

DENISE GONÇALVES PRIOLLI

**CONTEÚDO TECIDUAL E NÍVEL SÉRICO DO ANTÍGENO
CARCINOEMBRIONÁRIO NO CARCINOMA COLORRETAL.
CORRELAÇÃO COM ASPECTOS MORFOLÓGICOS E
ESTADIAMENTO.**

Tese apresentada à Universidade Federal de São
Paulo – Escola Paulista de Medicina - para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2006

DENISE GONÇALVES PRIOLLI

**CONTEÚDO TECIDUAL E NÍVEL SÉRICO DO ANTÍGENO
CARCINOEMBRIONÁRIO NO CARCINOMA COLORRETAL.
CORRELAÇÃO COM ASPECTOS MORFOLÓGICOS E
ESTADIAMENTO.**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina - para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Jaques Waisberg

Co-orientador: Prof. Dr. Nelson Fontana Margarido

São Paulo

2006

Priolli, Denise Gonçalves

Conteúdo tecidual e nível sérico do antígeno carcinoembrionário no carcinoma colorretal. Correlação com aspectos morfológicos e estadiamento./Denise Gonçalves Priolli.—São Paulo, 2006.

xv,68 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista Medicina. Programa de Pós Graduação em Ciências. Serviço de Gastroenterologia Cirúrgica.

Título em inglês: Tissue content and serum level of carcinoembryonic antigen in colorectal carcinoma. Relation with the morphological aspects and staging.

1. Antígeno Carcinoembrionário. 2. Análise de Imagem Assistida por Computador. 3. Marcadores Biológicos de Tumor. 4. Imunohistoquímica. 5. Carcinoma. 6. Cirurgia Colorretal

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina
Departamento de Gastroenterologia Cirúrgica

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Tarcísio Triviño

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Délcio Matos

DENISE GONÇALVES PRIOLLI

**CONTEÚDO TECIDUAL E NÍVEL SÉRICO DO ANTÍGENO
CARCINOEMBRIONÁRIO NO CARCINOMA COLORRETAL.
CORRELAÇÃO COM ASPECTOS MORFOLÓGICOS E
ESTADIAMENTO.**

Presidente da banca:

Prof. Dr. _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Dedicatória

A minha família

Pela ausência e afastamento torturantes, peço desculpas. Pela compreensão e apoio, agradeço. Pelo motivo da existência, não tenho palavras a expressar.

Aos nossos filhos, Lucas e Rafael Priolli

“Mantenha-se simples, bom, puro, sério, livre de afetação, amigo da justiça, temente aos deuses, gentil, apaixonado, vigoroso em todas as suas atitudes. Lute para viver como a filosofia gostaria que vivesse. Ajude os homens. A vida é curta.”

(Marco Aurélio)

Ao esposo, Fábio Luiz Malta Priolli

Meu abraço de carinho, meu reconhecimento pelo sacrifício e a promessa de fazer o máximo para que esse tempo seja lembrado, de momentos poucos, mas muito intensos.

“Andei por esta terra durante trinta anos e, por gratidão, quero deixar alguma lembrança.”

(Vincente Van Gogh)

Agradecimentos especiais

Aos meus pais, Paulo Silas Gonçalves e Edina Tavares Gonçalves

Obrigada por sempre me incentivarem, por acreditarem nos meus projetos. Obrigada por existirem, assim a vida é um lugar seguro. Obrigada por seu carinho estar sempre presente e ir comigo onde eu estiver. Por esperar o melhor de mim e assim imaginar um futuro brilhante.

Aos mestres, Prof Fábio Goffi, Prof. Nelson Fontana Margarido, Prof. Jaques Waisberg

“Uma única conversa à mesa com um homem inteligente é melhor do que dez anos estudando simplesmente os livros.”

(Henry Wadsworth Longellow)

Aos amigos, Carlos Augusto Real Martinez e Adriana Valim Portes,

“A realidade de hoje foi o sonho de ontem. O sonho de hoje será a realidade de amanhã. E em todas as épocas zombou-se dos sonhadores.”

(Zalkind Piatigirki)

Agradecimentos

Agradecer é pouco pelo que recebi. Palavras de incentivo, divisão de responsabilidade, pensamento crítico e construtivo. Compreensão, respeito, fidelidade.

Prof. José Aires Pereira, sem sua determinação técnica impecável, impossível seria conseguir atingir a qualidade das lâminas imunocoradas. A pesquisa necessita de pessoas dedicadas como o senhor.

Sra. Ana e Gilda, secretárias do Hospital Público Estadual, Cláudia e Mônica, secretárias da Pós-graduação em Gastroenterologia da Escola Paulista de Medicina, sua torcida e auxílio foram indispensáveis a minha chegada.

As esteticistas que me deram retaguarda: “MárciaS” (seria nome de anjo?) Holcman e Pivato Serra, do Hospital do Servidor Público Estadual e da Universidade São Francisco. Sem sua ajuda pronta, impossível alcançar a linha de chegada. Obrigada.

Ao Professor Délcio Matos, pela oportunidade em participar deste respeitado grupo de pós-graduação. Obrigada pela acolhida sincera.

Palavras não traduziriam o sentimento de agradecimento e respeito às professoras Helenice Piovesan e Izilda Aparecida Cardinalli, da Universidade São Francisco. Tantas discussões, sempre consensos. Tantas dúvidas, sempre aprendizado. Obrigada, sobretudo pela moral, ética e comprometimento – palavras tão fáceis de dizer, atitudes tão raras de encontrar.

Aos enfermos, sem os quais a evolução científica seria negada.

A todos aqueles que de maneira direta ou indireta tenham contribuído para que mais um sonho se tornasse realidade.

“Algo só é impossível até que alguém duvide e acabe provando o contrário.”

Sumário

Dedicatória.....	V
Agradecimentos especiais.....	VI
Agradecimentos.....	VII
Lista de figuras.....	X
Lista de tabelas.....	XI
Lista de abreviaturas.....	XIV
Resumo.....	XV
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	2
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Epidemiologia.....	3
2.2 Estadiamento.....	3
2.3 CEA sérico.....	4
2.4 CEA tecidual.....	5
2.5 Análise de imagem assistida por computador.....	9
3 MÉTODOS.....	10
3.1 Adequação do projeto.....	10
3.2 Casuística.....	10
3.3 Estadiamento pré-operatório.....	12
3.4 Preparo pré-operatório.....	13
3.5 Técnica operatória.....	13
3.6 Exame histopatológico.....	14
3.7 Imunoistoquímica para pesquisa do CEA tecidual.....	14
3.8 Análise histopatológica das lâminas imunocoradas.....	16
3.9 Análise morfofuncional dos carcinomas.....	20
3.10 Análise estatística.....	21
4 RESULTADOS.....	22
5 DISCUSSÃO.....	35
5.1 Caracterização da casuística.....	35
5.2 Estadiamento.....	35
5.3 CEA sérico.....	35

5.4	CEA tecidual.....	38
5.5	Conteúdo tecidual do CEA.....	43
5.6	Considerações finais.....	46
6	CONCLUSÕES.....	48
7	ANEXOS.....	49
7.1	Dados individuais dos doentes com carcinoma colorretal.....	49
7.2	Documentos Éticos.....	54
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
	Abstract	
	Apêndice	
	Bibliografia consultada	

Lista de Figuras

- Figura 1-** Carcinoma do colo. Padrão de distribuição apical: imunorreação distribuída de forma homogênea e intensa no ápice glandular celular..... 16
- Figura 2-** Carcinoma do colo. Padrão de distribuição citoplasmático: imunorreação distribuída de forma homogênea no citoplasma celular.... 17
- Figura 3-** Carcinoma do colo. Células do carcinoma no estroma tumoral..... 17
- Figura 4-** Colo normal. Padrão de distribuição tênue no ápice glandular..... 18
- Figura 5-** Carcinoma do colo. Notar ausência de formação glandular..... 18
- Figura 6-** Carcinoma mucoprodutor do colo. Notar CEA na luz glandular (seta longa) e CEA disperso no citoplasma celular (seta curta)..... 19
- Figura 7-** Equipamento necessário para a realização da análise de imagem assistida por computador..... 19
- Figura 8-** Histograma de frequência e curva de normalidade da distribuição do conteúdo do CEA tecidual..... 30
- Figura 9-** Histograma de frequência e curva de normalidade da distribuição do conteúdo do CEA tecidual em carcinomas bem diferenciados..... 30
- Figura10-** Histograma de frequência e curva de normalidade da distribuição do conteúdo do CEA tecidual em carcinomas moderadamente diferenciados..... 31
- Figura 11-** Histograma de frequência e curva de distribuição do conteúdo do CEA tecidual em carcinomas indiferenciados..... 31

Lista de Tabelas e Quadro

Tabela 1-	Média de idade e sexo dos doentes com carcinoma colorretal.....	11
Tabela 2-	Freqüência quanto à cor, tabagismo, localização da lesão, tipo de operação realizada nos doentes com carcinoma colorretal.....	11
Tabela 3-	Estadiamento dos doentes com carcinoma colorretal.....	22
Tabela 4-	Comparação entre nível sérico pré-operatório do CEA em doentes fumantes e não fumantes com carcinoma colorretal.....	22
Tabela 5-	Relação entre o nível sérico pré-operatório do CEA e presença ou ausência de invasão angioneural no carcinoma colorretal.....	23
Tabela 6-	Nível sérico pré-operatório e conteúdo tecidual do CEA em doentes com carcinoma colorretal.....	23
Tabela 7-	Associação entre o nível sérico pré-operatório do CEA em diferentes classificações dos doentes com carcinoma colorretal.....	23
Tabela 8-	Comparação entre o nível sérico pré-operatório do CEA nos diferentes estádios do carcinoma colorretal.....	24
Tabela 9-	Comparação entre o nível do CEA sérico pré-operatório com distribuição citoplasmática do CEA tecidual em estágio A e B de Dukes de acordo com a localização do carcinoma colorretal.....	24
Tabela 10-	Variáveis determinantes do nível sérico pré-operatório do CEA no carcinoma colorretal.....	24

Tabela 11- Potência estatística das variáveis na predição do nível sérico do CEA no carcinoma colorretal.....	25
Tabela 12- Aspectos histopatológicos do carcinoma colorretal.....	25
Tabela 13- Comparação entre a intensidade de expressão e a localização do CEA tecidual no carcinoma colorretal.....	26
Tabela 14- Associação entre a distribuição estromal do CEA tecidual e nível sérico do CEA no carcinoma colorretal.....	26
Tabela 15- Comparação entre o nível sérico do CEA de acordo com a distribuição do CEA tecidual do carcinoma colorretal.....	26
Tabela 16- Relação entre o nível sérico do CEA de acordo com os tipos histopatológicos, graus de diferenciação celular e distribuição tecidual do CEA no carcinoma colorretal.....	27
Tabela 17- Relação entre o nível sérico do CEA e a capacidade celular de polarização do CEA no carcinoma colorretal.....	27
Quadro 1- Grau de diferenciação celular e capacidade celular de polarização do CEA.....	28
Tabela 18- Nível sérico do CEA de acordo com o estadiamento TNM, grau de diferenciação celular, capacidade celular de polarização do CEA no carcinoma colorretal.....	29
Tabela 19- Relação entre a capacidade celular de polarização do CEA e o comprometimento linfonodal no carcinoma colorretal.....	29
Tabela 20- Associação entre o conteúdo do CEA tecidual e variáveis morfológicas do carcinoma colorretal.....	32

Tabela 21- Comparação entre o conteúdo do CEA tecidual nos graus de diferenciação celular no carcinoma colorretal.....	32
Tabela 22- Comparação entre o conteúdo do CEA tecidual em graus de diferenciação celular quanto à capacidade celular de polarização do CEA no carcinoma colorretal.....	32
Tabela 23- Comparação entre o nível sérico de CEA nos diferentes agrupamentos morfofuncionais do carcinoma colorretal.....	33

Lista de Abreviaturas e Símbolos

%	Porcentagem
µm	Micrômetros
<i>bmp</i>	<i>"Bit-mapped"</i>
CEA	Antígeno Carcinoembrionário
DP	Desvio padrão
EP	Erro padrão
F	Fator de regressão
HE	Hematoxilina eosina
IC	Intervalo de confiança
KDa	Kilodalton
M	Mol
mM	Milimol
N	Número
ng/dl	Nanogramas por decilitros
°C	Graus Celcius
p	Probabilidade de erro
<i>PBS</i>	<i>"Phosphate Buffer Sodium"</i>
PC	<i>"Personal Computer"</i>
pH	Logaritmo decimal do inverso da atividade dos íons hidrogênio em uma solução
QL	Quimioluminescência
®	Marca registrada
R ²	Coefficiente de determinação de predição
RCUI	Retocolite Ulcerativa Idiopática
RGB	<i>"Red", "blue", "green"</i>
rs	Coefficiente de correlação de Spearman
x	Vezes

Resumo

Objetivo: Relacionar o nível sérico e o conteúdo tecidual do antígeno carcinoembrionário (CEA) no carcinoma colorretal, correlacionando-os aos aspectos morfológicos e ao estadiamento da neoplasia. **Método:** Operou-se 45 doentes com carcinoma colorretal extirpável. Determinou-se o nível sérico do CEA, a distribuição e o conteúdo do CEA por estudo imunoistoquímico e por análise de imagem assistida por computador. Classificou-se a imunocoloração de acordo com o padrão de distribuição tecidual, intensidade e capacidade celular de polarização do CEA. Os carcinomas colorretais foram agrupados segundo características morfofuncionais. Analisaram-se as seguintes variáveis: tabagismo, localização e dimensão da lesão colorretal primária, metástase à distância, invasão angioneural, infiltração parietal, comprometimento linfonodal, tipo histológico, grau de diferenciação celular, distribuição, conteúdo tecidual e capacidade celular de polarização do CEA. As lesões foram estadiadas pelas classificações de Dukes, Astler-Coller e TNM. **Resultados:** O nível sérico do CEA foi mais elevado nos carcinomas colorretais com invasão angiolinfática ($p=0,009$), na localização citoplasmática do antígeno ($p=0,02$), nos estádios avançados nas classificações TNM ($p=0,003$), de Dukes ($p=0,03$) e de Astler-Coller ($p=0,008$), com graus progressivos de perda morfofuncional ($p=0,04$) e da capacidade celular de polarização do CEA ($p=0,03$), nos diferentes graus de diferenciação celular quando relacionado ao padrão de distribuição celular do CEA ($p=0,05$) e à capacidade celular de polarização do CEA em carcinomas em estádios iniciais da classificação TNM ($p=0,01$). A combinação de múltiplas variáveis foi responsável pela elevação dos níveis séricos do CEA, em especial a dimensão da lesão primária, presença de metástase à distância e invasão angioneural ($p=0,0001$), enquanto nas lesões iniciais, a invasão angioneural e a perda da capacidade celular de polarização do antígeno foram os principais preditores dos níveis séricos do CEA ($p=0,003$). **Conclusões:** O conteúdo tecidual do CEA, quantificado por análise de imagem assistida por computador, relacionou-se ao nível sérico do antígeno, ao menor grau de diferenciação celular, e à perda da capacidade celular de polarização do CEA. O nível sérico do CEA elevou-se com a perda da característica morfofuncional, da capacidade celular de polarização do CEA e da diferenciação celular, com a maior dimensão, presença de invasão angioneural, distribuição citoplasmática do antígeno e com os estádios mais avançados das classificações TNM, Dukes e Astler-Coller no carcinoma colorretal.

1 INTRODUÇÃO

Um dos marcadores tumorais mais bem estudados em câncer é o antígeno carcinoembrionário (CEA). Descrito em 1965, é rotineiramente utilizado como marcador sérico do carcinoma gastrointestinal, em especial do carcinoma colorretal. O CEA é proteína da superfamília das imunoglobulinas cuja função principal é a promoção da adesão celular.^(1,2)

Devido à baixa especificidade, o CEA não é utilizado como teste diagnóstico, sendo atualmente aplicado na prática clínica no seguimento dos enfermos submetidos ao tratamento cirúrgico do carcinoma colorretal.^(3,4)

O potencial diagnóstico e prognóstico do CEA sérico tem motivado diversas indagações. Apesar do valor prognóstico das dosagens pré-operatórias ainda ser controverso, estudos mostraram associação entre níveis elevados do antígeno e prognóstico desfavorável.^(5,6,7)

Diversas questões permanecem ainda pouco esclarecidas em relação à função do CEA como antígeno associado de tumor e da capacidade do seu nível sérico ser indicador da presença de tumor. Cerca de 60 a 70 por cento de todos os pacientes com carcinoma colorretal apresentam níveis séricos elevados do CEA no pré-operatório. Níveis crescentes do marcador, após a extirpação da lesão, podem sugerir recidiva da neoplasia.^(8,9) Entretanto, existe percentual de carcinomas colorretais que produzem quantidades pouco expressivas do CEA, determinando níveis séricos baixos do antígeno, nos quais a possibilidade de detecção de doença avançada e de recorrência é pequena com esse recurso.⁽¹⁰⁾

Há contradições na correlação entre o nível sérico do CEA e a expressão do CEA no tumor revelado pela análise imunoistoquímica com anticorpos monoclonais anti-CEA e no prognóstico das lesões neoplásicas colorretais.^(11,12,13,14,15) A análise das características da expressão do CEA no tecido neoplásico vem sendo objeto de constante estudo.⁽¹⁴⁾ O emprego de técnicas imunoistoquímicas revelou que o antígeno pode ser expresso em diferentes localizações no tecido neoplásico.^(14,15)

Os achados resultantes da análise imunoistoquímica do CEA no tecido neoplásico e sua correlação com os valores do CEA sérico são objetos de pesquisas com a finalidade de encontrar a lógica da relação biológica entre o nível sérico do CEA e sua fonte tecidual de produção. A relação existente entre especialização celular, intensidade e padrão de expressão tecidual vêm fazendo com

que o CEA seja utilizado como marcador importante nos estudos que avaliam a diferenciação celular.⁽¹⁶⁾ A intensidade e a extensão da expressão tecidual são, entretanto, avaliadas de forma subjetiva e, portanto, estão sujeitas a variáveis decorrentes da experiência do patologista ou da técnica imunoistoquímica empregada.

A exata determinação do conteúdo tecidual do CEA levaria a compreensão de tais parâmetros, sua utilidade na predição evolutiva da doença, e melhoraria a capacidade de se estabelecer diagnóstico e prognóstico do carcinoma colorretal.

A aplicação da análise de imagem assistida por computador com a finalidade de avaliar o conteúdo do CEA tecidual, nas bases de dados pesquisadas, ainda não foi utilizada. A determinação deste conteúdo de forma objetiva melhoraria a compreensão da relação do antígeno sérico com a dinâmica tecidual.

1.1 Objetivo

Analisar a relação entre CEA sérico e o conteúdo do CEA tecidual, determinado por análise de imagem assistida por computador, correlacionando-os aos aspectos morfológicos e ao estadiamento do carcinoma colorretal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia

No Brasil, estimativas para o ano de 2005, apontavam o câncer colorretal como o 4º tumor maligno mais freqüente em ambos os sexos. A maior incidência ocorre na faixa etária entre 50 e 70 anos, mas a possibilidade de aparecimento da doença aumenta a partir dos 40 anos. A neoplasia colorretal é a 5ª causa de óbito no Brasil e a 3ª causa de óbito por câncer.⁽¹⁷⁾

Quanto à localização, ao retossigmoidoscópio rígido, os carcinomas situados a 16 centímetros ou menos da borda anal são considerados neoplasias do reto e perfazem 50 por cento de todos os adenocarcinomas do intestino grosso; 25 por cento deles situam-se no colo sigmóide e 25 por cento nos demais segmentos.⁽¹⁸⁾

2.2 Estadiamento

A primeira classificação descrita para sistematizar as operações em curativas e não curativas surgiu em 1926*, na Mayo Clinic. Em 1930, Dukes propôs classificação para o câncer retal que combina profundidade de invasão do carcinoma na parede retal e metástase linfonodal: estágio A, invasão até a túnica muscular própria, sem comprometimento linfonodal; estágio B, invasão além da túnica muscular própria, sem comprometimento linfonodal; estágio C, comprometimento linfonodal regional, independente da profundidade de invasão parietal.⁽¹⁹⁾

O próprio autor juntamente com Gabriel, revisando este sistema, propôs a subdivisão do grupo C em C1 e C2, conforme a ausência ou presença de comprometimento linfonodal do pólo vascular apical, respectivamente.⁽²⁰⁾ Em 1945, a classificação de Dukes foi estendida para o colo.⁽²¹⁾ Quase 10 anos depois, Astler e Collier propuseram nova modificação onde C1 representava o tumor que extrapolava a mucosa, limitado a parede intestinal, com comprometimento de linfonodo e C2, a neoplasia com linfonodo comprometido e invasão neoplásica que ultrapassava a gordura pericólica.⁽²²⁾

Em 1966, foi publicado o primeiro estadiamento TNM (Tumor, Linfonodo, Metástase) para o carcinoma colorretal.⁽²³⁾ O estadiamento TNM foi

* Rankin FW. Surgery of the colon. (1926) apud ⁽⁵⁷⁾.

baseado no nível de penetração da parede intestinal (T), no número e localização de linfonodos comprometidos (N), e na presença ou não de metástases à distância (M).

2.3 CEA sérico

O CEA é imunoglobulina presente em intestino de fetos normais até o 2º trimestre da gestação e em carcinomas de colo humano, daí sua denominação de antígeno carcinoembrionário.⁽¹⁾ A partir de técnicas de detecção apuradas, como o radioimunoensaio,⁽²⁴⁾ foi possível mensurá-lo na corrente sangüínea em fumantes,⁽²⁵⁾ moléstias inflamatórias intestinais,⁽²⁶⁾ cirrose hepática,⁽²⁷⁾ pancreatites,⁽²⁸⁾ e em tumores do pâncreas,⁽²⁹⁾ pulmão,^(30,31) mama^(32,33) e ovário.^(34,35) O CEA apresenta níveis mais elevados em doentes com neoplasias, especialmente as de origem endodérmica.^(24,29-37) As células da mucosa normal ou neoplásica do colo sintetizam constantemente o CEA que migra através do citoplasma e associa-se à membrana celular.⁽³⁸⁾

O antígeno é constituído por conjunto de peptídeos glicosados simples de 200 kDa de peso molecular cujos determinantes antigênicos situam-se na região protéica da molécula.⁽²⁹⁾ Seu principal componente é o carboidrato composto por frutose, manose, galactose, além da N-acetilglicosamina e ácido siálico.⁽³⁹⁾

A possibilidade de detecção do CEA no sangue, por meio de radioimunoensaio,⁽²⁴⁾ após sua determinação inicial em tecido, por técnica de imunodifusão,⁽¹⁾ permitiu que o antígeno passasse a ser utilizado de forma rotineira no acompanhamento de doentes portadores de carcinoma colorretal. Por apresentar baixa especificidade, já que pode estar elevado em diversas condições benignas⁽²⁵⁻²⁸⁾ ou em outros tumores que não os colorretais,⁽²⁹⁻³⁵⁾ o CEA não é empregado como método diagnóstico. Possui, entretanto, importante papel no acompanhamento dos enfermos com carcinoma colorretal extirpado, podendo, quando se eleva, ser indicador do surgimento de recidivas.⁽⁴⁰⁾ Apresenta baixa sensibilidade, uma vez que o limite sérico dentro da normalidade pode ocorrer em 14,4 a 56 por cento dos casos de carcinoma colorretal.⁽⁴¹⁻⁴³⁾ A técnica de imunoenzimoensaio,⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾ apesar de discretamente menos sensível que o radioimunoensaio,⁽²⁴⁾ é de uso mais rotineiro, por ser mais simples e de menor custo.

Apesar de não ter valor diagnóstico, o CEA deve ser dosado no pré-operatório.^(3,4,5,7,47) Diversos relatos na literatura destacam o valor prognóstico do CEA sérico.^(6,8,15,43,47-55) Sugeriu-se a relação do CEA como parâmetro prognóstico

independente do estádio,⁽⁵⁰⁾ em contraposição àqueles que mostraram a relação dos níveis séricos do CEA com estádios mais avançados da doença neoplásica colorretal.^(14,56)

Há na literatura relatos⁽⁴¹⁻⁴³⁾ onde o antígeno mantém-se com valores séricos normais, não obstante o nível sérico do CEA estar aumentado na maioria dos doentes com carcinoma colorretal. Acredita-se que o estádio clínico da doença poderia estar relacionado com os níveis séricos do CEA, pois à medida que a neoplasia invade a parede intestinal, o acesso do antígeno à corrente sanguínea encontra-se facilitado.^(54,55) A invasão linfática também parece desempenhar papel relevante como fator determinante dos níveis séricos do CEA.⁽⁵⁶⁾

Após a operação curativa do carcinoma colorretal, os níveis séricos do CEA, quando inicialmente elevados, retornam ao normal. As elevações plasmáticas do antígeno podem significar o aparecimento de células neoplásicas viáveis. Graças a esta propriedade, o CEA é utilizado na tentativa da detecção precoce das recidivas locais, regionais ou metastáticas.^(3,59)

2.4 CEA tecidual

A capacidade de disseminação à distância depende de mecanismos de adesão intercelular da célula neoplásica no carcinoma colorretal, especialmente ao endotélio vascular de outros tecidos.⁽⁶⁰⁾ O CEA provavelmente contribui para o processo de metastatização dos adenocarcinomas colorretais.⁽⁶¹⁾ Sua expressão pode ser avaliada diretamente nos tecidos, por meio de técnica imunoistoquímica.^(15,62-64)

O CEA é antígeno habitualmente encontrado na membrana citoplasmática das células normais e neoplásicas do intestino grosso. Também pode ser detectado no citosol das células blásticas com menor grau de maturidade celular. A diferença no conteúdo do CEA entre células normais e as neoplásicas da mucosa do colo parece ser mais quantitativa do que qualitativa, e sua mensuração pode sofrer variações dependendo da metodologia empregada.⁽⁶⁵⁾ Até o momento, a interpretação dos resultados consiste em descrições subjetivas ou semiquantitativas.⁽¹⁵⁾

Em 1980, estudou-se o CEA em 44 pacientes com adenocarcinoma de colo pela expressão imunoistoquímica e imunofluorescência indireta. Classificando a imunoexpressão em padrões luminal, linear e citoplasmático.⁽⁶⁶⁾

Baseado no estudo de 60 pacientes com adenocarcinoma de colo, em 1985, descreveu-se três padrões de distribuição celular do CEA: apical, citoplasmático e estromal, obedecendo ao critério de predominância na distribuição do antígeno.⁽¹⁵⁾

Na década seguinte, observando-se 80 casos de adenocarcinoma colorretal, classificou-se a distribuição em apical, citoplasmática e mista, respectivamente, tecidos com coloração predominantemente apical, neoplasias com imunoexpressão exclusivamente citoplasmática e os mistos, onde a imunoexpressão apical e citoplasmática era uniforme quanto à distribuição e intensidade.⁽⁶³⁾

Em 1995, estudando-se 49 carcinomas colorretais submucosos ressecados por intervenção cirúrgica ou endoscópica, classificou-se a expressão celular do CEA em tipo 1 ou luminal, tipo 2 ou apical-citoplasmático, e tipo 3 ou tipo citoplasmático difuso. Também foi observada a expressão estromal do CEA, aceita como característica do tecido neoplásico, não sendo por isso considerada como tipo específico na classificação destes autores.⁽⁶⁴⁾

Ao se analisar em 1999, 149 espécimes de carcinoma colorretal, propôs-se dois tipos de distribuição tecidual do CEA: apicoluminal, localizada ao longo do ápice e borda luminal, e citoplasmática, expressa difusamente no citoplasma e na membrana citoplasmática.⁽⁶²⁾ Esses autores consideraram a imunoexpressão do tipo estromal como manifestação da propriedade invasiva do tumor, idéia corroborada por Markova et al,⁽⁶⁷⁾ que acreditaram tratar-se de característica conceitual do carcinoma colorretal encontrada em 50 por cento dos casos avaliados por esses autores.

A detecção do CEA tecidual no carcinoma colorretal por estudo imunoistoquímico ocorre em aproximadamente 100 por cento das células tanto em tecidos previamente congelados como nos fixados em formol e inclusos em parafina.^(15,62-64,66-68)

As células epiteliais da mucosa do colo produtoras do CEA possuem características de epitélio colunar especializado, proteínas produzidas em seu interior têm orientação de direção polarizada no sentido apicolateral da célula. Da mesma forma, a orientação do CEA obedece à polarização celular. Essa característica das células que compõe a mucosa do intestino grosso é mantida pela constante movimentação compartimentada do CEA produzido nas porções basais das células que migram progressivamente para o pólo apical e, a partir daí, o antígeno é eliminado para o interior do lume intestinal.⁽⁶⁹⁾ A face celular voltada para a luz intestinal

apresenta especializações ou microvilosidades relacionadas aos fenômenos de absorção e excreção, próprios da mucosa cólica.⁽⁷⁰⁾ Estudos *in vitro* mostraram que quando se promove o bloqueio na polarização das células da mucosa cólica em meio de cultura pobre em cálcio, ocorre acúmulo intracelular e citoplasmático do CEA.⁽⁷¹⁾

As células da mucosa cólica vão migrando do interior das criptas mucosas para o ápice das vilosidades à medida que vão se especializando, tornam-se mais diferenciadas quando comparadas às células localizadas no interior das criptas, na zona de epitélio proliferativo.⁽⁷²⁾ No epitélio cólico normal observa-se acúmulo progressivo do CEA no interior do citoplasma de células com menor grau de diferenciação, sugerindo que a incapacidade de polarização do antígeno possa estar relacionada ao menor grau de diferenciação e especialização celular.^(68,73)

A maior quantidade do CEA no citoplasma celular e no estroma tecidual do carcinoma colorretal e a inversão da polaridade com perda da excreção do CEA^(69,70,73) parecem facilitar o acesso do antígeno à circulação sistêmica, através de sua passagem aos vasos venosos e plexo linfático da submucosa do intestino grosso, elevando os valores do CEA sérico.^(15,68) Estudando-se 49 doentes com carcinoma colorretal, nos quais a neoplasia invadia a túnica submucosa da parede intestinal, verificou-se que o comprometimento linfonodal ocorreu em 11,6 por cento dos tumores com padrão de distribuição citoplasmático e em 16,7 por cento com distribuição estromal.⁽⁶⁴⁾

Em 1997, foi relatado que a expressão difusa do CEA tecidual indicava a invasão angiolinfática pela neoplasia.⁽⁷⁴⁾ Em concordância com estes autores, relacionou-se a expressão apical aos valores do CEA sérico menores que 10,0ng/dl e a expressão citoplasmática a valores maiores.⁽⁷⁵⁾ O padrão apical de distribuição tecidual do CEA estudado por método imunistoquímico em doentes com câncer colorretal foi relacionado com níveis baixos do CEA sérico quando comparado aos padrões de distribuição citoplasmática e estromal.^(69,77) Demonstrou-se valor inferior a 10,0ng/dl para padrão apical e, em doentes com padrão citoplasmático de distribuição do CEA, média maior que 10,0ng/dl,^(14,15) resultados semelhantes aos obtidos por outros autores.^(75,76)

Há estudo que não conseguiu estabelecer correlação entre o nível sérico do CEA pré-operatório e a intensidade de imunoexpressão do antígeno,⁽⁵⁹⁾ enquanto autores demonstraram que o padrão de distribuição tecidual do CEA e os níveis séricos nos doentes com carcinoma colorretal podem estar relacionados com o

grau de diferenciação celular do tumor.⁽¹⁵⁾ Segundo esse estudo, a maioria dos doentes com tumores bem diferenciados e com padrão de distribuição do tipo apical exibiram níveis baixos do CEA sérico. Por outro lado, portadores de tumores moderadamente diferenciados ou indiferenciados com padrão de distribuição citoplasmático apresentaram níveis séricos elevados. Tumores bem diferenciados com intensidade de expressão moderada a intensa, mas com padrão de distribuição do tipo apical, podem apresentar níveis baixos do CEA sérico, pois embora o antígeno esteja presente no tecido, a maior parte dele é eliminada para o lume intestinal.⁽⁶⁸⁾ Autores referiram que a presença de imunexpressão do CEA tecidual apresenta relação com o grau de diferenciação tumoral.^(15,68,74) Outros demonstraram que mesmo com expressão do CEA tecidual em 100 por cento dos casos de neoplasia de colo, não houve correlação com o estágio e com o grau de diferenciação celular.^(59,66)

Ao se estudar o tecido colorretal quanto à expressão imunistoquímica do CEA, observou-se que ocorreu positividade em 9,1 por cento de células normais, 37,5 por cento em pólipos intestinais, 41,2 por cento em portadores de RCUI e na totalidade dos doentes com adenocarcinoma. Salientou-se que a positividade da reação mostrou graus diferentes de expressão e localizações celulares distintas, concluindo que a localização intracelular está relacionada com o grau de atipia celular.⁽⁷⁷⁾

Demonstrou-se, em estudo *in vitro*, que a matriz dos adenocarcinomas colorretais são originárias nas células LISP-I e que suas subpopulações, LISP-A10 e LISP-E11, possuem características diferentes, epitelial e fibroblástica, respectivamente. As células LISP-A10 são produtoras de moléculas de adesividade intercelular, como o CEA e a desmogleina, enquanto tumores originados na população celular LISP-E11 produzirão de maneira incipiente o CEA, aproximando-se do padrão indiferenciado do adenocarcinoma colorretal.⁽¹⁰⁾

Há ainda controvérsias quanto ao valor da dosagem tecidual do CEA.⁽⁷⁸⁾ Autores sustentaram que a determinação do CEA no tumor, por melhorar a interpretação dos níveis séricos, pode ser útil para o acompanhamento do carcinoma do intestino grosso.⁽⁷⁹⁾ Por outro lado, outros demonstraram que não há diferença prognóstica entre doentes com concentrações elevadas ou normais do CEA nos tecidos neoplásicos.⁽⁸⁰⁾

2.5 Análise de imagem assistida por computador

Em 1992 foi apresentado em nosso meio método computadorizado que permite a avaliação quantitativa de estruturas microscópicas.⁽⁸¹⁾ Autores se beneficiaram, como era o objetivo inicial do idealizador do método, quanto à pesquisa mais rápida e objetiva.^(82,89)

Baseado na análise de imagem assistida por computador foram estudados a cicatrização das anastomoses intestinais,⁽⁸²⁻⁸⁵⁾ a superfície isquêmica de mucosa gástrica em cães submetidos à vagotomia,^(86,88) a utilização de anel biofragmentável em comparação a sutura manual em anastomose colo-cólica,⁽⁸⁷⁾ e a neovascularização da córnea de ratos.⁽⁸⁹⁾

Programas de análise computadorizada foram desenvolvidos por empresas específicas e atualmente estão disponíveis comercialmente, tal como o utilizado nesse estudo*.

A primeira tentativa de se aferir o conteúdo do CEA tecidual por método associado a computador é atribuída a Schmid et al em 1989. Os autores acoplaram citofotômetro ao PC, determinando de forma semiquantitativa, os intervalos de positividade e intensidade da imunocoloração no adenocarcinoma colorretal.⁽⁹⁰⁾

* ImageLab for Windows 3.x

3 MÉTODOS

3.1 Adequação do projeto

A realização do estudo obedeceu todas as etapas previstas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco, da Universidade Federal de São Paulo e as exigências do Conselho de Ética em Pesquisa da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde (Resolução CNS196/96). Está registrado no CEP da Universidade Federal de São Paulo sob o número 0420/06 (Anexo2)

Todos os doentes selecionados para o presente estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido padronizado pela Universidade São Francisco e receberam, antes da coleta dos dados, todos os esclarecimentos em relação ao objetivo e a metodologia empregada durante o estudo.

3.2 Casuística

No período de 2001 a 2004 foram estudados 45 doentes com adenocarcinoma colorretal. Foram excluídos enfermos com menos de 18 anos e os que apresentaram neoplasia colorretal não extirpável durante o estadiamento pré-operatório ou na avaliação intra-operatória, pacientes com metástase hepáticas múltiplas não extirpáveis no intra-operatório e aqueles com margens microscópicas comprometidas na avaliação histopatológica. Pacientes portadores de co-morbidades como moléstias inflamatórias intestinais, cirrose hepática, pancreatite e/ou outros tumores epiteliais primários (pâncreas, pulmão, mama, ovário) que poderiam elevar os níveis séricos de CEA, pacientes que tivessem sido submetidos a tratamento neo-adjuvante ou apresentassem número de linfonodos ressecados menor que 12, foram excluídos.

A coleta dos dados foi realizada nas dependências do Hospital Universitário (enfermaria de clínica cirúrgica e centro cirúrgico), no laboratório de análises clínicas e no laboratório de anatomia patológica.

A média de idade foi de 62,4 anos (tabela 1). A amostra foi constituída por 84,4 por cento de doentes brancos, 6,7 por cento de pardos, 4,4 por cento de amarelos e 4,4 por cento de pretos (tabela 2).

Em relação ao tabagismo, 18 (34,0 por cento) doentes eram fumantes, sendo orientados a suspender o hábito na primeira consulta. Dos 18

fumantes iniciais, nove (50,0 por cento) mantiveram-se como tabagistas mesmo após o diagnóstico de carcinoma colorretal (tabela 2).

Tabela 1- Média de idade e sexo dos doentes com carcinoma colorretal

Sexo	Idade			
	N	%	Média de Idade	IC (95%)
Feminino	20	44,4	64,7	59,4 – 69,9
Masculino	25	55,6	58,7	53,3 – 64,1
Total	45	100	62,4	53,3 – 69,9

Estatística descritiva; N= número de doentes; %= porcentagem; IC= intervalo de confiança

Tabela 2- Frequência quanto à cor, tabagismo, localização da lesão, tipo de operação realizada nos doentes com carcinoma colorretal

Variáveis	Características	N	%	
Cor	Branco	38	84,4	
	Amarelo	2	4,4	
	Preto	2	4,4	
	Pardo	3	6,7	
Tabagismo	Sim	9	17	
	Não	27	66	
	Ex-fumante	9	17	
Localização	Reto	alto	4	8,9
		médio	2	4,4
		baixo	11	24,2
	Sigmóide	5	22,2	
	Retossigmóide	10	11,1	
	Ascendente	7	15,6	
	Outros	6	13,3	
Operação	Retossigmoidectomia anterior	13	28,9	
	Amputação de reto	10	22,2	
	Colectomia direita	9	20	
	Colectomia esquerda	4	8,9	
	Ressecção a Hartmann	5	11,1	
	Outros	4	8,9	
	Não	29	64,4	

Tabela de Frequência; N= número de doentes; %= porcentagem

Dezesseis pacientes (35,6 por cento) foram atendidos na urgência sendo sete casos de suboclusão intestinal, cinco de oclusão intestinal e quatro de perfuração do colo, enquanto 29 (64,4 por cento) foram atendidos de forma eletiva. Houve necessidade de operação em dois tempos em 10 pacientes, devido à ausência de preparo do colo e más condições gerais do doente para proceder à lavagem “*on-table*”, e em três tempos, em um doente (2,2 por cento) com oclusão intestinal e insuficiência renal aguda, que apresentou infarto agudo do miocárdio entre a 1ª e a 2ª operação.

Quanto à localização, as lesões foram predominantemente no reto e no sigmóide (71,0 por cento). Ocorreram no reto em 17 casos, na transição retossigmoideana em 10, e no sigmóide em cinco enfermos. As demais localizações da neoplasia estão relacionadas na tabela 2.

A operação mais freqüentemente executada foi a retossigmoidectomia anterior em 13 casos, seguida da amputação de reto em 10, colectomia direita em nove, ressecção a Hartmann em cinco, colectomia esquerda em quatro, esvaziamento pélvico posterior em três e, um caso de tumor avançado com crescimento exclusivamente loco-regional onde houve necessidade de esvaziamento pélvico total (tabela 2).

3.3 Estadiamento pré-operatório

Os enfermos selecionados para o estudo foram submetidos ao estadiamento clínico, laboratorial e por exames de imagem segundo o protocolo de conduta do Grupo de Coloproctologia da Disciplina de Cirurgia Geral da Universidade São Francisco.⁽⁹¹⁾

O estadiamento foi feito com base no exame clínico e proctológico completos, determinação do nível sérico do CEA, colonoscopia com biópsia e estudo histopatológico, enema opaco, radiografia do tórax, tomografia computadorizada de tórax e abdômen e/ou ultra-sonografia abdominal.

Para a coleta do CEA sérico, todos os enfermos foram submetidos à punção da veia cefálica do membro superior não dominante. As amostras de sangue foram encaminhadas de forma imediata para mensuração do nível do CEA sérico pela técnica de quimioluminescência, imediatamente antes da cirurgia de ressecção. O resultado foi expresso em nanogramas por mililitro (ng/ml).

Os valores do CEA sérico adotados como padrão normal determinados pela técnica de quimioluminescência são os seguintes: homens fumantes até 6,2ng/ml, homens não fumantes até 3,4ng/ml, mulheres fumantes até 4,9ng/ml, e mulheres não fumantes até 2,5ng/ml.

Após o processamento do resultado, a cópia dos valores foi arquivada em prontuário eletrônico informatizado individual para cada enfermo.

3.4 Preparo pré-operatório

Os doentes operados de forma eletiva foram submetidos ao preparo mecânico e biológico do intestino grosso. Na véspera da operação foi permitida dieta líquida sem resíduos e, 12 horas antes do procedimento o doente permaneceu em jejum.

O preparo mecânico foi feito com laxante osmótico (manitol* 20 por cento) diluído em suco de laranja e ingerido em intervalos de 10 minutos até que se completasse a ingestão de 1 litro da solução, associado a enteroclistas com fosfato sódico,** quantos fossem necessários até o clareamento completo do líquido de excreção intestinal.

A redução do conteúdo bacteriano colorretal deu-se por meio de metronidazol*** em três doses de 400mg a cada 8 horas, iniciadas 24 horas antes do procedimento operatório.

3.5 Técnica operatória

Os doentes foram submetidos à anestesia geral a critério do Serviço de Anestesiologia. Depois de alcançar plano anestésico adequado, o acesso à cavidade abdominal foi realizado através de celiotomia mediana que se estendeu de acordo com a necessidade de acesso adequado a cada doente. A parede abdominal foi aberta por planos e as bordas da incisão protegidas pela fixação de compressas cirúrgicas.

Em seguida, realizou-se inventário da cavidade abdominal com o intuito de se confirmar a ressecabilidade do tumor e identificar metástases intra-

* ® Áster Produtos Médicos – Sorocaba - Brasil

** ® Fleet-enema - Whitehall

*** ® Aventis Pharma

cavitárias. Os doentes que apresentaram doença metastática no fígado foram submetidos à biópsia local para posterior confirmação histopatológica.

As ressecções seguiram o padrão das cirurgias oncológicas com dissecação da veia de drenagem seguida da ligadura da artéria correspondente à lesão antes da manipulação da neoplasia. A ligadura arterial distal ficou marcada com fio longo. A extensão necessária foi determinada pela necessidade de ablação dos linfonodos extramurais, os quais acompanham os vasos cólicos nos seguimentos acometidos.

3.6 Exame histopatológico

Para a realização do estudo histopatológico todos os espécimes cirúrgicos, previamente fixados em solução de formalina a 10 por cento, foram incluídos em blocos de parafina. Três cortes de 4 μ m foram obtidos de cada bloco na periferia do tumor, para obtenção de áreas com e sem tumor, sendo corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) para diagnóstico anatomopatológico. A verificação de comprometimento neoplásico dos linfonodos ressecados foi avaliada por meio de cortes corados por HE. Apenas os carcinomas mucinosos e usuais (não mucoprodutores) foram incluídos neste estudo.

Os carcinomas foram classificados em vegetante, infiltrativo, ulcerado ou nas suas combinações de acordo com a característica macroscópica. Sua dimensão foi avaliada a partir de seu maior eixo.

A invasão da parede foi avaliada de acordo com a profundidade do comprometimento da muscular, da serosa ou tecido adiposo adjacente.

A invasão angioneural foi considerada presente ao se evidenciar o comprometimento vascular, quer venoso quer linfático, e/ou invasão neural.

Quanto ao grau de diferenciação os carcinomas foram classificados em bem diferenciados, Grau 1 (G1); moderadamente diferenciados, Grau 2 (G2); ou indiferenciados, Grau 3 (G3), considerando a extensão da aparência glandular dos carcinomas.

3.7 Imunoistoquímica para pesquisa do CEA tecidual

Para a realização do estudo imunoistoquímico todos os espécimes previamente fixados em formol e incluídos em blocos de parafina foram submetidos a

dois cortes adicionais de 4µm depositados em lâminas previamente salinizadas. As lâminas foram desparafinadas por três banhos sucessivos de 5 minutos em xilol e três banhos em etanol absoluto. A seguir, foram acondicionadas em recipiente próprio e submersas em solução tampão fosfato de sódio (*PBS*) 0,05M e pH 7,2 por 10 minutos. Foi realizado bloqueio das peroxidases endógenas pelo gotejamento de peróxido de hidrogênio 30 volumes a três por cento, em câmara úmida à temperatura ambiente durante 10 minutos, seguido de mais uma lavagem com *PBS* por 10 minutos. Terminada esta etapa, realizou-se recuperação antigênica. As lâminas foram acondicionadas em cuba com solução de citrato 10mM, pH 6,0 e submetidas ao calor em banho-maria à temperatura de 35°C por período de 40 minutos e, ao final deste processo, deixadas esfriar por 20 minutos em temperatura ambiente, sendo realizada lavagem com *PBS* por 5 minutos. As lâminas foram coradas por meio da técnica imunoistoquímica com anticorpo monoclonal anti-CEA*.

Utilizou-se o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (ABC) adaptado às condições laboratoriais. As lâminas foram incubadas com anticorpo específico anti-CEA diluído em albumina bovina** durante 16 a 18 horas a 4°C. Em seguida, foram lavadas em tampão *PBS*, com três trocas de três a cinco minutos e incubadas com anticorpo secundário biotilado (anti-IG)*** diluído em albumina bovina durante 30 minutos à temperatura ambiente. Seguiram-se as etapas: lavagem em tampão *PBS* com três trocas de 5 minutos cada; incubação com o complexo ABC**** diluído em tampão Tris, durante 30 minutos à temperatura ambiente; lavagem em tampão *PBS* com três trocas de três a cinco minutos cada; revelação com solução de diaminobenzidina (DAB)***** 0,6 por cento, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,06 por cento. As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada, e contra-coradas com hematoxilina de Harris por um minuto, e novamente lavadas em água corrente e água destilada.

O processo final de desidratação das lâminas obedeceu às seguintes passagens: etanol 80 por cento, etanol 90 por cento, etanol absoluto, xilol 1, xilol 2, xilol 3. Após o processo de imunocoloração, as lâminas foram montadas com lamínula e resina.

* ® Dako Cytomation. Monoclonal Rabbit Carcinoembrionic Antigen. Clone II-7. Código A-115.

** ® Sigma

*** ® Dako

**** ® StretABC-HRP

***** ®Sigma

3.8 Análise histopatológica das lâminas imunocoradas

A análise microscópica das lâminas foi realizada com o auxílio de microscópio óptico comum, com lente objetiva de 100x e magnificação final de 400x.

A leitura de todas as lâminas foi sempre realizada de modo conjunto por dois patologistas experimentados na interpretação imunoistoquímica que desconheciam os resultados da avaliação anatomopatológica. Controles positivo e negativo foram adotados para garantir a qualidade das lâminas.

A reação foi considerada positiva quando a expressão ocorreu de modo difuso, com distribuição homogênea.

Classificou-se a imunocoloração de acordo com o padrão de distribuição tecidual, intensidade de imunorreação e capacidade celular de polarização do CEA:

1. Quanto à distribuição tecidual do CEA, o padrão foi classificado em apical ou citoplasmático (figuras 1 e 2). A distribuição estromal (figura 3) foi considerada como manifestação da propriedade invasiva do tumor.

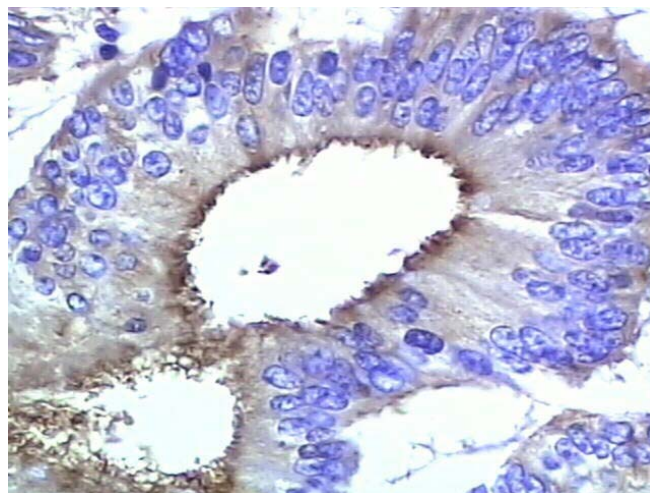


Figura 1- Carcinoma do colo. Padrão de distribuição apical: imunorreação distribuída de forma homogênea e intensa no ápice glandular celular. (Imunoistoquímica anti-CEA, 400x)



Figura 2- Carcinoma do colo. Padrão de distribuição citoplasmático: imunorreação distribuída de forma homogênea no citoplasma celular. (Imunoistoquímica anti-CEA, 400x)

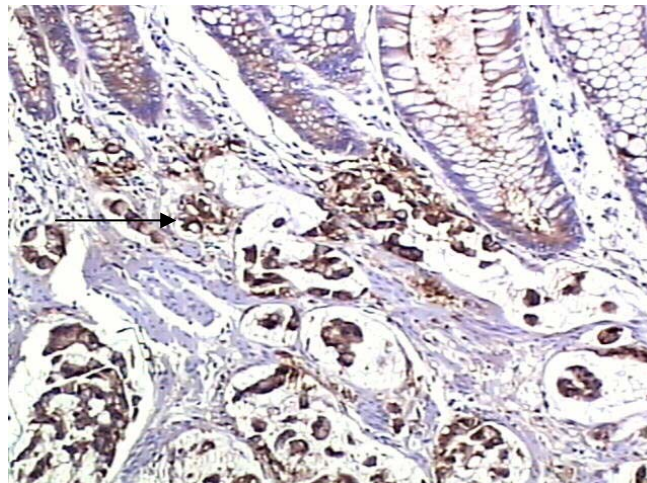


Figura 3- Carcinoma do colo. Células do carcinoma no estroma tumoral (seta). (Imunoistoquímica anti-CEA, 100x)

2. A intensidade de expressão do CEA nas áreas neoplásicas foi semiquantificada em cada área de diferenciação tumoral em leve (+/+++), moderada (++/+++) e intensa (+++/+++). Áreas de diferentes graus de diferenciação celular foram avaliadas em varredura, sempre que presentes nas lâminas.

3. Quanto à capacidade celular de polarização do CEA, comparou-se o distanciamento do padrão de polarização celular do CEA na célula normal (figura 4). Considerou-se como bem polarizadas (G1IH) as neoplasias com

predominância de distribuição apical do CEA tecidual (figura 1); como moderadamente polarizadas (G2IH), as lesões com padrão de distribuição predominantemente citoplasmático (figura 2); e como pouco polarizadas (G3IH), aquelas que apresentavam distribuição celular cordonal, em virtude da impossibilidade de diferenciar-se o pólo apical do pólo basal celular (figura 5), ou as neoplasias com grande quantidade de muco e do CEA na luz glandular que, à histologia convencional, representariam o padrão mucinoso do carcinoma colorretal devido ao distanciamento das características de produção das células mucinosas com as células epiteliais cólicas (figura 6).



Figura 4- Colo normal. Padrão de distribuição tênue no ápice glandular. (Imunoistoquímica anti-CEA. 400X)

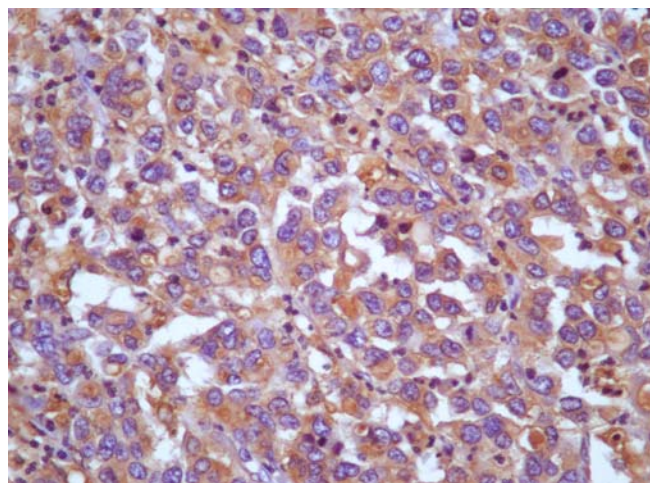


Figura 5- Carcinoma do colo. Notar ausência de formação glandular. (Imunoistoquímica anti-CEA, 400x)

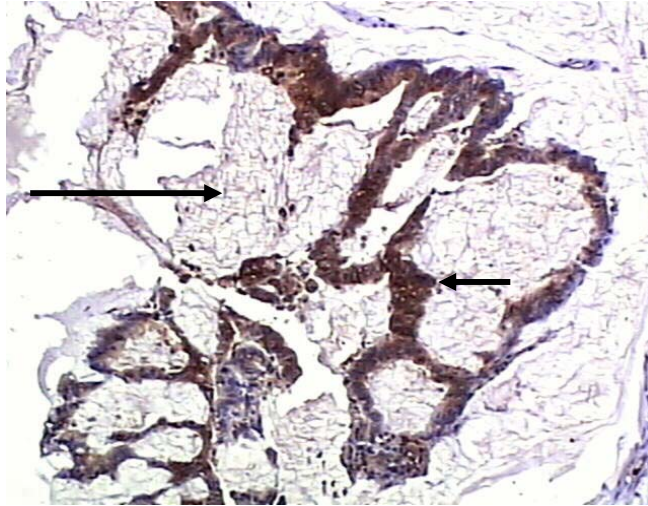


Figura 6- Carcinoma mucoprodutor do colo. Notar CEA na luz glandular (seta longa) e CEA disperso no citoplasma celular (seta curta). (Imunoistoquímica anti-CEA, 100x)

O método de análise de imagem auxiliado por computador foi descrito detalhadamente em estudo anterior.^(81,83)

O sistema de captação de imagem foi composto por câmera *Digital Color*,* acoplada a microscópio,** ligado a monitor*** e ao computador**** (figura 6).



Figura 7- Equipamento necessário para a realização da análise de imagem assistida por computador

* Samsung SCC 131^A

** Nikon, aphoto-2 YS2

*** Dell, 15 polegadas

**** Dell Dimension 2100, Celeron, plataforma Windons XP

O processamento da imagem foi formado por níveis de cores e tonalidades distintas, permitindo a visibilização de estruturas.

A imagem da lâmina observada no monitor foi focalizada e em seguida captada por programa de aquisição de imagem. As imagens foram gravadas em arquivo *bmp*, em disco flexível, para programa específico de análise.^{****} A mensuração foi executada com aumento de 100X em área representativa da neoplasia. Foi adotada a medida de subtração RGB (*Red, Green, Blue*), e o valor da quantificação da análise computadorizada foi o da média obtida por três medidas da mesma lâmina.

Ao selecionar determinada estrutura tecidual, no caso a imunocoloração do CEA, apenas ela foi observada de modo colorido, realçando estruturas da imagem pela imunocoloração específica. O programa associou tabela de cores aos valores numéricos dos pontos que compunham a imagem. Somente a estrutura composta pelos números resultantes da combinação *RGB* que o usuário selecionou apareceu colorida na tela do monitor, deixando escuro todo o restante da tela.

Usou-se filtro da média para reduzir rapidamente os ruídos eletrônicos, minimizando o contraste nas bordas da imagem para atenuar as distorções geradas por processo de digitalização e produzidas por interferências elétricas diversas. O cálculo da média foi feito pela convolução de máscara de 3x3, onde o *pixel* central da máscara foi substituído pelo da média desse, com seus oito vizinhos.

O programa analisou a imagem, permitindo ao usuário tomar conhecimento dos valores correspondentes a densidade óptica e da quantidade de imunocoloração do CEA no tecido selecionado.

3.9 Análise morfofuncional dos carcinomas

Supondo-se características semelhantes dos carcinomas colorretais determinantes do conteúdo do CEA tecidual, quanto à capacidade de produção e excreção do antígeno, agruparam-se os carcinomas colorretais em três padrões morfofuncionais de acordo com as seguintes características:

Grupo 1: carcinomas bem diferenciados e bem polarizados (G1G1IH) e os moderadamente diferenciados e bem polarizados (G2G1IH), ou seja, carcinomas que apresentam baixo conteúdo tecidual de CEA;

**** ImageLab for Windows 3.x.

Grupo 2: carcinomas moderadamente diferenciados e moderadamente polarizados (G2G2IH) e os bem diferenciados e moderadamente polarizados (G1G2IH), sendo o conteúdo tecidual do CEA moderado;

Grupo 3: carcinomas moderadamente diferenciados e mucoprodutores pouco polarizados (G2G3IH) e carcinomas indiferenciados pouco polarizados (G3G3IH) que apresentam grande conteúdo de CEA tecidual.

3.10 Análise estatística

A análise dos resultados obtidos foi realizada adotando-se nível de significância de 5 por cento ($p \leq 0,05$), ou quando possível de 1 por cento ($p \leq 0,01$), mediante os seguintes modelos:

- Estatística descritiva;
- Medidas de tendência central;
- Teste de normalidade;
- Teste de igualdade das médias (*t* de Student);
- Teste de igualdade de medianas (Mann-Whitney);
- Análise de variância;
- Testes de associação (correlação de Pearson e Spearman);
- Teste de regressão (linear múltipla, R^2 , Stepwise).

Os resultados foram analisados de acordo com as seguintes variáveis: sexo; idade; nível do CEA pré-operatório; tamanho e localização do tumor; tipo histológico; grau de diferenciação celular; estadiamentos de Dukes, Astler-Coller e TNM; invasão angioneural, intensidade e distribuição da imunoexpressão, capacidade celular de polarização e conteúdo do CEA.

Para a análise dos dados obtidos utilizaram-se os programas estatísticos SigmaStat for Windows (versão 1.0) e SPSS for Windows (versão 13.0).

4 RESULTADOS

Os resultados são apresentados sob a forma de tabelas e quadros, de acordo com a ordem de aparecimento na discussão. Dados individuais estão disponibilizados no Anexo1.

Tabela 3- Estadiamento dos doentes com carcinoma colorretal

Classificação	Estadiamento		
	Estádio	N	%
Dukes	A	4	8,9
	B	27	60
	C	14	31,1
Astler-Coller	A	0	0
	B1	7	15,6
	B2	24	53,3
	C1	4	8,9
	C2	10	22,3
TNM	I	0	0
	II	31	68,9
	III	10	22,3
	IV	4	8,9

Tabela de Frequência; N= número de doentes %= percentagem

Tabela 4- Comparação entre nível sérico pré-operatório do CEA em doentes fumantes e não fumantes com carcinoma colorretal

Tabagismo	CEA sérico (ng/dl)						
	CEA normal				CEA elevado		
	N	Média	DP	p	N	Mediana	p
Não fumante	19	1,32	1,01	0,12	16	18,5	0,28
Fumante	6	2,1	1,09		4	10	
Correlação	CEA sérico			rs= 0,083	p=0,59		
	Estádio (TNM)			rs=-0,068	p=0,656		

Teste "t" Student; Teste de Mann-Whitney; Correlação de Spearman

N= número de doentes; DP= desvio padrão; p= probabilidade de erro; rs= coeficiente de correlação de Spearman

Tabela 5- Relação entre o nível sérico pré-operatório do CEA e presença ou ausência de invasão angioneural no carcinoma colorretal

Invasão angioneural	CEA sérico (ng/dl)		
	N	Media	p
Ausente	30	19,38	0,009*
Presente	15	30,23	
Correlação	rs=0,994		0,007*

Teste de Mann-Whitney

N= número de doentes; p= probabilidade de erro; *= significativa

Tabela 6- Nível sérico pré-operatório e conteúdo tecidual do CEA em doentes com carcinoma colorretal

Local	CEA				
	N	Mínimo	Máximo	Média	DP
Tecidual	45	99,25	146,92	125,47	11,33
Sérico (ng/dl)	45	<0,1	106	12,82	23,23

Estatística descritiva

N= número de doentes; DP= desvio padrão

Tabela 7- Associação entre o nível sérico pré-operatório do CEA em diferentes classificações dos doentes com carcinoma colorretal

Classificação	CEA sérico	
	rs	p
Dukes	0,361	0,01*
Astler-Coller	0,450	0,002**
TNM	0,446	0,002**

Correlação de Spearman

rs= coeficiente de correlação de Spearman; p= probabilidade de erro; *= significativa; *p<0,05; **p<0,01

Tabela 8- Comparação entre o nível sérico pré-operatório do CEA nos diferentes estádios do carcinoma colorretal

Classificação	Estádio	CEA sérico (ng/dl)			
		N	Média	Mediana	p
Dukes	A	4	4,25	3,25	0,03*
	B*	27	7,09	2,10	
	C*	14	26,32	11,95	
Astler-Coller	A	0	0	0	0,008*
	B*	31	6,72	2,10	
	C*	14	26,32	11,95	
TNM	I	0	-	-	0,003*
	II*	31	6,72	2,10	
	III	10	8,18	5,05	
	IV*	4	71,68	79,70	

Teste de Mann-Whitney; Student-Newman-Kels

N= número de doentes; p=probabilidade de erro; *= significativa

Tabela 9- Comparação entre o nível do CEA sérico pré-operatório com distribuição citoplasmática do CEA tecidual em estágio A e B de Dukes de acordo com a localização do carcinoma colorretal

Localização	CEA sérico(ng/dl) em Dukes A e B com distribuição citoplasmática			
	N	Média	Mediana	p
Reto baixo	9	16,55	16,55	0,27
Outras	1	6,69	1,40	

Teste de Mann-Whitney

N= número de doentes; p= probabilidade de erro

Tabela 10- Variáveis determinantes do nível sérico pré-operatório do CEA no carcinoma colorretal

Estádio	Tipo histológico	Modelo	CEA sérico (ng/dl)		
			Variáveis preditivas	R ²	p
Qualquer TNM	Todos	1	A/B/C/D/E/F/G/H/I/J	0,889	0,0001*
Estádio I e II	Todos	2	A/B/C/D/H/I/J	0,653	0,05*
Estádio I e II	Exceto mucoprodutor	3	A/B/C/D/H/I/J	0,727	0,05*

Teste de regressão linear múltipla

p= probabilidade de erro; R²= coeficiente de determinação de predição; *= significativa

A- Conteúdo do CEA tecidual; B- Capacidade celular de polarização do CEA; C- Grau de diferenciação celular; D- Infiltração na parede; E- Comprometimento linfonodal; F- Presença de metástase; G- Estádio (TNM); H- Invasão angioneural; I- Dimensão da lesão; J- Tabagismo

Tabela 11- Potência estatística das variáveis na predição do nível sérico do CEA no carcinoma colorretal

Estádio	Tipo histológico	Modelo	CEA sérico (ng/dl)		
			Variável	F	p
Qualquer TNM	Todos	1	Grau diferenciação	49,02	0,001*
			Metástase (TNM)	76,54	
			Dimensão	45,02	
Estádio I e II	Todos	2	Invasão angioneural	7,01	0,003*
			Polarização do CEA	7	
Estádio I e II	Exceto mucoprodutor	3	Polarização do CEA	6,17	0,02*

Testes de regressão de Stepwise

F = fator de regressão; p= probabilidade de erro; *= significativa

Tabela 12- Aspectos histopatológicos do carcinoma colorretal

	Classificação	N	%
Carcinomas	Não-mucoprodutores	41	91,1
	Mucoprodutores	4	8,9
Grau de diferenciação celular	G1	12	26,7
	G2	32	71,1
	G3	1	2,2
Capacidade celular de polarização do CEA	G1IH	23	51,1
	G2IH	18	40
	G3IH	4	8,9
Profundidade de infiltração na parede intestinal	Muscular	8	17,8
	Subserosa	8	17,8
	Serosa	7	15,6
	Adiposo	22	48,9
Invasão angioneural	Ausente	30	66,7
	Presente	15	33,3
Comprometimento linfonodal	Proximal	9	20
	Regional	5	11,1
Metástase hepática	Ausente	41	91,1
	Presente	4	8,9

Tabela de Frequência

N= número de doentes; %= porcentagem

Tabela 13- Comparação entre a intensidade de expressão e a localização do CEA tecidual no carcinoma colorretal

Distribuição do CEA tecidual	Intensidade de expressão do CEA tecidual					p
	N	+	++	+++	Média	
Apical	22	4	6	12	2,36	0,0001*
Citoplasmático	63	30	26	7	1,63	

Teste Mann-Whitney

N=número de áreas examinadas; p= probabilidade de erro;*= significativa

Tabela 14- Associação entre a distribuição estromal do CEA tecidual e nível sérico do CEA no carcinoma colorretal

Distribuição do CEA tecidual	CEA sérico (ng/dl)	
	rs	p
Estromal	0,085	0,574

Correlação de Spearman

rs= Coeficiente de correlação de Spearman; p= probabilidade de erro

Tabela 15- Comparação entre o nível sérico do CEA de acordo com a distribuição tecidual do CEA no carcinoma colorretal

Distribuição CEA tecidual	CEA sérico (ng/dl)				p
	N	Média	Mediana	DP	
Apical	28	8,48	2,05	3,66	0,02*
Citoplasmático	17	19,97	11,40	6,70	

Teste de Mann-Whitney

N=número de doentes; DP= desvio padrão; p= probabilidade de erro;*= significativa

Tabela 16- Relação entre o nível sérico do CEA de acordo com os tipos histopatológicos, graus de diferenciação celular e distribuição tecidual do CEA no carcinoma colorretal

		CEA sérico (ng/dl)						
Tipo histopatológico	Distribuição do CEA tecidual	Grau diferenciação celular						p
		Bem diferenciado		Moderadamente diferenciado		Indiferenciado		
		Média	Mediana	Média	Mediana	Média	Mediana	
Todos	Apical	6,82	2,70	9,40	2,00	0,09
	Citoplasmático	35,40	35,40	16,20	5,90	41,90	41,90	
Exceto mucoprodutores e indiferenciados	Apical	6,82	2,70	4,07**	1,90	0,05*
	Citoplasmático	35,40	35,40	17,42**	5,00	

Teste de Mann Whitney; Kruskal-Wallis, Student-Newman-Kels

p= probabilidade de erro; *= significante; **p= 0,03

Tabela 17- Relação entre o nível sérico do CEA e a capacidade celular de polarização do CEA no carcinoma colorretal

Capacidade celular de polarização do CEA	CEA sérico (ng/dl)		
	N	Média	p
G1IH	23	18,85	0,03*
G2IH	18	26,50	
G3IH	4	31,13	
Correlação	rs=0,342		p= 0,02*

Teste das medianas; Correlação de Spearman;

N= número de doentes; p= probabilidade de erro; rs= coeficiente de Spearman; *= significante

Quadro 1- Grau de diferenciação celular e capacidade celular de polarização do CEA

Caso	Grau de diferenciação celular	Polarização celular do CEA
1	Moderadamente	Bem*
2	Bem	Bem
3	Moderadamente	Bem*
4	Moderadamente	Bem*
5	Moderadamente	Bem*
6	Bem	Bem
7	Moderadamente	Bem*
8	Moderadamente	Moderadamente
9	Moderadamente	Moderadamente
10	Moderadamente	Moderadamente
11	Bem	Moderadamente*
12	Moderadamente	Bem*
13	Bem	Moderadamente*
14	Moderadamente	Moderadamente
15	Bem	Moderadamente*
16	Moderadamente	Bem*
17	Moderadamente	Bem*
18	Moderadamente	Bem*
19	Bem	Bem
20	Moderadamente	Pouco*
21	Bem	Moderadamente*
22	Moderadamente	Bem*
23	Moderadamente	Bem*
24	Bem	Bem
25	Moderadamente	Moderadamente
26	Bem	Moderadamente*
27	Moderadamente	Bem*
28	Moderadamente	Moderadamente
29	Moderadamente	Moderadamente
30	Moderadamente	Moderadamente
31	Moderadamente	Pouco*
32	Bem	Moderadamente*
33	Moderadamente	Moderadamente
34	Moderadamente	Moderadamente
35	Pouco	Pouco
36	Moderadamente	Bem*
37	Moderadamente	Pouco*
38	Moderadamente	Bem*
39	Moderadamente	Bem*
40	Moderadamente	Moderadamente
41	Bem	Bem
42	Moderadamente	Bem*
43	Bem	Bem
44	Bem	Bem
45	Moderadamente	Moderadamente

* Discordância de avaliação quanto ao grau histológico e capacidade celular de polarização

Tabela 18- Nível sérico do CEA de acordo com o estadiamento TNM, grau de diferenciação celular, capacidade celular de polarização do CEA no carcinoma colorretal

Estádio	Grau de diferenciação celular	CEA sérico (ng/dl)				p
		Capacidade celular de polarização do CEA	N	Média	Mediana	
Qualquer estágio	Bem	G1IH	6	5,55	2,35	0,26
		G2IH	6	17,62	10,55	
	Moderadamente	G1IH	17	9,72	2,10	
		G2IH	12	14,53	5,50	
	Indiferenciado	G3IH	3	18,77	25,90	
		G3IH	1	41,9	41,9	
Estádios I e II	Bem	G1IH	4	1,40	1,05	0,01*
		G2IH	3	30,7	21,30	
	Moderadamente	G1IH	14	3,79	1,85	
		G2IH	8	8,51	9,25	
	Indiferenciado	G3IH	1	30,30	30,30	
		G3IH	1	41,90	41,90	

Teste Kruskal-Wallis

N= número; p= probabilidade de erro; *= significante

Tabela 19- Relação entre a capacidade celular de polarização do CEA e o comprometimento linfonodal no carcinoma colorretal

Capacidade celular de polarização do CEA	Linfonodos			p
	N0	N1	N2	
G1IH	19	4	0	0,03*
G2IH	9	5	4	
G3IH	3	0	1	
Correlação	rs=0,298			p= 0,04*

Análise de Variância; Teste das medianas; Correlação de Spearman;

N= número de doentes; p= probabilidade de erro; rs= coeficiente de Spearman; *= significante

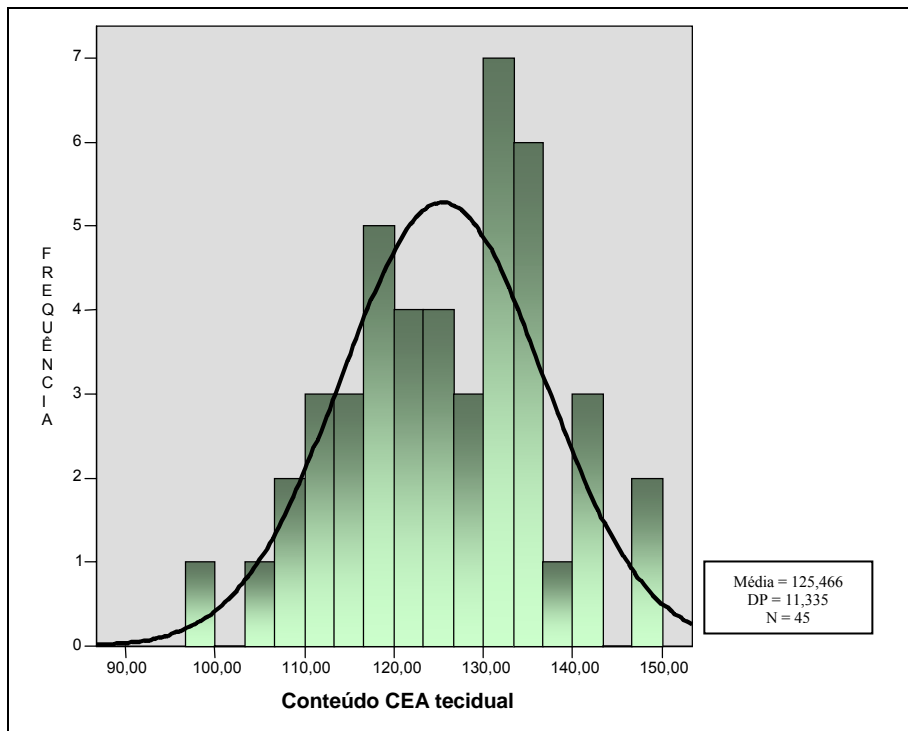


Figura 8- Histograma de frequência e curva de normalidade da distribuição do conteúdo do CEA tecidual

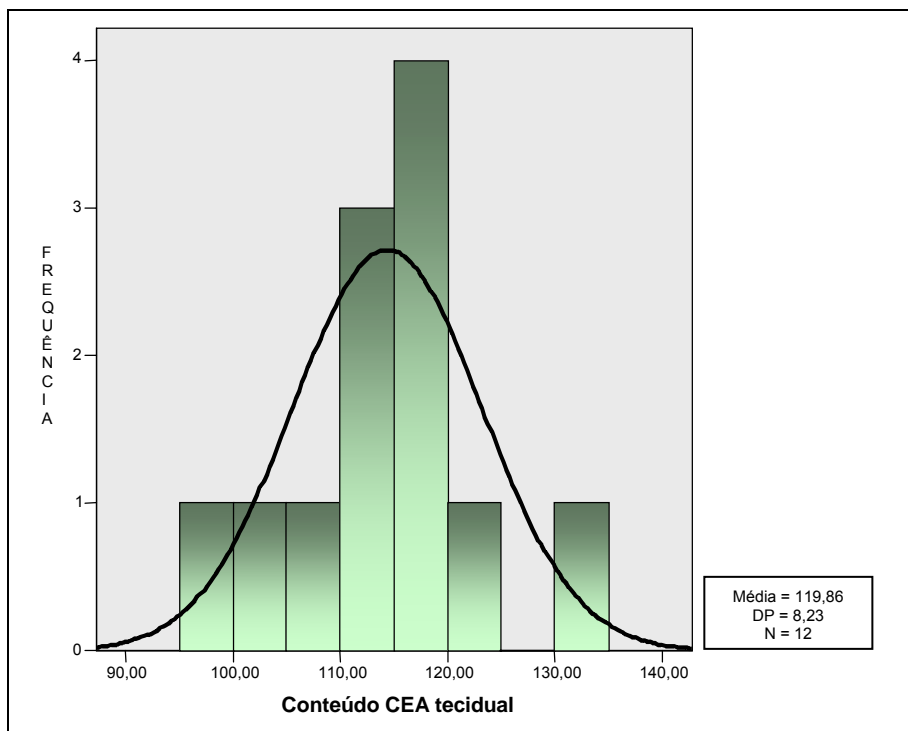


Figura 9- Histograma de frequência e curva de normalidade da distribuição do conteúdo do CEA tecidual em carcinomas bem diferenciados

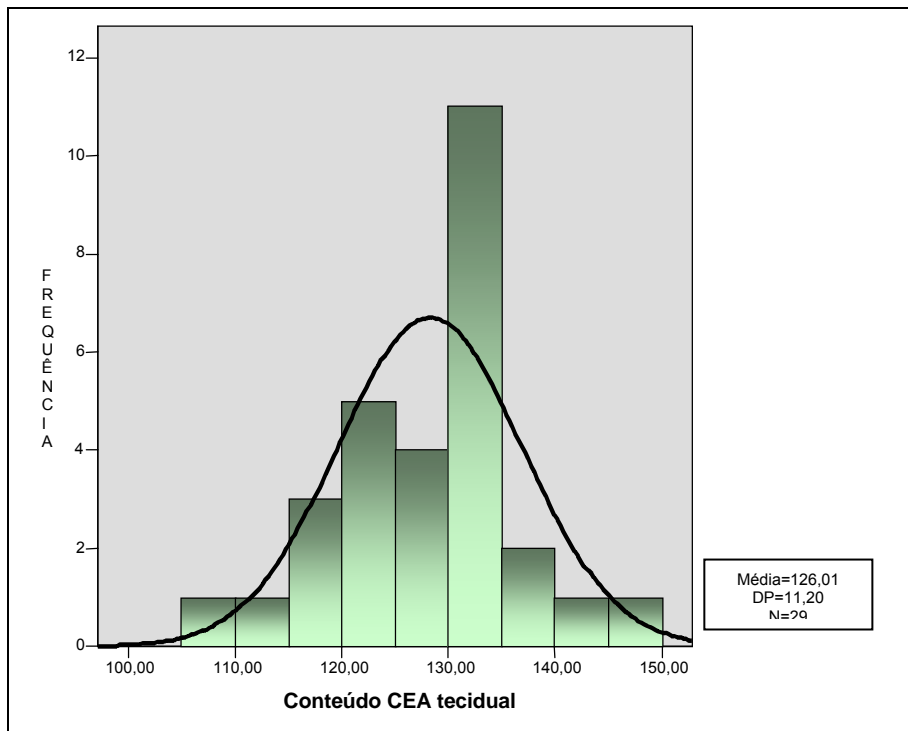


Figura 10- Histograma de frequência e curva de normalidade da distribuição do conteúdo do CEA tecidual em carcinomas moderadamente diferenciados

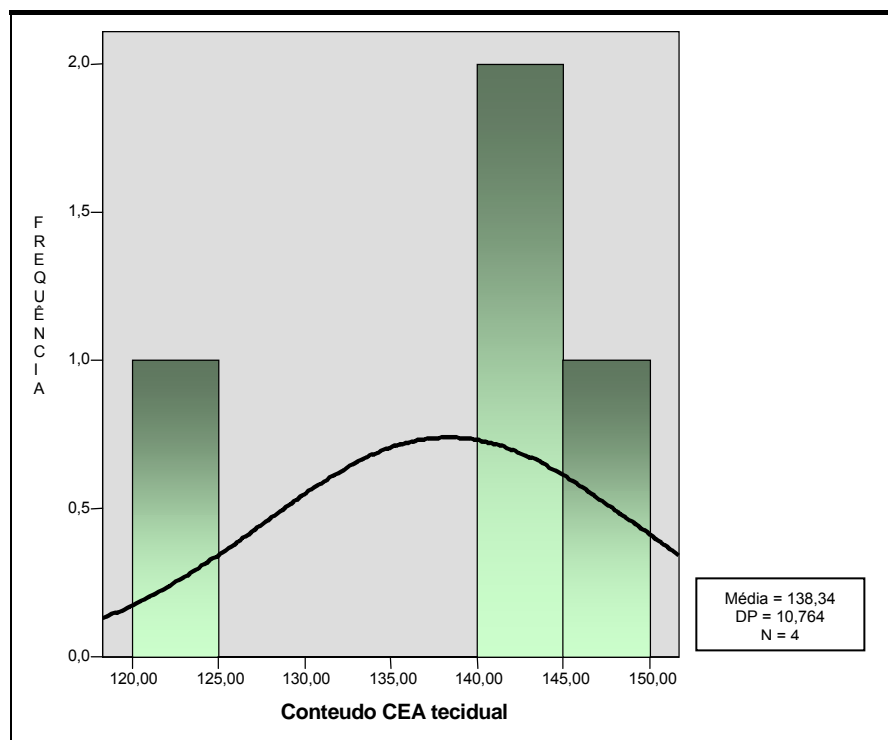


Figura 11- Histograma de frequência e curva de distribuição do conteúdo do CEA tecidual em carcinomas indiferenciados

Tabela 20- Associação entre o conteúdo do CEA tecidual e variáveis morfológicas do carcinoma colorretal

Variáveis morfológicas	CEA tecidual	
	r/rs	p
Invasão da parede	-0,149	0,330
Dimensão	-0,253	0,094
Invasão angioneural	0,03	0,847
Comprometimento linfonodal	-0,157	0,305
TNM	0,160	0,294
Astler-Coller	-0,129	0,4
Dukes	-0,143	0,348

Correlação de Spearman; Correlação de Pearson

rs= coeficiente de correlação de Spearman; r= coeficiente de Pearson; p= probabilidade de erro

Tabela 21- Comparação entre o conteúdo do CEA tecidual nos graus de diferenciação celular no carcinoma colorretal

Grau de diferenciação celular	CEA tecidual					p
	N	Mínimo	Máximo	Média	DP	
Bem diferenciado*	12	99,25	132,23	119,86	8,23	0,01*
Moderadamente diferenciado*	29	107,22	146,75	126,01	11,20	
Indiferenciado ou mucinoso*	4	122,68	146,92	138,34	10,76	
Correlação		rs=0,420			p=0,004*	

Análise de Variância; Teste de Student-Newman-Kels; Kolmogorov-Smirnov

N= número de doentes; DP= desvio padrão; p= probabilidade de erro; *= significante

Tabela 22- Comparação entre o conteúdo do CEA tecidual em graus de diferenciação celular quanto à capacidade celular de polarização do CEA no carcinoma colorretal

Grau de diferenciação celular	CEA tecidual (média)			p
	G1IH	G2IH	G3IH	
Bem diferenciado*	115,2	130,5	...	0,0002*
Moderadamente diferenciado*	113,2	125,5	137,6	
Indiferenciado ou mucinoso*	140,5	

Análise de Variância; Teste das medianas

p= probabilidade de erro; *= significante

Tabela 23- Comparação entre o nível sérico de CEA nos diferentes agrupamentos morfofuncionais do carcinoma colorretal

Grupos morfofuncionais	CEA sérico(ng/dl)		
	n	média	p
Grupo 1	23	8,64	0,04*
Grupo 2	18	15,56	
Grupo 3	4	24,55	
Correlação	rs=0,341		p=0,02*

Análise de variância; Teste das medianas

p= probabilidade de erro; *= significativa

Com o objetivo de facilitar a interpretação dos quadros e tabelas descreveu-se, de maneira resumida, os resultados obtidos:

1. O nível sérico do CEA foi significativamente mais elevado nos carcinomas colorretais com invasão angiolinfática (tabela 5), na localização citoplasmática do antígeno (tabela 15), nos estádios avançados nas classificações TNM, de Dukes e de Astler-Coller (tabela 8), com perda da capacidade celular de polarização do CEA (tabela 17), nos diferentes graus de diferenciação celular, quando relacionados aos padrões de distribuição tecidual do CEA, excluindo-se o carcinoma mucoprodutor e indiferenciado (tabela 16) e, nos diferentes graus de diferenciação celular relacionados à capacidade celular de polarização do CEA em carcinomas em estádios iniciais da classificação TNM (tabela 18).
2. Nos carcinomas Dukes A e B com distribuição citoplasmática do CEA tecidual situados no reto baixo, o nível sérico pré-operatório do CEA não foi significativamente mais elevado em relação às demais localizações (tabela 9). O nível sérico pré-operatório do CEA não apresentou relação com a presença do CEA no estroma tecidual (tabela 14).
3. A combinação de fatores: conteúdo tecidual do CEA, capacidade celular de polarização do CEA, grau de diferenciação celular, profundidade de infiltração do carcinoma na parede colorretal, comprometimento linfonodal, angioneural, dimensão de tecido produtor do CEA (lesão primária), presença de metástase, tabagismo e estádio da classificação TNM foram responsáveis pela elevação dos níveis séricos do CEA (tabela 10). A dimensão da lesão primária, a

presença de metástase e a invasão angioneural foram os principais determinantes da elevação do nível sérico do CEA (tabela 11).

4. Nos carcinomas em estágio inicial ($T_1N_0M_0$) os principais preditores dos níveis séricos do CEA foram capacidade celular de polarização do CEA e invasão angioneural. Excluindo-se as neoplasias mucoprodutoras, o fator determinante foi a perda da capacidade celular de polarização do antígeno (tabela 11). Outros fatores, tais como grau de diferenciação celular, conteúdo tecidual do CEA, dimensão da massa tumoral primária, invasão angioneural, profundidade de infiltração na parede cólica e tabagismo, relacionaram-se aos níveis séricos de CEA (tabela 10, modelos 2 e 3).
5. A perda da capacidade celular de polarização do antígeno relacionou-se com o nível sérico do CEA (tabela 17) com diferença significativa nos graus de diferenciação celular em carcinomas $T_1N_0M_0$ (tabela 18) e com diferentes níveis de comprometimento linfonodal (tabela 19).
6. As neoplasias indiferenciadas apresentaram conteúdo tecidual do CEA significativamente maior que os carcinomas bem e moderadamente diferenciados (figuras 9, 10 e 11, tabela 21). A intensidade da expressão do CEA tecidual na distribuição apical foi significativamente maior do que na distribuição citoplasmática (tabela 13).
7. O conteúdo do CEA tecidual não se associou, isoladamente, com a invasão da parede, dimensão do tumor, invasão angioneural, comprometimento linfonodal, ou com os diferentes estádios das classificações TNM, Dukes e Astler-Coller (tabela 20).
8. O conteúdo do CEA associou-se significativamente com o grau de diferenciação celular (tabela 21). Há diferenças no conteúdo do CEA tecidual ao se diferenciar a capacidade celular de polarização do CEA em relação ao grau de diferenciação celular (tabela 22).
9. Carcinomas com características morfofuncionais distintas quanto ao grau de diferenciação celular e capacidade celular de polarização do CEA apresentam diferenças quanto aos níveis séricos do CEA (tabela 23).

5 DISCUSSÃO

No Brasil, o carcinoma colorretal representa a terceira causa mais freqüente de óbito relacionada ao câncer. Sua incidência vem aumentando em comparação às demais neoplasias que envolvem o aparelho digestório.⁽¹⁷⁾

O prognóstico da doença encontra-se diretamente relacionado ao reconhecimento precoce de variáveis que possam identificar a recidiva da enfermidade. A presença de células viáveis na corrente sanguínea ou linfática é condição indispensável para a disseminação da doença. Desta forma, o CEA presente na maior parte das células do carcinoma colorretal, quando se encontra elevado na corrente sanguínea pode sinalizar a disseminação da doença. Portanto, o conhecimento da fonte de produção tecidual do CEA e sua relação com seu nível sérico são aspectos importantes para a melhor compreensão do comportamento biológico do carcinoma colorretal.

5.1 Caracterização da casuística

Na literatura mundial a prevalência do carcinoma do reto é de aproximadamente 50 por cento em relação às demais localizações da neoplasia no intestino grosso.⁽¹⁸⁾ Na presente casuística observou-se que a neoplasia apresentava-se distalmente à transição retossigmoideana em 70 por cento dos doentes. Tal diferença quanto à incidência justifica-se pelo fato do presente estudo ter sido realizado em hospital de referência regional para o tratamento dos carcinomas retais.

5.2 Estadiamento

Os sistemas de estadiamento do carcinoma colorretal baseiam-se em informações referentes à extensão da doença e são importantes para o planejamento terapêutico, resultados obtidos com os tratamentos e para o prognóstico. O estadiamento dos carcinomas na presente série deu-se conforme as classificações de Dukes,⁽¹⁹⁾ Astler-Coller⁽²²⁾ e TNM⁽²³⁾ (tabela 3).

5.3 CEA sérico

O nível sérico do CEA no carcinoma colorretal está freqüentemente aumentado. Entretanto, autores descreveram níveis normais entre 14,4 a 56 por cento

nesses doentes.⁽⁴¹⁻⁴³⁾ Na atual casuística, 44,4 por cento dos casos apresentaram CEA sérico elevado no pré-operatório e, em 55,6 por cento os níveis do CEA estavam dentro dos valores normais. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Tate.⁽⁴²⁾

Entre os fumantes (N=9), apenas quatro apresentaram nível do CEA aumentado, e dos 36 enfermos não fumantes por ocasião da ressecção, o CEA sérico pré-operatório estava normal em 19, não existindo diferença significativa entre os doentes não fumantes ou fumantes quando comparados aos níveis normais ($p=0,12$) ou aumentados ($p=0,277$) do CEA sérico (tabela 4). Esse achado é discordante do resultado apresentado por autores, que sugerem que o tabagismo, isoladamente, aumenta o nível sérico do CEA.⁽²⁵⁾

Quanto à influência da invasão angioneural nos níveis do CEA sérico pré-operatório, os achados do presente estudo foram semelhantes aos de Sunouchi et al.⁽⁵⁸⁾ A invasão angioneural desempenhou papel relevante como fator determinante dos níveis séricos do CEA à medida que vasos sanguíneos mais calibrosos e nervos encontram-se invadidos pela neoplasia. Houve diferença significativa ($p=0,009$) entre os valores séricos do CEA nos doentes com invasão angioneural comparados aos que não a apresentaram (tabela 5).

A questão da relação dos níveis séricos do CEA pré-operatórios com o estágio do carcinoma colorretal permanece polêmica. Na atual casuística, o nível sérico do CEA variou entre menos de 0,1ng/dl em doente em estágio inicial até 106,0ng/dl em enfermo portador de metástase hepática (tabela 6). Autores sustentaram a relação prognóstica dos níveis séricos elevados do CEA no pré-operatório,^(6,8,9,15,43,48-55) enquanto outros discutiram esta afirmativa.^(14,56,80) Estudo que compreendeu 945 doentes, referiu que a relação prognóstica com o CEA era independente do estágio de Dukes,⁽⁵⁰⁾ contrastando com outros achados, que à análise de 770 casos, observaram essa relação apenas naqueles com estágio C de Astler-Coller, ou seja, em estágios avançados da doença.⁽⁵⁶⁾ Provavelmente tal associação não é independente do estágio da neoplasia, uma vez que o nível do CEA sérico é marcadamente determinado pelas dimensões do tumor primário e das lesões metastáticas que representam, na realidade, a massa produtora do antígeno. Além disso, nas neoplasias em estágio avançado, a infiltração em planos profundos permite o acesso do antígeno à circulação angiolinfática e sua distribuição sistêmica, o que também foi sugerido por outros autores.^(14,57,58) Verificou-se que valores mais elevados do CEA sérico foram encontrados em estágio mais avançado da classificação de Dukes.⁽¹⁴⁾ A presente

casuística demonstrou a associação entre as classificações de Dukes, TNM e Astler-Coller e os níveis séricos do CEA (tabela 7). Os doentes com neoplasia classificada como estágio A de Dukes apresentaram valor médio do CEA sérico de 4,25ng/dl e os enfermos em estágio B e C de Dukes apresentaram, em média, valores de 7,09ng/dl e 26,32ng/dl, respectivamente. Quando se compararam os carcinomas em estágio B e C de Dukes, B e C de Astler-Coller e II e IV do TNM, os valores do CEA sérico apresentaram diferença significativa (tabela 8). A comparação entre o nível pré-operatório do CEA no estadiamento TNM foi mais significativa ($p=0,003$) quando comparado às classificações de Dukes ($p=0,03$) e Astler-Coller ($p=0,008$). Tal fato pode ser atribuído a classificação de Dukes e Astler-Coller não considerarem a presença de metástases, não propiciando a avaliação da massa tumoral produtora do CEA na sua totalidade.

A localização da neoplasia determina o território de drenagem venosa e linfática e poderia resultar em níveis do CEA sérico diferentes, maiores ou menores, de acordo com sua passagem ou não pela filtração hepática.^(58,92,94) Nas neoplasias cólicas e do reto alto e médio a drenagem venosa passa necessariamente, pelo fígado, enquanto que nas lesões do reto baixo, a drenagem do efluente venoso atinge a circulação sistêmica por meio da veia cava inferior, o que poderia traduzir níveis séricos do CEA mais elevados. Assim, quando analisamos tumores em diferentes localizações torna-se desejável considerar-se carcinomas em estágio, grau de diferenciação celular, distribuição e intensidade de expressão do CEA tecidual iguais, para atribuir à localização da neoplasia o eventual fator causal independente dos níveis séricos do CEA. Ao se comparar os carcinomas com distribuição citoplasmática do CEA, dicotomizados em localizados ou não no reto baixo e nos estádios A e B de Dukes, não se observou significância ($p=0,27$), embora o valor médio do CEA sérico tenha se apresentado elevado no reto baixo (tabela 9), sugerindo a influência da localização da lesão nos níveis séricos do marcador. No presente estudo, não foi possível avaliar os carcinomas com o mesmo grau de diferenciação celular e intensidade de imunoexpressão, devido ao número limitado de casos assim caracterizados.

Ao considerarmos diversas variáveis, tais como conteúdo do CEA tecidual, capacidade celular de polarização do CEA, grau de diferenciação celular, estágio da doença pela classificação TNM, dimensão da lesão primária, invasão angioneural, infiltração na parede cólica, comprometimento linfonodal, presença ou não

de metástases à distância e tabagismo conseguiu-se demonstrar relação causal em cerca de 89 por cento dos casos dos carcinomas colorretais (tabela 10, modelo 1). Realizando-se a pesquisa de Stepwise*, notou-se que a propriedade de predizer a elevação do nível sérico do CEA foi atribuída particularmente à presença de metástase à distância, ao grau de diferenciação celular e à dimensão da lesão primária (tabela 11).

Da mesma forma, demonstrou-se a relação causal entre os níveis séricos do CEA nos carcinomas restritos à parede do intestino grosso (tabela 10, modelo 2 e 3). As neoplasias sem massa extracólica produtora do CEA ($T_{1-4}N_0M_0$) apresentam como os principais preditores no nível sérico do CEA a capacidade celular de polarização do CEA e a invasão angioneural ($p=0,003$). Enquanto nos carcinomas não mucoprodutores, nas lesões restritas à parede colorretal, verificou-se que a determinação do CEA sérico relacionou-se ($p=0,02$) com a capacidade celular de polarização do CEA (tabela 11).

Os tumores mucoprodutores foram excluídos devido à origem monoclonal das neoplasias que encerra subpopulações celulares com características próprias, linhagens diferentes e comportamentos biológicos distintos. Os carcinomas podem ter linhagens de origem glandular epitelial ou calciforme, por exemplo, garantindo a cada uma delas, respectivamente, maior ou menor capacidade de produção ou de excreção das proteínas produzidas, tal como o CEA. Assim, não se deveriam considerar tais carcinomas como grupo único, possibilitando a análise enviesada do seu comportamento biológico.

5.4 CEA tecidual

Autores sugeriram correlações entre a expressão imunoistoquímica, sua distribuição tecidual e a diferenciação celular dos carcinomas colorretais.^(62-64,66) No presente estudo, ao se analisar o grau de diferenciação dos tumores colorretais pela técnica convencional, ou seja, por meio da análise da área de diferenciação celular prevalente na lâmina corada pela HE, obteve-se 12 neoplasias bem diferenciadas, 32 moderadamente diferenciadas e um caso de carcinoma indiferenciado. Os resultados

*Teste de regressão Stepwise: Teste estatístico de regressão que, a partir da retirada de variáveis, por meio de modelos matemáticos, irá determinar qual das variáveis envolvidas apresenta maior valor na determinação da variável analisada.

histopatológicos dos espécimes estudados estão apresentados na tabela 12. Essa avaliação foi realizada por dois patologistas que não informaram os dados obtidos aos patologistas que executaram a leitura da imunocoloração.

Sugeriu-se que a pesquisa rotineira do padrão de expressão tecidual do CEA por método imunoistoquímico permitiria aumentar a eficiência da mensuração sanguínea do CEA como fator prognóstico nos doentes com adenocarcinoma colorretal.⁽⁷⁵⁾ No presente estudo, identificou-se a imunoexpressão do CEA em todos os espécimes, no tecido colorretal neoplásico e normal (figura 4), apesar da descrição de diferentes índices de identificação do CEA em tecido congelado ou fixado em formol, com cifras que variam entre 60 a 100 por cento de imunocoloração das células neoplásicas.^(62-66,70) Tais diferenças nas porcentagens de imunoexpressão das células neoplásicas e de tecido normal podem ocorrer devido as diferentes metodologias empregadas para a coloração, ao anticorpo empregado e/ou ao fato dos resultados, freqüentemente, consistirem em descrições simples e semiquantitativas.^(15,62-66)

Há diferentes descrições quanto à classificação do padrão de distribuição tecidual do CEA.^(15,62-64,66) Na presente série classificou-se o padrão de distribuição tecidual em apical ou citoplasmático e a intensidade de expressão do antígeno em leve, moderada ou intensa.

A intensidade de expressão nas áreas neoplásicas foi determinada de forma subjetiva nas diferentes regiões de diferenciação celular em cada lâmina (tabela 13). Houve diferença significativa ($p=0,0001$) entre os tumores com expressão apical ou citoplasmática do CEA e a intensidade de imunocoloração semiquantificada. Nas diferentes áreas de diferenciação celular com padrão apical, quatro delas mostraram fraca intensidade de expressão e, em seis houve expressão moderada. O predomínio da expressão intensa ocorreu em 12 áreas das 22 examinadas. Nos doentes com padrão citoplasmático, em 63 áreas examinadas, 30 delas mostraram imunocoloração de intensidade fraca, sete exibiram intensidade forte, e 26 apresentaram intensidade moderada. Esse achado sugere que, embora exista maior quantidade do CEA sendo produzido ou acumulado no interior do citoplasma, o antígeno apresenta-se mais disperso no padrão citoplasmático quando comparado ao padrão apical.

Quanto à distribuição do CEA, constatou-se que no tecido colorretal normal, o antígeno apresentou-se na região apical ou no lume glandular (figura 4). Houve semelhança com o padrão apical de distribuição do CEA nas células

neoplásicas, exceto pela localização mais restrita à membrana apical da célula e pela quantidade de imunocoloração (figura 1). A distribuição citoplasmática do antígeno apresentou-se sob a forma difusa e homogênea no citosol celular (figura 2).

Considerou-se que a distribuição estromal (figura 3) é manifestação da propriedade invasiva do tumor, tratando-se de característica conceitual do carcinoma.^(62,64,67) No carcinoma invasivo existe o rompimento da membrana basal, e dessa forma, se a área onde é demonstrada a ruptura fosse imunocorada, poderia ocorrer distribuição do antígeno no estroma ou em células que estariam infiltrando a membrana basal. No presente estudo foi observada a imunocoloração estromal em 80 por cento (36/45) dos espécimes independentemente de se tratar de padrão apical ou citoplasmático de distribuição do CEA celular. Nos 20 por cento (9/45) dos casos onde não se observou a distribuição estromal do CEA tecidual é provável que o rompimento da membrana basal tenha ocorrido em outros cortes do mesmo material, caracterizando o aspecto invasivo do carcinoma. Neste estudo, não houve correlação significativa entre a presença de imunocoloração estromal e os níveis do CEA sérico (tabela 14), diferentemente dos achados de outros autores que adotaram a imunocoloração estromal como um tipo específico de padrão do CEA tecidual.^(15,64,68,74,75) A detecção do antígeno no estroma tecidual parece traduzir a ruptura da membrana basal e não necessariamente a disseminação do carcinoma.

Autores sugeriram classificar a imunocoloração em padrões apical, citoplasmático e misto, relacionando a expressão apical a valores do CEA sérico menores que 10ng/dl e a expressão citoplasmática a valores maiores.⁽⁷⁵⁾ De forma similar, o padrão apical de distribuição tecidual do CEA foi relacionado com níveis do CEA sérico menores quando comparado aos padrões de distribuição citoplasmática e estromal em doentes com carcinoma colorretal em outros estudos.^(69,77) Na presente casuística, a leitura da imunocoloração foi realizada na região de predominância do grau de diferenciação celular, notando-se diferença significativa entre os níveis séricos do CEA na análise dos padrões de distribuição apical e citoplasmático (tabela 15). Vinte e oito doentes com carcinoma com distribuição tecidual do CEA do tipo apical apresentaram níveis séricos do CEA menores, com média de 8,48ng/dl em comparação ao padrão tecidual do tipo citoplasmático, cuja média foi de 19,97ng/dl. Esses achados sugerem que a distribuição tecidual citoplasmática possa estar relacionada aos níveis elevados do CEA sérico, corroborando estudos anteriores.^(14,15,68,75,79)

Estudos demonstraram a relação do padrão de distribuição tecidual do CEA e os níveis séricos com o grau de diferenciação celular da neoplasia nos doentes com carcinoma colorretal. Afirmaram que a maioria dos doentes com tumores bem diferenciados e com padrão de distribuição do tipo apical cursam com nível baixo do CEA sérico. Por outro lado, enfermos com tumores moderadamente diferenciados ou indiferenciados e de padrão citoplasmático cursam com níveis séricos elevados. Doentes com tumor bem diferenciado e com intensidade de expressão moderada a intensa, porém com padrão de distribuição do tipo apical, podem apresentar nível do CEA sérico baixo, pois embora o antígeno esteja presente no tecido, a maior parte dele é eliminada para o lume intestinal.^(15,68)

No presente estudo, valores séricos do CEA relacionaram-se ao grau de diferenciação celular do carcinoma e ao padrão de distribuição tecidual determinado pela imunistoquímica (tabela 16). Em tumores indiferenciados, o valor médio do CEA sérico esteve elevado quando comparado aos moderadamente diferenciados ou bem diferenciados com o mesmo padrão de distribuição do CEA tecidual. Doentes com padrão apical bem diferenciado apresentaram valores séricos de CEA menores que os moderadamente diferenciados com o mesmo padrão de distribuição tecidual, concordando com os estudos anteriormente apresentados.^(15,68,75,79) Ao se excluir tumores indiferenciados (figura 5), pela impossibilidade de se determinar seu pólo apical, já que não ocorre arranjo celular do tipo glandular, e neoplasias mucoprodutoras (figura 6), por representarem padrão celular distinto dos carcinomas bem e moderadamente diferenciados, notou-se que a média do CEA sérico manteve-se elevada nas lesões com distribuição citoplasmática em relação a apical ($p=0,05$), sobretudo nos moderadamente diferenciados ($p=0,03$).

A modificação morfológica que a célula neoplásica sofre parece induzir à alteração na produção e distribuição celulares do antígeno carcinoembrionário, expressa pelas diferenças entre intensidade e distribuição do antígeno entre as células normais e o carcinoma colorretal.

As células epiteliais da mucosa do colo produtoras do antígeno possuem características de epitélio colunar especializado, fazendo com que proteínas produzidas no seu interior tenham orientação de direção polarizada no sentido do pólo apical celular e, portanto, o CEA celular obedece a esta polarização. Estudo *in vitro* mostrou que ao se promover o bloqueio da polarização das células da mucosa cólica em meio de cultura pobre em cálcio, ocorreu acúmulo intracelular (citoplasmático) do

CEA.⁽⁷¹⁾ Este fenômeno parece ocorrer em virtude da incapacidade da célula com polarização bloqueada excretar o antígeno no lume intestinal.

Na avaliação imunoistoquímica, a determinação da capacidade celular de polarização do CEA determinou 23 (51,1 por cento) carcinomas bem polarizados (G1IH), 18 (40 por cento) moderadamente polarizados (G2IH) e quatro (8,9 por cento), classificados como G3IH, representados pelos carcinomas mucoprodutores e indiferenciados (tabela 12).

A elevação na média dos níveis do CEA sérico ocorreu simultaneamente à perda de capacidade de polarização do CEA pela célula neoplásica, sugerindo que esse fenômeno possa estar envolvido no alcance do antígeno à circulação sistêmica. Observou-se nos carcinomas G1IH, média do CEA sérico de 18,85ng/dl, nos G2IH de 26,50ng/dl e nos G3IH de 31,13ng/dl ($p=0,03$), com correlação ($p=0,02$) entre o nível do CEA e a capacidade celular de polarização do CEA (tabela 17).

Demonstrou-se a variabilidade entre grau de diferenciação celular e capacidade celular de polarização do CEA (Quadro 1). Em 16 oportunidades, o grau de diferenciação celular não coincidiu com os 23 considerados bem polarizados pela avaliação imunoistoquímica (35,5 por cento). Dos 18 casos classificados como moderadamente polarizados na avaliação imunoistoquímica, em seis (33,33 por cento) oportunidades não houve concordância com a avaliação convencional, tendo sido considerados bem diferenciados na avaliação pela HE. Em apenas um caso (5,56 por cento) houve coincidência para o carcinoma classificado como pouco diferenciado e pouco polarizado, as outras três neoplasias foram consideradas, à avaliação histopatológica convencional, como moderadamente diferenciadas.

Essas observações apontam para alterações das características morfológica e funcional do carcinoma, esta última, avaliada pela perda da orientação de direção polarizada da proteína formada em seu interior.

Houve elevação da média do nível sérico do CEA em carcinomas com a perda de diferenciação celular e de capacidade de polarização do CEA (tabela 18) com diferença significativa ($p=0,01$) nos carcinomas em estágio inicial, reforçando a idéia que o distanciamento da célula neoplásica do colonócito normal propicia o aporte de quantidades maiores do CEA à corrente sanguínea, com conseqüente aumento do nível plasmático do antígeno.

Esses dados vêm de encontro à teoria da polaridade do CEA.⁽⁷⁰⁾ Esses autores estudaram a distribuição imunocitoquímica do CEA determinada por anticorpo anti-peroxidase no intestino normal e no adenocarcinoma de colo, avaliada por microscopia eletrônica. Concluíram que o CEA possui expressão polar nas células epiteliais normais e que esta polaridade não está mantida no adenocarcinoma indiferenciado do colo, sugerindo falência da manutenção da estabilidade na expressão normal da glicoproteína, caracterizando, dessa maneira, esse tipo de célula neoplásica.

Demonstrou-se diferença significativa ($p=0,03$) entre capacidade celular de polarização do CEA e comprometimento linfonodal (tabela 19). Tal observação sugere que carcinoma menos diferenciado do ponto de vista funcional, ou seja, com menor capacidade celular de polarização do antígeno, se comporte de forma mais agressiva quanto à disseminação da doença.

A perda progressiva da capacidade celular de polarização do antígeno produzido, com conseqüente redução de sua excreção, pode representar fator contributivo do aumento dos níveis do CEA sérico. Tal fato poderia representar distúrbio funcional da célula neoplásica e permitir a identificação de carcinomas de comportamento biológico mais agressivo.

5.5 Conteúdo do CEA tecidual

A quantificação nas ciências biomédicas tem como meta promover a objetividade nas medidas para estabelecer o diagnóstico, tornar mais precisa a coleta, a apresentação e a análise dos resultados obtidos em pesquisas ou na rotina de laboratório, permitindo relacionar as diferentes estruturas anatômicas com suas funções. A aplicação de método quantitativo possibilita o aperfeiçoamento da capacidade de se estabelecer diagnóstico e o prognóstico.

Atualmente, os métodos auxiliados por computador ganharam meio próprio de divulgação,^{*} tendo sido publicados mais de 300 estudos com aplicações, as mais diversas, na ciência da saúde.

Em nosso meio estão disponíveis vários programas destinados a este fim, com venda comercial (Image Pro®, Image Pro-Plus®^{**}), ou de domínio público

*Journal Computer Assisted Learning

**Media Cybernetics

(Image J^{***}), ou ainda, de utilização interna na instituição onde foi desenvolvido (DIRACOM₃).⁽⁸¹⁻⁸⁵⁾

O CEA é imunoglobulina⁽¹⁾ e sua expressão é obtida por anticorpos específicos.^(24,29) No presente estudo, utilizou-se a imunocoloração com anticorpo monoclonal anti-CEA para a identificação do CEA no carcinoma colorretal. Pôde-se determinar o espectro de cor do CEA tecidual e identificá-lo no tecido neoplásico.

A presença do CEA no interior das células parece estar correlacionada com o grau de diferenciação celular. Estudo demonstrou que as células da mucosa cólica apresentam, à medida que vão se especializando e migrando do interior das criptas para o ápice das vilosidades, maior expressão do CEA quando comparadas com as células mais jovens localizadas no interior das criptas nas zonas de epitélio proliferativo.⁽⁷²⁾ Acúmulo progressivo do CEA no interior do citoplasma das células do epitélio colorretal normal foi observado nas células em processo de diferenciação,^(68,73) sugerindo que a perda da polarização celular possa estar relacionada ao menor grau de diferenciação celular. A relação existente entre especialização celular, intensidade e padrão de expressão tecidual vêm fazendo com que o CEA seja utilizado como marcador importante nos estudos que avaliam a diferenciação celular.^(15,16,68,75,79) Desta forma, tal avaliação por meio de imunocoloração do CEA e a medida do seu conteúdo por método computadorizado parece pertinente, como tentativa de se obter relação de dependência causal.

A medida morfométrica do CEA tecidual apresentou média de 125,47 com mínimo de 99,25 e máximo de 146,92 para os 45 casos estudados (tabela 6). Vale ressaltar que a distribuição das medidas obedeceu à curva de normalidade (figura 8), demonstrando retratar fenômeno biológico. Tal medida não apresentou associação isolada com a invasão da parede, avaliada por meio da classificação TNM, dimensão da neoplasia, invasão angioneural, comprometimento linfonodal ou com o estágio da doença de acordo com a classificação TNM, Astler-Coller ou Dukes (tabela 20).

O conteúdo do CEA tecidual obtido pela análise da imagem por meio do computador correlacionou-se significativamente ($p=0,004$) com o grau de diferenciação celular (figuras 9, 10 e 11, tabela 21). Observou-se que nos tumores bem diferenciados (12/45), a distribuição do CEA encontrava-se mais à esquerda dos

***Necessidade de ambiente Java

histogramas de frequência, com densidades ópticas menores e maior concentração da imunexpressão, com média de 119,86 (99,25 a 132,23). Para os carcinomas moderadamente diferenciados, o espectro de cor esteve deslocado nos eixos dos histogramas de frequência à direita dos valores encontrados nas lesões bem diferenciadas (29/45) com média do conteúdo tecidual do CEA de 126,01 (107,22 a 146,75), enquanto para os casos de carcinomas indiferenciados ou mucoprodutores (4/45), o desvio do eixo do histograma de frequência manteve-se à direita, ou seja, o conteúdo maior, com média do conteúdo de 138,34 (122,68 a 146,92). Portanto, o conteúdo elevou-se à medida que os tumores foram se tornando indiferenciados ($p=0,01$).

Quando foram comparados os conteúdos segundo grau de diferenciação celular relacionados à capacidade celular de polarização do CEA (tabela 22) observou-se diferença significativa entre os conteúdos nos diferentes padrões morfofuncionais ($p=0,0002$). Carcinomas bem diferenciados e bem polarizados (G1G1IH) e moderadamente diferenciados e bem polarizados (G2G1IH) constituíram o grupo morfofuncional 1 que demonstrou baixo conteúdo tecidual de CEA (115,2 e 113,2), provavelmente devido ao fato do aumento da produção estar sendo compensado pela manutenção da capacidade de excreção do antígeno. Enquanto carcinomas moderadamente diferenciados e moderadamente polarizados (G2G2IH) e neoplasias bem diferenciadas e moderadamente polarizadas (G1G2IH) compuseram o grupo 2 morfofuncional e apresentaram conteúdo do antígeno maior que o grupo 1 (130,5 e 125,5), provavelmente devido à capacidade de excreção não superar a capacidade de produção do antígeno. Já no grupo 3, formado por carcinomas moderadamente diferenciados e mucoprodutores pouco polarizados (G2G3IH) e carcinomas indiferenciados pouco polarizados (G3G3IH), demonstrou-se elevação do conteúdo tecidual de CEA (137,6 e 140,5), possivelmente por apresentar grande perda na capacidade de polarização do CEA associada ao aumento de sua produção.

Os níveis séricos do CEA associaram-se aos grupos morfofuncionais ($p=0,02$), sendo seus níveis séricos significativamente mais elevados ($p=0,04$) nos grupos com maior perda morfofuncional (tabela 23), sugerindo diferentes expressões fenotípicas do carcinoma colorretal que podem estar traduzindo a mutação nuclear a que as células colorretais foram submetidas.

5.6 Considerações finais

Parece haver dois mecanismos celulares responsabilizados pelos níveis séricos do CEA nos carcinomas colorretais, as diferenças de produção nas subpopulações tumorais, ou seja, a capacidade de produzir o antígeno, e a perda de capacidade da célula neoplásica em manter a polarização do CEA celular, mais evidente com o progressivo grau de indiferenciação tumoral. Entretanto, apenas esses mecanismos não explicam a totalidade dos resultados encontrados no presente estudo. Outros fatores devem ser considerados para que a relação entre fonte produtora e nível sérico do CEA esteja completamente determinada. Pôde-se constatar que, em cerca de 89 por cento dos casos, a relação se faz às custas de diversos fatores (tabela 10, modelo 1): conteúdo do CEA tecidual, capacidade celular de polarização do CEA, grau de diferenciação celular, infiltração do carcinoma na parede colorretal, comprometimento linfonodal, metástases à distância, invasão angioneural, dimensão da neoplasia primária produtora do CEA, estágio da doença e tabagismo. Notou-se que a propriedade de predizer a elevação do nível sérico do CEA foi atribuída à presença de metástase à distância, ao grau de diferenciação celular e à dimensão da lesão primária (tabela 11), ou seja, à capacidade de produção do antígeno e à quantidade de massa neoplásica primária ou metastática produtora.

Demonstrou-se, da mesma forma, a relação causal entre os níveis séricos do CEA nos carcinomas restritos à parede do intestino grosso com grau de diferenciação celular, conteúdo do CEA tecidual, capacidade celular de polarização do CEA, padrão de distribuição tecidual do CEA, dimensão do tumor primário, invasão angioneural, infiltração na parede colorretal e tabagismo (tabela 10, modelo 2 e 3). Enquanto as neoplasias sem massa extracólica produtora do CEA ($T_{1-4}N_0M_0$) apresentam capacidade celular de polarização do CEA e invasão angioneural como os principais preditores no nível sérico do CEA ($p=0,003$), nos carcinomas não mucoprodutores, com lesão restrita à parede colorretal, verifica-se que o nível sérico do antígeno é determinado, principalmente, pela capacidade celular de polarização do CEA ($p=0,02$) (tabela 11).

O conteúdo tecidual do CEA mensurado por meio da análise de imagem assistida por computador, quando considerado de forma isolada, não demonstrou correlação com o nível sérico do antígeno. Todavia, mostrou-se importante para a determinação dos níveis séricos do CEA quando considerado conjuntamente com as demais variáveis estudadas. Tal fato torna-se evidente quando se propõe o

agrupamento morfofuncional dos carcinomas, onde se demonstra a dinâmica entre produção, excreção e nível sérico do antígeno. Exemplo deste fato é o caso de tumor indiferenciado com aspecto cordonal (figura 5), sem qualquer característica morfológica glandular, onde o CEA sérico foi 41,9ng/dl e o conteúdo do CEA tecidual foi de 140,5, sugerindo a relação entre a fonte de produção do CEA, a perda da característica morfológica, da capacidade celular de polarização do CEA e o elevado nível sérico do marcador.

A quantificação do CEA tecidual poderia fazer parte da avaliação do enfermo com carcinoma colorretal, contribuindo para a análise mais detalhada da sua evolução clínica. Nos casos onde o carcinoma não tenha elevada capacidade de produção do CEA, e/ou naquelas lesões onde a polarização celular do antígeno se encontra mantida, seus os níveis séricos podem não ser determinantes do prognóstico, uma vez que, nesses casos, poderiam mostrar valores normais. Nestes doentes a avaliação por métodos de imagem em intervalos menores poderia ser benéfica permitindo detectar recidivas precoces em relação aos padrões habituais de acompanhamento pós-operatório. Para que este caminho seja adotado, entretanto, estudos casualizados deveriam ser realizados, especialmente no que diz respeito à sobrevivência dos enfermos.

Novas informações quanto ao estadiamento do carcinoma colorretal, com o objetivo de propor terapias neoadjuvantes, cirúrgicas ou adjuvantes, poderiam melhorar a sobrevivência. Ainda não se conseguiu modificar a realidade bidirecional em que esses doentes vivem: aqueles que irão sobreviver e os destinados a morrer. Com o aprimoramento no seguimento e com o melhor entendimento dos eventos biológicos individualizados que governam a evolução desses doentes, seria possível surpreender mais precocemente as recidivas do carcinoma colorretal, bem como identificar carcinomas com perda da orientação polarizada e da diferenciação celular, representantes do distúrbio morfofuncional e, possivelmente, de neoplasias com comportamento biológico mais agressivo, hipótese esta que deverá ser testada por ocasião de estudo de sobrevida e intervalo livre de doença.

Possivelmente, será por meio da combinação entre fatores clínicos, morfológicos e funcionais que poderá ser obtida melhoria no prognóstico desses doentes.

6 CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, os resultados obtidos permitiram concluir que:

1. O conteúdo tecidual, quantificado por análise de imagem assistida por computador, relacionou-se com o nível sérico do CEA, quando considerado conjuntamente com outras variáveis no carcinoma colorretal;

2. O conteúdo tecidual do CEA, apresentou-se relacionado ao menor grau de diferenciação celular, e a perda da capacidade celular de polarização do CEA;

3. O nível sérico do CEA elevou-se à medida que o carcinoma perdeu sua característica morfofuncional, capacidade celular de polarização do CEA e menor diferenciação celular, com a maior dimensão do tecido produtor do CEA, com a presença de invasão angioneural, distribuição citoplasmática do antígeno, e com os estádios mais avançados das classificações TNM, Dukes e Astler-Coller.

7 ANEXOS

7.1. Dados individuais dos doentes com carcinoma colorretal

Paciente	Data	Idade	Sexo	Cor	Localização	CEA sérico
1	21/03/2003	74	Feminino	Branco	Colon ascendente	2.30
2	11/06/2004	48	Masculino	Amarelo	Cólon descendente	0.10
3	27/09/2002	70	Masculino	Branco	Reto baixo	2.60
4	04/10/2002	49	Masculino	Branco	Reto baixo	1.80
5	18/04/2002	68	Masculino	Branco	Retossigmóide	28.30
6	14/04/2003	74	Masculino	Branco	Reto	2.40
7	08/05/2002	65	Feminino	Branco	Sigmóide	106.00
8	16/12/2002	49	Feminino	Branco	Sigmóide	0.70
9	25/11/2002	48	Masculino	Branco	Ceco	15.70
10	09/03/2004	67	Masculino	Branco	Ascendente	2.00
11	17/10/2002	70	Feminino	Branco	Retossigmóide	59.40
12	07/11/2002	65	Masculino	Branco	Reto alto	1.90
13	01/08/2003	62	Feminino	Branco	Reto baixo	9.70
14	09/01/2004	72	Masculino	Pardo	Reto baixo	0.40
15	06/09/2002	66	Masculino	Branco	Retossigmóide	21.30
16	15/10/2002	38	Masculino	Branco	Sigmóide	0.40
17	13/01/2003	60	Feminino	Branco	Retossigmóide	6.80
18	21/10/2002	76	Feminino	Branco	Descendente	0.80
19	09/08/2002	58	Masculino	Branco	Reto	3.40
20	21/05/2004	70	Masculino	Branco	Ceco	0.10
21	28/05/2003	46	Masculino	Branco	Retossigmóide	1.90
22	01/09/2003	73	Masculino	Negro	Colon ascendente	3.90
23	16/07/2004	45	Masculino	Branco	Transverso	2.10
24	16/08/2002	67	Masculino	Branco	Retossigmóide	23.60
25	10/03/2004	47	Masculino	Branco	Retossigmoide	14.20
26	16/10/2001	66	Feminino	Branco	Retossigmoide	12.50
27	26/09/2003	71	Masculino	Branco	Reto baixo	1.00
28	27/10/2003	46	Masculino	Branco	Reto baixo	2.10
29	19/09/2003	47	Feminino	Branco	Sigmóide	0.60
30	25/07/2002	82	Feminino	Branco	Reto	5.00
31	01/08/2002	80	Feminino	Branco	Reto	30.30
32	28/10/2002	47	Masculino	Branco	Reto baixo	11.40
33	05/03/2003	57	Feminino	Branco	Reto	4.00
34	21/11/2003	59	Feminino	Branco	Sigmóide	100.00
35	25/09/2002	65	Feminino	Branco	Cólon ascendente	41.90
36	29/10/2003	58	Masculino	Negro	Colon ascendente	0.10
37	08/01/2004	76	Masculino	Pardo	Colon ascendente	25.90
38	25/10/2001	71	Feminino	Branco	Colon ascendente	1.50
39	01/08/2002	80	Masculino	Branco	Reto	2.80
40	05/03/2004	80	Feminino	Branco	Retossigmoide	6.00
41	12/03/2004	39	Feminino	Pardo	Reto Médio	1.30
42	11/05/2004	68	Feminino	Amarelo	Descendente	0.70
43	05/07/2002	64	Feminino	Branco	Retossigmóide	4.10
44	26/03/2004	60	Feminino	Branco	Reto Médio	0.80
45	14/04/2004	68	Masculino	Branco	Reto baixo	13.20

Paciente	Diferenciação	Macroscopia	Invasão parede	Invasão angiolinfática
1	Moderadamente diferenciado	Vegetante	Subserosa	Ausente
2	Bem diferenciado	Vegetante	adiposo	Ausente
3	Moderadamente diferenciado	Úlcero-vegeto-infiltrativo	Subserosa	Ausente
4	Moderadamente diferenciado	Úlcerado	adiposo	Presente
5	Moderadamente diferenciado	Úlcerado	Serosa	Ausente
6	Moderadamente diferenciado	Úlcero-vegeto-infiltrativo	adiposo	Ausente
7	Moderadamente diferenciado	Úlcero-perfurado	adiposo	Presente
8	Moderadamente diferenciado	Úlcero-vegeto-infiltrativo	adiposo	Ausente
9	Moderadamente diferenciado	Vegeto-infiltrativo	Serosa	Ausente
10	Bem diferenciado	Úlcero-infiltrativo	Serosa	Presente
11	Bem diferenciado	Úlcero-infiltrativo	adiposo	Presente
12	Moderadamente diferenciado	Úlcerado	adiposo	Ausente
13	Bem diferenciado	Úlcero-vegetante	Muscular própria	Ausente
14	Moderadamente diferenciado	Úlcerado	adiposo	Ausente
15	Bem diferenciado	Úlcero-infiltrativo	adiposo	Ausente
16	Moderadamente diferenciado	Úlcerado	Serosa	Ausente
17	Moderadamente diferenciado	Úlcero-infiltrativo	Subserosa	Presente
18	Moderadamente diferenciado	Vegetante	Muscular própria	Ausente
19	Bem diferenciado	Úlcero-vegeto-infiltrativo	Muscular própria	Ausente
20	Moderadamente diferenciado	Vegeto-ulcerada	adiposo	Ausente
21	Bem diferenciado	Úlcerado	Subserosa	Presente
22	Moderadamente diferenciado	Úlcero-vegeto-infiltrativo	Serosa	Ausente
23	Moderadamente diferenciado	Úlcero-vegetante	adiposo	Ausente
24	Bem diferenciado	Úlcero-vegeto-infiltrativo	adiposo	Presente
25	Moderadamente diferenciado	Úlcero-vegetante	adiposo	Presente
26	Moderadamente diferenciado	Úlcerado	adiposo	Presente
27	Moderadamente diferenciado	Úlcero-infiltrativo	adiposo	Ausente
28	Moderadamente diferenciado	Úlcero-infiltrativo	adiposo	Ausente
29	Moderadamente diferenciado	Úlcero-infiltrativo	Muscular	Ausente
30	Moderadamente diferenciado	Úlcero-vegetante	Muscular	Ausente
31	Moderadamente diferenciado	Úlcero-infiltrativo	adiposo	Ausente
32	Bem diferenciado	Úlcero-vegetante	Subserosa	Ausente
33	Moderadamente diferenciado	Úlcero-infiltrativo	Serosa	Presente
34	Moderadamente diferenciado	Infiltrativo	adiposo	Presente
35	Pouco diferenciado	Vegetante	Muscular própria	Presente
36	Moderadamente diferenciado	Úlcero-infiltrativo	Subserosa	Presente
37	Moderadamente diferenciado	Vegetante	Subserosa	Ausente
38	Moderadamente diferenciado	Vegetante	Muscular	Ausente
39	Moderadamente diferenciado	Úlcero-vegeto-infiltrativo	Muscular externa	Ausente
40	Moderadamente diferenciado	Úlcero-infiltrativo	adiposo	Presente
41	Bem diferenciado	Úlcerado	Subserosa	Ausente
42	Moderadamente diferenciado	Úlcerado	adiposo	Ausente
43	Bem diferenciado	Úlcero-vegeto-infiltrativo	Serosa	Ausente
44	Bem diferenciado	Úlcero-vegetante	adiposo	Ausente
45	Moderadamente diferenciado	Úlcero-vegetante	adiposo	Ausente

Paciente	Invasão neural	Dukes	Astler-Coller	Estádio TNM	Cadeia linfonodal	Metástase
1	Ausente	B	B2	2.00	0.00	0.00
2	Ausente	B	B2	2.00	0.00	0.00
3	Ausente	B	B2	2.00	0.00	0.00
4	Presente	B	B2	2.00	0.00	0.00
5	Ausente	B	B2	2.00	0.00	0.00
6	Ausente	C	C1	3.00	1.00	0.00
7	Presente	C	C2	4.00	1.00	1.00
8	Ausente	B	B1	2.00	0.00	0.00
9	Ausente	B	B2	2.00	0.00	0.00
10	Ausente	B	B2	2.00	0.00	0.00
11	Presente	C	C2	4.00	2.00	1.00
12	Ausente	B	B2	2.00	0.00	0.00
13	Ausente	A	B1	2.00	0.00	0.00
14	Ausente	B	B2	2.00	0.00	0.00
15	Presente	C	C2	4.00	2.00	1.00
16	Ausente	C	C1	3.00	1.00	0.00
17	Ausente	B	B2	2.00	0.00	0.00
18	Ausente	A	B1	2.00	0.00	0.00
19	Ausente	B	B1	2.00	0.00	0.00
20	Ausente	B	B2	2.00	0.00	0.00
21	Ausente	C	C1	3.00	1.00	0.00
22	Ausente	B	B2	2.00	0.00	0.00
23	Ausente	B	B2	2.00	0.00	0.00
24	Presente	B	B2	2.00	0.00	0.00
25	Presente	B	B2	2.00	0.00	0.00
26	Presente	C	C2	3.00	1.00	0.00
27	Ausente	B	B2	2.00	0.00	0.00
28	Ausente	B	B2	2.00	0.00	0.00
29	Ausente	B	B1	2.00	0.00	0.00
30	Ausente	A	B1	2.00	0.00	0.00
31	Ausente	B	B2	2.00	0.00	0.00
32	Ausente	C	C2	3.00	1.00	0.00
33	Ausente	C	C2	3.00	1.00	0.00
34	Presente	C	C2	4.00	1.00	1.00
35	Presente	B	B2	2.00	0.00	0.00
36	Presente	B	B2	2.00	0.00	0.00
37	Ausente	C	C2	3.00	2.00	0.00
38	Ausente	A	B1	2.00	0.00	0.00
39	Ausente	B	B2	2.00	0.00	0.00
40	Presente	C	C1	3.00	2.00	0.00
41	Ausente	B	B2	2.00	0.00	0.00
42	Ausente	B	B2	2.00	0.00	0.00
43	Ausente	C	C2	3.00	1.00	0.00
44	Ausente	B	B2	2.00	0.00	0.00
45	Ausente	C	C2	3.00	2.00	0.00

Paciente	Dimensão	N Linfonodos comprometidos	Urgência	Cirurgia principal	Tempos Cirúrgicos	Tabagismo
1	8.00	0.00	não	Colectomia D	1.00	0
2	10.00	0.00	sim	Colectomia E	1.00	0
3	3.50	0.00	não	Amputação reto	1.00	2
4	2.50	0.00	não	Amputação reto	1.00	0
5	5.50	0.00	sim	Retossigmoidectomia	2.00	1
6	5.00	3.00	não	Retossigmoidectomia	1.00	0
7	7.50	3.00	sim	Hartmann	1.00	0
8	4.50	0.00	sim	Retossigmoidectomia	3.00	1
9	10.00	0.00	sim	Colectomia D	1.00	0
10	7.00	0.00	não	Colectomia D	1.00	0
11	4.00	5.00	não	Retossigmoidectomia	1.00	0
12	6.00	0.00	não	Retossigmoidectomia	1.00	0
13	4.50	0.00	não	Amputação reto	1.00	0
14	7.00	0.00	não	Amputação reto	1.00	1
15	4.50	9.00	não	Retossigmoidectomia	1.00	1
16	4.00	1.00	sim	Hartmann	2.00	2
17	6.50	0.00	não	Esvaziamento pélvico posterior	1.00	2
18	4.00	0.00	não	Colectomia E	1.00	0
19	5.00	0.00	não	Amputação reto	1.00	2
20	7.00	0.00	sim	Colectomia D	1.00	0
21	5.50	2.00	sim	Hartmann	2.00	0
22	5.50	0.00	não	Colectomia D	1.00	0
23	8.00	0.00	sim	Colectomia E	2.00	0
24	15.00	0.00	sim	Exanteração pélvica	2.00	2
25	5.00	0.00	sim	Retossigmoidectomia	2.00	1
26	6.00	1.00	não	Esvaziamento pélvico posterior	1.00	0
27	5.30	0.00	não	Amputação reto	1.00	1
28	3.00	0.00	não	Amputação reto	1.00	2
29	6.40	0.00	não	Hartmann	1.00	0
30	6.00	0.00	não	Retossigmoidectomia	1.00	1
31	5.00	0.00	não	Amputação reto	1.00	0
32	8.50	3.00	não	Amputação reto	1.00	1
33	4.50	2.00	não	Retossigmoidectomia	2.00	0
34	13.50	3.00	sim	Retossigmoidectomia	1.00	1
35	7.00	0.00	não	Colectomia D	1.00	0
36	3.50	0.00	sim	Colectomia D	1.00	0
37	5.00	4.00	sim	Colectomia D	1.00	0
38	4.00	0.00	não	Colectomia D	1.00	0
39	8.00	0.00	não	Amputação reto	1.00	2
40	8.00	8.00	sim	Hartmann	2.00	0
41	5.00	0.00	não	Retossigmoidectomia	1.00	2
42	2.00	0.00	sim	Colectomia E	2.00	0
43	5.50	2.00	não	Retossigmoidectomia	1.00	0
44	8.00	0.00	não	Esvaziamento pélvico posterior	2.00	0
45	2.00	3.00	não	Retossigmoidectomia	1.00	2

Paciente	Conteúdo CEA tecidual	Distribuição CEA tecidual	Polarização CEA	Tipo morfofuncional	Grupo morfofuncional
1	123.81	cito	1.00	G2G1IH	1.00
2	131.91	apical	1.00	G2G1IH	1.00
3	134.57	apical	1.00	G2G1IH	1.00
4	139.61	apical	1.00	G2G1IH	1.00
5	133.39	apical	1.00	G2G1IH	1.00
6	119.97	apical	1.00	G1G1IH	1.00
7	128.31	apical	1.00	G2G1IH	1.00
8	134.21	apical	2.00	G2G2IH	2.00
9	99.25	apical	2.00	G2G2IH	2.00
10	107.31	apical	2.00	G1G2IH	2.00
11	130.98	apical	2.00	G2G2IH	2.00
12	116.20	apical	1.00	G1G1IH	1.00
13	112.06	apical	2.00	G1G2IH	2.00
14	131.35	apical	2.00	G2G2IH	2.00
15	115.25	apical	2.00	G1G2IH	2.00
16	135.43	apical	1.00	G2G1IH	1.00
17	141.01	apical	1.00	G2G1IH	1.00
18	146.75	apical	1.00	G2G1IH	1.00
19	123.69	apical	1.00	G1G1IH	1.00
20	143.24	apical	3.00	G2G3IH	3.00
21	125.33	apical	2.00	G2G2IH	2.00
22	118.99	apical	1.00	G2G1IH	1.00
23	134.80	apical	1.00	G2G1IH	1.00
24	117.20	apical	1.00	G1G1IH	1.00
25	132.54	apical	2.00	G2G2IH	2.00
26	134.00	apical	2.00	G2G2IH	2.00
27	118.22	apical	1.00	G2G1IH	1.00
28	130.51	apical	2.00	G2G2IH	2.00
29	120.64	apical	2.00	G2G2IH	2.00
30	124.49	cito	2.00	G2G2IH	2.00
31	146.92	cito	3.00	G2G3IH	3.00
32	120.26	cito	2.00	G2G2IH	2.00
33	128.34	cito	2.00	G2G2IH	2.00
34	111.98	cito	2.00	G2G2IH	2.00
35	140.52	cito	3.00	G3G3IH	3.00
36	119.52	cito	1.00	G2G1IH	1.00
37	122.68	cito	3.00	G2G3IH	3.00
38	130.33	cito	1.00	G2G1IH	1.00
39	122.73	cito	1.00	G2G1IH	1.00
40	107.22	cito	2.00	G2G2IH	2.00
41	111.21	cito	1.00	G1G1IH	1.00
42	103.84	cito	1.00	G1G1IH	1.00
43	114.40	cito	1.00	G1G1IH	1.00
44	128.77	cito	1.00	G2G1IH	1.00
45	132.23	cito	2.00	G1G2IH	2.00

7.2. Documentos Éticos

2.1 Parecer do Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo

7.2.2 Parecer do Comitê de Ética da Universidade São Francisco

2.3 Termo de consentimento Livre e Esclarecido

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 1965;121:439-62.
2. Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of human digestive system. *J Exp Med*. 1965;122(3):467-81.
3. Castells A, Bessa X, Daniels M, Ascaso C, Lacy A, Garcia-Valdecasas JC, et al. Value of postoperative surveillance after radical surgery for colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1998;41(6):714-24.
4. Fletcher RH. Carcinoembryonic antigen. *Ann Intern Med*. 1986;104(1):66-73.
5. Barone C, Astone A, Cassano A, Garufi C, Astone P, Grieco AQ, Noviello MR, Ricevuto E, Albenese C, Gambassi G. Advanced colon cancer: staging and prognosis by CEA test. *Oncology*. 1990;47(2):128-32.
6. Chapman MA, Buckley D, Henson DB, Armitage NC. Preoperative carcinoembryonic antigen is related to tumor stage and long-term survival in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1998;78(10):1346-9.
7. Northover J. The use of prognostic markers in surgery for colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 1995;31a(7-8):1207-9.
8. Forones NM, Tanaka M. CEA and Ca 19-9 as prognostic indexes in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 1999;46(26):905-8.
9. Costa CA, Macedo JLS, Reis PEG, Povia C, Mendes D, Cruz D, et al. O valor do CEA no estadiamento do adenocarcinoma colorretal. *Rev Bras Cir*. 1996;86(4):171-3.

10. Solimene ACC, Carneiro CRW, Melati I Lopes, JD. Functional differences between two morphologically distinct cell subpopulations within a human colorectal carcinoma cell line. *Braz J Med Biol Res.* 2001;34(5):653-61.
11. Burtin P, Von Kleist S, Sabine, MC, King M. Immunohistological localization of CEA and nonspecific cross-reacting antigen in gastrointestinal normal and tumoral tissues. *Cancer Res.* 1973;33:3299-305.
12. Pagé M, Dalifard I, Bertrand G, Bocquillon PG, Daver A. Immunostaining of colorectal cancer with monoclonal anti-CEA antibodies compared to serum and tumor CEA content. *Anticancer Res.* 1986;6(5):893-6.
13. Panucci A, Fabris C, Del Favero G, Basso D, Marchioro L, Piccoli A, et al. Tissue polypeptide antigen (TPA) in pancreatic cancer diagnosis. *Br J Cancer.* 1985;52(5):801-3.
14. Waisberg J, Landman G, Cha ASH, Henriques AC, Gaspar HA, Speranzini MB. Padrão da distribuição tecidual do CEA no carcinoma colorretal: relação com o nível sérico do CEA e classificação de Dukes. *Rev Bras Coloproct.* 2002;22(1):20-6.
15. Hamada Y, Yamamura M, Hioki K, Yamamoto M, Nagura H, Watanabe K. CEA distribution pattern and the CEA levels in the peripheral blood in patients with colorectal carcinoma. *Cancer.* 1985;55:136-41.
16. Babia T, Veldman RJ, Hoekstra D, Kok JW. Modulation of carcinoembryonic antigen release by glucosylceramide-implications for HT29 cell differentiation. *Eur J Biochem.* 1998;258(1):233-42.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Prevenção do câncer de intestino. Normas e recomendações do INCA. *Rev Bras Cancerol.* 2003;49(4):207.

18. Fielding LP, Arsenault PA, Chapuis PH, Dent O, Gathright B, Hardcastle JD, et al. Clinicopathological staging for colorectal cancer: an International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT). *J Gastroenterol Hepatol.* 1991;6(4):325-44.
19. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol.* 1932;35:323-32.
20. Gabriel WB, Dukes CE, Bussey H. Lymphatic spread in cancer of the rectum. *Br J Surg.* 1935;23:395-413.
21. Dukes CE. Discussion on the pathology and treatment of carcinoma of the colon. *Proc R Soc Méd.* 1945;38:381-4.
22. Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg.* 1954;139:846-51.
23. UICC Committee on TNM Classification. Malignant tumors of oesophagus, stomach, colon and rectum. Geneva: UICC; 1966.
24. Thomson DMP, Krupey J, Freedman SO, Gold P. The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc Natl Acad Sci.* 1969;64(1):161-67.
25. Alexander JC, Silverman NA, Chretien PB. Effect of age and cigarette smoking on carcinoembryonic antigen levels. *JAMA.* 1976;235(18):1975-9.
26. Moore TL, Kantrowitz PA, Zamcheck N. Carcinoembryonic antigen (CEA) in inflammatory bowel disease. *JAMA.* 1972;222(8):944-7.
27. Bell H, Orjasaeter H, Lange HF. Carcinoembryonic antigen (CEA) in patients with alcoholic liver diseases. *Scand J Gastroenterol.* 1979;14(3):273-9.

28. Zamcheck N, Moore TL, Dhar P, Kupchik H. Immunologic diagnosis and prognosis of human digestive-tract cancer: carcinoembryonic antigens. *N Engl J Med.* 1972; 286(2):83-6.
29. Moore TL, Kupchik H, Marcon N, Zamcheck N. Carcinoembryonic antigen assay in cancer of the colon and pancreas and other digestive tract disorders. *Am J Dig Dis.* 1971;16(1):1-7.
30. Reynoso G, Chu TM, Holyoke D, Cohen E, Nemoto T, Wang JJ, Chuang Y, Guinan P, Murphy GP. Carcinoembryonic antigen in patients with different cancers. *JAMA.* 1972;220(3):361-5.
31. Vincent RG, Chu TM, Lane WW. The value of carcinoembryonic antigen in patients with carcinoma of the lung. *Cancer.* 1979;44(2):685-91.
32. Booth SN, King JPG, Leonard JC, Dyres PW. Serum carcinoembryonic antigen in clinical disorders. *Gut.* 1973;14(10):794-99.
33. Chu TM, Nemoto T. Evaluation of carcinoembryonic antigen in human mammary carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51(4):1119-22.
34. Parente JT, Greston WM. Carcinoembryonic antigen levels in the diagnosis of malignant lesions of the abdominopelvic region. *Surg Gynecol Obstet.* 1981;153(5):693-6.
35. Van Nagell JR Jr, Meeker WR, Parker JC Jr, Harralson JD. Carcinoembryonic antigen in patients with gynecologic malignancy. *Cancer.* 1975;35(5):1372-6.
36. Mach JP, Vienny H, Jaeger P, Haldemann B, Egely R, Pettravel J. Long-term follow-up of colorectal carcinoma patients by repeated CEA radioimmunoassay. *Cancer.* 1978;42(3 Suppl):1439-47.

37. Pritchard DG, Todd CW. The chemistry of carcinoembryonic antigen. In: Heberman RB, McIntere KR. Immunodiagnosis of cancer. New York: Marcel Dekker, 1979;p:165-81.
38. Schoentag R, Williams V, Kuhns W. The distribution of blood group substance H and CEA in colorectal carcinoma. *Cancer*. 1984;53(3):503-9.
39. Pritchard DG, Todd CW. Gas Chromatography of methyl glycosides as their trimethylsilyl ethers. *J Chromatogr*. 1977;133(1):133-39.
40. Cutait R, Borges JLA, Cutait DE. Aplicações clínicas do antígeno carcinoembrionário em câncer colorretal. *Rev Bras Coloproct*. 1988;8(1):28-33.
41. Moertel CG, Schutt AJ, Go VL. Carcinoembryonic antigen test for recurrent colorectal carcinoma. Inadequacy for early detection. *JAMA*. 1978;239(11):1065-6.
42. Tate H. Plasma CEA in the post-surgical monitoring of colorectal carcinoma. *Br J Cancer*. 1982;46(3):323-30.
43. Forones NM, Tanaka M, Machado D, Falcão JB, Giovanoni M. Antígeno carcinoembrionário no diagnóstico e acompanhamento do câncer colorretal. *Arq Gastroenterol* 1997;34(1):3-6.
44. Egan ML, Engvall E, Ruoslahti E, Todd CW. Detection of circulating tumor antigens. *Cancer*. 1977;40(1 suppl):458-466.
45. Frakelton AR, Szaro RP, Weltman JK. A galactosidase immunosorbent test for carcinoembryonic antigen. *Cancer Res*. 1976;36(8):2845-49.
46. Hammarström S, Engvall E, Johansson BG, Svensson S, Sunblad G, Goldstein IJ. Nature of the tumor-associated determinant(s) of carcinoembryonic antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975;72(4):1528-32.

47. Zamcheck N, Doos WG, Prudente, R, Luril BB, Gottlieb LT. Prognostic factors in colon carcinoma. Correlation of serum carcinoembryonic antigen levels and tumor histopathology. *Hum Pathol.* 1975;6(1):31-45.
48. Goslin R, Steele G, MacIntyre J, Mayer R, Sugarbaker P, Cleghorn K, et al. The use of preoperative plasma CEA levels for the stratification of patients after curative resection of colorectal cancers. *Ann Surg.* 1980;192(6):747-51.
49. Wanebo HJ. Are carcinoembryonic antigen levels of value in the curative management of colorectal cancer? *Surgery.* 1981;89(3):290-95.
50. Wolmark N, Wieand HS, Rockette HE, Fisher B, Glass A, Lawrence W, et al. The prognostic significance of tumor location and bowel obstruction in Dukes B and C colorectal cancer. *Ann Surg.* 1983;198(6):743-51.
51. Marchena J, Acosta MA, Garcia-Anguiano F, Simpson H, Cruz F. Use of the preoperative levels of CEA in patients with colorectal cancer. *Hepatogastroenterol.* 2003; 50(52):1017-20.
52. Abreu G, Dantas ANM, Jesus R, Lago PA. Análise do valor prognóstico da dosagem sérica pré-operatória do antígeno carcinoembrionário (CEA) em pacientes com carcinoma colorretal. *Rev Bras Coloproct.* 2002;22(2):82-7.
53. Moura RMAM, Matos D, Galvão Filho MM, D'Ippólito G, Sizenfeld J, Giuliano LM. Value of CEA level determination in gallbladder bile in the diagnosis of liver metastases secondary to colorectal adenocarcinoma. *São Paulo Med. J.* 2001;119(3):110-113.
54. Fernandes LC, Kim SB, Matos D. Cytokeratins and carcinoembryonic antigen in diagnosis, staging and prognosis of colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;11(5):645-8.

55. Kim SB, Fernandes LC, Saad SS, Matos D. Assessment of the value of preoperative serum levels of CA 242 and CEA in the staging and postoperative survival of colorectal adenocarcinoma patients. *Int J Biol Markers*. 2003;18(3):182-7.
56. Steele G Jr., Ellenberg S, Ramming K, O'Connell M, Moertel C, Lessner H, et al. CEA monitoring among patients in multi-institutional adjuvant G.I. Therapy protocols. *Ann Surg*. 1982;196(2):162-69.
57. Shimoyama T, Fukuda Y, Kusano H, Shimizu T, Takahira R, Itoh S, Watabe S, Miyashita K, Ishikawa H, Nakagoe T. Portal blood level of carcinoembryonic antigen (CEA) in colorectal cancer: correlation between tumor CEA content and immunohistochemical staining. *Gan To Kagaku Ryoho*. 1988;15(8):2245-50.
58. Sunouchi K, Machinami R, Mori M, Namiki K, Hattori S, Murata Y, Tsuchiya T, Mizuno H, Tadokoro M. Clinical impact of carcinoembryonic antigen messenger ribonucleic acid expression in tumor-draining vein blood on postoperative liver metastasis in patients with colorectal carcinoma: a prospective cohort study. *Dis Colon Rectum*. 2003;46(4):467-73.
59. Zeng Z, Cohen AM, Urmacher C. Usefulness of carcinoembryonic antigen monitoring despite normal preoperative values in node-positive colon cancer patients. *Dis Colon Rectum*. 1993;36(11):1063-8.
60. Pinho Mauro. Marcadores Tumorais em Câncer colorretal. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Jr S, Lopes A. Câncer de Cólon, Reto e Ânus. São Paulo: Lemar & Tecmedd Editora, 2004, p.87-104.
61. Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shirota K, Stanners C. Carcinoembryonic Antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell*. 1989;57(2):327-34.

62. Kim Y, Han MS, Park S, Lee HK, Kim WS, Park SK, et al. Distribution of carcinoembryonic antigen and biologic behavior in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 1999;42(5):640-8.
63. Chiquillo Barber MT, Navarro Fos S, Perez Bacete M, Esclapez Valero JP, Gómez-Ferrer Bayo F, Bort Marti J. Determinación del CEA tisular en adenocarcinomas colorectales: un estudio inmunohistoquímico. *Rev Esp Enferm Dig*. 1993;83(4):241-7.
64. Tokunaga N, Kijima H, Noto T, Osamura Y, Sadahiro S, Tajima T, Mitomi T. Immunohistochemical localization of carcinoembryonic antigen as a predictor of lymph node status in submucosa-invasive colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 1995;38(8):842-7.
65. Sirigu F, Dessi A, Natale L. L'antigene carcino-embrionario tissutale in condizioni normali e nella patologia neoplastica del colon-retto. *Recenti Prog Med*. 1991;82(7-8):378-80.
66. Pihl E, McNaughtan J, Ward HA, Nairn RC. Immunohistological patterns of carcinoembryonic antigen in colorectal carcinoma. Correlation with staging and blood levels. *Pathology*. 1980;12(1):7-13.
67. Markova E, Kamenova M. Study of the tissue localization of carcinoembryonic antigen in tumors of colonic mucosa. *Eksp Med Morfol*. 1989;28(4):12-6.
68. Huitric E, Laumonier R, Burtin P, Von Kleist S, Chavonel G. An optical and ultrastructural study of the localization of carcinoembryonic antigen (CEA) in normal and cancerous human rectocolonic mucosa. *Lab Invest*. 1976;34(1):97-107.
69. Chammas R, Novak EM. Mecanismos de invasão e metástases em câncer colorretal. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A. *Câncer de Cólon, Reto e Ânus*. São Paulo: Lemar & Tecmedd Editora, 2004, p.55-62.

70. Ahnen, DJ; Nakane, PK; Brown WR. Ultrastructural localization of carcinoembryonic antigen in normal intestine and colon cancer: abnormal distribution of CEA on the surfaces of colon cancer cells. *Cancer*. 1982;49(10):2077-90.
71. Yan Z, Robinson-Saddler A, Winawer S, Friedman E. Colon carcinoma cells blocked in polarization exhibit increased expression of carcinoembryonic antigen. *Cell Growth Differ*. 1993;4(9):785-92.
72. Shirota K, Minassian H, Jothy S. Protein G-gold immunoelectron microscopy of the colon carcinoma: the effect of tumor differentiation of carcinoembryonic antigen immunostaining. *Exp Mol Pathol*. 1988;49(3):305-15.
73. Fantini J, Rognoni JB, Culouscou JM, Pommier G, Marvaldi J, Tirard A. Induction of polarized apical expression and vectorial release of carcinoembryonic antigen (CEA) during the process of differentiation of HT29-D4 cells. *J Cell Physiol*. 1989;141(1):126-34.
74. Lorenzi M, Vindigni C, Manacci C, Tripodi SA, Iroatulam A, Petrioli R, Franchini G. Histopathological and prognostic evaluation of immunohistochemical findings in colorectal cancer. *Int J Biol Markers*. 1997;12(2):68-74.
75. Chiquillo Barber MT, Bort Marti I, Navarro Fos S, Perez Bacete M, Esclapez Valero J, Gómez-Ferrer Bayo F. Correlación entre niveles séricos de CEA preoperatorios y tinción inmunohistoquímica del CEA en el carcinoma colorrectal. *Rev Esp Enferm Dig*. 1993;83(4):249-54.
76. Shimano T, Okuda H, Monden T, Inaji H, Mori T. Usefulness of carcinoembryonic antigen measurement in feces of patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1987;30(8): 607-10.
77. Battistelli S, Marcheggiani F, Stella F, Pecorella I, Troccoli R. Dimostrazione immunostochimica del CEA nelle patologie del colon retto. *Boll Soc Ital Biol Sper*. 1990;66(10):985-92.

78. Martinez CAR; Priolli DG; Cardinalli I A; Piovesan H; Pereira JA. Os diferentes padrões de expressão celular do antígeno carcinoembrionário podem influenciar em seus níveis séricos? Estudo prospectivo em 50 doentes portadores de câncer colorretal. *Rev Col Bras Cir.* 2005;32(supl):86-7.
79. Bhatnagar J, Tewari HB, Bhatnagar M, Austin GE. Comparison of carcinoembryonic antigen in tissue and serum with grade and stage of colon cancer. *Anticancer Res.* 1999;19(3B):2181-7.
80. Gebauer G, Muller-Ruchholtz W. Carcinoembryonic antigen and CA19-9: implications of quantitative marker measurement in tissues for prognosis of colorectal cancer. *Cancer Detect Prev.* 2001;25(4):344-51.
81. Novelli MD. Introdução de uma nova metodologia para análise morfométrica através do processamento de imagens por computadores com aplicação no ensino e na pesquisa. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 1992.
82. Novelli MD, Barreto E, Matos D, Saad SS, Borra RC. Aplicação do processamento de imagens por computador na quantificação das variáveis histopatológicas de reparação tecidual de anastomoses colocólicas em cães. *Rev Ass Méd Brasil.* 1997;43:277-82.
83. Priolli, DG. Cicatrização da anastomose cólica. Avaliação através da associação de métodos convencionais com análise de imagem auxiliada por computador. Estudo experimental em ratos.[Tese]. São Paulo: Hospital Servidor Público Estadual “Francisco Morato Oliveira”; 1999.
84. Priolli DG, Margarido NF, Martinez CAR, Rotta CM, Stephani SM. Edema quantification by computerized morfometry as an evaluation parameter for the resistance of colon anastomoses. *Acta Cir Bras.* 2003;18(5):398-406.

85. Sthephani, SM; Novelli, MD, Leite, MSB, Bromberg, SH; Andretto, R; Pinto jr, PE; Zanotto, A; Farhoud, S; Priolli, DG. Processamento de imagens auxiliado pelo computador na avaliação da cicatrização da anastomose do colo esquerdo obstruído em ratos. *Estudos*. 2004;31:1181-96.
86. Martinez, CAR. Estudo morfométrico da superfície mucosa do estômago de cães submetidos a esplenectomia e a vagotomia gástrica proximal isoladas e associadas.[Tese]. São Paulo: Hospital Servidor Público Estadual “Francisco Morato Oliveira”; 2002.
87. Matos D, Saad SS, Franceschi Jr, O, Barreto, EP, Novelli, MD. – Estudo experimental comparativo entre anastomoses colóclicas com sutura manual e com anel biofragmentável. *Rev Assoc Méd Brasil*. 1993;39(4):201-6.
88. Martinez CAR, Waisberg J, Palma TR, Silva FZ, Cimerman G, Goffi FS. – Morphometric study of gastric mucosa in dogs submitted to proximal gastric vagotomy, splenectomy or proximal gastric vagotomy associated with splenectomy. *Acta Cir Bras*. 2002;17(5):289-98.
89. Niporciukas, MC. Avaliação da Neovascularização da Córnea de Ratos.[Tese]. São Paulo: Universidade São Paulo; 1992
90. Schmid KW, Puelacher C, Riedler L, Stoss F, Marth C. Measuring of immunoreactivity of carcinoembryonic antigen (CEA) in colorectal cancer by microdensitometry. *Pathol Res Pract*. 1989;184(4):382-9.
91. Cordeiro F, Yamaguchi NH, Habr-Gama A, Cutait R, Reinan RJ, Abramoff R, Perdicas M, Moraes A. Diagnóstico, estadiamento e tratamento cirúrgico e multidisciplinar do câncer colorretal. [texto na Internet]. 2001 [citado 2001 Set 21]. Disponível em: <http://alfa.epm.br/diretrizes/pd/CANCERCO.pdf>.

92. Sadahiro S, Suzuki T, Tokunaga N, Yurimoto S, Yasuda S, Tajima T, Makuuchi H, Murayama C, Matsuda K. Detection of tumor cells in the portal and peripheral blood of patients with colorectal carcinoma using competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer*. 2001;92(5):1251-8.
93. Tabuchi Y, Deguchi H, Saitoh Y. Carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9 levels of peripheral and draining venous blood in colorectal cancer patients. Correlation with histopathologic and immunohistochemical variables. *Cancer*. 1988;62(8):1605-13.
94. Martinez CAR, Priolli DG, Rezende Junior HC, Fernandes Filho CL, Nonose R. A localização do câncer do reto pode influenciar nos valores séricos e mesenteriais do antígeno carcinoembrionário? Estudo comparativo de 28 casos. *Rev Col Bras Cir*. 2005;32(supl):87.

Abstract

Objective: To determine the serum carcinoembryonic antigen (CEA) levels and tissue CEA content in colorectal carcinoma cases, and to correlate these with morphological characteristics and staging of the neoplasia. **Method:** Forty-five patients with resectable colorectal cancer underwent surgical treatment. Serum CEA levels, distribution and tissue content were determined by immunohistochemical study and computer-assisted image analysis. Immunostaining was classified in accordance with the tissue CEA distribution pattern, intensity and polarization capacity of cells. The colorectal carcinomas were grouped according to morphofunctional characteristics. The following variables were analyzed: smoking, location and size of the primary colorectal lesion, distant metastasis, angioneural invasion, parietal infiltration, lymph node involvement, histological type, degree of cell differentiation, CEA distribution, tissue CEA content and CEA polarization capacity of cells. The lesions were staged using the Dukes, Astler-Coller and TNM classifications. **Results:** The serum CEA levels were higher in colorectal carcinomas with angiolymphatic invasion ($p=0.009$); with cytoplasmic location of the antigen ($p=0.02$); with more advanced staging via the TNM ($p=0.003$), Dukes ($p=0.03$) and Astler-Coller ($p=0.008$) classifications; with progressive degrees of morphofunctional loss ($p=0.04$) and CEA polarization capacity of cells ($p=0.03$); at different degrees of cell differentiation in relation to the CEA distribution pattern in cells ($p=0.05$); and with regard to CEA polarization capacity of cells in carcinomas at the initial stages of the TNM classification ($p=0.01$). This combination of multiple variables was responsible for raising the serum CEA levels, particularly the size of the primary lesion, presence of distant metastasis and angioneural invasion ($p=0.0001$), while in the initial lesions, angioneural invasion and loss of CEA polarization capacity of cells were the principal predictors for the serum CEA levels ($p=0.003$). **Conclusions:** The tissue CEA content, as quantified by computer-assisted image analysis, was related to the serum CEA level, lower degree of cell differentiation and loss of CEA polarization capacity of cells. The serum CEA levels increased with the loss of morphofunctional characteristics, CEA polarization capacity of cells, cell differentiation, greater size, presence of angioneural invasion, cytoplasmic distribution of the antigen and more advanced stages in the TNM, Dukes and Astler-Coller classifications of colorectal carcinoma cases.

Bibliografia consultada

Armitage P, Berry G. Statistical methods in medical reserch. 3a. ed. Cambridge: Blackwell Science, 1994. 326p.

Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AS. Biostat 2.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Brasília:CNPq; 2000. 259p.

Cordeiro F, Yamaguchi HN, Habr-Gama A, Cutait R, Reinan RJ, Abramoff R, Perdicaris M, Moraes A. Diagnóstico, Estadiamento e Tratamento Cirúrgico e Multidisciplinar do Câncer Colorretal. [sítio na Internet] In: Associação Médica Brasileira, Conselho Federal de Medicina. Projeto Diretrizes, 2005. [acesso 2005 janeiro 19]. Disponível em:http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/020.pdf

DECS: Descritores em Ciências da Saúde. São Paulo: Bireme; 1992.

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2^a. ed. rev e ampl. São Paulo: BC Gráfica e Editora; 2005. 122p.