

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA

EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA C REATIVA NO
ADENOCARCINOMA DE RETO

AUTOR: PAULO DE CARVALHO CONTU
ORIENTADOR: PROF. LUIS FERNANDO MOREIRA
TESE DE DOUTORADO

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS

FACULDADE DE MEDICINA - FAMED

EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA C REATIVA NO
ADENOCARCINOMA DE RETO

AUTOR: PAULO DE CARVALHO CONTU

ORIENTADOR: PROF. LUIS FERNANDO MOREIRA

TESE DE DOUTORADO

2008

C765e **Contu, Paulo de Carvalho**

Expressão imunoistoquímica da proteína c reativa no adenocarcinoma de reto / Paulo de Carvalho Contu ; orient. Luis Fernando Moreira. – 2008. 46 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Cirurgia. Porto Alegre, BR-RS, 2008.

1. Adenocarcinoma 2. Neoplasias retais 3. Proteína C-reativa 4. Marcadores biológicos de tumor 5. Prognóstico 6. Inflamação I. Moreira, Luis Fernando II. Título.

NLM: WI 610

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Luis Fernando Moreira**, por sua orientação na realização deste trabalho, por acreditar na validade deste experimento, pela sua seriedade e amizade.

Ao **Prof. Mário Antonello Rosito**, chefe do Serviço de Coloproctologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo seu acolhimento, coleguismo e orientação diária no exercício da coloproctologia.

Aos colegas do Serviço de Coloproctologia do HCPA, **Dr. Daniel Carvalho Damin** e **Dr. Cláudio Tarta**, pelo companheirismo, convivência e respeito mútuo.

Aos residentes atuais e passados do Serviço de Coloproctologia do HCPA, principalmente o **Dr. Gustavo Coradini Tolfo**, **Dr. Frederico Sedrez Sanchez**, **Dr. Tiago Luiz Dedavid e Silva** e **Dra. Leticia Franke Gonçalves**, principal razão e espelho da nossa atividade assistencial no HCPA, pela dedicação e apoio.

À **Profª. Luise Meurer**, patologista do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFRGS e do Serviço de Patologia do HCPA, pelas horas de trabalho, pelo seu auxílio na análise imunohistoquímica das lâminas e presteza no acompanhamento deste trabalho.

Ao **Prof. João Carlos Prolla**, da UFRGS, Departamento de Citologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo auxílio na realização das microfotografias.

Ao **Prof. Mário Bernardes Wagner** e ao estatístico **Mathias Bressel**, pelas sugestões e pela orientação na análise estatística dos dados.

À **Sra. Estela Maris Araripe**, secretária do Programa de Pós-Graduação, por sua eficiência, presteza, atenção e solicitude.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, por possibilitarem a realização de projeto.

Ao **Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA**, pelas orientações, sugestões e financiamento parcial através do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Estudo.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, pelo financiamento parcial deste trabalho através do Programa Pro-Doc.

Ao **Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, pelo fornecimento de grande parte do material necessário à execução deste trabalho, particularmente aos **funcionários da Gerência Financeira**, em especial ao funcionário **Daniel**, pela orientação, planejamento e acompanhamento do processo de importação do reagente utilizado neste trabalho.

Aos **funcionários do Serviço de Anatomia Patológica do HCPA**, em especial à técnica **Flávia**, pela preparação das lâminas.

A todas aquelas pessoas e instituições que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

Aos meus queridos filhos, **Ana Paula, Maria Eduarda e Pedro**, fontes de inspiração e motivos para transpiração, pelo carinho e inocência que me fazem acreditar que a vida vale a pena. Que este trabalho os motive, no futuro, a acreditar no esforço, na ciência e pesquisa.

À minha esposa **Simone Santana Contu**, co-autora deste trabalho, pelo seu amor e incansável apoio, paciência, compreensão, estímulo, crítica e entusiasmo pela pesquisa.

A Deus.

“O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele; destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto.”

Thomas Henry Huxley

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE TABELAS	II
RESUMO	III
SUMMARY	IV
INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	01
HIPÓTESES	02
OBJETIVOS	02
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	03
METODOLOGIA	07
RESULTADOS	10
DISCUSSÃO	16
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	19
REFERÊNCIAS	21
ANEXO 1 - CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	25
ANEXO 2 – ARTIGO	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC: avidin-biotin-peroxidase complex

AINES: antiinflamatórios não esteróides

CEA: antígeno carcinoembrionário

COX-2: ciclooxigenase 2

CRP: C-reaction protein

DAB: tetraidrocloro de diaminobenzidina

DNA: ácido desoxirribonucléico

dp: desvio-padrão

FAMED: Faculdade de Medicina

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HR: hazard ratio

IC95%: intervalo de confiança de 95%

kDa: kilodalton

LSAB: Labeled Streptavidin Biotin

n: número de casos

ng/ml: nanogramas por mililitro

p: significância estatística

PCR: proteína C reativa

Sbv: sobreviventes

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UK: United Kingdom

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

1. Caso de adenocarcinoma moderadamente diferenciado de reto em 200x (A) e 500x (B). 09
2. Curva de sobrevivência global em 60 meses de pacientes com tumores de reto. 12
3. Curva de sobrevivência em 60 meses de pacientes com tumores de reto conforme a expressão imunohistoquímica da PCR. 14
4. Gráfico de barras representando a proporção de positividade da proteína C reativa em tumores de reto (n=91) comparados com controles (n=22). 14

LISTA DE TABELAS

1. Descrição e comparação bivariada entre diversas características dos grupos casos versus controles. 11
2. Relação entre fatores selecionados e a imunorreatividade à PCR em pacientes com câncer de reto e controles normais, com estimativas de hazard ratio obtidas em modelo de Cox múltiplo. 12
3. Comparação bivariada entre as características dos grupos óbitos versus sobreviventes. 13
4. Relação entre fatores selecionados e a ocorrência de óbito em pacientes com câncer de reto com estimativas de hazard ratio obtidas em modelo de Cox múltiplo. 15

RESUMO

O possível envolvimento da inflamação na carcinogênese colorretal tem potenciais implicações prognósticas, preventivas e terapêuticas. Foi investigado, através de imunistoquímica, se a proteína C reativa (PCR) é expressa em adenocarcinoma retal primário humano, e avaliada sua relação com achados clínico-patológicos. Acúmulo celular de PCR foi observado em 65 (71%) de 91 pacientes com adenocarcinoma de reto e em todos os 22 controles ($p < 0,01$). Nenhuma diferença significativa foi observada referente aos fatores clínico-patológicos ou taxas de sobrevida, mas uma correlação linear entre a proporção de positividade da PCR e o estágio de Dukes-Turnbull foi observada ($p = 0,005$). Estes dados sugerem que a PCR pode desempenhar um papel na carcinogênese retal, mas parece não afetar o prognóstico. Estudos adicionais são necessários em amostras populacionais maiores.

Palavras-chave: proteína C reativa; câncer de reto; inflamação; carcinogênese colorretal; expressão imunistoquímica; prognóstico.

SUMMARY

The possible involvement of inflammation on colorectal carcinogenesis has potential prognostic, preventive and therapeutic implications. We investigated immunohistochemically whether C-reactive protein (CRP) is expressed in human primary rectal adenocarcinoma and assessed its relationship with clinicopathological findings. Cell accumulation of CRP was observed in 65 (71%) out of 91 patients with adenocarcinoma of the rectum and in all 22 control cases ($p < 0.01$). No significant difference was observed with regard to clinicopathological features or survival rates, but a linear correlation between the positivity proportion of CRP and Dukes-Turnbull stage ($p = 0.005$) was observed. These data suggest that CRP might play a role in rectal carcinogenesis, but seems to not affect prognosis. Additional studies are warranted in larger population samples.

Keywords: C-reactive protein; rectal cancer; inflammation; colorectal carcinogenesis; immunohistochemical expression; prognosis.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O adenocarcinoma colorretal é um dos tumores malignos mais comuns no mundo ocidental, com incidência e taxa de mortalidade significativas, sendo que o reto é o sítio primário em 30 a 40% dos casos.

O envolvimento do processo inflamatório na carcinogênese colorretal é uma hipótese que há muito é discutida. As doenças inflamatórias intestinais, como a retocolite ulcerativa, têm sido associadas com risco aumentado de câncer colônico e diversos estudos têm demonstrado um risco reduzido de câncer colorretal com o uso de agentes antiinflamatórios.

Sintetizada principalmente nos hepatócitos, a proteína C reativa (PCR) é considerada o protótipo do peptídeo de fase inflamatória aguda. Sua expressão é induzida por citocinas como a interleucina 6, que pode atuar como fator de crescimento em tumores malignos. Estes dados vão ao encontro de estudos que demonstraram um aumento no risco de mortalidade por câncer utilizando outros marcadores inflamatórios e sugere a possibilidade da participação deste processo no desenvolvimento do câncer.

O papel da PCR sérica como um indicador do potencial maligno e prognóstico já foi investigado em carcinomas gastrintestinais, renal, ovariano e mieloma. Entretanto, a origem da elevação sérica da PCR em pacientes com tumores malignos não foi elucidada, permanecendo controverso se este aumento é derivado somente da produção pelos hepatócitos ou da síntese e acúmulo nas células carcinomatosas. É justificável, portanto, o estudo da PCR em adenocarcinoma de reto a fim de verificar a expressão desta substância nas células tumorais, sua influência na carcinogênese colorretal e verificação de impacto prognóstico. Não há na literatura, até a realização deste trabalho, qualquer estudo que analise a expressão da PCR em tecido neoplásico de reto.

HIPÓTESES

H0. Não há diferença na expressão imunoistoquímica da PCR no adenocarcinoma de reto em comparação com o grupo controle.

H1. Há diferença na expressão imunoistoquímica da PCR no adenocarcinoma de reto em comparação com o grupo controle.

OBJETIVOS

Determinar a prevalência da expressão imunoistoquímica da PCR no adenocarcinoma de reto em comparação com os controles normais.

Avaliar a associação entre a expressão imunoistoquímica da PCR no tumor primário e as variáveis clínico-patológicas do adenocarcinoma de reto.

Verificar o valor prognóstico da expressão imunoistoquímica da PCR no adenocarcinoma de reto.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

No mundo, os tumores malignos que acometem o cólon e o reto, somam, anualmente, cerca de 945 mil casos novos, sendo a quarta causa mais comum de câncer e a segunda em países desenvolvidos¹.

O adenocarcinoma é o tumor maligno mais freqüente do intestino grosso. Predomina em idosos, tem pico de incidência na sétima década, mas pode ocorrer em qualquer idade e em proporções semelhantes entre os gêneros. Aproximadamente 30 a 40% dos casos têm origem no reto².

Até o momento, o prognóstico do carcinoma colorretal tem sido avaliado por fatores anatomopatológicos discriminados nos principais sistemas de estadiamento. Neste ínterim, está bem estabelecida a relação prognóstica da invasão tumoral através da parede retal, a disseminação neoplásica para linfonodos regionais e a ocorrência de metástases à distância, com a expectativa de sobrevida dos pacientes tratados cirurgicamente, conforme estabelecido por Dukes e modificado por Turnbull³. Outros aspectos histopatológicos, como a pouca diferenciação celular, invasão linfovascular e produção de muco, têm sido associados a pior prognóstico, mas sua avaliação pode ser subjetiva e variável em diferentes áreas do mesmo tumor⁴.

Muitas pesquisas na área da biologia molecular têm sido realizadas com o objetivo de melhor compreender a carcinogênese e o comportamento biológico dos tumores colorretais^{5,6}. O estudo das alterações genéticas, os mecanismos de controle do ciclo celular, os índices de proliferação celular e a expressão de determinados oncogenes e genes supressores tumorais em vários tipos de neoplasias humanas têm sido descritos, mas o papel exato destes eventos e sua utilização na prática clínica como fator prognóstico do câncer de reto ainda está por ser definido^{7,8}.

A inflamação é uma reação fisiológica em que, a partir de um dano tissular, uma rede multifatorial de sinais químicos inicia e mantém uma resposta projetada para reparar o tecido

comprometido. Este fenômeno envolve a ativação e participação de proteínas das famílias das seletinas, citocinas, integrinas e proteases. A resposta inflamatória normal, como aquela associada à cicatrização de ferimentos é, usualmente, auto-limitada porque a produção de citocinas anti-inflamatórias segue a síntese de citocinas pró-inflamatórias intimamente. Entretanto, o desequilíbrio na regulação de qualquer fator de conversão pode resultar em anormalidades, como parece ocorrer durante a progressão neoplásica.

A associação funcional entre inflamação e câncer não é nova. Em 1863, Virchow sugeriu que a origem do câncer estava em locais de inflamação crônica, baseando tal hipótese em algumas classes de irritantes que, em conjunto com o dano tecidual e seguido do processo inflamatório, incrementariam a proliferação celular⁹. Atualmente, duas hipóteses são estudadas relacionando inflamação e câncer. A hipótese de indução infere que a inflamação crônica resulta em proliferação celular excessiva e ativação de uma cascata de ações celulares que podem induzir dano irreversível do DNA. Estas células, consideradas iniciadas, podem sofrer a promoção. A promoção pode resultar da exposição de células iniciadas a diversos fatores, como irritantes químicos, fatores liberados no sítio do dano tecidual, ressecção parcial de órgãos, hormônios ou irritação crônica e inflamação. Funcionalmente, muitos promotores, direta ou indiretamente, induzem a proliferação celular, recrutam células inflamatórias, aumentam a produção de espécies oxigênio reativas que levam a dano oxidativo do DNA, e reduzem o reparo do mesmo. Pode haver subversão de programas de apoptose ou reparo celular em tecidos cronicamente inflamados, resultando em replicação de DNA e proliferação de células que perderam o controle do crescimento normal¹⁰, resultando em crescimento tumoral, progressão de doença metastática e imunossupressão^{10,11}. A segunda hipótese defende que a resposta imune do hospedeiro é uma consequência do próprio crescimento tumoral. Em ambas hipóteses, os produtos dos processos inflamatórios podem ser considerados biomarcadores¹².

O envolvimento do processo inflamatório na carcinogênese colorretal e seu papel como fator prognóstico é um tema há muito discutido. Embora haja crescentes evidências em estudos laboratoriais

desta associação¹³, dados de trabalhos epidemiológicos são esparsos. Risco aumentado de câncer colorretal foi demonstrado em pacientes com doença inflamatória intestinal, particularmente na retocolite ulcerativa idiopática. Uma redução do risco de adenoma e câncer colorretal associado com uso prolongado de ácido acetilsalicílico e outros agentes antiinflamatórios não esteróides (AINES) foi demonstrada em estudos observacionais e alguns ensaios clínicos¹⁴⁻¹⁷. O valor preditivo da reação celular inflamatória tumoral e peritumoral foi proposto e defendido por Jass como um dos fatores prognósticos constantes no sistema de estadiamento preconizado pelo seu grupo¹⁸. Klintrup e colaboradores demonstraram que a inflamação tem um valor prognóstico independente no câncer colorretal, comparável ao estágio de Dukes¹⁹. Entretanto, as doenças inflamatórias intestinais são responsáveis por apenas 1 a 2% dos carcinomas colorretais na população geral e há controvérsias sobre o mecanismo pelo qual os AINES possam reduzir o risco de câncer colorretal, com evidências que sugerem a influência de outras vias de carcinogênese não relacionadas à inflamação.

A PCR foi identificada originalmente em 1930 como uma substância reativa ao polissacarídeo C do *Streptococcus pneumoniae* no soro de pacientes com pneumonia. Com 206 aminoácidos, é considerada o protótipo das proteínas de fase aguda, que consistem em uma família de proteínas sintetizadas principalmente pelo fígado, cujas concentrações plasmáticas alteram em resposta a infecções, trauma, queimaduras, infarto tecidual, processos inflamatórios ou neoplasia. É considerada um marcador sistêmico sensível de inflamação e dano tecidual e sua expressão é induzida por citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 6, que atua como fator de crescimento em tumores malignos²⁰. A PCR é composta por cinco subunidades idênticas de polipeptídeos com 23 kDa de peso molecular arranjados em um formato pentamérico cíclico. Cada uma destas subunidades contém um sítio de ligação para uma molécula de fosfocolina e dois sítios de ligação para cálcio. Estes sítios de ligação permitem à PCR reconhecer e ligar-se a vários substratos biológicos como componentes fosfolipídicos de membranas celulares danificadas e antígenos nucleares e de cromatina, resultando na formação de complexos ligados à PCR que atuam como opsoninas. Estas opsoninas podem ativar o

sistema do complemento facilitando a fagocitose de materiais liberados pelas células danificadas bem como materiais potencialmente tóxicos de microorganismos invasores. Os complexos também podem ligar-se diretamente a neutrófilos, macrófagos e outras células inflamatórias, estimulando a resposta inflamatória e a liberação de citocinas. A PCR também atua na inibição a L-seletina, proteína que bloqueia a adesão de neutrófilos, e incrementa a síntese de antagonista do receptor para interleucina 1.

Na prática clínica, a PCR é utilizada, principalmente, no auxílio diagnóstico e controle evolutivo de doenças ou processos inflamatórios e de necrose tecidual, como infecções bacterianas, enfermidades reumáticas, colagenoses, infarto do miocárdio, doenças inflamatórias intestinais, queimaduras extensas, estados pós-operatórios e até como marcador biológico capaz de prever o aumento de risco cardiovascular. O nível sérico da PCR pode refletir a extensão e gravidade do processo e sua determinação seqüencial tem sido empregada no prognóstico e no controle terapêutico.

A PCR também foi estudada em diversas neoplasias. Em pacientes com doença de Hodgkin os níveis séricos de PCR se correlacionaram com estágio e risco de recidiva. Aumento dos níveis de PCR também foi associado com menor sobrevida em pacientes com diversos tumores, como linfoma não-Hodgkin, carcinoma de pulmão, pâncreas, próstata e esôfago⁹. A associação da PCR com neoplasia colorretal foi extensamente explorada, mas com conclusões incertas.

No presente estudo, foi investigado, através da imunoistoquímica, a expressão da PCR nas células de adenocarcinoma retal na tentativa de elucidar o seu significado na carcinogênese colorretal, bem como o seu potencial maligno.

METODOLOGIA

O presente trabalho consiste em uma coorte histórica não concorrente. O momento da cirurgia foi considerado o tempo zero e o desfecho foi a sobrevida após cinco anos ou a morte atribuída ao tumor de reto.

Foram avaliados os casos de adenocarcinoma primário de reto submetidos à ressecção cirúrgica eletiva no Serviço de Coloproctologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) com seguimento mínimo de cinco anos, exceto nos casos de óbito pela doença. Como controle, foram utilizados os casos de pacientes submetidos a colonoscopia pelo Serviço de Coloproctologia do HCPA, por alguma suspeita clínica, com biópsia cuja análise histopatológica resultante foi de mucosa retal normal.

Foram excluídos os casos com período de seguimento pós-operatório inferior a cinco anos, excetuando-se os casos de morte causada pela neoplasia de reto, portadores de doença inflamatória intestinal ou polipose intestinal de qualquer tipo, cirurgias sem ressecção do tumor ou somente ressecção local do tumor de reto, cirurgia de urgência, tumores recidivados, tumores metacrônicos ou sincrônicos de cólon ou reto, outras neoplasias concomitantes, tratamento com quimioterapia ou radioterapia neoadjuvante ou prévia, óbitos por outras causas não relacionadas ao adenocarcinoma de reto, pacientes cujos dados não puderam ser completamente revisados ou não tiveram acompanhamento pós-operatório completo, ou com dados incompletos, pacientes cujos blocos de parafina não foram disponibilizados para o estudo no Serviço de Patologia do HCPA e pacientes cujos prontuários não foram encontrados para revisão no Serviço de Arquivo Médico e Informações em Saúde do HCPA, ou com dados incompletos de seguimento.

Foram selecionados, inicialmente, 278 casos de pacientes com adenocarcinoma de reto operados no Serviço de Coloproctologia do HCPA. Foram excluídos 49 casos de tumores irressecáveis, sete neoplasias sincrônicas, sete casos de polipose, cinco casos com associação de outras neoplasias,

dois casos submetidos a terapia neoadjuvante e 117 casos cujos blocos de parafina não estavam disponíveis no Serviço de Patologia do HCPA. Os 91 casos resultantes podem não apresentar poder estatístico suficiente para calcular o desfecho prognóstico.

As variáveis da população efetivamente estudada foram idade, sexo, localização do tumor, dosagem sérica pré-operatória do antígeno carcinoembrionário (CEA), grau de diferenciação histológica e produção de muco, profundidade de invasão, presença de metástases linfáticas ou distantes, estado das margens radiais de ressecção, estágio segundo Dukes modificado por Turnbull, tratamento adjuvante pós-operatório, recidiva, sobrevida em cinco anos e expressão imunoistoquímica da PCR. Para os controles, foram considerados a idade, sexo e expressão imunoistoquímica da PCR. As variáveis em estudo foram coletadas em banco de dados atualizado do programa de pós-graduação, utilizado em pesquisas anteriores efetuadas nestes pacientes.

A expressão imunoistoquímica da PCR foi determinada a partir do estudo imunoistoquímico realizado no Serviço de Patologia e Centro de Pesquisas do HCPA, através do método ABC (avidin-biotin-peroxidase complex, kit LSAB DAKO). Foi utilizado o anticorpo policlonal anti-PCR diluído em 1:100 (Biogenesis Ltd, England, UK). O agente cromogênico utilizado foi o tetraidroclorato de diaminobenzedina (DAB). Foram considerados positivos para PCR os espécimes com mais de 10% das células tumorais coradas (Figura 1). Todas as etapas de preparo das lâminas, reagentes utilizados e critérios de positividade adotados na reação imunoistoquímica foram fiéis ao estudo de Nozoe e colaboradores²¹. As lâminas foram avaliadas por dois patologistas "cegos" em relação às características clínicas e de prognóstico dos casos.

Na análise estatística descritiva foram utilizados média aritmética, desvio padrão (dp), valores máximos e mínimos e mediana para as variáveis quantitativas, e percentuais para as variáveis qualitativas. Para comparação das características clínicas, histopatológicas e expressão imunoistoquímica da PCR entre os grupos câncer e normal, entre os subgrupos PCR positivo e PCR negativo do grupo câncer e entre os subgrupos com ocorrência de óbito ou não (vivos) no período de

seguimento de cinco anos do grupo câncer foram utilizados o teste t de Student ou o teste U de Mann-Whitney para variáveis quantitativas e o teste do qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher para variáveis categóricas. Para comparar a proporção de positividade da expressão de PCR dos casos de tumor de reto com os controles, foi utilizado o teste para tendência linear em proporções. A análise da sobrevida foi realizada pelo método de Kaplan-Meier com utilização de curvas e comparação entre grupos pelo teste de log-rank. Na consideração do efeito simultâneo dos diversos fatores estudados sobre a ocorrência de óbito, utilizou-se a técnica de regressão multivariável de Cox, obtendo-se estimativas ajustadas de associação. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de p menor que 0,05 e intervalo de confiança de 95%. Foi realizado um cálculo para estimativa do tamanho amostral, considerando um intervalo de confiança de 95% e 80% de poder, cujo resultado determinou a necessidade de 20 casos e 20 controles. Os dados foram processados e analisados com auxílio do programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows, versão 10.0.

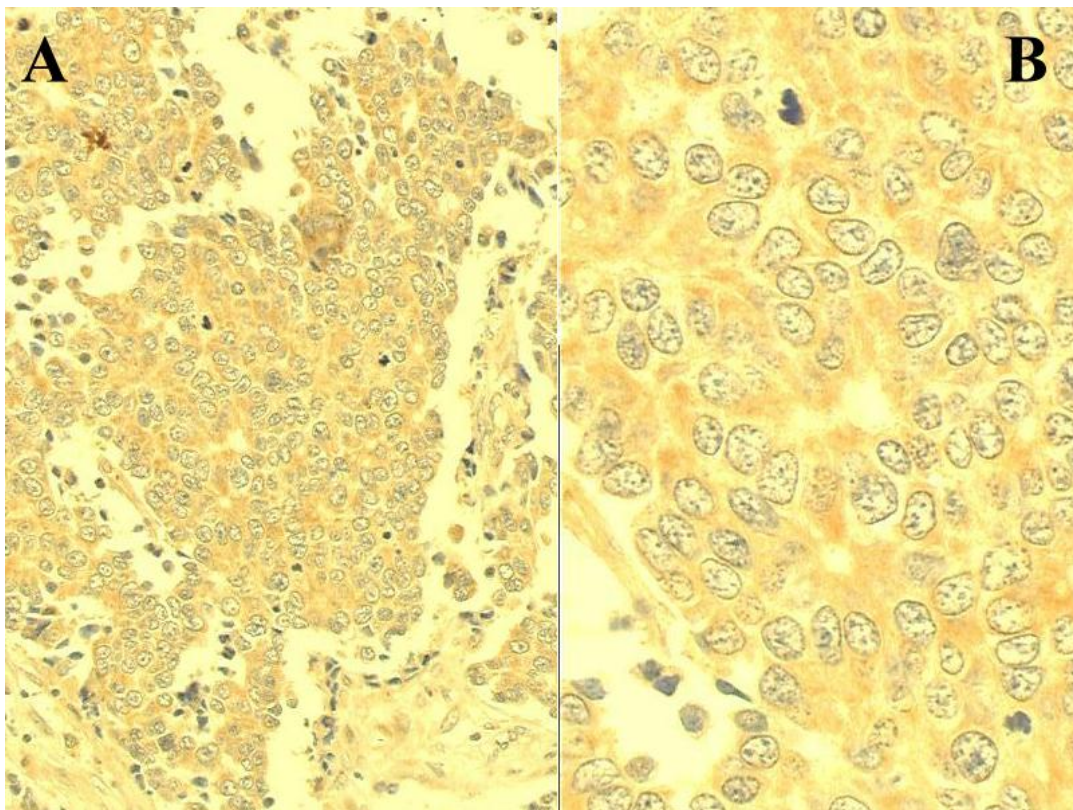


Figura 1 – Caso de adenocarcinoma moderadamente diferenciado de reto em 200x (A) e 500x (B). A pigmentação amarronzada citoplasmática é característica da reação imunoistoquímica positiva.

RESULTADOS

A amostra estudada foi constituída de 113 pacientes com idade média (\pm dp) de 58,4 (\pm 14,75) anos e maioria feminina (58%). O grupo de casos foi constituído por 91 pacientes operados por adenocarcinoma de reto, com 54% deles apresentando a doença em fase avançada. Em 73 pacientes (80%), o procedimento foi considerado curativo. O tratamento adjuvante com radioterapia, quimioterapia ou a combinação de ambos foi realizado em cinco, três e 14 pacientes, respectivamente. Dos pacientes operados curativamente, 18 (25%) receberam terapia adjuvante. Nos pacientes submetidos a cirurgia curativa, a recidiva, local ou à distância, ocorreu em 31 (43%). Ao final de 60 meses de seguimento pós-operatório, 49 (54%) pacientes estavam vivos, sendo 43 sem doença (88%) e seis (12%) com doença recidivada, e 42 (46%) foram ao óbito pela doença. Vinte e nove (40%) óbitos ocorreram entre os 73 pacientes submetidos a cirurgia curativa.

Houve expressão imunoistoquímica da PCR em 65 (71%) pacientes do grupo câncer e em todos os indivíduos do grupo controle ($p < 0,01$).

As variáveis idade, sexo, localização tumoral, produção de muco, profundidade de invasão, dosagem de CEA pré-operatório, tratamento adjuvante e expressão da PCR não apresentaram influência sobre a ocorrência do óbito. O grau de diferenciação histológica, a presença de linfonodos metastáticos, o estadiamento de Dukes-Turnbul e o estado das margens radiais se mostraram com poder de influência quanto à ocorrência de óbito, à análise bivariada ($p < 0,05$).

A Tabela 1 apresenta a descrição e comparação entre diversas características dos grupos de casos e controles.

Tabela 1 – Descrição e comparação bivariada entre diversas características dos grupos controles versus casos.

<i>Fator</i>	<i>Controles (n=22)</i>	<i>Casos (n=91)</i>	<i>P</i>
--------------	-------------------------	---------------------	----------

Idade, anos	49,1±13,4	60,6±14,2	<0,01
Sexo masculino, nº (%)	7 (32)	40 (44)	0,30
Distância, margem anal, cm		6,9±3,4	--
Diferenciação, nº (%)			
Bem		9 (10)	--
Moderado		71 (78)	
Pouco		11 (12)	
Produção de muco, nº (%)		14 (15)	--
Invasão, nº (%)			
Submucosa		5 (6)	--
Muscular		24 (26)	
Adventícia		15 (17)	
Extrarretal		47 (52)	
Linfonodos +, nº (%)		48 (53)	--
CEA pré-operatório, ng/mL		n=80 4,0 (1,7 a 10,1)	--
Limites radiais +, nº (%)		n=89 7 (8)	--
Dukes-Turnbull			
A		25 (28)	--
B		17 (19)	
C		34 (37)	
D		15 (17)	
Terapia Adjuvante, nº (%)		n=85	
Radioterapia		5 (6)	--
Quimioterapia		3 (4)	
Ambos		14 (17)	
Sem terapia		63 (74)	
Expressão de PCR ≥ 10 %, nº (%)	22 (100)	65 (71)	<0,01

Os dados são apresentados como média±desvio padrão, mediana (amplitude interquartil: percentil 25 a percentil 75) ou contagem (percentual). P: significância estatística. No grupo casos o n=91, exceto quando diferentemente indicado.

Na análise de regressão logística, a variável grupo (casos e controles) mantém relação com

PCR ($p < 0,001$), controlando as diferenças de idade (Tabela 2).

Tabela 2 – Relação entre fatores selecionados e a imunorreatividade à PCR em pacientes com câncer de reto e controles normais, com estimativas de hazard ratio obtidas em modelo de Cox múltiplo

Fator	n	PCR \oplus		HR	IC95%	P
		n°	%			
Grupo						
casos	91	65	71	0,007	0,001 a 0,044	<0,0001
controles	22	22	100	1,00		
Idade				1,012	0,961 a 1,064	0,658

Os dados são descritos como contagens e percentuais. HR: *hazard ratio* (ou risco relativo) obtido em modelo de azares proporcionais de Cox múltiplo. PCR: Proteína C reativa expressa em tumor medida em porcentagem de células positivas; IC95%: intervalo de confiança de 95%; P: significância estatística.

*No modelo de Cox, somente foram incluídos 81 indivíduos (eventos=37) com todas as observações completas.

A Tabela 3 compara as características dos subgrupos com óbito e sobrevida. As Figuras 2 e 3 registram a sobrevida global do grupo câncer e a sobrevida segundo a expressão da PCR, em 60 meses, respectivamente.

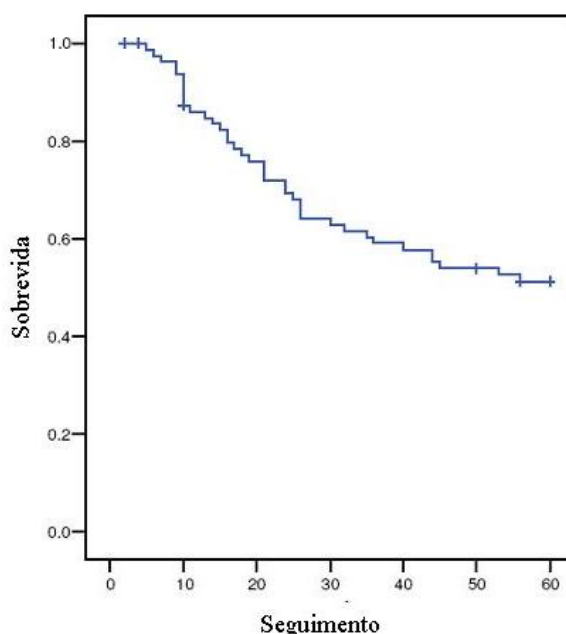


Figura 2 – Curva de sobrevida em global em 60 meses de pacientes com tumores de reto.

Tabela 3 – Comparação bivariada entre as características dos grupos óbitos versus sobreviventes (Sbv)

<i>Fator</i>	<i>Óbitos (n=42)</i>	<i>Sbv (n=49)</i>	<i>P</i>
Idade, anos	62,1±15,3	59,4±13,3	0,38
Sexo masculino, n° (%)	22 (52)	18 (37)	0,13
Distância da margem anal, cm	6,5±3,1	7,1±3,6	0,39
Diferenciação, n° (%)			
Bem	1 (2)	8 (16)	<0,01
Moderado	32 (76)	39 (80)	
Pouco	9 (21)	2 (4)	
Produção de muco, n° (%)	9 (21)	5 (10)	0,24
Invasão, n° (%)			
Submucosa	1 (2)	4 (8)	0,07
Muscular	7 (17)	17 (35)	
Adventícia	10 (24)	5 (10)	
Extrarretal	24 (57)	23 (47)	
Linfonodos +, n° (%)	31 (74)	17 (35)	<0,01
CEA pré-operatório, ng/mL	4,9 (1,7 a 13,1)	3,8 (1,7 a 9,0)	0,38
Limites radiais +, n° (%)	6 (15)	1 (2)	0,04
Dukes-Turnbull			
A	5 (12)	20 (41)	<0,01
B	5 (12)	12 (25)	
C	22 (52)	12 (25)	
D	10 (24)	5 (10)	
Terapia Adjuvante, n° (%)			
Radioterapia	4 (10)	1 (2)	0,23
Quimioterapia	1 (3)	2 (4)	
Ambos	4 (10)	10 (22)	
Sem terapia	30 (77)	33 (72)	
Expressão de PCR ≥ 10 %, n° (%)	30 (71)	35 (71)	0,99

Os dados são apresentados como média±desvio padrão, mediana (amplitude interquartil: percentil 25 a percentil 75) ou contagem (percentual). Sbv: sobreviventes; P: significância estatística. No grupo casos o n=91, exceto quando diferentemente indicado.

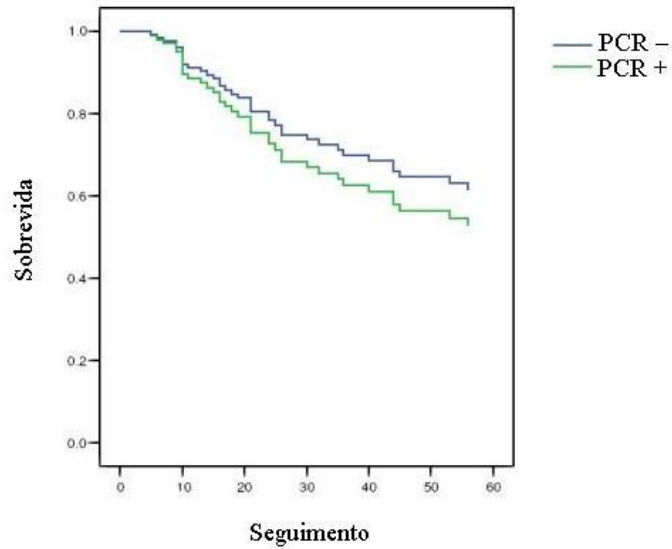


Figura 3 – Curva de sobrevivência em 60 meses de pacientes com tumores de reto conforme a expressão imunoistoquímica da PCR.

Embora não tenha sido demonstrada relação da expressão imunoistoquímica da PCR com o prognóstico dos pacientes com adenocarcinoma de reto, o teste de tendência linear, ilustrado na Figura 4, registra uma correlação significativa de expressão decrescente da PCR entre os controles normais, quando comparados com o estágio tumoral.

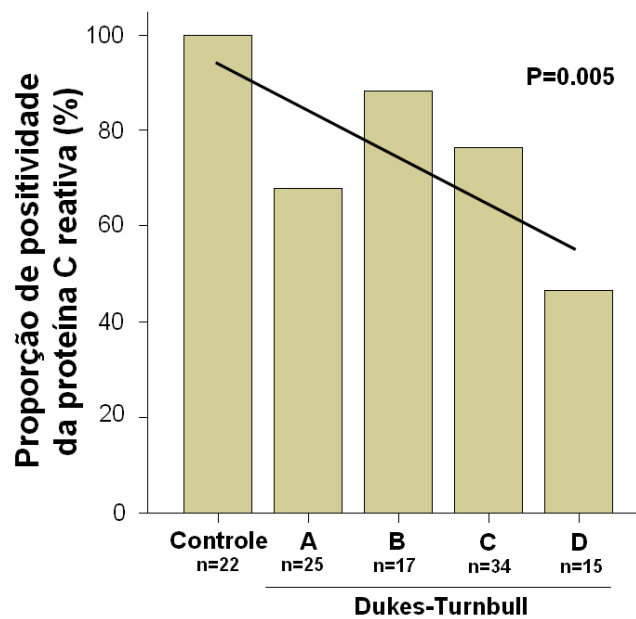


Figura 4 – Gráfico de barras representando a proporção de positividade da proteína C reativa em tumores de reto (n=91) comparados com controles (n=22).

Para o modelo multivariado de Cox, tendo o óbito como desfecho, foram testadas as variáveis idade, limites radiais positivos, estadiamento e expressão da PCR para identificar aquelas com efeito independente como fator prognóstico sobre a ocorrência de óbito. O estadiamento de Dukes-Turnbull e margens circunferenciais positivas foram as variáveis que apresentaram associação com a ocorrência de óbito (Tabela 4).

Tabela 4 – Relação entre fatores selecionados e a ocorrência de óbito em pacientes com câncer de reto com estimativas de hazard ratio obtidas em modelo de Cox múltiplo, (n=91; eventos=42)*

<i>Fator</i>	<i>n</i>	<i>Óbito</i>		<i>HR</i>	<i>IC95%</i>	<i>P</i>
		<i>n°</i>	<i>%</i>			
Expressão de PCR						
≥ 10 %	65	30	46,2	1,31	0,58 a 2,94	0,51
< 10 %	26	12	46,2	1,00		
Idade						
≥ 60 anos	55	27	49,1	1,32	0,66 a 2,64	0,43
< 60 anos	36	15	41,7	1,00		
Limites radiais						
Comprometidos	7	6	85,7	3,64	1,26 a 10,51	0,02
livres	82	34	41,5	1,00		
Dukes-Turnbull						
A	25	5	20,0	1,00		0,01
B	17	5	29,4	1,21	0,33 a 4,48	0,78
C	34	22	64,7	4,59	1,72 a 12,27	0,01
D	15	10	66,7	4,85	1,25 a 18,77	0,02

Os dados são descritos como contagens e percentuais. HR: *hazard ratio* (ou risco relativo) obtido em modelo de azares proporcionais de Cox múltiplo. PCR: Proteína C reativa expressa em tumor medida em porcentagem de células positivas; IC95%: intervalo de confiança de 95%; P: significância estatística.

*No modelo de Cox, somente foram incluídos 81 indivíduos (eventos=37) com todas as observações completas.

DISCUSSÃO

A inflamação crônica já foi associada a diversas neoplasias. Os possíveis mecanismos pelos quais o processo inflamatório pode contribuir para a carcinogênese incluem a elaboração de citocinas e fatores do crescimento que favorecem o crescimento da célula tumoral, a indução da cicloxigenase 2 (COX-2) nos macrófagos e células epiteliais e a geração de espécies oxigênio e nitrogênio reativas mutagênicas¹⁰.

A fase aguda de síntese da PCR é regulada por citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1, interleucina 6 e fator de necrose tumoral, que agem como fatores do crescimento autócrinos para neoplasias²⁰. É reconhecido que a PCR é sintetizada principalmente nos hepatócitos. Entretanto, há estudos que demonstraram elevação da PCR sérica em pacientes com insuficiência hepática candidatos a transplante de fígado, sugerindo uma outra fonte produtora da proteína²². De fato, Torzewski e colaboradores demonstraram depósitos de PCR na parede de artérias coronárias em estudo imunoistoquímico de tecidos coletados em autópsias, sugerindo que a PCR pode promover a formação da lesão aterosclerótica por ativação do sistema de complemento²³.

Muitos estudos demonstraram a associação entre PCR e o câncer colorretal. Nozoe e colaboradores demonstraram associação entre a concentração de PCR sérica e a presença de doença metastática, comprometimento peritoneal local e pior prognóstico²⁴, achados concordantes com o estudo de McMillan e colaboradores, que demonstraram relação com maior recidiva tumoral após cirurgia de ressecção curativa do cancer colorretal²⁵. Wigmore e colaboradores não obtiveram resultados que indicassem significado prognóstico, embora tenham demonstrado nível aumentado sérico de proteínas de fase aguda em mais de um terço dos pacientes com câncer colorretal, bem como associação com invasão tumoral local, menos ressecções curativas e maiores níveis de CEA²⁶, achados semelhantes aos obtidos por Chung e Chang²⁷. A PCR também foi relacionada como fator

prognóstico em pacientes submetidos a tratamento cirúrgico para metástases hepáticas, sendo considerada fator preditivo de pior resultado quando apresenta níveis séricos pré-operatórios elevados, conforme estudo de Wong e colegas²⁸. No estudo de Nielsen e colaboradores, a PCR sérica foi considerada uma variável prognóstica independente e permitiu identificar um subgrupo de pacientes submetidos a ressecção curativa de câncer colorretal sob risco de baixa sobrevida²⁹. Erlinger e colaboradores publicaram um estudo que demonstrou elevação nas concentrações séricas de PCR entre indivíduos que, posteriormente, desenvolveram câncer de cólon³⁰, achados consistentes com o estudo de Gunter³¹ e Helzsouer³², corroborando a hipótese de que a inflamação é um fator de risco para o desenvolvimento de câncer colônico em indivíduos sob risco padrão para esta doença. Siemens e colaboradores demonstraram que níveis elevados de PCR em sangue periférico coletado de indivíduos sem o diagnóstico de câncer foram associados a um aumento subsequente de 38% no risco global de câncer, predominantemente para carcinoma epidermóide de pulmão, câncer de cólon, exceto sigmóide, e câncer de mama¹². Já Ito e colaboradores não demonstraram associação clara entre níveis séricos de PCR e risco de câncer colorretal³³. Todas estas pesquisas, entretanto, foram realizadas com PCR sérica e sujeitas, portanto, a vieses por interferências diversas sobre os níveis de PCR, como cardiopatia isquêmica, doenças inflamatórias ou uso de determinados medicamentos.

Não foi encontrada, na revisão bibliográfica realizada, qualquer investigação da expressão imunoistoquímica de PCR em tecido de tumores colorretais humanos. A importância em executar este tipo de pesquisa consiste na demonstração da localização da proteína através da reatividade celular à PCR na análise imunoistoquímica.

Na verdade, Nozoe e colaboradores²¹ foram os primeiros a demonstrar a expressão imunoistoquímica da PCR em células de carcinoma epidermóide esofágico, sugerindo que a elevação sérica da PCR poderia ser parcialmente derivada da produção da substância pelas células do carcinoma, bem como pela síntese pelos hepatócitos em resposta ao tumor. Neste estudo foi

demonstrado que os pacientes cujas neoplasias apresentaram reação imunoistoquímica à PCR tiveram pior sobrevida, sendo considerada, em análise multivariada, fator prognóstico independente.

No presente estudo, a expressão celular de PCR foi observada em 65 dos 91 pacientes com adenocarcinoma retal e em todos os controles normais. Estes dados corroboram o fato de que a PCR pode ser encontrada em outros tecidos, inclusive em neoplasias, além do fígado. A sua distribuição foi significativamente diferente entre os casos e os controles (71% contra 100%), sugerindo a influência do processo inflamatório na carcinogênese colorretal. No entanto, em oposição ao estudo de Nozoe²¹, não foi demonstrada associação da expressão de PCR com prognóstico. A maior prevalência de expressão da PCR em controles normais comparados ao grupo câncer pode sugerir uma influência da PCR na progressão tumoral, principalmente em estágios iniciais. De fato, na análise imunoistoquímica da PCR nos controles normais, foi evidenciada uma expressão intensa de PCR no muco das células. Já no tecido neoplásico, esta característica é ausente ou se apresenta sem a mesma intensidade, o que pode indicar uma capacidade ou função alterada na produção e liberação da PCR. Considerando que o muco é produzido no citoplasma celular, esta observação pode sugerir, como hipótese, que a PCR possa desempenhar o papel de marcador de algum fator protetor da mucosa retal e que sofre deterioração à medida que ocorre a progressão neoplásica.

A comparação dos achados deste trabalho com estudos citados anteriormente²⁴⁻³², onde a PCR sérica está presente e positivamente relacionada com incidência e pior prognóstico no câncer colorretal, no nosso entendimento não é adequada, visto que aqueles estudos verificaram o comportamento de um marcador inflamatório sérico e, portanto, sistêmico, enquanto a PCR tecidual expressa uma apresentação reacional local. O fato de a PCR estar presente em tecidos normais corrobora a hipótese anterior de proteção natural, principalmente por ser um estudo em intestino, órgão rico em tecido inflamatório e constantemente em contato com substâncias presentes nos alimentos.

Apesar da tendência significativa na correlação da expressão da PCR com os estágios de Dukes-Turnbull, não foi demonstrado impacto prognóstico no presente estudo, o que pode refletir a

necessidade de uma amostra maior, principalmente do grupo de pacientes no estágio A, ou a participação de outros fatores não abordados neste estudo.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Na presente amostra, a prevalência da expressão imunohistoquímica da PCR no adenocarcinoma de reto foi de 71% contra 100% nos controles normais, sendo esta diferença estatisticamente significativa.

Não houve associação entre a expressão da PCR e as variáveis, gênero, localização do tumor, grau de diferenciação celular, produção de muco, profundidade de invasão, presença de linfonodos metastáticos, valor do CEA pré-operatório e presença de margens laterais de ressecção comprometidas.

Não foi demonstrada relação direta da expressão da PCR com estágio neoplásico de Dukes-Turnbull ou com sobrevida.

O mecanismo preciso de envolvimento da inflamação na carcinogênese colorretal permanece incerto. A PCR é um marcador não específico da inflamação e estudos adicionais de citocinas específicas ou fatores que regulem a resposta inflamatória aguda podem auxiliar na elucidação dos mecanismos implicados no processo inflamatório e aumento do risco do câncer colorretal.

A associação entre processos inflamatórios e o risco do desenvolvimento de câncer representa um potencial fator de risco modificável. Intervenções que atuem nestes processos podem reduzir o risco de câncer. Os riscos associados com intervenções de quimioprevenção, como o uso de inibidores da COX-2, são significativas. Se as intervenções de quimioprevenção podem oferecer benefícios significativos maiores e melhores do que os benefícios da detecção precoce de lesões pré-neoplásicas com intervenções de rastreamento como a colonoscopia e sem risco significativo, é incerto. Intervenções no estilo de vida com altos benefícios para as razões de risco que possam interferir com o processo inflamatório também deveriam ser investigadas, assim como o papel da inflamação em outros cânceres.

A utilidade da aplicação da PCR para a predição clínica do câncer colorretal requer melhor atenção enquanto estudos que incorporam medidas de outras variáveis inflamatórias e citocinas possam ser potencialmente úteis na elucidação da reação inflamação e carcinogênese colorretal.

REFERÊNCIAS

- 1 American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2006. Available in August, 24th 2006: <http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2006PWSecured.pdf>.
- 2 Gordon PH. Malignant neoplasms of the colon. In: Gordon PH and Nivatvongs S, eds. Principles and Practice of Surgery for the Colon, Rectum and Anus. 2nd ed. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing; 1999. p. 576-717.
- 3 Turnbull RB Jr, Kyle K, Watson FR, Spratt J. Cancer of the colon: the influence of no-touch isolation technic on survival rates. *Ann Surg* 1967;166:420-427.
- 4 Moreira LF, Iwagaki H, Hizutae A, Sakagami K, Orita K. Outcome in patients with early colorectal carcinoma. *Br J Surg* 1992;79:436-438.
- 5 Walker CL. Cancer susceptibility genes and molecular carcinogenesis. *Molecular Medicine Today* 1996;2(9):364-365.
- 6 Navaratnam RM, Chowaniec J, Winslet MC. The molecular biology of colorectal cancer development and associated genetic events. *Ann R Coll Surg Engl* 1999;81:312-319.
- 7 Nowell PC. Molecular events in tumor development. *N Engl J Med* 1988;319(9):575-577.
- 8 Lopes A, Nakagawa WT, Mello CAL. Oncogenes e Genes Supressores de Tumor: Um equilíbrio necessário. In: Rossi BM e Pinho M. eds. *Genética e biologia molecular para o cirurgião*. São Paulo, SP: Lemar, 1999 p. 125-142.
- 9 Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357:539-545.
- 10 Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860-867.
- 11 Mazhar D and Ngan S. C-reactive protein and colorectal cancer. *Q J Med* 2006;99:555-559.
- 12 Siemens C, Visser LE, Coebergh J-WW, Splinter TAW, Witteman JCM, Uitterlinden AG, Hoffman A, Pols HAP, Stricher BHC. C-reactive protein levels, variations in the c-reactive protein gene, and cancer risk: the Rotterdam study. *J Clin Oncol* 2006; 24(33):5216-5222.

- 13 Okada F, Kawaguchi T, Habelhah H, Kobayashi T, Tazawa H, Takeichi N, Kitagawa T, Hosokawa M. Conversion of human colonic adenoma cells to adenocarcinoma cells through inflammation in nude mice. *Lab Invest* 2000;80:1617-1628.
- 14 Baron JA, Cole BF, Sandler RS, et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med* 2003;348:891-899.
- 15 [Flossmann E, Rothwell PM; British Doctors Aspirin Trial and the UK-TIA Aspirin Trial.](#) Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomized and observational studies. *Lancet*. 2007;369(9573):1603-1613.
- 16 Bertagnolli MM, Eagle CJ, Zauber AG, Redston M, Solomon SD, Kim KM, Tang J, Rosenstein RB, Wittes J, Corle D, Hess TM, Woloj GM, Boissierie F, Anderson WF, Viner JL, Bagheri D, Burn J, Chung DC, Dewar T, Foley TR, Hoffman N, Macrae F, Pruitt RE, Saltzman JR, Salzberg B, Sylwestrowicz T, Gordon GB, Hawk ET. Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. *N Engl J Med* 2006;355(9):873-884.
- 17 Arber N, Eagle CJ, Spicak J, Racz I, Dite P, Hajer J, Zavoral M, Lechuga MJ, Gerletti P, Tang J, Rosenstein RB, Macdonald K, Bhadra P, Fowler R, Wittes J, Zauber AG, Solomon SD, Levin B. Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps. *N Engl J Med* 2006;355(9):885-895.
- 18 Jass JR, Love SB, Northover JM. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet* 1987;1:1303-1306.
- 19 Klintrup K, Mäkinen JM, Kauppila S, Väre PO, Melkko J, Tuominen K, Tuppurainen K, Mäkelä J, Karttunen TJ, Mäkinen MJ. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2005;41:2645-2654.
- 20 Castell JV, Gomes-Lechon MJ, David M, Fabra R, Trullenque R, Heinrich PC. Acute phase protein response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. *Hepatology* 1990;12:1179-1186.

- 21 Nozoe T, Korenaga D, Futatsugi M, Saeki H, Maehara Y, Sugimachi K. Immunohistochemical expression of C-reactive protein in squamous cell carcinoma of the esophagus – significance as a tumor marker. *Cancer Letters* 2003;192:89-95.
- 22 Wigmore SJ, Walsh TS, Lee A, Ross JA. Pro-inflammatory cytokine release and mediation of the acute phase protein response in fulminant hepatic failure. *Intensive Care Med* 1998;24:224-9.
- 23 Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Fröhlich M, Koenig W, Waltenberger J, Fitzsimmons C, Hombach V. C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1386-1392.
- 24 Nozoe T, Matsumata T, Kitamura M, Sugimachi K. Significance of preoperative evaluation of serum C-reactive protein as an indicator of prognosis in colorectal cancer. *Am J Surg* 1998;176:335-338.
- 25 McMillan DC, Wotherspoon HA, Fearon KC, Sturgeon C, Cooke TG, McArdle CS. A prospective study of tumor recurrence and the acute-phase response after apparently curative colorectal cancer surgery. *Am J Surg* 1995;170:319-322.
- 26 Wigmore SJ, McMahon AJ, Sturgeon CM, Fearon KC. H. Acute-phase protein response, survival and tumour recurrence in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 2001;88(2):255-260.
- 27 Chung Y-C and Chang Y-F. Serum C-reactive protein correlates with survival in colorectal cancer patients but is not an independent prognostic indicator. *Eur J Gastro Hep* 2003;15:369–373.
- 28 Wong VK, Malik HZ, Hamady ZZ, Al-Mukhtar A, Gomez D, Prasad KR, Toogood GJ, Lodge JP. C-reactive protein as a predictor of prognosis following curative resection for colorectal liver metastases. *Br J Cancer* 2007;96:222-225.
- 29 Nielsen HJ, Christensen IJ, Sørensen S, Moesgaard F, Brunner N and The RANX05 Colorectal Cancer Study Group. Preoperative Plasma Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 and Serum C-Reactive Protein Levels in Patients With Colorectal Câncer. *Ann Surg Oncol* 2000;7(8):617-23.

- 30 Erlinger TP, Platz EA, Rifai N, Helzlsouer KJ. C-Reactive Protein and the Risk of Incident Colorectal Cancer. *JAMA*. 2004;291:585-590.
- 31 Gunter MJ, Stolzenberg-Solomon R, Cross AJ, Leitzmann MF, Weinstein S, Wood RJ, Virtano J, Taylor PR, Albanes D, Sinha R. A prospective study of serum c-reactive protein and colorectal cancer risk in men. *Cancer Res* 2006;66:2483-2487.
- 32 Helzlsouer KJ, Erlinger TP, Platz EA. C-reactive protein levels and subsequent cancer outcomes: results from a prospective cohort study. *Eur J Cancer* 2006;42:704-707.
- 33 Ito Y, Suzuki K, Tamakoshi K, Wakai K, Kojima M, Ozasa K, Watanabe Y, Kawado M, Hashimoto S, Suzuki S, Tokudome S, Toyoshima H, Hayakawa N, Kato K, Watanabe M, Ohta Y, Maruta M, Tamakoshi A. Colorectal cancer and serum C-reactive protein: a Case-control Study Nested in the JACC Study. *J Epidemiol* 2005;15(suppl II):185-189.

ANEXO 1 – CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA GRUPO CONTROLE

Expressão Imunoistoquímica da Proteína C Reativa no Adenocarcinoma de Reto

O Rio Grande do Sul é uma das regiões do Brasil onde mais se encontra o câncer de reto. O reto é a porção final do intestino grosso. Sabemos que uma das formas de aumentar a chance de cura da doença é através do conhecimento da sua origem e desenvolvimento e através do diagnóstico precoce. Estamos realizando uma pesquisa em pacientes acometidos pelo câncer de reto e necessitamos de um grupo de pessoas sem a doença, como você, para adequada comparação.

Queremos examinar seu intestino grosso através de um exame chamado colonoscopia, que é realizado com uma sonda endoscópica que permite a visualização do interior do intestino. Antes do exame você será submetido a um preparo constituído de dieta alimentar e uso de laxantes, para adequada limpeza intestinal. A sonda será introduzida pelo ânus logo após você receber alguns medicamentos sedativos, que lhe deixará levemente sonolento e lhe permitirá tolerar melhor o exame. A maioria das pessoas tolera muito bem este exame, que dura entre 10 e 30 minutos, na maioria das vezes. Será coletado material (biópsias) para pesquisa. Existe também um risco, muito pequeno, de complicações pelos exames, tais como reações alérgicas, sangramento ou perfuração do intestino, podendo, nesses casos, ser necessário transfusões de sangue ou também cirurgias.

O resultados do exame estará pronto em, aproximadamente, sete a dez dias e você será informado e orientado para tratamento, caso necessário.

Eu,....., fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, dos desconfortos ou dos riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, em face destas informações.

O profissional certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Porto Alegre, .../.../...

Assinatura do paciente

Dr. Luis Fernando Moreira

Fone: 9808 0808

ANEXO 2 – ARTIGO

Immunohistochemical expression of c-reactive protein in rectal adenocarcinomas

Paulo de Carvalho Contu^{ab}, Simone Santana Contu^a, Mario Antonello Rosito^b, Luis Fernando Moreira^a

^aPost-Graduate Programme in Surgery, Hospital de Clínicas de Porto Alegre University Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar, Santa Cecília, Porto Alegre, RS, PO 90.035-930 Brazil.

^bDivision of Coloproctology, Department of Surgery, Hospital de Clínicas de Porto Alegre University Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Ramiro Barcelos, 2350 – sl 600, Santa Cecília, Porto Alegre, RS, PO 90.035-930 Brazil

Correspondence to: Paulo de Carvalho Contu, MD, Casemiro de Abreu, 900/302 – Porto Alegre (RS) PO 90420-000, Brazil. Telephone/fax: 055 21 51 37371374. contu@terra.com.br.

Abstract

Background and aims. The possible involvement of inflammation on colorectal carcinogenesis has potential prognostic, preventive and therapeutic implications. We investigated immunohistochemically whether C-reactive protein (CRP) is expressed in human primary rectal adenocarcinoma and assessed its relationship with clinicopathological findings.

Materials and methods. Ninety-one rectal cancer samples and 22 normal control samples were analyzed. CRP was evaluated using immunohistochemical examination.

Results and findings. Cell accumulation of CRP was observed in 65 (71%) out of 91 patients with adenocarcinoma of the rectum and in all 22 control cases ($p < 0.01$). No significant difference was observed regarding to clinicopathological features or survival rates, but a linear correlation between the positivity proportion of CRP and Dukes-Turnbull stage ($p = 0.005$) was observed.

Interpretation/conclusions. These data suggest that CRP might play a role in rectal carcinogenesis, but seems to not affect prognosis. Additional studies are warranted in larger population samples.

Key words: C-reactive protein; rectal cancer; inflammation; colorectal carcinogenesis; immunohistochemical expression; prognosis.

Introduction

The involvement of chronic inflammation on colorectal carcinogenesis has been studied for a long time. Inflammatory bowel diseases, such as ulcerative colitis and Crohn's disease, have been associated with increased risk of colorectal cancer¹. Several studies have suggested a reduced risk of colorectal cancer associated with non steroid anti inflammatory agents²⁻⁵.

C-reactive protein (CRP) is an acute phase protein which increases in response to infection, trauma, burning, tissue infarction, inflammation and tumours⁶. CRP expression has been known to be induced by pro-inflammatory cytokines⁷ and it is well known that it is synthesized mainly in hepatocytes. However, there have been some investigations presenting that an excessive elevation of CRP is occasionally found in such patients with liver failure who are requiring liver transplantation⁸.

The significance of serum elevation of CRP as an indicator of tumour malignant potential and the outcome of patients have been investigated in human gastrointestinal carcinomas^{9,10}, renal cell

carcinoma¹¹, ovarian carcinoma¹², or myeloma¹³. However, the origin of the serum elevation of CRP in patients with malignant tumours has not been clarified yet and it also remains controversial whether CRP is solely derived from hepatocyte production as a response to inflammatory events or from synthesis and accumulation in tumour cells. In this study, we investigated immunohistochemically whether CRP is expressed in rectal tumour cells and evaluated its significance and malignant potential in colorectal carcinogenesis.

Materials and methods

Tissue samples were collected from 91 patients with primary and sporadic rectal adenocarcinomas treated by surgical resection in the Colorectal Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre University Hospital. None of the patients received neoadjuvant therapy. There were 51 females and 40 males, and the age ranged from 19 to 84 (mean of 61) years. Follow-up of the patients was carried out up to 60 months or up to tumour-related death. As a control group, rectal biopsies obtained from 22 patients submitted to colonoscopy and showing a normal histopathological diagnosis were studied. There were 7 males and 15 females with mean age of 49 (range = 30 to 75) years. None of the control subjects had any family history of cancer.

The study was performed after approval by the Ethics and Scientific Committees of University Hospital and written informed consent as obtained from all participants.

Immunohistochemical assessment of the 113 paraffin-embedded tissues was performed using a sheep antihuman polyclonal CRP antibody (Biogenesis Ltd, England, UK) diluted at 1:100. To determine the antibody reactivity, the avidin-biotin peroxidase complex (ABC method; kit LSAB DAKO) was used. Positive cases were identified through visualization of a brownish cellular granulation stained by the diaminobenzidine (DAB) chromogen. As positive controls, samples of liver tissue were used. Reactions conducted without the primary antibody were used as negative controls in liver samples as well.

Inflammatory cells depicting immunoreactivity were used as internal positive controls. Cases were identified as positive if more than 10% of tumour cells in a 400 magnification microscopic field showed accumulation of CRP (Figure 1). Each slide was analyzed by two independent pathologists.

Variables were described by mean and standard error. The chi-square test and student's t-test were used to compare the clinicopathological data. The cumulative survival rates were calculated by the Kaplan–Meier method and significance by logrank. Multivariate analysis was calculated according to Cox's proportional hazards model in a forward stepwise manner. Statistical significance was considered at p level of 5%. All analyses were calculated using the SPSS 10.0 software.

Results

Cellular accumulation of CRP was observed in 65 (71%) out of the 91 patients with rectal adenocarcinomas and in all 22 controls ($p < 0.01$).

Clinicopathological characteristics of patients and controls are shown in Table 1. No significant difference was observed regarding age, sex, tumour location, histological differentiation and tumour depth or lymph node involvement. However, a linear correlation was observed between the positivity proportion of CRP and Dukes-Turnbull stage ($p = 0.005$; Figure 2).

There were no significant differences between 5-year survival rates in patients with rectal adenocarcinomas expressing CRP as compared to those ones not expressing CRP. Additionally, a multivariate analysis demonstrated that Dukes-Turnbull tumour staging ($p = 0.01$) and curative resection ($p = 0.02$) were found to be independent prognostic factors in patients with rectal adenocarcinomas (Table 2).

Discussion

Chronic inflammation has been linked to several solid malignancies, including cancers of the oesophagus, stomach, liver, pancreas, kidney and prostate. Possible mechanisms by which inflammation may contribute to carcinogenesis include the production of cytokines and growth factors that favour tumour cell growth, the induction of cyclooxygenase-2 in macrophages and epithelial cells, and the generation of mutagenic reactive oxygen and nitrogen species¹⁴.

The acute phase synthesis of CRP is upregulated by proinflammatory cytokines as interleukin-1, interleukin-6, and tumour necrosis factor, which act as autocrine growth factors for neoplasms⁷. It is known that CRP is synthesized mainly in hepatocytes. Actually, Nozoe et al¹⁵ were the first authors to demonstrate the immunohistochemical expression of CRP in cells of oesophageal squamous cell carcinomas, suggesting that serum elevation of the protein may be partially derived from immediately production of the substance by the tumour cells as well as by the synthesis into the hepatocytes as a bioresponse to cancer.

Many studies have demonstrated association between CRP and colorectal cancer. Nozoe et al reported increased incidences of liver metastases, peritoneal seedings, microscopic lymph nodes involvement, intravascular invasion and poor prognosis in patients with a preoperatively increased serum CRP level than in those with a negative serum protein level¹⁶. McMillan et al demonstrated a significantly higher recurrence rate after curative resection of colorectal cancer in patients with an acute-phase response compared to those without acute-phase response¹⁷. Wigmore et al have showed an increased acute phase protein response in more than a third of patients presenting colorectal cancer associated with more frequent local tumour invasion, fewer curative resections and higher carcinoembryonic antigen (CEA) concentration, but without showing prognostic significance⁹, in agreement with Chung e Chang¹⁸. In the study of Nielsen et al, serum CRP was found to be a Dukes independent prognostic variable and was found to identify a subgroup of curatively operated patients at

risk for decreased survival¹⁹. Erlinger et al have reported an increased plasma concentrations of CRP among individuals who subsequently develop colon cancer, supporting the hypothesis that inflammation is a risk factor for the development of colon cancer in average-risk individuals²⁰.

However, all of these investigations studied serum CRP. To the best of our knowledge, till now, there is no reported investigation on the immunohistochemical expression of CRP in human colorectal tumours. The rationale to perform this investigation is that an immunohistochemical examination would demonstrate whether rectal tumours do express CRP and if so, which sites the protein would be revealed.

Cell expression of CRP was observed in 65 of the 91 patients with rectal adenocarcinomas and in all control samples. These data confirm the hypothesis that CRP can be found in other tissues, including neoplasia, beyond the liver. The distribution was significantly different between cases and controls (71% vs 100%), indicating the influence of inflammation in colorectal carcinogenesis.

It was not demonstrated, in the current study, association of CRP expression and prognosis, but a linear trend test indicates correlation of decreasing expression of CRP between controls and Dukes' stages, and therefore, these findings may suggest a CRP role in tumour progression, mainly at early stages. Indeed, in immunohistochemical analysis of CRP among controls, an intense expression of CRP was observed in the mucus of the cells. This feature was absent or lacking intensity in neoplastic tissues, which may indicate a modified capacity or function in the production and release of CRP. Hypothetically, this may suggest that CRP may play as a protective factor of rectal mucosa which deteriorates with tumour progression. However, lack of prognostic significance due to a small or inadequate sample to determine differences among subgroups should be also considered.

In conclusion, the inflammation is important in rectal carcinogenesis, but it seems to not affect prognosis. It would be important to carry out this study with a larger sample, including adenomas, also correlating CRP expression with plasma levels in order to examine the hypothesis of cellular CRP

contribution to serum levels, effect of the inflammation in colorectal carcinogenesis and to reassess this association with prognosis.

Acknowledgement

This work was partially granted by the HCPA University Hospital Research Fund (FIPE) and by the Programme of Doctorate Accrual for National Universities of the Brazilian Post-Graduate Agency (PRODOC-CAPES 2003-2008).

References

1. Munkholm P (2003) Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 18(suppl 2):1-5
2. Baron JA (2003) Epidemiology of non-inflammatory drugs and cancer. *Prog Exp Tumor Res* 37:1-24.
3. Baron JA, Cole BF (2003) A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med* 348:891-899.
4. Huls G, Koornstra JJ (2003) Non-steroidal anti-inflammatory drugs and molecular carcinogenesis of colorectal carcinomas. *Lancet* 362: 230-232.
5. Giovannucci E, Egan KM (1995) Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med* 333:609-614.
6. Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-867.
7. Castell JV, Gomes-Lechon MJ (1990) Acute phase protein response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. *Hepatology* 12:1179-1186.

8. Wigmore SJ, Walsh TS (1998) Pro-inflammatory cytokine release and mediation of the acute phase protein response in fulminant hepatic failure. *Intensive Care Med* 24:224-229.
9. Wigmore SJ, MacMahon AJ (2001) Acute-phase protein response, survival and tumour recurrence in patients with colorectal cancer. *Br J Surg* 88:255–260.
10. Nozoe T, Saeki H (2001) Significance of preoperative elevation of serum C-reactive protein as an indicator of prognosis in esophageal carcinoma. *Am J Surg* 182:197–201.
11. Miyata Y, Koga S (2001) Predictive values of acute phase reactants, basic fetoprotein, and immunosuppressive acidic protein for staging and survival in renal cell carcinoma. *Urology* 58:161–164.
12. Kodama J, Miyagi Y (1999) Serum C-reactive protein as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 82:107–110.
13. Sezer O, Niemoller K (2000) Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol* 79: 574–577.
14. Mazhar D, Ngan S (2006) C-reactive protein and colorectal cancer. *Q J Med* 99:555-559.
15. Nozoe T, Korenaga D (2003) Immunohistochemical expression of C-reactive protein in squamous cell carcinoma of the esophagus - significance as a tumor marker. *Cancer Let* 192:89–95.
16. Nozoe T, Matsumata T (1998) Significance of preoperative evaluation of serum C-reactive protein as an indicator of prognosis in colorectal cancer. *Am J Surg* 176:335-8.
17. McMillan DC, Wotherspoon HA (1995) A prospective study of tumor recurrence and the acute-phase response after apparently curative colorectal cancer surgery. *Am J Surg* 170:319-22.
18. Chung YC, Chang YF (2003) Serum C-reactive protein correlates with survival in colorectal cancer patients but is not an independent prognostic indicator. *Eur J Gastro Hep* 15:369–373.

19. Nielsen HJ, Christensen IJ (2000) Preoperative Plasma Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 and Serum C-Reactive Protein Levels in Patients With Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol* 7(8):617-623.
20. Erlinger TP, Platz EA (2004) C-Reactive Protein and the Risk of Incident Colorectal Cancer. *JAMA* 291:585-590.

Figures

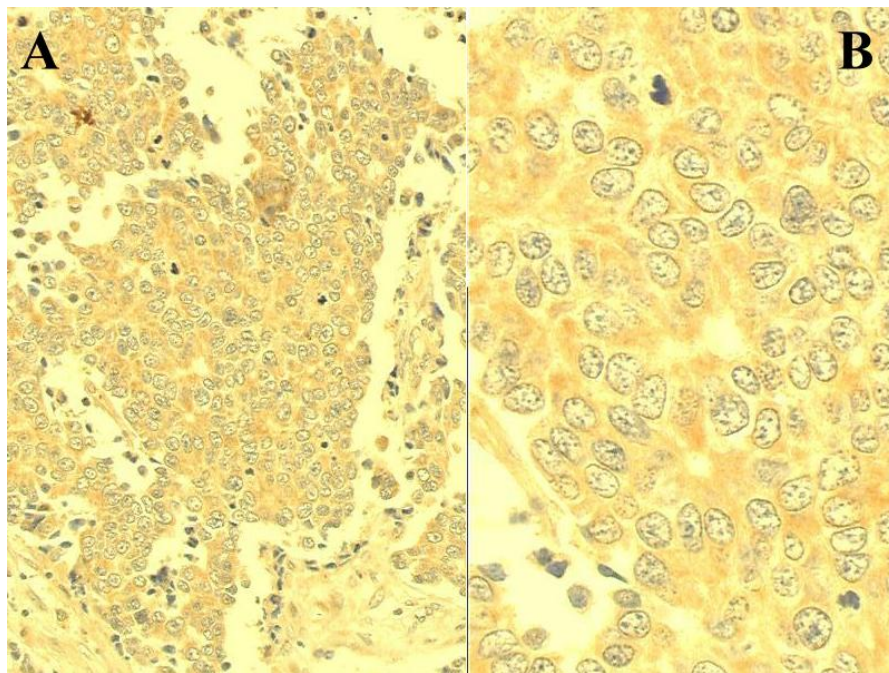


Figure 1. CRP immunorexpression in a sample of rectal adenocarcinoma. Positive cells display cytoplasmic brownish granulation stained by the DAB chromogen (ABC method; A: 200X; B: 500X).

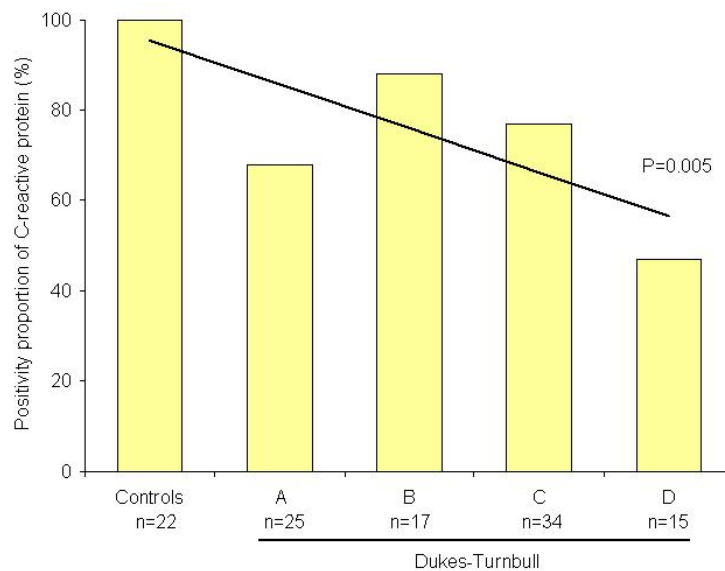


Figure 2. Graphic representation of the positivity proportion of C-reactive protein in rectal tumours (n=91) compared with controls (n=22).

Table 1. Clinicopathological features of controls versus cases and of deceased cases versus survivors

<i>Features</i>	<i>Controls (n=22)</i>	<i>Cases (n=91)</i>	<i>P value</i>	<i>Deaths (n=42)</i>	<i>Survivors (n=49)</i>	<i>P value</i>
Age (median, se), years	49.1 (13.4)	60.6 (14.2)	<0.01	62.1 (15.3)	59.4 (13.3)	0.38
Male: Female	7:15	40:51	0.30	22:20	18:21	0.13
Location, from anal verge(mean, se), cm		6.9 (3.4)	—	6.5 (3.1)	7.1 (3.6)	0.39
Differentiation, n (%)						
Well		9 (10)	—	1 (2)	8 (16)	<0.01
Moderate		71 (78)		32 (76)	39 (80)	
Poor		11 (12)		9 (21)	2 (4)	
Depth of invasion, n (%)						
Submucosa		5 (6)	—	1 (2)	4 (8)	0.07
Muscularis propria		24 (26)		7 (17)	17 (35)	
Adventitia		15 (17)		10 (24)	5 (10)	
Surrounding tissues		47 (52)		24 (57)	23 (47)	
Lymph node positive cases, n (%)		48 (53)	—	31 (74)	17 (35)	<0.01
Circumferential invasion, n (%)		n=89 7 (8)	—	6 (15)	1 (2)	0.04
Dukes-Turnbull						
A		25 (28)	—	5 (12)	20 (41)	<0.01
B		17 (19)		5 (12)	12 (25)	
C		34 (37)		22 (52)	12 (25)	
D		15 (17)		10 (24)	5 (10)	
Adjuvant therapy, n (%)		n=85				
Radiotherapy (RT)		5 (6)	—	4 (10)	1 (2)	0.23
Chemotherapy (CT)		3 (4)		1 (3)	2 (4)	
Combined CT + RT		14 (17)		4 (10)	10 (22)	
no adjuvant therapy		63 (74)		30 (77)	33 (72)	
CRP expression ≥ 10 %, n (%)	22 (100)	65 (71)	<0.01	30 (71)	35 (71)	0.99

Data are presented as mean (standard error), medium (interquartile range: 25th to 75th percentile) or counting (percentage).

Table 2. Relationship between clinicopathological features and death in patients with rectal tumours.

Features (n)	Death		HR	CI 95%	P value
	n	%			
CRP expression					
≥ 10 % (65)	30	46.2	1.31	0.58 to 2.94	0.51
< 10 % (26)	12	46.2	1.00		
Age					
≥ 60 years (55)	27	49.1	1.32	0.66 to 2.64	0.43
< 60 years (36)	15	41.7	1.00		
Circumferential wedge					
Positive (7)	6	85.7	3.64	1.26 to 10.51	0.02
Negative (82)	34	41.5	1.00		
Dukes-Turnbull					
A (25)	25	5	20.0	1.00	0.01
B (17)	17	5	29.4	1.21	0.33 to 4.48
C (34)	34	22	64.7	4.59	1.72 to 12.27
D (15)	15	10	66.7	4.85	1.25 to 18.77

Data presented as counts and percentages. HR: *hazard ratio* by a multiple Cox model; CRP: Tumour expression of C reactive protein as measured by percentage of positive cells; CI 95%: 95% confidence interval. *Cox model including only those subjects (n=81, events=37) with thorough observations.