



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

**Estudo do valor prognóstico da oncoproteína p53  
no adenocarcinoma do cólon e reto e a sua  
correlação com o grau de diferenciação  
histológica, localização e prognóstico**

**Leonor Aniceto Gomes**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Medicina**  
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Professor Doutor Javier Muñoz

**Covilhã, março de 2018**



## Agradecimentos

Um agradecimento especial aos meus pais, por sempre me apoiarem e nunca me deixarem desanimar nos momentos críticos.

Um Obrigada ao TS por ter sido o meu forte ao longo destes 6 anos.

Obrigada aos meus amigos por todo o apoio.

Obrigada ao meu orientador da tese, Professor Doutor Javier Muñoz, por toda a disponibilidade e apoio demonstrado ao longo deste trabalho.

## Resumo

### Introdução:

Atualmente o cancro é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade mundial.

É imperativo o estudo aprofundado da doença oncológica de forma a obter-se um diagnóstico mais precoce, tratamentos mais eficazes e prognóstico mais fiável.

O cancro colorretal (CCR) é o terceiro mais comum a nível mundial e é o terceiro mais mortal tanto em mulheres como em homens.

Nas passadas décadas, a taxa global de sobrevivência do CCR não evoluiu favoravelmente e os fatores de prognóstico até à data são insuficientes (estadiamento TNM, a presença/ausência de doença residual pós-cirurgia, classificação histológica, presença/ausência de invasão ganglionar e/ou metástases à distância).

No sentido de melhorar a previsão da evolução clínica e determinar a abordagem terapêutica mais adequada, torna-se crucial investigar a existência de novos marcadores moleculares que sirvam como fatores de prognóstico isolados ou em combinação com os dados clínico-histopatológicos.

A oncoproteína p53 regula vários processos metabólicos como a apoptose, a reparação do ADN e o ciclo celular. A perda desta proteína em 50% dos cancros sugere um papel importante na carcinogénese.

Este marcador molecular tem sido alvo de exploração e investigação científica com o intuito de se perceber o seu papel na carcinogénese e estabelecimento como fator de prognóstico independente para diversos tipos de cancro. No entanto, no que concerne ao adenocarcinoma colorretal (ACR), a literatura existente revela resultados controversos quanto ao seu valor prognóstico.

### Objetivos:

- 1) Detetar através do método de coloração imunohistoquímica a expressão da oncoproteína p53.

- 2) Analisar a expressão imunohistoquímica da oncoproteína p53 e dos parâmetros clínico-histopatológicos em estudo.
- 3) Determinar o valor prognóstico da expressão da proteína p53 em pacientes com ACR e a sua correlação com os parâmetros clínico-histopatológicos: grau de diferenciação, localização, prognóstico dos pacientes.

## **Métodos:**

Estudo clínico-patológico retrospectivo realizado nas peças cirúrgicas de 32 doentes com mais de 50 anos que foram submetidos a (uma) ressecção cirúrgica do cancro do cólon e reto no Serviço de Cirurgia do Centro Hospitalar da Cova da Beira (CHCB) na Covilhã entre 2002-2005.

As amostras foram processadas histologicamente no serviço de Anatomia Patológica do CHCB. Foram de seguida classificadas de acordo com o tipo histológico, grau de diferenciação e TMN. Posteriormente, foram consideradas de acordo com a intensidade e percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53.

Os dados foram analisados estatisticamente considerando-se um valor  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo.

## **Resultados:**

Foi encontrada uma correlação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre a expressão imunohistoquímica de células marcadas pela oncoproteína p53 e o prognóstico dos pacientes. Não se verificaram resultados estatisticamente significativos entre a “expressão imunohistoquímica de células marcadas pela oncoproteína p53” e a “localização do tumor” e o “grau de diferenciação histológico”. Ao fim de 10 anos a mortalidade foi de 59,4%.

## **Palavras-chave**

Adenocarcinoma colorretal, p53, IHQ, localização, grau de diferenciação histológica, prognóstico.



## Abstract

### Introduction:

Nowadays, cancer is one of the biggest causes of mortality and morbidity worldwide.

It is imperative to deepen the knowledge about cancer in order to get a better and precocious diagnostic, more effective treatments and more reliable prognostics.

Colorectal cancer is the third most common worldwide and it is the third most deadly in women and men.

In the past decade, the global survival rate of the CRC didn't evolve favourably and the prognostic factors until today aren't sufficient (TNM staging system, presence/absence of post-surgery residual disease, histologic classification, presence/absence of lymph nodes invasion and distant metastases).

With the intention of improving prognosis prediction and reaching a better therapeutic approach, it is crucial to search for new molecular markers that can be used as prognostic factors, isolated or in combination with the clinical-histopathological data.

The oncoprotein p53 regulates several metabolic processes such as apoptosis, DNA repair and cellular cycle. The loss of this protein in 50% of cancers suggests an important role in carcinogenesis.

This molecular marker has been target of research with the objective of discovering its role in carcinogenesis and to establish it as an independent prognostic factor of various cancers. However, for colorectal adenocarcinoma, the prevailing literature reveals controversial results as to its value as prognostic factor.

### Objectives:

- 1) Detect the oncoprotein p53 expression through immunohistochemical staining.
- 2) Analyse the immunohistochemical staining of the oncoprotein p53 and the clinical-histopathological parameters of this study.
- 3) Determine the prognostic value of p53 expression in patients with colorectal adenocarcinoma and its correlations with clinical-histopathological parameters: histological differentiation degree, location and prognostic.

## **Methods:**

Retrospective study accomplished in the surgical samples of 32 patients older than 50 years that were submitted to surgical resection of colorectal cancer in the Department of Surgery of Centro Hospitalar Cova da Beira in Covilhã (CHCB) between 2002-2005.

The samples were histologically processed in the Department of Pathologic Anatomy of CHCB. They were then categorized according to the histological type, differentiation degree and TNM staging system. Posteriorly, they were analysed according to the intensity and proportion of immunohistochemical staining by oncoprotein p53.

The data were statistically analysed by taking in consideration a p-value <0,05 as statistically significant.

## **Results:**

A significant statistic correlation ( $p < 0,05$ ) between the expression of immunohistochemical cells stained by the oncoprotein p53 and the prognostic of patients was found.

We did not verify any other significant results between the expression of immunohistochemical cells stained by the oncoprotein p53, location of the tumor and the histological differentiation degree. the mortality rate was 59,4% after 10 years.

## **Keywords**

Colorretal adenocarcinoma, p53, IHQ, location, histological differentiation degree, prognostic.



# Índice

1.	Introdução .....	1
1.1	Hipóteses a testar .....	2
1.2	Objetivos do Estudo .....	2
2.	Materiais e Métodos.....	3
2.1	Preparação e Determinação Imunohistoquímica .....	3
2.2	Análise Estatística .....	6
3.	Resultados .....	7
4.	Discussão.....	15
4.1	Limitações .....	19
5.	Conclusão .....	21
6.	Referências Bibliográficas .....	23
7.	Anexos.....	27



## Lista de Figuras

FIGURA 1 - ADENOCARCINOMA BEM DIFERENCIADO HEX 100	6
FIGURA 2 - ADENOCARCINOMA POUCO DIFERENCIADO HEX400	6
FIGURA 3 - ADENOCARCINOMA MODERADAMENTE DIFERENCIADO HEX 600	6
FIGURA 4 - ADENOCARCINOMA MODERADAMENTE DIFERENCIADO COM MUCO E MACIÇOS HEX100	6



## Lista de Gráficos

GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS SEGUNDO "GÉNERO" DOS PACIENTES (N=32)	7
GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS SEGUNDO A "IDADE" DOS PACIENTES (N=32)	7
GRÁFICO 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS SEGUNDO A "LOCALIZAÇÃO" DO TUMOR (N=32)	8
GRÁFICO 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS SEGUNDO A "DIFERENCIAÇÃO HISTOLÓGICA DO TUMOR"(N=32)	8
GRÁFICO 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS SEGUNDO O "ESTADIAMENTO" (N=32)	9
GRÁFICO 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS SEGUNDO A "INTENSIDADE DE EXPRESSÃO DA P53" (N=32)	9
GRÁFICO 7 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS SEGUNDO A "PERCENTAGEM DE CÉLULAS MARCADAS IMUNOHISTOQUIMICAMENTE PELA ONCOPROTEÍNA P53" (N=32)	10
GRÁFICO 8 - RELAÇÃO ENTRE A "PERCENTAGEM" DE CÉLULAS MARCADAS IMUNOHISTOQUIMICAMENTE PELA ONCOPROTEÍNA P53 E O "PROGNÓSTICO" DOS DOENTES	16
GRÁFICO 9 - RELAÇÃO ENTRE "INTENSIDADE DE MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA PELA ONCOPROTEÍNA P53" E O "PROGNÓSTICO" DOS PACIENTES	17



## Lista de Tabelas

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS SEGUNDO A "PERCENTAGEM DE CÉLULAS MARCADAS IMUNOHISTOQUIMICAMENTE PELA ONCOPROTEÍNA P53" E "GRAU DE DIFERENCIAÇÃO HISTOLÓGICA"	10
TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS SEGUNDO A "INTENSIDADE DE CÉLULAS MARCADAS IMUNOHISTOQUIMICAMENTE PELA ONCOPROTEÍNA P53" E "GRAU DE DIFERENCIAÇÃO HISTOLÓGICA"	10
TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS SEGUNDO A "PERCENTAGEM DE CÉLULAS MARCADAS IMUNOHISTOQUIMICAMENTE PELA ONCOPROTEÍNA P53" E A LOCALIZAÇÃO DO TUMOR	11
TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS SEGUNDO A "INTENSIDADE DE MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA PELA PROTEÍNA P53" E A "LOCALIZAÇÃO" DO TUMOR	11
TABELA 5 - RELAÇÃO ENTRE A "PERCENTAGEM" E A "INTENSIDADE" DE CÉLULAS MARCADAS IMUNOHISTOQUIMICAMENTE PELA ONCOPROTEÍNA P53	12
TABELA 6 - CORRELAÇÃO ENTRE A "PERCENTAGEM DE CÉLULAS MARCADAS IMUNOHISTOQUIMICAMENTE PELA ONCOPROTEÍNA P53" E O "PROGNÓSTICO DOS PACIENTES" E RESPETIVOS RISCOS RELATIVOS	13
TABELA 7 - CORRELAÇÃO ENTRE A "INTENSIDADE DE MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA PELA ONCOPROTEÍNA P53" E O "PROGNÓSTICO DOS PACIENTES" E RESPETIVOS RISCOS RELATIVOS	14





## Lista de Acrónimos

ABD	Adenocarcinoma Bem Diferenciado
ACR	Adenocarcinoma Colorretal
AMD	Adenocarcinoma Moderadamente Diferenciado
APD	Adenocarcinoma Pouco Diferenciado
CA	Cólon Ascendente
CCR	Cancro Colorretal
CD	Cólon Descendente
CHCB	Centro Hospitalar Cova da Beira
CS	Cólon Sigmóide
CT	Cólon Transverso
F	Feminino
IHQ	Imunohistoquímica
M	Masculino
N	Valor Absoluto
R	Reto



## 1. Introdução

O cancro colorretal (CCR) é das neoplasias malignas mais comuns no mundo, estimando-se que até 2030 aumente até 60%, levando ao aparecimento de mais 2,2 milhões de novos casos e a 1,1 milhões de mortes, com 394,000 mortes estimadas a ocorrerem anualmente (1,2). No panorama nacional, ocupa o 1º lugar relativamente à incidência e à mortalidade das neoplasias malignas, em ambos os sexos (3).

Apesar desta elevada prevalência, o CCR não se encontra distribuído uniformemente pelo mundo apresentando uma grande variação geográfica. A grande maioria dos casos (63%) encontra-se nos países desenvolvidos, facto atribuível a hábitos alimentares ou ambientais, que se juntam a um fundo de suscetibilidade genética que culmina no desenvolvimento desta neoplasia (2).

O CCR é um cancro que se desenvolve por várias fases, iniciando-se com a formação de pólipos (carcinoma benigno). Sendo o adenocarcinoma o subtipo de CCR mais comum, a carcinogénese inicia-se de um adenoma, que devido a acumulação de anormalidades cromossómicas, mutações genéticas, epigenéticas e consequente alteração do crescimento célula, pode converter-se em adenocarcinoma a uma taxa de 1-1,5% por ano (4).

O prognóstico do CCR depende principalmente do estadio TNM no momento de diagnóstico (5), com taxas de sobrevivência aos 5 anos de 90%, para tumores localizados e de 10% em doença metastática (2).

Atualmente os parâmetros clinico-patológicos que se sabe que influenciam o prognóstico são o tipo histológico, localização, grau de invasão, presença/ausência de metástases e a presença de doença residual após a cirurgia (5,6). No entanto, estes parâmetros são insuficientes para avaliar com precisão o risco individual (7).

Torna-se imperativo descobrir métodos adicionais que auxiliem na identificação dos pacientes com maior risco de recaída e que beneficiem de terapêuticas adjuvantes, de forma a se obterem prognósticos mais fiáveis (8). Surgiu então a investigação nos marcadores moleculares para o CCR, que isolados ou em combinação com as características clínico-histopatológicas, podem eventualmente melhorar o resultado clínico e determinar a abordagem terapêutica mais apropriada.

TP53 é um gene supressor tumoral que codifica a proteína p53 que faz por sua vez a paragem do ciclo celular em G1, permitindo a reparação do DNA, apoptose ou senescência da célula (9)(10).

A inativação do gene TP53 é um evento chave na progressão do CCR, permitindo a transição entre adenomas e carcinomas (8,11,12). Para além disso, é um evento tardio (13,14), com uma frequência de oncoproteína p53 mutada no ACR variando entre 30-70% e 40-50%(5,14).

No entanto, no que toca ao CCR, a correlação da expressão imunohistoquímica da oncoproteína p53 com os parâmetros clinico-histopatológicos mostra-se inconsistente nas diversas investigações realizadas até hoje.

## 1.1 Hipóteses a testar

Existe correlação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre a expressão imunohistoquímica (IHQ) da oncoproteína p53 no adenocarcinoma colorretal (ACR) e:

1. “Grau de diferenciação histológico do tumor”;
2. “Localização do tumor”;
3. “Prognóstico dos pacientes”;

## 1.2 Objetivos do Estudo

- A. Detetar através do método de coloração imunohistoquímica a expressão da oncoproteína p53.
- B. Analisar a expressão imunohistoquímica da oncoproteína p53 e os parâmetros clinico-histopatológicos em estudo.
- C. Determinar o valor prognóstico da expressão da proteína p53 em pacientes com ACR e a sua correlação com os parâmetros clínico-histopatológicos: grau de diferenciação, localização e prognóstico dos pacientes.

## 2. Materiais e Métodos

Estudo clínico-patológico retrospectivo realizado nas peças cirúrgicas de 32 doentes, com mais de 50 anos, que foram submetidos a uma ressecção cirúrgica de cancro do cólon e reto no Serviço de Cirurgia do Centro Hospitalar Cova da Beira (CHCB), entre 2002 e 2005.

Nenhum dos pacientes recebeu qualquer terapia neoadjuvante, tendo sido sujeitos a um follow-up pós-operatório de 10 anos.

Os critérios de inclusão de doentes no estudo foram: diagnóstico de ACR submetido a ressecção cirúrgica tumoral com intenção curativa; ausência de terapêutica neoadjuvante; idade igual ou superior a 50 anos.

Os critérios de exclusão não foram previamente definidos.

Os parâmetros clínico-histopatológicos avaliados incluíram: género, idade, localização do tumor, grau de diferenciação histológica do tumor, classificação TNM, intensidade e percentagem de células marcadas pela oncoproteína p53, e prognóstico.

O presente trabalho foi elaborado com recurso a pesquisa bibliográfica na base de dados *Pubmed*, utilizando para o efeito combinações das palavras e expressões “p53”, “colorectal cancer”, “prognosis”. Foi dada preferência a artigos com menos de 10 anos, que constituem grande parte da bibliografia, apesar de não ter havido restrição temporal da pesquisa. Os artigos apresentados na pesquisa foram restringidos aos idiomas inglês, português.

### 2.1 Preparação e Determinação Imunohistoquímica

O material deste estudo foi obtido de peças cirúrgicas ressecadas durante o período operatório, tendo sido posteriormente conservado numa solução de formaldeído 10% e enviado ao laboratório de Anatomia Patológica do CHCB, onde foi feita a descrição macroscópica da peça: tamanho, consistência, cor, presença ou ausência de lesão, distância à margem.

De seguida foram feitas amostras de aproximadamente 3 mm de espessura de diferentes localizações: zona de lesão, margem cirúrgica, zona de transição tecido normal/lesão e mucosa normal. Neste trabalho foram considerados exclusivamente amostras provenientes da zona de lesão.

Cada amostra foi colocada numa cassete e identificada para ser, posteriormente, submetida a desidratação, diafanização e, finalmente, impregnação em parafina (anexo 1). Neste último passo, as amostras são retiradas da cassete e colocadas em moldes de metal preenchidos com

parafina líquida a 62°C, que posteriormente são arrefecidas numa placa fria que se encontra a uma temperatura entre -10°C e -15°C primeiro dentro, e, depois, fora do molde metálico.

Após solidificação dos blocos de parafina procedeu-se à obtenção de cortes de 2 µm de espessura com um micrótomo tendo depois sido colocados, individualmente, num recipiente de água de fundo escuro de forma a avaliar-se a qualidade dos mesmos. Os cortes utilizáveis foram dispostos sobre lâminas de vidro, colocados em água e aquecidos em banho maria (50-55°C) de forma a remover eventuais artefactos.

Todas as amostras obtidas foram, de seguida, colocadas na estufa a 60°C de forma a promover-se a adesão do corte à lâmina, tendo este processo demorado uma hora para as lâminas destinadas à coloração com Hematoxilina-Eosina e um dia para aquelas que, posteriormente, foram sujeitas a imunomarcação para a oncoproteína p53.

Realizou-se a coloração com Hematoxilina-Eosina segundo o protocolo do CHCB (anexo 2).

As lâminas destinadas às técnicas de imunohistoquímica foram desparafinizadas com xilol e posteriormente hidratadas com concentrações decrescentes de etanol. Após este processo foram colocadas numa panela de pressão durante 6 minutos com um tampão citrato de pH= 6.0 e de seguida, procedeu-se à marcação para a oncoproteína p53 através do processamento em máquina de imunohistoquímica, de acordo com o protocolo definido pelo CHCB, que inclui 79 passos (anexo 3).

A avaliação da expressão imunohistoquímica do marcador molecular p53 foi realizada utilizando-se o anticorpo monoclonal dirigido à oncoproteína p53, o DO7, obtido a partir do sobrenadante de culturas de rato (DaKo Denmark, M7001). O anticorpo foi de seguida empregue em concentrações de 1:25, em solução diluente (Dako Cytomation, ChemMate - Antibody Diluent, S.2022). Posteriormente, adicionou-se um anticorpo secundário, no qual foram utilizadas imunoglobulinas biotiniladas de cabra anti-rato e anti-coelho (Dako REAL TM Link, Biotinylated Secondary Antibodies), tendo-se feito o bloqueio da peroxidase endógena pela aplicação da Dako REAL TM Peroxidase-Blocking Solution (Dako Denmark, S.2023), e de seguida, adicionado um complexo de estreptavidina peroxidase e diaminobenzidina ( Dako REAL TM detection System, Peroxidase/DAB+, K.5001), de forma a obter um complexo que, ao ligar-se ao antígeno específico do anticorpo primário, ativa o cromógeno (diaminobenzidina), conferindo uma cor acastanhada ao tecido onde a oncoproteína p53 é expressa.

Todos os passos referidos anteriormente foram intercalados por uma lavagem com Buffer Kit (Dako Cytomation, ChemMate, Buffer Kit, K.5006).

Por fim, realizou-se a coloração dos núcleos celulares com Hematoxilina de Meyer e fez-se a montagem das lâminas em meio sintético. Este processo foi executado paralelamente em lâminas de controlo constituídas por amostras de tecido mamário humano.

Após o processamento das amostras, as lâminas obtidas foram observadas ao microscópio ótico a uma ampliação de 400x por dois observadores independentes e foram classificadas segundo o grau de diferenciação histológica em: adenocarcinoma bem (ABD), moderadamente (AMD) ou pouco diferenciado (APD). Esta classificação teve como critério a presença de padrão glandular na amostra, pelo que a ausência total ou quase total deste padrão categorizava os tumores em APD, a presença na maior parte do tecido em ABD, e o grau intermédio em AMD (Figuras 1, 2, 3 e 4). Nos casos em que na mesma zona se classificavam graus diferentes, o ACR recebeu a categorização do grau menos diferenciado encontrado.

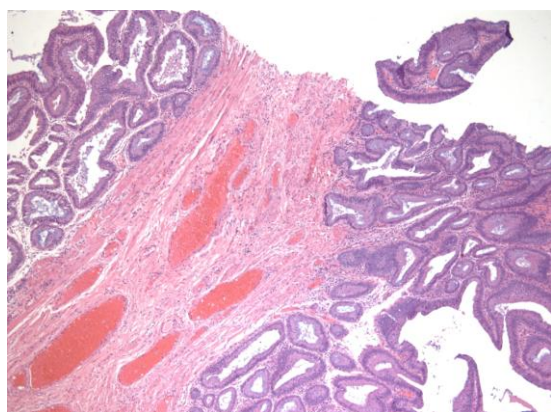


Figura 1 - Adenocarcinoma bem diferenciado HEx 100

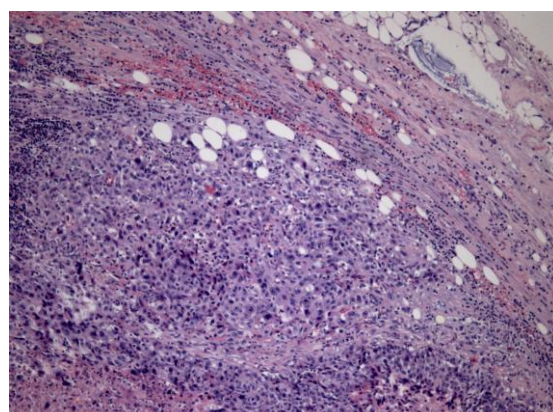


Figura 2 - Adenocarcinoma pouco diferenciado HEx400

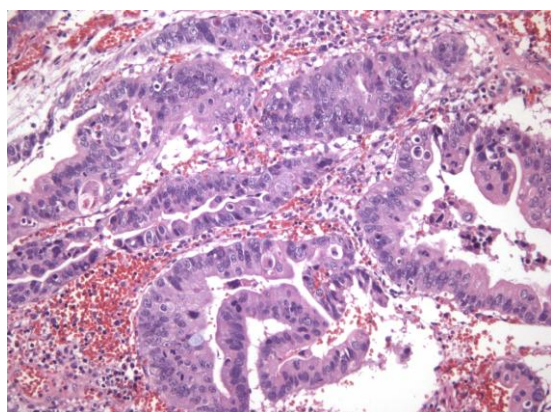


Figura 3 - Adenocarcinoma moderadamente diferenciado HEx600

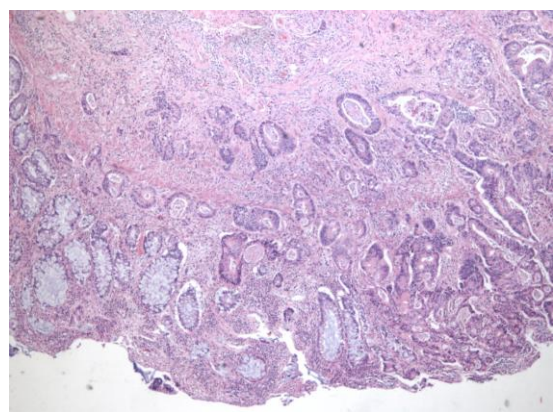


Figura 4 - Adenocarcinoma moderadamente diferenciado com muco e maciços HEx100

Relativamente à marcação imunohistoquímica, foi feita uma classificação das lâminas segundo a percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53 (0%, 25%, 50%, 75%, 100%), estabelecendo-se um cut-off > 0% para definir o resultado como positivo. Foi também feita a classificação das lâminas segundo a intensidade da marcação

imunohistoquímica, considerando-se “-“ na ausência de marcação, e “+”, “++” e “+++”, para uma marcação cada vez mais intensa.

O índice de marcação da oncoproteína p53 foi definido pela razão entre a percentagem de células tumorais coradas positivamente por cada 1000 células tumorais contadas a partir de áreas tumorais consecutivas, sendo a coloração nuclear o critério de positividade mais utilizado.

## 2.2 Análise Estatística

Para este estudo recorreu-se ao *Microsoft Office Excel 2007*® e *IBM SPSS 22.0*® para análise e tratamento dos dados obtidos.

Recorreu-se ao teste exato de Fisher para analisar a associação estatística entre percentagem e intensidade de expressão de células imunohistoquimicamente marcadas pela oncoproteína p53 e o grau de diferenciação histológica do tumor, localização, prognóstico, género e idade dos pacientes. A opção pelo teste não paramétrico prendeu-se com o facto de as variáveis não apresentarem uma distribuição normal, conforme o teste Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0,05$ ).

Procedeu-se ainda à análise univariada da estatística de frequências.

Foram calculados os riscos e riscos relativos nos casos relevantes.

Foi considerado um nível de significância de 5%.



### 3. Resultados

O estudo é constituído por 32 pacientes, dos quais 22 (69%) do género masculino e 10 (31%) do género feminino (Gráfico 1).

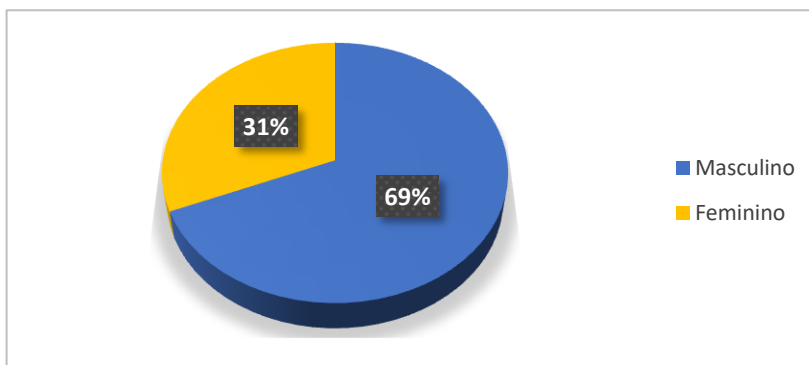


Gráfico 1 - Distribuição dos casos segundo "género" dos pacientes (N=32).

No parâmetro "idade", o grupo etário mais frequente foi o de ">70 anos" (53,1%), variando desde os 50 anos a mais de 70 anos (Gráfico 2).

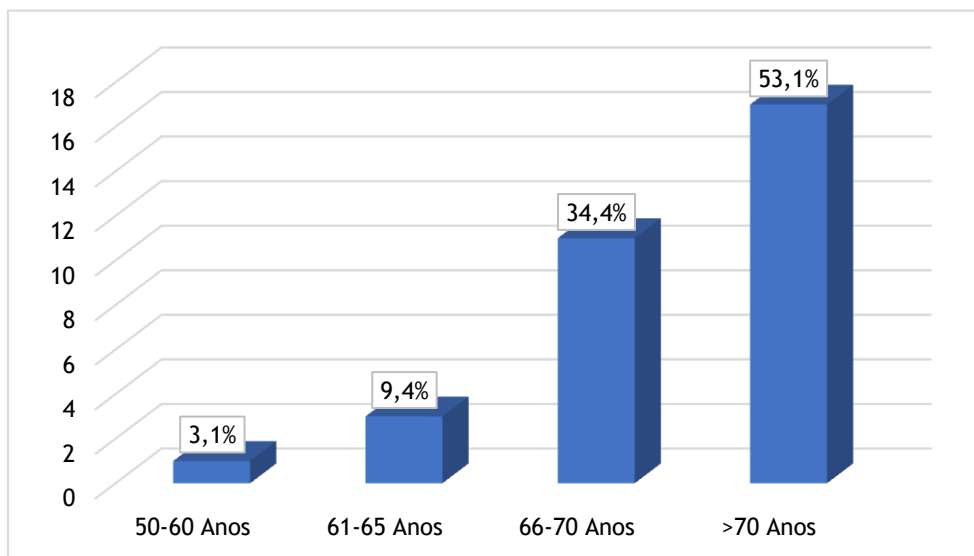


Gráfico 2 - Distribuição dos casos segundo a "idade" dos pacientes (N=32).

Relativamente à "localização do tumor" constatou-se um predomínio no lado esquerdo (definido como neoplasia do cólon descendente, cólon sigmóide e reto) com 29 casos (90,7%), em relação aos 3 casos localizados no lado direito (definido como neoplasia do cólon ascendente e cólon transverso) (Gráfico 3).

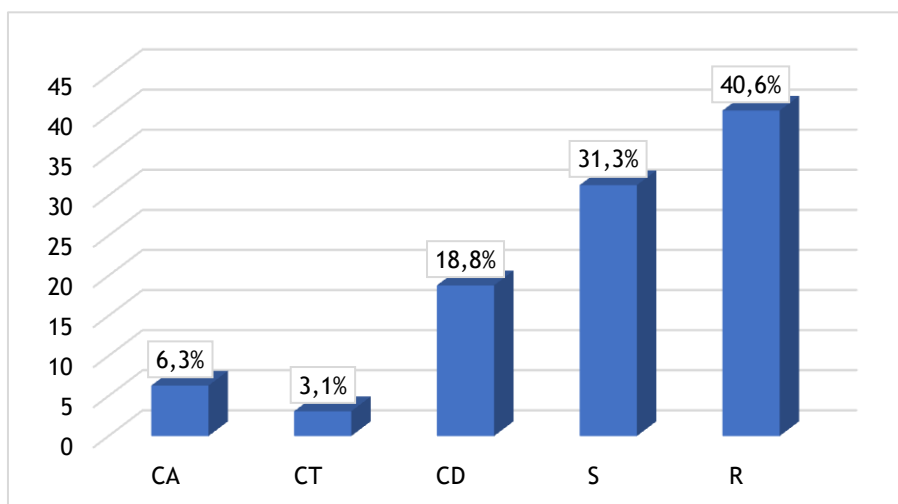


Gráfico 3 - Distribuição dos casos segundo a "localização" do tumor (N=32).

Em relação ao "grau de diferenciação histológica do tumor", 10 (31,3%) pacientes apresentaram ABD, 18 (56,3%) AMD e 4 (12,5%) APD (Gráfico 4).

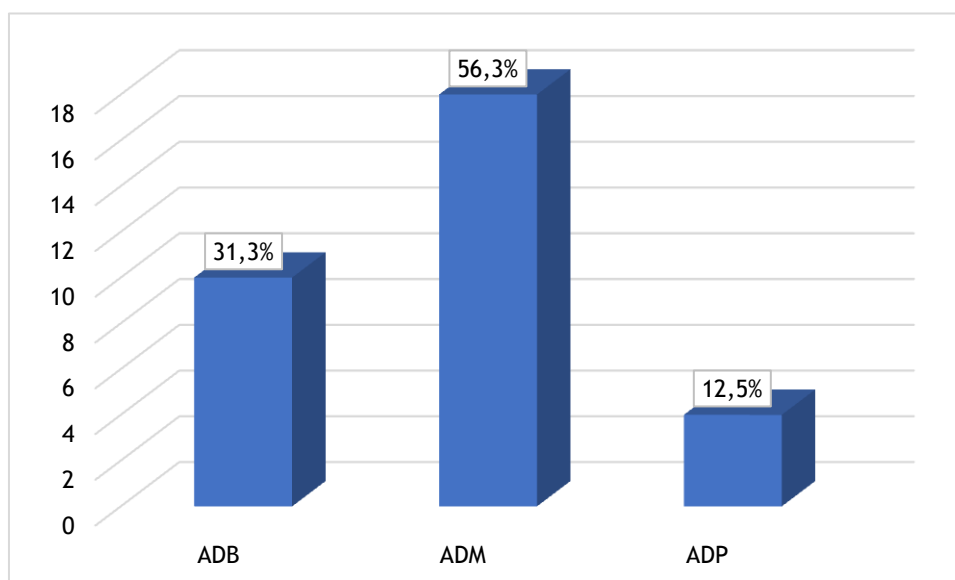


Gráfico 4 - Distribuição dos casos segundo a "diferenciação histológica do tumor"(N=32).

No que toca à "classificação TNM", verificou-se que 15 (46,9%) casos se apresentaram como tumores T2N0M0 (Gráfico 5).

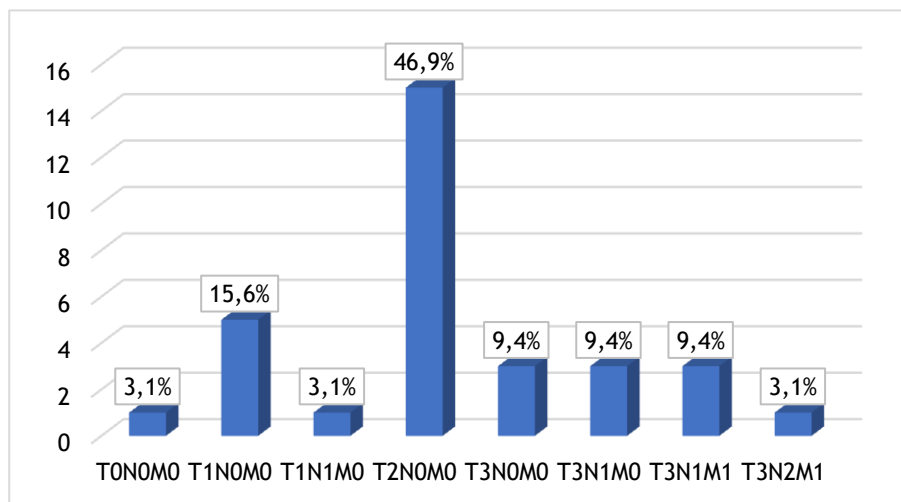


Gráfico 5 - Distribuição dos casos segundo o "estadiamento" (N=32).

No que diz respeito à intensidade da marcação imunohistoquímica pela oncoproteína p53 constatou-se que 11 (34,4%) dos tumores não exibiram marcação, contrariamente aos 21 (65,6%) casos que exibiram marcação (Gráfico 6).

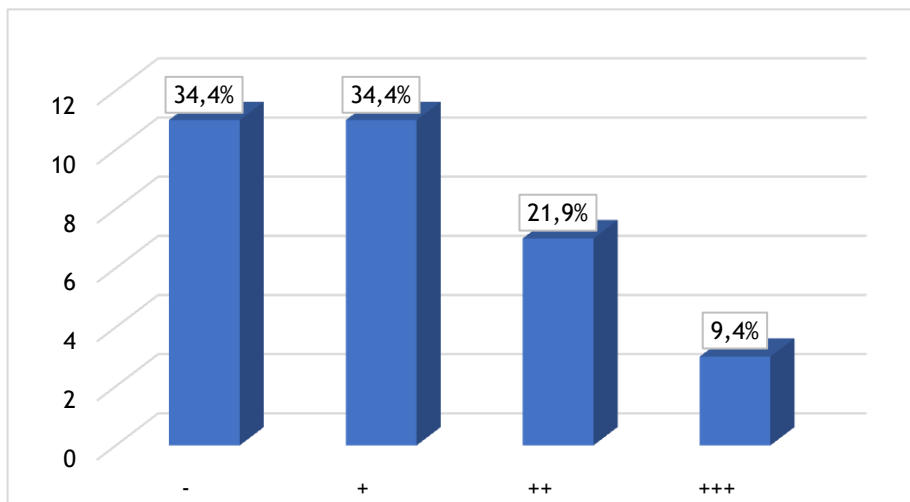


Gráfico 6 - Distribuição dos casos segundo a "intensidade de expressão da p53" (N=32).

Relativamente à "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53", 11 (34,4%) pacientes não apresentaram células imunohistoquimicamente marcadas pela p53 e apenas 1 (3,1%) paciente apresentou marcação máxima (100%) (Gráfico 7).

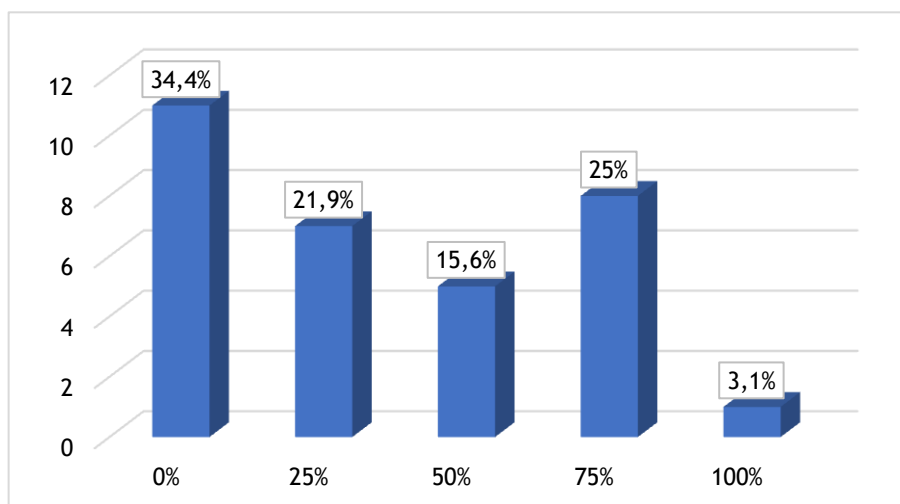


Gráfico 7 - Distribuição dos casos segundo a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" (N=32).

13 doentes (40,6%) sobreviveram e 19 (59,4%) faleceram durante o *follow-up* pós-operatório de 10 anos.

Ao analisar as hipóteses em estudo, obtiveram-se as seguintes distribuições:

Tabela 1 - Distribuição dos casos segundo a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e "grau de diferenciação histológica".

		GRAU DE DIFERENCIAÇÃO HISTOLÓGICA			TOTAL
		ABD	AMD	APD	
PERCENTAGEM DE CÉLULAS MARCADAS POR P53	0%	6	4	1	11
	25%	1	5	1	7
	50%	1	3	1	5
	75%	2	5	1	8
	100%	0	1	0	1
TOTAL		10	18	4	32

Tabela 2 - Distribuição dos casos segundo a "intensidade de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e "grau de diferenciação histológico".

		GRAU DE DIFERENCIAÇÃO HISTOLÓGICA			TOTAL
		ABD	AMD	APD	
INTENSIDAD E DE CÉLULAS MARCADAS POR P53	-	6	4	1	11
	+	2	8	1	11
	++	1	4	2	7
	+++	1	2	0	3
TOTAL		10	18	4	32

Tabela 3 - Distribuição dos casos segundo a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e a localização do tumor.

		LOCALIZAÇÃO DO TUMOR					TOTAL
		CA	CT	CD	S	R	
PERCENTAGEM DE CÉLULAS MARCADAS POR P53	0%	0	1	4	4	2	11
	25%	0	0	1	1	5	7
	50%	0	0	1	2	2	5
	75%	2	0	0	2	4	8
	100%	0	0	0	1	0	1
TOTAL		2	1	6	10	13	32

Tabela 4 - Distribuição dos casos segundo a "intensidade de marcação imunohistoquímica pela proteína p53" e a "localização" do tumor.

		LOCALIZAÇÃO DO TUMOR					TOTAL
		CA	CT	CD	S	R	
INTENSIDADE DE CÉLULAS MARCADAS POR P53	-	0	1	4	4	2	11
	+	0	0	1	3	7	11
	++	1	0	1	2	3	7
	+++	1	0	0	1	1	3
TOTAL		2	1	6	10	13	32

Analisando as tabelas, observa-se que a distribuição de casos pelos diferentes grupos é heterogénea, parecendo não existir relação entre a presença do marcador em estudo (oncoproteína p53) e qualquer uma das características de interesse.

A percentagem e a intensidade de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53 não apresenta uma relação estatisticamente significativa com o grau de diferenciação histológica do tumor ( $p=0,377$  e  $p=0,201$ , respetivamente)

É de destacar que 1 doente com APD revelou ausência de percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53 e que nenhum doente com APD teve 100% de células marcadas. Contrariamente aos AMD, no qual foi detetado um caso com percentagem máxima e 4 casos com ausência da mesma. Em relação aos doentes cm ABD, nenhum obteve percentagem máxima e 6 doentes revelaram ausência da mesma (Tabela 1).

Relativamente à intensidade é de salientar que entre os doentes com APD, 1 revelou ausência de "intensidade de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e que nenhum doente com este grau de diferenciação histológico obteve "intensidade máxima". Contrariamente aos AMD, que novamente, revelaram uma heterogeneidade de "intensidade".

Dos doentes com ABD, 6 revelaram ausência de “intensidade” e 1 obteve “intensidade” máxima (Tabela 2).

No que toca a localização do tumor, também não se verificou correlação estatística significativa com a “percentagem” e “intensidade” ( $p=0,145$  e  $p= 0,162$ ). De salientar que 1 doente apresentava expressão de “percentagem” máxima quando o tumor se localizava no cólon sigmóide e que 2 doentes apresentaram “intensidade” máxima no cólon sigmóide e reto. Em relação ao cólon transversal observou-se apenas 1 doente com “percentagem” 0% e “intensidade” “-“ (Tabela 3 e 4).

Quando se correlacionou a “percentagem” de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53 com a “intensidade” da mesma, foi obtida uma associação significativa com um valor de  $p= 0,000$ . Observou-se que a proporção de casos com “percentagem” 0% é estatisticamente maior no nível de intensidade mais baixo e casos com uma “percentagem” de 25% surgem estatisticamente associados a uma intensidade “+”. A proporção de casos com “percentagem” a 75% e a 100% foi estatisticamente superior nos níveis de intensidade “++” e “+++” (Tabela 5).

Tabela 5 - Relação entre a "percentagem" e a "intensidade" de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53.

		INTENSIDADE DE CÉLULAS MARCADAS POR P53				TOTAL	p-valor*	
		-	+	++	+++			
PERCENTAGEM DE CÉLULAS MARCADAS POR P53	0%	n	11	0	0	0	,000	
		%	100,0	,0	,0	,0		34,4
	25%	n	0	7	0	0		7
		%	,0	100,0	,0	,0		21,9
	50%	n	0	3	2	0		5
		%	,0	60,0	40,0	,0		15,6
	75%	n	0	1	5	2		8
		%	,0	12,5	62,5	25,0		25,0
	100%	n	0	0	0	1		1
		%	,0	,0	,0	100,0		3,1
TOTAL	n	11	11	7	3	32		
	%	34,4	34,4	21,9	9,4	100,0		

Foi ainda obtido um outro resultado estatisticamente significativo relativo à “percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53” e o “prognóstico dos pacientes” após o follow-up pós-operatório de 10 anos, tendo-se obtido um valor de  $p=0,042$ . Observou-se ainda que uma maior proporção de doentes sobrevive quando a “percentagem” de células marcadas pela oncoproteína p53 é 0% e o inverso, isto é, que uma maior “percentagem” corresponde a uma maior mortalidade (Tabela 6).

Ainda relativamente à “percentagem” de células marcadas por p53, o risco relativo e a probabilidade de morrer quando esta é “0%”, “25%”, “50%”, “75%” ou “100%” é, respetivamente, 3,1; 2,9; 2,3 ou 3,7 vezes maior do que com “0”.

Tabela 6 - Correlação entre a “percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53” e o “prognóstico dos pacientes” e respetivos riscos relativos.

		PROGNÓSTICO			TOTAL	RISCO RELATIVO	p-valor
		Morre	Vive				
PERCENTAGEM DE CÉLULAS MARCADAS POR P53	0%	n	3	8	11	1	,042
		%	27,3	72,7	34,4		
	25%	n	6	1	7	3,1	
		%	85,7	14,3	21,9		
	50%	n	4	1	5	2,9	
		%	80,0	20,0	15,6		
	75%	n	5	3	8	2,3	
		%	62,5	37,5	25,0		
	100%	n	1	0	1	3,7	
		%	100,0	,0	3,1		
TOTAL	n	19	13	32			
	%	59,4	40,6	100,0			

No que se refere à relação entre a “intensidade de marcação imunohistoquímica pela oncoproteína p53” e o “prognóstico dos doentes” também foi encontrada uma correlação estatisticamente significativa ( $p=0,032$ ), revelando que quanto menor a “intensidade” maior será o número de doentes vivos e o inverso, ou seja, quanto maior a “intensidade”, pior será o prognóstico. No que toca ao risco relativo a probabilidade de morrer com “+”, “++” ou “+++” é respetivamente 3; 2,6; e 2,4 vezes maior do que com “-“ (Tabela 7).

Tabela 7 - Correlação entre a "intensidade de marcação imunohistoquímica pela oncoproteína p53" e o "prognóstico dos pacientes" e respectivos riscos relativos.

		PROGNÓSTICO		Total	Risco Relativo	p-valor
		Morre	Vive			
INTENSIDADE DE CÉLULAS MARCADAS POR P53	-	n	3	8	11	,032
		%	27,3	72,7	34,4	
	+	n	9	2	11	
		%	81,8	18,2	34,4	
	++	n	5	2	7	
		%	71,4	28,6	21,9	
	+++	n	2	1	3	
		%	66,7	33,3	9,4	
	TOTAL	n	19	13	32	
		%	59,4	40,6	100,0	

Assim, após a análise das 2 tabelas das correlações entre a marcação da p53 e o "prognóstico" registaram-se 3 perdas de vida para a ausência de "percentagem" e de "intensidade" (Tabela 6 e 7), e para uma "percentagem" máxima não se observou qualquer caso com vida (Tabela 6), enquanto que para as intensidades "+", "++" e "+++" se observaram sobreviventes (Tabela 7).

Sucintamente, após a análise dos resultados do estudo pode-se dizer que uma maior "expressão" (percentagem e intensidade) de marcação imunohistoquímica pela oncoproteína p53 encontra-se associada a um pior prognóstico e como tal, morte, no universo deste estudo.



## 4. Discussão

Atualmente no ACR a decisão terapêutica baseia-se no prognóstico apoiado nas características anatomo-histopatológicas e principalmente no estadiamento TNM e na ressecção completa do tumor (5,6). No entanto, para o mesmo estadiamento tumoral, observam-se *outcomes* clínicos diferentes, evidenciando a necessidade de criar sistemas de estadiamentos baseados em marcadores moleculares que permitam uma base de decisão de baixo custo e uma melhor previsão prognóstica e na escolha de terapias adjuvantes (8).

Apesar de todo o progresso em relação ao conhecimento molecular no que toca ao cancro e à progressão molecular, poucos biomarcadores foram identificados como fatores de prognóstico independentes e, atualmente, nenhum deles é usado de forma rotineira na prática clínica (12).

Sabe-se que a oncoproteína p53 também se encontra presente no cancro do pulmão, do esófago, da mama e do cérebro. No entanto o seu real valor prognóstico no ACR permanece controverso (5,7,10,14-25).

A maior proporção de doentes do sexo masculino (69%) e com mais de 65 anos (87,5%) encontrada neste estudo está de acordo com a literatura mundial sobre o tema.

É do conhecimento geral que a incidência do ACR aumenta com a idade, sendo que 90% dos casos ocorre depois dos 50 anos e em 80% acima dos 65 anos de idade (2). Este facto foi evidenciado pela amostra em estudo, na qual grande parte dos indivíduos possuía mais de 65 anos (87,5%).

No que toca à localização do tumor, a maioria destes situava-se no CS (31,3%) e no R (40,6%), dados que, mais uma vez, são concordantes com o panorama descrito na literatura atual (18,19,25-27). O estudo da localização torna-se relevante visto haverem diferenças significativas nas características genéticas, anatomopatológicas e vias carcinogénicas dos tumores originados nas diferentes zonas do cólon, com conseqüente influência na evolução e resposta ao tratamento (26-28).

Quanto à distribuição por grau de diferenciação histológica do tumor, a maior parte das amostras obtidas foram classificadas como AMD (56,3%), no entanto, é de ressaltar que a atribuição deste grau nem sempre é de fácil comparação com outros estudos, porque apesar de haverem sistemas universais de classificação, grande parte deste processo depende do observador, sendo como tal um processo subjetivo, dependente de critérios relacionados com a experiência de quem o realiza.

De salientar que a mortalidade após follow-up pós-operatório de 10 anos rondou os 59%, percentagem esta não negligenciável.

No que toca às hipóteses deste estudo verificou-se que a “percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53” apresentou valor estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) quando relacionada com o “prognóstico” dos pacientes, isto é, se o paciente se encontra vivo ou morto após o follow-up pós-cirúrgico de 10 anos (Gráfico 8).

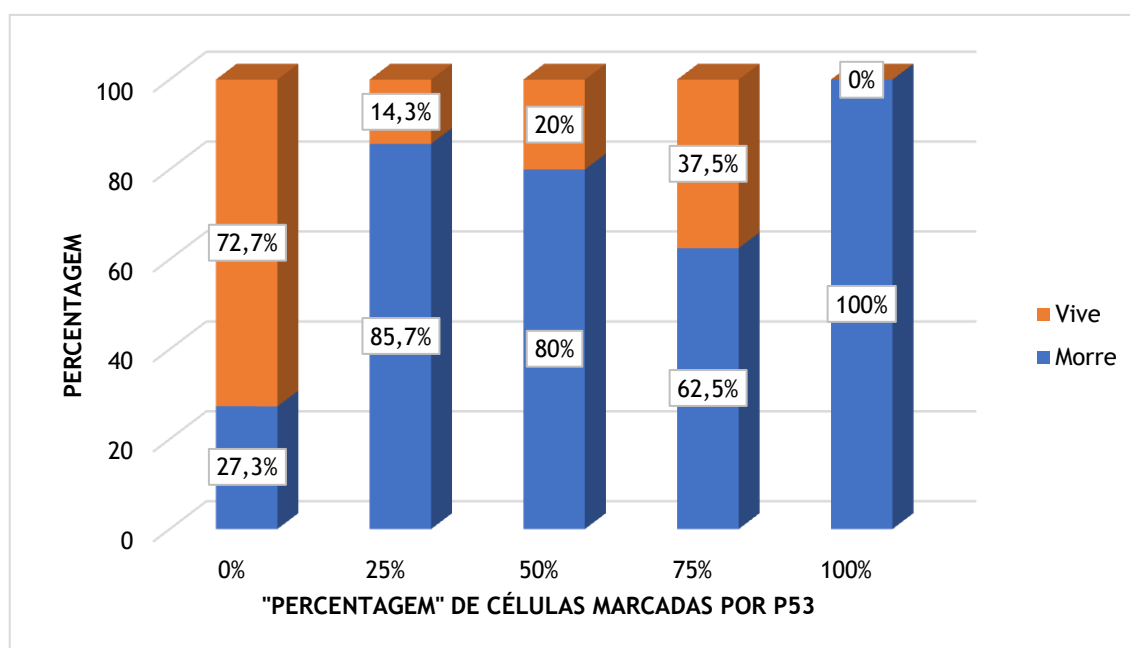


Gráfico 8 - Relação entre a "percentagem" de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53 e o "prognóstico" dos doentes.

Resultado semelhante foi obtido entre a “intensidade de marcação imunohistoquímica pela oncoproteína p53” e o “prognóstico” dos pacientes (Gráfico 9), em que se obteve uma correlação estaticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

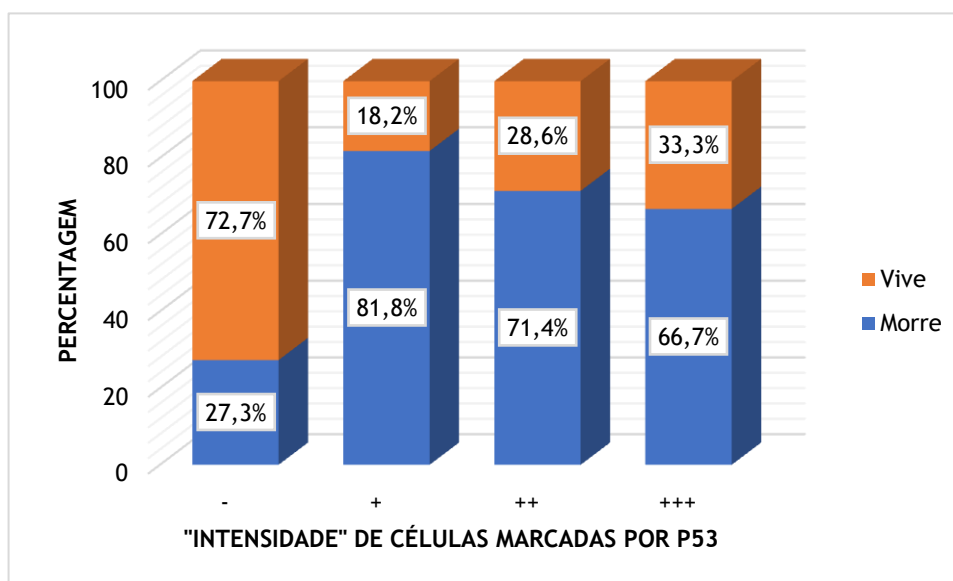


Gráfico 9 - Relação entre "intensidade de marcação imunohistoquímica pela oncoproteína p53" e o "prognóstico" dos pacientes.

Outros estudos semelhantes avaliaram o valor prognóstico da expressão da oncoproteína p53 no ACR. Os estudos de Wang P *et al.* (15), Wang L *et al.* (7), Melincovici C *et al.* (5), Cao D *et al.* (16), Zhao DP *et al.* (17), Hamelin R *et al.* (29) e Menezes H *et al.* (8) corroboram os resultados obtidos de que o aumento da expressão do marcador p53 se encontra associado a um pior prognóstico em doentes com ACR. Contrariamente a Soong R *et al.*(30) que obteve um melhor prognóstico com níveis mais elevados de expressão da oncoproteína p53.

Peng Du *et al.* (20), Zhang M *et al.* (22), Hoff P *et al.* (23), Jong KP *et al.*(24) e Lustosa S *et al.* (12) concluíram que a expressão desta oncoproteína não tem relação com a sobrevivência do doente, e como tal não deve ser considerada como fator prognóstico.

Em relação a "expressão" imunohistoquímica da oncoproteína p53" e o "grau de diferenciação histológico" do ACR, este estudo não obteve resultados estatisticamente significativos, o que é apoiado pelos estudos de Wang L *et al.* (7) e Melincovici C *et al.*(5). No entanto, a tendência mostra que quanto mais diferenciado o grau histológico do tumor (ABD), menor será a expressão da marcação imunohistoquímica pela oncoproteína p53, havendo casos que distorcem a realidade (Tabelas 1 e 2). Com estes resultados heterogêneos, nada se pode inferir relativamente à "expressão" de células marcadas pela oncoproteína e o "grau de diferenciação histológico".

Nesta investigação, os resultados obtidos não permitiram concluir a existência de uma relação estatisticamente significativa entre a "expressão imunohistoquímica da oncoproteína p53" e a "localização" do tumor o que é concordante com os estudos de Wang L *et al.* (7) e Melincovici *et al.*(5). No entanto em muitos outros estudos como o de Iacopetta B *et al.*(19,26),

Paluszkiewicz P *et al.* (18) e Watatani M *et al.* (28) os resultados são estatisticamente significativos, relacionando o aumento “expressão da oncoproteína p53” nos tumores localizados no cólon distal/ cólon esquerdo (neste trabalho denominado CD, S e R).

Podemos assim observar que os resultados das diversas investigações semelhantes a esta são muito heterogêneos, e no geral, inconclusivos no que respeita à influência do marcador como fator prognóstico no ACR. A única concordância em relação a este marcador, é que a oncoproteína p53 têm um papel importante na carcinogênese (17,31), sendo que a sua mutação representa um evento chave na progressão do CRC (8,11,12) e tardio (13,14).

## 4.1 Limitações

Não se pode afirmar que este estudo seja representativo da população dada a pequena dimensão da amostra disponível (N=32), bem como distribuição desigual dos casos pelos diferentes grupos, havendo maior representação de alguns em detrimento de outros (por exemplo a localização cólon esquerdo vs. Localização cólon direito). Assim seria importante a realização de um estudo idêntico com um maior número de pacientes.

Populações não homogéneas, diferentes protocolos de tratamento, fatores relativos à aplicação da técnica de IHQ (diferentes anticorpos, métodos de fixação, deteção de marcação), avaliação subjetiva dos resultados e variações de análises estatística são também alguns pontos que podem contribuir para a obtenção de resultados divergentes (8). Para além destas limitações, diversos estudos referem que a avaliação por IHQ poderá não ser a melhor, nem a mais fiável (8,24), podendo haver aqui um novo tópico de investigação de forma a estabelecer-se a melhor forma de detetar a expressão da oncoproteína p53.

Outra limitação do estudo foi o facto de não se ter avaliado a possível existência de uma relação entre a expressão do marcador p53 e outras características clinico-histopatológicas dos pacientes, nomeadamente a resposta às diferentes terapêuticas, metastização e recorrência do tumor, todos vistos como importantes para o prognóstico.

Neste trabalho não foi averiguada a relação entre a expressão da oncoproteína p53 e o resultado obtido com outros possíveis indicadores de prognóstico, como a expressão das proteínas Ki-67, bcl-2, COX2, Bax, entre outras, que são de extrema relevância e que a junção do estudo de mais de um marcador poderá ser a chave para a obtenção de diagnósticos mais precoces, terapêuticas mais adequadas e prognósticos mais fiáveis da evolução clínica do ACR (7,8,17,20).



## 5. Conclusão

A incidência e a mortalidade do cancro do cólon e do reto, ao longo dos últimos anos, têm vindo a aumentar, sendo cada vez mais, alvo de diversos estudos e investigações de forma a caracterizar melhor esta doença, o seu processo de carcinogénese, fatores de risco e invertendo as tendências epidemiológicas em ascensão deste cancro.

Apesar de o grande avanço no toca a técnicas de imagiologia médica, genética e bioquímica e a sua enorme contribuição no diagnóstico precoce deste tumor, atingiu-se um ponto que é necessário expandir a investigação do CRC para o campo da biologia molecular. Os diversos estudos realizados no ACR comprovam que as características moleculares deste tumor se encontram associadas ao prognóstico e à resposta à terapêutica.

A oncoproteína p53, é um marcador de lesão no DNA e a sua correlação com o “grau de diferenciação histológico” tem se mostrado, na maior parte dos estudos, não estatisticamente significativa, levando-nos a concluir que tal relação não é passível de ser estabelecida.

No que toca à “localização do tumor”, na literatura atual, já há uma maior controvérsia, visto já existirem muitos estudos que correlacionam a expressão da oncoproteína p53 com a localização no colón esquerdo. No entanto no estudo presente, não foi possível obter nenhuma correlação estatisticamente significativa no que toca à expressão da oncoproteína p53 e a “localização tumoral”.

Contudo, foram alcançados resultados estatisticamente significativos no que concerne à “expressão da marcação imunohistoquímica” por esta proteína com o “prognóstico dos pacientes”, corroborando o que outros estudos têm vindo anteriormente a comprovar, de que este marcador pode ter efetivamente valor prognóstico.

Ainda que na literatura atual considerem limitado e fraco o valor prognóstico da oncoproteína p53 para o ACR, com futuros estudos que incluam mais pacientes e sejam mais representativos há a possibilidade de este marcador tumoral poder contribuir para a avaliação prognóstica deste tumor, podendo vir a ser um auxílio na clínica, para a escolha da opção terapêutica mais adequada a determinado doente.





## 6. Referências Bibliográficas

1. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* [Internet]. 2017;66(4):683-91. Available from: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2015-310912>
2. Haggard FA, Boushey RP, Ph D. Colorectal Cancer Epidemiology : Incidence , Mortality , Survival , and Risk Factors. *Clin Colon Rectal Surg*. 2009;6(212):191-7.
3. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C PD. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase [Internet]. Vol. 10, International Agency for Research on Cancer. 2010 [cited 2017 Sep 25]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
4. Cappell MS. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 2008;37(1):1-24.
5. Embryol RJM. The prognostic significance of p53, Bax, Bcl-2 and cyclin E protein overexpression in colon cancer - an immunohistochemical study using the tissue microarray technique. 2016;57(1):81-9.
6. Huh JW, Kim HR, Kim YJ. Prognostic role of p53 messenger ribonucleic acid expression in patients after curative resection for stage I to III colorectal cancer: Association with colon cancer stem cell markers. *J Am Coll Surg* [Internet]. 2013;216(6):1063-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2013.01.058>
7. Wang L, Liu Z, Fisher KW, Ren F, Lv J, Davidson DD, et al. Prognostic value of programmed death ligand 1, p53, and Ki-67 in patients with advanced stage colorectal cancer. *Hum Pathol* [Internet]. 2017; Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=medp&NEWS=N&AN=28782638>
8. De Menezes HL, Jucá MJ, Gomes EGDA, Nunes BLBBP, Costa HO, Matos D. Analysis of the immunohistochemical expressions of p53, bcl-2 and Ki-67 in colorectal adenocarcinoma and their correlations with the prognostic factors. *Arq Gastroenterol*. 2010;47(2):141-7.
9. Shaw PH. The role of p53 in cell cycle regulation. *Pathol Res Pract* [Internet]. 1996;192(7):669-75. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0344033896800884>

10. Velculescu VE, El-Deiry WS. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin Chem.* 1996;42(6 SUPPL.):858-68.
11. Sakai E, Fukuyo M, Matsusaka K, Ohata K, Doi N, Takane K, et al. TP53 mutation at early stage of colorectal cancer progression from two types of laterally spreading tumors. *Cancer Sci.* 2016;107(6):820-7.
12. Lustosa SAS, Logullo A, Artigiani R, Saad SS, Goldenberg A, Matos D. Analysis of the correlation between p53 and bcl-2 expression with staging and prognosis of the colorectal adenocarcinoma. *Acta Cir Bras.* 2005;20(5):353-7.
13. Bazan V, Agnese V, Corsale S, Cal?? V, Valerio MR, Latteri MA, et al. Specific TP53 and/or Ki-ras mutations as independent predictors of clinical outcome in sporadic colorectal adenocarcinomas: Results of a 5-year Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale (GOIM) prospective study. *Ann Oncol.* 2005;16(SUPPL. 4):50-5.
14. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: Influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol.* 2005;23(30):7518-28.
15. Wang P, Liang J, Wang Z, Hou H, Shi L, Zhou Z. The prognostic value of p53 positive in colorectal cancer: A retrospective cohort study. *Tumor Biol [Internet].* 2017;39(5):101042831770365. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1010428317703651>
16. Cao D-Z, Ou X-L, Yu T. The association of p53 expression levels with clinicopathological features and prognosis of patients with colon cancer following surgery. *Oncol Lett.* 2017;13(5):3538-46.
17. Zhao D, Ding X, Peng J, Zheng Y, Zhang S. Prognostic significance of bcl-2 and p53 expression in colorectal carcinoma. *J Zhejiang Univ Sci B [Internet].* 2005;6(12):1163-9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1390638&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
18. Paluszkiwicz P, Berbec H, Pawłowska-Wakowicz B, Cybulski M, Paszkowska A. P53 Protein Accumulation in Colorectal Cancer Tissue Has Prognostic Value Only in Left-Sided Colon Tumours. *Cancer Detect Prev.* 2004;28(4):252-9.
19. Iacopetta B. TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat.* 2003;21(3):271-6.

20. Du P, Xu B, Zhang D, Shao Y, Zheng X. Hierarchical investigating the predictive value of p53 , COX2 , EGFR , nm23 in the post-operative patients with colorectal carcinoma. 2016;8(1):954-66.
21. Kandioler D, Mittlböck M, Kappel S, Puhalla H, Herbst F, Langner C, et al. TP53 Mutational Status and Prediction of Benefit from Adjuvant 5-Fluorouracil in Stage III Colon Cancer Patients. EBioMedicine [Internet]. 2015;2(8):825-30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.06.003>
22. Zhang M, Cui F, Lu S, Lu H, Jiang T, Chen J, et al. Increased expression of prothymosin- $\alpha$ , independently or combined with TP53, correlates with poor prognosis in colorectal cancer. Int J Clin Exp Pathol. 2014;7(8):4867-76.
23. Hoff PM. Is there a role for routine p53 testing in colorectal cancer? J Clin Oncol. 2005;23(30):7395-6.
24. De Jong KP, Gouw ASH, Peeters PMJG, Bulthuis M, Menkema L, Porte RJ, et al. P53 mutation analysis of colorectal liver metastases: Relation to actual survival, angiogenic status, and p53 overexpression. Clin Cancer Res. 2005;11(11):4067-73.
25. Soong R, Powell B, Elsaleh H, Gnanasampanthan G, Smith DR, Goh HS, et al. Prognostic significance of TP53 gene mutation in 995 cases of colorectal carcinoma: influence of tumour site, stage, adjuvant chemotherapy and type of mutation. Eur J Cancer. 2000;36(16):2053-60.
26. Iacopetta B. Are there two sides to colorectal cancer? Int J Cancer. 2002;101(5):403-8.
27. Bosari S, Viale G, Bossi P, Maggioni M, Coggi G, Murray JJ, et al. Cytoplasmic accumulation of p53 protein: an independent prognostic indicator in colorectal adenocarcinomas. J Natl Cancer Inst. 1994 May;86(9):681-7.
28. Watatani M, Yoshida T, Kuroda K, Ieda S, Yasutomi M. Allelic loss of chromosome 17p, mutation of the p53 gene, and microsatellite instability in right- and left-sided colorectal cancer. Cancer. 1996;77(8 SUPPL.):1688-93.
29. Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, Jeco N, Asselain B, Remvikos Y, et al. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. Gastroenterology. 1994 Jan;106(1):42-8.
30. Soong R, Grieu F, Robbins P, Dix B, Chen D, Parsons R, et al. p53 Alterations are associated with improved prognosis in distal colonic carcinomas. Clin Cancer Res. 1997;3(8):1405-11.

31. Kim S, An SSA. Role of p53 isoforms and aggregations in cancer. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2016;95(26):e3993. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27368003>

## 7. Anexos

Anexo 1 - Protocolo do CHCB de processamento.

Fixação	Formol	3 h
Desidratação	Etanol 70%	1 h
	Etanol 95%	1 h
	Etanol 95%	1 h
	Etanol 99.9%	1 h
	Etanol 99.9%	1 h
	Etanol 99.9%	1 h
Diafinização	Etanol 99.9% e xilol (partes iguais)	1 h
	Xilol	1 h
	Xilol	1h
	1ª Parafina	2h

Anexo 2 - Protocolo do CHCB de coloração com Hematoxilina e Eosina.

Desparafinação	Xilol	5 m
	Xilol	5 m
Hidratação	Etanol 99.9%	3 m
	Etanol 95%	1 m
	Etanol 70%	1 m
	Água corrente	2 m
Coloração Nuclear	Hematoxilina de Harris	10 m
Lavagem	Água Corrente	3 m
Diferenciação	Etanol Clorídrico 1%	10 s
Lavagem	Água corrente	6 m
Coloração Citoplasmática	Etanol 70%	1 m
	Eosina Alcoólica	1 s
Desidratação	Etanol 95%	1 m
	Etanol 95%	1 m
	Etanol 95%	1 m
	Etanol 99.9%	3 m
	Etanol 99.9%	5 m
	Xilol	4 m
	Xilol	3 m
Montagem	Meio sintético	

Anexo 3 - Protocolo do CHCB do funcionamento da máquina de imunohistoquímica.

PASSOS	ETAPA	TEMPO
1	BUFF1	10''
2	PAD1	29''
3	BUFF1	10''
4	PAD1	29''
5	BUFF1	10''
6	PAD1	29''
7	BUFF1	10''
8	PAD1	45''
9	AB1	25'
10	PAD1	29''
11	BUFF1	10''
12	PAD1	29''
13	BUFF1	10''

Estudo do valor prognóstico da oncoproteína p53 no adenocarcinoma do cólon e reto e sua correlação com o grau de diferenciação histológico, localização e prognóstico

14	PAD1	29''
15	BUFF1	10''
16	PAD1	29''
17	BUFF1	10''
18	PAD1	29''
19	BUFF1	10''
20	PAD2	45''
21	AB2	25'
22	PAD2	29''
23	BUFF1	10''
24	PAD2	29''
25	BUFF2	10''
26	PAD2	29''
27	HPBK	2'30''
28	PAD2	29''
29	HPBK	2'30''
30	PAD2	29''
31	HPBK	2'30''
32	PAD2	29''
33	BUFF2	10''
34	PAD2	29''
35	BUFF2	10''
36	PAD2	29''
37	BUFF2	10''
38	PAD2	45''
39	HRP	25'
40	PAD3	29''
41	BUFF2	10''
42	PAD3	29''
43	BUFF2	10''
44	PAD3	29''
45	BUFF3	10''
46	PAD3	29''
47	BUFF3	10''
48	PAD3	29''
49	BUFF3	10''
50	PAD3	45''
51	CROMOGÊNICO - DAB	5'
52	PAD3	29''
53	BUFF3	10''
54	PAD3	45''
55	CROMOGÊNICO - DAB	5'
56	PAD3	29''
57	BUFF3	10''
58	PAD3	45''
59	CROMOGÊNICO - DAB	5'
60	PAD3	29''
61	BUFF3	10''
62	PAD4	29''
63	BUFF3	10''
64	PAD4	29''
65	HEMATOXILINA DE MAYER	1'
66	PAD4	29''
67	BUFF3	10''
68	PAD4	29''
69	BUFF3	1'
70	PAD4	29''
71	BUFF2	1'
72	PAD4	29''
73	BUFF2	10''
74	PAD4	29''
75	H2O	10''

Estudo do valor prognóstico da oncoproteína p53 no adenocarcinoma do cólon e reto e sua correlação com o grau de diferenciação histológico, localização e prognóstico

---

76	PAD4	29''
77	H2O	10''
78	PAD4	29''
79	H2O	10''

(BUF - soluções de lavagem; PAD - “esponjas”; AB1 - anticorpo primário; AB2 - anticorpo secundário; HPBK - bloqueio da peroxidase endógena; HRP - streptavidin peroxidase; DAB - diaminobenzidina (cromogéneo);)

