

**HUNALDO LIMA DE MENEZES**

**ANÁLISE DAS EXPRESSÕES IMUNOHISTOQUÍMICAS DA P53, BCL-2 E KI-67 NO  
ADENOCARCINOMA COLORRETAL E SUAS CORRELAÇÕES COM OS FATORES  
PROGNÓSTICOS**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo –  
Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências.**

**SÃO PAULO**

**2009**

**HUNALDO LIMA DE MENEZES**

**ANÁLISE DAS EXPRESSÕES IMUNOHISTOQUÍMICAS DA P53, BCL-2 E KI-67 NO  
ADENOCARCINOMA COLORRETAL E SUAS CORRELAÇÕES COM OS FATORES  
PROGNÓSTICOS**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo –  
Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências.**

**Orientador: Prof. Dr. Delcio Matos  
Co-orientador: Prof. Dr. Mário Jucá**

**SÃO PAULO**

**2009**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

G633a Menezes, Hinaldo Lima.

**Análise das expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e ki-67 no adenocarcinoma colorretal e suas correlações com os fatores prognósticos** / Hinaldo Lima Menezes. – São Paulo, 2009.  
xiii, 60 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Gastroenterologia Cirúrgica.

Título em inglês: Analysis of the immunohistochemical expressions of p53, bcl-2 and Ki-67 in colorectal adenocarcinoma and their correlations with the prognostic factors.

1. Neoplasias colorretais. 2. Prognóstico. 3. Imuno-histoquímica.  
4. Marcadores biológicos de tumor.

CDU: 616.348/.351-006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**  
**DISCIPLINA DE GASTROENTEROLOGIA CIRÚRGICA**

**CHEFE DO DEPARTAMENTO: PROF(a). DR(a). LYDIA MASAKO FERREIRA**

**CHEFE DA DISCIPLINA: PROF. DR. GASPAR DE JESUS LOPES FILHO**

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: PROF. DR. DELCIO MATOS**

## Dedicatória

À minha mãe, Maria de Lourdes, pelo amor, incentivo e dedicação sem limites.

Aos meus filhos, Mariana, Marília, Lucas e agora Mateus; presentes divinos, raízes que me sustentam e me equilibram. Minha energia e felicidade vêm de vocês.

À Aline, minha esposa, pelo respeito e cumplicidade, além da presença constante e do apoio incondicional. O destino nos colocou juntos e o amor assim nos manterá.

## **Agradecimentos**

Ao Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo, nas pessoas que colaboraram nas leituras das lâminas de imunohistoquímica: a Professora Ângela Flávia Logulo e os Drs. Henrique Costa e Flávio Lima.

Ao Professor Jairo Calado Cavalcante, estatístico da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Alagoas, que realizou o tratamento estatístico desse estudo.

Aos companheiros de pós-graduação Edmundo Gomes e Benício Bulhões, pela colaboração, companheirismo e tolerância nesta jornada.

Aos Funcionários da Pós-Graduação da Disciplina de Gastroenterologia Cirúrgica da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, Mônica Noletto Miranda e Cláudia Joanete da Silva.

Ao Prof. Dr. Delcio Matos, pela iniciativa e incentivo. Exemplo de vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Mário Jucá, pela determinação, pela capacidade intelectual e pelo prazer de ser orientador.

Aos Drs. José Lídio Nunes Lira e José Roberto Rodrigues Cavalcante, pela amizade, pelo apoio e pela paciência.

"Sabedoria é chegar ao final da jornada em cada passo do caminho, viver o maior número de boas horas, vencer o egoísmo, alcançar a paz e encontrar a verdade. A verdade liberta-nos do mal; não há no mundo libertador igual. Confia na verdade, mesmo que não sejais capazes de compreendê-la, mesmo que no começo vos pareça amarga a sua doçura".

**Sakyamuni**

## SUMÁRIO

Dedicatória .....	iv
Agradecimentos.....	v
Epígrafe .....	vi
Lista de gráficos .....	ix
Lista de tabelas .....	x
Resumo .....	xii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS .....	5
3 MÉTODOS .....	6
3.1 Dados gerais .....	6
3.2 Características da amostra.....	7
3.3 Imunohistoquímica.....	9
3.4 Análise estatística.....	14
4 RESULTADOS .....	16
4.1 Expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 .....	16
4.2 Correlação das expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 com a recidiva .....	16
4.3 Correlação das expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 com a mortalidade .....	17
4.4 Correlação das expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 com o intervalo livre de doença .....	18
4.5 Correlação das expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 com a sobrevida .....	23
4.6 Correlação das expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 com o grau de diferenciação celular .....	29
4.7 Expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 com o estadiamento TNM.....	31
4.8 Síntese dos resultados .....	34
5 DISCUSSÃO .....	36



5.1 Marcadores prognósticos de tumor .....	36
5.2 A recidiva e as expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 no CCR .....	38
5.3 A mortalidade específica e as expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 no CCR.....	39
5.4 O tempo livre de doença e as expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 no CCR.....	39
5.5 A sobrevida e as expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 no CCR ..	39
5.6 A diferenciação celular e as expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 no CCR.....	40
5.7 O estadiamento TNM e as expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 no CCR.....	41
5.8 A imunohistoquímica e os marcadores prognósticos no CCR.....	42
5.9 Considerações finais .....	43
5.9.1 Implicações para pesquisa .....	43
5.9.2 Implicações para a prática clínica.....	44
6 CONCLUSÕES .....	45
7 ANEXOS.....	46
8 REFERÊNCIAS .....	54
Abstract	
Bibliografia consultada	

## Lista de gráficos

<b>Gráfico 1.</b> Curva do intervalo livre de doença relacionada com a expressão imunohistoquímica da p53.....	19
<b>Gráfico 2.</b> Curva do intervalo livre de doença relacionada com a expressão imunohistoquímica da bcl-2.....	20
<b>Gráfico 3.</b> Curva do intervalo livre de doença relacionada com a expressão imunohistoquímica da Ki-67.....	21
<b>Gráfico 4.</b> Curva do intervalo livre de doença relacionada com a expressão imunohistoquímica da p53, bcl-2 e Ki-67 associadas.....	22
<b>Gráfico 5.</b> Curva da expressão imunohistoquímica da p53 relacionada com a sobrevida.....	24
<b>Gráfico 6.</b> Curva da expressão imunohistoquímica da bcl-2 relacionada com a sobrevida.....	25
<b>Gráfico 7.</b> Curva da expressão imunohistoquímica da Ki-67 relacionada com a sobrevida.....	26
<b>Gráfico 8.</b> Curva da expressão imunohistoquímica da p53, bcl-2 e Ki-67 associadas relacionada com a sobrevida.....	28

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Procedimentos cirúrgicos realizados .....	8
<b>Tabela 2.</b> Estadiamento dos tumores colorretais de acordo com a classificação TNM.....	8
<b>Tabela 3.</b> Grau de diferenciação celular dos tumores colorretais .....	9
<b>Tabela 4.</b> Distribuição das expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 .....	16
<b>Tabela 5.</b> Distribuição das expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 relacionada com a recidiva .....	17
<b>Tabela 6.</b> Distribuição das expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 relacionadas com a mortalidade .....	18
<b>Tabela 7.</b> Média de intervalo livre de doença relacionada com a expressão imunohistoquímica da p53 .....	19
<b>Tabela 8.</b> Média de intervalo livre de doença relacionada com a expressão imunohistoquímica da bcl-2 .....	20
<b>Tabela 9.</b> Média de intervalo livre de doença relacionada com a expressão imunohistoquímica da Ki-67.....	22
<b>Tabela 10.</b> Média de intervalo livre de doença relacionada com as expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 associadas.....	23
<b>Tabela 11.</b> Média da expressão imunohistoquímica da p53 relacionada com a sobrevida .....	24
<b>Tabela 12.</b> Média da expressão imunohistoquímica da Ki-67 relacionada com a sobrevida .....	27
<b>Tabela 14.</b> Média das expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 associadas relacionadas com a sobrevida .....	28
<b>Tabela 15.</b> Distribuição da expressão imunohistoquímica da p53 relacionada com o grau de diferenciação celular .....	29
<b>Tabela 16.</b> Distribuição da expressão imunohistoquímica da bcl-2 relacionada com o grau de diferenciação celular .....	30
<b>Tabela 17.</b> Distribuição da expressão imunohistoquímica da Ki-67 relacionada com o grau de diferenciação celular .....	30

<b>Tabela 18.</b> Distribuição das expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 associadas relacionadas com o grau de diferenciação celular .....	31
<b>Tabela 19.</b> Distribuição da expressão imunohistoquímica da p53 relacionada com o estadiamento TNM.....	31
<b>Tabela 20.</b> Distribuição da expressão imunohistoquímica da bcl-2 relacionada com o estadiamento TNM.....	32
<b>Tabela 21.</b> Distribuição da expressão imunohistoquímica da Ki-67 relacionada com o estadiamento TNM.....	33
<b>Tabela 22.</b> Distribuição das expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 associadas relacionadas com o estadiamento TNM.....	34

## Resumo

**Objetivo:** Analisar as expressões imunohistoquímicas das proteínas p53, bcl-2 e Ki-67 no adenocarcinoma colorretal, correlacionando-as com os fatores prognósticos clínico-patológicos. **Método:** Foram confeccionados blocos de parafina de TMA com tecido de adenocarcinoma colorretal ressecados cirurgicamente em 82 pacientes no Hospital São Paulo da UNIFESP/EPM, de 2002 a 2005, não submetidos a radio ou quimioterapia. Cortes de 4 µm foram submetidos à reação imunohistoquímica e obtidos escores de intensidade das imunoexpressões, que foram correlacionados com o grau de diferenciação celular, estadiamento, tempo livre de doença, recidiva, sobrevida e mortalidade específica entre si e com os dados de sobrevida dos pacientes. As variáveis do estudo foram analisadas pelos testes do qui-quadrado e de Kaplan-Meier para verificar as associações com os marcadores. A significância das diferenças entre as curvas do tempo livre de doença e da sobrevida foi analisada pelos testes de Logrank e Wilcoxon. **Resultados:** A expressão imunohistoquímica da p53 foi positiva em 70 tumores (85,4%) e negativa em 12 (14,6%). A bcl-2 foi positiva em 26 tumores (31,7%) e negativa em 56 (68,3%). A expressão imunohistoquímica da Ki-67 foi positiva em 62 tumores (75,6%), sendo em 20 (24,4%) negativa. Não houve correlação estatisticamente significativa entre as expressões imunohistoquímicas dos marcadores analisadas separadamente ou em conjunto, envolvendo o grau de diferenciação celular, estadiamento, tempo livre de doença, sobrevida e mortalidade específica. Com relação à recidiva, observou-se uma correlação estatisticamente significativa com a expressão imunohistoquímica positiva da Ki-67 ( $p= 0,035$ ). **Conclusão:** A expressão imunohistoquímica positiva da Ki-67 no câncer colorretal está relacionada com a incidência de recidiva da doença.

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) soma 943 mil casos novos por ano, sendo a segunda neoplasia maligna mais prevalente no mundo (após o câncer de mama), com uma estimativa de 2,4 milhões de pessoas vivas com diagnóstico nos últimos cinco anos. É também a segunda maior causa de mortalidade por câncer nos Estados Unidos, com mais de 50 mil mortes por ano (BISHNUPURI et al., 2006). No Brasil, em 2008, estimou-se o aparecimento de 27 mil casos novos de CCR, sendo o quinto tumor maligno mais freqüente (INCA, 2008).

Por ser a doença metastática a maior causa do insucesso do tratamento, uma nova estratégia de terapêutica é essencial. Para isso, a elucidação do preciso mecanismo básico da invasão tumoral e metástase torna-se o ponto crítico para a questão (BENDARDAF et al., 2003). Como o diagnóstico precoce está na implicação direta de um tratamento com maiores índices de sobrevida, vários marcadores tumorais têm sido estudados, em virtude de indicarem a presença, extensão e resposta ao tratamento, bem como a recorrência da neoplasia. O antígeno carcino-embrionário (CEA) é um dos marcadores tumorais mais extensivamente estudados. Apesar de sua baixa sensibilidade para o CCR em estadiamento inicial (entre 20 a 40%), o CEA é ainda considerado o marcador tumoral sérico “standard” no acompanhamento de pacientes com CCR, com sensibilidade superior a 90% na detecção das recidivas (FERNANDES, MATOS, 2001).

A carcinogênese e o desenvolvimento do câncer colorretal são processos de várias etapas, caracterizadas por mudanças progressivas na quantidade ou atividade de proteínas que regulam a proliferação, diferenciação e sobrevida celular, e são mediados por mecanismos genéticos e epigenéticos. Uma seqüência ordenada de eventos não aleatórios leva ao desenvolvimento do CCR, passando o epitélio por transformação invasiva, sendo a progressão do epitélio intestinal normal até o desenvolvimento do carcinoma invasivo estimada entre 7 e 12 anos (JUCÁ et al., 2008). O CCR origina-se de células normais que expostas a várias agressões genotóxicas, levam ao acúmulo de mutações ou fenômenos epigênicos em genes que favorecem a proliferação clonal e a imortalização da célula. Esta cascata de mutações correlaciona-se com a progressão da neoplasia, sendo o gene p53 um dos mais prevalentes nesta neoplasia, estando alterado em 60 a 80% dos tumores colorretais (RIBEIRO JR, SAFATLE-RIBEIRO, 2006).

O p53 é um gene supressor tumoral clássico, que age na regulação do desenvolvimento e do crescimento celular (XI et al., 2006). Está localizado no locus 17p13, codificando uma proteína de 53kDa e 393 aminoácidos que tem a característica de ser expressa quando o DNA sofre algum tipo de dano, onde a proteína p53 se liga ao local danificado do DNA e interrompe as células na fase G1 do ciclo celular, ativando mecanismos de reparo do DNA ou mesmo de apoptose. O aumento da quantidade dessa proteína celular está associado à interrupção do ciclo celular e a programação da morte da célula (apoptose). Na célula, cujo material genético está danificado, a p53 ativa a produção da proteína p21, que interage com o receptor de ciclina dependente de quinases 2 (cdk2), que estimula a divisão celular. Quando a p21 forma complexos com a cdk2, a célula é impedida de avançar para o próximo estágio da divisão celular. Quando mutada, a p53 deixa de ativar a produção de p21, tornando a divisão celular um processo descontrolado e induzindo a formação de tumores (LIMA et al., 2006; ALMEIDA et al., 2007; ANEJA et al, 2007). As mutações do p53 aparecem em etapas específicas durante a transformação maligna. Nos tumores colorretais, a p53 é detectada em 30% dos adenomas e em 40% a 60% dos adenomas com displasia de alto grau (SAMOWITZ et al, 2002; PALUSZKIEWICZ et al., 2004). A perda do gene p53 é crucial para a transformação do adenoma colorretal em carcinoma. A expressão imunohistoquímica da p53 pode ter valor prognóstico em pacientes com câncer retal, pois maior índice de detecção da proteína tem sido demonstrado em tumores com maior envolvimento linfonodal, como também a sobrevivência de 5 anos é menor nos casos com tumor positivo para p53, quando comparada aos casos negativos. A detecção de mutação do p53 e a perda de alelo representam marcadores de prognóstico desfavorável (SMYTH et al., 2004). A sua forma ativa (*wild type*) tem vida média muito curta (em torno de 6 minutos), devido à sua rápida degradação, o que torna extremamente difícil a sua detecção pelos métodos imunohistoquímicos. Ao contrário, as formas mutadas ou inativas, devido à maior estabilidade molecular e maior tempo de degradação, tendem a acumular-se no núcleo das células, permitindo que a expressão da proteína p53 seja usada como indicador indireto da mutação do gene p53. Por exercer esta função de detecção de alterações no DNA e conseqüente correção ou morte celular, a proteína p53 é considerada como uma guardiã do genoma, e é um importante elemento na prevenção do desenvolvimento de tumores, sendo seu gene codificador, classificado como gene supressor de tumor (ROCHA et al., 2004).

Enquanto a p53 tem sido implicada com o controle do ciclo celular, da síntese e reparo do DNA, além da programação da morte celular, a expressão do gene bcl-2 promove a sobrevivência celular por se opor ao estímulo da apoptose (CONSTATA et al., 2006). A proteína bcl-2 é conhecida por prolongar a morte programada da célula, inibindo a apoptose, propagando a divisão celular e contribuindo potencialmente para o crescimento tumoral (KOURAKLIS et al., 2003). O gene bcl-2 está localizado no cromossomo 18q21 e seu produto é uma proteína de 24kd localizada no retículo endoplasmático e na membrana mitocondrial (ZAVRIDES et al., 2006). Vários estudos têm mostrado que a proteína bcl-2 prolonga a sobrevivência de uma variedade de células bloqueando a apoptose. Conseqüentemente, nos tecidos humanos normais a bcl-2 aparece somente nos tecidos na qual a apoptose tem um papel no desenvolvimento de estruturas complexas ou que promove a renovação celular (PEREIRA et al., 1997). A família bcl-2 é uma classe de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose que participam ativamente desta regulação. Os membros da família bcl-2, como a bcl-2 e bcl-XL inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo c e são chamados de reguladores anti-apoptóticos. Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas. A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, como dano ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas. Esse desequilíbrio induz a apoptose. Entre as proteínas mais estudadas, desta família, estão a Bax (pró-apoptótica) e a bcl-2 (anti-apoptótica) a qual é superexpressa em adenomas e carcinomas colorretais (GRIVICICH et al., 2007). Estudos têm demonstrado dados a respeito da expressão da bcl-2 e apoptose na tumorigênese colorretal: em 17 de 24 adenomas de cólon (71%) e em 14 de 21 adenocarcinomas (67%) a imunorreatividade da bcl-2 pode ser detectada. Na maioria dos estudos clínicos a expressão da bcl-2 citoplasmática tem sido associada a um melhor prognóstico. Entretanto, outros estudos mostram a associação da bcl-2 com baixa sobrevida (ZAVRIDES et al., 2005; METERISSIAN et al., 2001).

Classicamente as neoplasias são conseqüência de um distúrbio da proliferação celular. As alterações do controle normal da proliferação celular são também um fator significativo no processo de tumorigênese, sendo então a dimensão do crescimento tumoral clinicamente importante. A quantificação da atividade proliferativa celular na neoplasia tem sido alvo de várias investigações (FORONES et al., 1999). Desde o



desenvolvimento por Gerdes em 1984, o uso do anticorpo monoclonal Ki-67 tem se tornado cada vez mais popular como método de mensuração de proliferação celular (CHEN et al., 1997). O antígeno definido pelo anticorpo monoclonal Ki-67 é uma proteína nuclear humana encontrada em todas as partes ativas do ciclo celular, sendo largamente empregada como marcador de proliferação. O anticorpo monoclonal Ki-67 reconhece a parte lábil do antígeno nuclear, o qual está presente nas células em proliferação (nas fases G1, S, G2 e M) mas não em células na fase G0. O uso do Ki-67 está restrito ao tecido a fresco, pois o epítipo não sobrevive à fixação histológica de rotina em formaldeído. A expressão imunohistoquímica do Ki-67 tem sido relacionada com crescimento tumoral em várias neoplasias malignas. Entretanto, a correlação com parâmetros clínico-patológicos têm sido inconsistente. Alguns estudos mostram correlação significativa entre o Ki-67 com prognóstico clinicamente importante no câncer colorretal, em parâmetros como diferenciação tumoral, metástase e invasão local. Entretanto outros estudos mostram não haver esta relação. Investigadores têm sugerido que a ausência de correlação se deve à heterogeneidade do câncer colorretal (ALLEGRA et al., 2003). Embora muitos estudos que avaliam a expressão do ki-67 nos tumores primários tenham falhado em demonstrar alguma correlação com prognóstico, quando se trata de câncer colorretal com metástase hepática o antígeno ki-67 tem mostrado ser um bom indicador de sobrevida (SMITH et al., 2003).

Os resultados não uniformes observados na literatura, quanto à relação entre o prognóstico do adenocarcinoma colorretal e as expressões imunohistoquímicas da p53 e bcl-2 associadas e também do Ki-67 estimulou a realização desta pesquisa, esperando-se, desta forma, poder contribuir para esta importante área do conhecimento.

## **2 OBJETIVOS**

Analisar as expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 no adenocarcinoma colorretal e correlacioná-las com os fatores prognósticos clínico-patológicos.

## 3 MÉTODOS

### 3.1 Dados gerais

Através de um estudo clínico longitudinal retrospectivo, foram analisados 130 pacientes portadores de CCR operados no Hospital São Paulo, na Disciplina de Gastroenterologia Cirúrgica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – Escola Paulista de Medicina (EPM), no período de maio de 2001 a março de 2005 (anexo 1). Através de uma ficha de coleta de dados (anexo 2), foram arquivadas as informações clínicas e patológicas obtidas nos prontuários médicos. Como critérios de inclusão, foram considerados os pacientes operados eletivamente, com estadiamento clínico pré-operatório, bem como os pacientes operados na urgência. Também foram consideradas a ausência de doenças crônicas degenerativas, bem como seguimento clínico igual ou superior a seis meses após a cirurgia para não comprometer a sobrevida. Os critérios de exclusão foram: outras patologias malignas concomitantes, CCR metacrônico, tumores não ressecados, uso prévio de terapia anti-neoplásica e pacientes sem seguimento clínico pós-operatório. O projeto de pesquisa foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP-EPM, registrado com o número CEP 1431/05 (anexo 3).

O diagnóstico da doença nos pacientes submetidos à cirurgia eletiva foi feito através do exame proctológico e de exames complementares, como enema opaco, retossigmoidoscopia, colonoscopia, anatomopatológico e tomografia computadorizada de abdome. Nos casos de cirurgia de urgência, em decorrência de abdome agudo obstrutivo, o diagnóstico foi feito pela tomografia computadorizada de abdome e pela laparotomia exploradora.

O estadiamento pré-operatório foi realizado nos pacientes eletivos através de exames clínicos e subsidiários como: dosagem do CEA, radiografia simples de tórax nas incidências pósterio-anterior e perfil, colonoscopia, ultrassonografia do abdome e tomografia computadorizada do abdome. Foi realizado o preparo pré-operatório mecânico do cólon, bem como a administração profilática de antimicrobianos em todos os pacientes, com exceção dos que foram tratados na urgência, onde não houve preparo mecânico do cólon e o antimicrobiano foi terapêutico.

A ressecção cirúrgica obedeceu aos preceitos oncológicos que objetivam evitar a disseminação da doença, procurando-se realizar a excisão do tumor com margens de segurança, procedendo a ligadura dos vasos mesentéricos na altura das emergências das artérias principais, permitindo a retirada da peça cirúrgica com o maior número possível de gânglios linfáticos. Nos casos em que haviam tecidos ou órgãos aderidos ao tumor, estes eram ressecados em monobloco com a peça cirúrgica.

O seguimento pós-operatório foi realizado através de avaliação clínica ambulatorial periódica, dosagem do CEA, exames radiológicos e endoscópicos. Para a avaliação da sobrevida foi considerada a última consulta ou o último contato telefônico, realizado no mês de setembro de 2007.

Na Disciplina de Anatomia Patológica da UNIFESP-EPM foram realizados os levantamentos dos laudos anatomopatológicos, a identificação dos blocos e das lâminas, a revisão anatomopatológica das lâminas por três patologistas, as reações imunohistoquímicas e a leitura das reações dos antígenos p53, bcl-2 e Ki-67.

### **3.2 Características da amostra**

Foram analisados 82 pacientes, sendo 44 mulheres (53,7%) 38 homens (46,3%). A idade variou de 29 a 89 anos, com média de 59 anos. O seguimento variou de 6 a 64 meses, com média de 35 meses.

Com relação à localização, foram encontrados 27 casos (32,92%) de tumor em cólon direito, 26 (31,71%) no reto, 19 (23,17%) no cólon esquerdo, 8 (9,76%) no transverso e 2 (2,44%) sincrônicos.

Foram realizadas 67 cirurgias eletivas (81,7%) e 15 de urgência(18,3%). Os procedimentos cirúrgicos realizados estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1 - Procedimentos cirúrgicos realizados**

Cirurgia	Frequência	Porcentagem(%)
Colectomia direita	30	36,58
Retossigmoidectomia abdominal	25	30,48
Amputação abdominoperineal do reto	6	7,32
Colectomia esquerda	5	6,1
Colectomia sub-total	5	6,1
Colectomia total	5	6,1
Transversectomia	2	2,44
Hartmann	2	2,44
Proctocolectomia	1	1,22
Colectomia segmentar	1	1,22
<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>100,0</b>

Foi considerada curativa a ressecção cirúrgica em que macroscopicamente não foi observada a presença de doença residual e o exame anátomo-patológico do material de ressecção cirúrgica não demonstrou infiltração das margens de segurança. A ressecção foi considerada paliativa quando não foi retirado todo o tecido neoplásico existente ou houve confirmação anátomo-patológica de infiltração microscópica das margens. Através do inventário intra-operatório da cavidade abdominal associado ao resultado anatomopatológico do material de ressecção cirúrgica, concluiu-se o estadiamento final, que foi utilizado para fazer a projeção do prognóstico. Obedecendo os critérios expostos, foram submetidos à cirurgia curativa 69 pacientes (84,1%) e à cirurgia paliativa 13 (15,9%), sendo estes últimos excluídos na análise das variáveis “recidiva”, “intervalo livre de doença”, “sobrevida” e “mortalidade”.

O estadiamento dos tumores foi feito pela classificação internacional de tumores malignos – TNM, adotada pela União Internacional contra o Câncer (UICC), cuja distribuição está representada na tabela 2.

**Tabela 2 - Estadiamento dos tumores colorretais de acordo com a classificação TNM**

Estádio	Frequência	Porcentagem(%)
I	10	12,2
II	32	39,0
III	26	31,7
IV	14	17,1
<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>100,0</b>

De acordo com as recomendações do Colégio Americano de Patologia, os tumores bem e moderadamente diferenciados foram agrupados e denominados como de baixo grau de malignidade, enquanto que os tumores mal diferenciados e indiferenciados foram agrupados e denominados como de alto grau de malignidade. Desta forma, o grau de diferenciação celular dos tumores, que foram classificados como de baixo grau e alto grau, está representado na tabela 3.

**Tabela 3 - Grau de diferenciação celular dos tumores colorretais**

Grau de diferenciação	Freqüência	Porcentagem(%)
Baixo grau	78	95,1
Alto grau	4	4,9
Total	82	100,0

Considerou-se como intervalo de tempo livre de doença o período de tempo, contado a partir da cirurgia curativa, em que não houve recidiva tumoral, local ou a distância. O intervalo de tempo livre de doença variou de 6 a 64 meses.

A recidiva foi estabelecida como o retorno da doença neoplásica após um intervalo de tempo livre de doença, que ocorreu localmente ou à distância. Os tumores metacrônicos foram aqueles localizados em outros segmentos do cólon, diagnosticados durante o seguimento e não foram considerados metástases do tumor primário. Foram observados 18 pacientes (21,95%) com recidiva durante o seguimento.

Foi considerada sobrevida como o intervalo de tempo decorrido entre a cirurgia curativa e a data da última consulta, do último contato telefônico, ou ainda a ocorrência de óbito do paciente. O tempo mínimo adotado por este estudo foi de 6 meses, com a sobrevida variando de 6 a 64 meses.

A mortalidade específica foi definida como o percentual de mortes ocorridas em decorrência do câncer colorretal. Nesta amostra ocorreram 16 óbitos até setembro de 2007, representando uma taxa de mortalidade de 19,5%.

### 3.3 Imunohistoquímica

Os tecidos de carcinoma colorretal e de mucosa não tumoral adjacente, obtidos de peças cirúrgicas, foram fixados em formalina 10% e processados rotineiramente

pelo método de inclusão em parafina para análise histológica. Cortes histológicos com 3  $\mu\text{m}$  de espessura de cada bloco, corados pela hematoxilina-eosina, foram revisados por três patologistas para a confirmação do diagnóstico, reavaliação dos achados histopatológicos e para a seleção dos sítios para retirada dos cilindros de tecidos utilizados na construção do arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray - TMA). Foi preparado mapa em planilha de Excel com a localização e identificação das amostras de tecidos para a construção do bloco de TMA, e para orientar a leitura posterior das reações imunohistoquímicas. Usando aparelho Beecher™ (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) foram confeccionados blocos de TMA, conforme especificações do fabricante, seguindo-se as seguintes etapas: 1. Marcação da área selecionada no respectivo bloco de parafina; 2. Utilização do aparelho para criar espaço vasado (“casela”) no bloco receptor; 3. Extração de um cilindro tecidual de 1 mm de diâmetro do bloco doador da área de interesse previamente selecionada; 4. Transferência do cilindro tecidual obtido do bloco doador para a “casela” previamente criada no bloco receptor; 5. Progressão, em frações de milímetros, a novas posições dentro do bloco receptor, de modo a criar coletânea de amostras teciduais seguindo disposição matricial; 6. Avaliação da qualidade do bloco final para armazenamento. Para adesão dos cortes dos blocos de TMA nas lâminas foi utilizado sistema de fitas adesivas (Instrumedics Inc, Hackensak, NJ, USA). As amostras foram cortadas com espessura de 4  $\mu\text{m}$ , sendo usado pequeno rolo para pressionar o corte na fita. O corte histológico aderido foi posteriormente colocado sobre lâmina revestida por resina (parte do “kit” do sistema de fita adesiva), e pressionada com o mesmo rolo, para melhor aderência do corte. Em seguida, as lâminas com os cortes histológicos aderidos às fitas foram colocadas em luz ultra-violeta por 20 min, passando, em seguida, por solução solvente TPC, por mais 20 min. Após secas, as fitas adesivas foram retiradas e as lâminas estocadas a menos 80°C, até a realização da técnica imunohistoquímica. A escolha do sítio incluiu a localização da área de maior marcação (hot spot) e contagem de 200 células nesta área. Para garantir a representatividade, de cada área selecionada no bloco doador foram coletadas ao menos duas amostras, sendo, cada uma delas, representada em dois pontos diferentes de um mesmo bloco receptor, formando imagem em espelho das amostras. Quando, mesmo com a dupla representação, as amostras não eram representativas do tecido em questão, novas amostras foram coletadas dos blocos doadores e construídos blocos receptores adicionais.

Para a reação imunohistoquímica (IHQ), foi utilizado o método da estreptavidina-biotina, que se baseia na capacidade da estreptavidina ligar-se à biotina. Os anticorpos primários utilizados para o estudo foram: anticorpo monoclonal anti-bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology), na diluição 1:1000; anticorpo monoclonal anti-p53 (Bp53-12, sc-263) (Santa Cruz) na diluição 1:1500 e anticorpo monoclonal anti-Ki-67 (clone MIB-1, M7240) (DakoCytomation) na diluição 1:100. O sistema de amplificação utilizado na reação foi o kit LSAB+System, HRP (DAKO, CA-USA). Para revelação da reação foi utilizado como substrato o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), mais o agente cromogênico 3,3'-Diaminobenzidina-DAB (Sigma Chemical CO-USA), sendo finalmente contracorado com hematoxilina de Harris.

O padrão de positividade para os anticorpos primários antiproteínas da p53 e da bcl-2 foi o aparecimento de coloração marrom-acastanhada no citoplasma da célula. Para o anticorpo primário anti-Ki-67, considerou-se o aparecimento de coloração nuclear castanho-escura. Foi usada como controle positivo, lâmina contendo cortes histológicos comprovados anteriormente como positivos para os marcadores utilizados. A mesma lâmina foi usada como controle negativo subtraindo-se o anticorpo primário da reação.

Os critérios adotados para avaliação dos marcadores p53, bcl-2 e Ki-67 basearam-se na utilização de um escore categórico, que predeterminou o valor de corte na percentagem de células coradas no tumor. Foram considerados como positivos os casos que tiveram valor superior a dez (10%) e negativos os casos que apresentaram valor igual ou inferior a dez (10%). Os três avaliadores fizeram as leituras das lâminas de forma independente e não tiveram acesso aos dados clínicos dos pacientes. A concordância entre os resultados apresentados por eles foi superior a 90% e os casos discordantes foram reavaliados em conjunto pelos patologistas, que decidiram em consenso (figuras 1, 2 e 3).



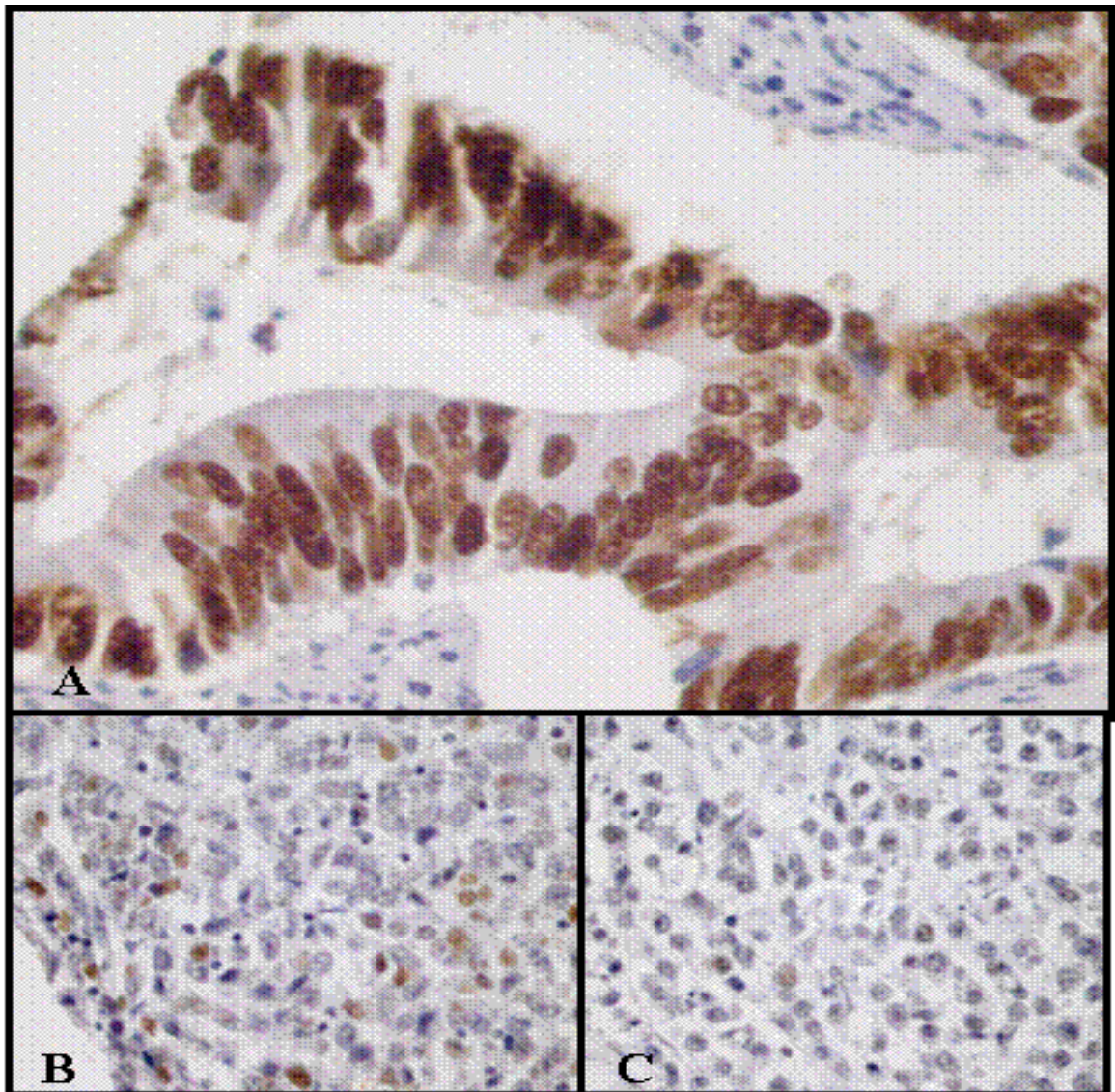
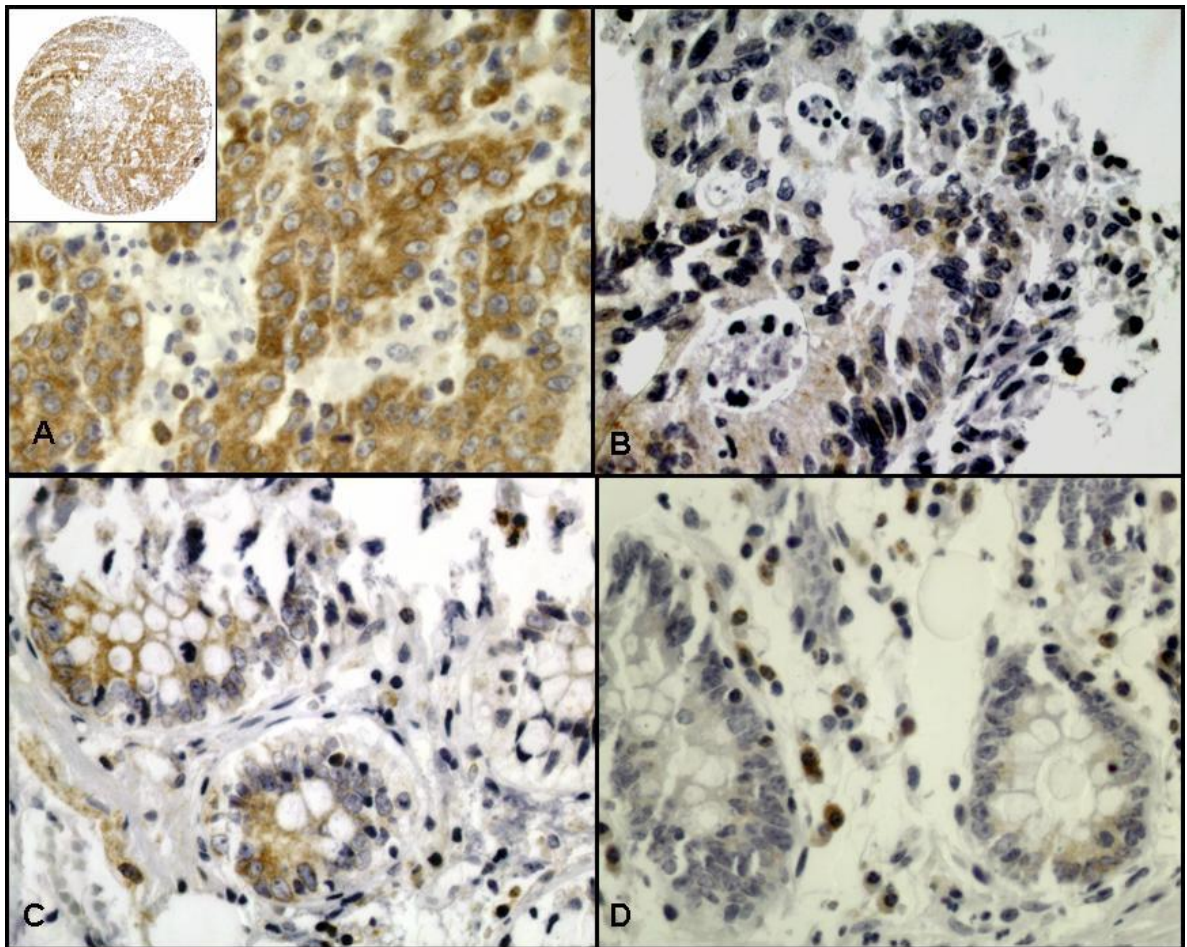
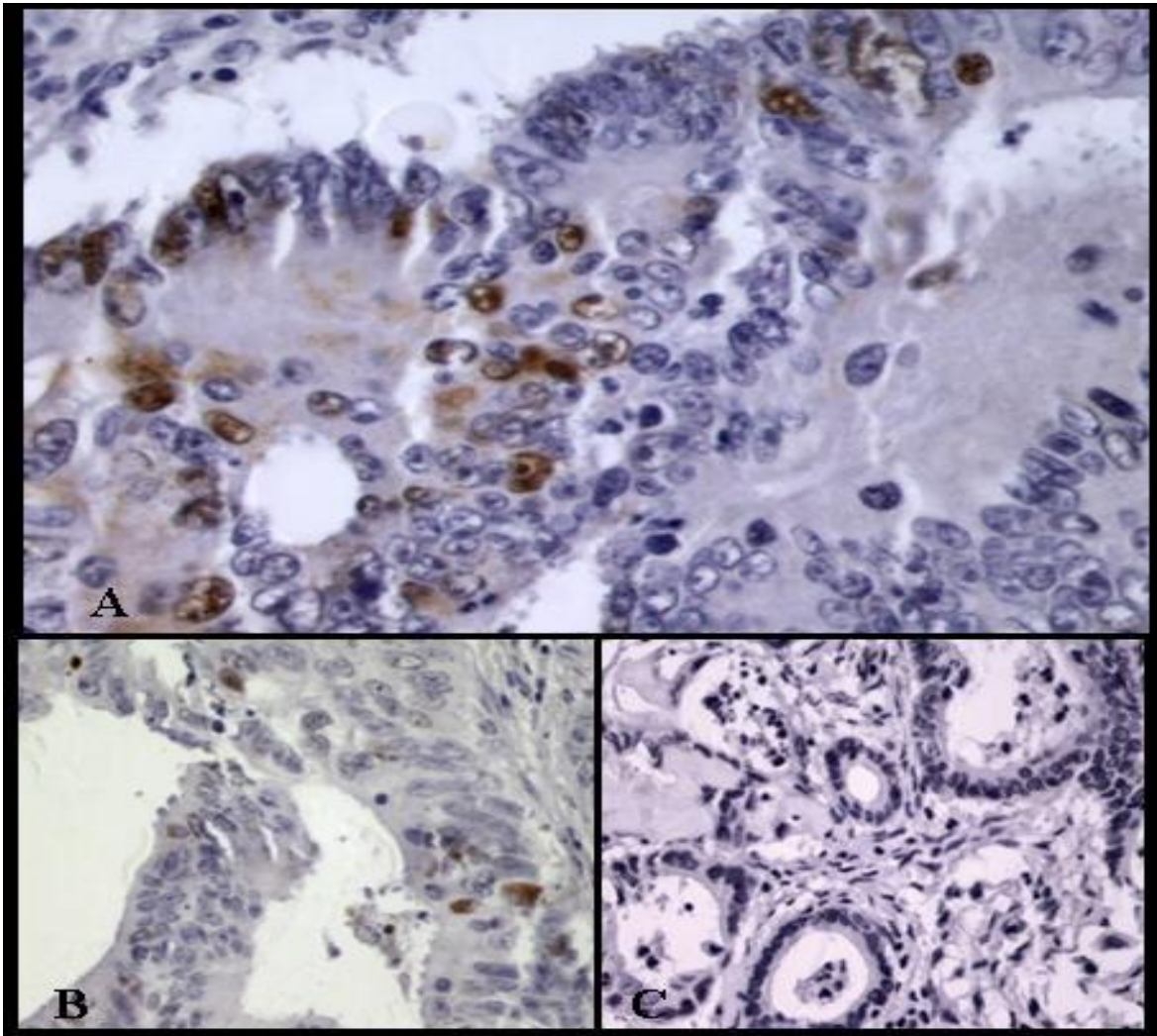


Figura 1 - Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica da p53 no tumor. A: Positiva (HE, 400x). B e C: Negativas (HE, 100x).



**Figura 2 - Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica da bcl-2. A: Positiva no tecido tumoral; B: Negativa no tumor; C: Positiva na mucosa adjacente; D: Negativa na mucosa adjacente (HE, 400x). No detalhe da figura A, amostra do TMA em visão panorâmica.**





**Figura 3 - Fotomicrografias da expressão imunohistoquímica da Ki-67 no tumor. A: Positiva (IPC, 400x). B e C: Negativas (IPC, 200x e 100x).**

### **3.4 Análise estatística**

As expressões imunohistoquímicas teciduais dos marcadores nos tumores e as associações individuais e em conjunto com as variáveis representadas pelo grau de diferenciação celular, estadiamento, recidiva e morte específica, foram analisadas empregando-se o teste do qui-quadrado.

Quando se estudou as expressões imunohistoquímicas teciduais dos marcadores nos tumores e as associações individuais e em conjunto com o intervalo livre de doença e a sobrevida, foi utilizado o método da tábua de vida de Kaplan-Meier. Para

testar a significância das diferenças entre as curvas do tempo livre de doença e da sobrevida foram usados os testes de Logrank e Wilcoxon (versão Breslow).

Foi instituído o limite de  $p < 0,05$  para rejeição da hipótese de nulidade, destacando-se os valores estatísticos considerados significantes.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67

Foi analisada a expressão tumoral da p53, bcl-2 e Ki-67 em todos os 82 doentes. A expressão imunohistoquímica da p53 foi positiva em 70 tumores (85,4%) e negativa em 12 (14,6%). A bcl-2 teve a sua expressão imunohistoquímica positiva em 26 tumores (31,7%) e negativa em 56 (68,3%). A expressão imunohistoquímica da Ki-67 foi positiva em 62 tumores (75,6%), sendo em 20 (24,4%) negativa (Tabela 4).

**Tabela 4 – Distribuição das expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67**

	<b>p53</b>	<b>bcl-2</b>	<b>Ki-67</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>Positiva</b>	70 (85,4)	26 (31,7)	62 (75,6)
<b>Negativa</b>	12 (14,6)	56 (68,3)	20 (24,4)
<b>Total</b>	82 (100,0)	82 (100,0)	82 (100,0)

n: Número      %: Percentagem

### 4.2 Correlação das expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 com a recidiva

Houve a recidiva do tumor em 18 pacientes. A imunoposição da p53 foi positiva em 16 tumores recidivados (88,9%) e negativa em 2 (11,1%), sendo  $p = 0,460$ . A bcl-2 teve a sua imunoposição positiva em 5 casos de recidiva tumoral (27,8%) e negativa em 13 (72,2%), com  $p = 0,479$ . A imunoposição da Ki-67 foi positiva em 10 tumores recidivados (55,6%) e negativa em 8 (44,4), sendo  $p = 0,035$ , resultado estatisticamente significativo (Tabela 5).

**Tabela 5 – Distribuição das expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 relacionada com a recidiva**

	<b>p53</b>	<b>bcl-2</b>	<b>Ki-67</b>	<b>p53, bcl-2 e Ki-67</b>
	<b>N (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>Positiva</b>	16 (88,9)	5 (27,8)	10 (55,6)	3 (16,7)
<b>Negativa</b>	2 (11,1)	13 (72,2)	8(44,4)	15 (83,3)
<b>Total</b>	18 (100,0)	18 (100,0)	18 (100,0)	18 (100,0)
Teste exato de Fisher	$p = 0,460$	$p = 0,479$	$p = 0,035^*$	$p = 0,275$
n: Número	%: Percentagem			

#### **4.3 Correlação das expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 com a mortalidade**

Dos 16 pacientes que foram a óbito durante o período de seguimento pós-operatório, a expressão imunohistoquímica da p53 relacionada com a mortalidade foi positiva em 14 pacientes (87,5%) e negativa em 2 (12,5%), sendo  $p = 0,572$ . A bcl-2 teve a sua expressão imunohistoquímica positiva em 6 pacientes (37,5%) e negativa em 10 (62,5%), com  $p = 0,391$ . A expressão imunohistoquímica da Ki-67 foi positiva em 12 pacientes (75,0%) e negativa em 4 (25,0%), sendo  $p = 0,589$  (Tabela 6).

**Tabela 6 – Distribuição das expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 relacionada com a mortalidade**

	<b>p53</b>	<b>bcl-2</b>	<b>Ki-67</b>	<b>p53, bcl-2 e Ki-67</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>Positiva</b>	14 (87,5%)	6 (37,5)	12 (75,0%)	4 (25,0)
<b>Negativa</b>	2 (12,5)	10 (62,5)	4 (25,0)	12 (75,0)
<b>Total</b>	16 (100,0)	16 (100,0)	16 (100,0)	16 (100)

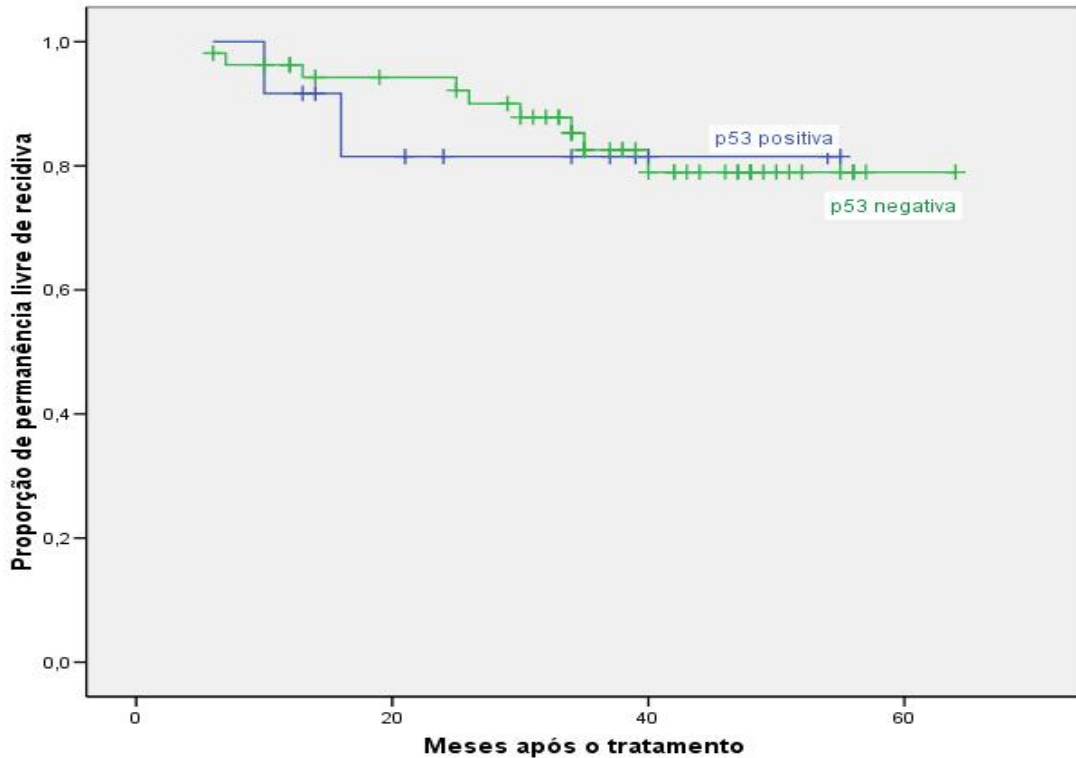
Teste exato de Fisher       $p = 0,572$        $p = 0,391$        $p = 0,589$        $p = 0,613$

n: Número      %: Percentagem

#### **4.4 Correlação da expressão imunohistoquímica da p53, bcl-2 e Ki-67 com o intervalo livre de doença**

A média do intervalo livre de doença nos pacientes com a expressão imunohistoquímica da p53 positiva foi de 56,0 meses, variando de 51,3 a 60,8 meses. Quando a expressão imunohistoquímica foi negativa, a média foi de 47,3 meses, com variação entre 37,6 a 57,0 meses. O resultado não mostrou diferença significativa entre as médias, sendo  $p53 = 0,637$  (Gráfico 1 e tabela 7).

**Gráfico 1 – Curva do intervalo livre de doença relacionada com a expressão imunohistoquímica da p53**



**Tabela 7 – Média de intervalo livre de doença relacionada com a expressão imunohistoquímica da p53**

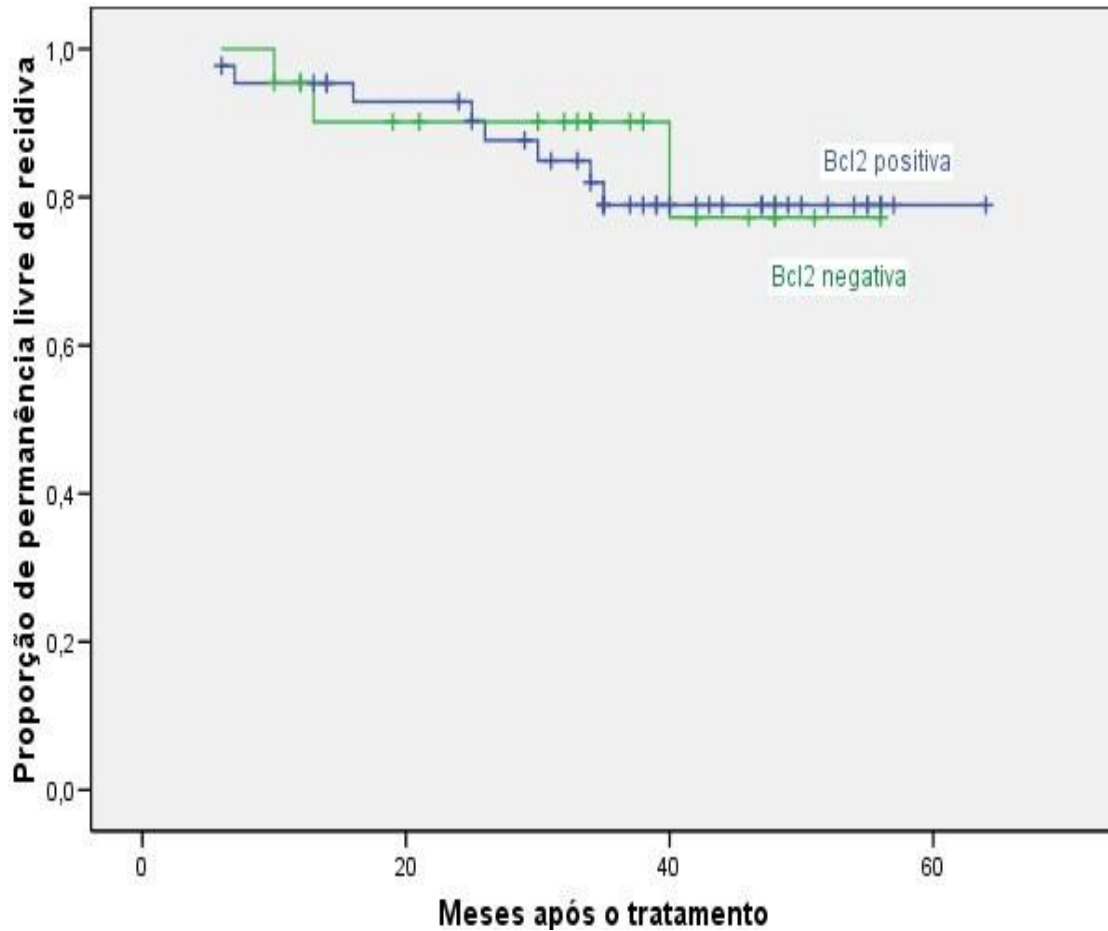
p53	Média	Intervalo de confiança de 95%
Positivo	56,0	51,3 – 60,8
Negativo	47,3	37,6 – 57,0

$p = 0,637$  (Teste de Wilcoxon – versão Breslow)

A média do intervalo livre de doença nos pacientes com a expressão imunohistoquímica da bcl-2 positiva foi de 49,5 meses, variando de 42,9 a 56,1 meses. Quando a expressão imunohistoquímica foi negativa, a média foi de 55,4 meses, com variação entre 50,0 a 60,8 meses. O resultado não mostrou diferença significativa entre as médias, sendo  $p = 0,746$  (Gráfico 2 e Tabela 8).



**Gráfico 2 - Curva do intervalo livre de doença relacionada com a expressão imunohistoquímica da bcl-2**



**Tabela 8 – Média de intervalo livre de doença relacionada com a expressão imunohistoquímica da bcl-2**

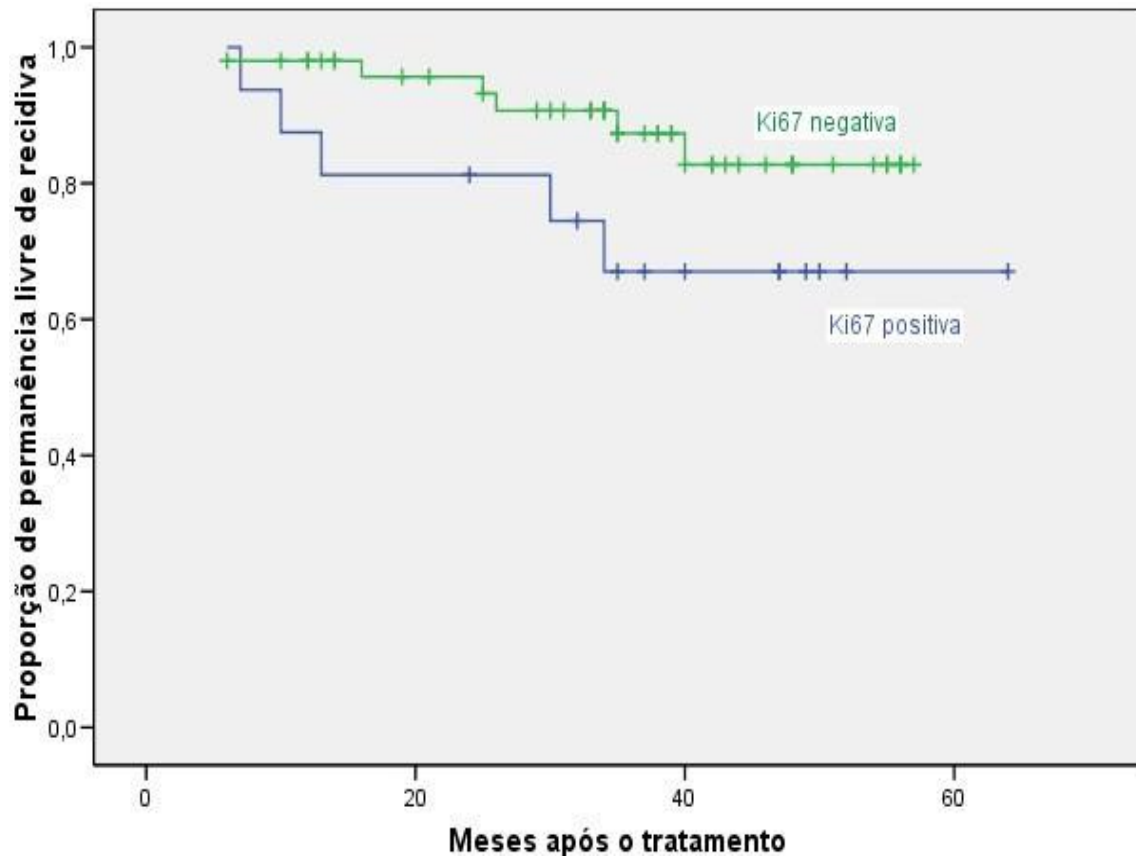
bcl-2	Média	Intervalo de confiança de 95%
<b>Positivo</b>	49,5	42,9 – 56,1
<b>Negativo</b>	55,4	50,0 – 60,8

$p = 0,746$  (Teste de Wilcoxon – versão Breslow)

A média do intervalo livre de doença nos pacientes com a expressão imunohistoquímica da Ki-67 positiva foi de 51,9 meses, variando de 48,1 a 55,7 meses. Quando a expressão imunohistoquímica foi negativa, a média foi de 49,3 meses, com

variação entre 38,4 a 60,2 meses. O resultado não mostrou diferença significativa entre as médias, sendo  $p = 0,108$  (Gráfico 3 e Tabela 9).

**Gráfico 3 - Curva do intervalo livre de doença relacionada com a expressão imunohistoquímica da Ki-67**



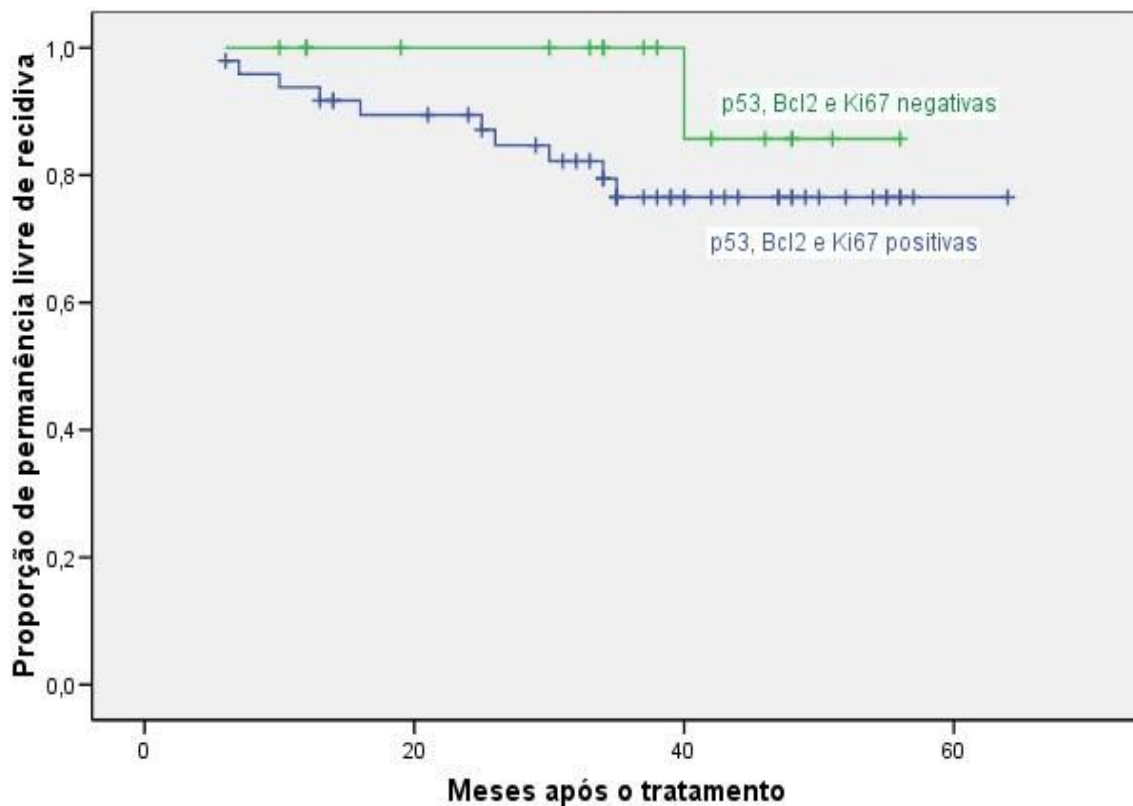
**Tabela 9 – Média de intervalo livre de doença relacionada com a expressão imunohistoquímica da Ki-67**

Ki-67	Média	Intervalo de confiança de 95%
<b>Positivo</b>	51,9	48,1 – 55,7
<b>Negativo</b>	49,3	38,4 – 60,2

$p = 0,108$  (Teste de Logrank)

A média do intervalo livre de doença nos pacientes com a expressão imunohistoquímica associada da p53, bcl-2 e Ki-67 positivas foi de 53,7 meses, variando de 49,5 a 57,8 meses. Quando a expressão imunohistoquímica associada foi negativa, a média foi de 54,0 meses, com variação entre 48,4 a 59,5 meses, sendo  $p = 0,199$ , não havendo diferença significativa entre as médias (Gráfico 4 e Tabela 10).

**Gráfico 4 - Curva do intervalo livre de doença relacionada com a expressão imunohistoquímica da p53, bcl-2 e Ki-67 associadas**



**Tabela 10 – Média de intervalo livre de doença relacionada com a expressão imunohistoquímica da p53, bcl-2 e Ki-67 associadas**

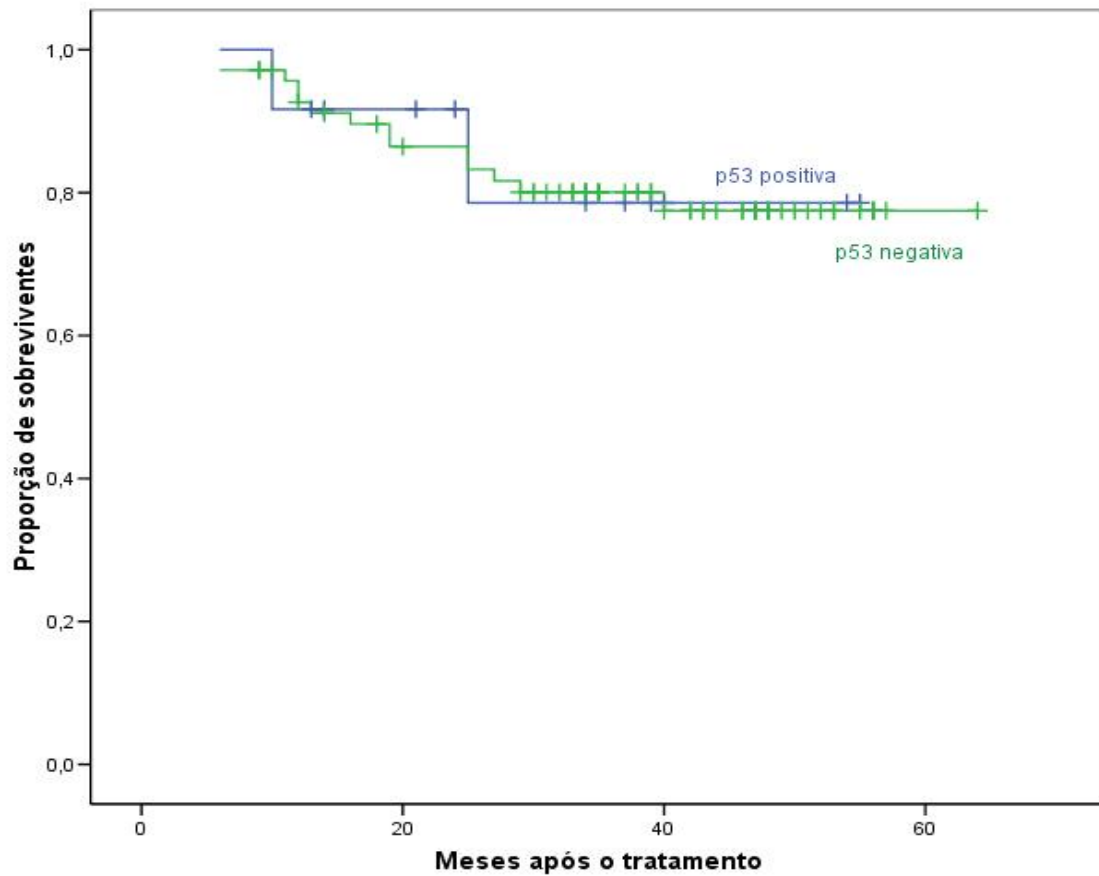
<b>p53, bcl-2 e Ki-67</b>	<b>Média</b>	<b>Intervalo de confiança de 95%</b>
<b>Positivo</b>	53,7	49,5 – 57,8
<b>Negativo</b>	54,0	48,4 – 59,5

$p= 0,199$  (Teste de Logrank)

#### **4.5 Correlação da expressão imunohistoquímica da p53, bcl-2 e Ki-67 com a sobrevida**

A média da sobrevida nos pacientes com expressão imunohistoquímica da p53 positiva foi de 54,0 meses, com variação de 49,4 a 58,7 meses. Nos pacientes com a expressão imunohistoquímica negativa a média foi de 47,3 meses, com variação de 37,8 a 56,9 meses; resultado não estatisticamente significativo (Gráfico 5 e Tabela 11).

**Gráfico 5 - Curva da expressão imunohistoquímica da p53 relacionada com a sobrevida**



**Tabela 11 – Média da expressão imunohistoquímica da p53 relacionada com a sobrevida**

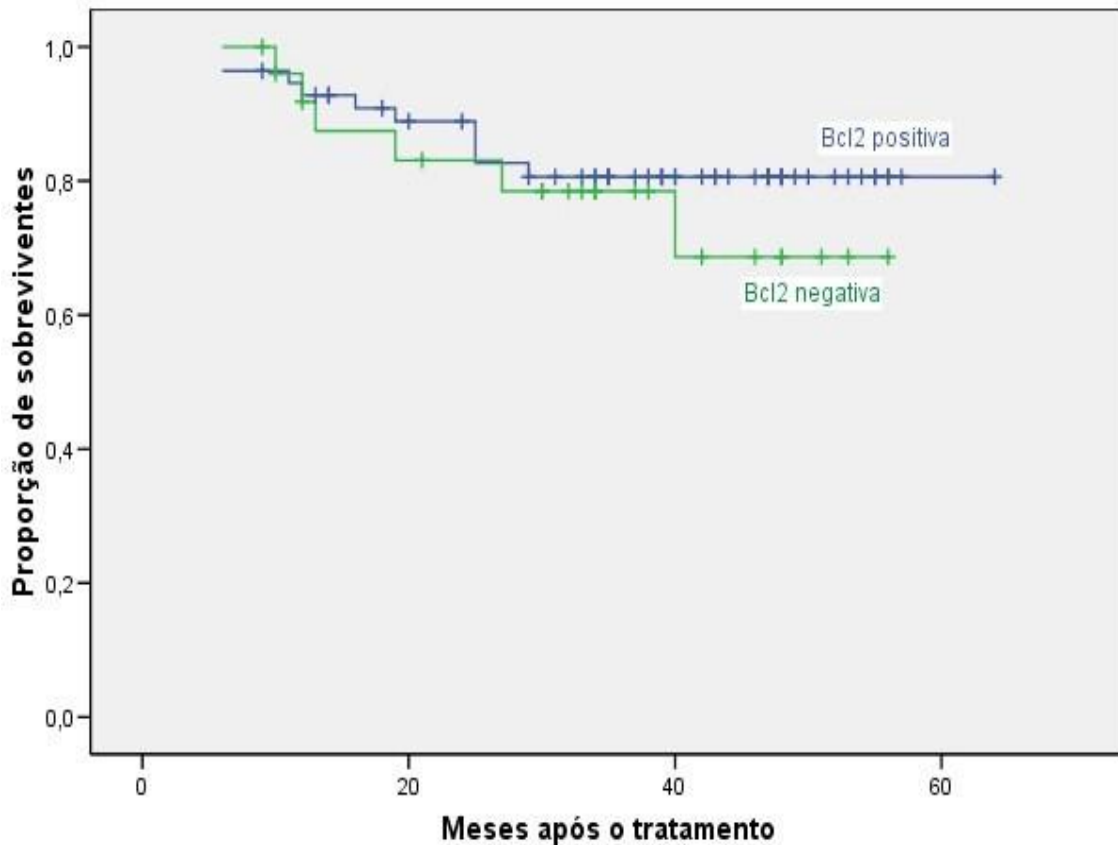
p53	Média	Intervalo de confiança de 95%
Positivo	54,0	49,4 – 58,7
Negativo	47,3	37,8 – 56,9

p= 0,966 (Teste de Wilcoxon – versão Breslow)

A média da sobrevida nos pacientes com expressão imunohistoquímica da bcl-2 positiva foi de 45,9 meses, com variação de 38,9 a 52,9 meses. Nos pacientes com a

expressão imunohistoquímica tumoral negativa a média foi de 55,0 meses, com variação entre 50,0 a 60,1 meses; resultado não estatisticamente significativo (Gráfico 6 e Tabela 12).

**Gráfico 6 - Curva da expressão imunohistoquímica da bcl-2 relacionada com a sobrevida**



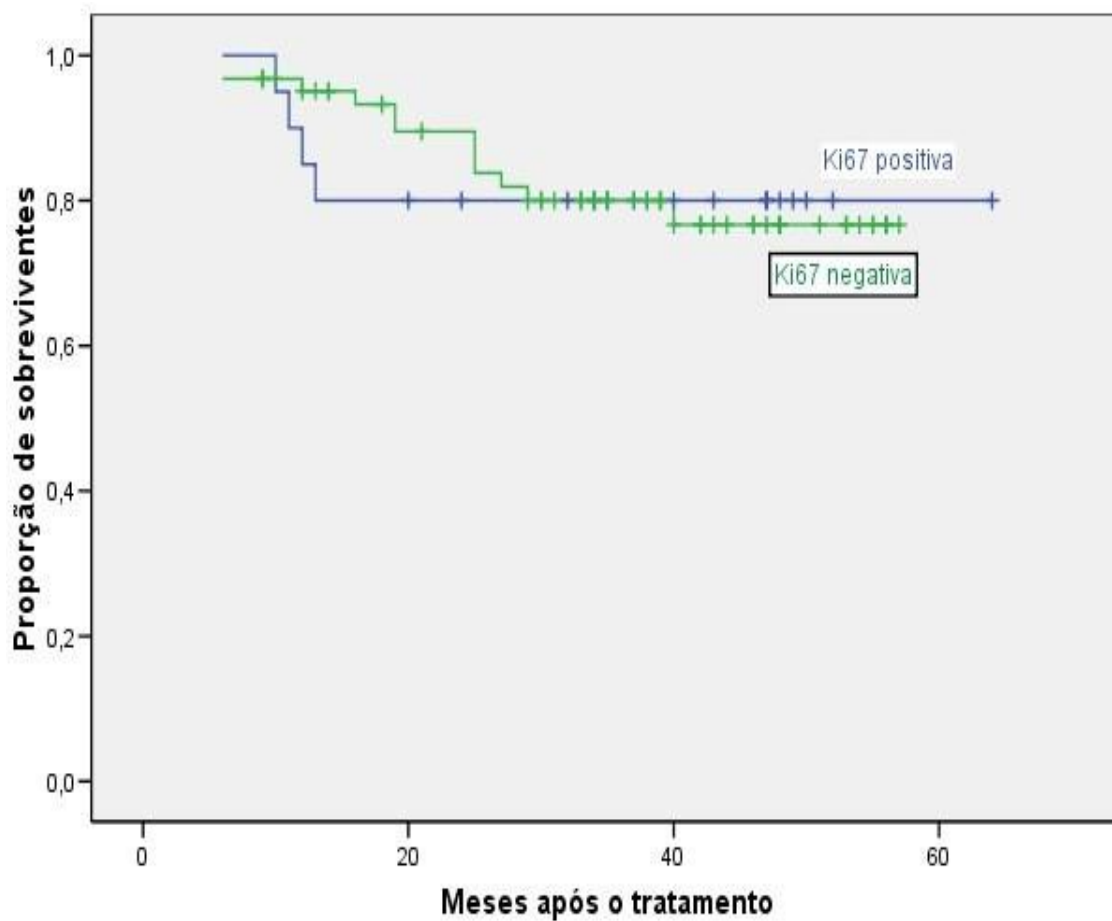
**Tabela 12 – Média da expressão imunohistoquímica da bcl-2 relacionada com a sobrevida**

Bcl-2	Média	Intervalo de confiança de 95%
Positivo	45,9	38,9 – 52,9
Negativo	55,0	50,0 – 60,1

$p = 0,507$  (Teste de Logrank)

A média da sobrevida nos pacientes com a expressão imunohistoquímica da Ki-67 positiva foi de 48,9 meses, com variação de 44,8 a 53,0 meses. Nos pacientes com a expressão imunohistoquímica negativa a média foi de 53,5 meses, com variação entre 44,3 a 62,7 meses; resultado não estatisticamente significativo (Gráfico 7 e Tabela 13).

**Gráfico 7 - Curva da expressão imunohistoquímica da Ki-67 relacionada com a sobrevida**



**Tabela 13 – Média da expressão imunohistoquímica da Ki-67 relacionada com a sobrevida**

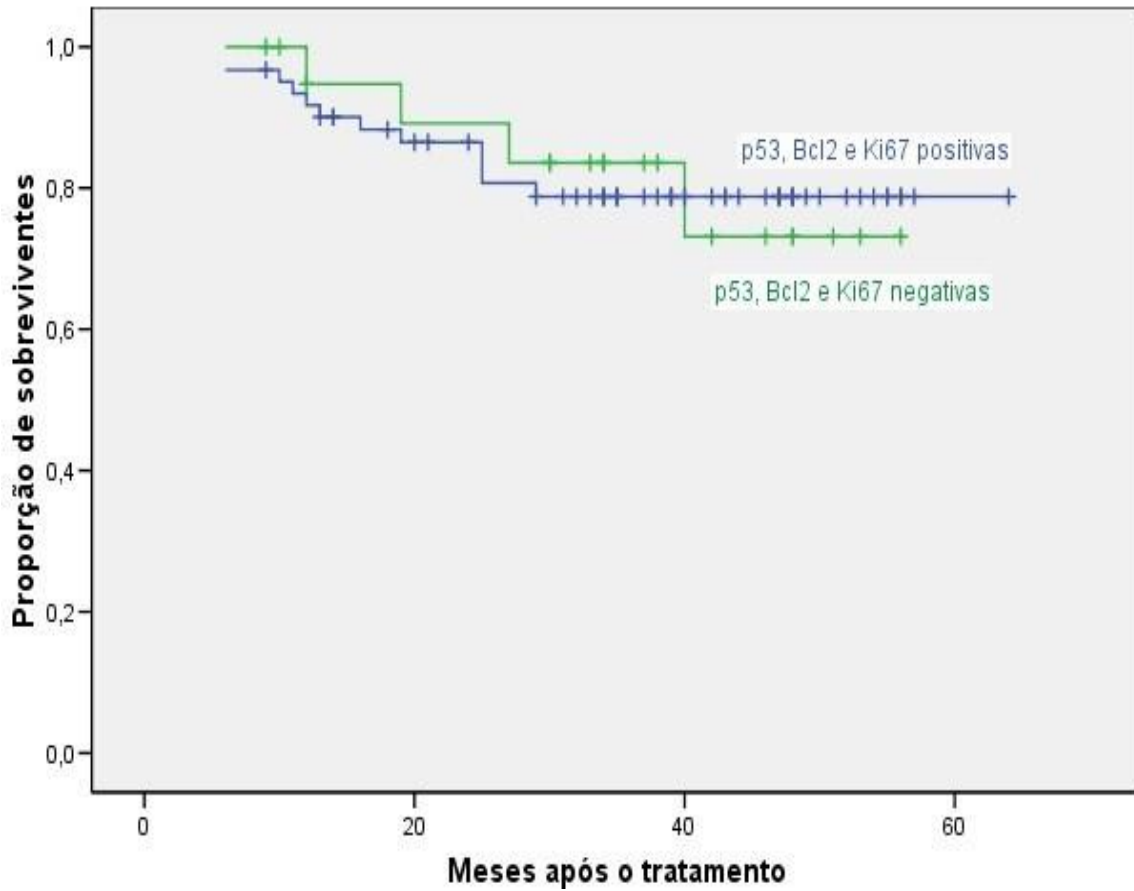
<b>Ki-67</b>	<b>Média</b>	<b>Intervalo de confiança de 95%</b>
<b>Positivo</b>	48,9	44,8 – 53,0
<b>Negativo</b>	53,5	44,3 – 62,7

p= 0,723 (Teste de Wilcoxon – versão Breslow)

A média da sobrevida nos pacientes com a expressão imunohistoquímica associada da p53, bcl-2 e Ki-67 positiva foi de 48,3 meses, com variação de 41,6 a 55,0 meses. Nos pacientes com a expressão imunohistoquímica associada negativa a média foi de 54,0 meses, com variação entre 48,9 a 59,0 meses; resultado não estatisticamente significativo (Gráfico 8 e Tabela 14).



**Gráfico 8 - Curva da expressão imunohistoquímica da p53, bcl-2 e Ki-67 associadas relacionada com a sobrevida**



**Tabela 14 – Média da expressão imunohistoquímica da p53, bcl-2 e Ki-67 associadas relacionada com a sobrevida**

bcl-2, p53 e Ki-67	Média	Intervalo de confiança de 95%
<b>Positivo</b>	48,3	41,6 – 55,0
<b>Negativo</b>	54,0	49,9 – 59,0

$p = 0,728$  (Teste de Wilcoxon – versão Breslow)

#### 4.6 Correlação da expressão imunohistoquímica da p53, bcl-2 e Ki-67 com o grau de diferenciação celular

A associação da expressão imunohistoquímica da p53 positiva foi de 84,6% (66 de 78 casos) nos tumores com baixo grau de diferenciação celular e na totalidade dos casos de alto grau de diferenciação (4/4). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as associações (Tabela 15).

**Tabela 15 – Distribuição da expressão imunohistoquímica da p53 relacionada com o grau de diferenciação celular**

	<b>Baixo grau</b>	<b>Alto grau</b>	<b>Total</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>Positiva</b>	66 (84,6)	4 (100,0)	70 (85,4)
<b>Negativa</b>	12 (15,4)	0 (0,0)	12 (14,6)
<b>Total</b>	78 (100,0)	4 (100,0)	82 (100,0)

n: Número

%. Percentagem

$p= 0,524$  (Teste exato de Fisher)

A associação da expressão imunohistoquímica da bcl-2 positiva foi de 32,1% (25 de 78 casos) nos tumores com baixo grau de diferenciação celular e em 67,9% (53 de 78) nos casos de alto grau de diferenciação. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as associações (Tabela 16).

**Tabela 16 – Distribuição da expressão imunohistoquímica da bcl-2 relacionada com o grau de diferenciação celular**

	Baixo grau	Alto grau	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Positiva</b>	25 (32,1)	53 (67,9)	78 (95,1)
<b>Negativa</b>	1 (25,0)	3 (75,0)	4 (4,9)
<b>Total</b>	26 (100,0)	56 (100,0)	82 (100,0)

n: Número

#: Percentagem

p= 0,622 (Teste exato de Fisher)

A associação da expressão imunohistoquímica da Ki-67 positiva foi de 74,4% (58 de 78 casos) nos tumores com baixo grau de diferenciação celular e em 25,6% (20 de 78) nos casos de alto grau de diferenciação. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as associações (Tabela 17).

**Tabela 17 – Distribuição da expressão imunohistoquímica da Ki-67 relacionada com o grau de diferenciação celular**

	Baixo grau	Alto grau	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Positiva</b>	58 (74,4)	4 (100,0)	62 (75,6)
<b>Negativa</b>	20 (25,6)	0 (0,0)	20 (24,4)
<b>Total</b>	78 (100,0)	4 (100,0)	82 (100,0)

n: Número

#: Percentagem

p= 0,319 (Teste exato de Fisher)

A associação da expressão imunohistoquímica da p53, bcl-2 e Ki-67 positiva foi de 25,6% (20 de 78 casos) nos tumores com baixo grau de diferenciação celular e em 74,4% (58 de 78) nos casos de alto grau de diferenciação. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as associações (Tabela 18).

**Tabela 18 – Distribuição da expressão imunohistoquímica da p53, bcl-2 e Ki-67 associadas relacionada com o grau de diferenciação celular**

P53, bcl-2 e Ki-67	Baixo grau	Alto grau	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Positiva</b>	20 (25,6)	1 (25,0)	21 (25,6)
<b>Negativa</b>	58 (74,4)	3 (75,0)	61 (74,4)
<b>Total</b>	78(100,0)	4(100,0)	82 (100,0)

n: Número

%: Percentagem

p= 0,702

#### 4.7 Correlação da expressão imunohistoquímica da p53, bcl-2 e Ki-67 com o estadiamento TNM

Com relação ao estadiamento, a expressão imunohistoquímica da p53 positiva foi de 90,0% (9 de 10 casos) nos tumores com estadiamento I, 87,5% (28 de 32) nos tumores com estadiamento II, 73,1% (19 de 26) nos tumores com estadiamento III e 100,0 % (14 de 14) naqueles com estadiamento IV. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as associações (Tabela 19).

**Tabela 19 – Distribuição da expressão imunohistoquímica da p53 relacionada com o estadiamento TNM**

	I	II	III	IV	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Positiva</b>	9 (90,0)	28 (87,5)	19 (73,1)	14 (100,0)	70 (85,4)
<b>Negativa</b>	1 (10,0)	4 (12,5)	7 (26,9)	0 (0,0)	12 (14,6)
<b>Total</b>	10 (100,0)	32 (100,0)	26 (100,0)	14 (100,0)	82 (100,0)

n: Número

%: Percentagem

p= 0,120 (qui quadrado de Pearson)

A associação da expressão imunohistoquímica da bcl-2 positiva com o estadiamento foi de 30,0% (3 de 10 casos) nos tumores com estadiamento I, 40,6% (13 de 32) nos tumores com estadiamento II, 26,9% (7 de 26) nos tumores com estadiamento III e 21,4% (3 de 14) naqueles com estadiamento IV. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as associações (Tabela 20).

**Tabela 20 – Distribuição da expressão imunohistoquímica da bcl-2 relacionada com o estadiamento TNM**

	I	II	III	IV	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Positiva	3 (30,0)	13 (40,6)	7 (26,9)	3 (21,4)	26 (31,7)
Negativa	7 (70,0)	19 (59,4)	19 (73,1)	11 (78,6)	56 (68,3)
Total	10 (100,0)	32 (100,0)	26 (100,0)	14 (100,0)	82 (100,0)

n: Número

#: Percentagem

p= 0,542 (qui quadrado de Pearson)

A associação da expressão imunohistoquímica da Ki-67 positiva com o estadiamento foi de 70,0% (7 de 10 casos) nos tumores com estadiamento I, 84,4% (27 de 32) nos tumores com estadiamento II, 69,2% (18 de 26) nos tumores com estadiamento III e 71,4% (10 de 14) naqueles com estadiamento IV. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as associações (Tabela 21).

**Tabela 21 – Distribuição da expressão imunohistoquímica da Ki-67 relacionada com o estadiamento TNM**

	I	II	III	IV	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Positiva	7 (70,0)	27 (84,4)	18 (69,2)	10 (71,4)	62 (75,6)
Negativa	3 (30,0)	5 (15,6)	8 (30,8)	4 (28,6)	20 (24,4)
Total	10 (100,0)	32 (100,0)	26 (100,0)	14 (100,0)	82 (100,0)

n: Número

#: Percentagem

p= 0,523 (qui quadrado de Pearson)

A associação da expressão imunohistoquímica da p53, bcl-2 e Ki-67 positiva com o estadiamento foi de 30,0% (3 de 10 casos) nos tumores com estadiamento I, 34,4% (11 de 32 casos) naqueles com estadiamento II, 15,4 (4 de 26 casos) nos com estadiamento III e 21,4 (3 de 14 casos) naqueles com estadiamento IV. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as associações (Tabela 22).

**Tabela 22 – Distribuição da expressão imunohistoquímica da p53, bcl-2 e Ki-67 associadas relacionadas com o estadiamento TNM**

P53, bcl-2 e Ki-67	I n (%)	II n (%)	III n (%)	IV n (%)	Total n (%)
Positiva	3 (30,0)	11 (34,4)	4 (15,4)	3 (21,4)	21 (25,6)
Negativa	7 (70,0)	21 (65,6)	22 (84,6)	11 (78,6)	61 (74,4)
Outras associações	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	<b>10 (100,0)</b>	<b>32 (100,0)</b>	<b>26 (100,0)</b>	<b>14 (100,0)</b>	<b>82 (100,0)</b>

n: Número

%; Percentagem

p=0,399 (qui quadrado de Pearson)

#### 4.8 Síntese dos resultados

A síntese dos resultados obtidos nesta investigação está apresentada no quadro 1.

**Quadro 1 – Distribuição dos resultados da expressão imunohistoquímica dos marcadores p53, bcl-2 e Ki-67 relacionados com o estadiamento TNM, grau de diferenciação celular, recidiva, intervalo livre de doença, sobrevida e mortalidade.**

		P53+	P53-	bcl-2+	bcl-2-	Ki-67+	Ki-67-	P53+, bcl-2 + e Ki- 67 (%)	P53-, bcl-2- e Ki- 67- (%)
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)		
<b>Estadiamento (TNM)</b>  P53 p= 0,120  bcl-2 p= 0,542  Ki-67 p= 0,523  p53, bcl-2 e Ki-67 p= 0,399	<b>I</b>	90,0	10,0	30,0	70,0	70,0	30,0	30,0	70,0
	<b>II</b>	87,5	12,5	40,6	59,4	84,4	25,6	34,4	65,6
	<b>III</b>	73,1	26,9	26,9	73,1	69,2	30,8	15,4	84,6
	<b>IV</b>	100,0	0,0	21,4	78,6	71,4	28,6	21,4	78,6
<b>Grau de diferenciação celular</b>  p53 p= 0,524  bcl-2 p=0,622  Ki-67 p= 0,319  p53, bcl-2 e Ki-67 p= 0,702	<b>Baixo grau</b>	84,6	15,4	32,1	25,0	74,4	100,0	25,6	74,4
	<b>Alto grau</b>	100,0	0,0	67,9	75,0	25,6	0,0	25,0	75,0
<b>Intervalo livre de doença</b>		p= 0,637		0,746		p = 0,108		p = 0,199	
<b>Recidiva</b>		p= 0,460		p= 0,479		p = 0,035*		p = 0,275	
<b>Sobrevida</b>		p = 0,966		p=0,507		p= 0,723		p= 0,728	
<b>Mortalidade</b>		p = 0,572		p=0,391		p=0,589		p = 0,613	

%; Percentagem



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Marcadores prognósticos de tumor

O estado anátomo-patológico do CCR baseado no sistema TNM (Tumor-Nódulo-Metástase) é a base atual do prognóstico e da decisão pelo tratamento adjuvante, sendo aceito que o mais importante fator de determinação de ressecção curativa é a ausência de linfonodos e metástase à distância (VIEIRA et al., 2004). Embora indivíduos em estado precoce do CCR sejam excluídos de quimioterapia adjuvante por ressecção potencialmente curativa do tumor, 20 a 30% apresentam recorrência da doença, sugerindo que o estadiamento anátomo-patológico, por si só, seja incapaz de assegurar o prognóstico do paciente (RESNICK et al., 2004). Portanto, a pesquisa de marcadores moleculares é importante para avaliação do prognóstico, como também para a alocação de indivíduos em protocolos apropriados de tratamento (ALLEGRA et al., 2002). A identificação de lesões gênicas responsáveis pela carcinogênese poderia criar um novo sistema de estadiamento baseado na biologia molecular, que aumentaria a acurácia em prever o prognóstico de um indivíduo com câncer. Da mesma forma, a identificação de marcadores moleculares que determinem o comportamento e a agressividade do tumor é um passo necessário para a melhoria do tratamento dos cânceres (SAHA et al., 2002). Entretanto, poucos marcadores individuais que fornecem informação sobre o prognóstico têm sido identificados, sendo alguns com valor limitado, porque os tumores frequentemente expressam múltiplos proto-oncogenes, genes supressores e antígeno onco-fetal, cada um contribuindo para a progressão tumoral e metástase. Desta forma, um melhor entendimento do comportamento tumoral e da sua agressividade pode ser adquirido examinando-se a expressão imunohistoquímica de múltiplos marcadores (MANNE et al., 1997). O marcador molecular pode ser a base para uma decisão mais econômica e precisa para o prognóstico e terapia adjuvante apropriada. A procura de marcadores moleculares que prevejam o prognóstico e identifiquem tipos populacionais para regimes específicos de tratamento tem sido o maior foco das pesquisas em CCR nos últimos anos (RESNICK et al., 2004).

Este estudo analisou proteínas envolvidas diretamente na tumorigênese celular, relacionadas à apoptose e proliferação celular, cuja literatura tem atribuído às mesmas a possibilidade de serem utilizadas como marcadores de prognóstico do CCR.

O p53 é um gene supressor tumoral clássico, que age na regulação do desenvolvimento e do crescimento celular. Na existência de defeitos celulares genéticos, o gene p53 tanto pode promover o retardo da divisão celular para permitir o reparo dos genes, quanto pode induzir a apoptose, na vigência de defeitos não passíveis de correção. O gene supressor de tumor p53 codifica uma fosfoproteína nuclear cuja disfunção contribui para a agressividade do tumor. Danos no DNA promovem a ativação da p53, com conseqüente super expressão da mesma. Com a ativação da p53, o ciclo celular é parado em G1 para reparo do DNA. Depois de realizado o reparo, a p53 aumenta transcrição da proteína mdm-2, que se associa à p53, revertendo o bloqueio do ciclo celular. Uma vez que não haja reparo do DNA, é ativada a apoptose. Mutações em p53 possibilitam que células danificadas não sejam reparadas e progridam o ciclo celular (PINHAL et al., 2005). O p53 é o mais frequentemente gene alterado nos tumores sólidos humanos, especialmente no CCR. Aproximadamente 42 a 69% dos CCR apresentam positividade para o p53 (ADROVER et al., 1999).

A homeostase da célula requer um delicado equilíbrio entre a morte e a reparação celular. Genes da família bcl-2 codificam proteínas que têm um papel na inibição da promoção da apoptose. Acredita-se que a bcl-2 bloqueia a apoptose nos estágios precoces da carcinogênese. A expressão imunohistoquímica da bcl-2 tem sido associada com um melhor curso clínico que a transformação neoplásica relatada com a inibição da apoptose, podendo resultar em tumores menos agressivos (ZHAO et al., 2005).

A quantificação da atividade proliferativa celular tem sido alvo de várias investigações. O antígeno Ki67 está imunoexpresso em todas as fases do ciclo celular. Um aumento da atividade proliferativa está associado com um maior potencial maligno no CCR, estando a Ki-67 relacionada com pior prognóstico nos parâmetros histopatológicos do CCR, associando-se com metástase linfonodal, baixa diferenciação celular tumoral e com tumores maiores que 2,0 cm (SALEH et al., 2000).

A expressão imunohistoquímica do p53, bcl-2 e Ki-67, neste estudo, foi realizado individualmente e em grupo nos tumores colorretais. Os resultados foram relacionados com a recidiva, mortalidade, intervalo livre de doença, sobrevida, grau de diferenciação

celular e estadiamento. Não foi encontrada associação entre os marcadores e os fatores relacionados individualmente ou em grupo, com exceção do Ki-67, cuja expressão imunohistoquímica positiva quando comparada à negativa, apresentou resultado estatisticamente significativo para a recidiva tumoral. Este achado pode representar o marcador associado ao prognóstico do CCR.

## **5.2 A recidiva e as expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 no CCR**

Não houve achados estatisticamente significantes quando se observou a distribuição da expressão imunohistoquímica tumoral da p53 e da bcl-2 relacionando com a recidiva. Contrariamente ao que foi encontrado neste estudo, GALIZIA et al. (2004) mostrou em sua pesquisa que a p53 é um forte marcador molecular de recorrência, observando em 65 pacientes que a expressão imunohistoquímica da p53 apresentou alta reatividade em todos os pacientes, com 92% de recorrência do tumor em 5 anos. Entretanto, vários estudos mostram que a p53, apesar de ser o marcador molecular mais frequentemente imunoexpresso no CCR, não tem correlação com a recidiva deste tumor (RAU et al., 2003). Já a bcl-2 é correlacionada com a recidiva por alguns autores (NEHLS et al., 2007), embora outros trabalhos apresentem o mesmo resultado que este estudo (LUSTOSA et al., 2005). Com relação à Ki-67, esta pesquisa mostrou uma correlação estatisticamente significativa da expressão imunohistoquímica desta proteína com a recidiva ( $p=0,035$ ). Este resultado está de acordo com ISHIDA et al. (2003), cujo estudo mostra que apesar do uso do Ki-67 como fator preditivo de sobrevivência nos tumores primários é limitado, sua atividade proliferativa foi significativa quando do aparecimento de metástase linfonodal e hepática, sugerindo que a sua expressão imunohistoquímica pode se mostrar um útil marcador de prognóstico no CCR. Esta hipótese é reafirmada por CHEN et al. (1997), que mostrou a Ki-67 significativamente associada com recidiva do CCR. Entretanto, outros estudos contestam estes achados, ao afirmarem que a Ki-67 não tem relação com o prognóstico no CCR (HASHIMOTO et al., 2006). No CCR, altos níveis de Ki-67 tem sido correlacionada com a sobrevida. A expressão imunohistoquímica da Ki-67 é um método simples e útil para estimar a atividade proliferativa. A importância da Ki-67 como um indicador do comportamento do tumor não é clara. No CCR esse índice pode ser utilizado como um marcador de prognóstico (OSHIMA et al., 2005). Quando se

correlacionaram as três proteínas juntas, não houve diferença estatisticamente significativa com a recidiva tumoral.

### **5.3 A mortalidade específica e as expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 no CCR**

Neste estudo 16 pacientes faleceram em decorrência do CCR, sendo a mortalidade específica sem significância estatística, quando correlacionada com as expressões imunohistoquímicas em separado e em conjunto. Este achado é semelhante ao apresentado por LUSTOSA et al. (2005), que estudou a p53 e a bcl-2 separadas e em conjunto. Com relação à Ki-67, esta variável não foi analisada na literatura consultada.

### **5.4 O tempo livre de doença e as expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2, e Ki-67 no CCR**

Não houve significância estatística com o tempo livre de doença quando estes marcadores foram correlacionados em separado e em conjunto. Este achado está de acordo com o que foi mostrado por KIM et al. (2007), num estudo de 542 pacientes. Por outro lado, GARRITY et al. (2004), apesar de mostrar dados semelhantes para a p53 e bcl-2, apresentou resultado diferente para a Ki-67, quando concluiu em seu estudo que este marcador está fortemente associado com um aumento do tempo livre de doença.

### **5.5 A sobrevida e as expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2, e Ki-67 no CCR**

Quando esta variável foi analisada, não houve resultado estatisticamente significativo quando estudados individualmente ou em conjunto. Anormalidades da p53 têm sido relevantes no CCR, mas os resultados têm sido conflitantes (ANEJA et al., 2007). Tais resultados conflitantes podem ser obtidos por múltiplos fatores, entre eles

diferentes tipos de anticorpos, método de fixação, diferença na detecção e marcação, além de número de pacientes incluídos (PEREIRA et al., 1997). De fato, diversos estudos mostram a inconsistência dos resultados com a p53, uma vez que uns mostram a relação entre a p53 e a sobrevida, enquanto outros não (POPAT et al., 2006; RAU et al., 2003). Como a p53 está relacionada com a apoptose, não é de se estranhar a sua super expressão. Tal fato já havia sido descrito por SAMOWITZ et al. (2002), que num estudo de 1464 casos identificou correlação estatisticamente significativa entre p53 e pior prognóstico, estágios avançados e tumores distais. Também em uma análise de sobrevivência durante 10 anos de observação mostrou pior prognóstico quando a expressão da p53 está aumentada (PALUSZKIEWICZ et al., 2004).

Com relação à bcl-2, os estudos também são conflitantes nos resultados envolvendo sobrevida. A dificuldade na interpretação da literatura reside no fato do uso de diferentes sistemas de estágios ou pequenos grupos em diferentes estágios (ZAVRIDES et al., 2005). Em CCR, a bcl-2 foi mais alta (76,9%) que nos adenomas (59%), mas a expressão da bcl-2 em CCR e adenoma não foi correlacionada com parâmetros clínico-patológicos relevantes, incluindo displasia, diferenciação e prognóstico em análises uni e multi-variáveis, sugerindo que a bcl-2 desempenha um papel na tumorigênese em fases precoces da sequência adenoma-carcinoma (ZHAO et al., 2005; KOURAKLIS et al., 2003).

Quanto à Ki-67, estudos mostram que a sua expressão imunohistoquímica não tem correlação com a sobrevida (HASHIMOTO et al., 2006). Em contraste, GARRITY et al. (2004) relatam que este marcador está significativamente associado com aumento da sobrevida.

## **5.6 A diferenciação celular e as expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2, e Ki-67 no CCR**

Quando se correlacionou diferenciação celular e p53, não se encontrou significância estatística, sendo este achado observado por LIMA et al. (2006). Na amostra pesquisada, não houve achados estatisticamente significantes correlacionando

a expressão imunohistoquímica da bcl-2 com o grau de diferenciação celular, o que está de acordo com alguns estudos (BENDARDAF et al., 2003). Por outro lado, estudo de NEHLS et al. (2007), mostra uma correlação estatisticamente significativa entre bcl-2 e alto grau de diferenciação celular. Apesar do resultado, observou-se uma clara diferença entre as expressões da p53 e bcl-2 quando se compara a expressão tumoral (85,4% e 31,7%) e grau de diferenciação celular (84,6% e 32,1%, quando se avalia baixo grau de diferenciação) o que mostra que existe uma relação inversa entre as expressões, sugerindo que as proteínas podem interagir por complexos mecanismos opostos (CHEN et al., 1997). Trabalhos têm demonstrado que a expressão da bcl-2 e o CCR está associado a um melhor curso clínico, sugerindo que transformações neoplásicas relacionadas por inibição da apoptose podem resultar em tumores malignos menos agressivos (PEREIRA et al., 2000). Com relação à Ki-67, este estudo não mostrou correlação estatisticamente significativa com o grau de diferenciação celular, que está de acordo com RIBEIRO JR. et al. (2000). Entretanto, SALEH et al. (2000), mostra que a Ki-67 apresenta significância estatística quando relacionada à tumores mal diferenciados.

## **5.7 O estadiamento e as expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 no CCR**

Não se encontrou correlação estatisticamente significativa entre os marcadores isolados e em conjunto com o estadiamento no CCR neste estudo. Tal resultado está de acordo com o estudo de KIM et al. (2007), que não encontrou correlação significativa entre p53 e estadiamento, usando a classificação de Dukes. Entretanto, o estudo de ALLEGRA et al. (2002) mostrou associação significativa entre p53 e CCR no estadiamento C de Dukes. Com relação à bcl-2, BENDARDAF et al. (2003), de maneira semelhante a este estudo, não encontrou correlação estatisticamente significativa entre o marcador e o estadiamento. Mas METERISSIAN et al. (2001), mostrou em seu estudo que este marcador encontra-se associado com melhor prognóstico, sobretudo nos pacientes de estadiamento B de Dukes, evidenciando um importante declínio da expressão imunohistoquímica da bcl-2 durante a progressão do tumor de adenoma

para carcinoma, o que reforça a habilidade da bcl-2 em inibir a apoptose celular. Apesar de a relação entre a expressão da bcl-2 e a evolução do epitélio colônico normal para câncer invasivo permanecer desconhecido, existem evidências que sugerem que a expressão da bcl-2 vai diminuindo durante a evolução para CCR (H. ZAVRIDES, 2006). A expressão imunohistoquímica da KI-67 não mostrou correlação estatisticamente significativa com o estadiamento neste estudo. Este resultado vai de encontro ao de HASHIMOTO et al. (2006), que mostrou uma alta expressão imunohistoquímica correlacionada com o estadiamento. Porém, esta análise é conflitante com a de SALEH et al. (2000), cujo estudo mostrou que este marcador, apesar de apresentar uma clara tendência do aumento do Ki-67 com o avanço da doença, não apresentou uma correlação estatisticamente significativa relacionada à Classificação de Dukes. Estes resultados podem ser reflexo do fato de a Ki-67 mostrar o status da proliferação celular e não exclusivamente o evento tumorigênico.

### **5.8 A imunohistoquímica e os marcadores prognósticos no CCR**

Na maior parte dos casos, estudos procurando por um marcador biológico de prognóstico para o CCR têm produzido resultados inconclusivos. Isto em parte é decorrente de estudos com populações não homogêneas, tumores em estágios diversos, análises estatísticas variadas, sítio dos sintomas, diferentes protocolos de tratamento, além de aspectos primários concernente à técnica de IHQ, bem como avaliação dos resultados. Apesar de utilizada na maioria dos estudos, a IHQ é interpretada com variáveis de protocolo e escores os mais diversos, o que impossibilita a comparação dos resultados em diferentes estudos (WERNER et al., 2005). Na verdade, a expressão imunohistoquímica positiva para a p53, por exemplo, não implica necessariamente em mutação. Da mesma maneira, a ausência de coloração pode ocorrer em caso de deleção do gene, falência de transcrição ou mutação não estável (ADROVER et al., 1999). Neste aspecto, o estudo por TMA, que permite a avaliação simultânea de múltiplos casos em uma só lâmina, apresenta a vantagem de ser um método que elimina as variações que se encontram em cada lâmina individualmente, sendo um importante fator para a diminuição de vieses metodológicos (KIRKEGAARD et al., 2006). Este estudo usou o TMA, o que está de acordo com várias revisões atuais

da literatura, que corroboram o uso da técnica da TMA como o método de escolha para prover os pesquisadores com uma ferramenta poderosa e relativamente simples de investigação da expressão proteica de marcadores tumorais. A separação de grupos para classificá-lo com relação à intensidade da reação de expressão imunohistoquímica apresenta uma grande variação de critérios entre os principais grupos de pesquisa (COSTA, 2008). Neste trabalho optou-se por classificar em “positivo” ou “negativo” e colocar três examinadores independentes para uma melhor acurácia. A positividade do marcador foi avaliada utilizando-se um sistema de escore em que o valor de corte está predeterminado na percentagem de células coradas pelo tumor. A expressão imunohistoquímica foi considerada negativa quando encontrou-se um valor  $\leq 10\%$  de células neoplásicas coradas e foi considerada positiva quando se encontrou um valor  $> 10\%$ . Tal modelo de interpretação foi validado por ZLOBEC et al. (2006), que demonstrou um alto grau de concordância inter-observadores e foi utilizado em outros estudos (SCHWANDNER et al., 2007; GOMES, 2008), mostrando que este método pode apresentar reprodutibilidade maior que o método semi-quantitativo, onde se analisa uma escala de proporção de células coradas, bem como o escore de intensidade e proporção de células neoplásicas coradas.

## **5.9 Considerações finais**

### **5.9.1 Implicações para a pesquisa**

Embora nos últimos anos um grande número de informações científicas esteja disponível, os resultados não têm mostrado relevância clínica. A extensa investigação de marcadores tumorais em CCR, inclusive este estudo, ainda não mostrou aquele que possa ser considerado como uma variável independente de prognóstico. Com relação ao tamanho da amostra, estudos têm mostrado que grandes grupos populacionais podem confirmar mais fortemente a correlação entre o marcador tumoral e a possibilidade de ele ser usado como fator prognóstico. Por outro lado, o desenvolvimento de estudo em um painel de marcadores pode ser necessário para a medição da sobrevida nos pacientes com CCR (SMITH et al., 2003). De fato, diante destes resultados conflitantes e se for levada em consideração a complexidade dos



fenômenos envolvendo a carcinogênese e o número de proteínas que participam em cada passo deste processo, chega-se à conclusão que os marcadores prognóstico de tumor ainda não representam valor significativo no prognóstico do CCR. Este foco de estudo deve ser aprofundado no sentido de pesquisar novas moléculas bioativas com outros métodos de investigação, como o proteoma.

### **5.9.2 Implicações para a prática clínica**

A possibilidade de um marcador tumoral contribuir isoladamente na avaliação prognóstica do CCR é remota, levando-se em consideração os atuais conhecimentos disponíveis na carcinogênese deste tumor. Os resultados deste estudo confrontado com os da literatura mostram segurança para afirmar que não há como utilizar a expressão imunohistoquímica tumoral na clínica diária de pacientes com CCR. O estadiamento do tumor é, ainda, o principal determinante da sobrevida destes pacientes.

## **6 CONCLUSÕES**

1. As expressões imunohistoquímicas isoladas e associadas da p53, bcl-2 e Ki-67 não se relacionam com os fatores prognósticos clínicos-patológicos no adenocarcinoma colorretal.

2. A expressão imunohistoquímica isolada do Ki-67 está associada com a recidiva do adenocarcinoma colorretal, na amostra analisada.

**7 ANEXOS****Anexo 1****Lista dos pacientes que participaram do estudo**

<b>NOME</b>	<b>Nº TMA</b>	<b>RGHSP</b>
EAG	1	10012787.00
ELG	2	10001754.00
CCN	3	396399.00
EHS	4	10032410.00
JPS	5	10031784.00
JIS	6	773368.00
JA	7	10035678.00
DAJ	8	570508.00
ESM	9	10029515.00
ACS	10	1062302.00
AZC	11	468101.00
GAF	12	10031317.00
ACC	13	10024568.00
ARSS	14	10019654.00
FVN	15	707033.00
DTT	16	10013389.00
JMS	17	803119.00
ARS	18	10048311.00
BFF	19	10048123.00
EGPP	20	901899.00
ISP	21	10057148.00
GC	22	10051743.00
ASP Jr	23	989441.00
DD	24	10062177.00
ACP	25	10064885.00
CRP	26	10068757.00
ABM	27	741619.00
JMMR	28	1666495.00
AA	29	10073840
DF	30	10071746.00
APS	31	10082248.00
DDP	32	1079590.00
CGL	33	10086121.00
IJD	34	619689.00
CFSL	35	10094625.00
HCMA	36	694241.00

FM	37	10098806.00
FXM	38	10105006.00
JPF	39	769866.66
JLE	40	10106630.00
AC	41	00554074.00
OSJK	42	10068817.00
PMV	43	10067576.00
MED	44	10067022.00
MVM	45	10067596.00
CST	46	10038826.00
MAS	47	00579428.00
CHF	48	10072270.00
MJP	49	10069157.00
LHO	50	00519662.00
OBL	51	1006845800
VG	52	1006659200
JL	53	1001788600
RSP	54	1003007100
OPS	55	000000-66
EFMA	56	1004353000
CIF /113914	57	00000-66
RFQS	58	1004394000
LCR /78488	59	00000-66
EES	60	1003525500
MLPS	61	1003603000
AMA	62	1003364800
JEN	63	1004631900
FS	64	1004501700
LJO /39832	65	00000-66
ESJ	66	1004690400
HJS /96470	67	00000-66
NAC	68	1004754600
SBO	69	10048118-00
MGAS	70	657447-00
MN	71	1004471066
EG	72	1005425000
MMS	73	1005059266
VGB	74	1005387100
SD	75	100462500
CJO	76	1005606500
OMPM	77	1005608300
JFS /111507	78	00000-66
AQ	79	1005938200
CMPF	80	648145-66
AMS	81	1006009200
WFO	82	1005960400

NBSL	83	334498-00
PK	84	855458-00
SFCT	85	1006369800
TM	86	456893-00
MRS	87	1002433700
LTS	88	1006732700
MMAS	89	536282-00
JAS / 14490	90	00000-66
NA	91	1007320800
MSA	92	172670100
JMP	93	1007050300
AM	94	1006448500
LRI	95	83812100
INS	96	1007827200
IMB	97	66
MJJF	98	1008717600
EVA	99	1008804400
ABS	100	00733228-00
EB	101	1009126900
MA	102	66
PJJ	103	1009710400
FCV	104	1008320300
HFS	105	1009613666
JLS	106	1009558000
MLWM	107	66
TMF	108	77709800
ML	109	1010260800
MJTA	110	157751966
LFM	111	1005242000
SRN	112	97774200
GG S	113	1010556600
SK	114	1005790600
AMF	115	1010996300
RMAC	116	10113512-00
JRB	117	66
VB	118	106843700
EB	119	10113347-00
KS	120	10111769-00
ZGR	121	10114935-00
GNG /36469	122	000000-66
JOQ	123	1005873000
JNS	124	10071333.00
ARM	125	1008765800
FM	126	0000000-66
MLL	127	10090609 00
CJN	128	10074446.00

IIVG  
MCP

129	01720597.00
130	00380052.00

**Anexo 2****Ficha de coleta de dados do estudo**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA – HOSPITAL SÃO PAULO  
DISCIPLINA DE GASTROENTEROLOGIA CIRÚRGICA**

**Análise das expressões imunohistoquímicas da p53, bcl-2 e Ki-67 no adenocarcinoma colorretal e suas correlações com os fatores prognósticos.**

Ficha de coleta de dados

REGISTRO DO ESTUDO: \_\_\_\_\_

NOME: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

IDADE: \_\_\_\_\_ ANOS SEXO: ( ) MASC. ( ) FEM.

PROCEDÊNCIA:

( ) SÃO PAULO - CAPITAL ( ) SÃO PAULO – INTERIOR  
( ) OUTROS ESTADOS

LOCAL DA NEOPLASIA (CID10):

( ) CECO ( ) ASCENDENTE ( ) TRANSVERSO ( ) DESCENDENTE  
( ) SIGMÓIDE ( ) RETOSSIGMÓIDE ( ) RETO

DATA DO DIAGNÓSTICO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ DATA DA OPERAÇÃO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

TIPO DE CIRURGIA: ( ) CURATIVA ( ) PALIATIVA

CIRURGIA REALIZADA:

( ) COLECTOMIA DIREITA ( ) TRANSVERSECTOMIA  
( ) COLECTOMIA ESQUERDA ( ) RETOSSIGMOIDECTOMIA ABDOMINAL  
( ) HARTMANN ( ) MILES ( ) COLECTOMIA TOTAL  
( ) COLOSTOMIA DERIVATIVA ( ) OUTRAS \_\_\_\_\_

RESSECÇÃO DE OUTROS ÓRGÃOS: ( ) SIM ( ) NÃO

QUAL(IS): \_\_\_\_\_

TIPO HISTOLÓGICO: \_\_\_\_\_

GRAU DE DIFERENCIAÇÃO:

( ) BEM DIFERENCIADO ( ) MODERADAMENTE DIFERENCIADO  
( ) POUCO DIFERENCIADO ( ) INDIFERENCIADO

PRESENÇA DE MUCINA: ( ) SIM ( ) NÃO – PERCENTAGEM: \_\_\_\_\_%

ESTADIAMENTO (Peça operatória): T\_\_\_ N\_\_\_ M\_\_\_

QUANTIDADE DE LINFONODOS RESSECADOS: \_\_\_\_\_

QUANTIDADE DE LINFONODOS POSITIVOS: \_\_\_\_\_

METÁSTASE À DISTÂNCIA: ( ) SIM ( ) NÃO

ÓRGÃO AFETADO: ( ) FÍGADO ( ) PULMÃO ( ) CÉREBRO  
( ) OSSOS ( ) OUTROS \_\_\_\_\_

QUIMIOTERAPIA: ( ) SIM ( ) NÃO

( ) ADJUVANTE ( ) NEOADJUVANTE ( ) PALIATIVA

RADIOTERAPIA: ( ) SIM ( ) NÃO

( ) ADJUVANTE ( ) NEOADJUVANTE ( ) PALIATIVA

RECIDIVA: ( ) SIM ( ) NÃO

LOCAL: ( ) SIM ( ) NÃO

À DISTÂNCIA: ( ) SIM ( ) NÃO - ÓRGÃO: \_\_\_\_\_

REOPERAÇÃO POR RECIDIVA/METÁSTASE:

( ) SIM ( ) NÃO - DATA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

PERDA DE ACOMPANHAMENTO PÓS-OPERATÓRIO: ( ) SIM ( ) NÃO

MOTIVO: ( ) ALTA AMBULATORIAL ( ) MUDANÇA DE CIDADE  
( ) ÓBITO ( ) OUTROS

ÓBITO: ( ) SIM ( ) NÃO - DATA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

SOBREVIDA: \_\_\_\_\_ MESES

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO: ( ) SIM ( ) NÃO

QUAL?

( ) OUTRAS NEOPLASIA \_\_\_\_\_

( ) CIRURGIA PALIATIVA \_\_\_\_\_

( ) DOENÇAS ASSOCIADAS \_\_\_\_\_

( ) AUSÊNCIA DE ACOMPANHAMENTO PÓS-OPERATÓRIO

DATA DA ÚLTIMA CONSULTA:





## Anexo 3

### Parecer do Comitê de Ética aprovando o projeto de pesquisa



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 30 de março de 2009.  
**CEP 1431/05**  
**CONEP**

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) HUNALDO LIMA DE MENEZES  
Disciplina/Departamento: Gastroenterologia Cirúrgica/Cirurgia da  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Análise das imunorexpressões da p53, bcl-2 e KI-67 no adenocarcinoma colorretal e suas correlações com os fatores prognósticos"**.

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** **Emenda 1 (versão de 16/03/09, substituição de marcadores)** do projeto de pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

OBS: Informamos que, de acordo com a carta Circular nº 003-CONEP/CNS de 14 de fevereiro de 2001 não há necessidade do parecer da CONEP para emendas aos protocolos, salvo quando o CEP solicitar. Nos projetos de Grupo I e II, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las à ANVISA junto com o parecer aprobatório do CEP/UNIFESP.

"Resaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."

## 8 REFERÊNCIAS

1. Adrover E, Maestro ML, Sanz-Casla MT, del Barco V, Cerdán J, Fernández C, Balibrea JL. Expression of high p53 levels in colorectal cancer: a favourable prognostic factor. *Br. j. cancer.* 1999;81(1):122-126.
2. Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, Parr AL, Kirsch I, Kim G, Klein P, Johnston PG, Wolmark N, Wieand HS. Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study. *J. clin. oncol.* 2003;21(2):241-250.
3. Allegra CJ, Parr AL, Wold LE, Mahoney MR, Sargent DJ, Johnston P, Klein P, Behan K, O'Connell MJ, Levitt R, Kugler JW, Tria Tirona M, Goldberg RM. Investigation of the prognostic and predictive value of thymidylate synthase, p53, and Ki-67 in patients with locally advanced colon cancer. *J. clin. oncol.* 2002;20(7):1735-1743.
4. Almeida JRC, Pedrosa NL, Leite JB, Fleming TRP, Carvalho VH, Cardoso AAA. Marcadores tumorais: revisão de literatura. *Rev. bras. cancerol.* 2007; 53(3):305-316.
5. Aneja R, Ghaleb AM, Zhou J, Yang VW, Joshi HC. P53 and p21 determine the sensitivity of nocapine-induced apoptosis in colon cancer cells. *Cancer res.* 2007; 67(8):3862-3870.
6. Bendardaf R, Ristamaki R, Kujari H, Laine J, Lamlum H, Collan Y, Pyrhonen S. Apoptotic index and bcl-2 expression as prognostic factors in colorectal carcinoma. *Oncology.* 2003;64(4):435-442.
7. Bishnupuri KS, Luo Q, Murmu N, Houchen CW, Anant S, Dieckgraefe BK. Reg IV activates the epidermal growth factor receptor/Akt/AP-1 signaling pathway in colon adenocarcinomas. *Gastroenterology.* 2006;130:137-149.
8. Chen YT, Henk MJ, Carnq KJ, Wang WD, Rothenberger DA, Zbeng T, Feygin M, Madofi RD. Prognostic significance of tumor markers in colorectal cancer patients: DNA index, s-phase fraction, p53 expression, and Ki-67 index. *J. gastrointest. surg.* 1997;1:266-273.
9. Contasta I, Pellegrini P, Berghella AM, Beato TD, Adorno D. Colon cancer and gene alterations: their immunological implications and suggestions for prognostic indices and improvements in biotherapy. *Cancer biother.* 2006;21(5): 488-505.
10. Costa, HO. Imunoexpressão das proteínas da família bcl-2 em carcinomas colorretais e sua correlação com índice apoptótico, proliferação celular e sobrevida [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2008.
11. Fernandes LC, Matos D. Marcadores tumorais no câncer colorretal. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2002;29(2):106-111.

12. Forones NM, Oshima C, Nanogaki S, Tanaka M; Barbosa V. Determinação da atividade proliferativa pelo Ki-67 e p53 em doentes com câncer colorretal. *Arq. gastroenterol.* 1999; 36(3):122-126.
13. Galizia G, Ferraraccio F, Lieto E, Orditura M, Castellano P, Imperatore V, Romano C, Vollaro M, Agostini B, Pignatelli C, De Vita F. Prognostic value of p27, p53, and vascular endothelial growth factor in Dukes A and B colon cancer patients undergoing potentially curative surgery. *Dis. colon rectum.* 2004; 47:1904-1914.
14. Garrity MM, Burgart LJ, Mahoney MR, Windschitl HE, Salim M, Wiesenfeld M, Krook JE, Michalak JC, Goldberg RM, O'Connell MJ, Furth AF, Sargent DJ, Murphy LM, Hill E, Riehle DL, Meyers CH, Witzig TE. Prognostic value of proliferation, apoptosis, defective DNA mismatch repair, and p53 overexpression in patients with resected Dukes' B2 or C colon cancer: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J. clin. oncol.* 2004;22(9):1572-1582.
15. Gomes EGA. Análise das expressões imunohistoquímicas da metaloproteinase-1, metaloproteinase-7 e do fator de crescimento endotelial vascular no adenocarcinoma colorretal e suas correlações com os fatores prognósticos [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2008.
16. Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte celular por apoptose. *Rev. bras. cancerol.* 2007;53(3):335-343.
17. Hashimoto Y, Skacel M, Lavery IC, Mukherjee AL, Casey G, Adams JC. Prognostic significance of fascin expression in advanced colorectal cancer: an immunohistochemical study of colorectal adenomas and adenocarcinomas. *BMC cancer.* 2006; 6:241.
18. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2008 – Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro; 2008 [ citado 2008 aug 24 ]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/topo.asp>.
19. Ishidaa H, Miwab H, Tatsutaa M, Masutania S, Imamuraa H, Shimizua J, Ezumia K, Katoa H, Kawasakia T, Furukawaa H, Kawakami H. Ki-67 and CEA expression as prognostic markers in Dukes' C colorectal cancer. *Cancer lett.* 2004;207:109-115.
20. Jucá, M, Nunes BLBBP, Menezes HL, Gomes EGA, Matos D. Metaloproteinases 1 e 7 e câncer colorretal. *Rev. bras. colo-proctol.* 2008;28(3):353-362.
21. Kim GP, Colangelo LH, Wieand HS, Paik S, Kirsch IR, Wolmark N, Allegra CJ. Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: a National Cancer Institute–National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study. *J. clin. oncol.* 2007; 25:767-772.
22. Kirkegaard T, Edwards J, Tovey S, McGlynn LM, Krishna SN, Mukherjee R, Tam L, Munro AF, Dunne B, Bartlett JMS. Observer variation in immunohistochemical

- analysis of protein expression, time for a change? *Histopathology*. 2006;48:787-794.
23. Kouraklis G, Facs JK, Stamatios T, Tzonou A, Glinavou A, Raftopoulos J, Karatzas G. Prognostic significance and correlation with survival of bcl-2 and TGF- RII in colon cancer. *Dig. dis. sci.* 2003; 48(12):2284-2289.
  24. Lima JM, Serafim PVP, Silva IDCG, Forones NM. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códono 72) em câncer colorretal. *Arq. gastroenterol.* 2006;43(1): 8-13.
  25. 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):353-357.
  26. Manne U, Myers RB, Moron C, Poczatek RB, Dillard S, Weiss H, Brown D, Srivastava S, Grizzle WE. Prognostic significance of bcl-2 expression and p53 nuclear accumulation in colorectal adenocarcinoma. *Int. j. cancer.* 1997;74:346-358.
  27. Matos LL, Machado LN, Sugiyama MM, Bozzetti RM, Pinhal MAS. Tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais. *Arq. méd. ABC.* 2005;30(1):19-25.
  28. Meterissian SH, Kontogiannea M, Al-Sowaidi M, Linjawi A, Halwani F, Jamison B, Edwardes M. Bcl-2 is a useful prognostic marker in Dukes' B colon cancer. *Ann. surg. oncol.* 2001; 8(6):533-537.
  29. Nehls O, Okech T, Hsieh CJ, Enzinger T, Sarbia M, Borchard F, Gruenagel HH, Gaco V, Hass HG, Arkenau HT, Hartmann JT, Porschen R, Grego M, Klump B. Studies on p53, BAX and Bcl-2 protein expression and microsatellite instability in stage III (UICC) colon cancer treated by adjuvant chemotherapy: major prognostic impact of proapoptotic BAX. *Br. j. cancer.* 2007; 96:1409-1418.
  30. Oshima CT, Iriaky, Forones NM. Ki 67 as a prognostic marker in colorectal cancer but not in gastric cancer. *Neoplasma.* 2005; 52(5):420-424.
  31. Paluszkiwicz P, Berbec H, Wakowicz BP, Cybulski M, Paszkowska A. P53 protein accumulation in colorectal cancer tissue has prognostic value only in left-sided colon tumours. *Cancer detec. prev.* 2004;28:252-259.
  32. Pereira H, Silva S, Julião R, Garcia P, Perpétua F. Prognostic markers for colorectal cancer: expression of p53 and bcl-2. *World j. sur.* 1997;21(2):210-213.
  33. Popat S, Chen Z, Zhao D, Pan H, Hearle N, Chandler I, Shao Y, Aherne W, Houlston RS. A prospective, blinded analysis of thymidylate synthase and p53 expression as prognostic markers in the adjuvant treatment of colorectal cancer. *Ann. oncol.* 2006;17:1810-1817.
  34. Rau B, Sturm I, Lage H, Berger S, Schneider U, Hauptmann S, Wust P, Riess H, Schlag PM, Dorken B, Daniel PT. Dynamic expression profile of p21WAF1/CIP1

- and Ki-67 predicts survival in rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *J. clin. oncol.* 2003;21(18):3391-3401.
35. Resnick MB, Routhier J, Konkin T, Sabo E, Pricolo VE. Epidermal growth factor receptor, c-MET, beta-catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: a tissue microarray study. *Clin. cancer res.* 2004; 10(9):3069-3075.
  36. Ribeiro Jr U, Safatle-Ribeiro AV. P53 in clinical contexts: yes or not? *Arq. gastroenterol.* 2006;43(1):6-7.
  37. Ribeiro JR. U, Alves VA, Souza PMSB, Ribeiro AVS, Rawet V, Nonogaki S, Rodrigues JG, Habr-Gama A. Correlação das proteínas p53 e Ki67 com o prognóstico de pacientes com adenocarcinoma do reto distal. *Rev. bras. coloproctol.* 2000;20(4):248-256.
  38. Rocha FTR, Lourenço LG, Jucá MJ, Leal AT, Paz AMDC. Expressão da proteína P53 no adenocarcinoma gástrico: correlação clínica, anatomopatológica e significância prognóstica. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2004;31(3):186-193.
  39. Saha D, Roman C, Beauchamp RD. New strategies for colorectal cancer prevention and treatment. *World j. sur.* 2002;26(7):762-766.
  40. Saleh HA, Jackson H, Banerjee M. Immunohistochemical expression of bcl-2 and p53 oncoproteins: correlation with Ki67 proliferation index and prognostic histopathologic parameters in colorectal neoplasia. *Appl. immunohistochem. mol. morphol.* 2000;8(3):175-182.
  41. Samowitz, WS, Curtin K, Ma K, Edwards S, Schaffer D, Leppert MF, Slattery ML. Prognostic significance of p53 mutations in colon cancer at the population level. *Int. j. cancer.* 2002;99:597-602.
  42. Schwandner O, Schlamp A, Broll R, Bruch HP. Clinicopathologic and prognostic significance of matrix metalloproteinases in rectal cancer. *Int. j. colorectal. dis.* 2007;22:127-136.
  43. Smith DL, Sofia JC, Morat L, Yang Q, Sabatier L, Liu DD, Nemr RA, Rashid A, Vauthey JN. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) are better predictors of survival than established indicators in patients undergoing curative hepatic for colorectal metastases. *Ann. surg. oncol.* 2003; 11(1):45-51.
  44. Smyth EF, Sharma A, Sivarajasingham N, Hartley J, Monson JR, Cawkwell L. Prognostic implications of hMLH1 and p53 immunohistochemical status in right-sided colon cancer. *Dis. colon rectum.* 2004;47(12):2086-2091.
  45. Vieira RAC, Lopes A, Almeida PAC, Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Melo CA. Prognostic factors in locally advanced colon cancer treated by extended resection. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. São Paulo.* 2004; 59(6):361-368.

46. Werner B, Campos AC, Nadji M, Torres LFB. Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica. *J. bras. patol. med. lab.* 2005;41(5):353-364.
47. Xi Y, Shalgi R, Fodstad O, Pilpel Y, Ju J. Differentially regulated micro-RNAs and actively translated messenger RNA transcripts by tumor suppressor p53 in colon cancer. *Clin. cancer res.* 2006;12(7):2014-2024.
48. Zavrídes H, Zizi-Sermpetzoglou A, Elemenoglou I, Papatheofanis I, Peros G, Athanasas G, Panousopoulos D. Immunohistochemical expression of bcl-2 in UICC stage I and III colorectal carcinoma patients: correlation with c-erbB-2, p53, ki-67, CD44, laminin and collagen IV in evaluating prognostic significance. *Pol. j. pathol.* 2006; 57(3):149-159.
49. Zavrídes H, Zizi-Sermpetzoglou A, Elemenoglou I, Papatheofanis I, Peros G, Athanasas G, Panousopoulos D. Immunohistochemical expression of bcl-2 in Dukes' Stage B and C colorectal carcinoma patients: correlation with p53 and ki-67 in evaluating prognostic significance. *Pol. j. pathol.* 2005;56(4):179-185.
50. Zavrídes H, Zizi-Sermpetzoglou A, Panousopoulos D, Athanasas G, Elemenoglou I, Peros G. Prognostic evaluation of CD44 expression in correlation with bcl-2 and p53 in colorectal cancer. *Folia histochem. cytobiol.* 2005; 43(1):31-36.
51. Zhao DP, Ding XW, Peng JP, Zheng YX, Zhang SZ. Prognostic significance of bcl-2 and p53 expression in colorectal carcinoma. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 2005; 6(12):1163-1169.
52. Zlobec I, Steele R, Michel RP, Compton CC, Lugli A, Jass JR. Scoring of p53, VEGF, Bcl-2 and APAF-1 immunohistochemistry and interobserver reliability in colorectal cancer. *Mod. pathol.* 2006;19:1236-1242.

## Abstract

**Purpose:** To analyse the immunohistochemical expressions of the proteins p53, bcl-2 e Ki-67 in colorectal adenocarcinoma and correlate it with the clinical pathological prognostic factors. **Methods:** A TMA paraffin block was constructed with colorectal carcinoma tissue of 82 patients who had undergone surgery in the Hospital Sao Paulo-UNIFESP, from 2002 to 2005, submitted neither to chemo or radiotherapy. Four  $\mu\text{m}$  sections from the was submitted to immunohistochemistry and immunoexpression staining scores were obtained, than was correlated with the degree of cellular differential, stage, relapse-free survival, relapse, survival and specific mortality. The variables of the study were analyzed by tests of the qui-square and Kaplan-Meyer to verify the markers association. The significance of the differences between the curves of relapse-free survival and of the overall survival was analyzed by tests of Igrank and Wilcoxon. **Results:** The immunohistochemical expression of the p53 was found to be positive in 70 tumours (85,4%) and negative in 12 (14,6%). The bcl-2 was found to be positive in 26 (31,7%) and negative in 56 (68,3%). The immunohistochemical expression of the ki-67 was found to be positive in 62 (75,6%) and negative in 20 (24,4 %). There was no correlation statistically significant between the markers expressions separately and in conjunction, involving the degree of cellular differentiation, stage, relapse-free survival, survival and specific mortality. With respect the relapse, there was a correlation statistically significant with the positive expression of the ki-67 ( $p53=0,035$ ). **Conclusion:** The immunohistochemical expression of the Ki-67 in colorectal cancer is related to the incidence of the relapse of the disease.



## **Bibliografia consultada**

AURÉLIO. Miniaurélio Século XXI: O minidicionário da língua portuguesa. 4ª ed. rev. e ampl. Rio de Janeiro: Nova fronteira, 2001. 790 p.

MICHAELIS. Pequeno dicionário inglês-português, português-inglês. São Paulo: Melhoramentos, 1989. 792 p.

ROTHER, ET & BRAGA, MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2ª ed. rev. e ampl. São Paulo. 2005.