



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Estudo de correlação dos oncogenes *BCL2* e *MKI67* com o tipo histológico e a localização de 30 casos de adenocarcinoma colorretal

Diana Sofia Dos Santos França

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

Orientador: Prof. Doutor Javier Muñoz

Covilhã, Março de 2013

Dedicatória

À minha mãe, que foi a minha força e me ensinou a lutar por muito que o caminho seja duro.

Ao meu pai, que me ensinou a encontrar o sorriso mesmo quando tudo parecia sem solução.

À minha irmã, porque não posso imaginar uma amiga melhor no mundo.

Aos três, porque esta conquista é tão minha quanto vossa: devo-vos tudo o que sou hoje.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Javier Muñoz, por me ter dado a oportunidade de realizar este trabalho e pela infinita paciência em me orientar.

À Dr.^a Catarina Ferreira, pela ajuda e disponibilidade em partilhar seu conhecimento comigo.

Ao Dr. Miguel Freitas pela ajuda e interesse na boa realização do meu trabalho.

Aos meus pais e minha irmã, por me terem apoiada de todas as maneiras possíveis neste longo e duro caminho.

Resumo

O cancro colorretal é o terceiro com maior incidência em Portugal e a sétima causa de óbito nos países desenvolvidos, sendo responsável por 3,3% de todas as mortes. Em 98,6% dos casos manifesta-se na forma de adenocarcinoma. Este trabalho enfoca o estudo da relação de duas proteínas que influenciam o ciclo e multiplicação celular (Bcl-2 e KI-67), com algumas características anátomo-patológicas do adenocarcinoma colorretal cuja influência no prognóstico é conhecida (localização e tipo histológico). A proteína Bcl-2 é capaz de impedir a apoptose, permitindo a sobrevivência de células malignas e a progressão do crescimento tumoral. A KI-67 desempenha um papel na divisão celular, tendo sido usada como um marcador de proliferação. O seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido.

Foram estudados 30 casos adenocarcinomas colorretais ressecados cirurgicamente no Centro Hospitalar Cova da Beira entre 2002 e 2005. Em cada peça foram realizadas técnicas de marcação imunohistoquímica para as proteínas Bcl-2 e KI-67. As amostras foram classificadas em adenocarcinoma bem, moderadamente ou pouco diferenciado, de acordo com a presença de padrão glandular; foi feito também um agrupamento segundo a percentagem de células positivas para imunomarcação (0, 25, 50, 75 ou 100%). Analisaram-se as variáveis utilizando testes de χ^2 e de Cramer.

Observou-se que 2 carcinomas (7%) localizavam-se no cólon ascendente, 1 (3%) no transversal, 6 (20%) no descendente, 10 (33%) no sigmoide e 11 (37%) no reto. Relativamente ao tipo histológico, 9 (30%) eram bem diferenciados, 17 (57%) moderadamente e 4 (13%) pouco.

No que toca à marcação para Bcl-2, observaram-se 14 casos (47%) sem células positivas para esta proteína, 6 (20%) com 25% de células marcadas, 6 (20%) com 50%, 4 (13%) com 75% e 0 com 100%. Para a KI-67 observaram-se 13 casos (43%) com 0% de células marcadas, 5 (17%) com 25%, 4 (13%) com 50%, 6 (20%) com 75% e 2 (7%) com 100%. Não se encontrou correlação entre a marcação para Bcl-2 e localização ($p=0,746$) ou o tipo histológico dos tumores ($p=0,657$). Os resultados para a KI-67 foram similares, tendo-se obtido $p=0,466$ e $p=0,933$, respetivamente.

Palavras-chave

Adenocarcinoma colorretal, tipo histológico, localização, Bcl-2, KI-67.

Abstract

Colorectal cancer is the third most frequent in Portugal and the seventh leading cause of death in developed countries, accounting for 3.3% of all deaths. In 98.6% of cases manifests itself in the form of adenocarcinoma. This work focuses on the study of the relationship of two proteins that influence cell cycle and proliferation (Bcl-2 and KI-67), with some anatomical and pathological features of colorectal carcinoma whose influence on prognosis is known (location and histological type). Bcl-2 can prevent apoptosis, allowing the survival of malignant cells and the progression of tumor growth. KI-67 plays a role in cell division and has been used as a proliferation marker. Its mechanism of action has not been fully elucidated.

We studied 30 cases of colorectal carcinomas surgically resected in Centro Hospitalar Cova da Beira between 2002 and 2005. In each specimen were performed staining with Hematoxylin and Eosin and immunohistochemical labeling techniques for proteins Bcl-2 and KI-67. The samples were classified as adenocarcinoma well, moderately and poorly differentiated according to the existence of glandular pattern; it was also made a grouping according to the percentage of cells positive for immunostaining (0, 25, 50, 75 or 100%). Variables were analyzed using χ^2 and Cramer tests.

It was observed that 2 carcinomas (7%) were located in the ascending colon, 1 (3%) in the transverse, 6 (20%) in descending, 10 (33%) in the sigmoid and 11 (37%) in the rectum. Regarding the histologic type, 9 (30%) were well differentiated, 17 (57%) moderately and 4 (13%) poorly. As regards the BCL-2 marking, 14 cases (47%) of cells without this protein, 6 (20%) with 25%, six (20%) with 50%, 4 (13%) with 75% and 0 with 100% of labeled cells were observed. For KI-67, 13 cases (43%) with 0%, 5 (17%) with 25%, 4 (13%) with 50%, 6 (20%) with 75% and 2 (7%) with 100% of cells stained were observed. No correlation was found between the markup for Bcl-2 and location ($p = 0.746$) or histological type of tumor ($p = 0.657$). The results for KI-67 were similar, yielding $p = 0.466$ and $p = 0.933$, respectively.

Keywords

Colorectal adenocarcinoma, histological type, location, Bcl-2, KI-67.

Índice

| | |
|------------------------|------|
| Agradecimentos | v |
| Resumo | vii |
| Abstract | ix |
| Índice | xi |
| Lista de Figuras | xiii |
| Lista de Gráficos | xv |
| Lista de Tabelas | xvii |
| Lista de Acrónimos | xix |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1 Objetivos | 1 |
| 1.2 Hipóteses | 2 |
| 2. Materiais e métodos | 3 |
| 3. Resultados | 10 |
| 4. Discussão | 15 |
| 4.1 Limitações | 16 |
| 4.2 Conclusões | 16 |
| 5. Bibliografia | 18 |
| 6. Anexo | 21 |

Lista de Figuras

| | |
|---|---|
| Figura 1 - Complexo estreptavidina-biotina peroxidase. | 5 |
| Figura 2 - Adenocarcinoma bem diferenciado. | 6 |
| Figura 3 - Adenocarcinoma moderadamente diferenciado. | 6 |
| Figura 4 - Adenocarcinoma pouco diferenciado produtor de muco. | 7 |
| Figura 5 - Amostra de adenocarcinoma colorretal negativa para a marcação imunohistoquímica. Visualiza-se embolização. | 7 |
| Figura 6 - Amostra de adenocarcinoma colorretal com 50% das células positivas para a marcação imunohistoquímica. | 8 |
| Figura 7 - Amostra de adenocarcinoma colorretal com 75% das células positivas para a marcação imunohistoquímica. | 8 |

Lista de Gráficos

| | |
|---|----|
| Gráfico 1 - Distribuição por sexo da população estudada. | 9 |
| Gráfico 2 - Distribuição por grupo etário da população estudada. | 9 |
| Gráfico 3 - Distribuição por localização dos casos estudados. | 10 |
| Gráfico 4 - Distribuição por tipo histológico dos casos estudados. | 10 |
| Gráfico 5 - Distribuição por intensidade de marcação para cada uma das proteínas estudadas. | 11 |
| Gráfico 6 - Distribuição por percentagem de células marcadas para cada uma das proteínas estudadas. | 11 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Fases do processo de desidratação e inclusão em parafina segundo o protocolo do CHCB. | 3 |
| Tabela 2 - Fases do processo de reidratação e coloração com Hematoxilina e Eosina segundo o protocolo do CHCB. | 4 |
| Tabela 3 - Distribuição dos casos tendo em conta a percentagem de células marcadas para Bcl-2 e a localização do tumor. | 13 |
| Tabela 4 - Distribuição dos casos tendo em conta a percentagem de células marcadas para Bcl-2 e o tipo histológico do tumor. | 13 |
| Tabela 5 - Distribuição dos casos tendo em conta a percentagem de células marcadas para KI-67 e a localização do tumor. | 13 |
| Tabela 6 - Distribuição dos casos, tendo em conta a percentagem de células marcadas para KI-67 e o tipo histológico do tumor. | 14 |

Lista de Acrónimos

| | |
|--------------|---|
| AB1 | Anticorpo primário |
| AB2 | Anticorpo secundário |
| ABD | Adenocarcinoma bem diferenciado |
| AMD | Adenocarcinoma moderadamente diferenciado |
| APD | Adenocarcinoma pouco diferenciado |
| Bcl-2 | Proteína B-cell lymphoma 2 |
| <i>BCL2</i> | Gene que codifica a proteína Bcl-2 |
| BUFF | Soluções de lavagem |
| CHCB | Centro Hospitalar Cova da Beira |
| DAB | Diaminobenzidina |
| HPBK | Bloqueio da peroxidase endógena |
| HRP | Estreptavidina peroxidase |
| KI-67 | Proteína Ki-67 |
| <i>MKI67</i> | Gene que codifica a proteína Ki-67 |
| MIB-1 | Molecular Immunology Burstel 1 (anticorpo anti-Ki-67) |

1. Introdução

O cancro colorretal é o terceiro com maior incidência em Portugal, afetando 31,4/100000 habitantes por ano e sendo precedido somente por cancro da próstata em homens e da mama em mulheres.¹ É também a sétima causa de óbito nos países desenvolvidos, sendo responsável por 3,3% de todas as mortes.²

De todos os tipos de cancro colorretal, o mais frequente é o adenocarcinoma (98,6%).³

A importância de conhecermos as alterações genéticas responsáveis pela carcinogénese e desenvolvimento das doenças neoplásicas advém da possibilidade de se vir futuramente a desenvolver novos sistemas de estadiamento baseados em critérios moleculares, mais exatos na previsão do prognóstico de o que os critérios atuais.⁴

Um dos principais elementos reguladores da morte celular programada/apoptose é o gene *BCL2*, localizado no cromossoma 18 e estudado inicialmente no linfoma folicular de células B.⁵ Este codifica, entre outras, a proteína Bcl-2 que está presente na membrana mitocondrial, membrana nuclear e retículo endoplasmático das células e é capaz de impedir a apoptose ao inibir a libertação do citocromo c, a geração de espécies reativas de oxigénio e a acidificação intracelular e ao estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria.^{5,6}

Uma translocação (14;18) resulta na desregulação da expressão do gene gerando altos níveis de proteína Bcl-2, que atua como protetor das células contra a apoptose e pára o ciclo celular na fase G0; este mecanismo permite a sobrevivência de células malignas e a progressão do crescimento tumoral.⁷

Está descrita a associação entre altos níveis de Bcl-2 e carcinoma colo-retal.⁶

O gene *MKI67* localiza-se no braço longo do cromossoma 10 e codifica uma proteína (KI-67) de localização nuclear, que foi estudada pela primeira vez em 1983, em células de linfoma de Hodgkin.^{8,9}

A KI-67 desempenha um papel na divisão celular, podendo ser detetada nas células em todas as fases do ciclo celular, à exceção de G0, pelo que tem sido usada como um marcador de proliferação.⁸

Apesar de estar estudado a seu valor prognóstico em casos de cancro da mama e da próstata, entre outros, o seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido.⁸

1.1 Objetivos

- Estudar a relação entre a expressão da Bcl-2 e o adenocarcinoma colorretal
- Estudar a relação entre a expressão da KI-67 e o adenocarcinoma colorretal

1.2 Hipóteses

- Existe correlação entre a expressão da Bcl-2 e o tipo histológico de adenocarcinoma colorretal
- Existe correlação entre a expressão da Bcl-2 e a localização do adenocarcinoma colorretal
- Existe correlação entre a expressão da KI-67 e o tipo histológico de adenocarcinoma colorretal
- Existe correlação entre a expressão da KI-67 e a localização do adenocarcinoma colorretal

2. Materiais e métodos

Para a realização deste estudo foram escolhidos 30 casos de doentes submetidos a ressecção cirúrgica de adenocarcinomas colorretais no Centro Hospitalar Cova da Beira (CHCB) entre 2002 e 2005.

Cada peça cirúrgica foi conservada numa solução de formaldeído a 10% e enviada ao laboratório de Anatomia Patológica do hospital, onde foi feita inicialmente uma descrição macroscópica da peça. Em seguida colheram-se amostras de aproximadamente 3 mm de espessura de diferentes localizações: zona da lesão, margem cirúrgica, zona de transição tecido normal-lesão e mucosa normal. Neste trabalho foram considerados exclusivamente os espécimes provenientes da lesão.

Cada amostra de tecido foi então colocada numa cassete e identificada para ser, em seguida, submetida a desidratação, diafanização e finalmente impregnação em parafina (Tabela 1). Para este último passo as amostras foram retiradas das cassetes e colocadas em moldes de metal preenchidos de parafina líquida a 62°C; estes foram posteriormente arrefecidos sobre placa fria, a uma temperatura entre -10°C e -15°C, primeiro dentro e depois fora do molde metálico.

Tabela 1 - Fases do processo de desidratação e inclusão em parafina segundo o protocolo do CHCB.

| | | |
|----|-------------------------------------|-----|
| 1 | Formol | 3 h |
| 2 | Etanol 70% | 1 h |
| 3 | Etanol 95% | 1 h |
| 4 | Etanol 95% | 1 h |
| 5 | Etanol 100% | 1 h |
| 6 | Etanol 100% | 1 h |
| 7 | Etanol 100% | 1 h |
| 8 | Etanol 100% - Xilol (partes iguais) | 1 h |
| 9 | Xilol | 1 h |
| 10 | Xilol | 1 h |
| 11 | 1ª Parafina | 2 h |
| 12 | 2ª Parafina | 2 h |

Uma vez que os blocos de parafina se solidificaram procedeu-se à obtenção de cortes de 2 µm de espessura com micrótomo. Cada corte foi colocado num recipiente de água de fundo escuro para se observar a qualidade do mesmo e, os utilizáveis, foram dispostos sobre lâminas de vidro, colocados em água, aquecidos em banho-maria a 50-55°C para remover eventuais artefactos e finalmente dispostos novamente nas lâminas.

Todas as amostras foram então colocadas na estufa a 60°C para promover a adesão do corte à lâmina; esta secagem durou uma hora para as lâminas destinada à coloração com Hematoxilina-Eosina e prolongou-se um dia inteiro para aquelas em que posteriormente foi realizada imunomarcção.

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

Tabela 2 - Fases do processo de reidratação e coloração com Hematoxilina e Eosina segundo o protocolo do CHCB.

| | | |
|----|------------------------|-----|
| 1 | Xilol | 5m |
| 2 | Xilol | 5m |
| 3 | Etanol 100% | 3m |
| 4 | Etanol 95% | 1m |
| 5 | Etanol 70% | 1m |
| 6 | Água corrente | 2m |
| 7 | Hematoxilina de Harris | 10m |
| 8 | Água corrente | 3m |
| 9 | Etanol Clorídrico 1% | 10s |
| 10 | Água corrente | 6m |
| 11 | Etanol 70% | 1m |
| 12 | Eosina alcoólica | 1s |
| 13 | Etanol 95% | 1m |
| 14 | Etanol 95% | 1m |
| 15 | Etanol 95% | 1m |
| 16 | Etanol 100% | 3m |
| 17 | Etanol 100% | 5m |
| 18 | Xilol | 4m |
| 19 | Xilol | 3m |

Nas lâminas destinadas às técnicas de imunohistoquímica, depois da secagem em estufa, realizou-se desparafinação com Xilol e hidratação com concentrações decrescentes de etanol; estas foram posteriormente colocadas em panela de pressão durante 6 minutos com um tampão citrato de pH=6.0.

Em seguida as amostras foram processadas em máquina de imunohistoquímica de acordo com o protocolo próprio do CHCB, que inclui 79 passos (em Anexo).

Inicialmente utilizaram-se anticorpos monoclonais líquidos obtidos a partir do sobrenadante de culturas de células de ratinho; usaram-se o anticorpo NCL-L-bcl-2 (Novocastra) para marcar a oncoproteína Bcl-2 e o clone MIB-1 (Dako Denmark, M7240) para o antigénio KI-67. Os anticorpos foram empregues em concentrações de 1:25 e 1:300 respetivamente, em solução diluente (Dako Cytomation, ChemMate - Antibody Diluent, S.2022). Em seguida adicionou-se um anticorpo secundário; neste caso foram utilizadas imunoglobulinas biotiniladas de cabra anti-rato e anti-coelho (Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies). Posteriormente foi obtido o bloqueio da peroxidase endógena pela aplicação da Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution (Dako Denmark, S.2023) e foi depois adicionado um complexo de estreptavidina peroxidase e diaminobenzidina (Dako REAL™ detection System, Peroxidase/DAB+, K.5001). Todos os passos referidos foram intercalados por uma lavagem com Buffer Kit (Dako Cytomation, ChemMate, Buffer Kit, K.5006).

O resultado foi a obtenção de um complexo que, ao ligar-se ao antigénio específico do anticorpo primário, ativa o cromogénio (a diaminobenzidina) que confere uma cor acastanhada ao tecido onde o mesmo é expresso.

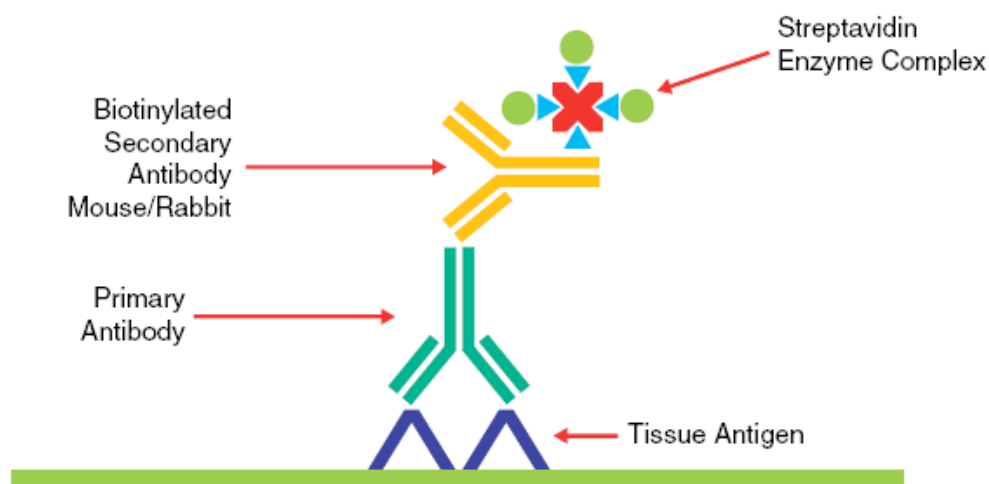


Figura 1 - Complexo estreptavidina-biotina-peroxidase.¹⁰

Finalmente foi realizada a coloração dos núcleos com Hematoxilina de Meyer e a montagem das lâminas em meio sintético.

O processo descrito foi realizado paralelamente em lâminas de controlo, constituídas por amostras de tecido amigdalino humano, tanto durante o estudo da oncoproteína Bcl-2 como do antigénio KI-67.

As lâminas foram observadas ao microscópio ótico a uma ampliação de 400x e foram classificadas por tipo histológico em adenocarcinoma bem, moderadamente ou pouco diferenciado. O critério usado para fazer esta distinção foi a presença de padrão glandular na amostra; assim a sua ausência total ou quase total caracterizava os tumores pouco diferenciados, a sua presença na maior parte do tecido os bem diferenciados e o grau intermedio os moderadamente diferenciados. Há que salientar que nos casos em que houvesse zonas que se pudessem classificar em graus diferentes, o adenocarcinoma recebeu sempre a categorização do grau menos diferenciado encontrado.

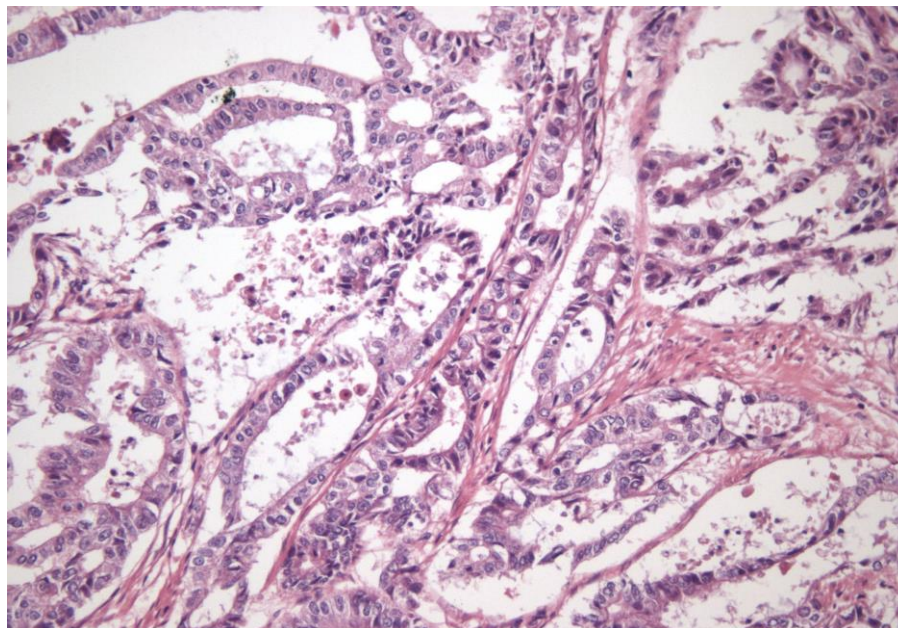


Figura 2 - Adenocarcinoma bem diferenciado.

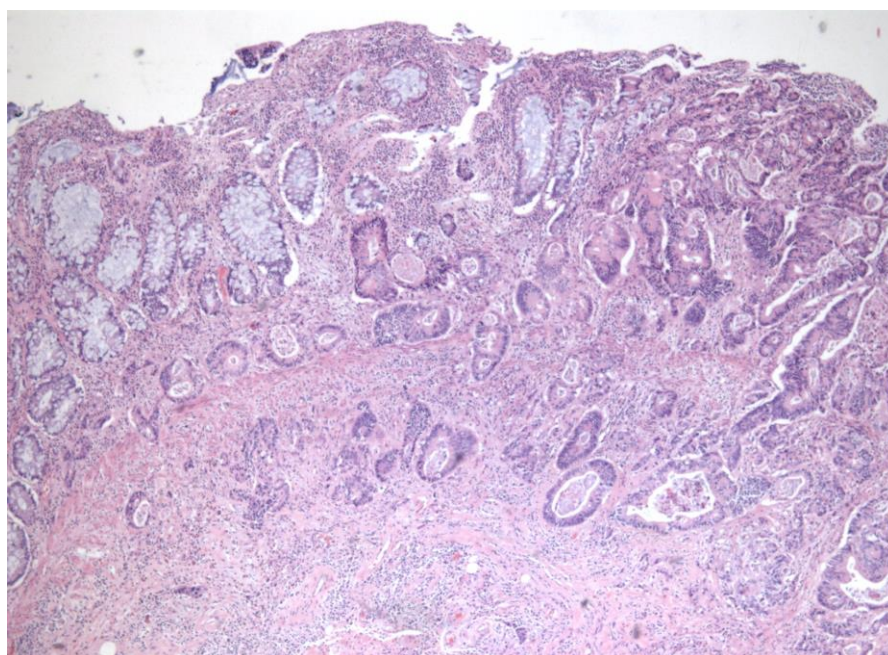


Figura 3 - Adenocarcinoma moderadamente diferenciado.

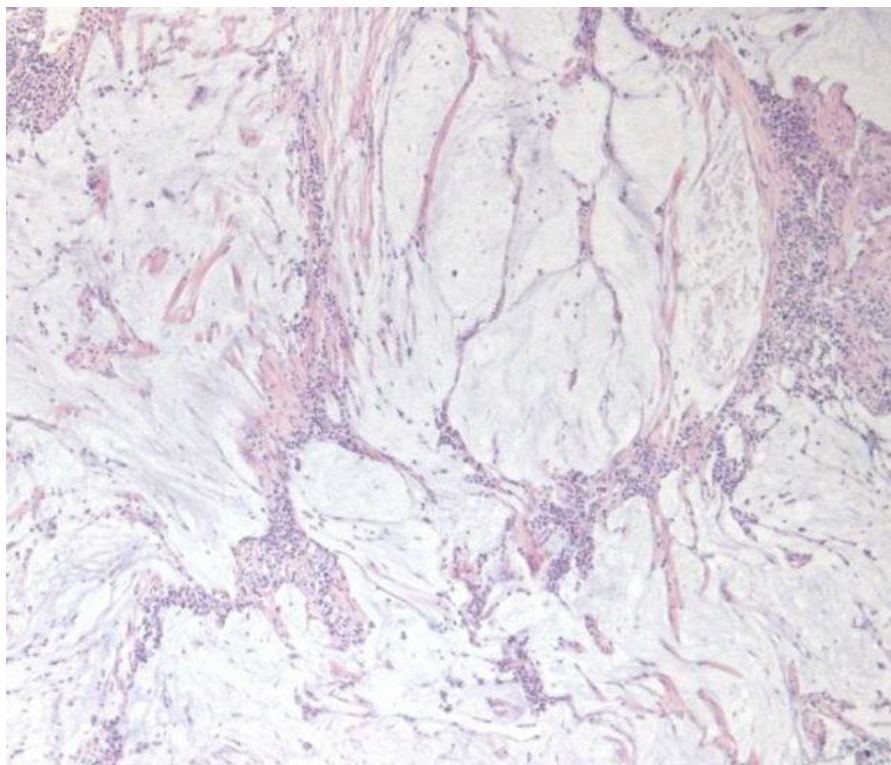


Figura 4 - Adenocarcinoma pouco diferenciado produtor de muco.

Relativamente à marcação imunohistoquímica, foi feita também uma classificação das lâminas segundo a percentagem de células “coradas” (0, 25, 50, 75 ou 100% das células da amostra) e a intensidade da marcação nos graus de -, +, ++ e +++. Neste estudo trabalhou-se principalmente com a percentagem de células marcadas e sua relação com os parâmetros histopatológicos observados.

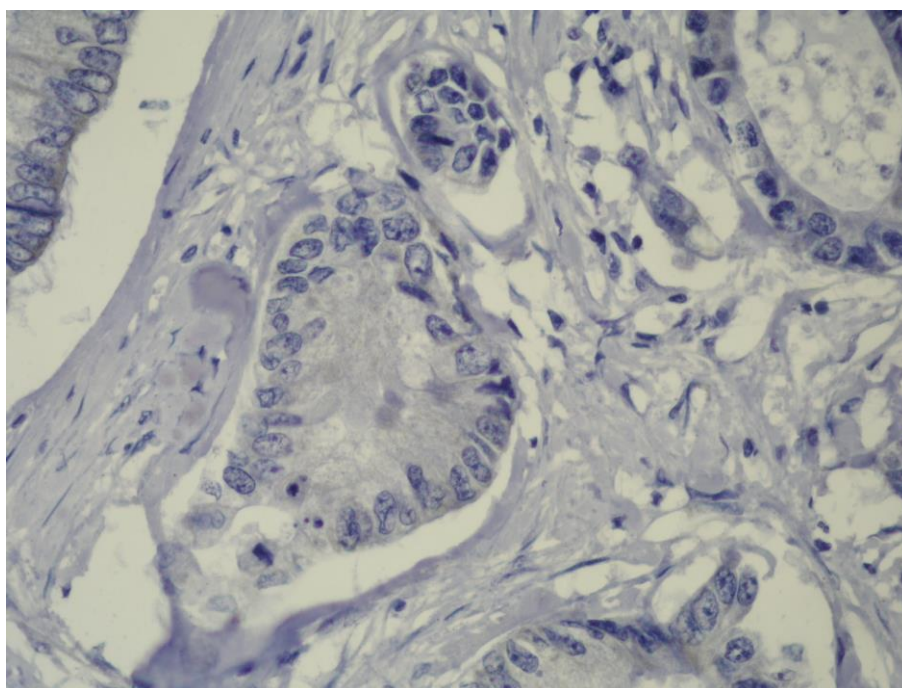


Figura 5 - Amostra de adenocarcinoma colorretal negativa para a marcação imunohistoquímica. Visualiza-se embolização.

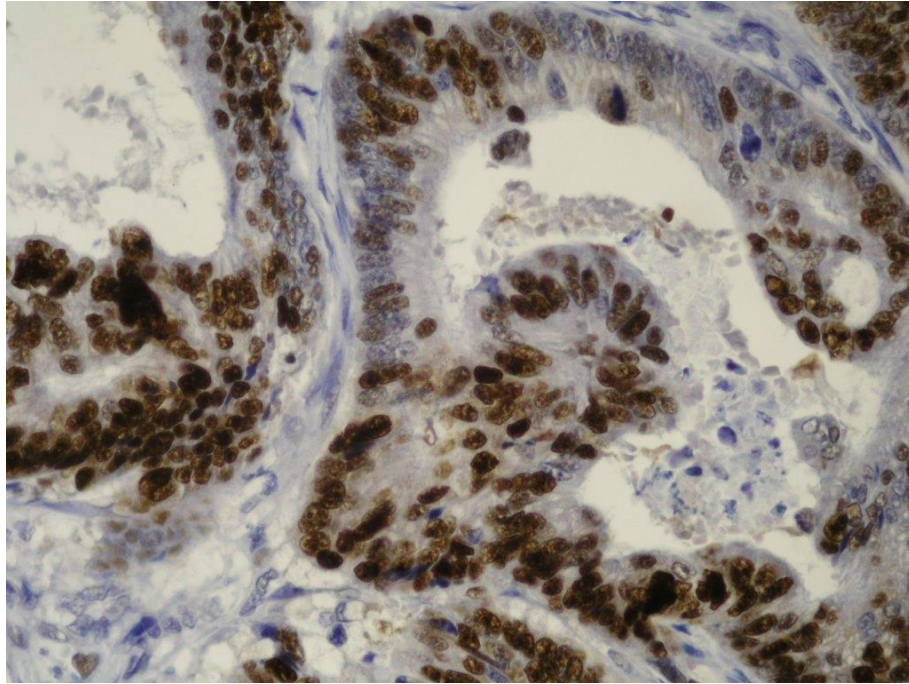


Figura 6 - Amostra de adenocarcinoma colorretal com 50% das células positivas para a marcação imunohistoquímica.

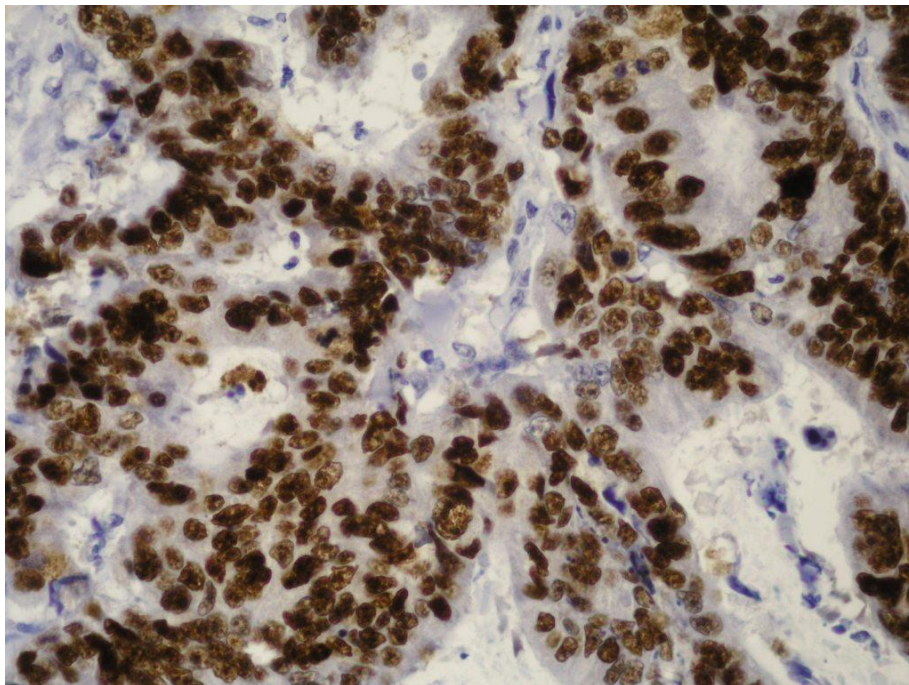


Figura 7 - Amostra de adenocarcinoma colorretal com 75% das células positivas para a marcação imunohistoquímica.

Os dados obtidos foram tratados utilizando Microsoft Office Excel® e IBM SPSS 19.0®. Foram realizados testes de χ^2 e de Cramer, para averiguar a existência de correlação estatisticamente significativa entre as variáveis:

- percentagem de células positivas para a marcação imunohistoquímica e localização do tumor;
- percentagem de células positivas para a marcação imunohistoquímica e tipo histológico do tumor.

Estabeleceu-se que os resultados são significativos para p inferior a 0,05.

3. Resultados

Foram estudados 30 casos de adenocarcinoma colorretal, de doentes submetidos a resseção cirúrgica no CHCB entre 2002 e 2005.

A amostra incluía 9 pacientes do sexo feminino e 21 do sexo masculino, tendo sido dividida em quatro grupos etários: menos de 61 anos, 61 a 65 anos, 66 a 70 anos e mais de 70 anos.

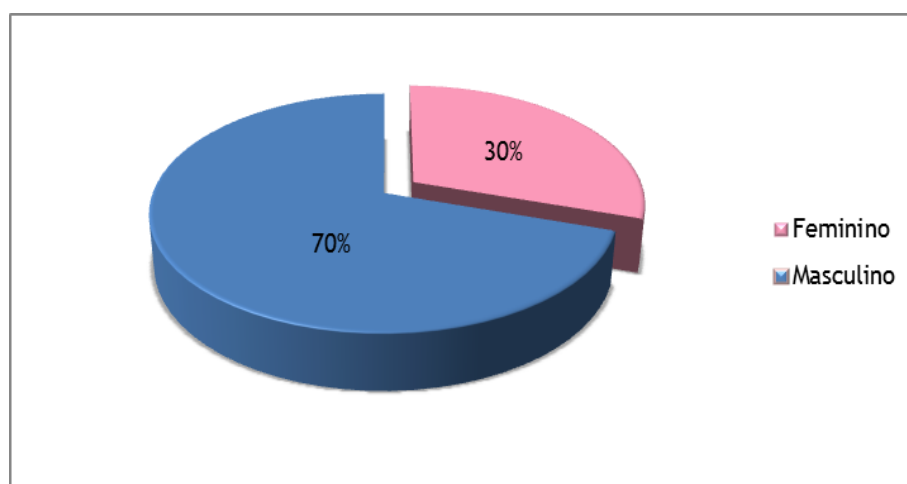


Gráfico 1 - Distribuição por sexo da população estudada.

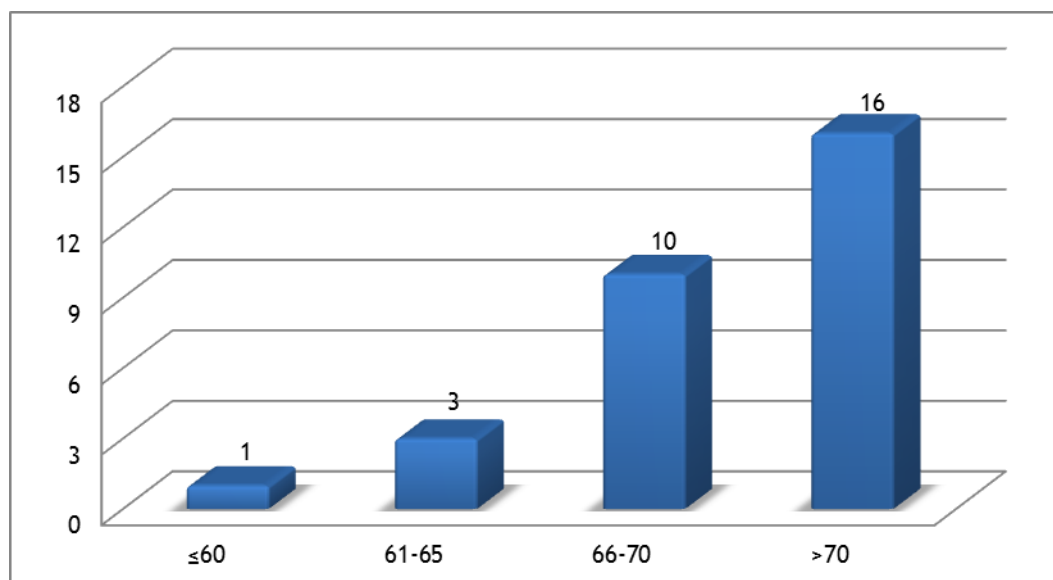


Gráfico 2 - Distribuição por grupo etário da população estudada.

De cada espécimen foram registradas a localização e o tipo histológico. Assim observou-se que 2 carcinomas (7%) localizavam-se no cólon ascendente, 1 (3%) no transverso e 6 (20%) no descendente, 10 (33%) no cólon sigmoide e 11 (37%) no reto.

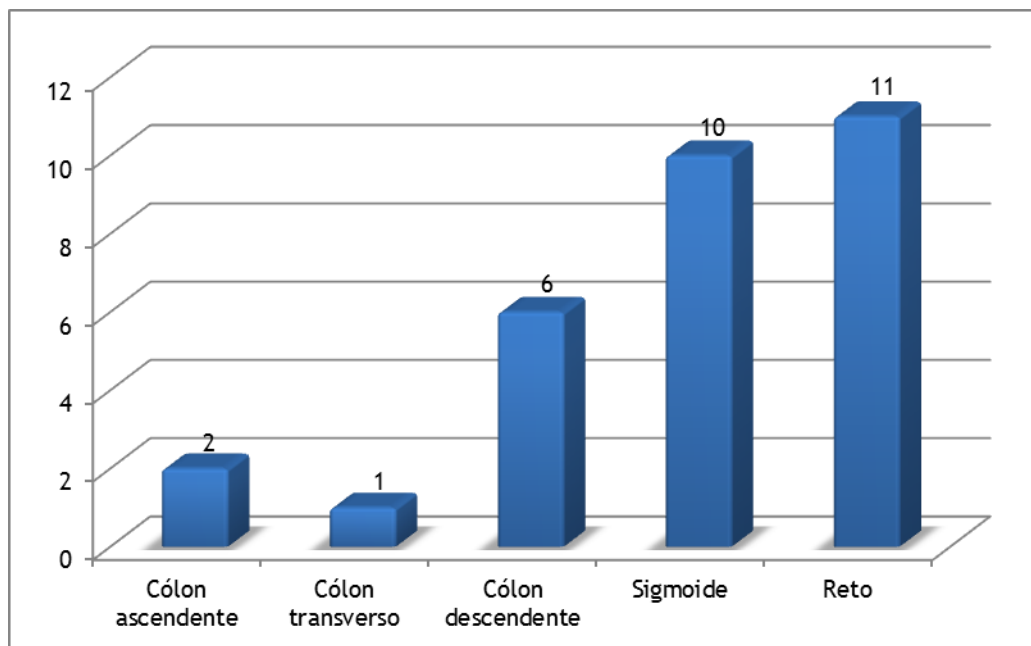


Gráfico 3 - Distribuição por localização dos casos estudados.

Relativamente ao tipo histológico de adenocarcinoma, 9 (30%) eram bem diferenciados, 17 (57%) moderadamente diferenciados e 4 (13%) pouco diferenciados.

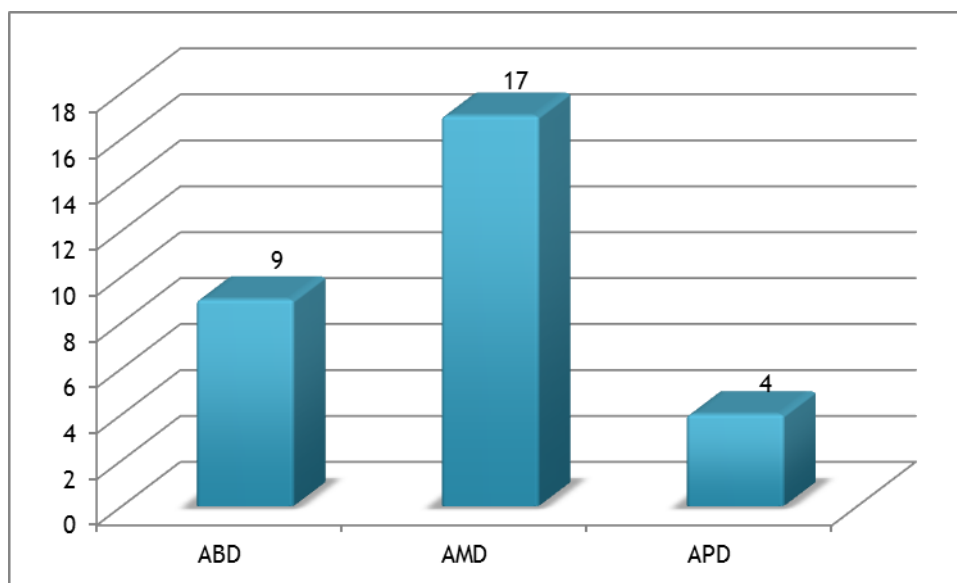


Gráfico 4 - Distribuição por tipo histológico dos casos estudados.

Relativamente à intensidade de marcação para Bcl-2 e KI-67, obtiveram-se os seguintes resultados:

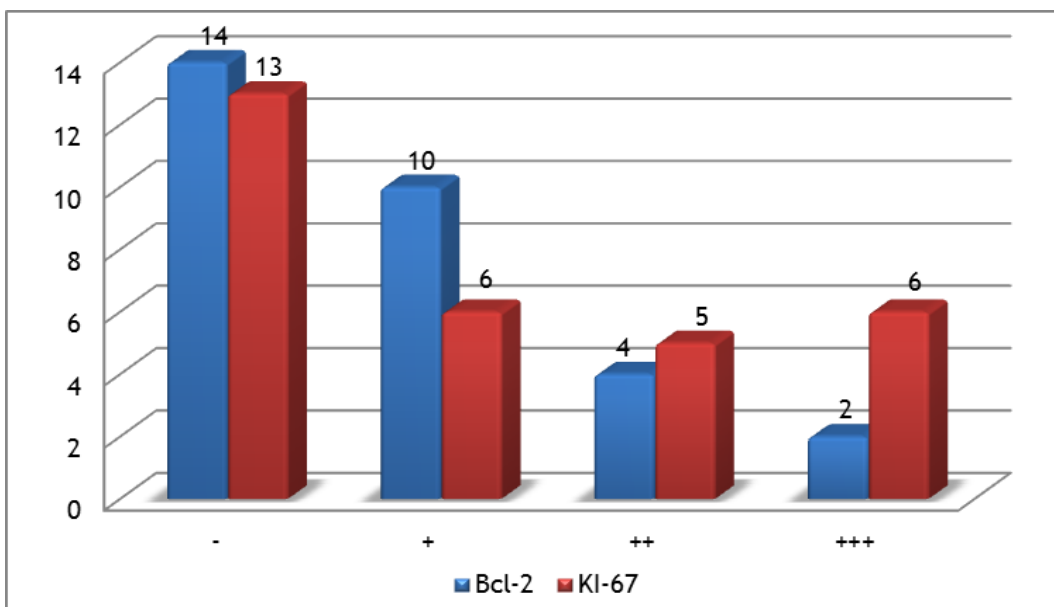


Gráfico 5 - Distribuição por intensidade de marcação para cada uma das proteínas estudadas.

No que toca à percentagem de células marcadas para Bcl-2, observou-se que havia 14 casos (47%) sem células positivas para esta proteína, 6 (20%) com 25% de células marcadas, 6 (20%) com 50%, 4 (13%) com 75% e 0 casos com 100% de marcação.

No que diz respeito à imunomarcação para KI-67 observaram-se 13 casos (43%) com 0% de células marcadas, 5 (17%) com 25%, 4 (13%) com 50%, 6 (20%) com 75% e 2 (7%) com 100% das células positivas para a proteína referida.

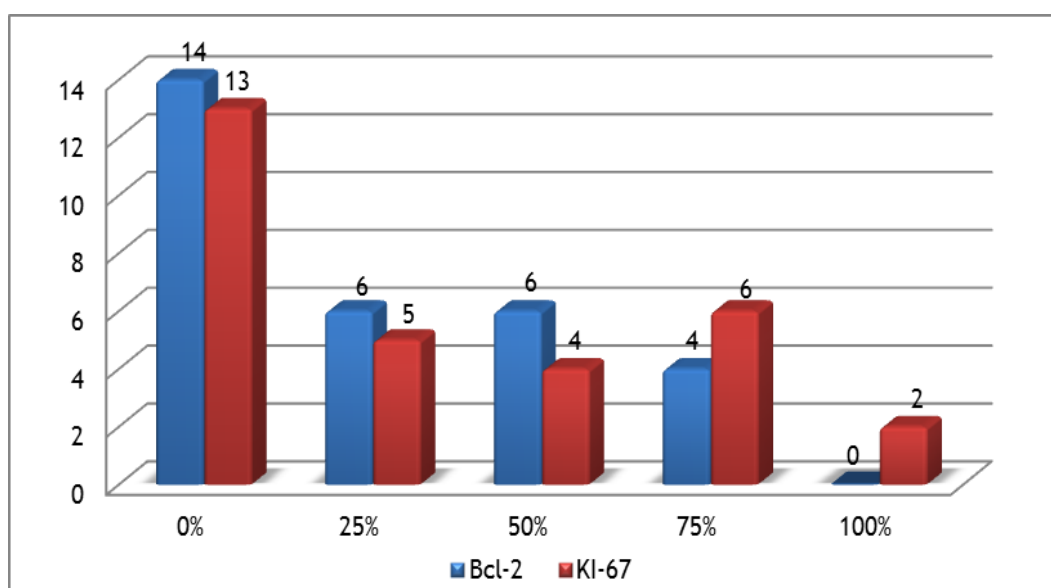


Gráfico 6 - Distribuição por percentagem de células marcadas para cada uma das proteínas estudadas.

Os casos estudados estavam distribuídos da seguinte maneira:

Tabela 3 - Distribuição dos casos tendo em conta a percentagem de células marcadas para Bcl-2 e a localização do tumor.

| | Localização | | | | | Total |
|--------------|------------------|-------------------|------------------|-----------|-----------|-----------|
| | Cólon ascendente | Cólon descendente | Cólon transverso | Reto | Sigmoide | |
| Bcl-2 % 0 | 0 | 3 | 1 | 4 | 6 | 14 |
| 25 | 0 | 2 | 0 | 3 | 1 | 6 |
| 50 | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 6 |
| 75 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 4 |
| Total | 2 | 6 | 1 | 11 | 10 | 30 |

Tabela 4 - Distribuição dos casos tendo em conta a percentagem de células marcadas para Bcl-2 e o tipo histológico do tumor.

| | Tipo histológico | | | Total |
|--------------|---------------------------------|---|-----------------------------------|-----------|
| | Adenocarcinoma bem diferenciado | Adenocarcinoma moderadamente diferenciado | Adenocarcinoma pouco diferenciado | |
| Bcl-2 % 0 | 5 | 6 | 3 | 14 |
| 25 | 1 | 5 | 0 | 6 |
| 50 | 2 | 3 | 1 | 6 |
| 75 | 1 | 3 | 0 | 4 |
| Total | 9 | 17 | 4 | 30 |

Tabela 5 - Distribuição dos casos tendo em conta a percentagem de células marcadas para KI-67 e a localização do tumor.

| | Localização | | | | | Total |
|--------------|------------------|-------------------|------------------|-----------|-----------|-----------|
| | Cólon ascendente | Cólon descendente | Cólon transverso | Reto | Sigmoide | |
| KI-67 % 0 | 0 | 4 | 1 | 2 | 6 | 13 |
| 25 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 5 |
| 50 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 4 |
| 75 | 1 | 2 | 0 | 2 | 1 | 6 |
| 100 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 |
| Total | 2 | 6 | 1 | 11 | 10 | 30 |

Tabela 6 - Distribuição dos casos, tendo em conta a percentagem de células marcadas para KI-67 e o tipo histológico do tumor.

| | | Tipo histológico | | | Total |
|---------|-----|---------------------------------|---|-----------------------------------|-------|
| | | Adenocarcinoma bem diferenciado | Adenocarcinoma moderadamente diferenciado | Adenocarcinoma pouco diferenciado | |
| KI-67 % | 0 | 4 | 7 | 2 | 13 |
| | 25 | 2 | 3 | 0 | 5 |
| | 50 | 1 | 2 | 1 | 4 |
| | 75 | 2 | 3 | 1 | 6 |
| | 100 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| Total | | 9 | 17 | 4 | 30 |

Nota-se que a distribuição de casos pelos diferentes grupos é heterogénea; intuitivamente parece não haver relação entre a presença dos marcadores estudados e qualquer uma das características de interesse.

Ao relacionar a percentagem de células marcadas para Bcl-2 e a localização do adenocarcinoma, com teste de χ^2 e de Cramer, não se observou correlação entre as duas variáveis ($p=0,746$); também não foi encontrada qualquer relação com o tipo histológico dos tumores estudados ($p=0,657$). Ao analisar a KI-67 os resultados foram similares, isto é, não foi observada qualquer relação entre a percentagem de células marcadas para a proteína em questão e a localização ($p=0,466$) ou o grau de diferenciação histológica os carcinomas ($p=0,933$).

4. Discussão

Embora as decisões terapêuticas relativas ao tratamento do adenocarcinoma colorretal nas últimas décadas assentassem sobre prognósticos baseados nas características anátomo-patológicas dos tumores, nos últimos anos têm sido dirigidos grandes esforços à criação de sistemas de estadiamento baseados em biologia molecular, mais personalizados e mais exatos na previsão do prognóstico de cada doente oncológico. Para conseguir isto, é necessário conhecer todos os marcadores moleculares que influenciam o comportamento dos tumores e o papel de cada um na evolução da doença e resposta às terapêuticas disponíveis.⁴

Neste contexto enquadra-se o presente trabalho, que enfoca o estudo da relação de duas proteínas que sabemos influenciarem o ciclo e multiplicação celular (Bcl-2 e Ki-67), com algumas características anátomo-patológicas do adenocarcinoma colorretal cuja influência no prognóstico é conhecida (localização e tipo histológico).

Na população observada a maioria dos pacientes era do sexo masculino (70%) e tinha mais de 65 anos (87%). Está estudado que a proporção de homens com cancro do cólon e reto é superior à de mulheres, apesar de a maioria dos estudos indicarem que a predominância é ligeira (aproximadamente 1,4:1); também sabe-se que a incidência aumenta com a idade, com 90% dos casos ocorrendo depois dos 50 anos de idade e 80% acima dos 65.^{1,11-13} Assim a distribuição por sexo e idade desta amostra está de acordo com o esperado, apesar de uma predominância de indivíduos do sexo masculino superior à relatada em estudos epidemiológicos de grande porte.^{11,12}

Relativamente à localização, a maioria dos tumores encontravam-se no cólon sigmoide (33%) e reto (37%), de acordo com o que está descrito na literatura.^{14,15} O estudo da localização tem relevância uma vez que é conhecida a existência de diferenças nas características genéticas e anatomopatológicas dos carcinomas originados de zonas diferentes do intestino grosso, com consequente influência na evolução, resposta às diferentes modalidades de tratamento e prognóstico.^{16,17}

Quanto à distribuição por tipo histológico, a maior parte dos espécimes foram classificados como adenocarcinomas moderadamente diferenciados (57%), seguidos em frequência pelos bem diferenciados (30%) e os pouco diferenciados (13%). Salienta-se que a distribuição por tipo histológico não pode ser comparada com outros estudos pois, apesar de existirem sistemas universais de classificação, grande parte deste processo depende do observador, fazendo com que a categorização de muitos dos casos seja subjetiva e dependente de critérios relacionados com a experiência de quem a realiza.

Relativamente aos objetivos do estudo, observou-se que não existe qualquer relação entre a percentagem de células marcadas para a proteína Bcl-2 e o grau de diferenciação (tipo histológico) dos adenocarcinomas colorretais ou a sua localização.

A literatura contém estudos com resultados muito heterogêneos e no geral inconclusivos no que toca a influência da Bcl-2 na patogênese do adenocarcinoma colorretal.⁴ Se por um lado sabe-se que esta proteína exerce um papel na fase precoce da carcinogênese^{7,18-19}, por outro a sua influência na diferenciação ou localização deste tipo de tumor não está provada. Apesar de haver estudos pontuais em que foi relatada alguma associação entre a quantidade de células positivas para Bcl-2 e o tipo histológico²⁰, a maioria dos trabalhos não observou qualquer correlação, inclusive com a variável localização, de acordo com o que se viu no presente trabalho.^{4,19,21,22}

No que toca o marcador KI-67, a única informação bem assente e aceite em toda a literatura científica atual é que este é um bom estimador da atividade proliferativa tumoral, apesar de não sabermos se e em que maneira se relaciona com o desenvolvimento do tipo de carcinoma ou com outras características, como a resposta aos fármacos e prognóstico.⁴ Como no caso da proteína anterior, a literatura apresenta resultados heterogêneos; uma grande maioria dos casos está de acordo com o que se observou neste trabalho, isto é, não há evidência de uma correlação entre a percentagem de células marcadas para KI-67, em amostras de adenocarcinoma colorretal, e a sua localização ou o seu grau de diferenciação.^{4,7-8,23} No entanto, relativamente a este marcador também existem alguns estudos em que foi encontrada uma relação entre variáveis, mais especificamente entre a quantidade de células marcadas e o grau de diferenciação do tumor.^{18,24}

4.1 Limitações e estudos futuros

É importante notar que, apesar de os resultados deste trabalho estarem de acordo com a maioria da literatura sobre o tema, não sabemos se estes são representativos da população geral, devido à pequena dimensão da amostra disponível e à distribuição desigual dos casos pelos diferentes grupos, havendo muita representação de alguns grupos em relação a outros (p.ex. adenocarcinoma moderadamente diferenciado vs. pouco diferenciado). Por este motivo, um estudo deste tipo deveria ser realizado novamente, com um maior número de casos. Para além disto, outra limitação deste trabalho é que não se avaliou a possível existência de uma relação entre a expressão de cada uma das proteínas com outras características da clínica dos pacientes oncológicos, nomeadamente, a resposta às diferentes terapias, a sobrevida e a metastização do tumor, que são os resultados finais de maior interesse no tratamento e, consequentemente prognóstico, deste doentes. Assim também poderia ser interessante, em futuro, realizar um trabalho para estudar estas variáveis.

4.2 Conclusão

A título de conclusão, pode-se então afirmar que não foi encontrada qualquer relação entre a percentagem de células marcadas para a proteína anti-apoptótica Bcl-2, tipo histológico ou localização de adenocarcinomas colorretais; o mesmo foi verificado para a proteína KI-67.

Os resultados do trabalho, incluindo testes estatísticos, não nos permitem concluir se o motivo desta ausência de correlação está relacionado com as dimensões e características da população estudada ou se é devida a uma real ausência de correlação entre as variáveis em questão.

Apesar das limitações referidas anteriormente e dos resultados não conclusivos, este trabalho é mais uma contribuição para a compreensão dos mecanismos moleculares que levam à geração e desenvolvimento de adenocarcinomas colorretais, juntando-se a toda uma série de estudos que poderão em futuro nos permitir uma atuação mais eficaz no tratamento desta doença oncológica.

5. Bibliografia

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. 2010 [cited 2012 Nov 15]. Available from <http://globocan.iarc.fr>
2. World Health Organization. The top ten causes of death. [Online] May 2011 [cited 2012 Nov 15] Available from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>
3. Santo GF, Aguilár-Nascimento E, Kishima MO, Takiuchi A. Correlação de fatores anatomopatológicos com a sobrevida de pacientes operados por adenocarcinoma colorretal. Revista do colégio brasileiro de cirurgiões. 2008; 35(3):182-7.
4. Menezes HL, Jucá MJ, Gomes EG, Nunes BL, Costa HO, Matos D. Analysis of the immunohistochemical expressions of p53, bcl-2 and Ki-67 in colorectal adenocarcinoma and their correlations with the prognostic factors. Arq Gastroenterol. 2010; 47(2):141-7.
5. Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, Stephens LC, Lee JJ, Levin B. Bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. Cancer Research. 1995; 55:237-41.
6. Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte celular por apoptose. Revista brasileira de cancerologia. 2007; 53(3):335-43.
7. Ustymowicz GK, Pryczynicz A, Kemoná A, Czyżewska J. Correlation between proliferation markers PCNA, Ki-67, MCM-2 and antiapoptotic protein Bcl-2 in colorectal cancer. Anticancer research. 2009; 29:3049-52.
8. Nabi U, Nagi AH, Sami W. Ki-67 proliferating index and histological grade, type and stage of colorectal carcinoma. J Ayub Med Coll Abbottabad. 2009; 20(4):44-8.
9. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer. 1983 Jan; 31(1):13-20.
10. Kumar GL, Rudbeck L. Immunohistochemical staining methods. 5th. Carpinteria: Dako North America; 2009. Figure 3, Labeled streptavidin-biotin method; p.58.
11. Mikov MM, Dugandžija T, Štabuc B, Muzikravić L. Colorectal cancer: current data on epidemiology, screening and follow-up. Archive of oncology. 2010 Sep; 18(1):11-12.

12. Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival and risk factors. *Clinics in colon and rectal surgery*. 2009; 22(4):191-7.
13. Boyle P, Langman MJ. Epidemiology. In: Young AM, Hobbs FD, Kerr DJ, editors. *ABC of colorectal cancer*. London : BMJ; 2001.
14. Hamilton SR, Aaltonen LA. *World Health Organization Classification of Tumors*. Lyon : IARC Press; 2007. Chapter 6, Tumors of the colon and rectum; p. 103-117.
15. Saad-Hossner R, Prado RG, Neto AB, Lopes PS, Nascimento SM, Santos CRV, Pracucho EM, Chaves FRP, Ioriatti ES, Siqueira JM. Estudo retrospectivo de pacientes portadores de câncer colorretal atendidos na Faculdade de Medicina de Botucatu no período de 2000-2003. *Rev bras Coloproct*. 2005; 25(1):31-7.
16. Agüero F, Murta-Nascimento C, Gallén M, García AM, Pera M, Hernández C, Burón A, Macià F. Colorectal cancer survival: Results from a hospital-based cancer registry. *Rev Esp Enferm Dig*. 2012; 104(11):572-7.
17. Glebov OK, Rodriguez LM, Nakahara K, Jenkins J, Cliatt J, Humbyrd CJ, De Nobile J, Soballe P, Simon R, Wright G, Lynch P, Patterson S, Lynch H, Gallinger S, Buchbinder A, Gordon G, Hawk E, Kirsch IR. Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. Aug 2003; 12:755-62.
18. Saleh HA, Jackson H, Khatib G, Banerjee M. Correlation of Bcl-2 oncoprotein immunohistochemical expression with proliferation index and histopathologic parameters in colorectal neoplasia. *App Immunohistochem Mol Morphol*. 2000; 8:175-82.
19. 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; 6:1163-69.
20. 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; 96:1409-18.
21. 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; 64:435-42.
22. Ivanov K, Kolev N, Tonev A, Nikolova G, Krasnaliev I, Softova E, Tonchev A. Comparative analysis of prognostic significance of molecular markers of apoptosis with clinical stage

Estudo de correlação dos oncogenes *BCL2* e *MKI67* com o tipo histológico e a localização de 30 casos de adenocarcinoma colorretal

and tumor differentiation in patients with colorectal cancer: a single institute experience. *Hepatogastroenterology*. Jan-Feb 2009; 56(89):94-8.

23.Jansson A, Sun XF. Ki-67 expression in relation to clinicopathological variables and prognosis in colorectal adenocarcinomas. *APMIS*. Sep 1997; 105(9):730-34.

24.Georgescu VC, Saftoiu A, Georgescu CC, Ciurea R, Ciurea T. Correlation of proliferation markers, p53 expression and histological findings in colorectal carcinomas. *J gastroenterol and liver diseases*. 2007; 16:125-9.

6. Anexo

Protocolo de funcionamento da máquina de imunohistoquímica utilizada no CHCB (BUFF - soluções de lavagem, PAD - “esponjas”, AB1 - anticorpo primário, AB2 - anticorpo secundário, HPBK - bloqueio da peroxidase endógena, HRP - estreptavidina peroxidase, DAB - cromogéneo diaminobenzidina).

| PASSO | ETAPA | TEMPO |
|-------|-------|--------|
| 1 | BUFF1 | 10'' |
| 2 | PAD1 | 29'' |
| 3 | BUFF1 | 10'' |
| 4 | PAD1 | 29'' |
| 5 | BUFF1 | 10'' |
| 6 | PAD1 | 29'' |
| 7 | BUFF1 | 10'' |
| 8 | PAD1 | 45'' |
| 9 | AB1 | 25' |
| 10 | PAD1 | 29'' |
| 11 | BUFF1 | 10'' |
| 12 | PAD1 | 29'' |
| 13 | BUFF1 | 10'' |
| 14 | PAD1 | 29'' |
| 15 | BUFF1 | 10'' |
| 16 | PAD1 | 29'' |
| 17 | BUFF1 | 10'' |
| 18 | PAD1 | 29'' |
| 19 | BUFF1 | 10'' |
| 20 | PAD2 | 45'' |
| 21 | AB2 | 25' |
| 22 | PAD2 | 29'' |
| 23 | BUFF1 | 10'' |
| 24 | PAD2 | 29'' |
| 25 | BUFF2 | 10'' |
| 26 | PAD2 | 29'' |
| 27 | HPBK | 2'30'' |
| 28 | PAD2 | 29'' |
| 29 | HPBK | 2'30'' |
| 30 | PAD2 | 29'' |
| 31 | HPBK | 2'30'' |
| 32 | PAD2 | 29'' |
| 33 | BUFF2 | 10'' |
| 34 | PAD2 | 29'' |
| 35 | BUFF2 | 10'' |
| 36 | PAD2 | 29'' |
| 37 | BUFF2 | 10'' |

Estudo de correlação dos oncogenes *BCL2* e *MKI67* com o tipo histológico e a localização de 30 casos de adenocarcinoma colorretal

| | | |
|----|-----------------------|------|
| 38 | PAD2 | 45'' |
| 39 | HRP | 25' |
| 40 | PAD3 | 29'' |
| 41 | BUFF2 | 10'' |
| 42 | PAD3 | 29'' |
| 43 | BUFF2 | 10'' |
| 44 | PAD3 | 29'' |
| 45 | BUFF3 | 10'' |
| 46 | PAD3 | 29'' |
| 47 | BUFF3 | 10'' |
| 48 | PAD3 | 29'' |
| 49 | BUFF3 | 10'' |
| 50 | PAD3 | 45'' |
| 51 | CROMOGÉNEO - DAB | 5' |
| 52 | PAD3 | 29'' |
| 53 | BUFF3 | 10'' |
| 54 | PAD3 | 45'' |
| 55 | CROMOGÉNEO - DAB | 5' |
| 56 | PAD3 | 29'' |
| 57 | BUFF3 | 10'' |
| 58 | PAD3 | 45'' |
| 59 | CROMOGÉNEO - DAB | 5' |
| 60 | PAD3 | 29'' |
| 61 | BUFF3 | 10'' |
| 62 | PAD4 | 29'' |
| 63 | BUFF3 | 10'' |
| 64 | PAD4 | 29'' |
| 65 | HEMATOXILINA DE MAYER | 1' |
| 66 | PAD4 | 29'' |
| 67 | BUFF3 | 10'' |
| 68 | PAD4 | 29'' |
| 69 | BUFF3 | 1' |
| 70 | PAD4 | 29'' |
| 71 | BUFF2 | 1' |
| 72 | PAD4 | 29'' |
| 73 | BUFF2 | 10'' |
| 74 | PAD4 | 29'' |
| 75 | H2O | 10'' |
| 76 | PAD4 | 29'' |
| 77 | H2O | 10'' |
| 78 | PAD4 | 29'' |
| 79 | H2O | 10'' |