores cujo objetivo é de predizer que droga será a mais apropriada para o tratamento de cada tipo específico de neoplasia.

A tecnologia de análise da expressão gênica tornou-se uma ferramenta importantíssima na busca de novos potenciais alvos e para a validação clínica destes achados. Sob este

aspecto, os fatores de transcrição com domínio ETS fazem parte de um grupo de genes que regulam diversos eventos biológicos incluindo proliferação, diferenciação e invasão celular. Suas expressões de forma, quantidade e subtipos diferentes, nos diversos tecidos tumorais, tornam a família ETS um desafio para o claro entendimento de seu papel na carcinogênese.

## 2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 – EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal (CCR) é um dos tumores malignos mais frequentes no mundo ocidental. Sua incidência mundial varia entre 3,4 a 35,8 casos a cada 100.000 habitantes. Situa-se em terceiro lugar entre as neoplasias mais comuns em ambos os sexos, sendo a segunda neoplasia em países desenvolvidos(1,4). Globalmente, aproximadamente 800.000 novos casos de câncer colo-retal são esperados a cada ano, sendo a mortalidade em torno de 450.000(2).

A prevalência de diagnóstico do CCR na população acima de 50 anos fora de rastreamento é de 0,5% a 2% de carcinoma invasivo e de 1% a 1,6% de detecção de carcinoma in situ(3). Após o câncer de pulmão, mama (nas mulheres) e próstata (nos homens), o CCR é a causa mais comum de mortes por doença maligna no mundo ocidental. Quanto a variação geográfica há uma menor incidência em países da África como Gambia e Argélia e maior incidência na população nativa do Alasca. O adenocarcinoma colorretal representa mais de 90% dos tumores malignos que acomete o intestino.

Há uma queda na incidência e na mortalidade desta neoplasia nos EUA na última década. As hipóteses para esta redução estão principalmente relacionadas as modificações dietéticas, ambientais e a disseminação de exames de rastreamento como: colonoscopia, retossigmoidoscopia e pesquisa de sangue oculto(1,5,14).

No Brasil, conforme os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) o número de casos novos de CCR esperado para o ano de 2008 é 12.490 casos em homens e 14.500 em mulheres. Estes valores refletem um risco de 13 novos casos a cada 100 mil homens e 15 casos a cada 100 mil mulheres. O CCR é, na maioria dos Estados brasileiros, excetuando-se os tumores de pele não melanoma, a terceira neoplasia mais frequente. Diferente disto, vimos na região Sudeste o tumor colorretal ocupando o segundo lugar em incidência, tanto em

homens quanto mulheres atrás apenas dos tumores de próstata e mama, respectivamente. O câncer de pulmão, nesta região, aparece em terceiro lugar.

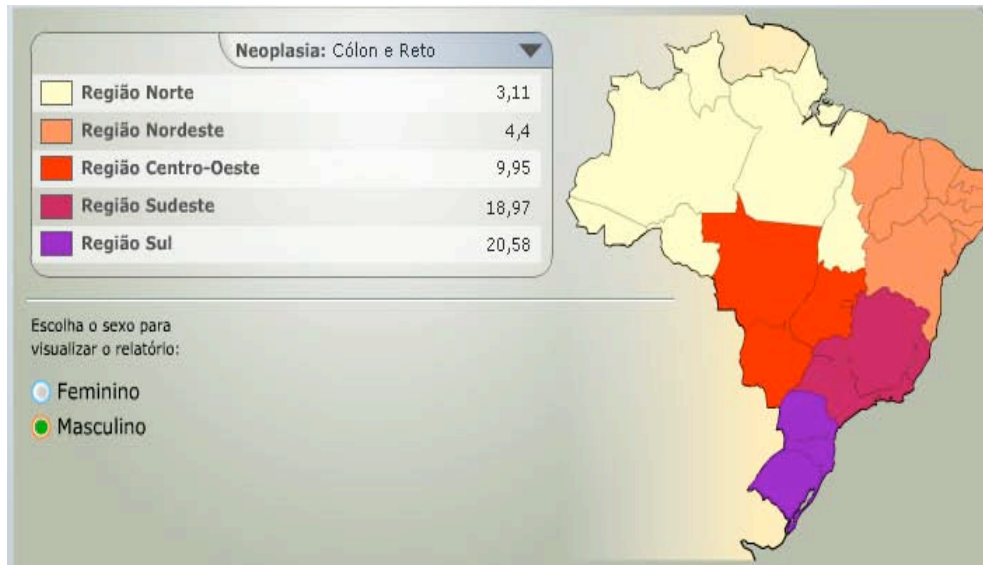
Importante, também, são os dados da região Norte e Nordeste onde o CCR se encontra atrás das neoplasias de colo do útero e estômago. Provavelmente esta diferença se deva a baixa condição socio-econômica local e erros estatísticos devido a não notificação (Tabela 1).

Localização Primária	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sul	Sudeste
Mama Feminina	1.210	7.630	2.630	9.500	28.430
Traquéia, Brônquio e Pulmão	1.020	3.630	1.690	7.210	13.720
Estômago	1.200	3.840	1.250	4.360	11.150
Próstata	1.750	9.820	3.200	9.500	25.260
Colo do Útero	1.700	4.720	1.350	3.470	7.440
Cólon e Reto	550	2.680	1.430	5.950	16.380
Esôfago	230	1.360	560	3.110	5.290
Leucemias	530	1.900	650	1.820	4.640
Cavidade Oral	400	2.500	750	2.500	8.010
Pele Melanoma	150	450	250	1.950	3.120
Outras Localizações	4.550	14.190	7.260	27.270	64.610
<b>Subtotal</b>	<b>13.290</b>	<b>52.720</b>	<b>21.020</b>	<b>76.640</b>	<b>188.050</b>
Pele não Melanoma	4.330	26.240	7.490	22.940	54.010
<b>TOTAL</b>	<b>17.620</b>	<b>78.960</b>	<b>28.510</b>	<b>99.580</b>	<b>242.060</b>

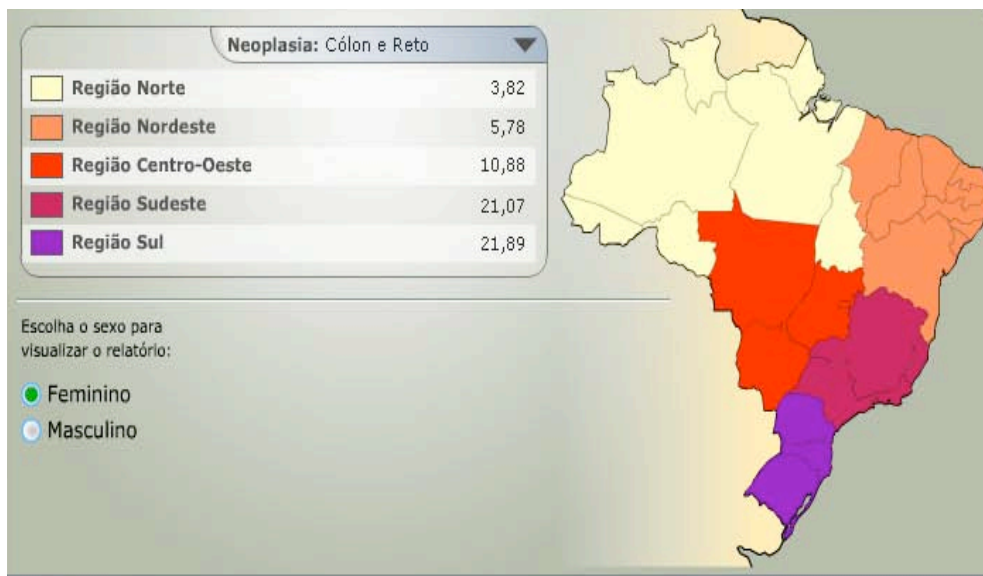
**TABELA 1** – Estimativas para o ano de 2008 de número de casos novos de câncer por Região, números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Na análise isolada do CCR no Brasil, observa-se uma incidência em torno de 20 casos novos para cada 100 mil habitantes ficando a região Sul em primeiro lugar. Em último, novamente, aparece a região Norte com taxas em torno de 5% (Figuras 1,2).





**FIGURA 1** – Representação espacial da taxa de incidência de câncer colorretal por 100.000 homens, estimadas para o ano de 2008.



**FIGURA 2** – Representação espacial da taxa de incidência de câncer colorretal por 100.000 mulheres, estimadas para o ano de 2008.

Dados do Rio Grande do Sul, em especial da capital Porto Alegre trazem o CCR em quarto lugar entre os homens atrás do câncer de próstata, pulmão e estômago com um total de 310 novos casos a cada 100 mil habitantes, isto é, uma taxa bruta de 43,47. Já nas mulheres porto-alegrenses o CCR é o terceiro em prevalência, atrás das neoplasias de mama e colo

uterino. Estimou-se para 2008, 360 novos casos de CCR por 100 mil mulheres com taxa bruta de 44,97. O CCR no Rio Grande do Sul tem uma discreta prevalência em mulheres (Tabelas 2 e 3).

Homens				
Localização Primária Neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	4.430	80,63	730	103,95
Traquéia, Brônquio e Pulmão	2.770	50,46	380	54,30
Estômago	1.020	18,66	130	18,77
Cólon e Reto	1.450	26,35	310	43,47
Cavidade Oral	820	14,97	110	15,61
Esôfago	1.080	19,73	110	16,09
Leucemias	460	8,32	70	10,09
Pele Melanoma	450	8,20	60	9,25
Outras Localizações	8.050	146,66	1.530	218,96
<b>Subtotal</b>	<b>20.530</b>	<b>374,02</b>	<b>3.430</b>	<b>490,88</b>
Pele não Melanoma	4.180	76,17	330	47,65
<b>Todas as Neoplasias</b>	<b>24.710</b>	<b>450,06</b>	<b>3.760</b>	<b>537,55</b>

**TABELA 2** – Estimativas para o ano de 2008 das taxas brutas de incidência por 100.000 habitantes e de número de casos novos por câncer, em homens, segundo localização primária.

Mulheres				
Localização Primária Neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	4.880	85,50	950	119,72
Colo do Útero	1.610	28,17	230	29,51
Cólon e Reto	1.610	28,22	360	44,97
Traquéia, Brônquio e Pulmão	1.220	21,42	230	28,74
Estômago	580	10,23	100	12,36
Leucemias	350	6,23	60	7,02
Cavidade Oral	230	3,96	60	7,01
Pele Melanoma	420	7,29	80	10,12
Esôfago	430	7,58	40	5,47
Outras Localizações	6.970	122,13	1.720	215,94
<b>Subtotal</b>	<b>18.300</b>	<b>320,66</b>	<b>3.830</b>	<b>480,85</b>
Pele não Melanoma	4.920	86,22	530	67,04
<b>Todas as Neoplasias</b>	<b>23.220</b>	<b>406,89</b>	<b>4.360</b>	<b>546,84</b>

**TABELA 3** - Estimativas para o ano de 2008 das taxas brutas de incidência por 100.000 habitantes e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária.

A etiologia do CCR é complexa, envolve agentes externos como fatores ambientais e dietéticos, bem como elementos internos de natureza somática ou hereditária. Desta forma, o CCR apresenta 3 padrões distintos de apresentação: esporádico, hereditário e familiar(4).

A forma esporádica da doença representa 70% dos casos de CCR, sendo mais comum em pessoas acima de 50 anos. Fatores presentes na dieta e no ambiente de trabalho, como substâncias cancerígenas, radiações, nicotina favorecem a instabilidade genômica, enquanto fibras, minerais e vitaminas provenientes de dieta rica em peixas, frutas secas e vegetais tendem a normalizar o ciclo celular. Geralmente o tipo esporádico aparece quando o ambiente adverso contribui para a instabilidade do ciclo celular por um período longo o suficiente para determinando o acúmulo de um número crítico de alterações celulares(1).

O CCR hereditário aparece em indivíduos que herdaram de seus pais uma alteração em um gene supressor de tumor. Menos de 10% dos pacientes com CCR têm esta predisposição hereditária. As síndromes hereditárias podem se manifestar por pólipos como a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e a Polipose Juvenil Familiar (FJP). Já outras síndromes não contêm pólipos como Síndrome de Câncer Colorretal Hereditário não Polipóide (HNPCC)(1,6).

A terceira forma da doença é conhecida como CCR familiar, que aparece numa frequência em torno de 20% e que não preenche os critérios para câncer hereditário(6).

Nestes 3 tipos de apresentação do CCR, diversos fatores genéticos atuam transformando a mucosa normal em lesões pré-malignas e em CCR, sendo a mutação gênica o fator central deste processo(7).

A maioria dos genes podem manter sua função mesmo que um dos alelos mutados esteja inativado, portanto, para que haja perda da função gênica, fato que pode levar ao processo neoplásico, é preciso que ambos os alelos estejam inativados. No CCR esporádico é necessário que ambos os alelos estejam “desligados” por eventos como mutações somáticas e deleções, exigindo para isto vários anos.

Quando ao nascimento um indivíduo já tem um dos alelos mutado, o alelo normal (selvagem) remanescente é o responsável por manter a homeostase. Assim, apenas um evento genético esporádico será necessário para “desligar” este alelo e inativar totalmente o gene. Isto explica a idade mais precoce do CCR quando a origem é hereditária(6).

Estes genes mutados, de forma somática ou germinativa, pertencem a diferentes classes como: oncogenes, genes supressores e genes de reparo do DNA sendo estes eventos parte do que se chama carcinogênese.

## **2.2 - CARCINOGENESE DO CÂNCER COLORRETAL**

O processo de carcinogênese do CCR vem sendo estudado ao longo dos anos, principalmente pelo já conhecimento de que as lesões polipóides benignas têm clara correlação com a neoplasia colorretal. A sequência adenoma-carcinoma, demonstrada por Morson em 1983, refere-se a uma tradicional visão de que o CCR se desenvolve, na maioria dos casos, de lesões pré-existentes, lesões pré-malignas, especialmente quando associado a alterações displásicas(8).

Vários aspectos corroboram para o entendimento da associação entre adenomas e CCR entre elas: os aspectos histológicos dos adenomas são também observados em espécimes contendo neoplasia(9,10), a realização de colonoscopia para retirada pólipos recém-diagnosticados diminui a incidência de lesões malignas (11,14), os pólipos tendem a ter distribuição anatômica semelhante ao CCR, com preferência pelo segmento retossigmóide(8), a idade de aparecimentos dos pólipos precede, em torno de 5 anos, o pico de surgimento da neoplasia(12), a constatação de que fatores de risco dietéticos e ambientais são os mesmos para o surgimento de lesões benignas e malignas(13) e, finalmente, a observação que adenomas e o CCR possuem alterações moleculares similares.

*Volgenstein e Fearon* propuzeram um modelo genético capaz de explicar os eventos que levam a progressão da lesão adenomatosa até a neoplasia. Com o estudo de genes encontrados em adenomas de diversos tamanhos, viu-se que as lesões adenomatosas aumentavam de tamanho a medida que o número de genes mutados aumentava, estabelecendo-se, assim, relação entre o tamanho da lesão, os achados histopatológicos e as alterações genéticas(15,18).

O estágio inicial deste modelo genético de sequência adenoma-carcinoma é a mutação e/ou perda do gene de supressão APC (*adenomatosis polyposis of the colon*), que atua na

forma de um dímero e exerce sua função de supressor tumoral, agindo na sinalização intracelular e no controle de proliferação celular, possivelmente por afetar a taxa de divisão celular ou a apoptose(16).

O primeiro indício da mutação APC veio da identificação de um paciente com polipose colorretal e retardo mental que tinha uma deleção da banda cromossômica 5q21(19). A análise de famílias com FAP conduziram ao mapeamento do gene APC no cromossomo 5q21-q22 em 1987. O gene, então, foi clonado, identificado e caracterizado em 1991(20). Esta alteração genética além de característica da FAP, também é encontrada no câncer de cólon esporádico, mutado em 70% dos casos, sugerindo um importante papel do gene APC nos estágios iniciais do desenvolvimento da neoplasia(17). Assim, o tecido normal da mucosa intestinal entra em estado hiperproliferativo e inicia a formação de adenomas.

O segundo e o terceiro estágio do modelo de progressão tumoral são a ativação do proto-oncogene KRAS e a perda do gene DCC (*deleted in colorectal carcinoma*), domínio este localizado no braço longo do cromossomo 18.

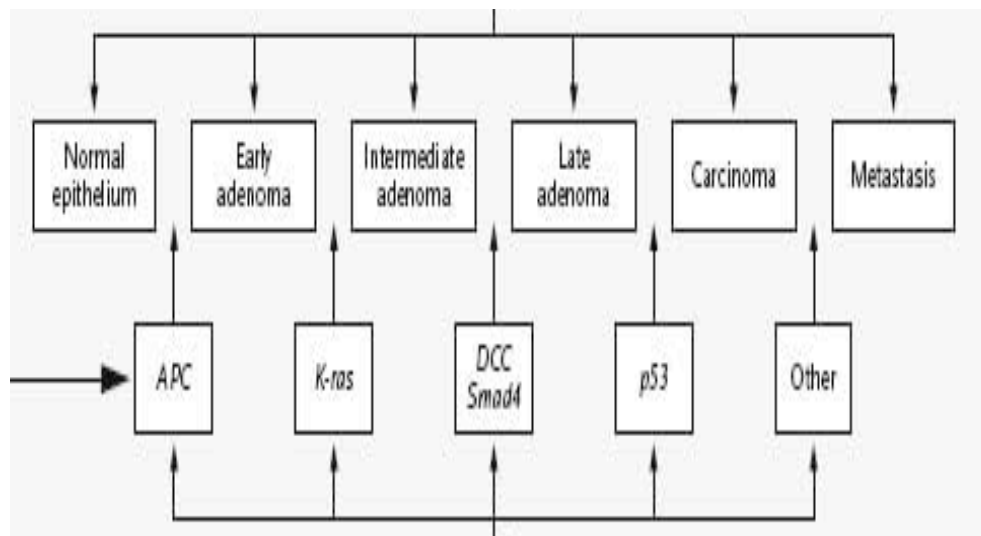
As proteínas RAS, também chamadas de p21, estão localizadas na membrana celular a partir do receptores de tirosina-quinase como o receptor EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*). As proteínas RAS são ativadas pela ligação GTP (guanidina tri-fostato) e desativas por duas enzimas GTPases (ras-GAP-P120 e neurofibromina). Os oncogenes RAS são ativados por mutações pontuais que previnem a ação destas GTPases. Mutações no gene KRAS, que desregulam a função normal do gene, descrita acima, são encontradas em aproximadamente 50% dos casos de CCR, sendo considerado um evento relativamente precoce(16).

Setenta por cento dos casos de CCR apresentam deleções do braço longo do cromossomo 18 (18q21.3), onde está localizado o gene DCC, alterações também vistas nos casos avançados de adenoma. Na prática clínica, a perda do heterozigose (LOH) no cromossomo 18q está associado a pior prognóstico em pacientes com CCR. Pacientes estágio clínico II de câncer de cólon com deleção do 18q possuem prognóstico semelhante aos pacientes com linfonodos positivos – estágio III(21,22).

O quarto estágio consiste na alteração da proteína p53 (*tumor protein p53*) que parece marcar a transição de adenoma para carcinoma, antes do surgimento da doença metastática. É identificada em 50% ou mais dos tumores colorretais e localizada entre os éxons 5 e 8 deste

gene. Sua função de proteção celular está relacionada a diversas vias de transdução de sinais, que ajudam, por exemplo, a manter a estabilidade do genoma após dano do DNA, prendendo o ciclo celular na fase G1 até que o reparo seja efetuado ou a apoptose induzida(15).

Por estes achados descritos acima, o modelo apresentado por Volgestein é adequado para explicar a transformação de adenomas em lesões malignas; porém, nem todos os tumores colorretais se desenvolvem desta forma, como é o caso do HNPCC (Figura 3).



**FIGURA 3** – O papel das mutações no desenvolvimento da neoplasia.  
Lynch HT, de la Chapelle A. N Engl J Med 2003; 348:919. Modificado.

Os pacientes com diagnóstico de HNPCC apresentam a perda do reparo do DNA que se expressa por defeitos nos genes: hMLH1 (*mutL homolog 1*), hMSH2 (*mutS homolog 2*), hMSH3 (*mutS homolog 3*), hPMS1 (*postmeiotic segregation increased 1*), hPMS2 (*postmeiotic segregation increased 2*) e hMSH6 (*mutS homolog 6*)(6). O Sistema de reparo atua durante o processo de replicação do DNA e é responsável pela substituição, com alta fidelidade, de nucleosídeos que apresentam um pareamento incorreto.

A assinatura genética característica dos tumores em pacientes com HNPCC é um alto número de replicações erradas do DNA (*replication errors* \_RER+) e altos níveis de instabilidade de microssatélite(MSI). Este termo, MSI, se refere a expansão ou contração de sequências de DNA causadas pela inserção ou deleção de unidades repetidas(23). Além de

encontrada na HNPCC, este erro de reparo pode ser característica de 15 a 20% dos tumores de cólon esporádicos, não ligados a pólipos(26) (Tabela 4).

<b>Autor</b>	<b>N</b>	<b>IMS +</b>	<b>Obs</b>
Tsai e cols, 2002	39	20 %	
Feeley e cols, 1999	50	10%	
Abe e cols, 2000	110	11%	
Salashor e cols, 1999	181	12%	
Ward e cols, 2001	302	11%	
Gonzalez-Garcia e cols, 2000	415	7,5%	
Wright e cols, 2000	255	8%	Dukes C
Gervaz e cols, 2002	88	24%	T3N0
Ikenaga e cols, 2002	53	50%	< 40 anos
Suh e cols, 2002	61	31%	< 40 anos
Ho e cols, 2000	124	26%	< 50 anos
Gryfe e cols, 2000	607	17%	< 50 anos
Naidoo e cols, 2000	32	31%	< 35 anos
	50	12%	> 50 anos
Guidoboni e cols, 2001	109	43%	Colon direito, estágio II/III
Elsaleh e cols, 2000	388	19%	Colon direito e transverse
Nilbert e cols, 1999	165	2%	Cancer de reto
Messerini e cols, 1999	50	36%	Tumores mucinosos

**TABELA 4** - Incidência de positividade para instabilidade de microsatélites em séries de câncer colorretal esporádico (apenas MSI-H considerados).

Adaptado de: Pinho MSL. Rev Bras Coloproct 2002; 22(2):139-144.

Apesar dos tumores com MSI serem pobremente diferenciados, subtipo mucinoso, com proeminente infiltração de linfócitos, localização colônica proximal, estes pacientes com alta frequência de instabilidade (MSI-H) possuem melhor prognóstico quando comparados à aqueles com baixa frequência (MSI-L) ou sem instabilidade (MSS)(23,24,26) (Tabela 5).

<b>Autor</b>	<b>N</b>	<b>Melhor sobrevida em pacientes IMS +</b>	<b>Obs</b>
Suh e cols, 2002	61	Sim (p= 0.05)	Pacientes < 40 anos
Samowitz e cols, 2001	1026	Sim (redução do risco em 60%)	
Guidoboni e cols, 2001	245	Sim	Tumores II/III
Gafa e cols, 2000	216	Sim (p < 0.001)	
Hemminki e cols, 2000	1044	Sim ( 90% x 43%)	Sobrevida em 3 anos
Wright e cols, 2000	255	Sim (p = 0.01)	
Gonzalez-Garcia e cols, 2000	415	Sim	
Elsaleh e cols, 2000	388	Sim ( 58% x 32%, p =0.01)	Dukes c
Gryfe e cols, 2000	607	Sim ( p < 0.001)	
Messerini e cols, 1999	50	Sim	Tumores mucinosos
Salahshor e cols, 1999	181	Não	
Feeley e cols, 1999	50	Não	
Gervaz e cols, 2002	88	Não	

**TABELA 5** – Análise da sobrevida em portadores de câncer colorretais com ou sem instabilidade de microssatélites.

Adaptado de: Pinho MSL. Rev Bras Coloproct 2002; 22(2): 139-144.

Além disso, a presença de MSI-H parece ter relevância em relação ao tratamento adjuvante, sugerindo que a quimioterapia baseada no medicamento 5-fluorouracil é menos benéfica para este grupo de pacientes. Porém, um painel de *experts* da Associação Americana de Oncologia (ASCO) considera o dados insuficientes para ser usado como preditor de efetividade da quimioterapia adjuvante(25).

### 2.3 - TRATAMENTO ADJUVANTE NO CÂNCER COLORRETAL

Conforme o TNM(27), os pacientes com CCR estão divididos em estadiamento I a IV. O grupo IV compreende paciente metastáticos e o grupo III, pacientes com linfonodos comprometidos. A sobrevida livre de doença (SLD) diminui conforme a progressão do T, a



maior extensão linfonodal e o grau de diferenciação tumoral. Grill et al, publicou estimativas onde a adição de quimioterapia adjuvante à cirurgia melhora a SLD em todos os grupos (Tabela 6)(28).

Nodal status	T stage	Low grade		High grade	
		S	+AT	S	+AT
0 nodes	T3	74	82	70	79
	T4	63	74	57	70
1-4 nodes	T1-T2	71	81	67	77
	T3	53	68	46	61
	T4	37	53	30	46
>5 nodes	T1-T2	51	64	44	59
	T3	27	44	21	37
	T4	13	27	9	21

**TABELA 6** – Estimativa da sobrevida livre de doença (SLD) em 5 anos com cirurgia associada a quimioterapia adjuvante. AT:quimioterapia adjuvante, S:Cirurgia.  
J Clin Oncol 2004; 22: 1797-1806.

Historicamente, o padrão ouro para definir o benefício da terapia adjuvante é a sobrevida global (SG). Porém, SLD em 2 ou 3 anos parece substituir a SG em 5 anos. Em um estudo publicado em 2007, incluindo 20.898 pacientes em 18 *trials* de quimioterapia adjuvante de cólon mostrou correlação entre a SLD em 3 anos e a SG, Harzard Ratios (HR) 0,92 (95% IC 0,83-0,95) para pacientes estágio III e HR 0,70 (95% IC 0,78-0,98) para estágio II. A partir de então, diversos estudos adjuvantes adotaram a SLD em 3 anos ao invés de SG como objetivo primário(29).

Os estudos iniciais que mostraram benefício na adjuvância do CCR surgiram nos anos 80. O estudo realizado pelo grupo *Nacional Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project* (NSABP) C-01 incluindo quimioterapia baseada em imunoterapia com BCG versus o esquema semustina/vincristina/5FU (MOF) mostrou vantagem para este último(30). Subsequentemente, o trial NSABP-C 03, estabeleceu a superioridade do esquema 5-Fluorouracil (5FU) associado a Leucovorin (LV) quando comparado ao esquema MOF. Similar grau de benefício foi notado pelo estudo do grupo *North Central Cancer Treatment Group* (NCCTG) em que 317 pacientes estágio II e III foram tratados com esquema 5FU/LV, dias 1-5, a cada 4 semanas (esquema Mayo)(31). Ambos estudos definiram a associação

5FU/LV como esquema de tratamento adjuvante padrão do CCR. Mais recentemente os dados do estudo IMPACT (*International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials*) que randomizou pacientes para quimioterapia adjuvante esquema Mayo versus observação, demonstrou 22% de redução do risco de morte em 3 anos (83% x 78%) para o grupo tratado(32).

A tentativa de prolongar a adjuvância por mais de 6 meses, de modificar o esquema de infusão (5FU/LV semanal (Roswell Park)), ou de utilizar esquemas de infusão contínua não demonstraram benefício em SG, apenas mudanças no perfil de toxicidade(33,34).

Com o surgimento das fluoropirimidinas orais, novos estudos comparando o esquema padrão 5FU/LV com estas pró-drogas, capecitabina e UFT, foram realizados. O medicamento capecitabina, cujo mecanismo de ação compreende a absorção intestinal da droga intacta e a conversão intra-celular em 5-FU foi testado no estudo europeu e canadense denominado X-ACT(35). Foram randomizados 1.987 pacientes para o esquema padrão 5FU/LV Mayo versus Capecitabina. Após acompanhamento de 3,8 anos não houve inferioridade entre os grupos mas houve uma tendência, não significativa, a melhora da SLD em 3 anos (64% x 61%,  $P=0,05$ ) e SG (81% x 78%,  $P=0,07$ ) a favor do grupo experimental.

O medicamento UFT, combinação 1:4 de tegafur e uracil, comercialmente não disponível nos EUA, também demonstrou equivalência quando comparado ao esquema 5FU/LV no estudo NSABP C-06(36). Não houve diferença estatística entre a SLD e a SG entre os grupos. Os estudos com fluoropirimidinas orais demonstram uma alternativa viável para os paciente que por contra-indicação ou preferência optem por não fazer uso da terapia injetável.

Novas drogas, irinotecano e oxaliplatina, combinadas aos medicamentos padrão 5FU/LV e Capecitabina mostraram-se benéficas em pacientes metastáticos(37). A partir destes dados foram realizados estudos de adjuvância em pacientes estágios II e III. O estudo mais importante da associação 5FU/LV em infusão contínua e oxaliplatina (FOLFOX), foi publicado 2004, no *New England Journal Medicine*(38). Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Após 4 anos de acompanhamento o esquema FOLFOX obteve superioridade em SLD (75,9% x 69,1%,  $P=0,008$ ). Esta diferença se manteve quando avaliado apenas os pacientes estágio III. Em recente reavaliação dos dados do estudo MOSAIC, apresentados na

ASCO 2007, com acompanhamento de 73 meses, a SLD continua com significância estatística nos pacientes estágio III (66% x 59%). Os pacientes estágio II classificados como risco, classificados como alto risco, demonstraram ampla diferença em SLD (82% x 75%), apesar de não significativa. Um segundo estudo, NSABP C-07, utilizou associação de 5FU/LV em bolus e oxaliplatina (FLOX), e também apresentou superioridade do esquema contendo 3 agentes; porém, com grau de toxicidade maior devido uso em *bolus*(39).

Em contraste com os resultados da combinação 5FU/LV com oxaliplatina, os estudos com irinotecano não demonstraram benefício(40,41). Neste momento, restringe-se o uso do quimioterápico irinotecano aos pacientes estágio IV.

Os estudos descritos acima provaram o claro benefício da indicação de quimioterapia adjuvante em pacientes com linfonodos positivos, estágio III. Em contraste, o benefício nos pacientes em estágio II permanece controverso. A maioria dos estudos conduzidos em adjuvância, envolvendo pacientes estágio II e III, demonstraram uma tendência a favor do uso de quimioterapia no estágio II do CCR. A análise em conjunto dos estudos do grupo NSABP (C-01, C-02, C-03 e C-04) demonstraram um aumento da SLD em pacientes estágio II e III, indicando quimioterapia adjuvante nestes pacientes(42).

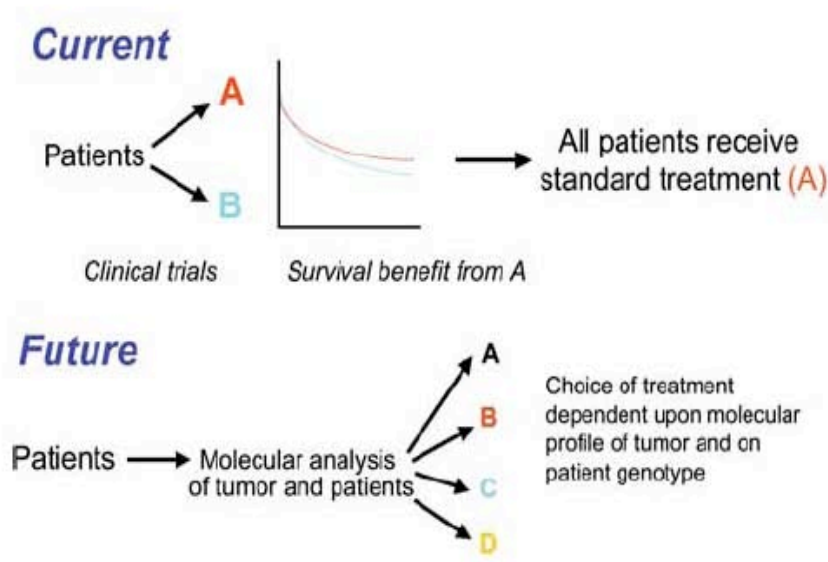
Na tentativa de aumentar o número de pacientes e tornar os valores com significância estatística 2 metanálises se destacam. A metanálise do Intergroup(28), publicada em 2004 no Journal of Clinical Oncology, reuniu 3.302 pacientes de sete estudos randomizados que compararam cirurgia isolada versus quimioterapia baseada em 5-FU. No grupo de pacientes estágio II a SLD atingiu significância estatística (76% x 72%). A metanálise publicada pela ASCO(43), em 2004, também encontrou benefício em SLD entre 5-10%, mas este não se traduziu em melhora da SG, P=0,07. O estudo MOSAIC, descrito acima, também apresenta tendência a ganho em SLD nos pacientes estágio II(38).

Apesar do benefício não claro da adjuvância nos estágios II devido ao P não significativo, a grande parte dos oncologistas clínicos acredita que haja ganho e consideram justificável os riscos e parafeitos da terapêutica. Os *guidelines* baseados em painel de *experts* tanto da ASCO(43) quanto do NCCN(44) sugerem que os esquemas de adjuvância com 5FU/LV sejam discutidos com os pacientes estágio II que apresentem os fatores de alto risco.

Em pacientes estágio clínico II, constituem fatores de pior prognóstico clínico-patológicos: lesões T4, histologia pobremente diferenciada (incluindo anel de sinete e tumores

mucinosos), invasão linfovascular, obstrução e perfuração intestinal, inadequada amostra linfonodal (menos de 13 linfonodos na peça cirúrgica) e CEA pré-operatório acima de 5 ng/dl(38,43,44).

Além de fatores prognósticos clínico-patológicos a busca de preditores moleculares torna-se cada vez mais importante para definir os pacientes que irão realmente beneficiar-se do tratamento adjuvante. No futuro, a deleção do 18q, hiperexpressão da enzima timidilato-sintetase, mutação do p53, MSI e expressão gênica farão parte da indicação e da escolha do esquema de adjuvância (FIGURA 4).



**FIGURA 4** – Modelo future para determinar a melhor escolha de tratamento adjuvante para cada paciente.

The Oncologist 2006; 11: 993-980.

Neste momento, O *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) vem randomizando pacientes para estudos adjuvantes utilizando estes preditores. Destaca-se o estudo E5202 onde a análise de risco e escolha da adjuvância passa pela avaliação da deleção do 18q e a presença de MSI(45). Porém, até o momento, conforme revisão da ASCO não há evidência suficiente para o uso de marcadores moleculares fora de estudos clínicos(46).

## 2.4 - GENES Ets

Como já discutido, o câncer é uma doença de múltiplos passos envolvendo uma série de alterações genéticas que resultam na perda do controle e da regulação da proliferação celular. Tais alterações genéticas incluem a ativação de oncogenes e a perda de genes de supressão. O isolamento e a caracterização dos genes da família Ets têm contribuído neste aspecto(47,48).

O primeiro membro da família Ets (E26 sequência específica de transformação) foi originalmente identificado em um retrovírus causador de leucemia mieloblástica e eritoblástica em aves, o E26(49). Logo ficou evidente que este fazia parte de uma vasta família de genes com alto grau de conservação evolucionária. Genes da família Ets são encontrados em todos os metazoários, incluindo espécies tão distintas como *Drosophila sp* e *C. elegans*(51). Em mamíferos, foram identificados até o momento, aproximadamente 30 genes (Tabela 7).

	Name	GenBank	Locus	Size	ETS	Pointed
A1	ETS1	J04101	11q23.3	441	331-416	54-135
2	ETS2	J04102	21q22.3	469	369-443	88-168
3	ERG2	M17254	21q22.3	462	290-375	120-201
4	ELK1	M25269	Xp11.2	428	Jul-92	None
5	SPI1 (PU.1)	X52056	11p12-p11.22	264	168-240	None
6	FLI1 (ERGB)	M98833	11q24.1-q24.3	452	277-361	115-196
7	SAP1 (ELK4)	M85165	1q32	431	Apr-89	None
8	ELF1	M82882	13q13	619	207-289	None
9	SPIB	X96998	19q13.3-q13.4	262	169-251	None
10	ETV2 (ER71)	NM_014209	19q13	370	265-350	None
11	E4TF1 (GABP)	D13318	21q21-q22.1	454	318-400	171-249
12	E1AF (PEA3, ETV4)	D12765	17q21	462	315-399	None
13	PE1 (ETV3)	L16464	1q23.3-q23.4	250	56-140	None
14	ERM (ETV5)	X76184	3q28	510	368-449	None
15	TEL (ETV6)	U11732	12p13	452	340-419	38-119
16	NET (SAP2, ERP, ELK3)	Z36715	12q23	407	May-85	None
17	ERF	U15655	19q13	548	26-106	None
18	ETV1 (ER81)	X87175	7p22	458	314-397	None
19	NERF2	U43188	4	581	198-277	None
20	MEF (ELF4, ELFR)	U32645	Xq26	663	204-290	None
21	ESX (JEN, ESE1,ERT,ELF3)	AF110184	1q32.2	371	275-354	47-132
22	FEV	Y08976	2q23	238	43-126	None
23	EHF (ESE3)	AF170583	11p12	300	209-288	42-112
24	ELF5 (ESE2)	AF049703	11p14	255	165-243	46-115
25	PDEF (ESF, PSE)	AF071538	6p21.3	335	248-332	138-211
26	TREF (TEL2)	AF147782	6p21	264	149-228	49-114
27	SPIC	NM_152323	12q23	248	111-193	None

**TABELA 7** - Lista dos genes Ets identificados, incluindo o gene, nome alternativo, número de acesso no banco de genes, localização cromossômica, tamanho da proteína (aminoácidos), limite do domínio Ets (85 aminoácidos), limite do *Pointed* domínio(65-80 aminoácido, se presente).

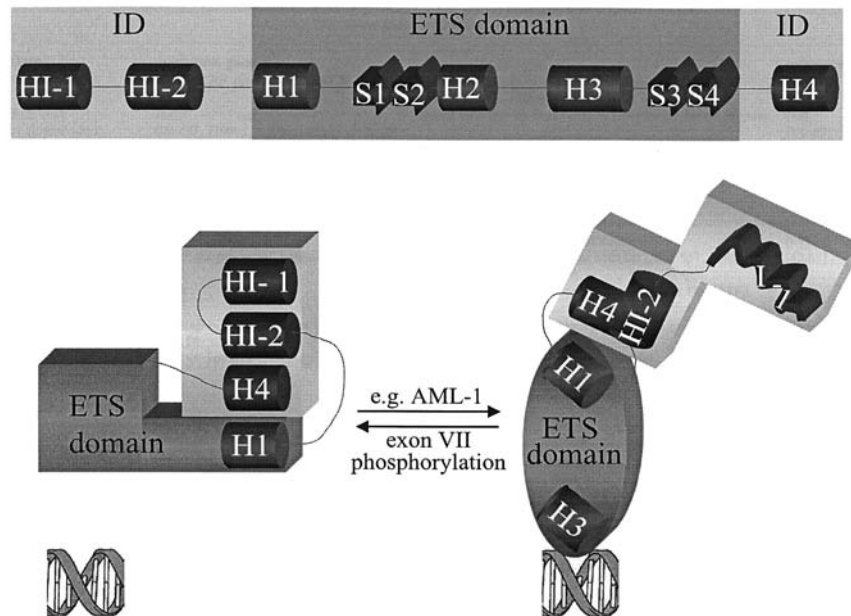
A família Ets consiste em fatores transcripcionais que, caracteristicamente, compartilham um domínio de ligação ao DNA do tipo “*helix-turn-helix*”, capaz de reconhecer uma seqüência específica de bases composta por GGAA/T (chamada de sítio de ligação ETS). A região conservada Ets completa consiste em cerca de 85 aminoácidos ligados a uma seqüência de bases de purina, responsáveis por ativar ou reprimir a transcrição do DNA em cooperação com outros membros de transcrição, exercendo papel fundamental no controle celular incluindo: crescimento, apoptose, desenvolvimento, diferenciação e transformação oncogênica(47,50,51).

Esta família tem um papel importante no desenvolvimento normal dos mamíferos, não ligado à neoplasia. Por exemplo, a desagregação do alvo do gene Fli-1 (membro da família Ets) resulta em hemorragia da aorta dorsal até o lúmen do tubo neural e sangramento nos ventrículos cerebrais no dia 11 do estado embriônico(55). A deficiência de ETS-2 causa letalidade no feto no dia 8 da embriogênese(56). Além de exercer papel importante no desenvolvimento hematopoiético como, por exemplo, como a desagregação do ETS-1 causa defeito no desenvolvimento das células “*natural killer*”. A perda da função da PU.1 causa defeitos na mielopoiese assim como na linfopoiese de células B(54).

## 2.5 - ESTRUTURA DA FAMÍLIA Ets

Em análises de Ressonância Nuclear Magnética a estrutura dos domínios Ets revela um arranjo de três alfa-hélices (alfa1-alfa3) e quatro folhas beta pregueadas (beta-strands) que são organizadas na seguinte ordem: H1-S1-S2-H2-H3-S3-S4 (H=alfa-hélice; S=folha beta)(51,55).

A família de proteínas Ets pode ser dividida em várias subfamílias baseado na composição estrutural e suas similaridades nos ligantes com DNA. A maioria deles tem um domínio Ets em sua porção C-terminal. Entretanto, alguns têm seu domínio na porção N-terminal. Outros possuem, um *Pointed-domain* (PTN), que é importante nas interações proteína-proteína. Muitos membros são expressos predominantemente em alguns tecidos, e alguns são onipresentes (Figura 5).



**FIGURA 5** - Estruturas proteicas e distribuição dos principais fatores de transcrição ETS. Ets: domínio ligante do DN, HLH: hélice-volta-hélice (*pointed domain*), AD: domínio de ativação, RD: domínio de repressão.

## 2.6 – PDEF

O fator derivado da próstata (PDEF) foi identificado de forma homóloga em espécies como camundongos e *Drosophila* (D-Ets). A análise do gene PDEF revela um domínio de DNA COOH-terminal e uma região reguladora NH2-terminal mediada por alvos específicos(57,58).

A proteína PDEF é expressa exclusivamente em células epiteliais o que a torna única entre os membros da família ETS. Sua expressão é restrita a um pequeno grupo de tecidos tais como próstata, mama, endométrio, ovário, cólon e glândula salivar(59,60,61).

Um potencial papel do PDEF na migração e invasão da célula com câncer tem sido investigada, entretanto diferentes pesquisadores têm encontrado resultados conflitantes. Em linhagens celulares de câncer de mama a super-expressão da proteína PDEF inibiu o crescimento celular e reduziu a migração e invasão. Em outros estudos, a super-expressão do

PDEF induziu a invasão e migração de células de câncer de mama, demonstrando que a expressão é diferente no tecido normal e na célula neoplásica(61).

Além disso, há diferenças entre o grau de expressão PDEF e o grau de diferenciação da célula neoplásica (Tabela 8)(61). Esta discrepância pode ser explicada por diferentes linhagens celulares e seu ambiente de desenvolvimento(58).

Breast tumor	Grade <sup>a</sup>	Pdef expression <sup>b</sup>
A (22958)	III (PD) <sup>c</sup>	2
B (25140)	III (PD)	1
C (B2)	II (MD) <sup>d</sup>	3
D (854)	II (MD)	1
E (F1)	II (MD)	1
F (844)	II (MD)	2
G (839)	III (PD)	1

**TABELA 8** – Redução da expressão da proteína PDEF no câncer de mama in vivo.

<sup>a</sup>Grau do tumor

<sup>b</sup>Tecido normal foi designado valor 4, indicando 75-100% de positividade do núcleo. 1, < 25% do núcleo possui efetividade comparado como onormal; 2, entre 25 e 50% do tumor tem expressão positiva; 3, entre 50 e 75% tem expressão positiva.

<sup>c</sup>PD, pobremente diferenciado.

<sup>d</sup>MD, moderadamente diferenciado.

Por fim, este gene da família Ets, PDEF, leva as células a uma mudança fisiológica e morfológica drástica que está associada a conversão das propriedades epiteliais em um fenótipo mesenquimal, com redução dos marcadores epiteliais, aumento dos marcadores mesenquimais, redução da adesão celular e aumento da migração e invasão(58).

## 2.7 - Ets E CÂNCER

Comum à maioria das neoplasias é a aquisição de novas capacidades funcionais: independência no sinal de mitose, perda do sinal de anti-crescimento, evasão da apoptose,



perda do limite de proliferação, conversão angiogênica, invasão e metástase. As duas últimas, invasão e metastatização, são características comuns em tumores agressivos e letais. Estes eventos requerem que as células percam a capacidade de adesão, tornem-se móveis e invadam os tecidos adjacentes.

Enquanto o crescimento epitelial anormal e a diferenciação celular contribuem para o desenvolvimento inicial do câncer, as células epiteliais devem passar por múltiplas alterações moleculares pelas quais adquirem a habilidade de migração. Neste estágio final de progressão tumoral, a célula epitelial retorna a estágios mais primitivos, adquirindo alguns aspectos estruturais de células mesenquimais. Em contraste com as células epiteliais, as células com características mesenquimais têm a habilidade de migrar e invadir outros tecidos através da matriz extracelular (ECM). Portanto, a transformação em células com propriedades mais primitivas (desdiferenciação) é um evento crítico que leva a disseminação e formação de metástases, predispondo a migração de, por exemplo, um carcinoma in situ (CIS) em invasivo e metastático(55,62).

O envolvimento dos genes ETS na carcinogênese é suportado pela observação que o gene ETS humano está localizado em pontos chaves de translocação, e são deletados ou tem seu modelo de expressão alterado em alguns tumores sólidos e leucemias como já demonstrado por diversos estudos.

Um dos estudos pioneiros avaliou a expressão da proteína ETS-1 em câncer de ovário, tanto no tumor quanto no líquido ascítico(63). Este estudo demonstrou um pior prognóstico nas pacientes com expressão aumentada de ETS-1 confirmado por uma publicação subsequente(65). Ambos os estudos foram realizados em tumores avançados, não sendo possível determinar se a expressão do ETS-1 é um evento precoce no processo da carcinogênese. A busca da expressão ETS nas fases iniciais da carcinogênese, quando os tumores ainda são curáveis, tornou-se o objetivo de diversos centros de pesquisa.

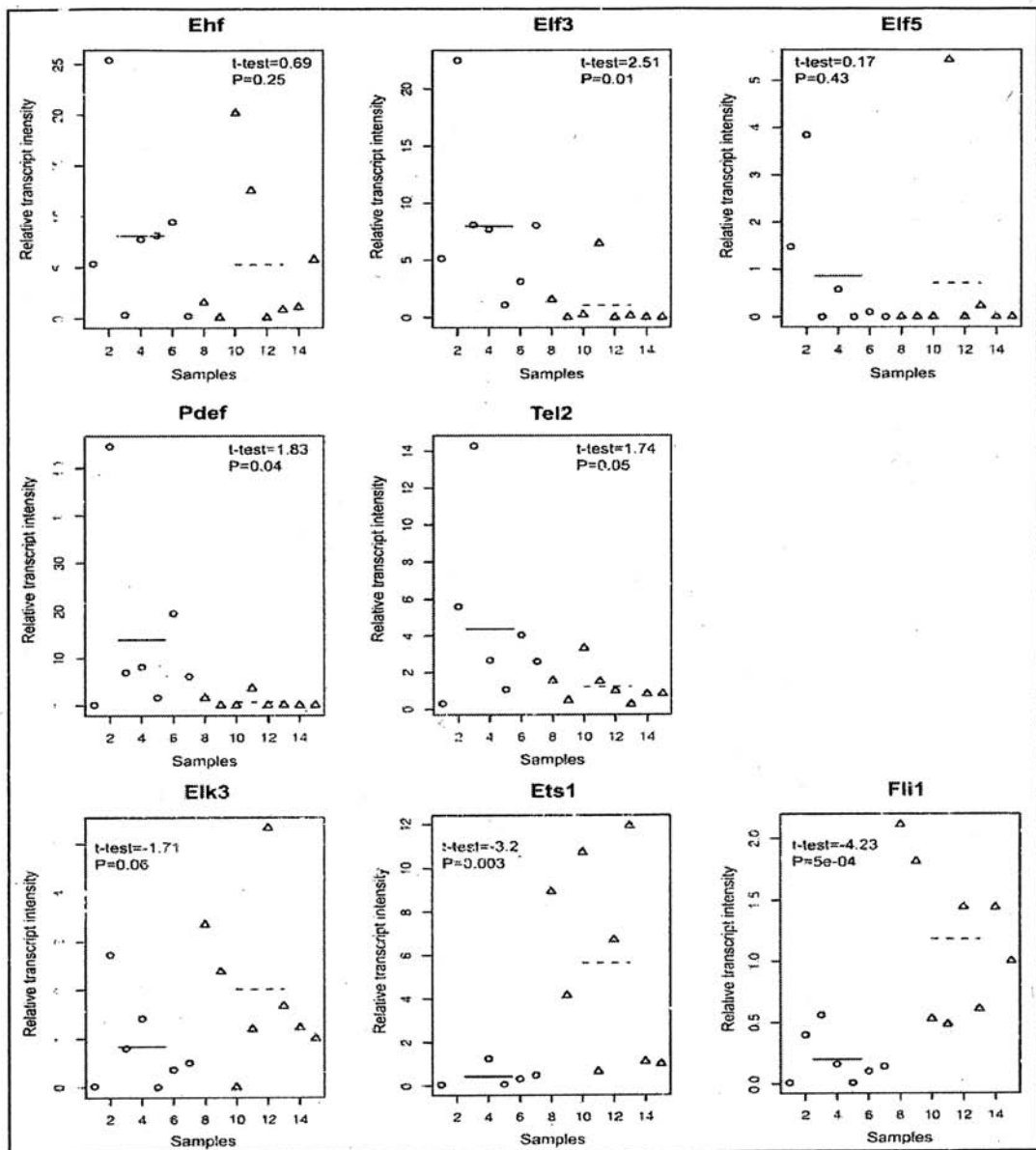
Seguindo o mesmo objetivo, Rodabaugh KJ(65) publicou em 2007 um estudo correlacionando a expressão da proteína PDEF, integrante da família ETS, em câncer de ovário. Para este estudo o autor selecionou amostras de tecido de ovário normal, cistoadenomas, tumores *boderline* e casos confirmados de neoplasia invasiva tanto inicial quanto avançada, incluindo casos de metástases peritoneais. Após análise imunoistoquímica não houve expressão do gene PDEF no tecido ovariano normal bem como nas amostras de cistoadenoma. A expressão do gene PDEF foi encontrada nas amostras de tumores *boderline*, adenocarcinoma seroso de ovário estágio I e adenocarcinoma estágio avançado em 35%, 27%

e 33%, respectivamente. Este estudo, pioneiro em mostrar expressões diferentes em estágios diferentes de câncer seroso de ovário, sugere que o gene PDEF seja um potencial marcador e alvo terapêutico. Limitações deste estudo se devem a uma amostra pequena com 54 casos.

Um estudo americano(66), publicado em 2008, avaliou o prognóstico e a sobrevida de pacientes com câncer epitelial de ovário estágios I a IIIC em relação à expressão da proteína PDEF. Observou-se em 40 amostras de ovário que os estágios iniciais (IA) e tumores *boderline* expressavam alto nível de mRNA PDEF quando comparados às amostras de tumor de ovário avançado (IIIC e IV),  $P < 0,05$ . Quando forçada a expressão de PDEF em células tumorais ovarianas PDEF-negativo observou-se uma inibição do crescimento celular, indução da apoptose e diminuição de expressão da proteína Survivina (inibidora da apoptose e envolvida no ciclo celular). Houve correlação inversa entre as expressões de PDEF e de Survivina, sugerindo que a redução/perda da expressão do gene PDEF é fator para progressão de estágio tumoral e piora do prognóstico.

A expressão da família Ets também foi estudada em tumores de mama. He J e colaboradores, num primeiro momento, realizaram estudo em 10 linhagens celulares de câncer de mama e tecido normal observando a expressão de 27 genes selecionados da família Ets(67). Quatro genes, Ehf, Elf3, Elf5 e PDEF apresentaram expressão elevada nas células malignas em relação a células epiteliais normais. Já a expressão dos genes Elk3, Flil e ETS-1 foram suprimidas nas células neoplásicas.

Num segundo momento do estudo os autores demonstraram a expressão destes 7 genes, anteriormente avaliados em linhagens celulares, no tecido mamário tumoral. Ocorreu superexpressão do gene PDEF no tecido tumoral em relação ao tecido normal,  $P = 0,04$  e perda da expressão do gene ETS-1 no tumor,  $P = 0,003$  (Figura 6). Este último achado contraria estudos anteriores em relação a expressão das proteínas ETS(68,69,70). Esta diferença, não claramente elucidada, pode ser explicada pela possível contaminação das linhagens neoplásicas por células de tecido mamário normal, necessitando novos estudos com análise de imunoistoquímica para este esclarecimento.



**FIGURA 6 -** Intensidade de expressão relativa a 8 genes da família de gene ETS em tecido normal e neoplásico. Os círculos e os triângulos indicam espécimes de tumor de mama e tecido normal, respectivamente. A média para tumores e tecido normal é indicada por linha cheia ou tracejada, respectivamente. O teste t unicaudal foi realizado para detectar a significância estatística de cada gene.

He J, et al. *Cancer Biol Ther.* 2007; 6(1): 76-82.

Estudos realizados em amostras tumorais exemplificam o questionamento acima. Em 2005, Katayama S e colaboradores publicaram estudo avaliando 137 casos de carcinoma de mama e expressão de ETS-1 por imunistoquímica. Não houve expressão de ETS-1 em tecido normal e em carcinomas não-invasores. Porém, dos 137 casos de câncer invasor, 104 (83,2%) expressaram o gene. A proteína ETS-1 teve correlação com o grau histológico do carcinoma ductal ( $p < 0,01$ ); sugerindo que a superexpressão ETS-1 é um dos fatores associados a

diferenciação histológica dos tumores de mama(70). Porém, não houve correlação entre sua expressão e a presença de linfonodos metastáticos, classificação T, baseado no TNM(27).

Um estudo avaliando a sobrevida do câncer de mama e a expressão da proteína PDEF por análise de PCR (reação de cadeia de polimerase) em tempo real foi publicado em 2008 por Tjensvoll K e colaboradores(71). Constatou-se não haver correlação entre a expressão da proteína e a curva de sobrevida de 192 pacientes submetidas a cirurgia para exérese da neoplasia com acompanhamento médio de 72 meses.

Flindlay VJ e colaboradores(72), baseados nos achados de expressão elevada da proteína PDEF no câncer de mama não invasivo e sua perda da expressão ao longo da progressão tumoral, demonstraram que há diferença entre os níveis de proteína PDEF e de mRNA PDEF levantando a hipótese que possa haver uma regulação postranscricional das proteínas da família ETS ainda não exploradas.

Quanto à pesquisa das proteínas da família ETS no CCR, estudos mais antigos já demonstraram associação entre ETS-1 e progressão tumoral. Toshiyuki Nakayama e colaboradores, da Universidade de Nagasaki correlacionaram a expressão desta proteína com amostras de adenoma e carcinomas em diferentes estágios por análise de PCR. Concluíram que a expressão entre os adenomas de alto grau foi de 29,3%, não havendo nenhuma expressão entre adenomas de baixo e moderado grau. Das 122 amostras de carcinoma a expressão foi detectada em 103 casos (84,4%). Além disso, em análise planejada detectou-se correlação significativamente estatística entre a presença da proteína e grau de invasão (T), presença de linfonodos metastáticos (N) e invasão venosa e linfática. Não houve correlação com o grau de displasia. Outra constatação importante foi a presença da expressão ETS-1 tanto no núcleo, como já conhecido, como no citoplasma(73).

A investigação das expressões da família Ets também foi estudada pelo Centro de Pesquisas Biológicas e Funcional (CP-BMF) e Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)(74). Em estudo recente avaliou-se a expressão de 11 genes Ets em amostras de câncer colorretal e tecido normal adjacente ao tumor através da técnica de PCR em tempo real. Dos 28 casos analisados houve diferença na quantificação das expressões dos genes ETV4, PDEF e SPI-B. Os genes ETV4 e SPI-B mostraram-se hiperexpressos no tecido neoplásico e nos linfonodos. Em contra-partida, a expressão PDEF, encontrada no citoplasma, pouco variou entre o tecido normal e o neoplásico e houve um decréscimo de 3 vezes na expressão quando analisado nas amostras com linfonodos positivos,  $P < 0,05$ .

Tumores menos frequentes também foram avaliados quanto a expressão de genes da família ETS tanto por técnica de análise imunoistoquímica quanto por PCR em tempo real. Estudos em neoplasias renais de células claras, tumores do estroma gastro-intestinal (GIST) e adenocarcinomas gástricos correlacionaram a presença de ETS-1 e PDEF com estadiamento patológico, sobrevida global e progressão tumoral (75,76,77). Os dados conflitantes entre alguns estudos e a diversidade de neoplasias são os motivos para a realização de novas pesquisas a fim de elucidar este possível alvo terapêutico e prognóstico.

### **3 - OBJETIVOS**

#### **Objetivo Geral:**

- Avaliar a expressão do fator de transcrição da família Ets em câncer colorretal.

#### **Objetivo específico primário:**

- Determinar a prevalência de expressão da fração PDEF, por imunoistoquímica, nos tumores colorretais armazenados.

#### **Objetivo específico secundário:**

- Correlacionar a expressão da proteína PDEF no tecido tumoral com características clínicas e patológicas dos pacientes com câncer colorretal.
- Correlacionar a expressão da proteína PDEF no tecido tumoral com o marcador de proliferação celular Ki-67.
- Avaliar a associação entre a expressão PDEF e a sobrevida global.

### **4 - PACIENTES E MÉTODOS**

#### **4.1 – DELINEAMENTO**

Trata-se de um estudo observacional, descritivo, analítico. Inicialmente, foi feito um estudo transversal para determinar a prevalência da expressão da proteína PDEF e Ki-67 definido por imunohistoquímica nas amostras tumorais, bem como a distribuição das características prognósticas clínicas dos pacientes incluídos. Em seguida, procedeu-se a um estudo de coorte retrospectivo para determinar a ocorrência dos desfechos clínicos de interesse nos pacientes. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital São Lucas da PUCRS sob o número 07/03601, antes de sua execução.

#### **4.2 – AMOSTRA**

Trata-se de uma amostra por conveniência, de seleção consecutiva. Foram considerados para este estudo todos os pacientes submetidos à cirurgia potencialmente curativa para câncer colorretal no Hospital São Lucas da PUCRS no período de janeiro de 2002 a junho de 2008, com registro do exame de anátomo-patológico no Serviço de Patologia desta instituição. As características clínicas dos pacientes foram definidas a partir de uma ficha preenchida durante a revisão dos prontuários. Os dados de seguimento foram obtidos através dos registros no prontuário médico das consultas de acompanhamento nos ambulatórios de oncologia e proctologia, bem como nas internações hospitalares.

#### **4.3 – CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

- Diagnóstico confirmado de adenocarcinoma colorretal;
- Estadiamento I a IIIB, de acordo com o sistema TNM;
- Margens cirúrgicas negativas;
- Tratamento adjuvante/neoadjuvante com quimioterapia e/ou radioterapia adequado com o estadiamento patológico;
- Assinatura do Consentimento Informado.

#### 4.4 – CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Doença metastática no diagnóstico, de acordo com o sistema TNM;
- Tumores de tipos histológicos especiais, diferentes de adenocarcinoma;
- Material para análise inadequado para realização do teste de imunistoquímica;
- Pacientes sem informações referentes ao seu seguimento no prontuário médico.

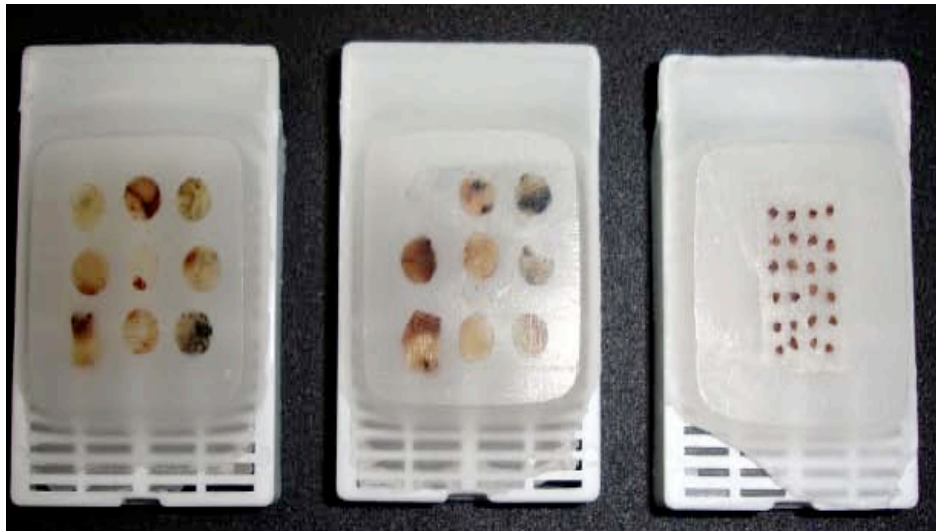
#### 4.5 – AMOSTRAS TUMORAIS E IMUNOISTOQUÍMICA

Os blocos de parafina rotineiramente processados, representativos de tumor de cada paciente incluído no estudo foram localizados no Serviço de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS e, neste mesmo Serviço, avaliados com métodos convencionais utilizando coloração hematoxilina e eosina (HE) e, após, submetidos a análise de imunistoquímica da expressão da proteína PDEF E Ki-67.

Optou-se pela realização do Ki-67 por ser um conhecido marcador de proliferação. Este encontra-se presente durante todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), mas está ausente nas células em repouso (G0), fazendo deste um excelente marcador da fração de crescimento celular. Além de marcar a proliferação neoplásica o Ki-67 é considerado fator prognóstico e está implicado no curso clínico de diversas neoplasias(78).

Foram realizados cortes histológicos de 3um de espessura em lâminas silanizadas em micrótomo rotativo Leica RT2150 e montagem dos espécimes em lâmina seguindo a técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais (TMA). Esta técnica, descrita primeiramente em 1998 por *Kononen et al*(79), permite a elaboração de um bloco de parafina contendo amostras tumorais obtidas de dezenas de blocos de parafina originais. Os cilindros teciduais ou tumorais são dispostos no bloco receptor seguindo uma ordem pré-determinada.

As vantagens deste método incluem a economia dos reagentes e do tempo para realização das reações, possibilidade de repetição destas reações em múltiplos níveis do blocos e a simplificação do trabalho das linhas de pesquisa pela utilização do bloco em mais de um projeto. Apesar de uma montagem que exige mais atenção do patologista, este método é de grande valia em estudos de larga escala e permite a uniformização das reações e sua interpretação comparativa dos casos(80) (Figura 7).



**FIGURA 7** – Blocos de parafina e TMA

As lâminas foram incubadas por uma hora em estufa histológica a 68C. Após, as lâminas foram desparafinizadas em uma série de incubações com 2 xilóis por 5 minutos cada, 4 álcoois 99° por 2 minutos cada e lavados em água destilada.

Para a recuperação antigênica utilizou-se o tampão PDEF e Citrato pH 6.0 para Ki-67. As lâminas foram submetidas ao calor elevado (+/- 100C) em panela de pressão no forno de microondas por 25 minutos seguidos de lavagem em tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada.

A peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em álcool metílico por 30 minutos e logo lavados com tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos.

Para minimizar o background (coloração de fundo) foi realizada incubação com leite em pó desnatado a 5% em tampão PBS seguidos de lavagem com tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos.



Os anticorpos primários foram diluídos em tampão PBS. A diluição aplicada foi de 1:50 para anti-PDEF (Santa Cruz Biotechnology, SC 46433, C-14) e 1:250 para anti-Ki-67 (Novocastra, NCL-MM1). A incubação foi realizada em câmara úmida com temperatura entre 4°C e 8°C em incubadora BOD por 16 horas (over night). Para remover o anticorpo utilizou-se tampão PBS e 3 incubações com tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos. A amplificação de sinal foi realizada com o Kit para imunistoquímica ultra sensível, Picture Max, ( Zymed, Invitrogen ), nas condições preconizadas pelo fabricante.

Para a revelação da reação de amplificação utilizou-se o cromógeno DAB+ (Dako) por 5 minutos de incubação. As lâminas foram lavadas em água destiladas, contra coradas com Hematoxilina de Harris seguido de lavagem rápida em solução amoniacal 1%. As lâminas foram desidratadas em uma série de 4 álcoois por 2 minutos cada, 2 xilóis por 5 minutos cada e montadas com lamínula e bálsamo do Canadá.

A leitura e interpretação das colorações realizadas foram executadas por patologista experiente em imunistoquímica. Para o Ki-67 todas as lâminas foram consideradas positivas com mensuração de suas porcentagens de expressão. A expressão da proteína PDEF, num primeiro momento, foi categorizada de forma dicotômica em positivo ou negativo.

Após esta classificação foi realizada sua leitura através de análise quantitativa da reação imunistoquímica dos receptores PDEF e Ki-67 em espécimes cirúrgicos utilizando microscópio Zeiss Axioskop 40 com óptica plan-neofluar e aumento de 400X, acoplado a sistema de captura de imagem e análise Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, EUA). A contagem foi realizada após serem feitas 4 fotografias em cada lâmina de cólon, e de cada marcador imunistoquímico para expressão PDEF. A montagem da planilha foi realizada no software Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation) com os resultados obtidos no sistema de análise de imagem Image Pro Plus 6.0.

#### **4.6 – ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Dados quantitativos foram descritos por média e desvio-padrão. Na presença de assimetria utilizamos a mediana acompanhada dos valores de percentil 25, 75 e mínimo e máximo. Para dados categóricos utilizamos contagens e percentuais.

Na comparação de variáveis quantitativas entre dois grupos utilizamos o teste t de Student ou seu substituto não-paramétrico, o teste U de Mann-Whitney. Quando havia mais de dois grupos envolvidos utilizamos o procedimento de Kruskal-Wallis. Para dados categóricos a significância das diferenças foi avaliada pelo teste de qui-quadrado ou pelo teste exato de Fisher.

Adicionalmente elaboramos curvas de Kaplan-Meier para o estudo da sobrevida entre grupos com diferentes níveis de expressão de PDEF. A comparação nesta situação foi realizada pelo teste de log rank. O nível de significância adotado foi de  $\alpha=0,05$ .

Os dados foram analisados com o auxílio do programa SPSS versão 15.0.

## 5 - RESULTADOS

### 5.1 - CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Um total de 112 casos diagnosticados no Hospital São Lucas da PUCRS entre março de 2002 a agosto de 2008 foram inicialmente selecionando para este mestrado.

Os prontuários foram revisados e os dados referentes ao acompanhamento atualizados. Foram excluídos 57 paciente por serem metastáticos (M1) no diagnóstico. Ainda, da amostra, 9 pacientes não entraram na análise por motivos diversos como: 6 pacientes por inexistência de acompanhamento, 2 por material do bloco de parafina inadequado para análise e 1 por ausência de estadiamento TNM no diagnóstico.

Desta forma, num total de 46 casos, procedeu-se, por técnica TMA, a confecção das lâminas, análise do HE, imunistoquímica na proteína PDEF e do marcador de proliferação celular Ki-67 e a quantificação por imagem do PDEF.

Dos 46 casos avaliados, a média de idade dos pacientes, no diagnóstico, foi de 61 anos, tendo o paciente mais jovem 36 anos e o mais idoso 86 anos.

Um total de 32 pacientes (69,9%) eram homens.

O marcador Antígeno Carcino-embriônico (CEA) pré-operatório obteve média de 5,5ng/dl e mediana de 3,0ng/dl. O valor mínimo do CEA encontrado de 0,5ng/dl e o valor máximo de 30,4ng/dl. Em 13 pacientes (28,3%) o CEA pré-operatório foi desconhecido.

Um total de 91,3% dos tumores era de cólon esquerdo. A localização tumoral mais frequente, em 54% dos pacientes, foi o reto, sendo o reto inferior a localização em 16 pacientes (34,8%). A topografia da lesão ficou prejudicada em 8 pacientes (17%) devido as descrições cirúrgicas e anatomopatológicas relatarem retossigmóide como local primário da neoplasia, não diferenciando entre sigmóide e reto superior.

O estadiamento pré-operatório dos pacientes, baseado no TNM, demonstrou que 21,7% dos paciente eram estágio I, o que corresponde a 10 pacientes. Classificados como estágio II, 24 pacientes (52%), sendo o estágio IIA 50% dos casos da amostra e IIB em apenas um paciente. Os pacientes estágio III corresponderam a 26%, sendo estágio IIIA 4,3% e estágio IIIB 21,7% dos pacientes.

Trinta e três pacientes (71,7%) eram estadiamento T3, 19,6% estágio T2. Apenas 2 pacientes eram T1 e 2 pacientes T4.

A mediana (percentil25-percentil75) de linfonodos examinados descrito no laudo anatomopatológico, por paciente, foi 13 (7-19,5), sendo que 21 casos (45%) possuíam menos de 12 linfonodos examinados. Do total da amostra, 71,7% dos pacientes eram linfonodos negativos.

Quanto ao tratamento adjuvante, este foi realizado em aproximadamente metade dos pacientes. Radioterapia foi indicada em 41,3%, sendo que 4 pacientes realizaram radioterapia pré-operatória. A quimioterapia, baseada em 5FU/LV, foi realizada por 56,5%, sendo pré-operatória num total de 4 pacientes.

Dos pacientes que foram submetidos à radioterapia 78,3% terminaram o tratamento. No grupo submetido à quimioterapia 67,9% terminaram o tratamento proposto e 10,7% o fizeram de forma parcial. Isto corresponde a 3 pacientes que interromperam o tratamento por toxicidade.

As principais características clínicas e patológicas dos pacientes estão demonstradas na Tabela 9:

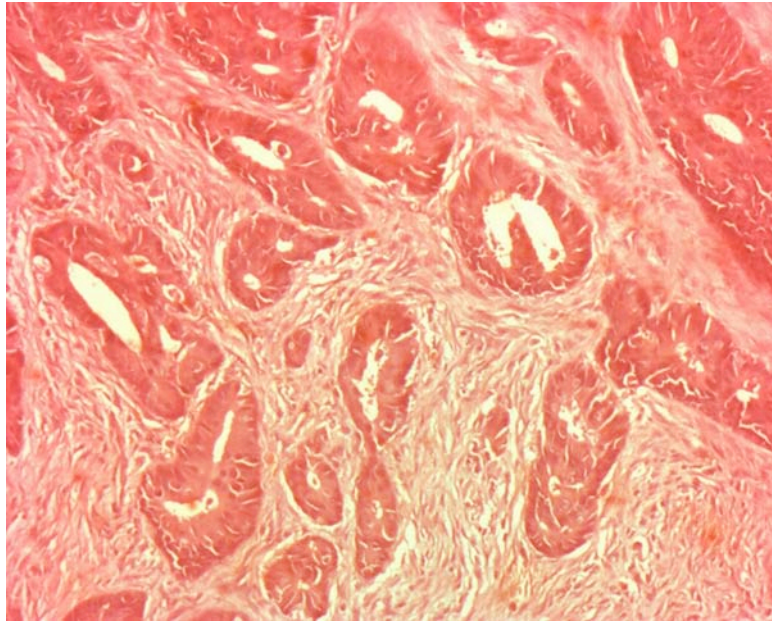
**TABELA 9** – Descrição das características clínico-patológicas dos pacientes com câncer colorretal.

Característica	Estatística Descritiva
	n = 46
Idade, anos	61,2±12,8
Sexo masc, n° (%)	32 (70)
CEA, ng/dl	n = 33 3,0 (2,3 a 5,9) [0,5 a 30,4]
Local, n° (%)	n = 46
Reto	25 (54)
Retossigmóide	8 (17)
c. descendente	9 (20)
c. ascendente	3 (7)
c. transverso	1 (2)
Classificação TNM, n° (%)	
I	10 (22)
II	24 (52)
III	12 (26)
Linfonodos (+), n° (%)	13 (28)
Radioterapia, n° (%)	n = 43
Sim	15 (33)
sim, neoadjuvante	4 (9)
Não	24 (52)
Quimioterapia, n° (%)	n = 43
Sim	22 (48)
sim, neoadjuvante	4 (9)
Não	17 (37)
Subtipo histológico, n° (%)	n = 46
Adenocarcinoma	39 (85)
Mucinoso	7 (15)
Tempo de seguimento, meses	23,2 (11,1 a 53,8) [0,9 a 81,2]

Os dados são apresentados como média±desvio padrão, mediana (percentil 25 a percentil 75), [mínimo a máximo] ou contagem (%). CEA: antígeno carcino-embriônico, TNM: tumor, nódulos (linfonodos) e metástase.

## 5.2 ANÁLISE HE

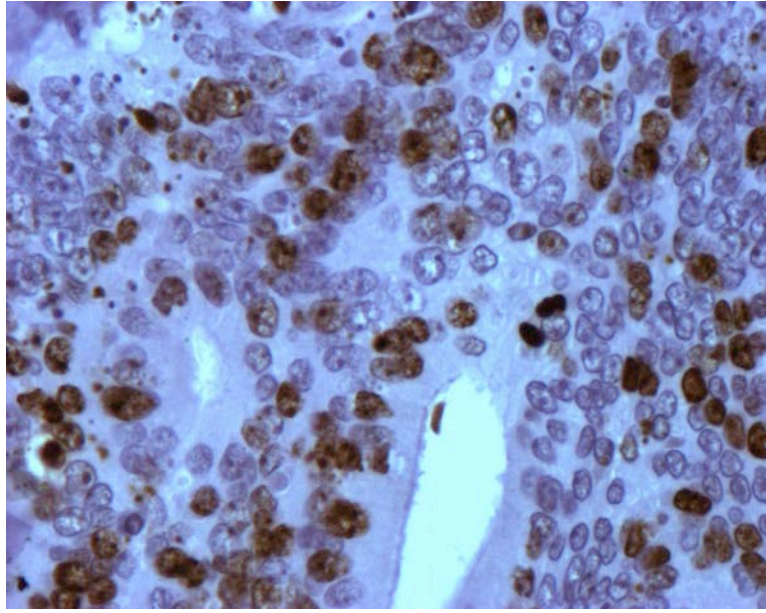
Da amostra de 46 pacientes, 15,2% eram subtipo histológico mucinoso e 84,8% eram adenocarcinoma( Figura 8). O grau de diferenciação foi moderado quase na totalidade dos casos, com exceção de 1 paciente cuja histologia era pobremente diferenciada.



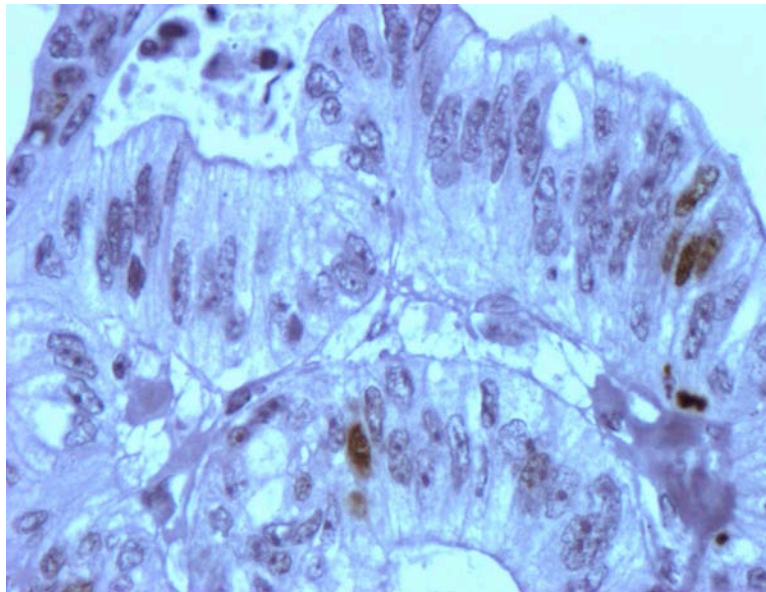
**FIGURA 8** – Coloração hematoxilina/eosina (HE).

### **5.3 - EXPRESSÃO Ki-67**

A reatividade ao Ki-67 ocorreu em todos os pacientes, com média de expressão de 32,5%. Foi considerado alto, 50%, em 13 pacientes. Em 7 pacientes, a expressão foi considerada baixa, menos de 10% de expressão (Figura 9 e 10).



**FIGURA 9** – Expressão elevada, por imunohistoquímica, do Ki-67.

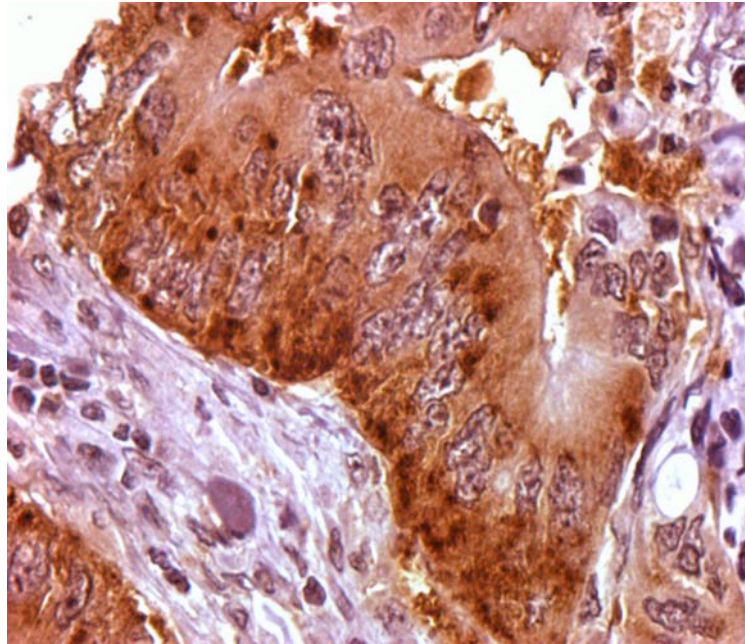


**FIGURA 10** – Expressão baixa, por imunohistoquímica, do Ki-67.

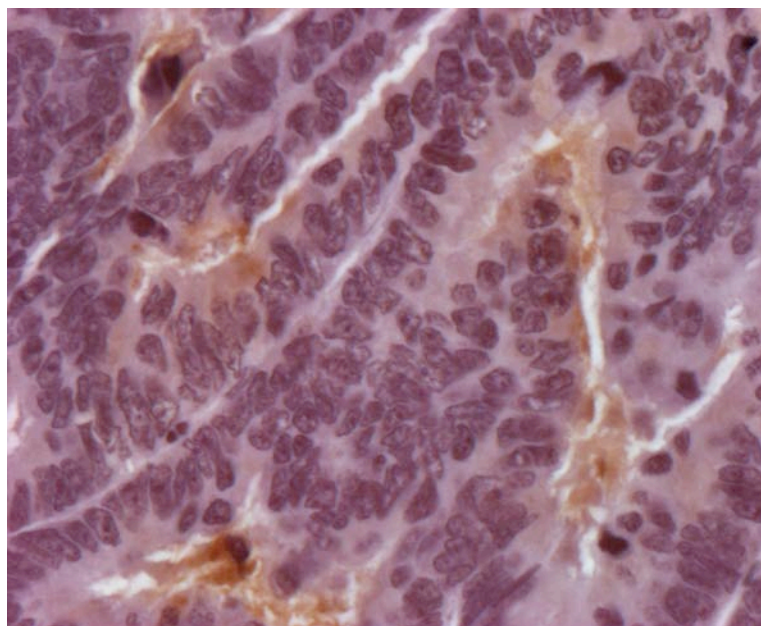
#### **5.4 – EXPRESSÃO DO PDEF**



Após quantificação por imagem, a mediana (mínimo-máximo) da expressão da proteína PDEF nos 46 pacientes examinados foi de 24,1 (11,1-42,1). A média (+DP) de células analisadas foi de 448 (+97).



**FIGURA 11** – Expressão elevada, por imunohistoquímica, da proteína PDEF.



**FIGURA 12** – Expressão baixa, por imunohistoquímica, da proteína PDEF.



## 5.5 – EXPRESSÃO DO PDEF E ACHADOS CLÍNICOS-PATOLÓGICOS

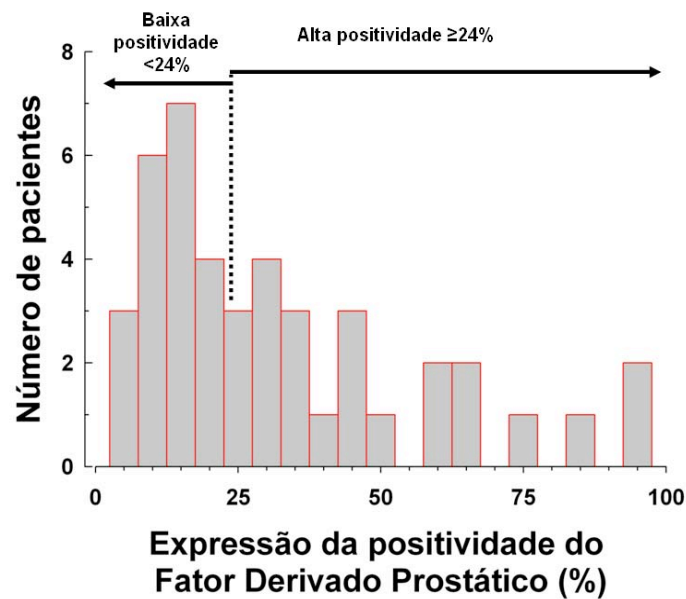
Não se observou associação significativa entre a expressão da proteína PDEF e as características clínico-patológicas: idade, gênero, topografia da lesão, CEA e presença de linfonodos positivos.

Os fatores clínicos e patológicos dos pacientes foram reavaliados e não se encontrou associação com significância estatística entre estes dados e a expressão do PDEF.

A positividade da expressão da proteína PDEF foi dividida em alta e baixa, conforme sua mediana (24%) em expressão da proteína PDEF. Foi considerada baixa em 21 pacientes com mediana de expressão 11% e alta em 22 pacientes com mediana de expressão de 41,8%.

A média de idade (DP) dos pacientes com baixa expressão foi de 63 anos (10,6) e a média de idade dos pacientes com alta positividade foi de 61,4 anos (14,2),  $P=0,66$ . Eram do sexo masculino 16 pacientes (76%) do grupo de baixa expressão e 14 (64%) do grupo de alta positividade,  $P=0,57$ .

Não foi encontrada diferença na expressão PDEF quando correlacionada com a topografia da neoplasia,  $P=0,23$ . O CEA teve mediana de 2,6ng/dl nos pacientes de baixa expressão e 3,7ng/dl nos pacientes com alta expressão,  $P=0,22$ . A presença de linfonodos positivos também não atingiu significância estatística,  $P=0,44$  (Figura 13 e Tabela 10).



**FIGURA 13** – Distribuição de frequências da expressão da positividade do Fator Derivado Prostático (PDEF).

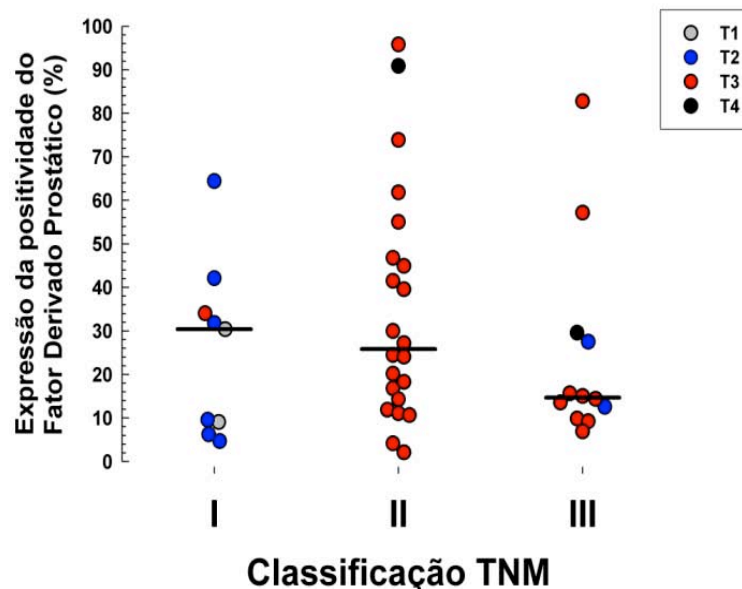
**TABELA 10** – Comparação dos grupos de baixa positividade (<24%) e alta positividade (≥24%) do Fator Derivado Prostático (PDEF)

Característica	Baixa positividade <24% (n=21)	Alta positividade ≥24% (n=22)	
PDEF, (%)	11,1 [2,1 a 20,2]	41,8 [24,1 a 95,8]	30,1±24,5 24,1 (11,1 a 42,1) [2,1 a 95,8]
			P
Idade, anos	63,2±10,6	61,4±14,2	0,66 <sup>[1]</sup>
Sexo masc, n° (%)	16 (76)	14 (64)	0,57 <sup>[2]</sup>
Local, n° (%)			0,23 <sup>[3]</sup>
Reto	11 (52)	12 (55)	
Retossigmóide	2 (10)	6 (27)	
c. descendente	6 (28)	2 (9)	
c. ascendente	2 (10)	1 (5)	
c. transversal	0 (0)	1 (5)	
CEA, ng/dl	2,6 [0,7 a 16,7]	3,7 [0,5 a 7,5]	0,22 <sup>[4]</sup>
Linfonodos (+), n° (%)	8 (38)	5 (23)	0,44 <sup>[2]</sup>

Os dados são apresentados como mediana (percentil 25 a percentil 75), [mínimo a máximo]; média±desvio padrão, contagem (%). P: significância estatística, [1]: t de Student, [2]: qui-quadrado, [3]: exato de Fisher e [4] teste U de Mann-Whitney. PDEF: fator derivado prostático, CEA: antígeno carcino-embriônico

Não foi encontrada correlação entre a presença de linfonodos positivos e a perda da expressão do PDEF. A média da expressão em pacientes com linfonodos negativos foi de 32% comparada com 25% nos pacientes linfonodos positivos,  $P=0,459$ .

Quando os casos foram agrupados em estágios I, II e III, segundo TNM, a expressão da proteína obteve média de 30,3%, 25,8%, 14,7%, respectivamente,  $P=0,416$ . Observa-se uma tendência a queda da expressão da proteína PDEF quando correlacionada ao estadiamento; porém, sem significância estatística (Figura 14).



**FIGURA 14** – Comparação da expressão da positividade do Fator Derivado Prostático (PDEF) segundo a classificação TNM.

A expressão da proteína PDEF foi comparada à expressão do Ki-67, não houve correlação significativa.

## 5.6 – EXPRESSÃO DO PDEF E SOBREVIDA

O seguimento médio dos pacientes foi de 31 meses, mediana de 23 meses. Apenas 6 pacientes tiveram recidiva e óbito pela neoplasia neste período. Quando analisado a sobrevida

livre de doença (SLD) dos pacientes, através da curva de Kaplan-Meier, separando-os nos grupos de alta e baixa expressão do PDEF não foi constatada diferença significativa na sobrevida (Figura 15).

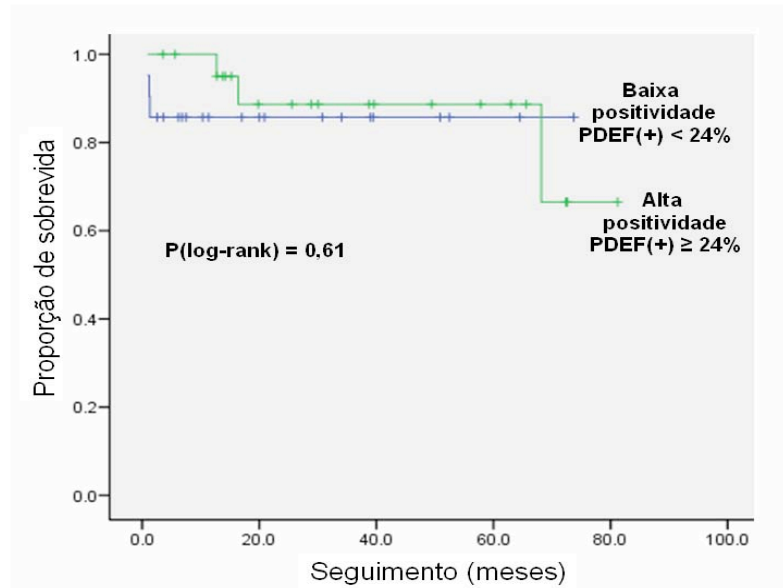


FIGURA 15 – Comparação de curvas de Kaplan-Meier para ocorrência de óbito entre os grupos de alta e baixa expressão da positividade do Fator Derivado Prostático (PDEF).

## 6 - DISCUSSÃO

O CCR situa-se entre o grupo de neoplasias mais frequentes no mundo ocidental. É a terceira causa mais comum de câncer em ambos os sexos, e a segunda causa em países desenvolvidos. A sobrevida desta neoplasia é considerada excelente, quando a doença é diagnosticada em estágios iniciais. Para este sucesso terapêutico contribuem: o diagnóstico precoce mais eficiente, as melhorias das técnicas cirúrgicas e, o desenvolvimento de fármacos mais ativos. Por estes motivos, há uma necessidade constante de validação de marcadores prognósticos que permitam a individualização nos tratamentos quimioterápicos, valendo-se do princípio que a heterogeneidade da doença exige tratamentos talhados caso-a-caso, principalmente no estágio II do CCR. Os fatores prognósticos em uso atualmente dependem de variáveis clínicas e histológicas(43). Recentemente, marcadores como a deleção de 18q, instabilidade de microssatélites ou mutações de KRAS, levaram a modificação de terapêutica dos pacientes metastáticos(81,82).

Na última década, a descoberta de quase três dezenas de genes envolvidos em mecanismos de transcrição, e que foram agrupados sob o nome de família Ets, abriu a possibilidade para que novos marcadores de neoplasias poderiam ser gerados a partir da detecção do mal-funcionamento destes genes. A família de genes Ets é responsável por uma orquestração de proteínas que em última análise pode ativar ou reprimir a transcrição de genes essenciais para sobrevivência celular. Alguns dos genes Ets foram implicados na carcinogênese do câncer de mama, próstata e cólon. Um dos últimos membros da família Ets a ser identificado, PDEF, foi recentemente associado ao prognóstico e a sobrevida de neoplasias como mama e ovário(60,61,64). Porém, ainda são contrversos devido a seleção de linhagens celulares, ao número limitado de pacientes e as diferentes técnicas de análise da expressão gênica (imunoistoquímica, PCR tempo real). Até o momento, não há estudo correlacionando PDEF em uma coorte de pacientes com CCR.

Em nosso estudo, dos 46 casos avaliados, todos tratados no Hospital São Lucas PUCRS, a média de idade foi idade foi 61,2 anos. Em torno de 40% dos pacientes a neoplasia foi diagnosticada antes dos 60 anos, mostrando uma faixa etária um pouco mais jovem do que os dados da literatura. Há necessidade, nestes pacientes, de uma análise da história familiar de neoplasia colorretal e de outros tumores relacionados já que o CCR em idades mais precoces está associado a heranças familiares e genéticas(1). O predomínio da neoplasia em homens,

coincide com a incidência mundial; porém, na região Sul do Brasil, conforme dados do INCA, temos um leve predomínio feminino. Como em nosso trabalho não houve diferença com significância estatística entre o número de pacientes do sexo feminino e masculino é bem provável que este predomínio tenha surgido ao acaso.

Do total da amostra, 91,3% eram tumores do cólon esquerdo, tendo um predomínio de tumores de reto (54%), o que é condizente com os dados da literatura (1,17). Também, tem-se constatado que a ação de agentes carcinógenos, fatores genéticos como genes de reparo e instabilidade de microssatélite vêm contribuindo para esta migração da doença do cólon esquerdo para o direito(1).

A mediana do nível do CEA foi de 3,0ng/dl, correspondendo aos níveis encontrados em estágios iniciais da neoplasia. Os estágios mais iniciais e o nível de CEA baixo, demonstram um melhor prognóstico(46). Dados como invasão vascular e linfática tem importância prognóstica principalmente em pacientes estágio II; porém, a maior parte dos anatomopatológicos não avaliou estes dados, sendo então estes excluídos da análise do estudo.

Todos pacientes com linfonodos positivos receberam quimioterapia e/ou radioterapia adjuvante. A presença de menos de 12 linfonodos isolados na peça cirúrgica nos pacientes estágio clínico II poderia implicar em viés na adjuvância, porém estes pacientes foram considerados alto risco e, com exceção de 3 pacientes, todos receberam adjuvância. Os dados do ASCO(43) e do NCCN(44) recomendam tratamento quimioterápico e/ou radioterápico a pacientes estágio II de alto risco, pois foram demonstrados em estudos prospectivos e controlados haver benefício em SLD e SG nestes pacientes.

A escolha dos quimioterápicos está embasada nos dados de estudos iniciais com 5FU/LV. Nenhum paciente estágio III recebeu esquema FOLFOX, documentadamente mais eficiente que 5FU/LV(38). Apenas 4 pacientes foram tratados antes da publicação do estudo MOSAIC demonstrando que até recentemente este esquema era inacessível para pacientes do Sistema Único de Saúde, como os do presente estudo.

Obtivemos um tempo de acompanhamento mediano de 23 meses, o que é pequeno para um estudo de coorte. Porém, estudos que testaram adjuvância no CCR mostraram uma forte correlação entre SLD em 2 anos e SG(29), o que sugere que este tempo de acompanhamento poderia ser suficiente para a avaliação do papel de PDEF como marcador de

prognóstico. O número de eventos (recidiva de doença + morte) foi pequeno. Provavelmente as características clínicas, o baixo valor do CEA pré-operatório e a adjuvância realizada pela maioria dos pacientes contribuíram para este achado. Além disso, na literatura, a SG dos pacientes estágio II, que corresponderam a 47% da amostra, é em torno de 80-85% (1).

Baseado no TNM(27), excluímos os pacientes estágio clínico IV. Esta exclusão baseia-se na análise dos primeiros estudos publicados por Rodabaugh KJ e colaboradores(65) em câncer de ovário. Rodabaugh não conseguiu definir, em seu estudo, se as expressões de PDEF eram um evento precoce ou tardio da carcinogênese, por ter em sua amostra um grande número de pacientes com doença clinicamente avançada. Nossos dados da análise imunohistoquímica, de expressão da proteína PDEF apenas no tecido neoplásico e de 30,3% de expressão nos pacientes estágio I corroboram com o fato de que o PDEF está presente nos estágios iniciais da carcinogênese. Achados semelhantes foram publicados em câncer de ovário com 27% de expressão de PDEF no estágio I da neoplasia(65). Outros membros da família Ets também tiveram sua expressão negativa no tecido normal. A proteína ETS-1 foi negativa no tecido de cólon normal e obteve 84,4% de expressão na neoplasia invasiva(73).

Um estudo prévio realizado pelo nosso grupo e submetido a publicação mostrou correlação entre os genes ETS-1, PDEF e SPI-B e progressão tumoral em amostras a fresco em tecido de câncer colorretal(74). Demonstrou-se que o gene PDEF, analisado por PCR em tempo real, tem papel repressor da carcinogênese no CCR. Há uma perda de expressão na ordem de três vezes em amostras teciduais de pacientes com linfonodos positivos quando comparados a amostras de pacientes com linfonodos negativos. Para uma análise retrospectiva de um número maior de pacientes, não dispunhamos de tecido a fresco, portanto não foi possível a repetição do experimento neste outro contexto. Como tínhamos disponíveis amostras em parafina, optamos em trabalhar com técnica de imunohistoquímica. Em nosso estudo utilizamos técnica de TMA que tem como vantagem sobre a IH realizada lâmina-a-lâmina, permitindo redução de custos, uniformização das reações e simplificação da análise.

Os dados de queda da expressão da proteína PDEF com significância estatística no estudo em PCR tempo real, não se refletiu em diferenças de expressão de PDEF or IH no presente estudo. Provavelmente, a diferença no perfil dos pacientes tenha contribuído para este achado. Em nosso estudo há mais pacientes estágio clínico II (47% da amostra) e não há pacientes estágio clínico IV. A qualidade de armazenamento dos blocos de parafina e a análise

apenas no tecido tumoral do cólon e não nos linfonodos também influenciou a diferença dos resultados.

Por se tratar de uma coorte de pacientes com CCR, iniciada em 2002, muitos pacientes não possuíam material a fresco armazenado, em qualidade adequada, para realização de PCR em tempo real. Admitimos que esta técnica possa ser superior e mais adequada que a imunohistoquímica para a análise da expressão gênica, mas esta última tem como vantagem a ampla disponibilidade em laboratórios de patologia, o que facilita a sua disseminação como método de rotina em avaliações prognósticas.

Como resultado principal encontramos uma tendência à perda da expressão da proteína PDEF em relação ao estadiamento clínico dos pacientes. Os valores de expressão do PDEF foram 30,3%, 25,8% e 14,7% em estágios I, II e III dos pacientes com CCR, respectivamente. A queda da expressão demonstrada entre o estágio inicial (I) e o estágio com linfonodos positivos (III) nos faz acreditar que este gene da família Ets faça parte da carcinogênese do CCR. Correlacionamos a expressão do marcador de proliferação celular Ki-67 com a expressão do PDEF e não obtivemos significância estatística sugerindo que a perda da expressão seja independente da marcação de proliferação celular. Quando os pacientes foram separados conforme seus níveis de expressão do PDEF baseados na mediana, não houve correlação com a sobrevida, demonstrado na curva de Kaplan-Meier. O pequeno número de eventos e a amostra restrita a casos iniciais com prognóstico mais favorável contribuíram para a falta de significância estatística ( $P=0,61$ ). Porém, dados semelhantes de ausência da correlação de sobrevida e perda da expressão gênica também foram publicados em câncer de mama por Tjensvoll K e colaboradores com uma amostra maior com 192 pacientes e acompanhamento longo de 72 meses(71).

A questão do papel da proteína PDEF em CCR merece ser estudaada mais profundamente. Na nossa casuística, o uso de metodologias que permitam a realização de PCR em tempo real a partir de métodos de extração do RNA destes blocos de parafina seria muito útil. O aumento do acompanhamento destes pacientes também poderia nos auxiliar a discriminar melhor grupos que progridem e grupos de indivíduos provavelmente curados. Além disso o trabalho com anticorpos que avaliem outros epitopos de PDEF poderia fornecer mais informações sobre a intensidade de expressão ou expressão aberrante da proteína. A análise de um maior número de membros da família Ets também se tornaria interessante. Não está claro na literatura se há interações entre membros desta família e a carcinogênese nos



diversos tumores (61). A escolha desta neoplasia foi considerada, por nós, adequada já que a incidência do CCR na região Sul é alta e há necessidade de se aperfeiçoar ferramentas de definição prognóstica nesta doença melhorando as indicações terapêuticas e, com isso, obtendo melhores resultados em SLD e SG.

Embora os níveis de significância estatística não tenham sido atingidos, parece haver uma tendência a perda da expressão da proteína PDEF a medida que a progressão dos estágios iniciais do CCR para os avançados. Este membro da família Ets, envolvido em diversos mecanismos celulares como invasividade, motilidade, crescimento e metastatização torna-se um possível alvo prognóstico e terapêutico. Há necessidade de estudos adicionais, com desenho prospectivo, maior número de pacientes, acompanhamento mais longo além da revisão das técnicas de análise gênica hoje empregadas.

## 7 - CONCLUSÕES

- 1 – Todos os espécimes de câncer de corretal mostraram expressão da proteína PDEF.
- 2 – Não houve associação entre as características clínicas, o marcador de proliferação Ki-67 e os níveis de expressão da proteína PDEF.
- 3 – Houve uma tendência à correlação entre a perda da expressão da proteína PDEF e os estágios mais avançados da neoplasia.
- 4 – Não houve associação entre sobrevida livre de doença e expressão da proteína PDEF.

## 8 - REFERÊNCIAS

- 1 – Libutti SK, Saltz LB, Rustgi AK, Tepper JE. Cancer of the colon. In: DeVita, Hellman Rosenberg. Cancer Principles and Practice. 7<sup>th</sup>ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Cap 29, section 8, p.1061-1109.
- 2 – Parkin DM, Pisani P. Global Cancer Statistics. CA Cancer J Clin 1999; 49: 33.
- 3 – Liebermann DA, Weiss DG, Bond JH, et al. Use of Colonoscopy to Screen Asymptomatic Adults for Colorectal Cancer. Veterans Affairs Cooperative Study Group 380. N Engl J Med 2000, 343: 162-168.
- 4 – Estimativa da Incidência de Câncer no Brasil para 2008. Disponível em < <http://www.inca.gov.br/estimativas/2008> > acesso em 03 de janeiro de 2009.
- 5 – Nelson RI, Persk YV, Turyk M, Determinations of Factors Responsible for the Declining Incidence of Colorectal Cancer. Dis Colon Rectum 1999, 82: 915.
- 6 – Vettore A, Caballero O. Câncer colorretal. Em: Ferreira CG e Rocha JC. Oncologia Molecular. 1<sup>a</sup> ed. Atheneu. Cap. 17, p:171-181.
- 7 – Hamilton SR. The molecular genetics of colorectal neoplasia. Gastroenterology 1993; 105: 3-7.
- 8 – Morson, BC. The polyp-cancer sequence in the larger bowel. Proc R Soc Med 1974; 67: 451-457.
- 9 - Kyzer S, Begin LR, Gordon PH, Mitmaker B. The care of patients with colorectal polyps that contain invasive adenocarcinoma. Endoscopic polypectomy or colectomy? Cancer 1997; 70: 2044-2050.
- 10 - Pollard CW, Nivatvongs S, Rojanasakul A, Reiman HM, Dozois RR. The fate of patients following polypectomy alone for polyps containing invasive carcinoma. Dis Colon Rectum 1992; 35: 933-937.
- 11 - Winawer SJ, Zauber AG, O'Brien MJ, Ho MN, Gottlieb L, Sternberg SS, Waye JD, Bond J, Schapiro M, Stewart ET, Panish J, Ackroyd F, Kurtz RC, Shike M, for The National Polyp Study Workgroup. Randomized comparison of surveillance intervals after colonoscopic removal of newly diagnosed adenomatous polyps. The National Polyp Study Workgroup. N Engl J Med 1993; 328: 901-906.

- 12 - Ponz de Leon M, Antonioli A, Ascari A, Zanghieri G, Sacchetti C. Incidence and familial occurrence of colorectal cancer and polyps in a health-care district of northern Italy. *Cancer* 1987; 60: 2848-2859.
- 13 - Kampman E, Giovannucci E, van 't Veer P, Rimm E, Stampfer MJ, Colditz GA, Kok FJ & Willett WC. Calcium, vitamin D, dairy foods, and the occurrence of colorectal adenomas among men and women in two prospective studies. *Am J Epidemiol* 1994; 139: 16-29.
- 14 - Ransohoff DF, Sandler RS. Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2002; 346: 40-44.
- 15 - Vogelstein B et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Eng J Med* 1988; 319: 525-532.
- 16 - Houlston RS. What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *Mol Pathol* 2001; 54: 206-14.
- 17 - Bosman RF. Molecular pathology of colorectal cancer. *Cytogenet Cell Genet* 1999; 86: 112-117.
- 18 - Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5): 759-767.
- 19 - Herrera L, Kakati S, Gibas I, Pietrzak E, Sandberg AA. Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Genet* 1986; 25(3): 473-476.
- 20 - Bodmet WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P et al. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 1987; 328(6131): 614-616.
- 21 - Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001; 344: 1196-1206.
- 22 - Jen J, Kim H, Piantadosi S, et al. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994; 331: 213-221.
- 23 - Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816.
- 24 - Kohonen-Corish MR, Daniel JJ, Chan C, et al. Low microsatellite instability is associated with poor prognosis in stage C colon cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2318-2324.
- 25 - Locker GY, Hamilton S, Harris J, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5313-5327.
- 26 - PINHO MSL .Câncer colorretal com instabilidade de microssatélites: Uma doença diferente. *Rev bras Coloproct* 2002; 22(2): 139-144.
- 27 - Greene FL, Page D, Morrow M, Balch C, Haller D, Fritz A, Fleming I, eds. *AJCC Cancer Staging Manual* 6th ed. New York: Springer; 2002.
- 28 - Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol* 2004; 22(10): 1797-1806.

- 29 – Sargent DJ, Patiyil S, Yothers G, et al. End point for colon cancer adjuvant trials: observations and recommendations based on individual patient data from 20,898 patients enrolled onto 18 randomized trials from the ACCENT group. *J Clin Oncol* 2007; 25(9): 4569-4574.
- 30 – Wolmark N, Fisher B, Rockette H et al. Postoperative adjuvant chemotherapy or BCG for colon cancer: results from NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 30.
- 31 – O`Connell MJ, Laurie JA, Kahn M et al. Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *J Clin Oncol* 1997; 15: 246-250.
- 32 – Efficacy of adjuvant fluorouracil and folic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of colon cancer trial (IMPACT) investigators. *Lancet* 1995; 345: 939.
- 33 - O`Connell MJ, Laurie JA, Kahn M et al. Prospectively randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy in patients with high-risk colon cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 295-300.
- 34 - Poplin EA, Benedetti JK, Estes NC et al. Phase III Southwest Oncology Group 9415/Intergroup 0153 randomized trial of fluorouracil, leucovorin and levamisole versus fluorouracil continuous infusion and levamisole for adjuvant treatment of stage III and high-risk stage III colon cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(9): 1819-1825.
- 35 – Twelves C, Wong A, Nowacki MP, et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med* 2005; 352: 2696-2704.
- 36 – Lembersky BC, Wieand HS, Petrelli NJ, et al. Oral uracil and tegafur plus leucovorin compared with intravenous fluorouracil and leucovorin in stage II and III carcinoma of the colon: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol C-06. *J Clin Oncol* 2006; 24(13): 2059-2064.
- 37 – Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E et al. FOLFIRI Followed by FOLFOX6 or the Reverse Sequence in Advanced Colorectal Cancer: A Randomized GERCOR Study. *J Clin Oncol* 2004; 22(2): 229-237.
- 38 – Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L et al. Multicenter International Study of oxaliplatin/5-fluorouracil/leucovorin in the adjuvant treatment of colon cancer (MOSAIC) investigators. Oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2343-2351.
- 39 – Wolmark N, Wieand HS, Kuebler JP et al. A phase III trial comparing FULV to FULV + oxaliplatin in stage II e III carcinoma of the colon: results of NSABP Protocol C-07. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005; 23: 3500a.
- 40 – Van Cutsem E, Labianca R, Hossfeld D et al. Randomized phase III trial comparing infused irinotecan/5-fluorouracil(5-FU)/folinic acid (IF) versus 5-FU/FA (F) in stage III colon cancer patients. PETACC 3. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005; 23: 8a.
- 41 – Ychou M, Raoul J, Douillard J et al. A phase III randomized trial of LV5FU2+CPT-11 vs. LV5FU2 alone in adjuvant high risk colon cancer. Accord02. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005; 23: 3502a.

- 42 – Mamounas E, Wieand S, Wolmark N et al. Comparative efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with Dukes`B versus Dukes`C colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies (C-01, C-02, C-03 e C-04). *J Clin Oncol* 1999; 17(5): 1349-1355.
- 43 – Benson AB 3<sup>rd</sup>, Sharag D, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology Recommendations on Adjuvant Chemotherapy for Stage II Colon Cancer. *J Clin Oncol* 2004, 22(16): 3408-3419.
- 44 – National Comprehensive Cancer Network Guidelines on Treatment of Colon Cancer. Disponível em < [http://www.nccn.org/physician\\_gls/default.asp](http://www.nccn.org/physician_gls/default.asp) > acesso em 03 de janeiro de 2009.
- 45 – Eastern Cooperative Oncology Group. Disponível em < <http://ecog.dfci.harvard.edu/general/gistudies.html> > acesso em 03 de janeiro de 2009.
- 46 – Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonalds J, Somerfield M et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(33): 5313–5327.
- 47 - Wasylyk C, Kerckaert JP, Wasylyk B. A novel modulador domain of Ets transcription factor. *Genes Dev* 1992; 6: 965-974.
- 48 – Cheng-Cheng H., Takis S. P. and Narayan K. B. a Variant form of ETS1 Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Cell. *Oncogene*. 1997; 15: 851-856.
- 49 – Leprince D., Gegonne A., Coll J., De Taisne C., Schneeberger A., Stehelin D. A Putative Second Cell-derived Oncogene of Avian Leukaemia Retrovirus E26. *Nature* 1983; 306: 395-397.
- 50 – Graves B. J., Petersen J. M. Specificity within the ETS Family of Transcription Factors. *Adv Cancer Res*.1998; 75: 1-55.
- 51 – Oikawa T., Yamada T. Molecular Biology of the ETS Family of Transcription Factors. *Gene* 2003; 303: 11-34.
- 52 – Spyropontoulos D. D., Pharr P. N., Lavenburg K. R., Jackers P., Papas T., Ogawa M. and Watson D. K. Hemorrhage, Impaired Hematopoiesis and Lethality in Mouse Embryos Carrying a Targeted Factor. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 5643-5652.
- 53 – Yamamoto H., Flannery M., Kupryanov S., Pearce J., McKercher S. R., Henkel G. W., Maki R. A., Werb Z. and Oshima R. G. Detective Trophoblast Function in Mice With a Targeted Mutation of ETS-2. *Gene Dev* 1998; 12: 1315-1326.
- 54 – Gilliland D. G. The Diverse Role of ETS Family of Transcription Factor in Cancer. *Clin Cancer Reseach* 2001; 7: 451-453.
- 55 – Hsu T., Trojanowsha M., Watson D. K. ETS Proteins in Biological Control and Cancer. *J Cell Biochem* 2004; 91: 896-903.

- 56 – Oikawa T. ETS Transcription Factors: Possible Targets for Cancer Therapy. *Cancer Sci* 2004; 95(8): 626-633.
- 57 – Oettgen P, Finger E, Sun Z, et al. PDEF, a novel prostate epithelium-specific ETS transcription factor, interacts with the androgen receptor and activates prostate-specific antigen gene expression. *J Biol Chem* 2000; 275:1216-1225.
- 58 – Gu X, Zerbini L, Out H, Bhasin M, Yang Q, Joseph M, Grall F et al. Reduced PDEF expression increases invasion and expression of mesenchymal genes in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67(9):4219-4227.
- 59 – Nozawa M, Yomogida K, Kanno N, Nonomura N, Miki T, Okuyama A, Nishimune Y, Nozaki M. Prostate-specific transcription factor hPSE is translated only in normal prostate epithelial cells. *Cancer Res* 2000; 60: 1348-1352.
- 60 – Seth A, and Watson D K. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur. J Cancer* 2005; 41: 2462-2478.
- 61 – Feldman R, Sementcheko V, Gayed M, Fraig M, Watson D. Pdef expression in human breast cancer is correlated with invasive potencial and altered gene expression. *Cancer Research* 2003; 63:4626-4631.
- 62 – Thiery J. P. Ephitelial-Mesenchymal Transitions in Tumor progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 442-454.
- 63 – Davidson B, Reich R, Golberg I, et al. Ets-1 messenger RNA expression is a novel marker of poor survival in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 551-557.
- 64 – Davidson B, Risberg B, Golberg I, et al. Ets-1 mRNA expression in effusions of serous ovarian carcinoma patients is a marker of poor outcome. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 1493-1500.
- 65 – Rodabaugh KJ, Mhaweck-Fauceglia P, Groth J, Lele S, Sood AK. Prostate-derived Ets factor is overexpressed in serous ephitelial ovarian tumor. *Int J Gynecol Pathol* 2007; 26(1): 10-15.
- 66 – Ghadersohi A, Odunsi K, Zhang S, Azrak RG, Bundy BN, Manjili MH, Li F. Prostate-derived Ets transcription factor as a favorable prognostic marker in ovarian cancer patients. *Int J Cancer* 2008; 123(6): 1376-1384.
- 67 – He J, Pan Y, Hu J, Albarracin C, Wu Y, Dai JL. Profile of Ets gene expression in human breast carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2007; 6(1): 76-82.
- 68 - Buggy Y, Maguine TM, Merreal G, McDermott E, Hill A, O'Higgins N, Duffy MJ. Overexpression of the Ets-1 transcription factor in human breast cancer. *Br J Cancer* 2004; 91: 1308-1315.
- 69 – Span PN, Manders P, Heuvel JJ, Thomas CM, Bosch RR, Beex LV, Sweep CG. Expression of the transcription factor Ets-1 is an independent prognostic marker for relapse-free survival in breast cancer. *Oncogene* 2002; 21: 8506-8509.

- 70 – Katayama S, Nakayama T, Ito M, Naito S, Sekine I. Expression of the Ets-1 proto-oncogene in human breast carcinoma: differential expression with histological grading and growth pattern. *Histol Histopathol.* 2005; 20(1): 119-126.
- 71 – Tjensvoll K, Gilje B, Oltedal S, Shammas VF, Kvaloy JT, Heikkila R, Nordgard O. A small subgroup of operable breast cancer patients with poor prognosis identified by quantitative real-time RT-PCR detection of mamoglobin A and trefoil factor 1 mRNA expression in bone marrow. *Breast Cancer Res Treat* 2008;
- 72 – Findlay VJ, Turner DP, Moussa O, Watson DK. Micro-RNA-mediated inhibition of prostate-derived Ets factor messenger RNA translation affects prostate-derived Ets factor regulatory networks in human breast cancer. *Cancer Res* 2008; 68(20): 8499-8506.
- 73 – Nakayama T, Ito M, Ohtsuru A, Naito S, Sekine I. Expression of the Ets-1 proto-oncogene in human colorectal carcinoma. *Mod Pathol* 2001; 14(5): 415-422.
- 74 – Deves C, Renck D, Garicochea B, Silva VD, Lopes TG, Fillman H, Fillman L, Basso LA, Santos DS, Batista EL. Analysis of select members of the E26(ETS) transcription factors as markers of colorectal cancer progression. Manuscript submetido à revista *Cancer Epidemiology and Biomarkers*, 2009.
- 75 – Mikami S, Oya M, Mizuno R, Murai M, Mukai M, Okada Y. Expression of Ets-1 in human clear cell renal cell carcinomas: implications for angiogenesis. *Cancer Sci* 2006; 97(9): 875-882.
- 76 – Nakayama T, Yoshizaki A, Naito S, Wen CY, Alivop G, Yakata Y, Sekine I. Expression of Ets-1 proto-oncoprotein in gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas and schwannomas. *World J Gastroenterol* 2006; 12(11): 1743-1746.
- 77 – Tsutsumi S, Kuwano H, Nagashima N, Shimura T, Mochiki E, Asao T. Ets-1 expression in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2005; 52(62): 654-656.
- 78 – Scholzen T, Gerdes J. The KI67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182(3): 311-322.
- 79 – Kononen, J et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4(7): 844-847.
- 80 – Andrade V, Cunha I, Silva E, Ayala F, Sato Y, Ferreira S. O arranjo em matrix de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. *Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial* 2007; 1: 55-60.
- 81 – Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann J, Aparicio J, Braud F, Donea S, et al. Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin With and Without Cetuximab in the First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(5): 663-671.
- 82 – Hecht R, Mitchell E, Chidiac T, Scroggin C, Hagenstad C, Spidel D, Marshall J, Cohn A, et al. A Randomized Phase IIIB Trial of Chemotherapy, Bevacizumab, and Panitumumab Compared With Chemotherapy and Bevacizumab Alone for Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 2009, 27(5), Vol 27, No 5: 672-680.



## COVER LETTER

Dear Sir/Madam,

We are submitting the original article entitled “Member of the Ets family in a cohort of patients with colorectal cancer,” which we would like you to consider for publication in the *Cancer Treatment Reviews*.

The manuscript is being submitted only this journal, it will not be submitted elsewhere while under consideration, nor has it been published elsewhere. If the paper is accepted for publication in the journal, it will not be published elsewhere, either in similar form or verbatim, without permission of the publisher.

All authors declare that they have no conflicts of interest. In addition, all authors have read and approved the manuscript as submitted, are qualified for authorship, believe the submission represents honest work and take full responsibility for the reported findings.

The work has also been approved by the responsible authorities where the work was carried out.

We look forward to hearing from you regarding the status of our manuscript. In the meantime, please feel free to contact us if you need any additional information.

Sincerely,

Bernardo Garicochea. E-mail: [bgarico@terra.com.br](mailto:bgarico@terra.com.br)

Juliana Lorenzoni Althoff. E-mail: [juli.a@terra.com.br](mailto:juli.a@terra.com.br)

Vinícius Duval da Silva E-mail: [vinirs@pucrs.br](mailto:vinirs@pucrs.br)

Tiago Giuliani

Silvana Lunardini Alves E-mail: [juli.a@terra.com.br](mailto:juli.a@terra.com.br)

Raquel Breunig E-mail: [raquelbreuning@ibest.com.br](mailto:raquelbreuning@ibest.com.br)

Felipe Loss

Mateus Chissini Paganella

Rafael Costa e Campo E-mail: [caralero@gmail.com](mailto:caralero@gmail.com)

Address: Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Avenida Ipiranga, 6690, CEP: 90610-000, Porto Alegre, Brazil.

Tel.: +55 (51) 3320-3000

Prostate-derived ETS transcription (PDEF) factor as a prognostic factor in colorectal cancer

Running title: PDEF in colorectal cancer

Juliana Lorenzoni Althoff, Vinícius Duval da Silva, Gustavo Carvalhal, Silvana Lunardini Alves, Raquel Breunig, Felipe Loss, Mateus Chissini Paganella, Rafael Costa e Campo, Lúcio S Fillmann, Bernardo Garicochea.

1 – Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB), Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e Programa de Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Avenida Ipiranga, 6690, CEP: 90610-000, Porto Alegre, Brazil. Tel.: +55 (51) 3320-3000. Emails: [bgarico@terra.com.br](mailto:bgarico@terra.com.br); [vinirs@pucrs.br](mailto:vinirs@pucrs.br); [sales@pucrs.br](mailto:sales@pucrs.br); [juli.a@terra.com.br](mailto:juli.a@terra.com.br) ; [raquelbreuning@ibest.com.br](mailto:raquelbreuning@ibest.com.br); [caralero@gmail.com](mailto:caralero@gmail.com)

Corresponding author:

Dr. Bernardo Garicochea, PhD.

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS

Hospital São Lucas – PUCRS, Serviço de Oncologia Clínica – sala 228

Avenida Ipiranga, 6690

CEP: 90610-000, Porto Alegre, Brazil

Tel.: +55 (51) 3320-3000

## ABSTRACT

The Ets family consists of almost thirty different transcriptional genes that share a helix-turn-helix DNA-binding domain, which can recognize a specific GGAA/T core sequence, called Ets binding site. Their expression is very heterogeneous. Some members of this family are predominantly found in certain tissues while others are ubiquitous. As Ets genes are related to activation or suppression of DNA transcription, playing a fundamental role in cell survival repertoire, recently they were targeted for gains or losses of function, as potential biomarkers for prognosis.

The prostate-derived Ets factor (PDEF) is expressed only in certain epithelial tissues, such as prostate, breast, endometrium, ovaries, colon and salivary glands, which makes it unique among the members of the Ets family. Studies in breast cancer cell lines found that the overexpression of PDEF protein inhibited cell growth. In other studies, PDEF overexpression induced invasion and migration, which suggests that expression is different in normal tissue and neoplastic cells.

In the present report we evaluated clinical and pathological characteristics and survival curves in a cohort of 46 patients with nonmetastatic colorectal cancer. The expression of PDEF protein was determined by immunohistochemical analysis of paraffin embedded tissue and image quantification. We observed a trend towards a loss of PDEF expression in advanced stages, an opposite finding to what has been reported in breast cancer. With number of patients analyzed we could not identify differences in survival based on PDEF expression level. Our results suggest that PDEF might act as a tumor suppressor gene in colorectal cancer and its loss may be associated to tumor invasiveness.

Keywords: Colorectal cancer, Ets family, PDEF.

## INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignant tumors in the western world. Its world incidence ranges from 3.4 to 35.8 cases in 100,000 inhabitants. It is the third most frequent tumor for both sexes, and the second most frequent in developed countries (1,2). About 800,000 new cases of colorectal cancer are expected each year all over the world, and the annual number of deaths is about 450,000 (3).

The prognosis of patients with CRC, based on the TNM (tumor, lymph node and metastasis) classification (4), is determined according to depth of invasion and presence of metastases found in neoplastic tissue and lymph nodes examined microscopically. However, the histopathological examination of the colon tumor is not enough to define prognoses accurately, and genetic and molecular changes should also be taken into considerations when defining the treatment of metastatic disease. Carcinogenesis has been studied for a long time, and benign polypoid lesions have been shown to be clearly associated with colorectal neoplasias. The polyp-cancer sequence, described by Morson in 1983, reflects the traditional understanding that CRC develops, in most cases, from preexisting, premalignant lesions, particularly when associated with dysplastic changes (5). Volgenstein and Fearon (6) described a genetic model to explain the events that lead to the progression from adenoma to cancer. The study of genes found in adenomas of different sizes revealed that adenomatous lesions grow as the number of mutated genes increases, which, therefore, establishes an association between lesion size, histological findings and genetic changes (6,7). The isolation and description of the Ets family of transcription factors has contributed to that purpose (8-10).

The first member of the Ets family (E26 transformation specific sequence) was originally identified in the E26 retrovirus, which causes avian myeloblastic and erythroblastic

leukemia (9). It soon became evident that it was part of a large family of genes with a high degree of evolutionary conservation. Genes of the Ets family are found in all metazoans, even in very different species, such as *Drosophila sp* and *C. elegans* (8). In mammals, 30 genes have been identified so far.

The Ets family consists of transcriptional genes that share a helix-turn-helix DNA-binding domain, which can recognize a specific GGAA/T core sequence, called Ets binding site. The complete conserved Ets domain consists of about 85 amino acids that bind to a purine-rich sequence; it is responsible for the activation or suppression of DNA transcription together with other transcriptional factors, and plays a fundamental role in cell control: proliferation, apoptosis, development, differentiation and oncogenic transformation (8,11).

The family of Ets proteins may be divided into several subfamilies according to their structure and DNA-binding similarities. Most have a c-terminal Ets DNA-binding domain. However, some have an N-terminal domain (8,12) and others have a pointed-domain (PTN), which is important in the protein-protein interactions. Many Ets proteins are predominantly expressed in some tissues, whereas others are found in all tissues.

The prostate-derived Ets factor (PDEF), one of the latest members of this family to be identified, has a COOH-terminal DNA-binding domain and a NH<sub>2</sub>-terminal regulatory domain mediated by specific targets (13,14). The PDEF protein is expressed only in epithelial tissues, which makes it unique among the members of the Ets family. Its expression is restricted to a small number of epithelial cells, such as cells from the prostate, breast, endometrium, ovaries, colon and salivary glands (15-17). Some authors have reported conflicting results of expression of this protein. Studies with breast cancer cell lines found that the overexpression of PDEF protein inhibited cell growth. In other studies, PDEF overexpression induced invasion and migration, which suggests that expression is different in normal tissue and neoplastic cells (15).

The expression of this protein leads to drastic physiological and morphological changes that are associated with epithelial-to-mesenchymal transition, with reduction of epithelial markers, increase of mesenchymal markers, reduction of cell adhesion, and increase of migration and invasion (14).

This study analyzed the prevalence of PDEF protein expression in a cohort of patients with nonmetastatic colorectal cancer. Clinical and pathological characteristics of this cohort were also correlated with protein expression in order to see if a PDEF expression level varies with stage and if it confers any survival difference. Our results showed that expression was different at different stages of tumor development, which suggest that this protein may be associated with the progression and invasiveness of the disease. These results may also imply that PDEF might play a role of tumor suppressor gene in colorectal carcinogenesis.

## MATERIAL AND METHODS

### Study population and tissue samples

This study enrolled a cohort of 46 patients that underwent potentially curative surgery for colorectal cancer in the São Lucas Hospital of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), in Porto Alegre, Brazil, from January 2002 to June 2008. Clinical characteristics of patients were defined according to data in medical charts and histopathological exams. This study was approved by the Human Studies and Ethics Committee of PUCRS under protocol #07/03601, and all subjects signed an informed consent term before entering the trial.

### Histopathology and lesion staging

A rotary microtome (Leica RT2150) was used to prepare 3-um histological sections, which were placed on silane-coated slides; specimens were mounted on slides using the tissue microarray (TMA) technique, a valuable method in large scale studies because it allows for the standardization of reactions and comparisons (18).

The histopathological features of the specimens were classified according to the TNM grading system, 2002 (4). After staging, information about patient demographics was also gathered and added to the analysis. Tumor location was entered as either colon (ascending, transverse and descending) or rectum.

#### Immunohistochemistry

Slides were incubated in a cell culture incubator at 68° C for one hour. After that, the slides were deparaffinized in a series of xylenes for 2 changes of 5 minutes each and of 90% alcohols for 4 changes of 2 minutes each, and then rinsed with distilled water.

PDEF buffer and pH 6.0 citrate at pH 6.0.0 for Ki-67 were used for antigen retrieval. The slides were microwaved at high temperatures (+/- 100° C) in a pressure cooker for 25 minutes, and then rinsed in PBS buffer 3 times for 5 minutes each. Endogenous peroxidase activity was blocked using 3% hydrogen peroxide in methyl alcohol for 30 minutes, and specimens were rinsed with PBS buffer 3 times for 5 minutes each time. To reduce background coloring, slides were incubated in 5% skimmed powder milk and PBS buffer and then rinsed in PBS buffer 3 times for 5 minutes each.

Primary antibodies were diluted in PBS buffer at a dilution rate of 1:50 for anti-PDEF (Santa Cruz Biotechnology, SC 46433, C-14) and 1:250 for anti-Ki-67 (Novocastra, NCL-MM1). The samples were incubated in a humid chamber at 4° C to 8° C in a BOD incubator for 16 hours (overnight). An ultrasensitive immunohistochemistry kit (Picture Max, Zymed, Invitrogen) was used for signal amplification according to the manufacturer's instructions.



The reaction was developed using DAB+ chromogen (Dako) for 5 minutes in incubation. Slides were rinsed in distilled water, stained with Harris hematoxylin and rapidly rinsed in a 1% ammonia solution. The slides were dehydrated in a series of alcohols for 4 changes of 2 minutes each and of xylenes for 2 changes of 5 minutes each, and mounted with Canada balsam and cover slips.

A Zeiss 400X Plan-Neofluar microscope (Axiokop 40) coupled with an image capture and analysis system (Image Pro Plus 6.0, Media Cybernetics, Silver Springs, MD, US) was used for the quantitative analysis of the immunohistochemical reaction of PDEF and Ki-67 receptors in surgical specimens. Counting was performed after 4 photos were obtained for each colon slide and for each immunohistochemical marker of PDEF expression.

#### Statistical analysis

Quantitative data were described as mean and standard deviation. Medians, 25th and 75th percentiles and minimum and maximum values were calculated for asymmetric data. Total counting and percentages were used for categorical data.

The Student *t* test or the nonparametric Mann-Whitney U test was used for the comparison of quantitative variables between two groups, The Kruskal-Wallis test was used when more than two groups were compared. The chi-square test or the Fisher exact test was used to determine the significance of differences in the analysis of categorical data.

Kaplan-Meier curves were used to evaluate survival between groups with different levels of PDEF expression. A Log Rank test was used for comparisons ( $\alpha = 0.05$ ).

## RESULTS

Mean follow-up time for the 46 patients was 31 months and mean patient age at diagnosis was 61 years; the youngest patient was 36 years, and the oldest, 86. Thirty-two

(69.9%) patients were men. Median preoperative carcinoembryonic antigen (CEA) level was 3.0 ng/dl. Preoperative CEA was not known for 28.3% of the patients. A total of 91.3% of the tumors were in the left colon. The rectum was the tumor site in 54% of the patients, and the lower rectum, in 16 patients (34.8%).

Patient preoperative staging according to TNM showed that 21.7% of the patients were stage I. Twenty-four patients (52%) were stage II, and 50% of the sample was stage IIA. Stage III patients corresponded to 26% of the sample; stage IIIA, to 4.3%, and IIIB, to 21.7%. The analysis of wall invasion revealed that 71.7% of the sample was stage T3, and 19.6%, stage T2. Median (25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentiles) number of lymph nodes examined and described in the histopathological exam was 13 per patient (7-19.5), and 21 patients (45%) had fewer than 12 lymph nodes examined. Of the 46 patients, 71.7% had negative lymph nodes.

About 50% of the patients underwent adjuvant treatments. Chemotherapy with 5-fluoracyl and leucovorin was used for 56.5% of the patients, and was administered preoperatively in 4 patients. All stage II patients received an indication of adjuvant chemotherapy, except 3 patients. Two of those patients had postoperative complications and died. The third stage-III patient chose not to undergo chemotherapy due to advanced age (86 years). Radiotherapy was prescribed for 41.3% of the patients, and 4 underwent preoperative radiotherapy.

Both radiotherapy and chemotherapy were completed by 68% of the patients. Of the patients that underwent radiotherapy, 78.3% completed the treatment. In the group that underwent chemotherapy, 67.9% completed the treatment, and 10.7% discontinued it before completion because of toxicity. The main clinical and pathological characteristics of the patients are described in Table 1.

PDEF expression was detected in all patients in the sample. After image counting, median (min-max) was 24.1 (11-42.1) and mean number of cells analyzed was 448 per

patient, as shown in Figures 1 and 2. Mean Ki-67 expression was 32.5%. It was classified as high (above 50%) in 13 patients, and low (below 10%) in 7 patients. PDEF positive expression was classified as high and low according to median values (24%). It was low in 21 patients for whom median expression value was 11%, and high in 22 patients who had a median value of 41.8%. There was no correlation between clinical and pathological factors and the different levels of PDEF expression, as shown in Figure 3 and Table 2.

When the sample was subdivided into stages I, II and III according to the TNM classification, mean expression was 30.3%, 25.8% and 14.8%. There was a trend towards loss of PDEF expression when correlated to staging ( $p = 0.416$ ) (Figure 4).

The disease recurred in only 6 patients, who died due to cancer during the study period. The analysis of disease-free survival using the Kaplan-Meier curves and patient groups separated according to high and low PDEF expression did not reveal any significant differences in survival, as shown in Figure 5.

## DISCUSSION

Colorectal cancer is one of the most frequent neoplasias in the western world. It is the third most common cancer among both sexes in the world, and the second most common in developed countries. Survival in this type of cancer is excellent when the disease is diagnosed at an early stage. The improvement of survival rates depends on more efficient techniques to make early diagnoses, improvement of surgical techniques and the development of more potent drugs. Therefore, prognostic markers should undergo constant validation so that individualized chemotherapeutic regimens can be prescribed, because the heterogeneity of the disease requires that treatments be tailored case by case, particularly in stage II CRC. Current prognostic factors rely on clinical and histological variables (19,20). Recently established

markers, such as 18q loss of heterozygosity, microsatellite instability, or KRAS mutations, have brought about changes in the treatment of patients with metastases (21).

In the last decade, the discovery of about thirty genes involved in transcription, which were grouped under the Ets family, has opened the possibility of generating new prognostic markers based on the detection of gene alterations. The Ets gene family, responsible for the organization of proteins that activate or suppress gene transcription, essential for cell survival, was implicated in the carcinogenesis of ovary, breast, prostate and colon cancers (14,22-25). However, study findings are controversial because of the selection of cell lines, the limited number of patients, and the different techniques used for the analysis of gene expression (immunohistochemical, real-time PCR). No study has correlated PDEF in a cohort of patients with CRC.

In our study, mean age of the 46 patients was 61.2 years. About 40% of the patients had a diagnosis of cancer before 60 years, a slightly younger group than those found in the literature. As patients with metastatic disease were not included, the population studied may have been subjected to a slight bias regarding to the age of diagnosis. Of all tumors, 91.3% were in the left colon, and rectum tumors were predominant (54%), which is in agreement with findings in the literature (1).

All patients with positive lymph nodes received adjuvant chemotherapy, radiotherapy, or both. The fact that fewer than 12 lymph nodes were isolated in the surgical specimens of clinical stage II patients might have resulted in treatment bias, but these patients were classified as high risk and all, except 3, received adjuvant treatment.

The adjuvant treatment was based on 5-fluoracyl and leucovorin. No stage III patients were treated with the FOLFOX regimen, because this regimen was not available, at the time of the study, for patients of the public healthcare system in our country.

Median follow-up was 23 months, which is short for a cohort study. However, studies that tested CRC adjuvant treatments showed a strong correlation between 2-year DFS and OS (28), which suggests that this follow-up time should be sufficient to evaluate the role of PDEF if its expression was a strong prognostic marker. The number of events (disease recurrence + death) was small. Clinical characteristics of patients, including the low preoperative CEA levels, the large number of cases with stage II (almost half of the patients studied) and adjuvant treatments received by most patients may have also contributed to the lack of significance of PDEF expression and DFS and OS.

Patients classified as stage IV according to TNM (4) were excluded from the study. Such exclusion followed the previous results of PDEF expression in ovary cancer(22). Those authors could not define whether PDEF expression was an early or late event of carcinogenesis because they had many patients with clinically advanced disease in their series. Our results of the immunohistochemical analysis, and findings of protein expression only in tumor tissue and of 30.3% expression in stage I patients confirm that PDEF protein is present in the initial stages of carcinogenesis.

We observed a trend towards a loss of PDEF expression according to patients' clinical staging. PDEF expression values were 30.3%, 25.8% and 14.7% in stage I, II and III patients. The fall in expression from the initial stage (I) to the stage with positive lymph nodes (III) suggests that this gene of the Ets family takes part in the progression of colorectal cancer as a tumor suppressor gene. The loss of the protein expression in more advanced stages indicates that PDEF participates in the process of invasiveness. The exact opposite was observed in breast cancer, in which the invasiveness increases with the increased protein expression. This intriguing finding could be better explored if metastatic lesions were available for study.

When patients were separated according to the median level of PDEF expression, there was no correlation with survival according to the Kaplan-Meier curve. The small

number of events and a sample with early-stage cases and favorable prognoses may have contributed to the lack of statistical significance ( $p = 0.61$ ).

The role of PDEF protein in colorectal cancer deserves further investigation. The use of methods that enable the performance of real-time PCR using RNA extraction from paraffin blocks would be very useful. Longer patient follow-up may contribute to a better discrimination of groups of patients whose disease progresses and groups of patients that are probably cured. Moreover, antibodies that evaluate other PDEF epitopes may provide more information about the intensity of expression or the aberrant expression of this protein. The analysis of a larger number of members of the Ets family should also be made. It is not clear in the literature whether there are interactions between members of this family and the carcinogenesis of several tumors (15,29). The choice of CRC was justified because it is one of the most prevalent, and no studies have correlated this member of the PDEF family and a cohort of patients with this type of cancer.

Although statistical significance was not found, there seems to be a trend towards loss of PDEF expression as the disease progresses from initial to more advanced stages. This member of the Ets family, involved in several cell mechanisms, such as invasion, migration, proliferation and metastasizing, should be seen as a possible prognostic and therapeutic target. Further prospective studies should be conducted with a larger number of patients, longer follow-up times and a review of current techniques of genetic analysis.

#### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

No conflicts of interest declared concerning the publication of this article.

## REFERENCES

1. Libutti SK, Saltz LB, Rustgi AK, Tepper JE. Cancer of the colon. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer Principles and Practice*. 7<sup>th</sup>ed. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins; 2004, p.1061-1109.
2. Estimativa da Incidência de Câncer no Brasil para 2008. Available at < <http://www.inca.gov.br/estimativas/2008> >. Accessed 03 Jan 2009.
3. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999; 49:33-64, 1.
4. Greene FL, Balch CM, Fleming ID, Fritz A, Haller DG, Morrow M, Page DL, eds. *AJCC Cancer Staging Manual* 6th ed. New York: Springer; 2002.
5. Morson, BC. The polyp-cancer sequence in the larger bowel. *Proc R Soc Med* 1974;67:451-7.
6. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
7. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Eng J Med* 1988;319:525-32.
8. Oikawa T., Yamada T. Molecular biology of the ETS family of transcription factors. *Gene* 2003;303:11-34.
9. Leprince D, Gegonne A., Coll J, et al. A putative second cell-derived oncogene of avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* 1983;306:395-7.
10. Huan CC, Papas TS, Bhat NK. A variant form of ETS1 induces apoptosis in human colon cancer cell. *Oncogene* 1997;15:851-6.
11. Graves BJ, Petersen JM. Specificity within the ETS family of transcription factors. *Adv Cancer Res*1998;75:1-55.

12. Hsu T, Trojanowsha M, Watson DK. ETS proteins in biological control and cancer. *J Cell Biochem* 2004;91:896-903.
13. Oettgen P, Finger E, Sun Z, et al. PDEF, a novel prostate epithelium-specific ETS transcription factor, interacts with the androgen receptor and activates prostate-specific antigen gene expression. *J Biol Chem* 2000; 275:1216-25.
14. Gu X, Zerbini LF, Out HH, et al. Reduced PDEF expression increases invasion and expression of mesenchymal genes in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:4219-26.
15. Feldman RJ, Sementcheko VI, Gayed M, Fraig MM, Watson DK. Pdef expression in human breast cancer is correlated with invasive potential and altered gene expression. *Cancer Res* 2003;63:4626-31.
16. Nozawa M, Yomogida K, Kanno N, et al. Prostate-specific transcription factor hPSE is translated only in normal prostate epithelial cells. *Cancer Res* 2000;60:1348-52.
17. Seth A, Watson DK. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur J Cancer* 2005;41:2462-78.
18. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4:844-7.
19. Benson AB 3<sup>rd</sup>, Shrag D, Somerfield MR, et al. American society of clinical oncology Recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:3408-19.
20. National Comprehensive Cancer Network Guidelines on Treatment of Colon Cancer. Available at < [http://www.nccn.org/physician\\_gls/default.asp](http://www.nccn.org/physician_gls/default.asp) > Accessed 03 Jan 2009.
21. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:663-71.



22. Rodabaugh KJ, Mhaweche-Fauceglia P, Groth J, Lele S, Sood AK. Prostate-derived Ets factor is overexpressed in serous epithelial ovarian tumors. *Int J Gynecol Pathol* 2007;26:10-15.
23. Ghadersohi A, Odunsi K, Zhang S, et al. Prostate-derived Ets transcription factor as a favorable prognostic marker in ovarian cancer patients. *Int J Cancer* 2008;123:1376-84.
24. He J, Pan Y, Hu J, Albarracin C, Wu Y, Dai JL. Profile of Ets gene expression in human breast carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2007;6:76-82.
25. Nakayama T, Ito M, Ohtsuru A, Naito S, Sekine I. Expression of the ets-1 proto-oncogene in human colorectal carcinoma. *Mod Pathol* 2001;14:415-22.
26. Locker GY, Hamilton S, Harris J, et al.; ASCO. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:5313–27.
27. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al.; Multicenter International Study of oxaliplatin/5-fluorouracil/leucovorin in the adjuvant treatment of colon cancer (MOSAIC) investigators. Oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2343-51.
28. Sargent DJ, Patiyil S, Yothers G, et al. End point for colon cancer adjuvant trials: observations and recommendations based on individual patient data from 20,898 patients enrolled onto 18 randomized trials from the ACCENT group. *J Clin Oncol* 2007;25:4569-74.
29. Findlay VJ, Turner DP, Moussa O, Watson DK. Micro-RNA-mediated inhibition of prostate-derived Ets factor messenger RNA translation affects prostate-derived Ets factor regulatory networks in human breast cancer. *Cancer Res* 2008;68:8499-506.

**TABLE 1** – Clinical and pathological characteristics of patients with colorectal cancer

<b>Characteristics</b>	<b>Statistic description</b>
	n = 46
Age, years	61,2±12,8
Gender, male, no. (%)	32 (70)
CEA, ng/dl	n = 33
	3.0 (2.3 to 5.9)
	[0.5 to 30.4]
Tumor location, no. (%)	n = 46
Rectum	25 (54)
Rectum-sigmoid	8 (17)
Descending c.	9 (20)
Ascending c.	3 (7)
Transverse c.	1 (2)
TNM stage, no. (%)	
I	10 (22)
II	24 (52)
III	12 (26)
Lymph node (+), no. (%)	13 (28)
Radiotherapy, no. (%)	n = 43
Yes	15 (33)
Yes, neoadjuvant	4 (9)
No	24 (52)
Chemotherapy, no. (%)	n = 43

Yes	22 (48)
Yes, neoadjuvant	4 (9)
No	17 (37)
Histological type, no. (%)	n = 46
Adenocarcinoma	39 (85)
Mucinous	7 (15)
Follow up, months	23.2 (11.1 to 53.8) [0.9 to 81.2]

---

Results are presented as: Mean  $\pm$  standard deviation, median (25<sup>th</sup> to 75<sup>th</sup> percentiles), [minimum to maximum] or range (%).  
CEA: carcinoembryonic antigen, TNM: tumor, lymph node and metastasis.

**TABLE 2** – Comparison between groups of low (<24%) and high (≥24%) positive expression of the prostate-derived Ets factor (PDEF)

Characteristics	Low positive expression <24% (n = 21)	High positive expression ≥24% (n = 22)	
			30.124.5
			24.1 (11.1 to 42.1)
PDEF, (%)	11.1 [2.1 to 20.2]	41.8 [24.1 to 95.8]	[2.1 to 95.8]
			p
Age, years	63.2±10.6	61.4±14.2	0.66 <sup>[1]</sup>
Gender, male, no. (%)	16 (76)	14 (64)	0.57 <sup>[2]</sup>
Tumor location, no. (%)			0.23 <sup>[3]</sup>
Rectum	11 (52)	12 (55)	
Rectum sigmoid	2 (10)	6 (27)	
Descending c.	6 (28)	2 (9)	
Ascending c.	2 (10)	1 (5)	
Transverse c.	0 (0)	1 (5)	
CEA, ng/dl	2.6 [0.7 to 16.7]	3.7 [0.5 to 7.5]	0.22 <sup>[4]</sup>
Lymph node (+), no. (%)	8 (38)	5 (23)	0.44 <sup>[2]</sup>

Results are presented as: Mean ± standard deviation, median (25<sup>th</sup> to 75<sup>th</sup> percentiles),

[minimum to maximum] or range (%). p statistic significance, [1]: Student *t* test, [2]: chi-square test, [3]: Fisher exact test and [4] Mann-Whitney U-test. PDEF: prostate-derived

factor, CEA: carcinoembryonic antigen

## **FIGURE LEGENDS**

**Figure 1** – High expression of prostate-derived Ets factor (PDEF) protein according to immunohistochemical analysis.

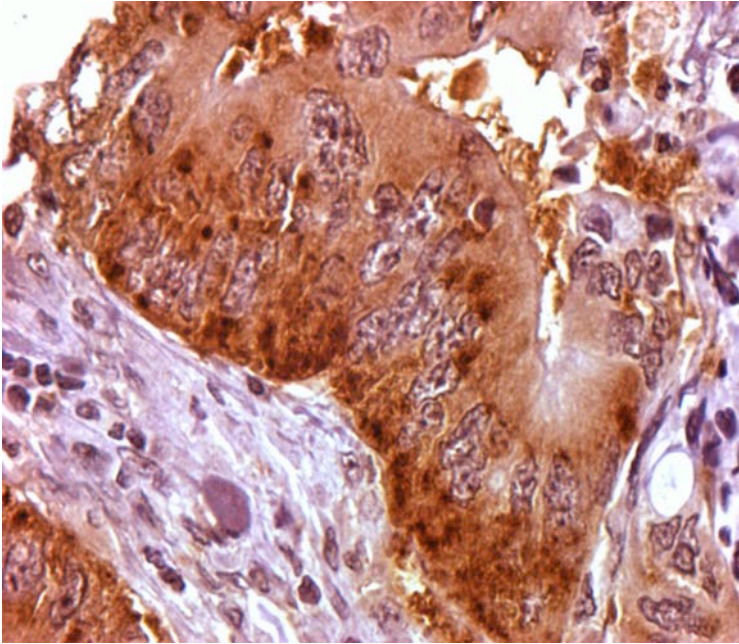
**Figure 2** – Low expression of prostate-derived Ets factor (PDEF) protein according to immunohistochemical analysis.

**Figure 3** – Distribution of frequencies of positive expression of prostate-derived Ets factor (PDEF)

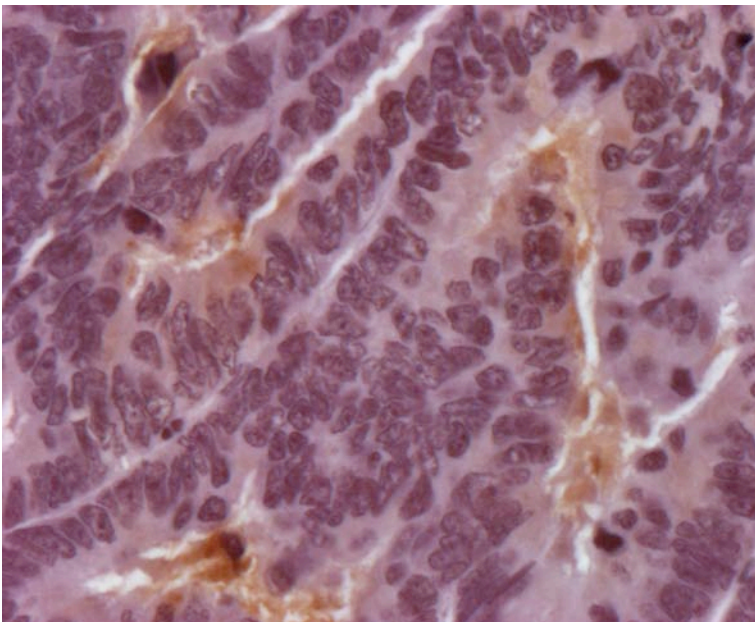
**Figure 4** - Comparison of positive expression of prostate-derived Ets factor (PDEF) according to TNM classification

TNM: tumor, lymph node and metastasis

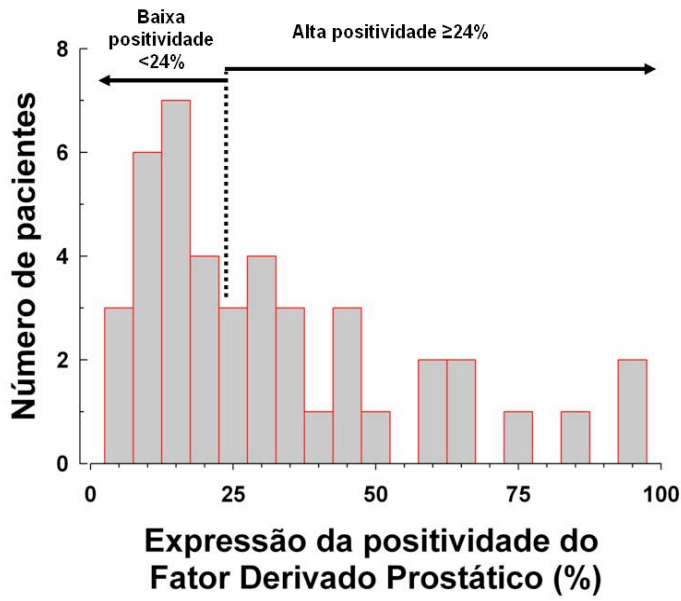
**Figure 5** – Comparison of Kaplan-Meier curves for the occurrence of death between the groups of high and low positive expression of prostate-derived Ets factor (PDEF)



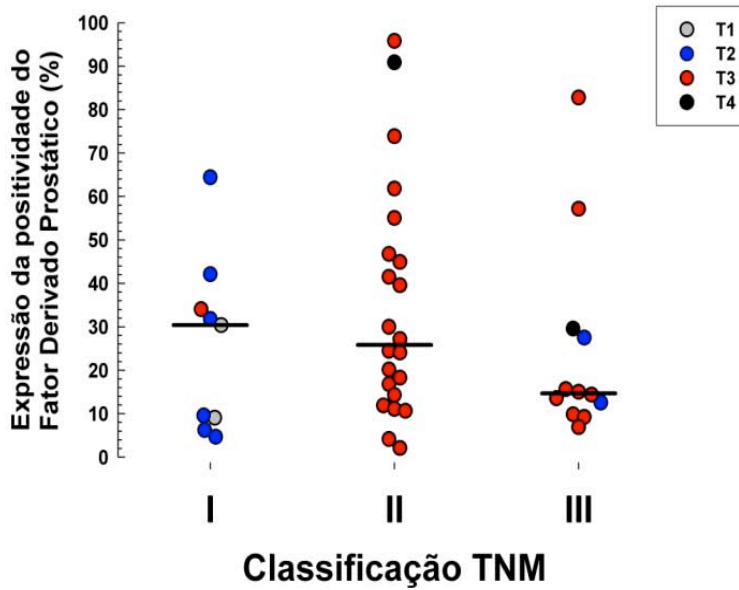
**Figure 1** – High expression of prostate-derived Ets factor (PDEF) protein according to immunohistochemical analysis.



**Figure 2** – Low expression of prostate-derived Ets factor (PDEF) protein according to immunohistochemical analysis.

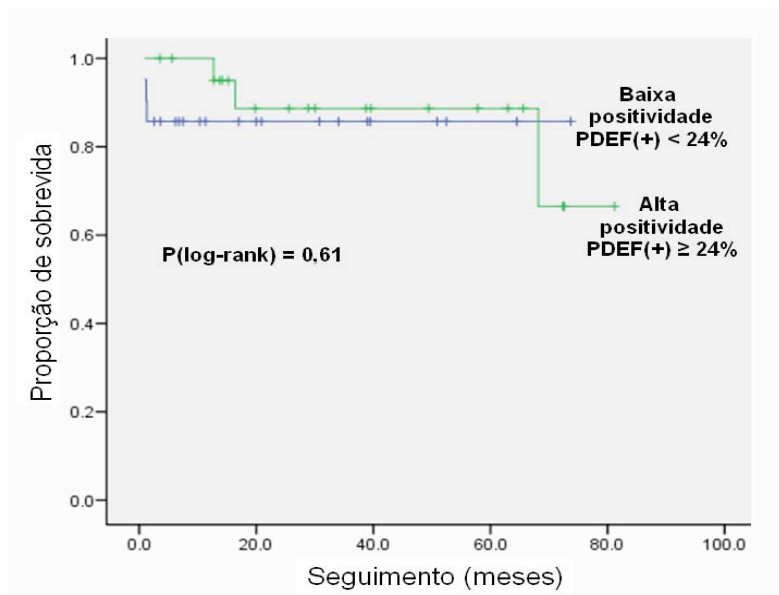


**Figure 3** – Distribution of frequencies of positive expression of prostate-derived Ets factor (PDEF)



**Figure 4** - Comparison of positive expression of prostate-derived Ets factor (PDEF) according to TNM classification

TNM: tumor, lymph node and metastasis



**Figure 5** – Comparison of Kaplan-Meier curves for the occurrence of death between the groups of high and low positive expression of prostate-derived Ets factor (PDEF)





Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria de Graduação  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [prograd@pucrs.br](mailto:prograd@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br](http://www.pucrs.br)





