



A EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO E A ANÁLISE DO CD133 SÃO RELEVANTES NA DIFERENCIAÇÃO DO CÂNCER COLORRETAL?

Are stem cell marker expression and CD133 analysis relevant to differentiate colorectal cancer?

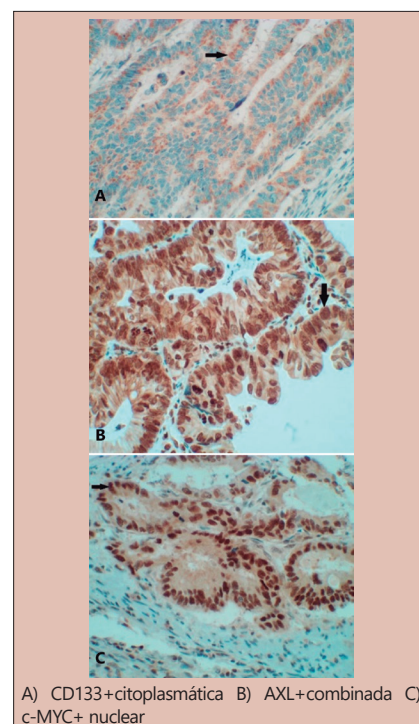
Leticia Elizabeth Augustin **CZECZKO**^{1,2}, Carmen Australia Paredes Marcondes **RIBAS**^{1,2}, Nicolau Gregori **CZECZKO**^{1,2}, Thelma Larocca **SKARE**¹, Camila Kienen **YAMAKAWA**¹, Guilherme **GIONEDISI**¹, Cecília **VASCONCELOS**¹, Fabiola Pabst **BREMER**^{1,2}, Diogo Francesco **CASTOLDI**^{1,2}, Martin **GASSER**¹, Ana Maria **WAAGA-GASSER**³

RESUMO - Racional: CD133 e AXL são descritos na literatura como marcadores de células-tronco tumorais, e c-MYC cumpre papel chave como mecanismo de regulação celular no câncer colorretal (CCR). **Objetivo:** Avaliar o papel prognóstico dos biomarcadores CD133, AXL e c-MYC e sua associação com características clinicopatológicas de adenocarcinomas e adenomas colorretais. **Métodos:** Um total de 156 pacientes com adenocarcinomas de estágio UICC I-IV (n=122) e adenomas (n=34) colorretais foram avaliados. Microarranjos teciduais (TMA) dos tumores primários e adenomas foram realizados em busca de expressão de CD133, c-MYC e AXL, com posterior análise de relação significativa com características clinicopatológicas. **Resultados:** Adenocarcinomas pobremente diferenciados e progressão de doença foram fatores de risco independentes para má sobrevida global. A taxa mediana de sobrevida global foi de 30 meses. Expressão positiva de CD133 (35,9% dos casos), particularmente em cânceres de cólon direito (44,8% dos casos CD133+), correlacionou-se negativamente com óbito na análise univariada, sem significância estatística na análise multivariada. c-MYC (15,4% dos casos) teve predomínio de expressão em pacientes com estágio avançado com metástases distantes (não-pulmonares/não-hepáticas). Expressão de AXL foi pouco encontrada, com predomínio em adenomas, com menor penetrância em displasia de alto grau. **Conclusão:** Expressão de CD133 não se associou com sobrevida global inferior em CCR. Enquanto AXL demonstrou resultados inconclusivos, expressão de c-MYC em tumores primários se associou-se à metástases à distância.

DESCRITORES: Neoplasias colorretais. Adenoma. Biomarcadores tumorais. Proteínas proto-oncogênicas. C-myc. Antígeno ac133. Receptores proteína tirosina quinases.

ABSTRACT – Background: CD133 and AXL have been described as cancer stem cell markers, and c-MYC as a key regulatory cellular mechanism in colorectal cancer (CRC). **Aim:** Evaluate the prognostic role of the biomarkers CD133, AXL and c-MYC and their association with clinicopathologic characteristics in colorectal adenocarcinomas and adenomas. **Methods:** A total of 156 patients with UICC stage I-IV adenocarcinomas (n=122) and adenomas (n=34) were analyzed. Tissue microarrays (TMA) from primary tumors and polyps for CD133, c-MYC and AXL expression were performed and analyzed for their significance with clinicopathologic characteristics. **Results:** Poorly differentiated adenocarcinomas and disease progression were independent risk factors for poor overall survival. The median overall survival time was 30 months. Positive CD133 expression (35.9% of all cases), particularly of right-sided CRCs (44.8% of the CD133+ cases), was negatively correlated with death in the univariate analysis, which did not reach significance in the multivariate analysis. c-MYC (15.4% of all cases) was predominantly expressed in advanced-stage patients with distant (non-pulmonary/non-hepatic) metastasis. AXL expression was found only occasionally, and predominantly dominated in adenomas, with less penetrance in high-grade dysplasia. **Conclusions:** CD133 expression was not associated with inferior overall survival in CRC. While AXL showed inconclusive results, c-MYC expression in primary CRCs was associated with distant metastasis.

HEADINGS: Colorectal neoplasms. Adenoma. Biomarkers, tumor. Proto-oncogene proteins c-MYC. AC133 antigen. Receptor protein tyrosine-kinase.



A) CD133+citoplasmática B) AXL+combinada C) c-MYC+ nuclear

Mensagem central

Os biomarcadores tumorais CD133 e c-MYC demonstram papéis prognósticos distintos em adenocarcinomas colorretais.

Perspectivas

Este estudo de imunohistoquímica demonstra associação entre a expressão de c-MYC e metástases à distância. Ao contrário da literatura atual, no entanto, expressão de CD133 não parece se relacionar com sobrevida global inferior no contexto do câncer colorretal.



www.facebook.com/abcdrevista



www.instagram.com/abcdrevista



www.twitter.com/abcdrevista

Trabalho realizado no ¹Programa de Pós-Graduação em Princípios da Cirurgia, Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, PR, Brasil; ²Hospital Universitário Evangélico Mackenzie, Curitiba, PR, Brasil; ³Renal Division, Brigham and Woman's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA (¹Mackenzie Evangelical Faculty of Paraná, Curitiba, PR, Brazil; ²University Evangelical Mackenzie Hospital, Curitiba, PR, Brazil; and ³Renal Division, Brigham and Woman's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA).

Como citar esse artigo: Czeczko LEA, Ribas CAPM, Czeczko NG, Skare TL, Yamakawa1 CK, Gionedisi G, Vasconcelos C, Bremer FP, Castoldi DF, Gasser M, Waaga-Gasser AM. A expressão de marcadores de células-tronco e a análise do CD133 são relevantes na diferenciação do câncer colorretal? ABCD Arq Bras Cir Dig. 2020;33(4):e1568. DOI: /10.1590/0102-672020200004e1568

Correspondência:

Leticia Elizabeth Augustin Czeczko
E-mail: leticiaeac@gmail.com;
gionedisguilherme@gmail.com

Financiamento: Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)

– Código de Financiamento 001 e pela Divisão Renal do Brigham and Woman's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

Conflito de interesse: não há

Recebido para publicação: 21/08/2020

Aceito para publicação: 10/10/2020

INTRODUÇÃO

Câncer colorretal (CCR) é uma das principais doenças malignas em humanos e é a segunda e terceira maior causa de óbitos relacionados a câncer em homens e mulheres nos Estados Unidos e no Brasil, respectivamente^{17,22}. Vias moleculares da carcinogênese colorretal têm sido progressivamente melhor caracterizadas nas últimas duas décadas. O proto-oncogene KRAS foi o primeiro gene que foi integrado no processo clínico de decisão da necessidade de terapia biológica adjuvante para tratar CCR de estadiamento avançado, assim como em outros tipos de câncer, nos últimos 15 anos. Subsequentemente, o ato de dividir pacientes com CCR em subgrupos definidos, caracterizados como de alto ou baixo risco de progressão dependendo de seus achados moleculares, tem se tornado cada vez mais comum durante o cuidado clínico, uma vez que leva a diversas implicações terapêuticas. O Atlas Genômico do Câncer (Cancer Genome Atlas) revelou que o CCR contém genes conhecidos com mutação significativa, dentre os quais se lista APC, TP53, SMAD4, PIK3CA e KRAS, bem como outros como ARID1A, SOX9 e FAM123B. Aproximadamente 16% dos CCRs analisados demonstraram alta carga mutacional, e 75% destes apresentaram alta instabilidade de microssatélites (MSI-H), geralmente com hipermetilação e silenciamento do gene MLH1. Ademais, 25% dos casos possuíam mutações somáticas nos genes de reparo de incompatibilidade (MMR) e POLE (ε polymerase)¹⁵.

Adenomas colorretais são lesões pré-malignas com capacidade proliferativa aumentada e com acúmulo de padrões moleculares, que se tornam distintamente detectáveis durante progressão de doença, dependendo do tempo de evolução de cada adenoma e de seu subgrupo histológico^{2,9,17}. Uma melhor caracterização das vias moleculares que ocorrem na sequência adenoma-para-adenocarcinoma e também durante progressão de doença, de estágios iniciais a avançados, é de grande relevância para garantir entendimento aprofundado da fisiopatologia do CCR e de seu processo de desenvolvimento⁷.

Um número crescente de publicações passou a descrever biomarcadores que podem permitir melhor definição de dados prognósticos em pacientes individuais, que apresentem ou não mutações em proto-oncogenes específicos (como KRAS) e em genes supressores tumorais (como TP53) em células tumorais colorretais, embora ainda exista muita controvérsia em relação ao papel de tais marcadores em desfechos clinicopatológicos.

Recentemente, tem sido consistentemente sugerido que muitos dos achados mutacionais encontrados em oncogenes e genes supressores podem ser de importância específica para células tumorais com características pluripotentes, de forma que possam predominantemente conduzir a progressão tumoral. Tais células são definidas como originadas de células-tronco cancerosas (CSC) encontradas no interior das criptas intestinais durante a carcinogênese colorretal inicial. Ao contrário da massa de células tumorais bem diferenciadas, esse pequeno grupo de células progenitoras é capaz de preservar suas características-chave de auto-renovação e diferenciação ao passo que se desenvolvem em células tumorais colorretais²⁶.

Existe evidência crescente de que a carcinogênese no CCR é conduzida principalmente pela ação desse pequeno grupo de células cancerosas pluripotentes, que podem abrigar proto-oncogenes que passaram por "upregulation" e também mecanismos de regulação do crescimento, podendo assim se tornarem relevantes na progressão tumoral. CD133, também conhecido como Prominin-1, é uma das glicoproteínas transmembrana mais frequentemente associadas a características de célula progenitora e a comportamento de célula-tronco no CCR, e é atualmente considerado o marcador de superfície mais robusto para células progenitoras de CCR¹².

O receptor de tirosina quinase AXL regula diversos processos celulares vitais, incluindo proliferação, sobrevivência, motilidade e resposta imune. Embora não seja implicado como um fator

de influência na oncogênese, AXL é superexpresso em várias malignidades sólidas e hematológicas, como leucemia mieloide aguda, câncer de pulmão não-pequenas células, adenocarcinoma gástrico e colorretal, bem como câncer de próstata e de mama¹⁰. c-MYC é um dos principais genes responsáveis pela regulação de crescimento e pelo metabolismo celular. Sua superexpressão transforma o proto-oncogene c-MYC em um potente oncogene responsável por fornecer o metabolismo necessário para garantir rápida proliferação celular e por coordenar as mudanças nas famílias de genes que aumentam a proliferação celular¹⁹.

O objeto do presente estudo foi de avaliar o papel prognóstico dos biomarcadores CD133, AXL e c-MYC e sua associação com características clinicopatológicas em adenocarcinomas e adenomas colorretais, em um estudo de desfechos clínicos de instituição única.

MÉTODOS

Pacientes e amostras teciduais

Este estudo observacional retrospectivo foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, PR, Brasil (número de aprovação IRB: 1999672) e teve uma divisão em dois grupos distintos: o grupo adenocarcinoma (n=122) incluiu pacientes com câncer colorretal e o grupo adenoma (n=39) os com adenomas colorretais que realizaram polipectomia por meio de colonoscopia. Todos os casos foram recrutados do Hospital Universitário Evangélico Mackenzie, Curitiba, PR, Brasil. Os blocos de parafina e lâminas histopatológicas de CCRs e adenomas foram obtidos e referenciados para revisão histológica antes da avaliação imunoistoquímica.

Construção do bloco multiamostrado (TMA) e imunoistoquímica

Este estudo utilizou a técnica de microarranjo tecidual (TMA) para análise histológica. Primeiramente, as lâminas coradas em H&E foram analisadas e a área contendo a maior representação de neoplasia foi marcada com caneta. O bloco de parafina doador correspondente recebeu a mesma marca no mesmo local da lâmina. A área selecionada foi então extraída dos blocos doadores por meio do dispositivo Tissue-Tek Quick-Ray™ (Sakura®, Nagano, Japão), extraíndo "biópsias" teciduais cilíndricas de 2.0 mm de espessura. Uma planilha de Excel com 10 colunas e seis linhas foi criada para coordenar o arranjo. Cada uma das 60 amostras cilíndricas foi posicionada nos buracos correspondentes do molde de parafina, seguindo a ordem da planilha, e então o molde foi preenchido com parafina, finalizando o bloco TMA. Microtomia de múltiplas seções de 5 µm foi feita em cada bloco de TMA, com os resultados transferidos para lâminas hidrofílicas Scientific™ Superfrost Plus™ (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

Os casos foram submetidos à técnica de imunoperoxidase, realizada no instrumento BenchMark ULTRA™ (Roche Tissue Diagnostics, Basel, Suíça), com processamento integrado 3-em-1. A leitura foi feita por meio de um amplificador após a marcação com os anticorpos primários. Dois patologistas laudaram os resultados das lâminas em tempos diferentes, e as amostras foram classificadas como positivas, caso apresentassem a marcação pelo anticorpo, ou negativas caso contrário. Os seguintes anticorpos foram utilizados: CD133 policlonal (Biorbyt®, Cambridge, Reino Unido); AXL policlonal (St John's Laboratory Ltd., Londres, Reino Unido); c-MYC clone MYC275 + MYC909 (Medaysis®, Livermore, Estados Unidos).

Coleta de dados

Dados clinicopatológicos foram obtidos do banco eletrônico de dados clínicos do hospital (PAGU), de formulários de requerimento de quimioterapia (APACs) e de laudos anatomopatológicos oficiais. Para coletar informações adicionais, contato telefônico também foi feito. Cada caso foi inserido em um protocolo padronizado de coleta de dados. O protocolo do grupo adenocarcinoma continha

pseudônimo do paciente com iniciais, idade ao diagnóstico, gênero, número telefônico, número do bloco de parafina, data da operação, diagnóstico histológico, local do tumor primário, CID-10, caso primário, TNM patológico, local de metástase à distância (se presente), estadiamento UICC, status de ressecção, data de progressão (se presente), tempo livre de doença (se presente), progressão de metástase à distância (se presente), sobrevida global, seguimento e data quando “visto pela última vez”.

Similarmente, o protocolo do grupo adenoma continha pseudônimo do paciente com iniciais, idade ao diagnóstico, gênero, número do bloco de parafina, data da colonoscopia, local do adenoma, classificação macroscópica do adenoma, diagnóstico histológico, dimensões na colonoscopia e grau de displasia.

Análise estatística

Todos os dados foram analisados utilizando o programa de computador Stata/SE v.14.1 (Stata Corp Lp., College Station, Texas, Estados Unidos). Para analisar os fatores associados com o evento progressão (PEVENT), modelos de Fine e Gray foram utilizados, considerando óbito como risco competitivo. Após ajustes, a medida de associação estimada utilizada foi a subdistribuição de razão de risco (SHR). Para analisar sobrevida, modelos ajustados univariado e multivariado de regressão de Cox foram utilizados, e valores de razão de risco (HR) foram estimados. Para avaliar a significância de cada variável, o teste de Wald foi utilizado. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

RESULTADOS

Desfechos clínicos

As variáveis clinicopatológicas do grupo adenocarcinoma (n=122) estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1 – Variáveis clinicopatológicas do grupo adenocarcinoma, e marcações CD133+ e c-MYC+ (marcação positiva). A análise AXL não foi realizada (AXL+ =4).

	n	CD133+	p	c-MYC+	p
Gênero			p=0,52		p=0,53
Masculino	63	14		34	
Feminino	59	17		30	
Idade (anos)			p=0,26		p=0,20
< 50	22	7		11	
50 a 65	45	14		41	
>65	55	10		12	
Local do tumor primário			p=0,19		p=0,17
Cólon direito	42	13		18	
Cólon esquerdo	48	10		24	
Reto	27	6		19	
Estadiamento UICC			p=0,51		p=0,67
0/I/II	41	14		25	
III/IV	62	17		39	
Grau histológico			p=0,42		
Baixo/moderado	93	27		60	
Alto	7	3		4	
Estadiamento TNM patológico					
pTins/pT2	13	3	p=0,74	7	p=0,37
pT3/pT4	84	27		53	
pN0	44	14	p=1	27	p=1
pN1/pN2	48	15		29	
pM0	11	2	P=0,69	9	p=1
pM1	28	8		18	
Local de metástase à distância					
Pulmonar	4	2	p=0,58	1	p=0,14
Hepática	21	5	p=0,59	15	p=0,30
Peritoneal	8	0	p=0,10	7	p=0,25
Outro	8	1	p=0,43	7	p=0,04

O local mais comum de metástases à distância foi o fígado (n=24, 19,7%). A taxa de sobrevida global foi de 44,3%, e o tempo mediano de sobrevida global estimado pelo método Kaplan-Meier foi de 30 meses. A análise univariada demonstrou que adenocarcinomas de estágio precoce foram associados com melhor sobrevida global (Figura 1A). Foi observado que adenocarcinomas pobremente diferenciados e progressão de doença foram fatores de risco independentes para óbito ($p < 0,05$). Expressão positiva de CD133 (Figura 1B) se correlacionou negativamente com óbito na análise univariada, mas esta significância foi perdida na análise multivariada. Expressão de c-MYC e AXL não se associaram com sobrevida global (Figuras 1C e 1D).

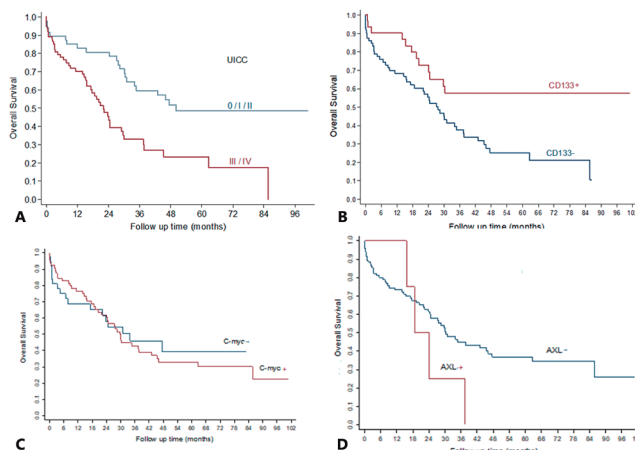


FIGURA 1 – Curva de Kaplan-Meier: A) de acordo com estadiamento UICC precoce (0/I/II) e tardio (III/IV); B) comparando tumores CD133+ e CD133-; C) comparando tumores c-MYC+ e c-MYC-; D) comparando tumores AXL+ e AXL-.

Não houve associação estatisticamente significativo entre a expressão de CD133 e idade, gênero, local de tumor primário, presença de metástase à distância, grau histológico, dimensão tumoral, presença de metástases linfonodais e estadiamento UICC.

Dentre os 122 pacientes, quatro apresentaram marcação positiva para AXL (AXL+, Figura 2B); 97 marcação negativa (AXL-); e 21 foram inconclusivos. A análise estatística não pôde ser concluída devido ao baixo número de casos AXL+.

Expressão positiva de c-MYC foi associada com metástase à distância

Dentre os 122 pacientes, 64 apresentaram marcação positiva para c-MYC (c-MYC+, Figura 1C), 38 negativa (c-MYC-) e 20 casos foram inconclusivos.

Onze pacientes tinham metástase à distância para “outros locais” (excluindo-se fígado, pulmões e peritônio). Entre esses casos, 63,6% (n=7) eram c-MYC positivos, com $p < 0,05$. Este achado demonstrou associação positiva entre expressão de c-MYC e a presença de metástases à distância. Não houve associação estatisticamente significativa entre expressão de c-MYC e idade, gênero, local do tumor primário, presença de metástases à distância em demais locais, grau histológico, dimensão tumoral, metástases linfonodais e estadiamento UICC.

Adenomas colorretais demonstraram expressão de CD133, c-MYC e AXL sem associação com características clinicopatológicas

A análise realizada no grupo adenoma se baseou nos dados de 34 pacientes e um total de 39 adenomas. O grupo foi constituído por 16 homens e 18 mulheres. A idade variou entre 34 a 96 anos, com média de 67,8 anos. As características clinicopatológicas do grupo adenoma estão descritas nas Tabelas 2 e 3.

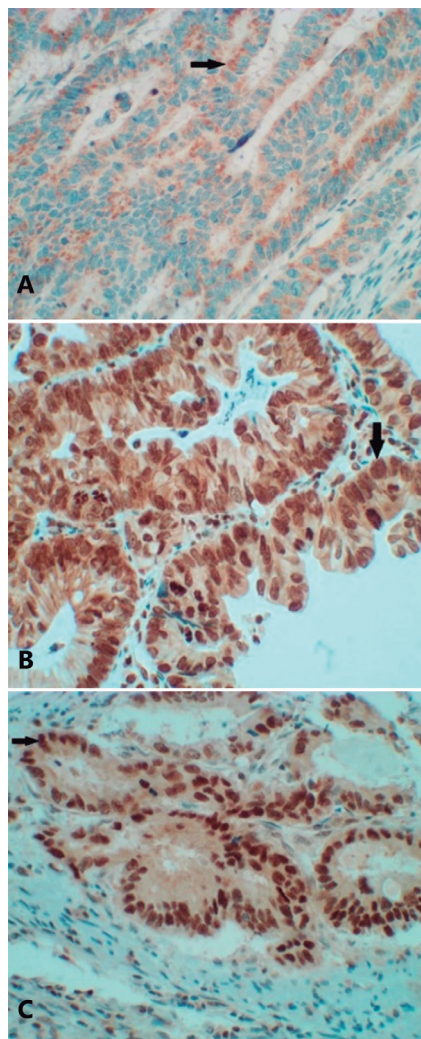


FIGURA 2 – Fotomicrografia de adenocarcinoma colorretal demonstrando positividade: A) CD133+ citoplasmática (seta); B) AXL+ combinada (membrana citoplasmática, citoplasmática e nuclear – seta); C) c-MYC+ nuclear (seta, 400x)

TABELA 2 – Características clínicas e patológicas do grupo adenoma (n=39) e expressão CD133+, c-MYC+ e AXL+ (marcação positiva), com a porcentagem de cada variável considerando resultados de imunomarcacão positivos, negativos e indeterminados (p>0,05)

Variáveis	n	CD133+	c-MYC+	AXL+
Localização anatômica				
Ascendente/ cólon transversal	9	5 (55%)	1 (20%)	1 (25%)
Cólon descendente	6	2 (20%)	1 (20%)	1 (20%)
Sigmoide	17	6 (35,3%)	3 (17,7%)	4 (23,5%)
Reto/ânus	6	2 (33%)	1 (20%)	
Tipo				
Plano	2	1		1
Séssil	11	4 (22,2%)		
Semi-pediculado	5	1 (20%)	1 (20%)	1 (20%)
Pediculado	18	7(38,9%)	5 (27,8%)	4 (22,2%)
Indeterminado	3	1(33,3%)		
Diagnóstico histológico				
Adenoma	31	13(41,9%)	6(19,4%)	
Pólipo hiperplásico	6	1 (16,7%)		
Adenocarcinoma	1			
Pólipo inflamatório	1			
Displasia				
Ausente	23	6 (26,1%)	3 (13%)	2 (8,7%)
Baixo grau	0			
Alto grau	15	8 (57,1%)	2 (14,3%)	3 (21,4%)
Adenocarcinoma in situ	1			

TABELA 3 – Resultados de imunomarcacão de CD133, c-MYC e AXL no grupo adenoma

	CD133	c-MYC	AXL
Positiva	14 (35,9%)	6 (15,4%),	6 (15,4%)
Negativa	10 (25,6%)	17 (43,6%)	20 (51,3%)
Inconclusiva	15 (38,5%)	16 (41%)	13 (33,3%)

Na análise univariada, não houve significância estatística entre adenomas CD133, c-MYC+ e AXL+ com as dimensões, localização anatômica, tipo histológico, diagnóstico histológico e presença de displasia.

Concordância entre marcadores

No grupo adenocarcinoma, concordância moderada entre c-MYC e AXL foi encontrada por meio do coeficiente de concordância Kappa, uma vez que houve 28 (71,8%) casos concordantes (c-MYC+/AXL+ ou c-MYC-/AXL-) e 11 (28,2%) casos discordantes.

DISCUSSÃO

Como já referido, o câncer colorretal é o terceiro câncer mais comum no Brasil e no mundo²². Para refinar o entendimento de sua fisiopatologia molecular, múltiplos estudos envolvendo diferentes expressões genéticas e proteicas foram publicados ao longo dos anos.

Dentre todas as técnicas moleculares que analisam mutações nas células neoplásicas, a imunohistoquímica é uma das mais amplamente empregadas e facilmente acessíveis. Nas últimas duas décadas, microarranjos teciduais (tissue microarrays, TMAs) têm sido usados como técnica de escolha em vários estudos de análise imunohistoquímica, uma vez que se relaciona com redução drástica de gasto financeiro e de outros recursos, além de diminuir o desperdício tecidual²⁸.

No presente estudo, a expressão de três diferentes biomarcadores em 156 pacientes foi analisada usando o método TMA. Ao invés de realizar secções imunohistoquímicas individuais e marcação isolada em 156 blocos tumorais de parafina, pequenos núcleos de cada amostra com a melhor área representativa foram arranjados em um pequeno número de blocos de TMA. No entanto, no contexto do câncer colorretal, a heterogeneidade tecidual aparenta ser particularmente pronunciada e, portanto, pequenas biópsias e secções teciduais possuem risco intrínseco de provocar viés de amostragem quando o dito tecido é testado para a presença de biomarcadores³.

Para avaliar esse possível viés, um estudo foi realizado com sete imunomarcadores em 44 amostras de carcinoma mamário. Variância intratumoral foi vista em cinco, tornando clara a problemática interpretação de que pequenas espécimes de biópsia possam ser representativas do estado de um tumor como um todo¹⁵. Em outra pesquisa envolvendo câncer colorretal, TMA foi realizado usando amostras de 340 pacientes. Oito biópsias distintas foram retiradas do maior número possível de blocos teciduais por paciente. Análise imunohistoquímica foi realizada buscando HER2 e p53, e enquanto 93,2% das amostras demonstraram distribuição homogênea para p53, 88,9% delas tiveram resultados heterogêneos para HER2¹⁶. Como resultado, novos estudos envolvendo CCR usando "TMAs de heterogeneidade" são necessários para comprovar esta significância implícita, incluindo mais de um único fragmento tumoral para assim obter resultado consistente sobre mutações moleculares tumorais e a expressão proteica relacionada.

O objetivo de estudar câncer e lesões pré-neoplásicas como adenomas colorretais é o de construir um banco de dados para cada tipo e subtipo de tumor, possibilitando assim um "diagnóstico tumoral molecular". Com a técnica imunohistoquímica, é possível isolar os tipos neoplásicos que requerem maior atenção em relação ao seguimento e, putativamente, à necessidade de

quimioterapia adjuvante de maior intensidade e/ou terapia com biológicos. É também importante entender quais genes e vias moleculares se encontram hiperativados ou suprimidos, para então permitir tentativas de correção molecular de fatores desencadeantes por meio de estratégias terapêuticas emergentes, como a terapia-alvo.

A literatura disponível recente ainda possui grande controvérsia em relação aos resultados de biomarcadores de câncer colorretal, particularmente em células-tronco tumorais. Múltiplos estudos relacionam a expressão de CD133 em tumores com características clinicopatológicas agressivas e prognóstico menos favorável²⁵. Para obter conclusão definitiva, uma metanálise foi publicada incluindo 37 artigos relacionados a expressão de CD133, determinando que os casos de CCR com expressão positiva de CD133 possuem características clinicopatológicas mais agressivas e pior prognóstico¹¹. Embora CD133 tenha sido usado como marcador de células-tronco tumorais, pouco é conhecido sobre sua função. Se o CD133 participa no comportamento biológico de células-tronco tumorais ou meramente age como marcador do fenótipo de tal linhagem celular não é estabelecido. Dois estudos foram realizados para investigar os tipos de instabilidade genômica e de células-tronco tumorais no câncer colorretal, e ambos encontraram que altos níveis de expressão de CD133 se associaram com câncer colorretal com estabilidade de microssatélites^{5,18}.

Este estudo demonstrou associação significativa entre adenocarcinomas com expressão de c-MYC e a presença de metástases à distância ($p < 0,05$). Entretanto, conclusões opostas também existem na literatura para esse relevante fator de transcrição, e relatam que pacientes com tumores MYC-positivos demonstraram maior sobrevida em cinco anos²³. Para tentar justificar a diferença de significância observada em estudos de imunistoquímica sobre c-MYC, pesquisa foi realizada envolvendo dois tipos de anticorpos MYC: anticorpo N-terminal (Y69) e C-terminal (9E10), com posterior associação a resultados de hibridização *in situ* (ISH). Os autores concluíram que anticorpos que se dirigem ao alvo C-terminal (9E10) precisam ser interpretados com cuidado¹.

Outros métodos moleculares biológicos também foram usados para definir a expressão do oncogene c-MYC. Um estudo utilizou a hibridização *in situ* por prata (SISH) e a reação em cadeia da polimerase digital da gota (ddPCR) para detectar a presença do gene c-MYC em CCR, e concluiu que a superexpressão de c-MYC é fato de risco independente para pior prognóstico ($p = 0,002$)¹³. Outro estudo bioinformático que analisou dados do Atlas Genômico do Câncer objetivando identificar o papel prognóstico de biomarcadores e possíveis terapias-alvo para CCR concluiu que MYC influencia várias vias tumorais e pode ser utilizado como candidato preditivo para pior prognóstico e para terapia-alvo⁸.

O presente estudo demonstrou taxa muito baixa de adenocarcinomas AXL-positivos, impossibilitando a realização de qualquer análise estatística. De toda forma, AXL permanece com controvérsia em relação ao seu uso como biomarcador e para terapia-alvo. Um estudo recente demonstrou o efeito paradoxal do AXL e do receptor de tirosina quinase Mer em câncer colônico. Os autores demonstraram que AXL e Mer são expressos em várias células tumorais e possuem seu papel oncogênico bem estabelecido, mas seu silenciamento genético leva ao aumento de citocinas pós-inflamatórias, favorecendo ambiente que promove a expansão tumoral⁴. Outra pesquisa com 223 pacientes encontrou tumores AXL-positivos em 76,7% das amostras, e que tais tumores se correlacionam com histologia pouco diferenciada ($p < 0,05$). A administração de inibidores de AXL em modelos ortotópicos de câncer colônico utilizando células tumorais HCT116 resultou em inibição significativa do crescimento tumoral e da disseminação metastática pelo peritônio. Os autores concluíram pelos seus resultados que a inibição de AXL pode representar uma nova abordagem terapêutica para o câncer colorretal¹⁴.

Outro estudo envolvendo 18 casos de CCR com silenciamento subsequente de AXL em painel de linhagens celulares de câncer colorretal demonstrou correlação estatisticamente significativa entre a expressão de AXL e cânceres de estágio IV em comparação com estágio 0. Além disso, o silenciamento gênico inibiu significativamente a migração e invasão das células tumorais, mas não reduziu sua proliferação e sobrevivência, assim como também não estimulou o aumento de apoptose e quimiossensibilidade. No entanto, resultados controversos foram vistos entre estudos em relação à relevância da expressão de AXL em células de câncer colorretal HCT66²⁴.

No grupo adenoma, nenhuma expressão estatisticamente significativa ou correlação com dados de desfecho clínico foram encontradas para os biomarcadores CD133, c-MYC e AXL. Tais resultados parecem sugerir que a expressão destes marcadores tumorais não é de importância significativa em amostras colorretais não-malignas baseadas na técnica TMA. Dois estudos totalizando 243 casos avaliaram a presença de CD133 em adenomas colorretais usando dois diferentes métodos – imunistoquímica isolada e imunistoquímica com microarranjo, e ambos enfatizaram a importância de CD133 para a carcinogênese colorretal^{12,27}. O oncogene c-MYC foi estudado em análise multiômica com 275 pacientes, pareando seus tecidos colônicos saudáveis com tecido neoplásico (de adenomas até adenocarcinomas estágio UICC IV). Os autores concluíram que a reprogramação metabólica global do CCR ocorre no estágio adenoma e é induzido pelo MYC¹⁹.

Outra pesquisa imunistoquímica foi realizada com 380 adenomas buscando diferenças em mutações de Ki-67 molecular, COX-2, TGFβRI, EGFR, β-catenina, ciclina D1, c-MYC e TUNEL (apoptose); em adenomas proximais e distais, e que podem contribuir para a heterogeneidade tumoral entre duas topografias. Os autores concluíram que a localização do adenoma não é um dos principais determinantes da expressão dos biomarcadores analisados, além de outros fatores patológicos²¹. Um estudo distinto avaliou a expressão de 29 marcadores em 50 pacientes, pareando seu tecido neoplásico (de adenoma a adenocarcinoma com metástase hepática) com uma amostra de mucosa sadia. Os autores concluíram que a tirosina quinase Arg possui possível papel na carcinogênese colônica, especialmente na transição entre adenoma para carcinoma⁶.

Existem várias razões para divergências em pesquisas relacionadas a biomarcadores tumorais. Diferentes técnicas diretamente relacionadas à reação e ao procedimento de imunistoquímica, a qualidade dos anticorpos, a ausência de protocolos padronizados para controle de interpretação positiva e negativa, diferentes métodos de fixação química, e também a quantidade e qualidade do material e os tipos de espécimes a serem analisados (à fresco ou fixados em formaldeído). Dentre os estudos analisados, não existe padronização metodológica que poderia tornar os achados mais confiáveis para comparação. Alguns exemplos deste problema são a existência de diferentes anticorpos para o mesmo biomarcador, a variabilidade do conceito de expressão positiva de um marcador entre autores e a ausência de relatos sobre a localização marcada – se nuclear ou citoplasmática, por exemplo. É importante recordar que devido à heterogeneidade tumoral, ocasionalmente o espécime de tecido escolhido para ser analisado pode não ter marcação positiva, ao passo que outras amostras do mesmo tumor poderiam ter resultados positivos.

Embora muito progresso tenha sido feito nos últimos anos para melhor entender o poder preditivo e prognóstico de biomarcadores em cânceres sólidos, especialmente no caso de CD133, sua utilidade ao marcar células-tronco tumorais permanece ainda muito controversa. Pesquisas adicionais são necessárias para desenvolver métodos mais acurados de perfilamento tumoral e assim adquirir resultados mais consistentemente confiáveis e comparáveis, permitindo assim melhor cuidado clínico para pacientes com adenocarcinoma colorretal.

Os resultados encontrados para CD133 demonstram achados em oposição à literatura prévia sobre CCR, e definem a

necessidade de sua análise no contexto de outros biomarcadores moleculares de interesse, bem como características do tumor e do paciente, buscando assim interpretação de dados mais confiável em relação aos desfechos clínicos e prognóstico.

CONCLUSÕES

A expressão de CD133 em análise TMA não se associou com sobrevida global inferior em pacientes com CCR. Enquanto AXL demonstrou resultados inconclusivos, a expressão de c-MYC em CCRs primários associou-se com metástase à distância.

REFERÊNCIAS

- Baker AM, Van Noorden S, Rodriguez-Justo M, Cohen P, Wright NA, Lampert IA. Distribution of the c-MYC gene product in colorectal neoplasia. *Histopathology*. 2016 Aug; 69(2):222-9. doi: 10.1111/his.12939.
- Barchi LC, Ramos MF, Dias AR, Andreollo NA, Weston AC, Lourenço LG et al. II Brazilian Consensus on Gastric Cancer by the Brazilian Gastric Cancer Association. *ABCD, arq. bras. cir. dig.* 2020;33(2):e1514. ISSN 0102-6720. doi: 10.1590/0102-672020190001e1514
- Blank A, Edward D, Roberts, Dawson H, Zlobec I, Lugli A. Tumor Heterogeneity in Primary Colorectal Cancer and Corresponding Metastases. Does the Apple Fall Far From the Tree? *Front Med*. 2018 Aug;5:234. doi: 10.3389/fmed.2018.00234
- Bosurgi L, Bernink JH, Delgado Cuevas V, Gagliani N, Joannas L, Schmid ET et al. Paradoxical role of the proto-oncogene Axl and Mer receptor tyrosine kinases in colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Aug; 110(32):13091-6. doi: 10.1073/pnas.1302507110.
- Cheah PL, Li J, Looi LM, Teoh KH, Ong DB, Arends MJ. DNA mismatch repair and CD133-marked cancer stem cells in colorectal carcinoma. *Peer J*. 2018 Sep;6:e5530. doi: 10.7717/peerj.5530
- Chen WS, Kung HJ, Yang WK, Lin W. Comparative tyrosine-kinase profiles in colorectal cancers: enhanced arg expression in carcinoma as compared with adenoma and normal mucosa. *Int J Cancer*. 1999 Nov; 83(5):579-84. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19991126)83:5<579::AID-IJC1>3.0.CO;2-R
- DE-Souza ASC, Costa-Casagrande TA. Animal models for colorectal cancer. *ABCD, arq. bras. cir. dig.* 2018 Jul;31(2):e1369. doi: 10.1590/0102-672020180001e1369.
- Dong S, Ding Z, Zhang H, Chen Q. Identification of Prognostic Biomarkers and Drugs Targeting Them in Colon Adenocarcinoma: A Bioinformatic Analysis. *Integr Cancer Ther*. 2019 Aug;18. doi: 10.1177/1534735419864434
- Freitas BA, Loth CAT, Swarovsky GL, Lourenço GM, Fillmann LS, Fillmann HS et al. Are obesity and adenoma development associated as colorectal cancer precursors? *ABCD, arq. bras. cir. dig.* 2020;33(1). ISSN 0102-6720.
- Gay CM, Balaji K, Byers LA. Giving AXL the axe: targeting AXL in human malignancy. *Br J Cancer*. 2017 Jan;116(4):415-23. doi: 10.1038/bjc.2016.428.
- Huang R, Mo D, Wu J, Ai H, Lu Y. CD133 expression correlates with clinicopathologic features and poor prognosis of colorectal cancer patients: An updated meta-analysis of 37 studies. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Jun;97(23):e10446. doi: 10.1097/MD.00000000000010446.
- Kazama S, Kishikawa J, Kiyomatsu T, Kawai K, Nozawa H, Ishihara S et al. Expression of the stem cell marker CD133 is related to tumor development in colorectal carcinogenesis. *Asian J Surg*. 2018 May;41(3):274-8. doi: 10.1016/j.asjsur.2016.12.002
- Lee KS, Nam SK, Seo SH, Park KU, Oh HL, Kim DW et al. Digital polymerase chain reaction for detecting c-MYC copy number gain in tissue and cell-free plasma samples of colorectal cancer patients. *Sci Rep*. 2019 Feb; 9:1611. doi: 10.1038/s41598-018-38415-4
- Martinelli E, Martini G, Cardone C, Troiani T, Liguori G, Vitagliano D et al. AXL is an oncotarget in human colorectal cancer. *Oncotarget*. 2015 Sep;6(27):23281-96. doi: 10.18632/oncotarget.3962
- Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, Dinh HH, Drummond JA, Fowler G, et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012 Jul;487(7407):330-7. doi: 10.1038/nature11252.
- Nassar A, Radhakrishnan A, Cabrero I A, Cotsonis GA, Cohen C. Intratumoral heterogeneity of immunohistochemical marker expression in breast carcinoma: a tissue microarray-based study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010 Oct;18(5):433-41. doi: 10.1097/PAI.0b013e3181d8db20.
- National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Result Program. U.S. Department of Health and Human Services. National Institutes of Health [cited 2019 Oct 9]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>
- Park JJ, Kwon JH, Oh SH, et al. Differential expression of CD133 based on microsatellite instability status in human colorectal cancer. *Mol Carcinog*. 2014 Feb;53 Suppl 1:E1-E10. doi:10.1002/mc.21971
- Satoh K, Yachida S, Sugimoto M, Oshima M, Nakagawa T, Akamoto S et al. Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Aug;114(37):E7697-706. doi: 10.1073/pnas.1710366114
- Stahl PPR, Schnellert J, Koop C, Simon R, Marx A, Izbicki J Retal. Determination of Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancers Using Heterogeneity Tissue Microarrays. *Pathol. Oncol. Res*. 2015 Sep;21(4):1183-9. doi: 10.1007/s12253-015-9953-4
- Su T, Washington MK, Ness RM, Rex DK, Smalley WE, Ulbright TM et al. Comparison of biomarker expression between proximal and distal colorectal adenomas: The Tennessee-Indiana Adenoma Recurrence Study. *Mol Carcinog*. 2017 Feb;56(2):761-73. doi: 10.1002/mc.22533.
- Teixeira UF, Fontes PRO, Conceição CWN, Farias CAT, Fernandes D, Ewald IP et al. Implementation of enhanced recovery after colorectal surgery (ERAS) protocol: initial results of the first Brazilian experience. *Arq Bras Cir Dig*. 2019 Feb;32(1):e1419. doi: 10.1590/0102-672020180001e1419.
- Toon CW, Chou A, Clarkson A, DeSilva K, Houang M, Chan JCY et al. Immunohistochemistry for Myc Predicts Survival in Colorectal Cancer. *PLOS ONE*. 2014 Feb;9(2):e87456. doi: 10.1371/journal.pone.0087456.
- Uribe DJ, Mandell EK, Watson A, Martinez JD, Leighton JA, Ghosh S et al. The receptor tyrosine kinase AXL promotes migration and invasion in colorectal cancer. *PLOS ONE*. 2017 Jul;12(7):e0179979. doi: 10.1371/journal.pone.0179979
- Wang BB, Li ZJ, Zhang FF, Hou HT, Yu JK, Li F. Clinical significance of stem cell marker CD133 expression in colorectal cancer. *Histol Histopathol*. 2016 Mar;31(3):299-306. doi: 10.14670/HH-11-676.
- Wilson BJ, Schatton T, Frank MH, Frank NY. Colorectal cancer stem cells: biology and therapeutic implications. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2011 Jun;7(2):128-35. doi: 10.1007/s11888-011-0093-2
- Yang CY, Tseng JY, Chou TY, Gao HW, Hua CL, Lin CH et al. Genome-wide copy number changes and CD133 expression characterized distinct subset of colon polyps: differentiation between incidental polyps and cancer-associated polyps. *Int J Colorectal Dis*. 2015 Dec;30(12):1617-26. doi: 10.1007/s00384-015-2319-2
- Zlobec I, Suter G, Perren A, Lugli A. A Next-generation Tissue Microarray (ngTMA) Protocol for Biomarker Studies. *J Vis Exp*. 2014 Sep;(91), e51893. doi:10.3791/51893