

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:

GASTROENTEROLOGIA

**EXPRESSÃO DAS VARIANTES v5 E v6 DA PROTEÍNA CD44
NA MARGEM TUMORAL INVASIVA DOS
ADENOCARCINOMAS COLORRETAIS**

CESAR CHIELE NETO

PORTO ALEGRE, 1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:

GASTROENTEROLOGIA

EXPRESSÃO DAS VARIANTES v5 E v6 DA PROTEÍNA CD44 NA MARGEM

TUMORAL INVASIVA DOS

ADENOCARCINOMAS COLORRETAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AUTOR: CESAR CHIELE NETO

ORIENTADORES: CLÁUDIO ROLIM TEIXEIRA E PEDRO GUS

Porto Alegre, 1999

M MED 05186324
I 1
S W1519 C533a 1999
j 1999. Chiele Neto, Cesar. Expressão das
v variantes v5 e v6 da proteína CD44 na margem
t tumoral invasiva dos adenocarcinomas
c colorretais. 1999. 75 f. : il.
:

C533e Chiele Neto, Cesar

Expressão das variantes v5 e v6 da proteína CD44 na margem tumoral invasiva de adenocarcinomas colorretais / Cesar Chiele Neto ; orient. Cláudio Rolim Teixeira e Pedro Gus. – Porto Alegre, 1999.

Dissertação(Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina : Gastroenterologia.

1. Neoplasias colorretais. 2. Adenocarcinoma. 3. Metástase neoplásica. 4. CD44 I. Teixeira, Cláudio Rolim. II. Gus, Pedro. III. Título.

NLM: WI 529

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

**À minha esposa
BEATRIZ**

**Aos meus filhos
GABRIEL E LAURA**

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e orientador **Prof. Dr. Cláudio Rolim Teixeira**, pesquisador e principal incentivador à minha formação científica.

Ao **Prof. Dr. Pedro Gus**, pela orientação e ensinamentos durante à minha formação médica.

Ao amigo e colega **Dr. Vinícius Duval da Silva**, por sua participação fundamental em todos os momentos da execução desta dissertação de mestrado, mesmo quando encontrava-se no exterior concluindo a sua tese de doutorado.

Ao amigo e colega **Dr. Cláudio Tarta**, pela colaboração e estímulo durante a realização desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Gabriel de Barros**, pela confiança, compreensão, apoio e, também, pela oportunidade proporcionada pelo curso de pós-graduação em gastroenterologia para a realização desta dissertação de mestrado.

Ao **Prof. Dr. Mário Wagner**, pelo auxílio fundamental na análise dos resultados obtidos.

À **Dra. Patrícia Ashton-Prolla**, pelo auxílio na compreensão dos eventos genéticos e de biologia molecular que envolveram a execução deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. João Carlos Prolla**, pela possibilidade de executar boa parte desta dissertação no serviço de Citologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Aos meus pais, **Ibanez e Loiva**, responsáveis pela minha educação e estímulo ao estudo.

Ao **Laboratório Anticorpos** do Rio de Janeiro pela execução da técnica imunohistoquímica.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
1. RESUMO.....	IX
2. INTRODUÇÃO	11
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Delineamento do Estudo:.....	26
4.2 Amostra Estudada:	26
4.3 Metodologia.....	27
4.3.1 Avaliação da Positividade.....	27
5. RESULTADOS.....	35
6. DISCUSSÃO	47
6.1 Perspectivas	55
7. CONCLUSÃO	58
8. SUMMARY	59
9. BIBLIOGRAFIA.....	61
ANEXO 1.....	71
ANEXO 2.....	72

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Descrição dos aspectos demográficos, anatomopatológicos e cirúrgicos dos pacientes com tumores colorretais..... **36**
- Tabela 2** - Descrição das características potencialmente relacionadas com a evolução e prognóstico dos tumores colorretais..... **37**
- Tabela 3** - Avaliação bivariada das associações entre diversos fatores e a ocorrência de metástases em carcinomas colorretais. **39**
- Tabela 4** - Modelo de regressão logística para avaliação da associação entre a variante v6 da proteína CD44 e ocorrência de metástases controlando para potenciais fatores de confusão. **40**
- Tabela 5** - Modelo de regressão logística para avaliação da associação entre a variante v5 da proteína CD44 e ocorrência de metástases controlando para potenciais fatores de confusão. **41**
- Tabela 6** - Avaliação bivariada da associação entre diversos fatores e a ocorrência de óbito em carcinomas colorretais. **45**
- Tabela 7** - Modelo de regressão de azares proporcionais (regressão de Cox) entre a variante 5 da proteína CD44 e o tempo para o óbito..... **46**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Expressão imunohistoquímica positiva da variante v5 (400x). 29
- Figura 2** - Glândulas tumorais que não expressam a variante v5. (400x)..... 29
- Figura 3** - Adenocarcinoma colorretal com expressão positiva da CD44v6(400x)... 30
- Figura 4** - Adenocarcinoma colorretal com expressão positiva da CD44v5 ((400x).31
- Figura 5** - Adenocarcinoma colorretal bem diferenciado (200x). 33
- Figura 6** - Adenocarcinoma colorretal moderadamente diferenciado (100x). 33
- Figura 7** - Adenocarcinoma pouco diferenciado (32x). 34
- Figura 8** - Gráfico de Kaplan-Meier apresentando a ocorrência de óbito nos pacientes com carcinoma colorretal..... 42
- Figura 9** - Gráfico de Kaplan-Meier demonstrando a sobrevida entre os grupos v5+ e v5- 43
- Figura 10** - Gráfico de Kaplan-Meier demonstrando a sobrevida entre os grupos v6+ e v6- 43

1. RESUMO

A glicoproteína CD44 e suas variantes são moléculas de adesão celular envolvidas no comportamento metastático de algumas células cancerosas. Este estudo avaliou a expressão imunohistoquímica das variantes v5 e v6 da proteína CD44 na margem tumoral invasiva (profunda) de adenocarcinomas colorretais e sua associação com a presença de metástases distantes e com o óbito. Para tanto, foram selecionados aleatoriamente 55 adenocarcinomas colorretais de pacientes submetidos a cirurgia no *The First Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology - Hiroshima University School of Medicine*, no período de 1988 a 1991. As variáveis analisadas dos adenocarcinomas colorretais foram o tipo histológico, invasão da parede intestinal, invasão venosa, presença de metástases linfonodais e distantes, classificação de Dukes, idade, sexo e óbito. A avaliação da associação entre as metástases distantes e o óbito com a expressão das variantes v5 e v6 da CD44 foi realizada através de uma análise bivariada, multivariada e regressão de Cox. Os resultados deste estudo mostraram uma associação estatisticamente significativa entre tipo histológico pouco diferenciado ($P = 0,009$), a invasão tumoral além da parede intestinal ($P = 0,024$), a invasão venosa ($P = 0,012$) e dos linfonodos ($P = < 0,001$) e o surgimento de metástases distantes. A invasão venosa, as metástases linfonodais e viscerais foram os fatores que contribuíram significativamente para a ocorrência do óbito ($P = 0,019$, $0,005$ e $<0,001$ respectivamente) As variantes v5 e v6 estavam expressas em 57,4% e 33,3% das amostras analisadas pelo método imunohistoquímico. Na avaliação bivariada, não foi observada associação entre a expressão das variantes v5 e v6 da CD44 e o surgimento de metástases distantes ($P \cong 1,000$ e $P = 0,278$, respectivamente) ou ao prognóstico destes pacientes ($P = 0,991$ e $P = 0,900$, respectivamente). Num modelo de regressão logística para avaliação da associação entre as variantes v5 e v6 e ocorrência de metástases, controlando para potenciais fatores

de confusão, observamos que a variante v5 mostrou uma tendência a expressar-se como fator de proteção para o surgimento de metástases e a v6 não demonstrou associação ($P=0,073$ e $RC=0,19$; $P=0,895$ e $RC=1,15$, respectivamente). No modelo de regressão de Cox entre a expressão da v5 e a ocorrência do óbito, observamos que esta variante expressou-se significativamente como um fator de proteção para este evento ($P=0,029$). Apesar da CD44 e suas variantes desempenharem um papel na disseminação das células tumorais, o valor desta proteína no prognóstico do adenocarcinoma colorretal não está definido com clareza.

2. INTRODUÇÃO

O câncer colorretal é o segundo tumor maligno mais freqüente nos países desenvolvidos. É muito comum nos Estados Unidos, Europa Ocidental e Austrália (Parkin et al., 1993). No mundo, é o terceiro mais freqüente em ambos os sexos, precedido pelos tumores de pulmão e estômago no homem e pelos tumores de mama e colo do útero na mulher (Coleman et al., 1993; Boring et al., 1991).

Apesar do Brasil não constar na lista dos vinte países com maior prevalência de câncer colorretal (Wilmink, 1997), a sua incidência vem aumentando progressivamente nos últimos anos, sendo maior nas regiões economicamente mais desenvolvidas. Porto Alegre e Campinas são as cidades que apresentam as maiores taxas de incidência de todas as formas de câncer. Dados do Ministério da Saúde estimaram a ocorrência de 9200 novos casos de câncer colorretal em homens e 9850 em mulheres no ano de 1999 (INCA, 1999). Esta neoplasia maligna é a quinta em incidência e mortalidade, permanecendo atrás dos tumores de pulmão, estômago, mama e colo uterino (INCA, 1997). No Estado do Rio Grande do Sul o câncer colorretal é a quinta causa de morte por neoplasias entre os homens e a terceira entre as mulheres (SSMA, 1997).

A grande maioria (aproximadamente 90%) dos carcinomas colorretais são adenocarcinomas (Fletcher et al., 1995). O tratamento de escolha é a cirurgia com a retirada do tumor e dos linfonodos regionais. O comprometimento destes linfonodos por células tumorais é o fator que normalmente indica o tratamento complementar com radioterapia e ou quimioterapia (Engel et al., 1996).

As neoplasias malignas são constituídas por múltiplas subpopulações de células com diferentes características genéticas, bioquímicas, imunológicas e biológicas (Fidler I.J., 1978). Entre as propriedades biológicas mais comuns destas subpopulações de células cancerosas estão o poder de invadir e metastatizar. Este processo de disseminação

tumoral é acompanhado por um aumento da instabilidade genética das células e, conseqüentemente, uma rápida diversificação do seu fenótipo. Com isso, a ação das modalidades terapêuticas torna-se mais difícil. (DeVita et al, 1997).

Após estabelecido o diagnóstico de câncer é importante identificar se a doença é localizada ou sistêmica. Independente da melhora das técnicas cirúrgicas e das terapias adjuvantes, a maioria das mortes resultam do surgimento das metástases. Por isso, a detecção precoce do tumor pode decretar a sua cura. Sabe-se que as metástases são um processo ativo e não uma conseqüência acidental do crescimento tumoral. A invasão dos tecidos sadios pelas células tumorais é um fenômeno complexo que envolve respostas tanto das células normais como das células cancerosas. As células tumorais devem possuir propriedades adesivas que permitam a estas ligarem-se à superfície do endotélio causando a sua retração e permitindo a exposição da matriz extracelular composta por uma diversidade de moléculas de proteínas e carboidratos. Além de servir como um filtro seletivo, a matriz extracelular serve como uma barreira mecânica, evitando a invasão das células tumorais. A ruptura da membrana basal (que é uma forma especializada de matriz extracelular) é um marco na invasão tecidual. Os três passos da invasão da membrana basal são: 1) adesão, 2) ativação das enzimas proteolíticas (metaloproteinases), e 3) migração, que é a passagem das células tumorais pela zona danificada da membrana basal (Liotta L.,1992).

A formação das metástases inicia com a proliferação progressiva das células neoplásicas com nutrientes gerados por difusão pelo microambiente local. Segue-se a angiogênese que é a formação de novos capilares no estroma tumoral a partir de células endoteliais do hospedeiro promovendo o desenvolvimento da massa tumoral (Folkman, 1971).

Os receptores de adesão celular são proteínas que permitem aos tecidos manterem a sua estabilidade transmitindo informações entre o meio extracelular e as

células. Estas informações possibilitam às células determinar a sua posição dentro do organismo bem como o seu estado de diferenciação. No processo de adesão celular, as células usam receptores específicos da sua superfície para realizar esta tarefa.

Acredita-se que a habilidade das células tumorais malignas para invadir a matriz extracelular e metastatizar seja, pelo menos em parte, pela expressão dos receptores de adesão celular que interagem com os componentes da matriz extracelular e da membrana basal. Os principais receptores de adesão celular são as integrinas, a superfamília das imunoglobulinas (IgG), as caderinas, as lamininas e a CD44 (Streit et al., 1996).

Após ocorrer a diminuição da adesão celular, as células cancerígenas desprendem-se do tumor primário, invadem a matriz extracelular e entram na circulação até pararem no leito capilar e aderirem a membrana basal subendotelial, penetrando novamente (através desta membrana) no parênquima do órgão distante. As células proliferam através da nova formação angiogênica. Surgem então micrometástases que evoluem para a formação de metástases clinicamente importantes (Hart I.R., 1992; Hirschel-Scholz & Sapino, 1992).

CD44 ("Cluster of Differentiation 44") é uma glicoproteína de adesão da superfície celular envolvida nas interações intercelulares e das células com a matriz extracelular (Carter & Wayner, 1988; Haynes et al., 1989). A proteína também atua como uma receptora multifuncional envolvida no trânsito das células, na ligação dos linfócitos aos linfonodos - "lymph node homing" (Jalkanen et al., 1986), hematopoiese, migração celular (Lesley et al., 1993) e nas metástases tumorais (Günthert et al.; 1991).

Entre as famílias de moléculas estruturalmente diferentes que são responsáveis pela função adesiva normal das células, encontram-se os proteoglicanos. Estes são componentes da matriz extracelular e interagem com o ácido hialurônico. A CD44 faz parte do grupo dos proteoglicanos (Doerge et al., 1987).

CD44 foi descrita inicialmente como um antígeno linfocitário de granulócitos T cerebrais (Dalchau et al., 1980). Por ter sido estudada por grupos independentes em laboratórios e contextos distintos a CD44 recebeu várias denominações tais como: glicoproteína fagocítica 1 (Pgp1), Ly 24, receptor da matriz extracelular (ECM III), gp90 hermes, H-CAM, e receptor do hialuronato (Underhill C., 1992). O nome CD44 foi determinado no "Third International Workshop on Leucocyte Differentiation Antigens" (Cobbold S. et al., 1987).

Esta proteína é codificada por um gene único localizado no braço curto do cromossomo 11 dos seres humanos (Goodfellow et al., 1982). Vinte exons estão envolvidos na organização genômica desta molécula (Screaton et al., 1992). Os primeiros 5 e os últimos 5 exons são constantes ao passo que os 10 exons localizados entre estas regiões estão sujeitos ao processamento alternativo ("alternative splicing"). Isto resulta na formação de uma região codificadora central de estrutura e tamanho variáveis gerando múltiplas isoformas. Estas isoformas que originam-se de um mesmo gene, possuem seqüências similares mas tamanhos moleculares diferentes (85 a 230kDa) dependendo de quais exons são utilizados. CD44 é uma proteína de cadeia simples composta por um domínio extracelular distal (contendo os sítios de ligação), uma região próxima à membrana, uma porção transmembranosa e uma cauda citoplásmica. A natureza heterogênea da CD44 (resultado do processamento alternativo bem como de diferentes glicosilações e glicoaminoglicanações) pode explicar a natureza multifuncional desta molécula e sua habilidade de ligar-se a outras substâncias de uma forma bastante específica.

As variantes da proteína CD44, abreviadas como CD44v ou "v", podem ser identificadas através de anticorpos monoclonais codificados especificamente para epitopos destas regiões por método imunohistoquímico ou citometria de fluxo (Naor et al., 1997).

Pals e colaboradores (1989) observaram que uma glicoproteína de 90kDa homóloga do "Hermes-1 human lymphocyte homing receptor (Hermes-1 LHR)" expressava-

se no tecido hematopoiético, alguns tecidos não hematopoiéticos e também em células tumorais, postulando que nestas últimas a molécula poderia desempenhar um papel na adesão intercelular e das células com a matriz. Posteriormente observou-se que a CD44 era homóloga ao Hermes-1 LHR (Picher, 1989).

A versão mais abundante da proteína é a CD44 padrão (85-95kDa), expressando-se principalmente nas células hematopoiéticas. É também conhecida como CD44 hematopoiética (CD44H). A CD44 epitelial (CD44E) é a isoforma ligada às células epiteliais. Observou-se que esta forma apresentava expressão fraca no epitélio normal, mas expressão forte em carcinomas (Stamenkovic et al, 1991).

Além da função adesiva, a CD44 colabora com outras moléculas na transmissão de sinais de crescimento emitidos da membrana celular para o núcleo das células (Lesley et al., 1993).

A interação entre a CD44 da superfície celular e o endotélio pode ser vital para a disseminação hematogênica dos tumores (Springer et al., 1994).

O ácido hialurônico é o principal polissacarídeo ligado à CD44 participando da sua captação e degradação intracelular (Culty et al. 1992). É sintetizado pelos fibroblastos, condrócitos e células mesoteliais (Teder et al., 1995; Honda et al., 1991). Este ácido é também um importante componente da matriz extracelular preenchendo os espaços intercelulares, regulando a adesão entre as células, sua orientação espacial e tráfego, bem como o seu crescimento e diferenciação. A CD44, por estar ligada ao ácido hialurônico, participa também da montagem e organização da matriz pericelular (Knudson C.B., 1993). A síntese do ácido hialurônico parece estar aumentada durante os processos de mitose e migração das células (Laurent & Fraser, 1992). Estes processos são observados na adventícia das veias, nas zonas de ferimentos que sofrem reparos, nos sítios de inflamação e nos tecidos invadidos por tumores (Sy et al., 1991). Muitos tumores ricos em ácido hialurônico apresentam um maior grau de invasão (Knudson et al., 1989). Especulou-

se que a degradação do ácido hialurônico que circunda os vasos sanguíneos permitiria que as células tumorais penetrassem mais rapidamente na circulação acelerando o processo metastático (Underhill, 1992). Como o ácido hialurônico cria um microambiente com baixa resistência ao movimento das células, podemos inferir que a proteína CD44 (como receptora do ácido hialurônico) desempenha um importante papel na motilidade das células. Esta motilidade é fundamental para o desenvolvimento embrionário, cicatrização dos ferimentos, substituições teciduais rotineiras e fator crucial na formação das metástases (Toole et al., 1979; Laurent & Fraser, 1992).

A análise histoquímica da cicatrização da mucosa humana revela que a proteína CD44 e o ácido hialurônico estão localizados na mesma região do epitélio durante os estágios da reparação tecidual. O tecido de granulação recém formado apresenta forte expressão da CD44 (Oksala et al., 1995). Em muitos casos, a CD44 pode ligar-se também ao colágeno da matriz extracelular como descreveram Carter & Wayner em 1988.

Considerando o papel desempenhado pela proteína CD44 em muitas funções fisiológicas e patológicas, é importante identificar novas substâncias às quais esta glicoproteína poderia estar ligada.

Alguns exemplos da sua presença e importância em eventos patológicos e fisiológicos são citados a seguir:

1 - A expressão da proteína CD44 está aumentada na membrana e líquido sinoviais (ricos em ácido hialurônico) dos pacientes com artrite reumatóide. A presença da CD44 no tecido sinovial está relacionado com o seu grau de inflamação. (Haynes et al., 1991).

2 - CD44 foi detectada precocemente, por imunofluorescência indireta, em embriões ainda não implantados no útero contendo de uma a oito células. A proteína está presente em células do estroma placentário entre 8 e 11 semanas, mas não no trofoblasto.

A diminuição da sua expressão ocorre na superfície embrionária após a implantação (Campbell et.al.,1995).

3 - Análise imunohistoquímica de amostras de endométrio demonstraram que ocorre expressão de CD44 na fase secretora média e tardia mas não na fase proliferativa e nas fases secretora inicial e atrófica. Os resultados sugerem que a proteína possa estar envolvida na fertilização e implantação do ovo no endométrio (Yaegashi et al., 1995).

4 - A glicoproteína CD44 é expressa predominantemente em regiões que apresentam células proliferativas como na linha basal dos epitélios estratificados e na base das criptas de Lieberkuhn do epitélio intestinal. As células superficiais (vilos) do intestino grosso e alguns tipos de epitélio como o do estômago não apresentam receptores para o ácido hialurônico (Alho & Underhill, 1989). Com isto, pode-se concluir que a relação entre divisão celular e receptores do hialuronato não está presente em todos epitélios.

A CD44 também desempenha um papel nos processos cancerígenos:

1 - Um estudo experimental com tumores em ratos (que possuem comportamento semelhante aos tumores humanos) evidenciou claramente que a glicoproteína CD44 possui um papel importante no processo metastático (Günthert et al.,1991). Variantes expressas neste processo também foram observadas nos macrófagos e linfócitos T e B após receberem estímulos antigênicos. Assim, foi sugerido que as metástases tumorais mimetizavam o comportamento dos linfócitos (Arch et al., 1992). Além de estarem presentes em linfócitos ativados, as variantes da proteína CD44 também foram encontradas nos linfomas agressivos compartilhando propriedades adesivas, infiltrativas e migratórias (Koopman et al., 1993).

2 - Muitos tipos de células cancerosas, bem como suas metástases expressam CD44 em níveis altos. Um estudo da expressão do gene CD44 em amostras de tumores de mama e cólon demonstraram uma expressão aumentada das variantes da proteína

nestas amostras. Nos controles, sem doença maligna, foi observado a expressão da CD44 padrão com mínima expressão das variantes (Matsumura & Tarin, 1992).

3 - Amostras de carcinoma papilar de tireóide foram corados pelo anticorpo monoclonal anti-CD44V6 (Figge et al., 1994). Os estudos sobre a positividade ou negatividade da proteína CD44 em células de tecido como o tireoideano são contraditórios (Mackay et al., 1994). A discrepância pode ser atribuída a diferenças técnicas na metodologia, variados graus de sensibilidade para os corantes e uso de anticorpos que reconhecem diferentes partes do antígeno onde os anticorpos aderem (epitopos).

4 - Experimentos com células de melanoma humano que apresentavam elevada expressão da CD44 ligado ao ácido hialurônico, injetadas por via subcutânea, em ratos imunodeficientes, demonstraram a formação de tumores locais e metástases distantes. Ao contrário, células tumorais que não expressavam a molécula geraram tumor local, porém, não foram capazes de formar metástases. Isto sugeriu que a presença da proteína CD44 pode ser necessária para a formação das mesmas (Guo et al., 1994b). Um estudo mais recente de melanomas primários e metastáticos não foi capaz de demonstrar a presença das variantes v5 e v6 mas demonstrou as variante v7 v8 e v10. A expressão destas diferentes variantes pode ser modulada pela própria carcinogênese (Simon et al., 1996).

5 - Astrócitos e tumores de cérebro expressam CD44. Os gliomas expressaram a forma padrão e os Schwannomas as variantes (Asher & Bignami, 1992; Kuppner et al., 1992; Sherman et al., 1995). Como as variantes são importantes para que ocorram metástases (Rudy et al., 1993), esta pode ser uma explicação para os gliomas apresentarem crescimento apenas local.

6 - Gastrinomas pancreáticos expressaram CD44 e demonstraram uma tendência a dar metástases para os linfonodos (Chaudhry et al., 1994).

7 - Tumores pulmonares de pequenas células altamente metastáticos não expressaram as variantes da CD44, porém, outros tipos de tumores expressaram algumas

das formas das variantes indicando que a positividade da proteína não se correlaciona necessariamente com o surgimento de metástases (Ariza et al., 1995).

8 - Tecido mamário normal e tecido metastático de mama expressavam CD44 (Fox et al., 1993; Iida & Bourguignon, 1995). A variante v5 foi positiva em aproximadamente 80% dos tumores de mama (Kaufmann et al., 1995). Tumores primários da cérvix uterina são fortemente positivos para as variantes v5 e v6. Os linfonodos metastáticos expressaram principalmente a variante v5. Tumores com a variante v6 positiva nos linfonodos metastáticos tenderam a um pior prognóstico, porém, sem atingir significância estatística (Kainz et al., 1996).

9 - Tumores de bexiga, rim, próstata, útero e ovário também expressam CD44 e suas variantes (Matsumura et al., 1995; Terpe et al., 1996; Lokeshwar et al., 1995; Kainz et al., 1995).

Outras neoplasias, como as gastrointestinais também expressam CD44 e suas variantes. A partir desta expressão, particularmente das variantes, podemos investigá-las como marcadores de diagnóstico e prognóstico de alguns tumores malignos em seres humanos.

Áreas normais da mucosa gástrica não expressaram as variantes v5 e v6 da CD44 (Harn et al., 1995). O adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal expressava fortemente as variantes v5 e v6 ao passo que tumores do tipo difuso expressavam predominantemente a variante v5. Com isto, foi sugerido que anticorpos anti-CD44v podem vir a ser úteis no diagnóstico do carcinoma gástrico e que a origem destes tipos de tumores pode ser distinta (Heider et al., 1993a). O carcinoma gástrico invasivo apresentou uma positividade maior da proteína do que o carcinoma intramucoso. Pacientes com tumores fortemente positivos apresentaram uma sobrevida média menor do que os fracamente positivos. Isto pode ser devido a um fenótipo mais invasivo dos tumores com forte expressão desta molécula de adesão (Washington et al., 1994).

A concentração sérica da CD44 mostrou-se 10 vezes superior ao normal em pacientes portadores de câncer gástrico ou colônico avançados. O aumento estava relacionado principalmente com a presença de metástases. Esta elevação pode ser pela secreção da proteína pelas células tumorais, pela liberação pelas células tumorais mortas ou, então, através das enzimas proteolíticas. A ressecção cirúrgica dos tumores estava associada a uma diminuição dos níveis séricos da CD44 (Guo et al., 1994a).

Amostras de vários estágios da carcinogênese do câncer colorretal revelaram mudanças na expressão das variantes da CD44 (Wielenga et al., 1993; Heider et al., 1993b). Um aumento da CD44 epitelial ocorreu nos tumores colorretais primários e metastáticos, porém, na mucosa normal a positividade foi fraca (Tanabe et al., 1993).

Estudos imunohistoquímicos da mucosa colônica normal detectaram a presença da CD44 e das suas variantes principalmente na zona proliferativa das criptas. Em outros sítios, a molécula estava praticamente ausente e suas variantes não foram detectadas (Abbasi et al., 1993; Heider et al., 1993b; Wielenga et al., 1993). A forte positividade das variantes da proteína no epitélio colorretal pode levar a uma alteração do processo adesivo e dos sinais promotores do crescimento associado com esta adesão (Pals et al., 1993). Expressão focal das variantes também foi encontrada em pólipos adenomatosos e em áreas de displasia. O aumento da expressão da CD44 estava claramente relacionado com grau de displasia (Heider et al., 1993b). Pequenos pólipos displásicos eram positivos para a variante v5. Esta variante também estava fortemente expressa em estágios mais avançados do câncer colorretal. Já a variante v6 aumentava com a progressão do tumor (Wielenga et al., 1993). Observando a relação da CD44 com os eventos somáticos da seqüência adenoma→carcinoma constatou-se a expressão precoce da CD44 em pequenos adenomas. Mutações do K-ras e do p53 foram observadas preferencialmente em adenomas grandes e adenomas contendo carcinomas. Isto sugere que a ativação do

gene CD44 está relacionado com os eventos mais precoces da seqüência adenoma→ carcinoma (Kim et al., 1994).

Usando método imunohistoquímico ou PCR ("polimerase chain reaction") alguns autores demonstraram que a CD44 e suas variantes estavam expressas, no mínimo, em 50% dos tumores colorretais primários e em todas as metástases linfonodais, hepáticas e pulmonares (Matsumura & Tarin, 1992; Heider et al., 1993b; Wielenga et al., 1993; Orzechowski et al., 1995; Suh et al., 1995). A progressão da doença não-metastática para metastática ocasionou um aumento de positividade de CD44V6 de 50% para 80% (Wielenga et al., 1993). Isto determinou que as diferenças quantitativas e qualitativas das variantes da CD44 na mucosa normal e nos tumores colônicos fossem relacionadas com o prognóstico desta neoplasia (Finn et al., 1994). Um relato sugeriu que a CD44v6 era um marcador tumoral independente do prognóstico, principalmente para os carcinomas colorretais nos estágios B e C de Dukes (Mulder et al., 1994). O mesmo autor investigou a relação entre a expressão do gene p53 e as variantes v5 e v6 em adenomas e carcinomas colorretais. Com a progressão tumoral houve um aumento significativo da CD44v6 e do p53. A variante v5 expressava-se fortemente independentemente do estágio da neoplasia. Os achados permitiram concluir que a expressão da v5 ocorria precocemente no câncer colorretal e a v6 era um marcador da progressão tumoral (Mulder et al., 1995a). Além disso, pacientes com tumores colorretais v6+ apresentaram uma sobrevida de 5 anos significativamente menor do que os v6- (Nihei et al, 1996).

Ichikawa (1994) não constatou associação significativa entre a expressão da CD44 e a idade, sexo, tamanho, localização, tipo histológico, invasão serosa, disseminação peritoneal e metástase linfonodais dos tumores colorretais. Porém, houve uma associação significativa com a presença de metástases hepáticas e recorrência dos tumores após as cirurgias curativas. Observou-se uma expectativa de vida maior para os pacientes que haviam sido submetidos a cirurgia curativa e não expressavam a proteína.

Carcinomas proximais expressaram significativamente mais as variantes v5 e v6 do que os tumores distais. Os grupos de pacientes CD44v6 positivo no tumor primário apresentavam uma sobrevida menor que os CD44v6 negativos. Isto pode indicar que os tumores proximais e distais possam ter características moleculares distintas (Mulder et al., 1995b).

Cortes histológicos de estágios precoces de tumores colorretais foram positivos para a variante v6, o que não ocorreu na maioria das espécimes do câncer colorretal metastático. Porém, a expressão desta variante relacionou-se positivamente com o estágio do tumor (Finke et al., 1995). O aumento da displasia celular nos neoplasmas colorretais tende a ser acompanhado por uma maior expressão da proteína CD44 (Orzechowski et al., 1995).

Alguns autores não observaram associação entre a expressão de CD44 e suas variantes e o estágio da doença ou a sobrevida dos pacientes. A positividade da proteína nos carcinomas colorretais pode diferir dramaticamente da sua expressão na mucosa normal, porém, não houve diferença quando comparadas com pólipos adenomatosos benignos ou metástases hepáticas (Jackson et al., 1995; Imazeki et al., 1996). Análise imunohistoquímica de tumores colorretais demonstrou que as variantes v5 e v6 estavam fortemente expressas em cada estágio da progressão tumoral de algumas das amostras estudadas, mas não em todas (Gotley et al, 1996). A variante v6, que estava fortemente expressa nos tumores colorretais, porém, sem relação definida com a presença ou não de metástases, poderia ser considerada mais um fenótipo tumoral do que um fator prognóstico (Higashikawa et al., 1996). Estas diferenças podem ser atribuídas a razões técnicas ou pela diferença de critérios usados para incluir os pacientes nos estudos como, por exemplo, idade e estágio da doença (Koretz et al., 1995).

Dados recentes relacionados com a expressão da CD44 padrão e das variantes v5 e v6 em adenomas e carcinomas precoces originados de adenomas demonstraram uma

fraca positividade da CD44 padrão nas áreas adenomatosas adjacentes aos carcinomas precoces e nas áreas de grande atipia celular. Adenomas com baixo grau de atipia apresentavam uma forte expressão desta proteína. Aproximadamente 60% dos pólipos expressavam a variante v5. Já a variante v6 aumentava a sua expressão conforme a progressão da displasia (Neumayer et al, 1999).

Embora as variantes v5 e v6 apresentem uma expressão mais forte após a transformação de um tumor colorretal benigno em maligno, esta expressão pode estar ligada a um papel biológico mais complexo do que foi demonstrado até hoje (Gotley et al., 1996).

Outras variantes da CD44 como a v8 e a v10 também estão ligadas às neoplasias colorretais. Houve uma associação entre a expressão destas variantes e a presença de metástases linfonodais ou hematogênicas, porém, não com o tipo histológico ou com a invasão linfática e venosa (Yamagushi et al., 1996).

O processo metastático é uma interação complexa entre as células tumorais e os múltiplos fatores que compõem um microambiente como as moléculas de adesão, as enzimas proteolíticas, os fatores angiogênicos, os fatores de crescimento além de outros (Azanovoorian et al., 1993). A angiogênese e a formação de metástases envolvem a proliferação e migração celular. Muitas moléculas de adesão podem mediar este processo (Jain et al., 1996). O papel da CD44 e suas variantes no desenvolvimento, crescimento, invasão e metástases dos tumores malignos encontra-se sob contínua investigação. Mudanças na expressão e função das moléculas de adesão são uma característica importante dos tumores gastrointestinais (Streit et al., 1996).

Tendo os tumores colorretais propriedades que lhes conferem a capacidade de invadir e provocar metástases, devemos focar as pesquisas neste seu comportamento biológico maligno. A porção mais profunda do tumor é aquela que invade os tecidos normais e provoca a sua disseminação local e distante. Estas metástases requerem a

interação das células tumorais com a matriz extracelular e com outras células. A CD44 satisfaz, em parte, o que as células tumorais necessitam para metastatizar como, por exemplo, interações intercelulares e das células com a matriz extracelular e a motilidade celular (entre outras). Apesar dos múltiplos estudos envolvendo a presença da proteína CD44 nos tumores malignos, não podemos afirmar que a sua presença nestes tumores signifique, com certeza, um pior prognóstico. A continuidade dos estudos está propiciando um maior entendimento da verdadeira função desta proteína na progressão das neoplasias malignas.

3. OBJETIVOS

Este estudo visa avaliar a expressão imunohistoquímica das variantes v5 e v6 da glicoproteína CD44 na margem tumoral invasiva de adenocarcinomas colorretais e sua associação com a presença de metástases distantes e o óbito.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do Estudo:

Estudo de Coorte Histórico

4.2 Amostra Estudada:

Foram selecionados aleatoriamente por sorteio do número do prontuário 58 adenocarcinomas avançados de um total de 292 pacientes submetidos à cirurgia por adenocarcinoma colorretal primário no *The First Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology - Hiroshima University School of Medicine*, no período compreendido entre os anos de 1988 e 1991. Foram considerados válidos, para critério de inclusão no presente estudo, todos os adenocarcinomas colorretais avançados (invasão até a muscular própria) operados no período entre 1988 e 1991 que apresentavam material histológico adequado (sem artefatos na técnica de fixação e coloração por hematoxilina-eosina que comprometessem a avaliação morfológica) e com seguimento pós operatório. Todos os dados e o material histológico foram coletados pelo Dr. Cláudio Rolim Teixeira, em uma extensão de sua Tese de Doutorado intitulada: "Histologic subclassification of the deepest invasive portion predicts malignant of colorectal carcinoma" (1993). Os dados foram analisados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre nos departamentos de Patologia e Citologia com permissão de Ken Haruma, professor do Departamento de Medicina Interna - Divisão de Gastroenterologia da Escola de Medicina da Universidade de Hiroshima. O estudo obteve a aprovação da Comissão de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foram excluídos do estudo três pacientes. Dois por apresentarem adenocarcinoma mucoprodutor que não preencheram os critérios histológicos estabelecidos por Teixeira (1994) e um por ausência de material histológico adequado para análise imunohistoquímica.

4.3 Metodologia

As lâminas foram preparadas a partir de blocos de parafina contendo a margem tumoral invasiva profunda sendo realizados cortes com 4 μ m com fixação e montagem em lâmina de vidro e coloração com hematoxilina e eosina.

Os procedimentos seqüenciais da técnica imunohistoquímica respeitaram os princípios e técnicas imunológicas para o estudo de células e tecidos (Hsu et al., 1981). Para a demonstração imunohistoquímica da proteína CD44 variante 5 (v5) e CD44 variante 6 (v6), anticorpos específicos contra a proteína foram aplicados nos cortes histológicos. Os anticorpos monoclonais utilizados foram o anti-CD44var(v5) - Cat. No. BMS115 específico para a variante 5 do CD44 humano, clone VFF-8, subclasse IgG1 e o Anti-CD44(v6) - Cat. No. BMS116 específico para a variante 6 do CD44 humano, clone VFF-7, subclasse IgG1, adquiridos junto a Boehringer Ingelheim- Bioproducts (Vienna-Austria). Foi aplicada a técnica imunohistoquímica peroxidase anti-peroxidase (PAP). Como cromógeno foi utilizado o DAB - diaminobenzidina tetrahydrocloro.

Os procedimentos da técnica imunohistoquímica realizados pelo **Laboratório Anticorpos - Anatomia Patológica e Citopatologia** (Niterói - RJ) seguiram os passos descritos no anexo 1.

4.3.1 Avaliação da Positividade

As lâminas foram analisadas por três observadores (patologista, orientador e pesquisador) sem o conhecimento prévio das variáveis clínico-patológicas e do seguimento dos pacientes. Utilizou-se microscopia ótica - microscópio Zeiss-Axiolab, com lentes planas, acromáticas. O campo de observação foi percorrido completamente com 50, 100 e 160 aumentos com o objetivo de reconhecer áreas de tumor, tecido normal e possibilidade de

background ou outros artefatos. A análise da positividade foi realizada na margem tumoral invasiva profunda.

Na análise das lâminas, foram consideradas **positivas** (figura 1,3 e 4) para a presença das variantes v5 e v6 da proteína CD44 (na margem tumoral invasiva profunda), aquelas que apresentavam imunorreatividade de cor acastanhada (DAB) na membrana das células contrastando com a contracoloração de fundo de cor azul (hematoxilina de Meyer). Foram consideradas **negativas** (figura 2) as que não apresentavam a coloração acastanhada.

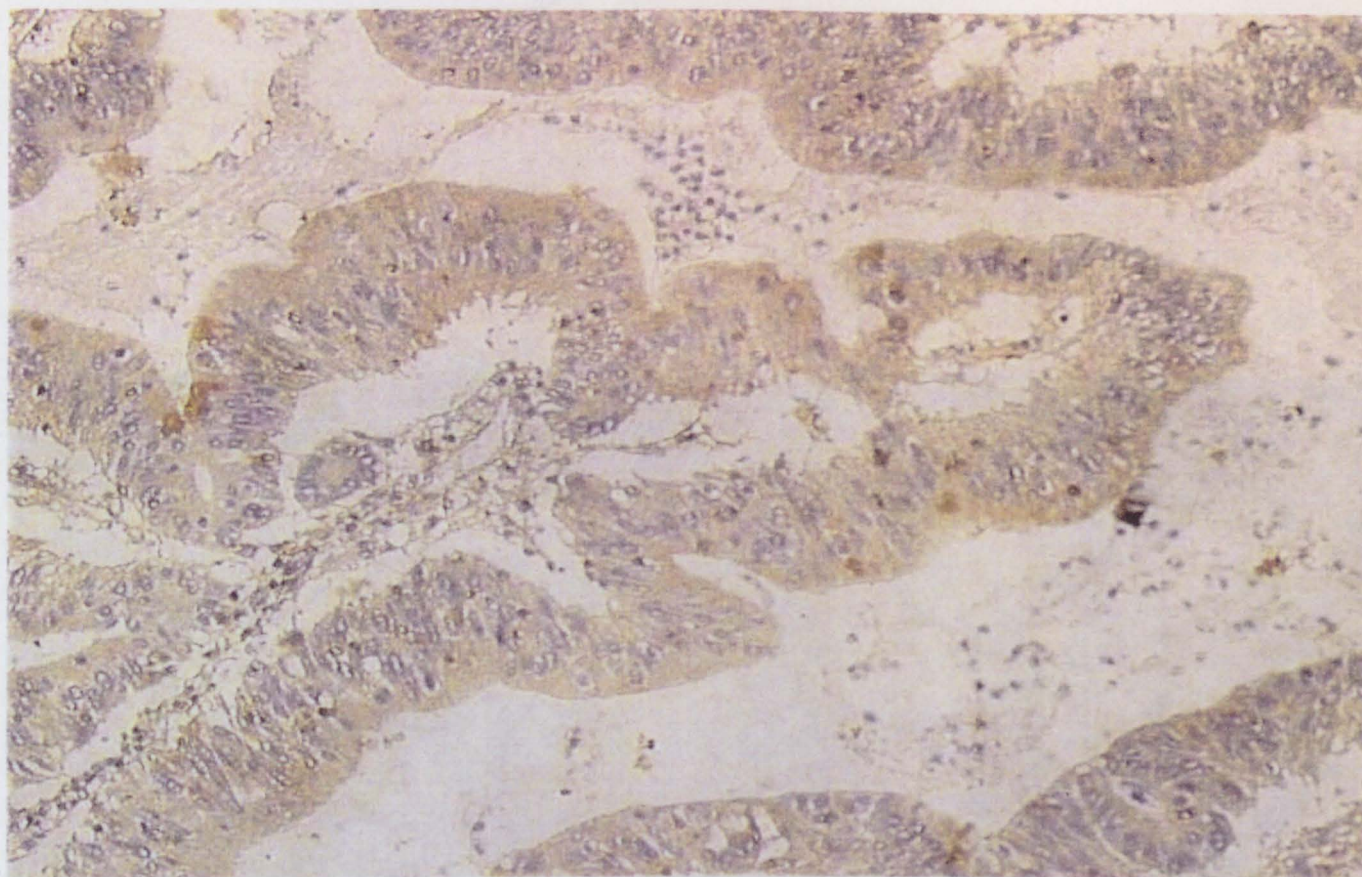


Figura 1 - Expressão imunohistoquímica positiva da variante v5 (anticorpo anti-CD44 - VFF-8) na margem tumoral invasiva. Observa-se a coloração acastanhada na membrana das células (400x).

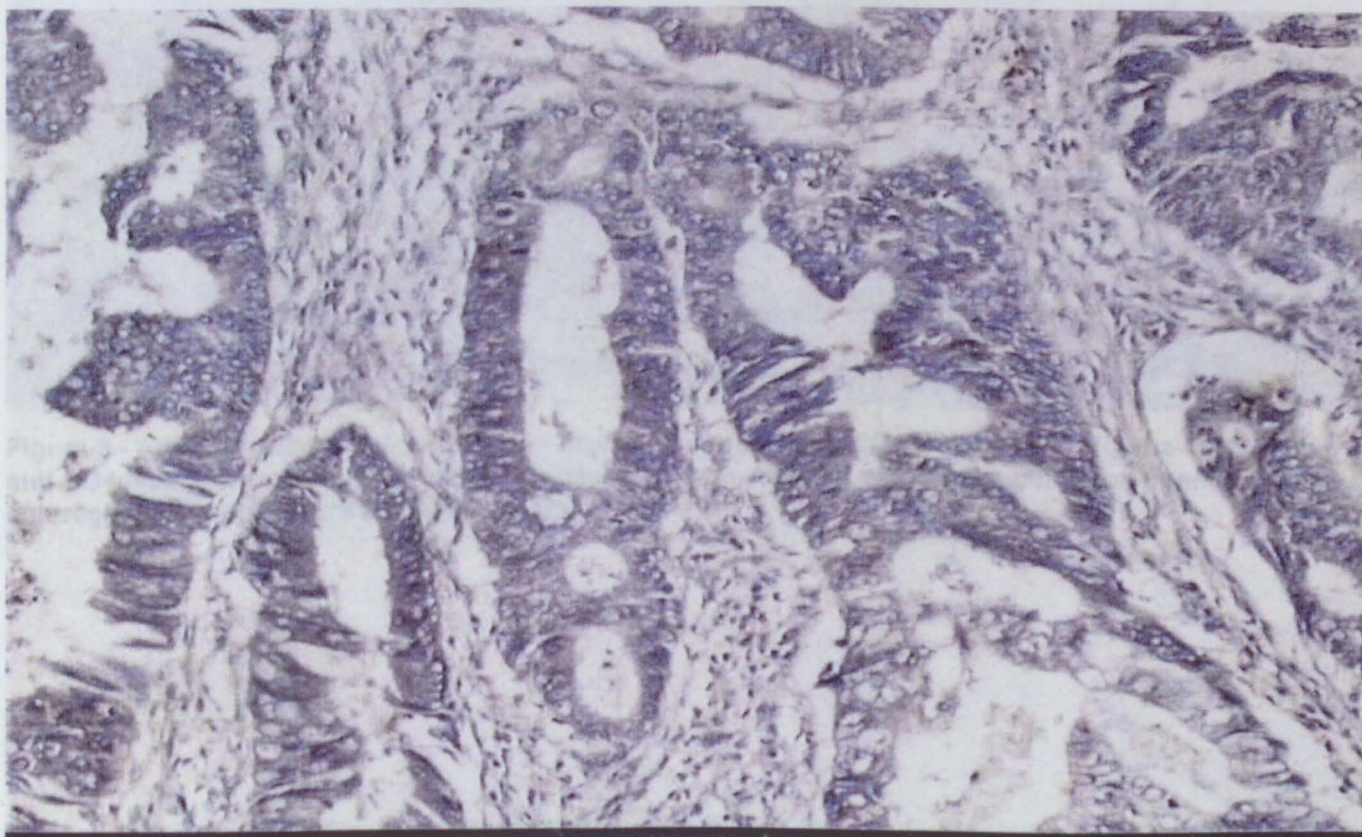


Figura 2 - Glândulas tumorais que não expressam a variante v5. Observa-se a ausência da coloração acastanhada (400x).

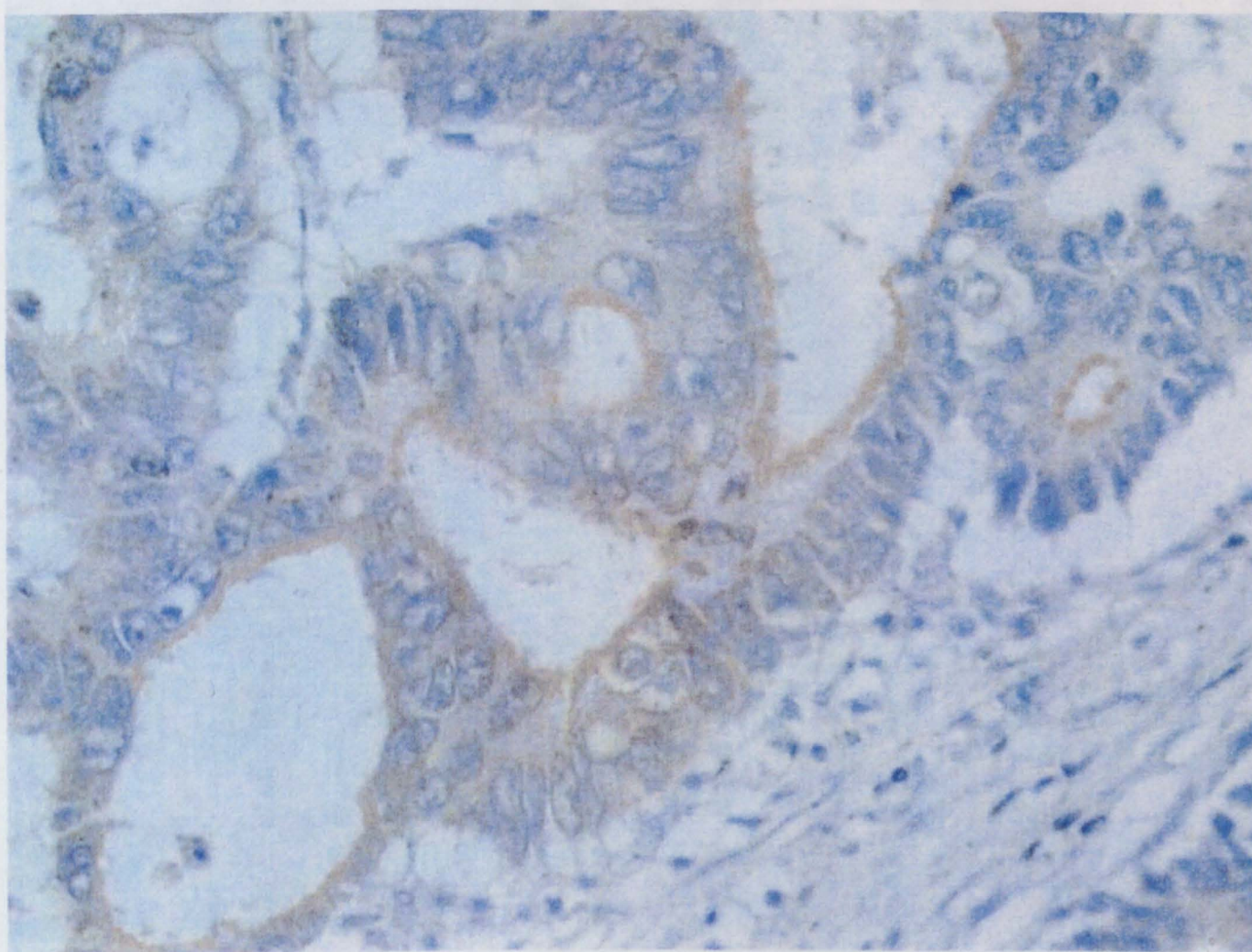


Figura 3 - Adenocarcinoma colorretal com expressão positiva da CD44v6 (reação antígeno- anticorpo anti-CD44v6). Observa-se a coloração acastanhada da membrana das células pelo cromógeno e a contra-coloração em hematoxilina de Meyer (400x).

Segundo Teixeria et al (2003) adenocarcinomas quase que inteiramente por formações glandulares, regular ou irregular, bem como foram classificados como bem diferenciados (aprox. 20%), moderadamente diferenciados (de formações glandulares combinadas à presença de células de aspecto sólido), foram classificados como moderadamente diferenciados (com a presença de alguma dispersão de células ou ilhotas sólidas). Adenocarcinomas com células de aspecto bastante irregular foram

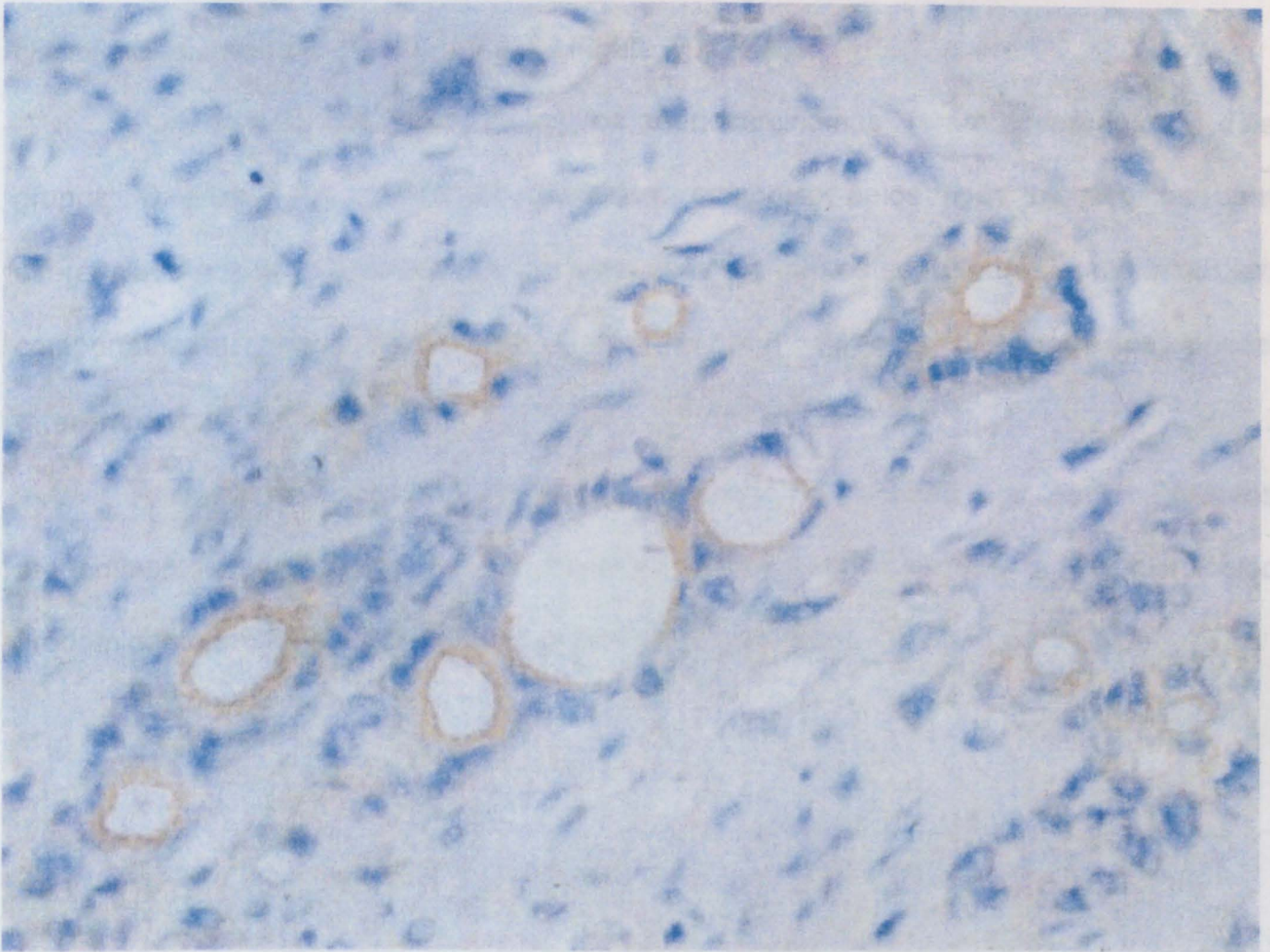


Figura 4 - Adenocarcinoma colorretal com expressão positiva da CD44v5 (reação antígeno- anticorpo anti-CD44v5, clone VFF-8) Observa-se a coloração acastanhada da membrana das células pelo cromógeno e a contra-coloração em hematoxilina de Meyer (400x).

Segundo Teixeira et al.(1993a), tumores compostos quase que inteiramente por formações glandulares regulares e arquitetura preservada foram classificados como bem diferenciados (figura 5). Tumores compostos principalmente de formações glandulares, combinadas a bainhas sólidas de células malignas, foram classificados como moderadamente diferenciados (figura 6). Tumores demonstrando dispersão de células ou ilhotas celulares, combinados com glândulas de estrutura altamente irregular foram classificados como pouco diferenciados (figura 7).

Para fins de análise estatística, os adenocarcinomas foram separados em dois grupos: O grupo dos **bem diferenciados**, composto pelos tipos histológicos bem diferenciado e moderadamente diferenciado, uma vez que estes tumores apresentam um comportamento clínico semelhante (Talbot et al., 1981), e o grupo dos **pouco diferenciados**.

A classificação do tipo histológico do tumor foi centrada nos clones celulares predominantes na margem tumoral invasiva. Portanto, nem sempre o tipo histológico predominante em toda a lâmina era o considerado pelo autor.

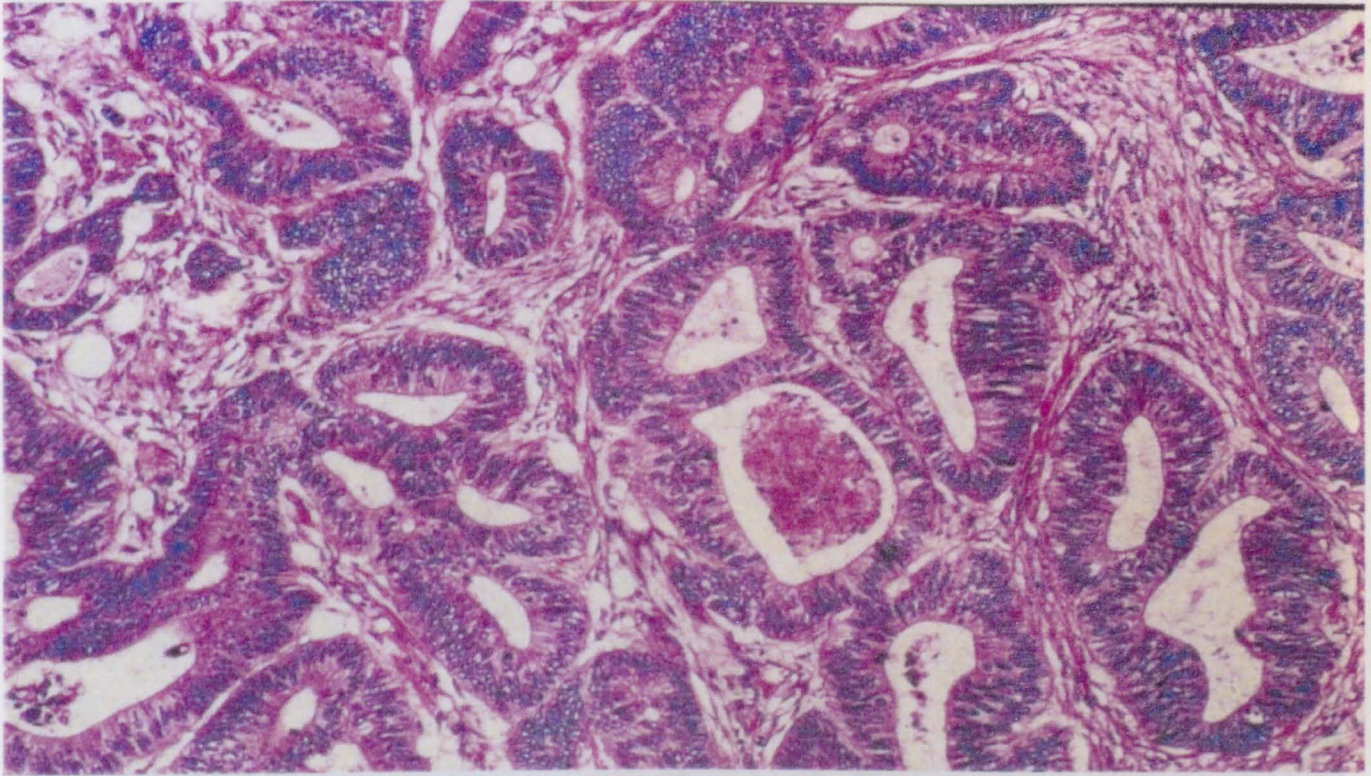


Figura 5 - Adenocarcinoma colorretal bem diferenciado demonstrando estrutura glandular regular e composta por células colunares. Os núcleos são pequenos e com polaridade basal (H.-E., 200x).

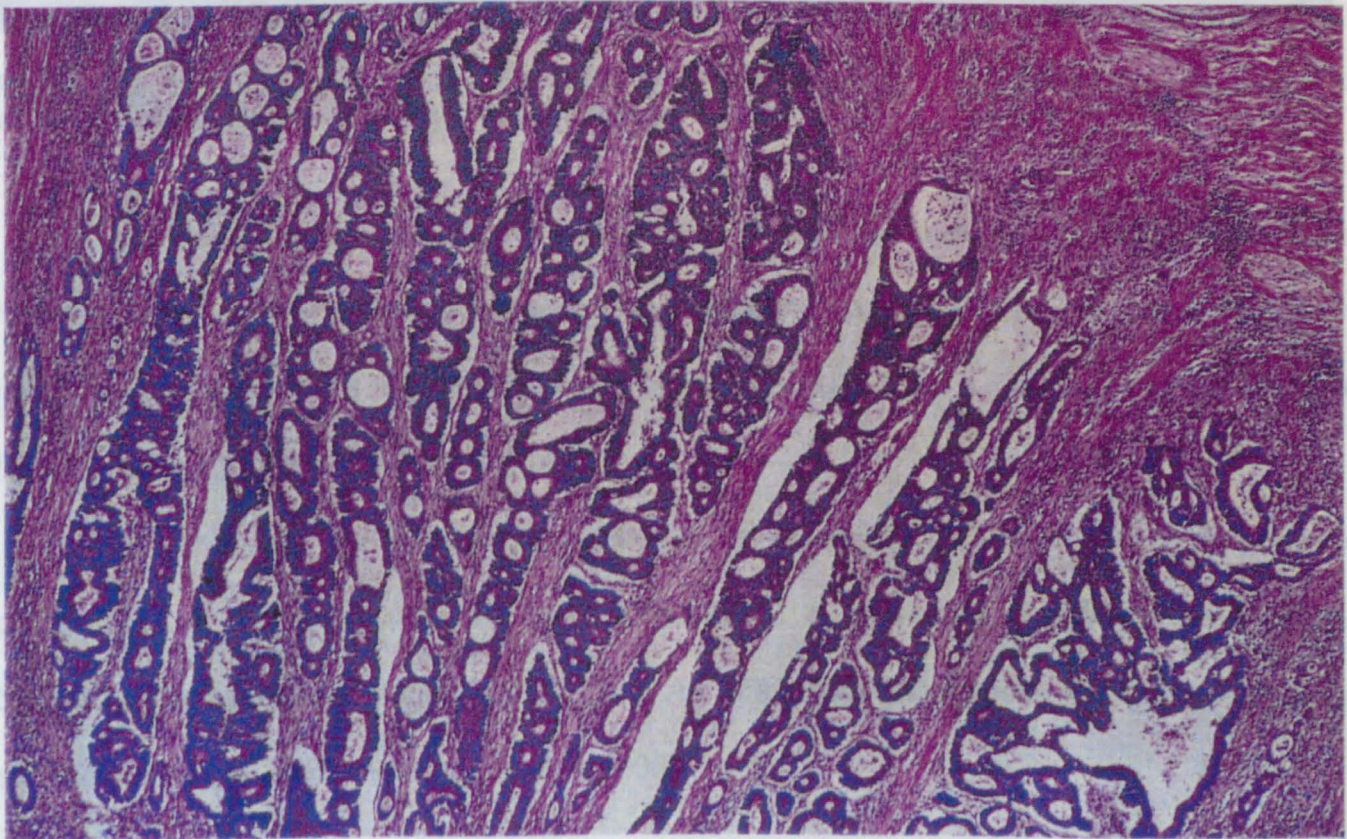


Figura 6 - Adenocarcinoma colorretal moderadamente diferenciado com estruturas glandulares menos regulares, porém permanecem facilmente reconhecidas em tamanho e forma (H.-E., 100x).

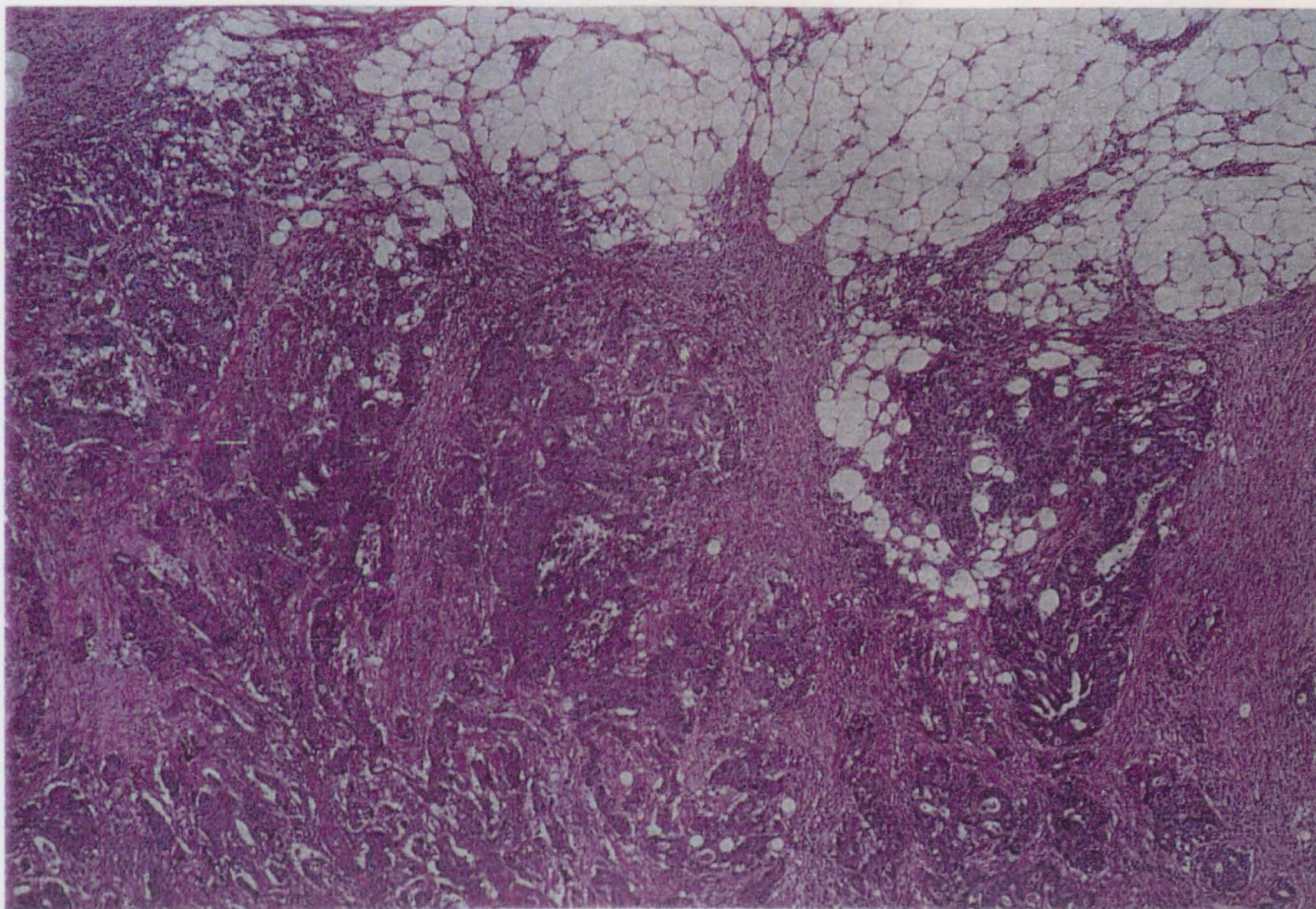


Figura 7 - Adenocarcinoma pouco diferenciado com células ou ilhotas dispersas, associadas a estruturas glandulares com intensa irregularidade (H.-E., 32x).

As variáveis analisadas dos carcinomas colorretais envolveram o tipo histológico, invasão da parede intestinal pelo tumor, invasão venosa, presença de metástases linfonodais e à distância, Classificação de Dukes (excluindo-se o grupo A por tratar-se de tumores superficiais), idade, sexo e óbito.

A avaliação da associação entre as metástases distantes e o óbito com a positividade da variantes v5 e v6 da proteína CD44 foi realizada através de uma análise bivariada, multivariada e regressão de Cox. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes com um P menor ou igual a 0,05.

5. RESULTADOS

Os tumores estudados foram diagnosticados em pacientes com uma média de idade superior a 60 anos variando entre 41 e 84 anos. Na amostra, o tipo histológico mais freqüente (na margem tumoral invasiva) entre os tumores colorretais foi o adenocarcinoma pouco diferenciado.

A grande predominância de tumores de reto e retossigmóide justificaram a realização da retossigmoidectomia abdominal e da amputação abdomino-perineal de reto como os procedimentos cirúrgicos mais executados (tabela 1).

Tabela 1 - Descrição dos aspectos demográficos, anatomopatológicos e cirúrgicos dos pacientes com tumores colorretais (n = 55).

Variável	
Idade	64,3 ± 10,2 anos
Sexo masculino n (%)	36 (65,5)
Tipo histológico n (%)	
<i>bem diferenciados</i>	25 (45,2)
<i>pouco diferenciados</i>	30 (54,5)
Localização n (%)	
<i>reto e retossigmóide</i>	33 (60)
<i>cólon ascendente</i>	9 (16,4)
<i>cólon sigmóide</i>	8 (14,5)
<i>cólon transverso</i>	4 (7,3)
<i>ceco</i>	1 (1,8)
Procedimento cirúrgico n (%)	
<i>retossigmoidectomia abdominal</i>	22 (40)
<i>amputação abdomino-perineal de reto</i>	12 (21,8)
<i>colectomia direita</i>	10 (18,2)
<i>sigmoidectomia</i>	7 (12,7)
<i>colectomia transversa</i>	3 (5,5)
<i>colectomia esquerda</i>	1 (1,8)

Na análise das variáveis potencialmente relacionadas com a evolução das neoplasias observamos que a grande maioria dos tumores apresentava invasão venosa e que em aproximadamente 50% dos casos houve o aparecimento de metástases linfonodais ou à distância (tabela 2).

O seguimento pós-operatório dos pacientes teve uma média de 31 meses sendo que 20 pacientes morreram neste período em consequência da doença metastática (anexo 2).

Na amostra estudada, a expressão imunohistoquímica da variante v5 da proteína CD44 na margem tumoral invasiva ocorreu numa percentagem bem superior a da variante v6 como pode ser observado na tabela 2. Entre os tumores pouco diferenciados 63,3% expressavam a variante v5 ao passo que 50% dos tumores bem diferenciados eram positivos para esta mesma variante ($P= 0,479$; $RR= 1,27$). Em relação a variante v6, 42,9% dos tumores pouco diferenciados expressavam esta proteína e somente 16,7% dos tumores bem diferenciados eram positivos para a v6 ($P= 0,249$; $RR= 2,57$).

Tabela 2 - Descrição das características potencialmente relacionadas com a evolução e prognóstico dos tumores colorretais.

Variável	n	%
Invasão venosa	38	73,1
Invasão da parede intestinal	14	25,5
Metástases linfonodais	29	52,7
Metástases à distância	27	49,1
v5 positivo (n = 54)	31	57,4
v6 positivo (n = 33)	11	33,3

Nas 31 amostras que expressavam a variante v5 da proteína CD44, 61,3% apresentavam metástases linfonodais. Nas 23 amostras que não expressavam a proteína, 39,1% tinham os linfonodos comprometidos com células tumorais (RR= 1,57 e P= 0,182). Na análise das 11 amostras com variante v6+, 72,7% apresentavam metástases linfonodais. Das 22 amostras sem a expressão desta proteína, 50% apresentavam metástases linfonodais (RR= 1,45 e P=0,278).

Quando observamos a relação entre os diversos fatores e o aparecimento de metástases à distância (tabela 3) pode-se constatar que os pacientes que possuíam idade menor ou igual a 65 anos (linha de corte determinada aleatoriamente, pois o pico da doença ocorre na sétima década de vida - Gordon & Nivatvongs, 1999) apresentavam um risco significativamente maior de metástases (P= 0,021). Não houve diferença entre sexo masculino e feminino e o surgimento de metástases distantes.

Os pacientes com adenocarcinoma pouco diferenciado apresentaram um risco 5 vezes maior de metástases à distância do que os pacientes com tumores bem diferenciados (P= 0,009)

Tumores com invasão venosa, ou cujo crescimento local ultrapassava a serosa ou a adventícia, também evidenciaram um risco significativamente maior de apresentarem doença metastática (P= 0,012 e 0,024 respectivamente).

Em relação ao comprometimento linfonodal, 72% dos pacientes que apresentavam células tumorais nos linfonodos também apresentavam doença metastática distante, ao passo que somente 23% dos pacientes com linfonodos livres da doença revelaram-se com metástases à distância (P <0,001).

A expressão positiva da variante v5 da proteína CD44 não apresentou associação com o aparecimento das metástases distantes (RC= 1,16). Aproximadamente 50% dos pacientes com v5+ e v5- desenvolveram doença tumoral à distância (P≅ 1,000). No entanto, a positividade da variante v6 na margem tumoral invasiva mostrou um risco 2,67

vezes maior de que ocorra metástase distante do que quando a proteína não está expressa. Porém, este achado não atingiu significância estatística (P= 0,278).

Tabela 3 - Avaliação bivariada das associações entre diversos fatores e a ocorrência de metástases em carcinomas colorretais.

Variável	n	Metástases		RC	IC 95%	P
		f	%			
Idade						
<i>< ou igual a 65 anos</i>	29	19	65,5	4,28	1,37 - 13,25	0,021
<i>> que 65 anos</i>	26	8	30,8			
Sexo						
<i>masculino</i>	36	17	47,2	0,81	0,26 - 2,45	0,922
<i>feminino</i>	19	10	52,6			
Tipo histológico						
<i>pouco diferenciado</i>	30	20	66,7	5,14	1,62 - 16,35	0,009
<i>bem diferenciado</i>	25	7	28,0			
Invasão da parede intestinal						
<i>ultrapassa serosa/adventícia</i>	14	11	78,6	5,73	1,38 - 23,76	0,024
<i>não ultrapassa</i>	41	16	39,0			
Invasão venosa						
<i>com invasão</i>	38	22	57,9	8,25	1,62 - 42,09	0,012
<i>sem invasão</i>	14	2	14,3			
Linfonodos						
<i>com metástases</i>	29	21	72,4	8,75	2,23 - 36,66	<0,001
<i>sem metástases</i>	26	6	23,1			
Dukes						
<i>B</i>	23	2	8,7	-	-	-
<i>C</i>	15	8	53,3	12,00	1,67 - 108,9	0,006
<i>D</i>	17	17	100	11,5	3,06 - 43,23	<0,001
v5						
<i>positivo</i>	31	16	51,6	1,16	0,40 - 3,43	≅1,000
<i>negativo</i>	23	11	47,8			
v6						
<i>positivo</i>	11	8	72,7	2,67	0,56 - 12,79	0,278
<i>negativo</i>	22	11	50,0			

RC = Razão de Chances; IC = Intervalo de Confiança.

Quando a relação entre as variantes v5 e v6 da proteína CD44 e a ocorrência de metástases distantes foi analisada por um modelo de regressão logística, pode-se observar que a tendência associativa demonstrada pela avaliação bivariada (tabela 3) da expressão positiva da variante v6 com o surgimento destas metástases não foi confirmada quando controlada pelos potenciais fatores de confusão como tipo histológico pouco diferenciado e idade inferior ou igual a 65 anos (tabela 4). Paradoxalmente a variante v5 expressou-se como um fator de proteção (tabela 5). No entanto, não se pode descartar ausência de relação de associação entre v5 e metástases distantes. Outras características alistadas com o prognóstico como a presença de metástases linfonodais e a idade inferior a 65 anos contribuíram de maneira significativa para a ocorrência de metástases distantes. O tipo histológico pouco diferenciado esteve muito próximo de atingir significância ($P=0,078$).

Tabela 4 - Modelo de regressão logística para avaliação da associação entre a variante v6 da proteína CD44 e ocorrência de metástases controlando para potenciais fatores de confusão.

Variável	coeficiente	RC	IC 95%	P
Tipo hist. Pouco diferenciado	2,76	15,57	2,23 - 108,56	0,006
v6 expressa na margem invasiva	0,14	1,15	0,15 - 8,64	0,895
Idade menor ou igual a 65 anos	1,01	2,76	0,42 - 17,92	0,288

RC = Razão de Chances; IC = Intervalo de Confiança

Tabela 5 - Modelo de regressão logística para avaliação da associação entre a variante v5 da proteína CD44 e ocorrência de metástases controlando para potenciais fatores de confusão.

Variável	Coefficiente	RC	IC 95%	P
v5 expressa na margem invasiva	- 1,68	0,19	0,03 - 1,17	0,073
Tipo hist. Pouco diferenciado	1,38	3,96	0,86 - 18,30	0,078
Metástases linfonodais	3,02	20,42	3,79 - 109,83	<0,001
Idade menor ou igual a 65 anos	1,85	6,35	1,21 - 33,38	0,029

RC = Razão de Chances; IC = Intervalo de Confiança.

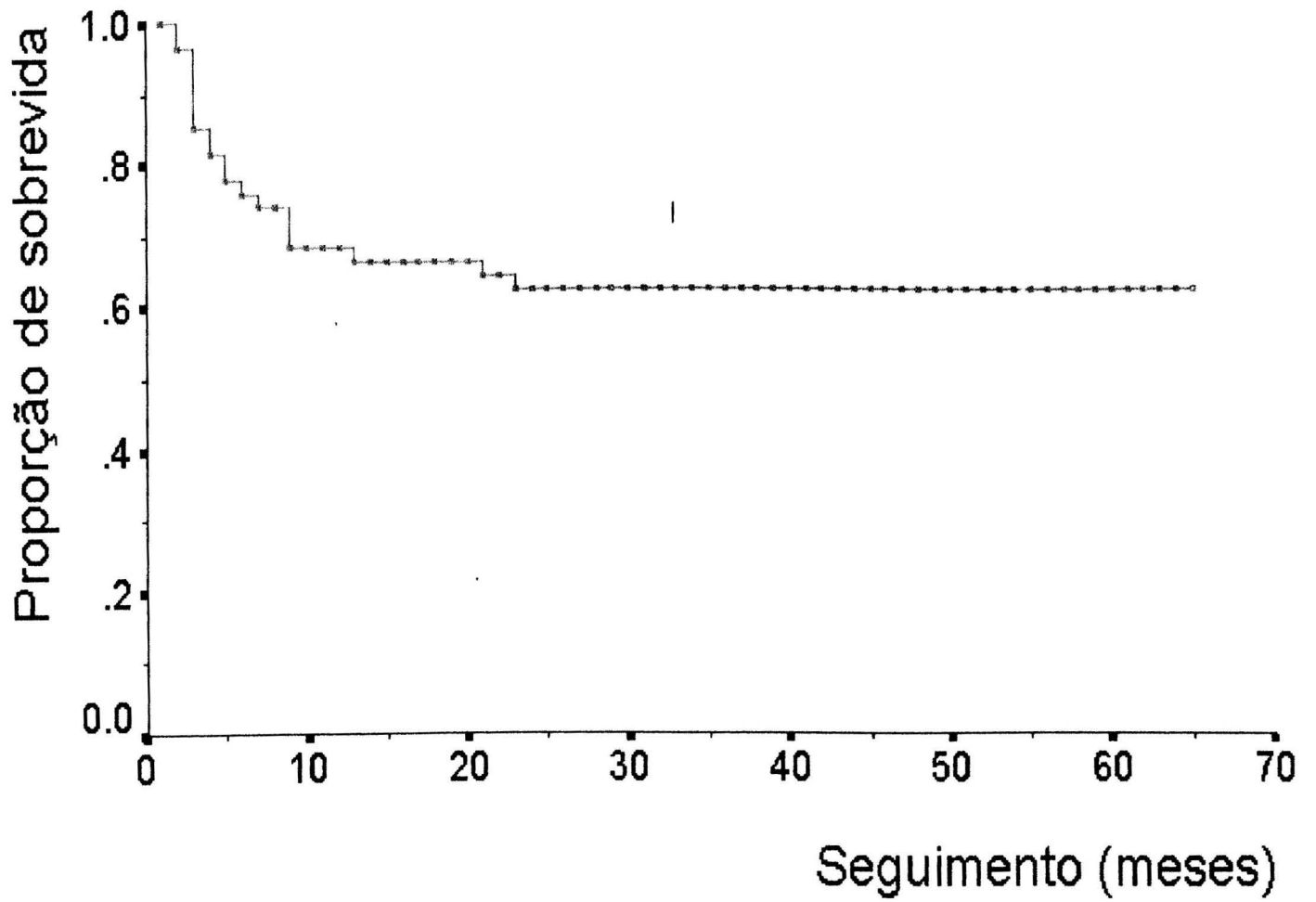


Figura 8 - Gráfico de Kaplan-Meier apresentando a ocorrência de óbito nos pacientes com carcinoma colorretal.

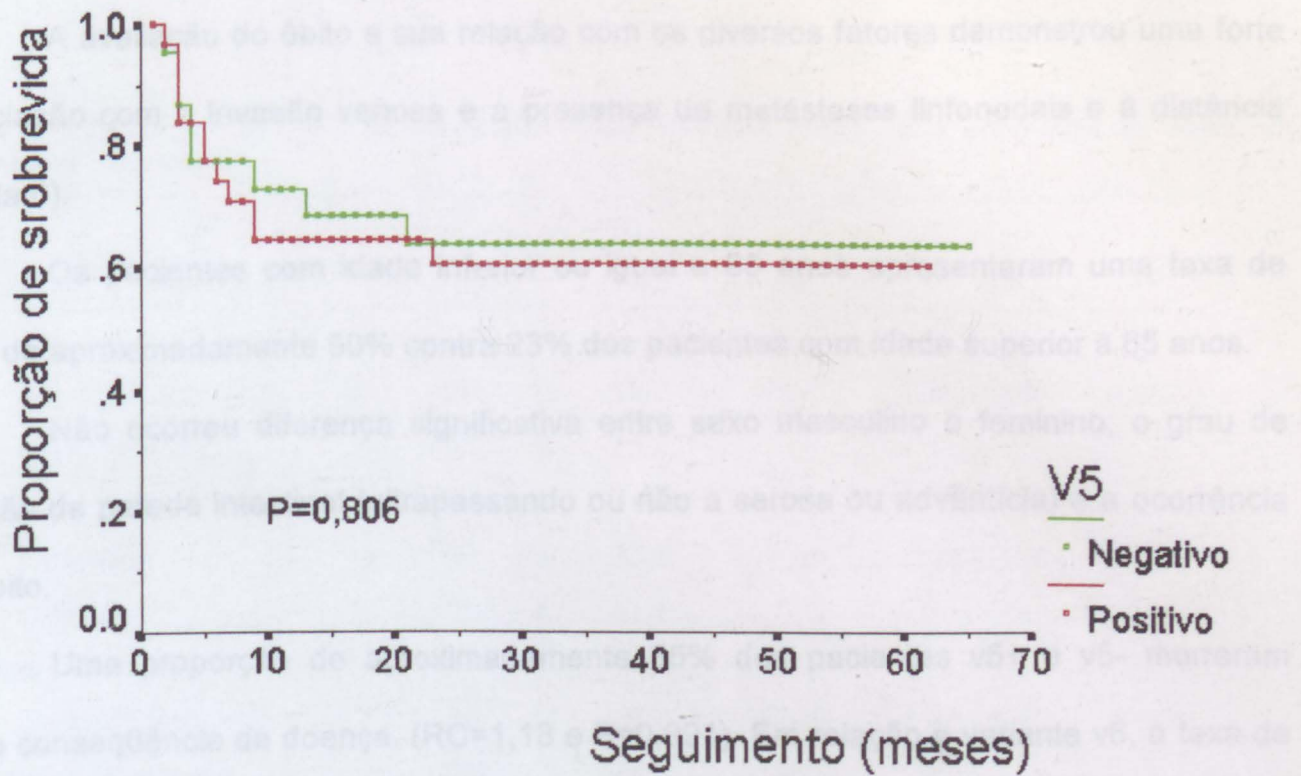


Figura 9 - Gráfico de Kaplan-Meier demonstrando a sobrevivência entre os grupos v5+ e v5-

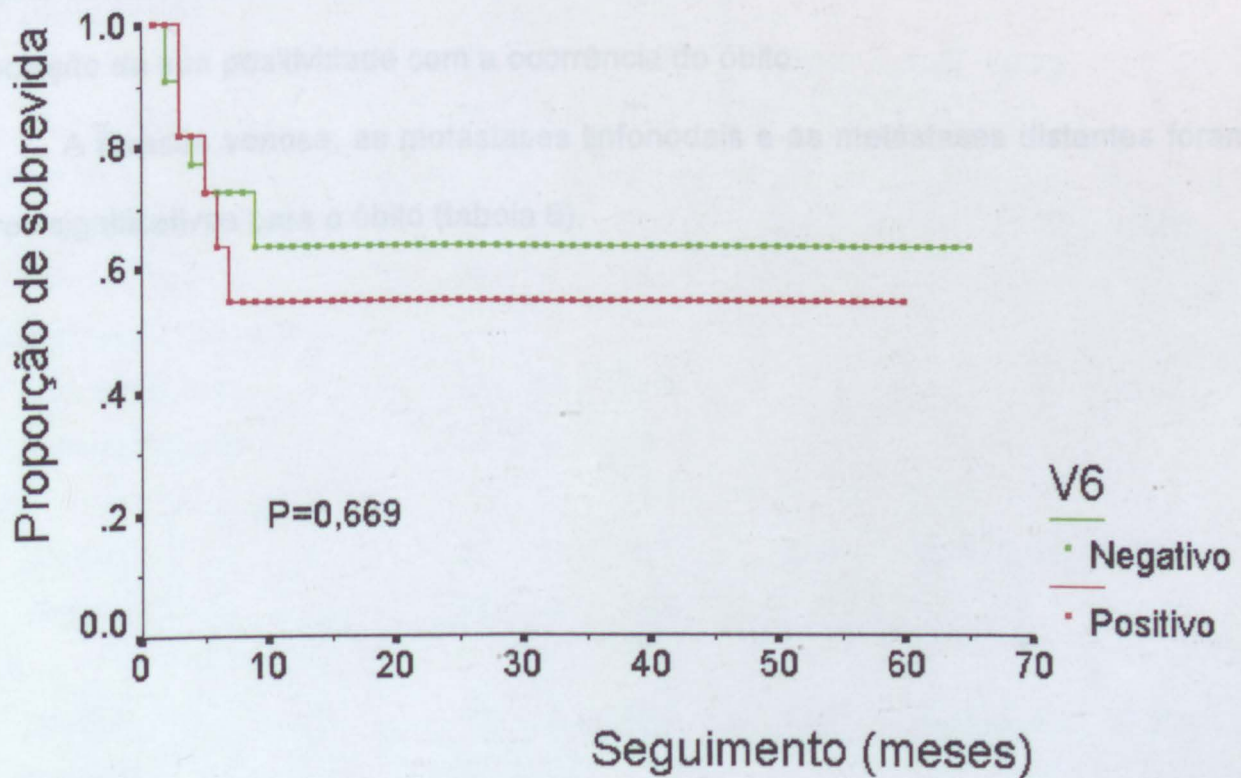


Figura 10 - Gráfico de Kaplan-Meier demonstrando a sobrevivência entre os grupos v6+ e v6-

A avaliação do óbito e sua relação com os diversos fatores demonstrou uma forte associação com a invasão venosa e a presença de metástases linfonodais e à distância (tabela 6).

Os pacientes com idade inferior ou igual a 65 anos apresentaram uma taxa de óbito de aproximadamente 50% contra 23% dos pacientes com idade superior a 65 anos.

Não ocorreu diferença significativa entre sexo masculino e feminino, o grau de invasão da parede intestinal (ultrapassando ou não a serosa ou adventícia) e a ocorrência de óbito.

Uma proporção de aproximadamente 35% dos pacientes v5+ e v5- morreram como consequência da doença. (RC=1,18 e P=0,991). Em relação a variante v6, a taxa de óbito foi de 45,5% para os pacientes v6+ e de 36,6% para os v6- (RC=1,46 e P=0,900). A análise bivariada da associação da expressão das variantes v5 e v6 da proteína CD44 na margem tumoral invasiva dos tumores colorretais examinados demonstrou que não houve associação da sua positividade com a ocorrência do óbito.

A invasão venosa, as metástases linfonodais e as metástases distantes foram os fatores significativos para o óbito (tabela 6).

Tabela 6 - Avaliação bivariada da associação entre diversos fatores e a ocorrência de óbito em carcinomas colorretais.

Variável	n	Óbito		RC	IC 95%	P
		f	%			
Idade						
<i>< ou igual a 65 anos</i>	29	14	48,3	3,11	0,97 - 9,99	0,097
<i>> que 65 anos</i>	26	6	23,1			
Sexo						
<i>masculino</i>	36	12	33,3	0,69	0,22 - 2,16	0,728
<i>feminino</i>	19	8	42,1			
Tipo Histológico						
<i>pouco diferenciado</i>	30	14	46,7	2,78	0,86 - 8,89	0,145
<i>bem diferenciado</i>	25	6	24,0			
Invasão da parede intestinal						
<i>ultrapassa serosa/adventícia</i>	14	7	50,0	2,15	0,63 - 7,42	0,365
<i>não ultrapassa</i>	41	13	31,7			
Invasão venosa						
<i>com invasão</i>	38	17	44,7	10,52	1,25 - 88,74	0,019
<i>sem invasão</i>	14	1	7,1			
Linfonodos						
<i>com metástases</i>	29	16	55,2	6,77	1,62 - 30,72	0,005
<i>sem metástases</i>	26	4	15,4			
Metástases à distância						
<i>com metástases</i>	27	20	74,1	-	-	<0,001
<i>sem metástases</i>	28	0	0			
v5						
<i>positivo</i>	31	12	38,7	1,18	0,39 - 3,64	0,991
<i>negativo</i>	23	8	34,8			
v6						
<i>positivo</i>	11	5	45,5	1,46	0,34 - 6,35	0,900
<i>negativo</i>	22	8	36,6			

RC = Razão de Chances; IC = Intervalo de Confiança.

No modelo estatístico de regressão utilizado entre a expressão da variante v5 e a ocorrência do óbito (tabela 7), observou-se que novamente a variante v5 surgiu como fator protetor para este desfecho. Os pacientes no estágio D de Dukes associaram-se significativamente com o óbito ($P=0,005$) e os pacientes no estágio C estiveram muito próximos de atingir esta significância ($RR= 7,03$; $P=0,078$).

Os pacientes com idade menor ou igual a 65 anos e os com tumores pouco diferenciados apresentam um risco maior para o óbito, porém, sem significância estatística.

Tabela 7 - Modelo de regressão de azares proporcionais (regressão de Cox) entre a variante 5 da proteína CD44 e o tempo para o óbito.

Variável	coeficiente	RR	IC 95%	P
V5	-1,33	0,26	0,08 – 0,87	0,029
Tumor pouco diferenciado	0,99	2,68	0,76 – 9,47	0,126
Dukes				
B	-	-	-	-
C	1,95	7,03	0,80 – 61,39	0,078
D	3,91	49,70	5,51 – 448,35	0,005
Idade menor ou igual a 65 anos	1,01	2,76	0,82 - 9,24	0,101
Invasão venosa	0,70	2,03	0,24 - 17,06	0,515

RR = Risco Relativo; IC = Intervalo de Confiança.

6. DISCUSSÃO

As metástases são as responsáveis pela maioria das mortes nos pacientes com câncer (Poste & Fidler, 1980). Atualmente, o prognóstico dos tumores colorretais é baseado principalmente no seu estágio no momento da cirurgia. A identificação de características biológicas que possam reconhecer uma maior propensão destes tumores para metastatizar poderiam ajudar na seleção dos pacientes candidatos à terapia complementar neoadjuvante (NHI, 1990). O processo metastático compreende uma série de interações complexas entre as células tumorais e os vários fatores que compõem o microambiente hospedeiro, como as moléculas de adesão, as enzimas proteolíticas, os fatores de crescimento, a angiogênese e os receptores dos fatores de crescimento (Frost & Levin, 1992; Azanovoorian et al., 1993). Um estudo experimental demonstrou que uma nova variante da proteína CD44 determinava comportamento metastático a uma linhagem de células não metastáticas de carcinoma do pâncreas em ratos. Estabeleceu-se então, uma relação causal direta entre a expressão desta glicoproteína de membrana e a formação de metástases tumorais (Günthert et al., 1991). A partir deste relato, vários pesquisadores têm buscado relacionar a sua expressão e de suas variantes como um possível marcador do potencial metastático dos tumores colorretais (Wielenga et al., 1993; Mulder et al., 1994; Herrlich et al., 1995; Rapponen et al., 1998; Bhatavdekar et al., 1998; Ioachim et al., 1999).

O carcinoma colorretal possui subpopulações heterogêneas de células crescendo e aprofundando-se gradualmente através das camadas da parede colônica. O diagnóstico histológico é baseado, usualmente, na parte dominante do tumor. Observamos que na nossa amostra, os clones de células neoplásicas mais freqüentes na margem tumoral

invasiva (profunda) pertenciam ao tipo histológico pouco diferenciado, conferindo a estes adenocarcinomas colônicos uma maior agressividade (Teixeira et al., 1993b).

A maioria dos estudos identificam a CD44 e suas variantes por método imunohistoquímico ou por RT-PCR (“reverse transcriptase-polimerase chain reaction”). A capacidade da técnica imunohistoquímica para diferenciar células normais de células malignas é uma vantagem sobre a RT-PCR. Por ser vulnerável as ribonucleases, a RT-PCR deve ser realizada em amostras que tenham sido imediatamente congeladas e não devem ser estocadas por mais de um mês. Assim, de acordo com o nosso material, a técnica imunohistoquímica foi a escolhida para a execução do trabalho.

O nosso critério de positividade para a expressão das variantes v5 e v6 limitou-se à margem tumoral invasiva. Adotamos esta região para o estudo porque a porção mais profunda do tumor é, em última análise, a que vai invadir e gerar as metástases. Esta região tumoral tem sido alvo de investigações. Estudos mostram que na margem profunda dos carcinomas colorretais ocorre uma maior proliferação celular e que esta proliferação relaciona-se com o grau de diferenciação tumoral (Teixeira et al., 1994).

Sendo positiva a reação com os anticorpos anti-CD44 v5 e v6 neste local, consideramos que as amostras expressavam as variantes. Portanto, como Harn et al. (1995), adotamos apenas o critério positivo ou negativo para a presença das variantes.

Ainda que avaliássemos os padrões em forte ou fraco, focal ou difuso, a subjetividade e também a irregularidade técnica da coloração, seriam fatores decisivos para a contestação.

Inúmeros critérios de positividade para a proteína CD44 e suas variantes podem ser encontrados na literatura. Eles dependem, freqüentemente, da subjetividade da interpretação do patologista examinador, dos índices utilizados para a positividade das amostras, dos critérios de diluição do anticorpo utilizado e dos demais aspectos da técnica imunohistoquímica. A disponibilidade de automação do procedimento de coloração

imunohistoquímica para a avaliação de marcadores tumorais ou a contagem por métodos quantitativos baseados em análise de imagem digital parecem ser soluções para a melhoria da reprodutibilidade técnica intra e interlaboratoriais (Tubbs & Bauer, 1989; Nadji & Morales, 1997).

Substâncias como melanina e hemosiderina podem causar dificuldades na interpretação. Os artefatos geralmente ocorrem por uma deposição do precipitado de forma aleatória. Problemas com a técnica imunohistoquímica podem ocorrer com a deposição do reagente em secções que não apresentam exatamente o mesmo corte. Outras dificuldades podem estar relacionada com o excesso de reatividade ("background"), uma reação muito fraca ou completamente negativa (Bratthauer & Adams, 1994). Como a formalina afeta a imunorreatividade, problemas com a técnica imunohistoquímica podem ocorrer mais freqüentemente no material fixado em parafina do que do que no tecido congelado (Neumayer et al., 1999).

Um estudo relacionando a expressão da variante v6 com a progressão tumoral no câncer colorretal considerou positivos os tumores que mostravam mais do que 10% das células cancerosas coradas pelo anticorpo (Wielenga et al., 1993). Ichikawa (1994) utilizou o método da intensidade da expressão e criou um escore -, ±, +, ou ++. Quando mais do que 5% das células que compunham o tecido tumoral eram + ou ++, classificava-se o caso como positivo. Washington et al. (1994), também definiram a positividade os negatividade pela intensidade, contudo, não citou os critérios para a inclusão das amostras nas respectivas classificações.

Mulder et al.(1995a), classificou a positividade de maneira quantitativa. O autor justificou seu método baseado num estudo prévio que quantificou a expressão da proteína por imunohistoquímica usando uma análise de imagens computadorizadas.

Inúmeros relatos na literatura apresentam critérios aleatórios para classificar a expressão da CD44 e suas variantes nos tumores colorretais (Jackson et al., 1995;

Nagabhushan et al., 1996; Gotley et al. 1996; Kainz et al., 1996; Nihei et al., 1996; Yamaguchi et al., 1996). O resultado destas diferenças é uma maior subjetividade no momento de avaliar se um tumor expressa ou não a CD44 e ou suas variantes. Além disso, o uso de diferentes anticorpos com diferentes concentrações por diferentes laboratórios, torna o método imunohistoquímico mais vulnerável. Uma padronização universal dos critérios de positividade da CD44 e de suas variantes é fundamental para que possamos tornar mais fidedignos os dados coletados pelos pesquisadores das diferentes instituições.

Demonstramos por método imunohistoquímico que na margem tumoral invasiva a expressão da CD44v5 foi superior à expressão da CD44v6 (57,4 e 33,3%, respectivamente). O nosso índice não muito alto de positividade pode ter sido influenciado pelo uso de material embebido em parafina ao invés de tecido congelado. Na literatura os dados são contraditórios. Porém, devemos considerar que a expressão da proteína é analisada geralmente em todo o tecido tumoral e não somente na margem profunda como foi por nós estudado. Mulder et al.(1995a), observando por método imunohistoquímico a expressão da variante v5 nos tumores colorretais, encontraram 95% de positividade nos estágios A e B de Dukes e 96% nos estágios C e D. A variante v6 estava expressa em 67% dos tumores nos estágios A e B e, em 82% dos tumores nos estágios C e D. Num outro estudo, os mesmos autores observaram 90% e 69% de positividade respectivamente para as variantes v5 e v6 (Mulder et al., 1995b).

Na comparação entre os tumores pouco diferenciados e bem diferenciados, constatamos que as variantes v5 e v6 expressavam-se com maior frequência no tipo histológico pouco diferenciado sem contudo atingir significância. A mesma tendência pode ser observada em relação às metástases linfonodais. Confirmando estes resultados, estudos mostraram uma associação da CD44 padrão e principalmente da variante v6 com a presença de metástases linfonodais e distantes. Pacientes que expressavam fortemente a variante v6 no epitélio tumoral apresentaram uma sobrevida menor do que aqueles que

não a expressavam (Mulder et al., 1994; Wimmenauer et al., 1997; Rapponen et al., 1998; Wielenga et al., 1998).

Nossos achados referentes à expressão das variantes v5 e v6 na margem tumoral invasiva não evidenciaram associação com o surgimento de metástases distantes. Apesar da CD44v5 estar presente em estágios precoces do adenocarcinoma colorretal e aumentar nos estágios mais avançados (Weilenga et al., 1993), esta variante não foi relacionada com o surgimento de metástases viscerais. Observamos que 50% dos pacientes com tumores v5 positivo e também 50% dos pacientes com tumores v5 negativo, apresentaram metástases à distância.

Em relação à CD44v6, 8 dos 11 tumores que expressavam esta variante apresentaram metástases distantes, ao passo que apenas 11 dos 22 tumores negativos eram metastáticos. Estes dados sugerem um risco aumentado para o surgimento de metástases distantes em pacientes com tumores v6 positivo, porém, sem significância estatística. Quando utilizou-se um modelo de regressão multivariada com os possíveis fatores de confusão para o surgimento de metástases distantes, a associação entre a variante v6 e a ocorrência destas metástases desapareceu. Um estudo comparando a expressão da variante v6 na mucosa colônica normal e nas amostras de tumores colorretais demonstrou que aproximadamente 85% das amostras de tumores colorretais expressavam v6, porém, na mucosa colônica normal a expressão era de 81%. Este achado é contrário à relação da v6 com a progressão tumoral. A variante v5 apresentava baixa positividade tanto nas amostras de mucosa normal, como nas amostras de câncer colorretal. Sendo assim, os autores questionaram o papel das variantes da CD44 como indicadoras da progressão do câncer colorretal (Gotley et al., 1996).

Algumas hipóteses podem ser especuladas em relação aos nossos achados: 1) A expressão desta proteína pode ser perdida pelas células tumorais durante a aquisição da sua função migratória, já que adenomas e carcinomas primários expressavam a variante, e

o tecido metastático não (Coppola et al., 1998). 2) Pode ocorrer uma diminuição da disponibilidade de epitopos específicos para a CD44v6 na superfície dos tumores avançados (Finke et al., 1995; Weg-Remers et al., 1998). 3) Outra possibilidade é o mascaramento dos epitopos das variantes por uma glicosilação alterada. Esta poderia ser a explicação para os tumores colorretais primários que não expressaram a CD44 e suas variantes através método imunohistoquímico e posteriormente tornarem-se positivos após análise por RT-PCR (Orzechowski et al., 1995; Givchian et al., 1998). 4) Outra possibilidade é a diminuição da expressão das variantes por substâncias que participem do processo metastático das células cancerosas. Rudzki et al. (1997), induzindo quimicamente o surgimento de tumores de cólon em camundongos, observaram que havia uma tendência à perda da imunorreatividade das células tumorais (para a CD44 e suas variantes) em tumores invasivos. Portanto, tumores que adquirem propriedades metastáticas, estariam relacionados com a menor expressão da proteína. 5) A limitação imposta pela técnica imunohistoquímica, onde os anticorpos estão restritos ao reconhecimento dos epitopos codificados por um limitado número de exons (Naor et al., 1997). Uma análise da variante v6 com 3 diferentes anticorpos anti-CD44v6 demonstrou que os anticorpos apresentavam afinidades diferentes pelo epitopo em questão. Enquanto o clone VFF7 (o mesmo utilizado pelo nosso estudo) apresentou uma taxa de expressão de 19%, o clone VFF18 apresentou uma taxa de 94% (Wielenga et al., 1998).

Utilizando o mesmo modelo de regressão para analisar a expressão da variante v5, foi observado que a sua presença surgia como um fator de proteção para as metástases. No entanto, o mais provável é uma ausência de relação entre a positividade de v5 e a presença ou ausência de metástases distantes. Como a literatura permanece conflitante em relação ao papel da CD44 e suas variantes no processo maligno, pode-se especular que as funções adesivas desta proteína podem colaborar para a manutenção da arquitetura dos tecido tumoral, impedindo que a célula cancerosa metastatise. Uma

diminuição da sua presença pode permitir que a célula maligna destaque-se do tumor primário e invada os tecidos adjacentes.

Tipo histológico pouco diferenciado, metástases linfonodais, idade, invasão venosa e invasão serosa foram os fatores de risco que contribuíram significativamente para o surgimento de metástases viscerais. Recentemente, outros autores encontraram resultados semelhantes: foram determinantes das metástases viscerais a presença da invasão venosa, da invasão da serosa e das metástases linfonodais (Adachi et al., 1999).

A avaliação bivariada entre a expressão das variantes v5 e v6 da proteína CD44 na margem tumoral invasiva e a ocorrência do óbito demonstrou que não ocorreu associação significativa entre a sua positividade e o desfecho em questão. As mesmas hipóteses sugeridas para a ausência de relação entre v5 e v6 e o surgimento de metástases distantes podem ser aplicadas a esta avaliação. Como adenomas e tumores precoces expressam as variantes v5 e v6 (Mueller et al., 1998; Wielenga et al., 1999), podemos inferir a sua expressão está mais relacionada com os eventos iniciais da carcinogênese do que com o evento final, ou seja, o óbito.

Nossos resultados demonstraram que a invasão venosa, as metástases linfonodais e viscerais foram os fatores que contribuíram significativamente para o óbito.

Novamente, no modelo estatístico de regressão, a variante v5 expressou-se de maneira significativa como um fator de proteção para o óbito. Ao encontro deste achado vai o trabalho de Soukka et al. (1997), que estudou a expressão da CD44v6 durante a proliferação de células epiteliais normais e malignas. Os autores observaram, em contraste com muitas outras doenças malignas, que a expressão da CD44v6 estava diminuída nos carcinomas escamocelulares de cabeça e pescoço. Células do epitélio escamoso apresentam alta expressão da CD44 e suas variantes. Porém, durante a transformação maligna, ocorre uma diminuição desta proteína.

Estudos como os de Ichikawa (1994) e Nihei et al.(1996), que relacionaram a expressão da variante v6 com o pior prognóstico dos tumores colorretais, apresentaram um seguimento dos pacientes durante 60 meses. As curvas de Kaplan-Meier apresentadas pelos autores mostraram que as diferenças de sobrevivência entre os grupos CD44+/CD44v6+ e CD44-/CD44v6- começavam a acentuar-se a partir do trigésimo mês de acompanhamento. Na nossa amostragem, além de termos um número reduzido de tumores testados para a variante v6 (33 amostras), o seguimento médio destes pacientes foi de apenas 31 meses (anexo 2). Dos 11 pacientes com v6+, 5 morreram nos seis primeiros meses de acompanhamento pós-operatório. Entre os 6 pacientes restantes, 3 apresentavam metástases distantes com seguimento que variava entre 12 e 30 meses. Portanto, nestes 3 pacientes, o óbito deve ter ocorrido em um curto espaço de tempo. Considerando estes dados, podemos inferir que, com uma maior amostragem e um tempo maior de seguimento, os nossos achados poderiam ir ao encontro dos estudos daqueles autores, associando o pior prognóstico aos tumores com expressão da variante v6 da CD44.

As variantes v5 e v6 estão presentes nas alterações precoces da seqüência adenoma-carcinoma. A expressão da CD44v6 parece estar associada com o pior prognóstico nos pacientes com câncer colorretal. Inúmeros relatos citados apontam nesta direção. Como analisamos adenocarcinomas avançados, poderíamos esperar uma porcentagem maior de amostras positivas. Porém, outros estudos constataram uma diminuição da expressão da v6 no câncer colorretal metastático (tanto no tecido primário como no tecido metastático). Isto sugere a existência de mecanismos reguladores que influenciam a expressão das variantes v5 e v6 nos tumores benignos e malignos. A partir dos nossos resultados e dos observados na literatura, constatamos que mais estudos serão necessários para compreender os mecanismos reguladores da expressão das variantes da CD44.

6.1 Perspectivas

Os estudos mostrando a relação entre a expressão da CD44 e suas variantes com a progressão do câncer colorretal têm sido conflitantes.

Como as interações entre a matriz extracelular e a CD44 fazem parte das funções fisiológicas dos tecidos, é importante identificar as variantes da CD44 expressas exclusivamente nas células tumorais. Assim, as alternativas terapêuticas estariam focadas especificamente para os antagonistas destas variantes, evitando a disseminação dos tumores e não causando dano às atividades biológicas normais. Já em 1993, Seiter et al., haviam sugerido que anticorpos monoclonais anti-CD44 poderiam bloquear a disseminação de células tumorais para os linfonodos. A administração de inibidores da adesão celular no momento da cirurgia, usando anticorpos monoclonais ou peptídeos sintéticos, poderia diminuir a incidência de metástases ou prolongar o tempo no qual elas se tornariam clinicamente evidentes (Streit et al., 1996).

Investigações dos mecanismos de adesão e migração transendotelial das células cancerosas colorretais têm demonstrado a forte expressão da proteína CD44 (Fujisaki et al., 1999). O efeito de um anticorpo monoclonal anti-CD44 sobre a proliferação e migração destas células e sua formação capilar, provocou a inibição da formação capilar (redução de aproximadamente 30% da proliferação e de 25 a 50% na migração celular), sugerindo o envolvimento desta proteína na angiogênese (Trochon et al., 1996). A interação das proteínas adesivas expressas na superfície das células endoteliais com os componentes da matriz extracelular parece ser um dos fatores determinantes da angiogênese. Como foi demonstrado que a angiogênese apresenta associação estatisticamente significativa com a invasão tumoral do adenocarcinoma colorretal (Tarta, 1998), consideramos que estudos focados na relação entre angiogênese e CD44 poderão colaborar para o entendimento do processo metastático e o surgimento de novas modalidades terapêuticas.

Pesquisas com a inclusão de tumores em estágios mais precoces e com seguimentos mais longos poderão clarear a significância da CD44 e das suas variantes no surgimento das metástases. Expressão alterada da CD44 foi observada em focos de criptas aberrantes com displasia, que é a lesão mais precocemente detectável nas neoplasias colorretais (Wielenga et al., 1999). Carcinomas precoces originados de adenomas e carcinomas “de novo” apresentaram um aumento importante da expressão da CD44 e das variantes v5 e v6 nas áreas carcinomatosas em comparação com as áreas de mucosa normal de ambos os grupos (Mueller et al., 1998).

Como na gênese do tumor colorretal a expressão da variante v5 ocorre precocemente em pequenos pólipos displásicos, a sua pesquisa nas fezes dos pacientes poderia indicar alterações precoces do epitélio intestinal (Herrlich et al., 1995). Um estudo recente demonstrou a expressão das variantes da CD44 em células presentes nas fezes de pacientes com carcinoma colorretal. Após o procedimento cirúrgico a sua positividade nas células esfoliadas diminuía consideravelmente. Esta expressão pode fornecer um teste diagnóstico não invasivo para os pacientes portadores de neoplasia colorretal (Yamao et al., 1998). A variante v6, detectada nos tumores, poderia direcionar os pacientes para receberem tratamento com anticorpos anti-CD44v6 após o procedimento cirúrgico. O objetivo seria eliminar ou inibir as células tumorais remanescentes (Herrlich et al., 1995).

Outras relações entre isoformas da CD44 tem sido sugeridas como indicadoras do prognóstico dos tumores colorretais. A razão CD44 Epitelial/CD44 Hematopoiética (CD44E/CD44H) mostrou-se maior nas amostras de tumores colorretais do que no tecido não tumoral adjacente (Shibuya et al., 1998). A elevação sérica da v6 pode estar associada a presença de metástases linfonodais. Portanto, a sua avaliação pré operatória poderá tornar-se um indicador prognóstico dos tumores colorretais. (Yamane et al., 1999; Yamaguchi et al., 1998). Não foi observada associação entre a concentração plasmática e

a tecidual da CD44. Logo, a sua verificação no seguimento dos pacientes com câncer colorretal tem pouco valor clínico (Weg-Remers et al., 1998b).

As variantes da CD44 no tumor primário e nas metástases não apresentam um padrão idêntico de expressão. A produção de inúmeras variantes pode indicar anormalidades do processamento do mRNA (Goodison et al., 1998) e a perda do controle dos mecanismos do processamento alternativo (Wong et al., 1997).

As pesquisas envolvendo as funções da proteína CD44 e suas variantes ganharam destaque principalmente nesta década. Enquanto alguns relatos associam sua expressão a um prognóstico adverso, outros trabalhos não dão suporte à esta associação. A continuidade das pesquisas é necessária para entender os mecanismos que regulam o processamento alternativo da CD44 padrão e de suas variantes e, conseqüentemente, o significado da sua expressão nos tumores colorretais. O conjunto das pesquisas desenvolvidas ao longo dos anos determinará o verdadeiro papel desta proteína nos adenocarcinomas colorretais.

7. CONCLUSÃO

Este trabalho não mostrou associação entre a expressão das variantes v5 e v6 da proteína CD44 na margem invasiva profunda dos tumores colorretais e o surgimento de metástases à distância ou a ocorrência do óbito.

8. SUMMARY

The glycoprotein CD44 and its variants (v) are adhesion molecules involved in cell-to-cell and cell-to-matrix interactions. The aim of this research was to evaluate the immunohistochemistry expression of the variant v5 and v6 of the protein CD44 in the invasive tumor margin of colorectal adenocarcinomas and its association with distant metastasis and death. Thus, 55 colorectal adenocarcinomas were randomly selected from the patients submitted to surgery in the *The first Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology - Hiroshima University School of Medicine*, between 1988 and 1991. The variables analyzed of the colorectal adenocarcinomas were histological type, invasion of the intestinal wall, venous invasion, presence of distant and lymph-node metastasis, Dukes stage, age, sex and death. The evaluation of the association between distant metastasis and death with the expression of v5 and v6 variants of CD44 was performed through a bivariate, multivariate analysis and Cox regression. The result of this study showed an association statistically significant between poorly differentiated histological type ($P=0.009$) tumor invasion beyond the intestine wall ($P=0.024$) venous invasion ($P=0.012$) and lymph-node metastasis ($P<0.001$) with development of distant metastasis. Venous invasion, lymph-node and visceral metastasis were the factors that significantly contributed to the occurrence of death ($P=0.019$, 0.005 and <0.001 respectively). The variant v5 and v6 were expressed respectively in 57.4% and 33.3% of the samples. In the bivariate analysis, there was no association between the expression of the variants v5 and v6 of CD44 and the occurrence of distant metastasis ($P\cong 1.000$ and $P=0.278$, respectively) or with the prognosis of these patients ($P=0.991$ and $P=0.900$, respectively). In a model of logistic regression to evaluate the association between variants v5 and v6 and occurrence of metastasis, with control over potential factors of confusion, we have observed that v6 did not demonstrate association and variant v5 showed a trend to express itself as a protection

factor for the appearance of metastasis ($P=0.895$ and $RC=1.15$, $P=0.073$ and $RC=0.19$, respectively). In the regression model of Cox between the expression of v5 and death, this variant expressed itself significantly as a factor of protection for this event ($P=0.029$). Although CD44 has a role in disseminating tumor cells, the value of this protein in the prognosis of colorectal adenocarcinomas is still unclear.

9. BIBLIOGRAFIA

- ABBASI A.M.; Chester K.A.; Talbot I.C.; MacPherson A.S.; Boxer G.; Forbes A.; Malcolm A.O.B.; Begent R.H.J. CD44 is associated with proliferation in normal and neoplastic human colorectal epithelial cells. *Eur. J. Cancer*, 1993; 29: 1995-2002.
- ADACHI Y.; Inomata M.; Kakisako K.; Sato K.; Shiraiashi N.; Kitano S. Histopathologic characteristics of colorectal cancer with liver metastasis. *Dis. Colon Rectum*, 1999; 42: 1053-1056.
- ALHO A.M.; Underhill C.B. The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cells. *J. Cell Biol.*, 1989; 108: 1557-1565.
- ARCH R.; Wirth K.; Hofmann M.; Ponta H. Matzku S.; Herrlich P.; Zöller M. Participation in immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science*, 1992; 257: 682-685.
- ARIZA A.; Mate J.L.; Isamat M.; López D.; Von Uexküll Güldeband C.; Rossel L.; Fernadéz Vasalo A.; Navas Palacios J.J. Standard and variant CD44 isoform are commonly expressed in lung cancer of the non-small cell type but not of the small cell type. *J. Pathol.*, 1995; 177:363-368.
- ASHER R.; Bignami A. Hyaluronate binding and CD44 expression in human glioblastoma cells and astrocytes. *Exp. Cell Res.*, 1992; 203: 80-90.
- AZANOVOORIAN S.; Murphy A.N.; Stetler-Stevenson W.G.; Liotta L.A. Molecular aspects of tumor invasion and metastasis. *Cancer*, 1993; 71: 1368-1383.
- BHATAVDEKAR J.M.; Patel D.D.; Chikhlikar P.R.; Trivedi T.I.; Gosalia N.M.; Ghosh N.; Shah N.G.; Vora H.H.; Suthar T.P. Overexpression of CD44: a useful independent predictor of prognosis in patients with colorectal carcinomas. *Ann. Surg. Oncol.*, 1998; 5: 495-501.
- BRATTHAUER G.L.; Adams L.R. Immunohistochemistry: antigen detection in tissue. In: Mikel U.V., editor. *Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology*. Washington DC American Registry of Pathology, Armed Forces Institute of Pathology; 1994, p. 1-40.
- BORING C.C.; Squires T.S.; Tong T.; *Cancer Statistics*. *Cancer J. Clin.*, 1991; 41: 19-31.
- CAMPBELL S.; Swann H.R.; Aplin J.D.; Seif M.W.; Kimber S.J.; Elstein M. CD44 is expressed throughout pre-implantation human embryo development. *Hum. Reprod.*, 1995; 10: 425-430.
- CARTER W.G.; Wayner E.A. Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. *J. Biol. Chem.*, 1988; 263: 4193-4201.
- CHAUDHRY A.; Gobl A.; Eriksson B.; Skogseid B.; Öberg K. Different Splice variants of CD44 are expressed in gastrinomas but not in other subtypes of endocrine pancreatic tumors. *Cancer Res.*, 1994; 54: 981-986.

- COBBOLD S.; Hale G.; Waldmann H.; In McMichel A.J. Leucocyte Type III: White Cell Differentiation Antigens. Oxford, Oxford University Press, 1987, 788-803.
- COLEMAN, M.; Esteve J.; Damielky P.; Arslan A.; Renard H. Trends in cancer incidence and mortality, 1993. Lyon: IARC.
- COPPOLA D.; Hyacinthe M.; Fu L.; Cantor A.B.; Karl R.; Marcet J.; Cooper D.L.; Nicosia S.V.; Cooper H. S. CD44v6 expression in human colorectal carcinoma. *Hum. Pathol.*, 1998; 29: 627-635.
- CULTY M.; Nguyen H. A.; Underhill C.B. The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J. Cell Biol.*, 1992; 116: 1055-1062.
- DALCHAU R.; Kirkley J.; Fabre J.W. Monoclonal antibody to a human brain-granulocyte-T lymphocyte antigen probably homologous to the W 3/13 antigen of the rat. *Eur. J. Immunol.*, 1980; 10: 745-749.
- DeVITA V.T.; Hellman S.; Rosemberg S.A. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, Fifth Edition; Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997.
- DOEGE K.; Sasaki M.; Horigan E.; Hassell J.R.; Yamada Y. Complete primary structure of the rat cartilage proteoglycan core protein deduced from cDNA clones. *J. Biol. Chem.*, 1987; 262: 17757-17767.
- ENGEL C.J.; Benett S.T.; Chambers A.F.; Doig G.S.; Kerkvliet N.; Omalley F.P. Tumor angiogenesis predicts recurrence in invasive colorectal cancer when controlled for Dukes Staging. *Am. J. Surg. Pathol.*, 1996; 20: 1260-1265.
- FIDLER I.J. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.*, 1978; 38:9 2651-2660.
- FIGGE J.; del Rosário A.D.; Gerasimov G.; Dedov I.; Bronstein M.; Troshina K.; Alexandrova G.; Kallakury B.V.; Bui H.X.; Bratslavsky G. Preferential expression of cell adhesion molecule CD44 in papillary thyroid carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.*, 1994; 61: 203-211.
- FINKE L.H.; Terpe H-J.; Zörb C.; Haensch W.; Schlag P.M. Colorectal cancer prognosis and expression of exon-V6-containing CD44 proteins. *Lancet*, 1995; 345: 583-584.
- FINN L.; Dougherty G.H.; Finley G.; Meisler A.; Becich M.; Cooper D.L. Alternative splicing of CD44 pre-mRNA in human colorectal tumor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1994; 200: 1015-1022.
- FLETCHER C.D.M.; *Diagnostic Histopathology of Tumors*. Churchill New York: Livingstone, 1995; V.1: p. 260.
- FOLKMAN J.; Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, 1971; 285: 1182-1186.
- FOX S.B.; Gatter K.C.; Jackson D.G.; Screatton G.R.; Bell M.V.; Bell J.I.; Harris D.G.; Simmons D.; Fawcett J. CD44 and cancer screening. *Lancet*, 1993; 342: 548-549.

- FROST P.; Levin B. Clinical implications of metastatic process. *Lancet*, 1992; 339: 1459-1461.
- FUJISAKI T.; Tanaka Y.; Fujii K.; Mine S.; Saito K.; Yamada S.; Yamashita U.; Irimura T.; Eto S. CD44 stimulation induces integrin-mediated adhesion of colon cancer cell lines to endothelial cells by up-regulation of integrins and c-Met and activation of integrins. *Cancer Res.*, 1999; 59: 4427-4434.
- GIVEHCHIAN M.; Wörner S.; Sträter J.; Zöller M.; Heuschen U.; Heuschen G.; Lehnert T.; Herfarth C.; von Knebel Doeberitz M. No evidence for cancer-related CD44 splice variants in primary and metastatic colorectal cancer. *Eur. J. Cancer*, 1998; 34: 1099-1104.
- GOODFELLOW P.N.; Banting G.; Wiles M.V.; Tunnacliffe A.; Parker M.; Solomon E.; Dalchau R.; Fabre J.W. The gene, MIC4, which controls expression of the antigen defined by monoclonal antibody F10.44.2, is on human chromosome 11. *Eur. J. Immunol.*, 1982; 12: 659-663.
- GOODISON S.; Yoshida K.; Churchman M.; Tarin D. Multiple intron retention occurs in tumor cell CD44 mRNA processing. *Am. J. Pathol.*, 1998; 153: 1221-8.
- GORDON P.H.; Nivatvongs S. Principles and Practice of Surgery for the Colon, Rectum and Anus, Second edition; Quality Medical Publishing, Inc. St. Louis, Missouri, 1999.
- GOTLEY D.C.; Fawcett J.; Walsh M.D.; Reeder J.A.; Simmons D.L.; Antalis T.M. Alternatively spliced variants of the cell adhesion molecule CD44 and tumor progression in colorectal cancer. *Brit. J. Cancer*, 1996; 74: 342-351.
- GÜNTHERT U.; Hofmann M.; Rudy W.; Reber S.; Zöler M.; Haußmann I.; Matzku S.; Wenzel A.; Ponta H.; Herrlich P. A new Variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell*, 1991; 65: 13-24.
- GUO Y-J.; Liu G.; Wang X.; Jim D.; Wu M.; Ma J.; Sy M-S. Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and metastasis in patients with gastric or colon cancer. *Cancer res.*, 1994a; 54: 422-426.
- GUO Y-J.; Ma J.; Wang J.; Che X.; Narula J.; Bigby M.; Wu M.; Sy M-S. Inhibition of human melanoma growth and metastasis in vivo by anti-CD44 monoclonal antibody. *Cancer Res.*, 1994b; 54: 1561-1565.
- HARN H-J.; Ho L-I.; Chang J-I.; Wu C-W.; Jiang S-I.; Lee H-S.; Lee W-H. Differential expression of the human metastasis adhesion molecule CD44 in normal and carcinomatous stomach mucosa of chinese subjects. *Cancer*, 1995; 75: 1065-1071.
- HART. I.R.; Saini A. Biology of tumour metastasis. *The Lancet*, 1992; 339: 1453-1457.
- HAYNES B.F. Telen M.J.; Hale L.P.; Denning S.M. CD44 - a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol. Today*, 1989; 10: 423-428.
- HAYNES B.F.; Hale L.P.; Patton K.L.; Martin M.E.; McCallum R.M. Measurement of an adhesion molecule as an indicator of inflammatory disease activity. *Arthritis Rheum.*, 1991; 34: 1434-1443.

- HEIDER K-H.; Dämmrich J.; Skroch-Angel P.; Müller-Hermelink H-K.; Vollmers H.P.; Herrlich P.; Ponta H. Differential expression of CD44 splice variants in intestinal and diffuse-type human gastric carcinoma and normal gastric mucosa. *Cancer Res.*, 1993a; 53: 4197-4203.
- HEIDER K-H.; Hofmann M.; Hors E.; Van den Berg F.; Ponta H.; Herlich P.; Pals S.T. A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J. Cell Biol.*, 1993b; 120: 227-233.
- HERRLICH P.; Pals S.; Ponta H. CD44 in Colon Cancer. *Eur. J. Cancer*, 1995; 31A: 1110-1112.
- HIGASHIKAWA K.; Yokozaki H.; Ue T.; Taniyama K.; Ishikawa T.; Tarin D.; Tahara E. Evaluation of CD44 transcription variants in human digestive tract carcinoma and normal tissues. *Int. J. cancer*, 1996; 66: 11-17.
- HIRSCHEL-SCHOLZ S.; Sappino A.P. Cancer metastasis - A multistep process. *Dermatology*, 1992; 185: 169-172.
- HONDA A.; Noguchi N.; Takehara H.; Ohashi Y.; Asuwa N.; Mori Y. Cooperative enhancement of hyaluronic synthesis by combined use of IGF-I and EGF, and inhibition by tyrosine kinase inhibitor genistein, in cultured mesothelial cells from rabbit pericardial cavity. *J. Cell Sci.*, 1991; 98: 91-98.
- HSU S-M.; Raine L.; Fanger H. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and Unlabeled Antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 1981; 29: 577-580.
- ICHIKAWA W. Positive relationship between expression of CD44 and hepatic metastases in colorectal cancer. *Pathobiology*, 1994; 62: 172-179.
- IIDA N.; Bourguignon L.Y.W. New CD44 splice variants associated with human breast cancers. *J. Cell Physiol.*, 1995; 162: 127-133.
- IMAZEKI F.; Yokosuka O.; Yamagushi T.; Ohto M.; Isono K.; Omata M. Expression of variant CD44-messenger RNA in colorectal adenocarcinomas and adenomatous polyps in humans; *Gastroenterology*, 1996; 110: 362-368.
- INCA, Instituto Nacional do Câncer - Ministério da Saúde. O problema do câncer no Brasil (4^a. edição), 1997.
- INCA / Conprev, Ministério da Saúde. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 1999. Rio de Janeiro, 1999.
- IOACHIM E.; Goussia A.; Agnantis N.J. Glycoprotein CD44 expression in colorectal neoplasms. An immuno-histochemical study including correlation with cathepsin D, extracellular matrix components, p53, Rb, bcl-2, c-erbB-2, EGFR and proliferation indices. *Virchows Arch*, 1999; 434:, 45-50.
- ISOZAKI H.; Ohyama T.; Mabuchi H. Expression of cell adhesion molecule CD44 and sialyl Lewis A in gastric carcinoma and colorectal carcinoma in association with hepatic metastasis. *Int. J. Oncol.*, 1998; 13: 935-942.

- JACKSON P.A.; Green M.A.; Pouli A.; Hubbard R.; Marks C.G.; Cook M.G. Relation between stage, grade, proliferation and expression of p53 and CD44 in adenomas and carcinomas of the colorectum. *J. Clin. Pathol*, 1995; 48: 1098-1101.
- JAIN R.K.; Koenig G.C.; Dellian M.; Fukumura D.; Munn L.L.; Melder R.J. Leucocyte-endothelial adhesion and angiogenesis in tumor. *Cancer Metastasis Rev*, 1996; 15: 195-204.
- JALKANEN S.; Reichert R.; Gallatin W.M.G.; Bargatze R.F.; Weissman I.L.; Buchter E.C. Homing receptors and the control of lymphocyte migration. *Immunol. Rev.*, 1986; 91: 39-60.
- KAINZ C.; Kohlberger P.; Sliutz G.; Tempfer C.; Heinzl H.; Reinthaller A.; Breitenecker G.; Koelbl H. Splice variants of CD44 in human cervical cancer stage IB to IIB. *Gynecol oncol.*, 1995; 57: 383-387.
- KAINZ C.; Tempfer C.; Kohlberger P.; Janisch S.; Koelbl H.; Gitsch G.; Breitenecker G. Immunohistochemical detection of adhesion molecule CD44 splice variants in lymph node metastases of cervical cancer. *Int. J. Cancer*, 1996; 69: 170-173.
- KAUFMANN M.; Heider K-H.; Sinn H.P.; von Minckwitz G.; Ponta H.; Herrlich P. CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. *Lancet*, 1995; 345: 615-619.
- KIM H.; Yang X-L.; Rosada C.; Hamilton S.R.; August J.T. CD44 expression in colorectal adenomas is an early event occurring prior to K-ras and p53 gene mutation. *Arch. Bioch. Bioph.*, 1994; 310: 504-507.
- KNUDSON C.B. Hyaluronan receptor-directed assembly of chondrocyte pericellular matrix. *J. Cell Biol.*, 1993; 120: 825-834.
- KNUDSON W.; Biswas C.; Li X.Q.; Nemecek R.E.; Toole B.P. The role and regulation of tumor-associated hyaluronan. *Ciba Found. Symp.*, 1989; 143: 150-159.
- KOOPMAN G.; Heider K.H.; Horst E.; Adolf G.R.; Van den Berg F.; Ponta H.; Herrlich P.; Pals S.T. Activated human lymphocytes and aggressive non-hodgkins lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. *J. Exp. Med.*, 1993; 177: 897-904.
- KUPPNER M.C.; Van Meir E.; Gauthier T.; Hamou M.F.; de Tribolet N. Differential expression of the CD44 molecule in human brain tumours. *Int. J. Cancer*, 1992; 50: 572-577.
- KORETZ K.; Möller P.; Lehnert T.; Hinz U.; Otto H.F.; Herfarth C. Effect of CD44 on survival in colorectal carcinoma. *Lancet*, 1995; 345: 327-328.
- LAURENT T.C.; Fraser J.R.E. Hyaluronan. *FASEB J.*, 1992; 6: 2397-2404.
- LESLEY J.; Hyman R.; Kincade P.W. CD44 and its interaction with extracellular Matrix. *Adv. Immunol.*, 1993; 54: 271-335.
- LIOTTA L. Cancer cell invasion and metastasis *Sci. Am.*, 1992; 266:2, 54-59.

- LOKESHWAR B.L.; Lokeshwar V.B.; Block N.L. Expression of CD44 in prostate cancer cells: association of cell proliferation and invasive potential. *Anticancer Res.*, 1995; 15: 1191-1198.
- MACKAY C.R.; Terpe H.J.; Stauder R.; Marston W.R.; Stark H.; Günthert U. Expression and modulation of CD44 Variant isoforms in humans. *J. Cell Biol.*, 1994; 124: 71-82.
- MATSUMURA Y.; Tarin D.; Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *The Lancet*, 1992; 340: 1053-1058.
- MATSUMURA Y.; Sugiyama M.; Matsumura S.; Hayle A.J.; Robinson P.; Smith J.C.; Tarin D. Unusual retention of introns in CD44 gene transcripts in bladder cancer provides new diagnostic and clinical oncological opportunities. *Pathol.*, 1995; 177: 11-20.
- MUELLER J.D.; Heider K. H.; Oberhuber B.; Mueller E.; Bethke B.; Stolte M.; Höfler H. Comparison of CD44 expression in early colorectal carcinoma of the de novo and ex adenoma types. *Virchows Arch*, 1998; 433: 407-414.
- MULDER J.W.R.; Kruyt P.M.; Sewnath M.; Oosting J.; Seldenrejk C.A.; Weidema W.F.; Offerhaus G.J.A.; Pals S.T. Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. *Lancet*, 1994; 344: 1470-1472.
- MULDER J.W.R.; Wielenga V.J.M.; Polak M.M.; van den Berg F.M.; Adolf G.R.; Herrlich P.; Pals S.T.; Offerhaus G.J.A. Expression of mutant p53 protein and CD44 variant protein in colorectal tumorigenesis. *Gut*, 1995a; 36: 76-80.
- MULDER J.W.R.; Kruyt P.M.; Sewnath M.; Seldenrijk C.A.; Weidema W.F.; Pals S.T.; Offerhaus G.J.A. Difference in expression of CD44 splice variants between proximal and distal adenocarcinoma of the large bowel. *Brit. J. Surg.*, 1995b; 82: 1468-1470.
- MULDER J.W.R.; Wielenga V.J.M.; Pals S.T.; Offerhaus G.J.A. p53 and CD44 as clinical markers of tumor progression in colorectal carcinogenesis. *Histochem. J.*, 1997; 29: 439-452.
- NADJI N.; Morales A.R. Immunohistochemical techniques. In: Silverberg S.G.; DeLellis R.A.; Frable W.J., editors. *Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology*. New York: Churchill-Livingstone; 1997. P. 63-76.
- NAOR D.; Sionov R.V.; Ish-Shalon D. CD44: Structure, function, and association with the malignant process. *Adv. Cancer Res.*, 1997; 71: 241-319.
- NEUMAYER R.; Rosen H.R.; Reiner A.; Sabasta C.; Schimid A.; tühler H.; Schiessel R. CD44 expression in benign and malignant colorectal polyps. *Dis. Colon Rectum*, 1999; 42: 50-55.
- NHI Consensus Conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. *JAMA*, 1990; 264: 1444-1450.
- NIHEI Z.; Ichikawa W.; Kojima K.; Togo S.; Miyanaga T.; Hirayama R.; Mishima Y. The positive relationship between the expression of CD44 variant 6 and prognosis in colorectal cancer. *Surg. Today*, 1996; 26: 760-761.

- OKANO K.; Shimoda T.; Matsumura Y. Clinicopathologic and immunohistochemical study of early colorectal cancer with liver metastases. *J. Gastroenterol.*, 1999; 34: 334-40.
- OKSALA O.; Salo T.; Tammi R.; Häkkinen L.; Jalkanen M.; Inki P.; Larjava H. Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *J. Histochem. Cytochem.*, 1995; 43: 125-135.
- ORZECZOWSKI H. D.; Beckenback C.; Herbst H.; Stölzel U.; Riecken E-O.; Stallmack A. Expression of CD44 V6 is associated with cellular dysplasia in colorectal epithelial cells. *Eur. J. Cancer*, 1995; 31A: 2073-2079.
- PALS S.T.; Hogervorst F.; Keizer G.D.; Thepen T.; Horst E.; Figdor C.C. Identification of a widely distributed 90-Kda glycoprotein that is homologous to the Hermes-1 human lymphocyte homing receptor. *J. Immunol.*, 1989; 143: 851-857.
- PALS S.T.; Koopman G.; Heider K-H.; Grifioen A.; Adolf G.R.; van den Berg F.; Herrlich P.; Horst E. CD44 splice variants: expression during lymphocyte activation and tumor progression. *Behring Inst. Mitt.*, 1993; 92: 273-277.
- PARKIN, D.M.; Pisani P.; Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int. J. Cancer*, 1993; 54: 594-606.
- PICKER L.J.; Nakache M.; Butcher E.C. Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules on diverse cell types. *J. Cell Biol.*, 1989; 109: 927-937.
- POSTE G.; Fidler I.J. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*, 1980; 283: 139-146.
- SSMA (Secretaria da Saúde e Meio Ambiente) - Núcleo de informações em saúde: "Mortalidade pelos principais tipos de câncer"; Rio Grande do Sul, 1997.
- RAPPONEN K.M.; Eskelinen M.J.; Lipponen P.K.; Alhava E.; Kosma V.M. Expression of CD44 and variant proteins in human colorectal cancer and its relevance for prognosis. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1998; 33: 301-309.
- RUDY W.; Hofmann M.; Schwartz A.R.; Zöller M.; Heider K-H.; Ponta H.; Herrlich P. The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat tumor cell line are derived from different splice variants: each one individually suffices to confer metastatic behavior. *Cancer Res.*, 1993; 53: 1262-1268.
- RUDZKI Z.; LeDuy L.; Jothy S. Changes in CD44 expression during carcinogenesis of the mouse colon. *Exp. Mol. Pathol*, 1997; 64: 114-125.
- SCREATON G.R.; Bell M.V.; Jackson D.G.; Cornelis F.B.; Gerth U.; Bell J.I. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992; 89: 12160-12164.
- SHERMAN L.; Skroch A.P.; Schwechheimer K.; Ponta H.; Herrlich P.; Hofmann M. Schwann cell tumors express characteristic patterns of CD44 splice variants. *J. Neurooncol.*, 1995; 26: 171-184.

- SHIBUYA Y., Okabayashi T.; Oda K.; Tanaka N. Ratio of CD44 epithelial variant to CD44 hematopoietic variant is a useful prognostic indicator in gastric and colorectal carcinoma; *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 1998; 28: 609-614.
- SIMON J.C.; Heider K-H.; Dietrich A.; Wuttig C.; Schöpf E.; Adolf G.R.; Ponta H.; Herrlich P. Expression of CD44 isoforms in human skin cancer. *Eur. J. Cancer*, 1996; 32A: 1394-1400.
- SEITER S.; Arch R.; Reber S.; Komitowski D.; Hofmann M.; Ponta H.; Herrlich P.; Matzku S.; zöller M. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J. Exp. Med.*, 1993; 177: 443-455.
- SOUKKA T.; Salmi M.; Joensuu H.; Häkkinen L.; Sointu P.; Koulu L.; Kalimo K.; Klemi P.; Grénman R.; Jalkanen S. Regulation of CD44v6-containing isoforms during proliferation of normal and malignant Epithelial cells. *Cancer Res.*, 1997; 57: 2281-2289.
- SPRINGER T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 1994; 76: 301-314.
- STAMENKOVIC I.; Aruffo A.; Amiot M.; Seed B. The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *EMBO J.*, 1991; 10: 343-348
- STREIT M.; Schmidt R.; Hilgenfeld R.U.; Thiel E.; Kreuzer E.D. Adhesion receptors in malignant transformation and dissemination of gastrointestinal tumors. *Recent Results Cancer Res.*, 1996; 142: 19-50.
- SU-MING H.; Raine L.; Fanger H. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: A comparacion between ABC and Unlabeled Antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 1981; 29: 577-580.
- SUH S.I.; Baek W.K.; Park J.W.; Bae O.S.; Suh M.H.; Choe B.K. Identification of CD44 splice variant in Korean colorectal cancers and cell lines. *J. Korean Med. Sci.*, 1995; 10: 169-175.
- SY M.S.; Guo Y-J.; Stamenkovic I. Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth in vivo. *J. Exp. Med.*, 1991; 174: 859-866.
- TALBOT I.C.; Ritchie S.; Leighton M.; Hughes A.O.; Bussey H.J.R.; Morson B.C. Invasion of veins by carcinoma of rectum: Method of detection, histological features and significance. *Histopathology*, 1981; 5: 141-163.
- TANABE K.K.; Ellis L.M.; Saya H. Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinoma and metastasis. *Lancet*, 1993; 341: 725-726.
- TARTA C.; Angiogênese e o potencial maligno do adenocarcinoma colorretal avançado; dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina - UFRGS Curso de pós-graduação: cirurgia, 1998.
- TEDER P.; Bergh J.; Heldin P. Functional hyaluronan receptors are expressed on a squamous cell lung carcinoma cell line but not on other lung carcinoma cell lines. *Cancer Res*, 1995; 55: 3908-3914.

- TEIXEIRA C.R.; Histologic subclassification of the deepest invasive portion predicts malignant of colorectal carcinoma; Hiroshima University School of Medicine Tese de Doutorado, 1993a.
- TEIXEIRA C.R.; Tanaka S.; Haruma K.; Yoshihara M.; Sumii K.; Kajiyama G.; Shimamoto F. The clinical significance of the histologic subclassification of colorectal carcinoma. *Oncology*, 1993b; 50: 495-499.
- TEIXEIRA C.R.; Tanaka S.; Haruma K.; Yoshihara M.; Sumii K.; Kajiyama G. Proliferating cell nuclear antigen expression at the invasive tumor margin predicts malignant potential of colorectal carcinomas. *Cancer*, 1994; 73: 575-579.
- TERPE H.J.; Störkel L.; Zimmer U.; Anquez V.; Fisher C.; Pantel K.; Günthert U. Expression of CD44 isoform in renal cell tumor. Positive correlation to tumor differentiation. *Am. J. Pathol*, 1996; 148: 453-463.
- TOOLE B.P.; Biswas C.; Gross J. Hyaluronate and invasiveness of the rabbit V2 carcinoma. *Proc. Natl. Sci. USA*, 1979; 76: 6299-6303.
- TROCHON V.; Malibat C.; Bertrand P.; Legrand Y.; Smadja-Joffe F.; Soria C.; Delpech B.; Lu H. Evidence of involvement of CD44 in endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis in vitro. *Int. J. Cancer*, 1996; 66: 664-668.
- TUBBS R.R.; Bauer T.W. Automation of immunohistology. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1989; 113: 653-657.
- UNDERHILL C. CD44: The hyaluronan receptor. *J. Cell Sci*, 1992; 103: 293-298.
- WASHINGTON K.; Gottfried M.; Telen M.J. Expression of the cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinoma. *Hum. Pathol.*, 1994; 25: 1043-1049.
- WEG-REMERS S.; Anders M.; von Lampe B.; Riecken E.O.; Schüder G.; Feifel G.; Zeitz M.; Stallmach A. Decreased expression of CD44 splicing variants in advanced colorectal carcinoma. *Eur. J. Cancer*, 1998a; 34: 1607-1611.
- WEG REMERS S.; Hildebrandt U.; Feifel G.; Moser C.; Zeitz M.; Stallmach A. Soluble CD44 and CD44v6 serum levels in patients with colorectal cancer are independent of tumor stage and tissue expression of CD44v6. *Am. J. Gastroenterol.*, 1998b, 93: 790-794.
- WIELENGA V.J.M.; Heider K-H.; Offerhaus J.A.; Adolf G.R.; Van den Berg F.M.; Ponta H.; Herrlich P.; Pals S.T. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res.*, 1993; 53: 4754-4756.
- WIELENGA V.J.M.; Van der Voort R.; Mulder J.W.R.; Kruyt P.M.; Weidema W.F.; Oosting J.; Seldenrijk C.A.; Van Krimpen C.; Offerhaus G.J.A.; Pals S.T. CD44 splice variants as prognostic markers in colorectal cancer. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1998; 33: 82-87.
- WIELENGA V.J.M.; Smits R.; Korinek V.; Smit L.; Kielman N.; Fodde R.; Clevers H.; Pals S.T. Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am. J. Pathol*, 1999; 154: 513-523.
- WILMINK, A.B.M.; Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum*, 1997; vol. 40; 483-493.

- WIMMENAUER S.; Keller H.; Rückauer K.D.; Rahner S.; Wolff Vorbeck G.; Kirste G.; von Kleist S.; Farthman E.H. Expression of CD44, ICAM- 1 and N-CAM in colorectal cancer. Correlation of the tumor stage and the phenotypical characteristics of tumor-infiltrating lymphocytes. *Anticancer Res.*, 1997 17: 2395- 2400.
- WONG L.S.; Cantrill J.E.; Morris A.G.; Fraser I.A. Expression of CD44 splice variants in colorectal cancer. *Br. J. Surg.*, 1997; 84: 363-367.
- YAEGASHI N.; Fujita N.; Yajima A.; Nakamura M. Menstrual cycle dependent expression of CD44 in normal human endometrium. *Hum. Pathol.*, 1995; 26: 862-865.
- YAMAGUCHI A.; Urano T.; Goi T.; Saito M.; Takeuchi K.; Hirose K.; Nakagawara G.; Shiku H.; Fusekawa K Expression of a CD44 variant containing exons 8 to 10 is a useful independent factor for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients. *J.Clin. Pathol.*, 1996; 14: 1122-1127.
- YAMAGUCHI A.; Goi T.; Taguchi S.; Ohtaki N.; Seki K.; Hirose K.; Nakagawara G.; Urano T.; Furukawa K. J. Clinical significance of serum levels of CD44 variant exons 8-10 protein in colorectal cancer. *J. Gastroenterol.*, 1998; 33: 349-53.
- YAMAO T.; Matsumura Y.; Shimada Y.; Moriya Y.; Sugihara K.; Akasu T.; Fujita S.; Kakizoe T. Abnormal expression of CD44 variants in the exfoliated cells in the feces of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology*, 1998; 114: 1196-1205.
- YAMANE N.; Tsujitani S.; Makino M.; Maeta M.; Kaibara N. Soluble CD44 variant 6 as a prognostic indicator in patients with colorectal cancer. *Oncology*, 1999; 56: 232-8.

ANEXO 1

Descrição da técnica Imunohistoquímica (Laboratório Anticorpos - Anatomia patológica e Citopatologia).

As lâminas foram rotuladas. Inicialmente foram incubadas em estufa a 60 graus centígrados por 30 minutos e, a seguir, deparafinadas em 4 passagens de 5 minutos no xilol e 3 passagens em álcool absoluto. Após, as lâminas foram imersas em álcool amoniacal a 70% por 10 minutos a fim de bloquear os cristais de formol e, a seguir, três banhos em água destilada. Para evitar a coloração de fundo ("background") pela marcação da peroxidase endógena, realizou-se o bloqueio desta enzima com água oxigenada a 3% durante 30 minutos seguido de lavagem com água destilada (três passagens de 5 minutos cada). Em seqüência, as lâminas foram levadas ao forno de microondas em tampão citrato pH 6,0 (2 vezes por 4 minutos). Após esfriarem foram lavadas com tampão Tris (3 passagens) e incubadas com albumina BSA a 1% por 1 hora para bloqueio das ligações inespecíficas. As lâminas foram secadas com papel filtro em volta do corte sem lavagem. Procedeu-se, a seguir, a incubação com os anticorpos primários anti-CD44 variantes v5 e v6 por 24 horas (overnight). Lavagem com Tris (3 passagens de 5 minutos cada). Aplicação do anticorpo secundário e complexo streptoavidina-biotina (kit EXTRA-2 Sigma Co.) ambos por 30 minutos. Após a lavagem com Tris (3 passagens de 5 minutos cada), os cortes foram revelados com solução de DAB - utilizado como cromógeno - por 1 a 3 minutos, permitindo a visualização microscópica da reação antígeno-anticorpo (cor acastanhada). A reação foi definitivamente bloqueada através de imersão em água destilada. Para finalizar, as lâminas foram contracoradas por imersão em hematoxilina de Meyer durante 25 a 35 segundos e montadas em bálsamo de Damar e cobertas por lamínulas de vidro. Foram utilizados cortes histológicos de pele como controles positivos (imunorreatividade das células epidérmicas) e negativo (supressão dos anticorpos monoclonais primários anti-CD44var.v5 e v6). Isto permitiu descartar reação cruzada do anticorpo secundário com alguma substância endógena, o que comprometeria a especificidade do método.

ANEXO 2

Descrição individual das variáveis dos tumores colorretais estudados.

TUMOR	SEXO	IDADE	HISTOLOGIA	INVASÃO VENOSA	INV. SEROSA/ADVENTÍCIA	LINFONODOS	MET.DISTANTE	V5	V6	DUKES	SEG/MESES
1	M	73	bem difer.	Sim	não	sem met	ausente	neg	neg	B	52
2	M	79	bem difer.	Não	não	sem met	ausente	pos		B	62
3	M	65	pouco difer.	Sim	não	sem met	presente	neg	neg	B	37
4	F	63	pouco difer.	Sim	não	sem met	ausente	pos	neg	B	56
5	F	74	pouco difer.	Sim	sim	com met	ausente	pos	neg	C	59
6	M	72	bem difer.	Não	não	sem met	ausente	neg	neg	B	65
7	F	76	bem difer.	Não	não	com met	ausente	neg	neg	C	60
8	F	51	bem difer.	Não	não	com met	presente	pos		D	8*
9	M	59	pouco difer.	Sim	sim	com met	presente	pos	pos	D	2*
10	F	54	mod. Difer.	Sim	não	com met	presente	neg		C	20*
11	M	70	pouco difer.	Sim	não	com met	ausente	neg		C	21
12	M	57	bem difer.	Sim	não	sem met	ausente	pos		B	60
13	M	83	pouco difer.	Sim	sim	sem met	presente	neg		D	2*
14	F	59	bem difer.	Não	não	sem met	ausente	pos	pos	B	60
15	F	62	pouco difer.	Sim	sim	com met	presente	pos	pos	D	4*
16	M	56	mod. Difer.		não	sem met	ausente		neg	B	60
17	F	59	pouco difer.	Sim	não	com met	presente	pos	pos	D	5*
18	M	67	mod. Difer.	Sim	não	sem met	ausente	neg	neg	B	63
19	M	53	pouco difer.	Não	não	sem met	ausente	pos		B	13
20	M	69	pouco difer.	Não	não	com met	presente	neg	neg	C	36
21	M	62	pouco difer.	Sim	não	sem met	ausente	pos		B	60
22	M	69	bem difer.	Sim	não	sem met	ausente	neg		B	49
23	M	73	pouco difer.	Sim	sim	sem met	ausente	neg	pos	B	42
24	F	63	pouco difer.	Sim	não	sem met	ausente	pos	neg	B	50
25	M	54	bem difer.	Não	não	sem met	ausente	neg		B	50
26	M	84	pouco difer.	Sim	não	com met	presente	neg	neg	D	2*
27	F	48	bem difer.		não	com met	presente	pos		D	2*
28	M	66	bem difer.	Não	não	sem met	ausente	pos	pos	B	57
29	M	64	pouco difer.	Sim	não	com met	ausente	pos		C	58
30	M	82	bem difer.	Sim	não	com met	ausente	pos		C	48
31	M	59	pouco difer.	Sim	sim	com met	presente	pos	pos	C	12*
32	F	49	pouco difer.	Sim	não	com met	ausente	pos		C	44
33	M	53	pouco difer.	Sim	sim	com met	presente	neg	neg	D	1*
34	M	73	pouco difer.	Sim	sim	sem met	presente	neg	neg	D	3*
35	F	67	bem difer.	Não	não	sem met	ausente	neg	neg	B	49
36	M	58	mod. Difer.		sim	com met	presente	pos	neg	D	9
37	F	67	bem difer.	Não	não	sem met	ausente	neg		B	48
38	M	68	pouco difer.	Sim	não	com met	presente	pos	neg	D	4*
39	M	74	bem difer.	Sim	não	sem met	ausente	neg	neg	B	51
40	F	83	pouco difer.	Sim	sim	com met	presente	pos	pos	C	23
41	M	69	mod. Difer.	Sim	não	com met	ausente	pos	neg	C	50
42	F	55	pouco difer.	Sim	não	com met	presente	neg		C	3*
43	M	67	bem difer.	Não	sim	sem met	ausente	neg		B	49
44	F	73	mod. difer	não	não	sem met	ausente	pos		B	45
45	M	62	pouco difer.	Sim	sim	com met	presente	pos	pos	D	12
46	M	57	pouco difer.	Sim	não	sem met	presente	pos	neg	B	8*
47	M	71	pouco difer.	Sim	não	sem met	ausente	pos		B	60
48	M	72	mod. Difer.		não	com met	presente	pos	neg	D	2*
49	M	54	pouco difer.	Sim	sim	sem met	presente	neg		D	5
50	M	60	bem difer.	Sim	não	com met	presente	pos		D	22*
51	F	65	pouco difer.	Sim	não	com met	presente	pos	pos	C	36
52	M	77	bem difer.	Sim	sim	com met	presente	neg		D	12*
53	F	43	pouco difer.	Sim	não	com met	presente	neg	neg	C	8*
54	M	41	pouco difer.	Sim	não	com met	presente	pos	neg	C	1*
55	F	51	pouco difer.	Sim	não	com met	presente	pos	pos	D	6*

SEXO: M = masculino; F = Feminino; HISTOLOGIA: bem difer = bem diferenciado; mod. difer = moderadamente diferenciado; pouco difer = pouco diferenciado.

INV. SEROSA/ADVENTÍCIA = Invasão ultrapassa a parede intestinal; LINFONODOS: sem met = sem metástases; com met = com metástases; MET. DISTANTES = metástases distantes

v5 e v6: neg = negativo; pos = positivo; SEG/MESES = meses de seguimento

* = óbito