

**Análise da expressão imunohistoquímica do
marcador de proliferação celular Ki-67 em
pacientes com adenocarcinoma do cólon e a
sua correlação com diferenciação histológica,
localização, estadiamento, prognóstico, sexo e
idade**

André Filipe Barbosa Teixeira

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

Orientador: Prof. Doutor Francisco Javier Muñoz

maio de 2020

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, à minha mãe, ao meu pai e à minha irmã. É graças a eles que vou tornar-me médico, sem eles, realizar este sonho não seria possível.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Javier Muñoz, pela oportunidade de realizar este trabalho, e também por toda a compreensão e disponibilidade que demonstrou para comigo ao longo desta jornada.

Devo também um agradecimento enorme à Professora Célia Nunes, que ajudou-me no tratamento estatístico dos dados. Sem ela este trabalho não seria possível.

Um agradecimento especial à Diane Pedrini por toda a ajuda e compreensão, mesmo tão longe, esteve presente ao longo desta jornada. Obrigado por tudo.

Quero agradecer aos meus amigos, que mesmo nas horas mais difíceis, sempre tiveram uma palavra de apoio e consolo para me dar. Fazendo uma retrospectiva destes 6 anos são muitos os momentos que orgulho-me de ter vivido com eles, penso que, tornei-me um Homem melhor graças a eles. Muito obrigado. Devo-lhes muito.

O último agradecimento, é para os meus pais e para a minha irmã. Tudo o que sou devo-lhes a eles. Espero um dia poder retribuir tudo aquilo que fizeram por mim. Obrigado.

Resumo

Introdução: Atualmente o Cancro Colorretal é uma das neoplasias mais diagnosticadas nos países desenvolvidos. Na Europa, acomete 17 em cada 100 000 habitantes. Apresenta baixa incidência abaixo dos 50 anos de idade e é mais frequente em homens do que mulheres. Os principais fatores de risco para desenvolver esta neoplasia são idade avançada e história familiar.

O fator de prognóstico mais importante desta doença é o estadiamento, pois a escolha da abordagem terapêutica recai principalmente nesta avaliação. Para auxiliar na avaliação do prognóstico dos pacientes, numerosos marcadores genéticos e bioquímicos têm vindo a ser sugeridos, no entanto, ainda não forneceram provas robustas para serem aplicados na prática clínica.

Este estudo teve por objetivo identificar a presença ou ausência do marcador de proliferação celular, Ki-67, em adenocarcinomas colorretais e verificar se este é um fator de prognóstico, ou se têm correlação com outras variáveis de interesse clínico, de forma a estudar o possível interesse do uso deste marcador em combinação com outras avaliações anatomopatológicas.

Objetivos: Verificar se o marcador de proliferação celular Ki-67 é preditivo de estadiamento, localização, diferenciação celular, prognóstico, sexo e idade em pacientes com adenocarcinoma colorretal.

Métodos: Neste estudo retrospectivo foram estudados 30 pacientes com Adenocarcinoma Colorretal, submetidos a ressecção cirúrgica com intenção curativa entre 1 de janeiro de 2004 e 1 de janeiro de 2007 no Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira, que posteriormente foram sujeitos a um follow-up pós-cirúrgico nos 10 anos seguintes.

As amostras recolhidas foram processadas no laboratório de Anatomia Patológica da instituição anteriormente mencionada, onde decorreu a classificação histológica e avaliação da expressão imunohistoquímica do Ki-67. O anticorpo MIB-1, dirigido ao antígeno Ki-67 humano, foi usado para este processo de marcação imunohistoquímica.

Os dados recolhidos foram analisados estatisticamente recorrendo ao Teste Exato de Fisher, onde utilizou-se um intervalo de confiança de 95% e foi considerado estatisticamente significativo um *valor p* <0.05. Foi também analisado o coeficiente de associação entre as variáveis, V de Cramer.

Resultados: Foi encontrada correlação estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre a marcação celular com o marcador de proliferação celular Ki-67 e duas das variáveis estudadas: “prognóstico” e “estadiamento”. Não foram obtidas relações estatisticamente significativas com outras variáveis estudadas.

Conclusão: Os resultados encontrados neste trabalho estão em sintonia com os resultados apresentados em outros estudos sobre o papel da proteína Ki-67, onde se conclui que esta está associada ao prognóstico e estadiamento de adenocarcinoma do cólon.

Palavras-chave

Ki-67; cancro colorretal; adenocarcinoma do cólon; imunohistoquímica; prognóstico; diferenciação histológica; prognóstico; sexo; idade

Abstract

Introduction: Nowadays Colorectal Cancer is one of the most diagnosed neoplasms in developed countries. In Europe it affects 17 out of every 100 000 inhabitants. It is infrequent below the age of 50 and affects more men than women. The main risk factors for developing this neoplasm are advanced age and family history of the disease.

The most important factor of prognosis is the staging of the disease, as the choice of therapeutic approach falls mainly on this assessment. To assist in the evaluation of the prognosis of patients numerous genetic and biochemical markers have been suggested, but they have not yet provided robust evidence to be applied in clinical practice.

This study aims to identify the presence or absence of the cell proliferation marker, Ki-67, in colorectal adenocarcinoma and to verify if it is a prognostic factor, or if it has correlation with other variables of clinical interest.

Objectives: To verify if the Ki-67 cell proliferation marker is predictive of staging, location, cell differentiation of prognosis, age and gender in patients with colorectal adenocarcinoma.

Methods: In this retrospective study, 30 patients with colorectal adenocarcinoma who underwent surgical resection with curative intention between January 1th 2004 and January 1th 2007 at the University of Beira Interior Hospital Center, who underwent post-medical monitoring in the following 10 years.

The samples collected were processed in the Laboratory of Pathology of the mentioned institution, where the histological classification and evaluation of the immunohistochemical expression of Ki-67 took place. The MIB-1 antibody, directed to the human Ki-67 antigen was used for this process of immunohistochemistry marking.

The collected data were analyzed statistically using Fisher's Exact Test, where a 95% confidence interval was used and p value < 0.05 was considered statistically significant. The coefficient of association between variables was analyzed with Cramer's V.

Results: Statistically significant correlation ($p < 0.05$) was found between the cellular proliferation marker Ki-67 and two of the studied variables: "prognosis" and "staging". No statistically significant relationships with other studied variables were obtained.

Conclusion: The results found in this study are in line with the results presented in other studies about Ki-67 role in colon adenocarcinomas, witch conclude that it is associated with the prognosis and staging of this neoplasia.

Keywords

Ki-67;colorectal cancer;corectal adenocarcinoma;immunohistochemistry;prognosis; histological differentiation;prognosis;gender;age

Índice

Dedicatória	iii
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice	xi
Lista de Figuras	xiii
Lista de Gráficos	xv
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Acrónimos	xix
Introdução	1
Materiais e Métodos	4
Estudo anatomopatológico e imunohistoquímico	4
Análise Estatística	7
Resultados	9
Discussão	21
Limitações	24
Conclusão	25
Bibliografia	27
Anexos	31

Lista de Figuras

Figura 1- Adenocarcinoma pouco diferenciado	6
Figura 2- Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	6
Figura 3- Adenocarcinoma bem diferenciado	7

Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Distribuição da amostra segundo a variável “sexo”	8
Gráfico 2 – Distribuição da amostra segundo a variável “idade”	8
Gráfico 3 – Distribuição da amostra segundo a variável “localização do tumor”	9
Gráfico 4 – Distribuição da amostra segundo a variável “grau de diferenciação histológica do tumor”.	9
Gráfico 5 – Distribuição da amostra segundo a variável “estadiamento”	10
Gráfico 6 – Distribuição da amostra segundo a variável “percentagem de células marcadas com Ki-67”	11
Gráfico 7 – Distribuição da amostra segundo a variável “intensidade da marcação pela proteína Ki-67”	11
Gráfico 8 – Relação entre a variável “percentagem de células marcadas com Ki-67” e a variável “prognóstico”.	19
Gráfico 9 – Relação entre a variável “intensidade da marcação por Ki-67” e a variável “prognóstico”	19

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Relação entre a percentagem de células marcadas com Ki-67 e a variável “diferenciação histológica” .	12
Tabela 2 – Relação entre a intensidade da marcação por Ki-67 e a variável “diferenciação histológica”.	12
Tabela 3 – Relação entre a percentagem de células marcadas com Ki-67 e a variável “localização”.	13
Tabela 4 – Relação entre intensidade da marcação por Ki-67 e a variável “localização”	13
Tabela 5 – Relação entre a percentagem de células marcadas com ki-67 e a variável “estadiamento”.	14
Tabela 6 - Relação entre a intensidade da marcação por Ki-67 e a variável “estadiamento”	15
Tabela 7 – Relação entre a percentagem de células marcadas com Ki-67 e a variável “sexo”.	16
Tabela 8 – Relação entre a intensidade da marcação com Ki-67 e a variável “sexo”	16
Tabela 9 – Relação entre a percentagem de células marcadas com Ki-67 e a variável “idade”	17
Tabela 10 – Relação entre a intensidade da marcação por Ki-67 e a variável “idade”	17
Tabela 11 – Relação entre a percentagem de células marcadas com Ki-67 e a variável “prognóstico”	18
Tabela 12 – Relação entre a intensidade da marcação por Ki-67 e a variável “prognóstico”	18

Lista de Acrónimos

ADB – Adenocarcinoma Bem Diferenciado

ACR – Adenocarcinoma Colorrectal

AMD – Adenocarcinoma Moderadamente Diferenciado

APD – Adenocarcinoma Pouco Diferenciado

CA – Cólon Ascendente

CCR – Cancro Colorrectal

CD – Cólon Descendente

CEA – Antígeno carcinogénico embrionário

CHUCB – Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira

CS – Cólon Sigmóide

CT – Cólon Transverso

F – Feminino

M – Masculino

N – Valor Absoluto

R – Reto

Folha em branco

Introdução

Atualmente o Cancro Colorretal (CCR) é terceira neoplasia maligna mais diagnosticada a nível mundial e a quarta causa de morte relacionada com cancro (1). Em Portugal, registaram-se 3852 óbitos por tumores malignos de cólon, reto e ânus no ano de 2017, representando 3.5% da mortalidade no país (2).

O estadio aquando do diagnóstico assume-se como o fator de prognóstico mais importante, com taxas de sobrevivência a 5 anos de 90% em pacientes com doença em estadio I, e pouco mais de 10% em pacientes com doença em estadio IV (3). O CCR afeta mais homens do que mulheres, assim como é 3 a 4 vezes mais prevalente em países desenvolvidos do que em países em desenvolvimento (4). Estas observações devem-se à diferente prevalência de fatores de risco modificáveis como: estilo de vida sedentário, obesidade, excesso de consumo de carnes vermelhas, álcool e hábitos tabágicos. A idade, género masculino, história familiar e pessoal de pólipos adenomatosos, e doença inflamatória intestinal constituem os fatores de risco não modificáveis desta doença (3).

É globalmente aceite que o CCR deriva de um pólipo displásico benigno. Entende-se por pólipo uma protusão focal macroscopicamente visível da parede intestinal. Dependendo da superfície de fixação à parede intestinal podem definir-se como sendo pediculados ou sésseis. Relativamente à classificação histopatológica, podemos dividir os pólipos em: inflamatórios, hiperplásicos, serreados e adenomatosos (5).

Estudos sequenciais demonstraram que a evolução dos pólipos adenomatosos e dos pólipos serreados em carcinomas deriva de duas vias principais de patogénese, nomeadamente, a via da instabilidade cromossómica e a via da instabilidade dos microssatélites que conduzem a mutações no ADN da célula. No caso do CCR destaca-se a importância da mutação nos genes supressores tumorais *APC* e *TP53* e nos oncogenes *KRAS*, *PI3KCa* e *BRAF* (6).

Existem vários tipos de tumor do cólon e do reto: adenocarcinoma, tumores carcinoides, tumores do estroma gastrointestinal, linfomas e sarcomas. Cerca de 96% dos CCRs são adenocarcinomas (7). A nível histológico, analisando a sua forma glandular podemos classificar os adenocarcinomas em: bem diferenciados (>95% do tumor tem forma glandular), moderadamente diferenciados (50% - 95% possuem forma glandular) e pouco diferenciados (<50% forma glandular). Cerca de 70% dos adenocarcinomas colorretais diagnosticados são moderadamente diferenciados, 10% bem diferenciados e 20% pouco diferenciados (8).

O crescimento do cancro colorretal pode ser entendido pelo seu estadiamento. No estadio O, o CCR é chamado de *tumor in situ*, isto é, as células cancerígenas encontram-se apenas na mucosa do cólon ou do reto. No estadio I, as células cancerígenas já cresceram além da mucosa e invadiram a camada muscular, não tendo atingido tecidos ou nódulos linfáticos próximos, o que corresponde aos estádios Tissue Node Metastasis Classification (TNM) - (T1 ou T2, No, Mo). Continuando o seu crescimento através da parede do cólon ou do reto, o cancro atinge o estadio II, e consoante a profundidade da invasão podemos caracterizá-lo como (T3 a T4b, No, Mo). Quando as células cancerígenas atingem os nódulos linfáticos, o estadio passa a ser III, e à medida que o cancro vai aumentando de tamanho e vai atingindo mais nódulos linfáticos, diferentes estádios podem ser caracterizados (IIIA, IIIB, IIIC) tendo em conta estas características. No momento em que se detetam células cancerígenas numa parte distante do corpo, como o fígado ou pulmões, existe metastização e foi atingido o estadio IV (9).

Embora o estadiamento do CCR segundo a classificação TNM da Union Internationale Contre le Cancer (UICC) forneça informação sobre o prognóstico e guie as decisões terapêuticas, não fornece informação sobre a resposta, nem sobre o resultado individual do paciente aos tratamentos (3). Assim, torna-se necessário identificar novas ferramentas para melhorar a compreensão dos parâmetros histopatológicos e clínicos, de forma a melhorar o resultado clínico dos pacientes com CCR.

A proteína Ki-67 foi descoberta em 1983 por Gerdes et al. que demonstraram que esta reagia com um antigénio nuclear expresso apenas em células em proliferação (10). Analisando o ciclo de divisão celular, a presença da proteína Ki-67 pode ser detetada nas fases ativas de divisão celular (G₁, S e G₂), mas encontra-se ausente na fase quiescente ou na fase G₀, sugerindo, então, o seu uso como marcador de proliferação celular (11). Um estudo recente demonstrou que o Ki-67 tem um papel na transcrição de rRNA, sendo esta correlação com a síntese de ribossomas a justificação da ligação entre a proliferação celular e a expressão de Ki-67 (12).

Não foram encontradas evidências de que houvesse algum tipo de célula humana que não expressasse a proteína Ki-67 quando estivesse em fase proliferativa (13). A avaliação imunohistoquímica do Ki-67 demonstrou utilidade como marcador de prognóstico em pacientes com cancro da mama (14), pulmão (15) e próstata (16).

A identificação imunohistoquímica da proteína Ki-67 é feita atualmente com o anticorpo MIB-1 (Molecular Immunology Burstel).

Objetivos: O objetivo deste trabalho de investigação passa por detetar através de coloração imunohistoquímica a expressão do Ki-67 (avaliada a partir da marcação com o anticorpo MIB-1), analisar a expressão da marcação por Ki-67, analisar a expressão das variáveis clinico-patológicas em estudo: “diferenciação histológica”, “localização”, “estadiamento”, “prognóstico”, “sexo” e “idade”, e por fim, verificar se o marcador Ki-67 é preditivo destas variáveis em pacientes com adenocarcinoma colorretal (ACR).

Hipóteses a testar

Verificar se existe correlação estatisticamente significativa entre a expressão da proteína Ki-67 no ACR e as seguintes variáveis:

- 1) diferenciação histológica
- 2) localização
- 3) estadiamento
- 4) prognóstico
- 5) sexo
- 6) idade

Materiais e Métodos

Para realizar este estudo retrospectivo, foram utilizados os dados referentes a 30 pacientes com adenocarcinoma do cólon submetidos a ressecção cirúrgica com intenção curativa no serviço de Cirurgia Geral do Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira (CHUCB), no período de 1 de janeiro de 2004 a 1 de janeiro de 2007. Nenhum dos pacientes realizou quimioterapia adjuvante. Foi realizado um *follow up* por um período de 10 anos destes pacientes. A caracterização da sobrevivência dos pacientes em relação à data da realização da cirurgia foi realizada em meses. O estudo foi realizado em colaboração com o laboratório de Anatomia Patológica do CHUCB, e recebeu parecer favorável do Comité de Ética do CHUCB.

Os critérios de inclusão foram: pacientes com ACR submetidos a ressecção cirúrgica no período de 1 de janeiro de 2004 a 1 de janeiro de 2007 e ausência de quimioterapia adjuvante. Não foram previstos critérios de exclusão.

Os parâmetros clínico-histopatológicos avaliados incluíram: “idade”, “sexo” e a sobrevivência da paciente caracterizada na variável “prognóstico”, “localização do tumor”, “estadiamento”, “grau de diferenciação histopatológica do tumor”, “percentagem de células marcadas com Ki-67” e “intensidade”.

A preparação das amostras assim como a coloração com Hematoxilina e Eosina e a deteção imunohistoquímica do Ki-67, foi realizada no laboratório de Anatomia Patológica do CHUCB, segundo os protocolos presentes nos Anexos 1, 2 e 3 respetivamente.

Estudo anatomopatológico e imunohistoquímico

As peças cirúrgicas ressecadas durante o momento operatório foram conservadas numa solução de formaldeído a 10% e enviadas para o laboratório de Anatomia Patológica do CHUCB, onde inicialmente foi feita uma descrição macroscópica da peça. De seguida, foram colhidas amostras de aproximadamente 3 a 4 mm de espessura de diferentes localizações: zona da lesão, margem cirúrgica, zona de transição do tecido normal – lesão e de mucosa normal. Estas amostras de tecido foram então introduzidas individualmente numa cassette e identificadas para serem submetidas a desidratação, diafanização e, finalmente, impregnação em parafina.

As cassetes foram colocadas no processador de tecido (Hipercenter XP) para serem impregnadas em parafina durante 4 horas, e, posteriormente foram arrefecidas no aparelho de inclusão Microm, a temperaturas no intervalo de -15°C a -10°C. O bloco de

parafina após estar arrefecido e solidificado foi então colocado num micrótomo, onde foram cortadas peças de 2mm de espessura e dispostas em lâminas. Todas as lâminas foram colocadas numa estufa a uma temperatura de 60°C, de forma a permitir maior adesão da peça à lâmina. Este processo demorou uma hora para lâminas destinadas à coloração com Hematoxilina-Eosina, e um dia inteiro para lâminas enviadas para imunomarcação.

Após a secagem na estufa, as lâminas destinadas a técnicas de imunohistoquímica foram submetidas a desparafinação com xílol e a hidratação com concentrações decrescentes de etanol, e posteriormente colocadas em uma panela de pressão com tampão de citrato (pH=6.0) durante 6 minutos. Estando então reunidas as condições para a marcação da proteína Ki-67, as amostras foram colocadas na máquina de marcação de imunohistoquímica e foi realizado o protocolo definido pelo CHUCB (anexo 3).

A determinação da proteína Ki-67 apenas pode ser realizada em tecido fresco, pois o epítipo não sobrevive à fixação rotineira de tecidos em formalina. Para avaliar a expressão imunohistoquímica da proteína Ki-67, foi utilizado o anticorpo monoclonal MIB-1, o qual reage com o antígeno Ki-67 humano (13).

O MIB-1 foi empregue em concentrações de 1:300 em solução de diluente (Dako Cytomation, ChemMate – Antibody Diluent, S.2022). Posteriormente, adicionou-se imunoglobulinas biotinizadas de cabra anti-rato e anti-coelho (Dako Real TM Link, Biotinylated Secondary Antibodies). Após a aplicação à amostra dos dois anticorpos, utilizou-se uma solução bloqueadora de peroxidase endógena (Dako Real TM Peroxidase – Bloking Solution, S.2023). Por último, foi utilizado um complexo de estreptavidina peroxidase e diaminobenzidina (Dako Real TM Detection System, Peroxidase – DAB +, K5001).

Durante a realização dos passos anteriores procedeu-se, de forma intercalada, à lavagem com Buffer Kit (Dako Cytomation, ChemMate, Buffer Kit, k.5006). Este procedimento resultou na coloração dos núcleos com Hematoxilina-Eosina, e foi efetuada a montagem das lâminas em meio sintético. A coloração Hematoxilina-Eosina foi realizada segundo o protocolo do CHUCB (anexo 2).

A observação das lâminas foi realizada ao microscópio ótico com ampliação de 400x por um Anatomopatologista. Foi realizada a classificação do tipo histológico como: adenocarcinoma bem diferenciado (Figura 3), moderadamente diferenciado (Figura 2) ou pouco diferenciado (Figura 1). A distinção entre os diferentes tipos de classificação

histológica é feita pelo padrão glandular da amostra. Em relação à análise da marcação imunohistoquímica foram realizadas duas classificações, nomeadamente, “percentagem de células marcadas pela proteína Ki-67” e “intensidade”. Na “percentagem de células marcadas pela proteína Ki-67”, a classificação foi realizada como 0%, 25%, 50%, 75% ou 100%, e utilizou-se um valor cutoff >0% para considerar-se esta marcação como positiva. A “intensidade” foi classificada como -, +, ++, +++. A ausência de marcação corresponde a “-“ e “+++” à máxima intensidade possível.

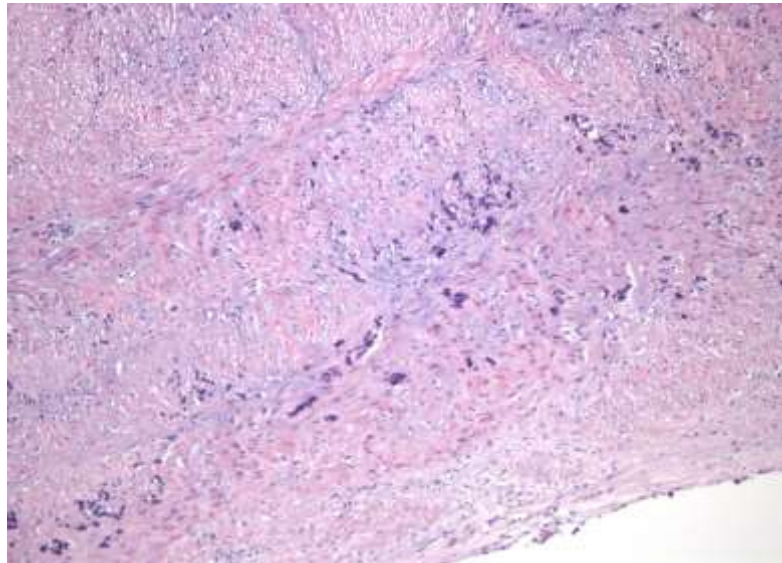


Figura 1- Adenocarcinoma pouco diferenciado

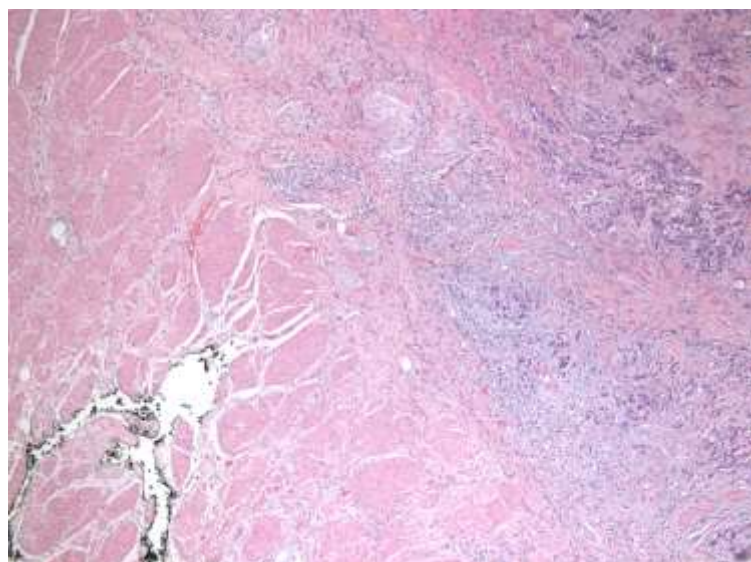


Figura 2- Adenocarcinoma moderadamente diferenciado

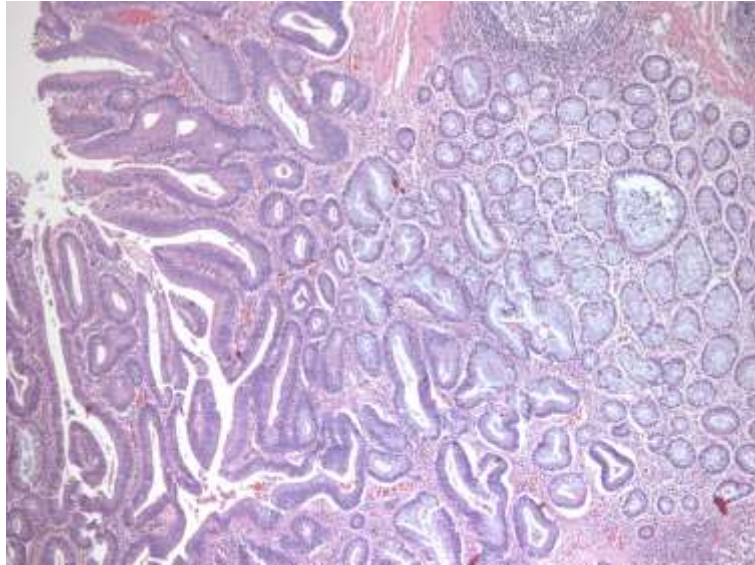


Figura 3- Adenocarcinoma bem diferenciado

Análise Estatística

Os dados recolhidos foram tratados estatisticamente usando os programas informáticos Microsoft Office Excel 2016® e IBM SPSS 25.0®.

Foi realizado o Teste Exato de Fisher para analisar a associação estatística entre a percentagem e a intensidade da marcação imunohistoquímica por Ki-67 com as variáveis “idade”, “sexo”, “localização”, “grau de diferenciação histológica”, “estadiamento” e “prognóstico”. Este teste fornece um valor p exato e não exige o uso de uma técnica de aproximação adicional, além de que é o mais usado para tamanhos de amostra pequenos ou quando a frequência esperada de uma variável for inferior a 5 (17). Utilizou-se um intervalo de confiança de 95% nos testes de hipóteses realizados, e foi considerado estatisticamente significativo um valor $p < 0.05$. Foi usado o coeficiente de associação, V de Cramer, para quantificar o grau de associação entre duas variáveis, sendo considerado:

$V < 0.1$ – associação muito fraca

$0.1 \leq V < 0.3$ – associação fraca

$0.3 \leq V < 0.5$ – associação moderada

$V \geq 0.5$ – associação forte

Resultados

Dos 30 elementos analisados neste estudo, 20 (66.7%) pessoas eram do sexo masculino e 10 (33.3%) do sexo feminino (Gráfico 1).

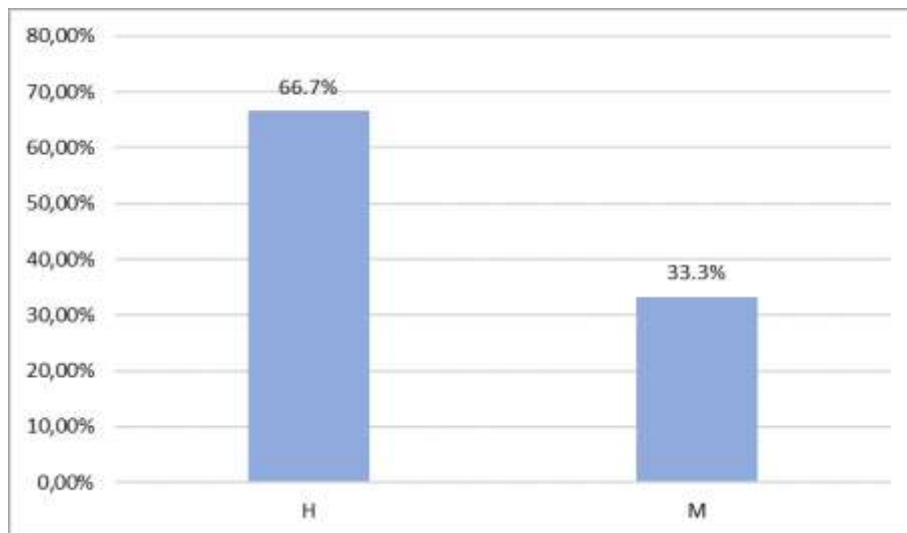


Gráfico 1- Distribuição da amostra segundo a variável "sexo".

De acordo com a divisão etária proposta neste estudo, 1 pessoa (3.3%) encontrava-se entre os 50 e 60 anos, 3 pessoas (10%) encontravam-se entre os 60 e os 65 anos, 11 pessoas (36.7%) encontravam-se entre os 65 e os 70 anos, e 15 pessoas (50%) tinham 70 ou mais anos (Gráfico 2).

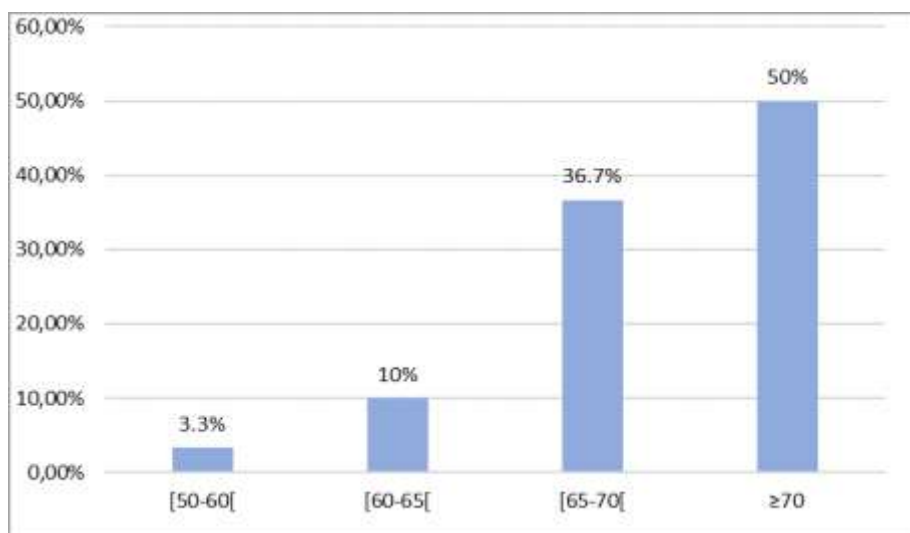


Gráfico 2- Distribuição da amostra segundo a variável "idade".

Relativamente à “localização do tumor”, 1 pessoa (3.3%) apresentava lesão no cólon ascendente, 1 pessoa (3.3%) apresentava lesão no cólon transverso, 6 pessoas (20%) tinham lesão no cólon descendente, 9 pessoas (30%) tinham lesão no cólon sigmoide e 13 pessoas (43.3%) apresentavam lesão no reto (Gráfico 3).

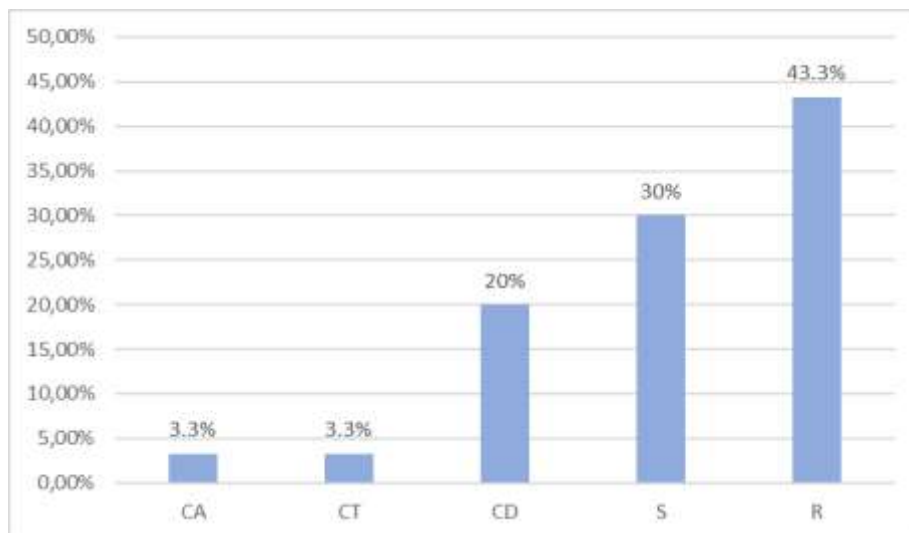


Gráfico 3- Distribuição da amostra segundo a variável "localização do tumor".

Em relação ao “grau de diferenciação histológica do tumor”, 8 amostras (26.7%) foram classificadas como adenocarcinoma bem diferenciado (ABD), 18 amostras (60%) foram classificadas como adenocarcinoma moderadamente diferenciado (AMD) e 4 (13.3%) amostras apresentaram adenocarcinomas pouco diferenciados (APD) (Gráfico 4).

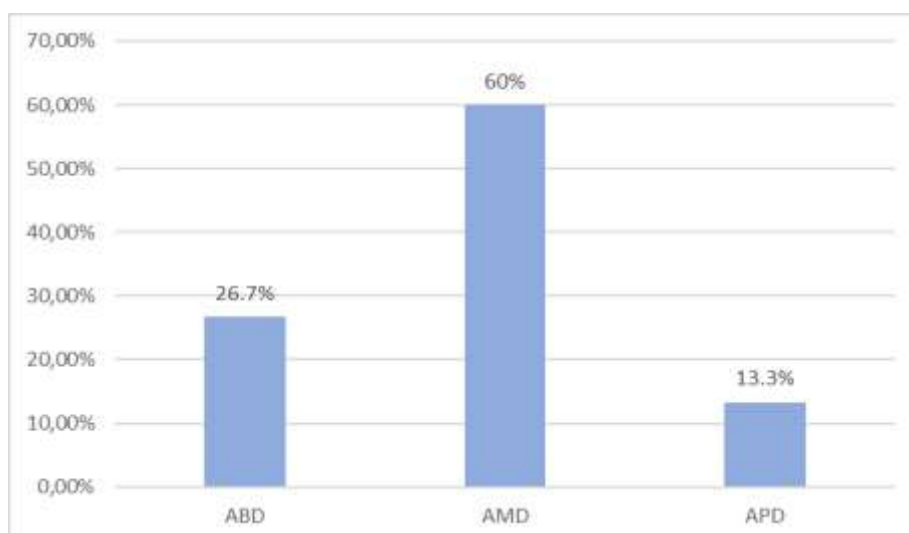


Gráfico 4- Distribuição da amostra segundo a variável "grau de diferenciação histológica do tumor".

A análise do “estadiamento” dos pacientes foi a seguinte: 1 paciente (3.3%) encontrava-se em estadio O, 20 pacientes (66.7%) foram caracterizados como tendo cancro estadio I, 4 pacientes (13.3%) foram caracterizados no estadio IIA, 2 pacientes (6.7%) foram caracterizados no estadio IIIA, e 3 pacientes (10%) encontravam-se no estadio IVA (Gráfico 5).

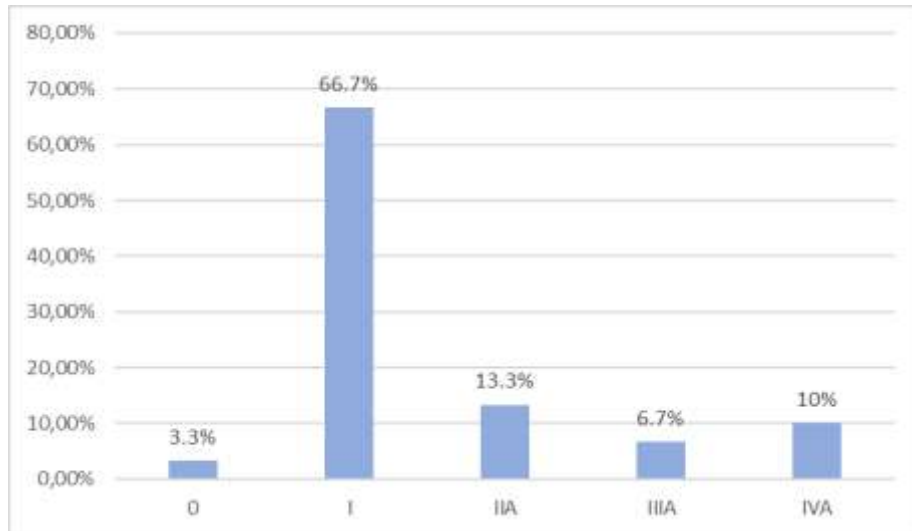


Gráfico 5- Distribuição da amostra segundo a variável "estadiamento".

A análise da distribuição da variável “prognóstico” revelou que, durante o *follow up* efetuado, 12 pacientes (40%) acabaram por falecer, tendo 18 pacientes (60%) sobrevivido.

A “percentagem de células marcadas com Ki-67” revelou que 10 amostras (33.3%) não apresentavam marcação com a proteína Ki-67, 6 amostras (20%) apresentavam 25% de células marcadas com a proteína Ki-67, 9 amostras (30%) apresentaram 50% de células marcadas, 4 amostras (13,3%) apresentaram uma marcação de 75% e apenas 1 amostra (3,3%) apresentou marcação de 100% (Gráfico 6).

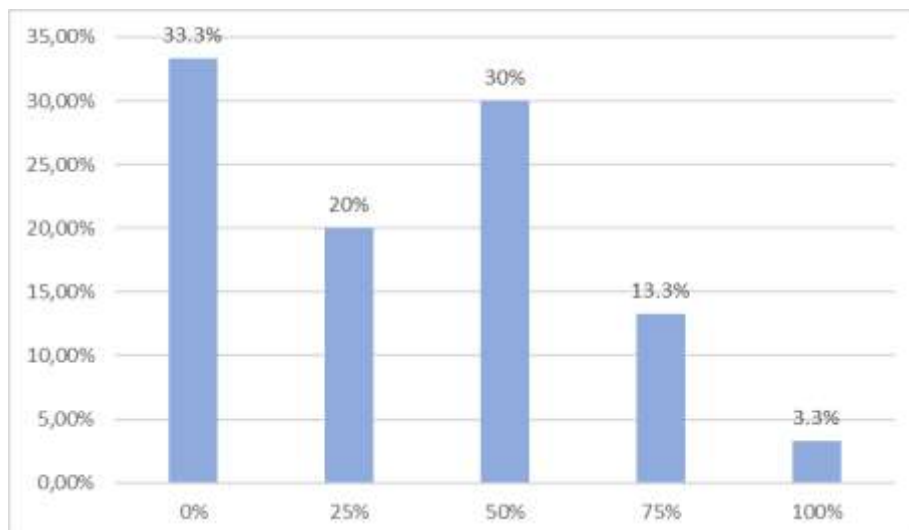


Gráfico 6- Distribuição da amostra segundo a variável "percentagem de células marcadas com Ki-67".

A observação da “intensidade da marcação pela proteína Ki-67” das amostras revelou que 10 amostras (33.3%) não apresentavam marcação com a proteína Ki-67. Em 13 amostras (43.3%) foi considerada uma marcação correspondente a “+”, em 5 amostras (16.7%) a intensidade da marcação foi considerada “++” e em 2 amostras (6.7%) a intensidade da marcação foi máxima “+++” (Gráfico 7).

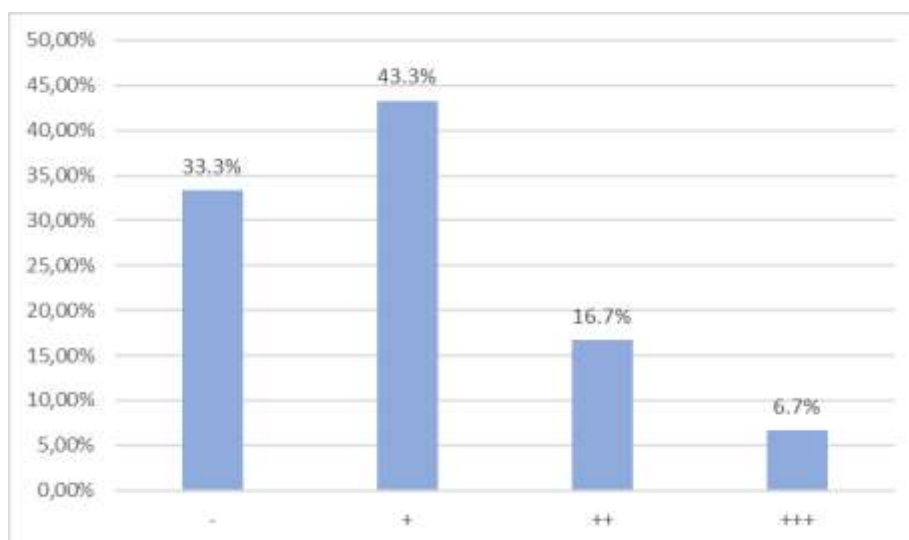


Gráfico 7- Distribuição da amostra segundo a variável "intensidade da marcação pela proteína Ki-67".

A fim de averiguar a existência de correlação entre a expressão da proteína Ki-67 e as variáveis em estudo, foram realizados testes estatísticos. A análise dos resultados obtidos, assim como a informação obtida nos mesmos, está apresenta nas tabelas a seguir.

Tabela 1- Relação entre a percentagem de células marcadas com Ki-67 e a variável "diferenciação histológica".

		Percentagem de células marcadas com Ki-67					Total	Valor <i>p</i>	V de Cramer
		0%	25%	50%	75%	100%			
		n	n	n	n	n	N		
		%	%	%	%	%			
Diferenciação histológica	ABD	3 30.0	2 33.3	2 22.72	0 0.0	1 100.0	8 26.7	0.419	0.394
	AMD	4 40.0	4 66.7	6 66.7	4 100.0	0 0.0	18 60.0		
	APD	3 30.0	0 0.0	1 11.1	0 0.0	0 0.0	4 13.3		
TOTAL		10 100.0	6 100.0	9 100.0	4 100.0	1 100.0	30 100.0		

Tabela 2- Relação entre a intensidade da marcação por Ki-67 e a variável "diferenciação histológica".

		Intensidade da marcação por Ki-67				Total	Valor <i>p</i>	V de Cramer
		-	+	++	+++			
		n	n	n	n	N		
		%	%	%	%	%		
Diferenciação histológica	ABD	3 30.0	3 23.1	1 20.0	1 50.0	8 26.7	0.321	0.321
	AMD	4 40.0	10 76.9	3 60.0	1 50.0	18 60.0		
	APD	3 30.0	0 0.0	1 20.0	0 0.0	4 13.3		
TOTAL		10 100.0	13 100.0	5 100.0	2 100.0	30 100.0		

De acordo com os testes estatísticos aplicados, a percentagem de células marcadas com Ki-67 e a intensidade da marcação com Ki-67, não têm correlação estatisticamente significativa com a variável “diferenciação histológica do tumor”, pois, em ambas obteve-se um valor $p > 0.05$, sendo, valor $p = 0.419$ e valor $p = 0.321$ respetivamente. Segundo o teste V de Cramer, as variáveis apresentaram uma associação moderada com a diferenciação histológica do ACR. Observou-se que a intensidade máxima de marcação, “+++”, apenas foi obtida em ABD e AMD (Tabela 2), e uma percentagem de células marcada com Ki-67 superior a 50% também só foi encontrada em ABD e AMD (Tabela 1).

Tabela 3- Relação entre a percentagem de células marcadas com Ki-67 e a variável "localização".

		Percentagem de células marcadas com Ki-67					Total	Valor <i>p</i>	V de Cramer
		0%	25%	50%	75%	100%			
		n	n	n	n	n	n		
		%	%	%	%	%			
Localização	CA	0 0.0	0 0.0	1 11.1	0 0.0	0 0.0	1 3.3	0.805	0.302
	CT	1 10.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	1 3.3		
	CD	3 30.0	2 33.3	1 11.1	0 0.0	0 0.0	6 20.0		
	S	4 40	2 33.3	2 22.2	1 25.0	0 0.0	9 30.0		
	R	2 20.0	2 33.3	5 55.6	3 75.0	1 100.0	13 43.3		
TOTAL		10 100.0	6 100.0	9 100.0	4 100.0	1 100.0	30 100		

Tabela 4- Relação entre intensidade da marcação por Ki-67 e a variável "localização".

		Intensidade da marcação por Ki-67				Total	Valor <i>p</i>	V de Cramer
		-	+	++	+++			
		n	N	n	n	N		
		%	%	%	%	%		
Localização	CA	0 0.0	0 0.0	1 20.0	0 0.0	1 3.3	0.511	0.369
	CT	1 10.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	1 3.3		
	CD	3 30.0	2 15.4	1 20.0	0 0.0	6 20.0		
	S	4 40.0	4 30.8	1 20.0	0 0.0	9 30.0		
	R	2 20.0	7 53.8	2 40.0	2 100.0	13 43.3		
TOTAL		10 100.0	13 100.0	5 100.0	2 100.0	30 100.0		

Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre a percentagem ou a intensidade de células marcadas com Ki-67 e a variável “localização”, valor $p=0.805$ e valor $p=0.511$, respetivamente. Ambas as variáveis apresentaram uma associação moderada no teste V de Cramer. Da distribuição dos casos, verifica-se que os tumores localizados no reto foram aqueles com a maior percentagem de células marcadas e os únicos onde a intensidade de marcação foi máxima, “+++” (Tabela 4).

Tabela 5- Relação entre a percentagem de células marcadas com Ki-67 e a variável "estadiamento".

		Percentagem de células marcadas com Ki-67					Total	Valor p	V de Cramer
		0%	25%	50%	75%	100%			
		n	n	n	n	n	N		
		%	%	%	%	%	%		
Estadiamento	0	0 0.0	1 16.7	0 0.0	0 0.0	0 0.0	1 3.3	0.033	0.439
	I	8 80.0	3 50.0	8 88.9	1 25.0	0 0.0	20 66.7		
	IIA	0 0.0	1 16.7	0 0.0	2 50.0	1 100.0	4 13.3		
	IIIA	1 10.0	0 0.0	0 0.0	1 25.0	0 0.0	2 6.7		
	IVA	1 10.0	1 16.7	1 11.1	0 0.0	0 0.0	3 10.0		
TOTAL		10 100.0	6 100.0	9 100.0	4 100.0	1 100.0	30 100.0		

Tabela 6- Relação entre a intensidade da marcação por Ki-67 e a variável "estadiamento".

		Intensidade da marcação por Ki-67				Total	Valor <i>p</i>	V de Cramer
		-	+	++	+++			
		n	n	n	n	N		
		%	%	%	%	%		
Estadiamento	0	0 0.0	1 7.7	0 0.0	0 0.0	1 3.3	0.056	0.444
	I	8 80.0	10 76.9	2 40.0	0 0.0	20 66.7		
	IIA	0 0.0	1 7.7	2 40.0	1 50.0	4 13.3		
	IIIA	1 10.0	0 0.0	0 0.0	1 50.0	2 6.7		
	IVA	1 10.0	1 7.7	1 20.0	0 0.0	3 10.0		
TOTAL		10 100.0	13 100.0	5 100.0	2 100.0	30 100.0		

Da análise da distribuição da percentagem de células marcadas por Ki-67, destaca-se que 88.9% dos pacientes com uma marcação de 50% encontravam-se no estadio I, e na Tabela 6, observa-se que perante uma marcação positiva, “+”, 76.9% dos pacientes já se encontram em estadio I. De acordo com o teste de Fisher, existe correlação estatisticamente significativa entre as variáveis “estadiamento” e “percentagem de células marcadas com Ki-67”, valor $p=0.033$. Contudo, não existe relação entre o “estadiamento” e a intensidade da marcação para um nível de significância de 5%, pois valor $p>0.05$. No entanto, parece haver uma tendência para a existência de relação entre estas variáveis, uma vez que $p=0.056<0.06$. O teste V de Cramer corrobora a possível relação existente entre o marcador de proliferação celular Ki-67 e o estadiamento de ACR, uma vez que ambas as variáveis analisadas apresentam uma associação moderada com o estadiamento dos pacientes.

Tabela 7- Relação entre a percentagem de células marcadas com Ki-67 e a variável “sexo”.

		Percentagem de células marcadas com Ki-67					Total	Valor p	V de Cramer
		0%	25%	50%	75%	100%			
		n %	n %	n %	n %	n %	N %		
Sexo	H	7 70.0	4 66.7	6 66.7	2 50	1 100.0	20 66.7	0.965	0.187
	M	3 30.0	2 33.3	3 33.3	2 50	0 0.0	10 33.3		
TOTAL		10 100.0	6 100.0	9 100.0	4 100.0	1 100.0	30 100		

Tabela 8- Relação entre a intensidade da marcação com Ki-67 e a variável “sexo”.

		Intensidade da marcação por Ki-67				Total	Valor p	V de Cramer
		-	+	++	+++			
		n %	n %	n %	n %	n %		
Sexo	H	7 70.0	8 61.5	3 60.0	2 100.0	20 66.7	0.943	0.208
	M	3 30.0	5 38.5	2 40.0	0 0.0	10 33.3		
TOTAL		10 100.0	13 100.0	5 100.0	2 100.0	30 100.0		

Não foi encontrada uma correlação estatisticamente significativa entre o “sexo” dos pacientes e a “percentagem de células marcadas com Ki-67” ou a “intensidade da marcação por Ki-67”, valor $p=0.965$ e valor $p=0.943$ respetivamente. A relação entre as variáveis estudadas nas Tabelas 7 e 8, após a aplicação do teste de V de Cramer, é caracterizada como fraca, pois $0.1 \leq V < 0.3$.

Tabela 9- Relação entre a percentagem de células marcadas com Ki-67 e a variável "idade".

		Percentagem de células marcadas com Ki-67					Total	Valor p	V de Cramer
		0%	25%	50%	75%	100%			
		n	n	n	n	n			
		%	%	%	%	%	%		
Idade	[50,60[0 0.0	1 16.7	0 0.0	0 0.0	0 0.0	1 3.3	0.155	0.466
	[60,65[1 10.0	0 0.0	0 0.0	1 25.5	1 100.0	3 10.0		
	[65,70[3 30.0	1 16.7	6 66.7	1 25.5	0 0.0	11 36.7		
	≥70	6 60.0	4 66.7	3 33.3	2 50.0	0 0.0	15 50.0		
TOTAL		10 100.0	6 100.0	9 100.0	4 100.0	1 100.0	30 100.0		

Tabela 10- Relação entre a intensidade da marcação por Ki-67 e a variável "idade".

		Intensidade da marcação por Ki-67				Total	Valor p	V de Cramer
		-	+	++	+++			
		n	n	n	n			
		%	%	%	%	%		
Idade	[50,60[0 0.0	1 7.7	0 0.0	0 0.0	1 3.3	0.367	0.308
	[60,65[1 10.0	0 0.0	1 20.0	1 50.0	3 10.0		
	[65,70[3 30.0	6 46.2	1 20.0	1 50.0	11 36.7		
	≥70	6 60.0	6 46.2	3 60.0	0 0.0	15 50.0		
TOTAL		10 100.0	13 100.0	5 100.0	2 100.0	30 100.0		

Não foram encontradas correlações estatisticamente significativa entre as variáveis “percentagem de células marcadas por Ki-67” ou “intensidade da marcação por Ki-67” com “idade”, valor $p=0.155$ e valor $p=0.367$ respetivamente.

Tabela 11- Relação entre a percentagem de células marcadas com Ki-67 e a variável "prognóstico".

		Percentagem de células marcadas com Ki-67					Total	Valor <i>p</i>	V de Cramer
		0%	25%	50%	75%	100%			
		n	n	n	n	n	N		
		%	%	%	%	%			
Prognóstico	Vivo	10 55.6	4 22.2	3 16.7	1 5.6	0 0.0	18 100.0	0.03	0.658
	Morto	0 0.0	2 16.7	6 50.0	3 25.0	1 8.3	12 100.0		
TOTAL		10 33.3	6 20.0	9 30.0	4 13.3	1 3.3	30 100.0		

Tabela 12- Relação entre a intensidade da marcação por Ki-67 e a variável "prognóstico".

		Intensidade da marcação por Ki-67				Total	Valor <i>p</i>	V de Cramer
		-	+	++	+++			
		n	n	n	n	n		
		%	%	%	%	%		
Prognóstico	Vivo	10 55.6	7 38.9	1 5.6	0 0.0	18 100.0	0.01	0.663
	Morto	0 0.0	6 50.0	4 33.3	2 16.7	12 100.0		
TOTAL		10 33.3	13 43.3	5 16.7	2 6.7	30 100.0		

De acordo com os testes estatísticos aplicados, as variáveis “percentagem de células marcadas com Ki-67” e “prognóstico” estão correlacionadas, valor $p=0.03$. Analisando a Tabela 11, observamos que quanto menor a percentagem de células marcadas, maior é o número de pessoas vivas no final do tempo de acompanhamento a que estes pacientes foram sujeitos, e que nenhuma pessoa que tenha morrido apresentou uma percentagem de marcação de “0%” ou uma intensidade de “-”. A variável “intensidade da marcação por Ki-67” também está correlacionada com a variável “prognóstico”, valor $p=0.01$. Uma maior mortalidade está associada a uma maior percentagem e intensidade de células marcadas com a proteína Ki-67, como observado nos Gráfico 8 e 9 respetivamente. De forma a atestar estes resultados, as variáveis foram também submetidas ao teste de V de Cramer, que demonstrou a existência de uma associação forte ($V \geq 0.5$) entre estas.

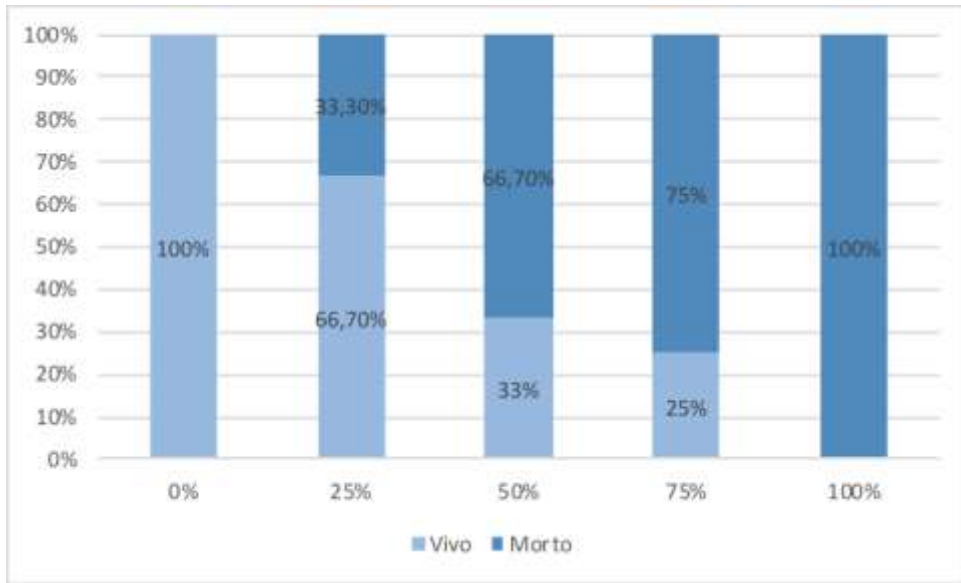


Gráfico 8 - Relação entre a variável "percentagem de células marcadas com Ki-67" e a variável "prognóstico".

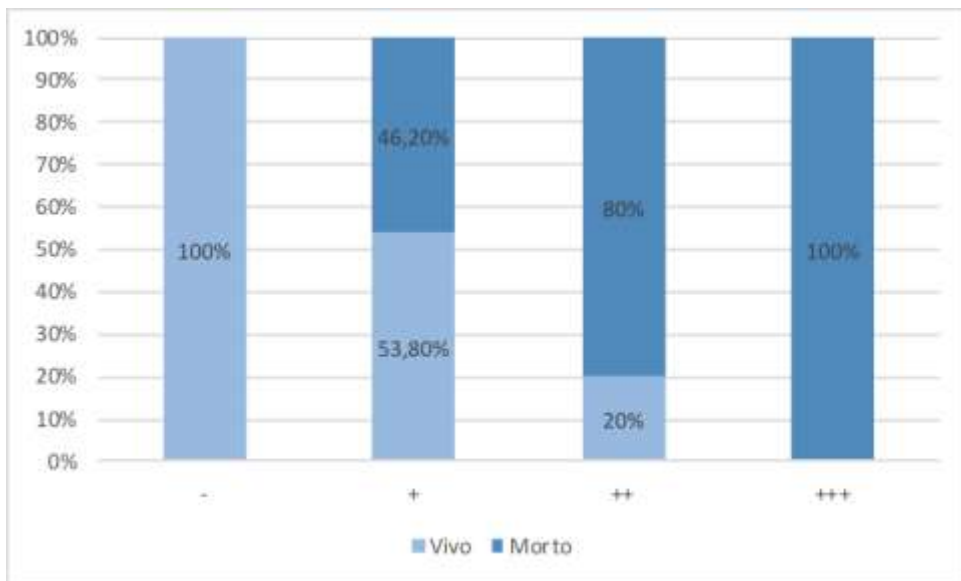


Gráfico 9- Relação entre a variável "intensidade da marcação por Ki-67" e a variável "prognóstico".

Discussão

A Carcinogênese representa um processo complexo que envolve diversas mudanças nos mecanismos de controle da proliferação celular, morte celular, invasão, angiogênese e disseminação (18). Atualmente, o diagnóstico, prognóstico e decisões terapêuticas relativas ao CCR são baseadas na análise das suas propriedades clínicas e histológicas. O estadiamento do tumor, a classificação histológica, a presença ou ausência de invasão de nódulos linfáticos ou de metástases, são reconhecidos como fatores de prognóstico (19). No entanto, estas características não conseguem prever completamente o desenvolvimento clínico ou o prognóstico dos pacientes, portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos de forma a antever a evolução da neoplasia e de possibilitar um tratamento personalizado para cada paciente (20). Neste sentido, este estudo teve por objetivo uma análise sobre o possível uso da marcação imunohistoquímica da proteína Ki-67 como fator de prognóstico em pacientes com ACR.

A análise da amostra deste trabalho revelou que a maioria dos pacientes eram do sexo masculino (66.7%) e tinham uma idade ≥ 65 anos (86.7%). Estes achados estão de acordo com dados referentes à incidência mundial (1,3,4), que demonstram a tendência para uma maior incidência desta neoplasia em indivíduos do sexo masculino, assim como uma maior incidência em pessoas de idade avançada. O estudo feito por Nussrat et al. (21) corrobora os resultados obtidos neste trabalho, no qual não foi encontrada uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão imunohistoquímica de Ki-67 e as variáveis “sexo” e “idade”, demonstrando que a marcação do Ki-67 não está correlacionada com a idade ou com o sexo de pacientes com ACR.

Em relação à localização da neoplasia, a maioria destas localizavam-se no cólon distal: CD (20%), S (30%) e R (43,5%). A distribuição das neoplasias no cólon proximal foi a seguinte: CA (3.3%) e CT (3.3%). Estes achados são expectáveis, pois a maioria dos pacientes apresentava uma idade avançada (≥ 65 anos (86.7%)), e, segundo a literatura científica, esta população apresenta uma localização predominante de ACR no cólon distal (22). Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre a expressão da imunohistoquímica do marcador de proliferação celular Ki-67 e a variável “localização” neste estudo, estando este resultado de acordo com os encontrados por Nussrat et al. (21) e por Ma et al. (23).

A distribuição da variável “diferenciação histológica” revelou que a minoria dos casos correspondeu a APD (13%), apresentando-se a maioria dos casos como AMD (60%), e os ABD correspondiam a (26,7%). Esta predominância de AMD foi encontrada noutro estudo

envolvendo o marcador de proliferação celular Ki-67 e ACR realizado por Sen et al. (24), que concluiu que existia relação entre a diferenciação histológica de ACR e a marcação imunohistoquímica de Ki-67. Outro estudo, conduzido por Ma et al. (23) também encontrou resultados estatisticamente significativos entre a expressão de Ki-67 e a variável “diferenciação histológica”. Uma possível justificação para a ausência de correlação entre estas variáveis neste estudo poderá ser o número da amostra inferior a ambos os estudos citados, além de que a caracterização desta variável é dependente do especialista em anatomia patológica que analisa as lâminas enviadas para o laboratório.

O estadio I foi o mais frequente (66.7%) e, com a análise de Fisher, foi possível encontrar uma correlação estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre a “percentagem de células marcadas com Ki-67” e a variável “estadiamento”, estando este resultado em sintonia com achados em estudos semelhantes (19,23,25). Uma possível explicação para este facto é que a maioria das amostras estudadas neste trabalho correspondiam a AMD e a ABD, e, possivelmente, estes apresentassem estadio mais baixo, bem como lesões menos diferenciadas tivessem tendência a apresentar estadio mais avançado. Shin et al. (19) sugere que, com o aumento da marcação com Ki-67, as neoplasias possuam maior capacidade de crescimento e de metastização, influenciando, assim, o estadiamento. Contudo, resultados diferentes foram obtidos em outros estudos: Sen et al. (24) não reportam correlação estatisticamente significativa entre a marcação por Ki-67 e a variável “estadiamento”, assim como Li et al. (26). A justificação para os diferentes resultados apresentados em diversos estudos relativamente à marcação por Ki-67 e o estadiamento dos pacientes não é clara, contudo, poderá estar correlacionada ao não entendimento total da influência do Ki-67 nos processos de multiplicação e regulação celular, que por sua vez influenciam o estadiamento (26).

O cerne deste trabalho foi verificar se o marcador de proliferação celular Ki-67 teria influência sobre o prognóstico de pacientes com ACR. Existem vários trabalhos que mostram a utilidade deste marcador de proliferação celular como preditor do prognóstico em pacientes com neoplasias da mama(14) , pulmão (15) e próstata (16).

A análise da distribuição da variável “prognóstico” revelou que, durante o *follow up* efetuado, 12 pacientes (40%) acabaram por falecer. Foi encontrada uma relação estatisticamente significativa entre a percentagem de células marcadas e a intensidade da marcação com Ki-67 e a variável “prognóstico” (Tabelas 11 e 12). A distribuição das variáveis “prognóstico” e “percentagem” e “intensidade da marcação por Ki-67” é apresentada nos Gráficos 8 e 9, nos quais observa-se que a mortalidade aumenta à medida que aumenta a intensidade e a marcação das amostras com o marcador de proliferação

celular Ki-67. Estes resultados estão de acordo com outras publicações que estudaram o papel marcador de proliferação celular Ki-67 no CCR (24–26). Ma et al. (23) sugerem que neoplasias que apresentarem uma marcação com Ki-67 mais intensa terão uma proliferação aumentada, o que poderá tornar estas neoplasias mais agressivas, tendo maior capacidade de metastização, no entanto, esta relação ainda não foi comprovada.

Este trabalho teve por objetivo poder contribuir para o estudo de marcadores que consigam prever o desenvolvimento e o prognóstico do ACR, de forma a otimizar o tratamento de pacientes com a referida patologia. Os resultados alcançados neste estudo sugerem que o marcador de proliferação celular Ki-67 cumpre estes objetivos. Contudo, mais estudos são necessários para entender com uma maior precisão de que forma o Ki-67 influencia o prognóstico, a clínica, e talvez o tratamento de pacientes com ACR.

Limitações

Os resultados presentes neste trabalho estão de acordo com várias publicações sobre o tema, mas devem ser alvo de uma análise cautelosa. O papel do Ki-67 tem vindo a ser estudado em várias publicações, nas quais nem todas apresentam resultados conclusivos e o seu papel continua a ser controverso, pois existem vários fatores que podem influenciar os resultados obtidos.

Primeiramente, diferentes valores de *cutoff* são usados para definir a positividade da expressão do marcador de proliferação celular Ki-67 em diferentes publicações. Além disso, diferentes protocolos são aplicados em diferentes laboratórios, o que leva a possíveis diferenças na técnica de imunohistoquímica a que as peças são sujeitas sejam diferentes, podendo, assim, causar resultados discordantes. Destaca-se, também, a importância que o médico especialista em Anatomia Patológica desempenha na descrição da lâmina obtida para estudo, assim como na caracterização das diferentes variáveis em estudo, como por exemplo a "diferenciação histológica".

Outra razão que limita os resultados obtidos é a amostra reduzida deste estudo, N=30. Esta limitação deve ser vista de duas formas: a primeira, como número de casos estudados, e este número ser demasiado pequeno para representar a população geral, não permitindo caracterizar com exatidão o impacto das variáveis "localização", "idade" ou "sexo"; a segunda, como pequeno número de amostras de ACR, que por sua vez irão afetar as conclusões a ser retiradas em relação ao estadiamento e prognóstico dos pacientes.

Conclusão

Neste trabalho, verificou-se que o aumento da marcação imunohistoquímica com o marcador de proliferação celular Ki-67 está correlacionado ao aumento da mortalidade em pacientes com ACR, assim como com o estadiamento apresentado por estes.

Face às perspectivas de crescimento de 60% no número de casos de CCR com uma estimativa de 2.2 milhões de casos a nível mundial em 2030, torna-se imperativo que esta neoplasia seja sujeita a mais estudos de forma a melhor prever o seu desenvolvimento e identificar as melhores estratégias para o seu tratamento, na tentativa de proporcionar o melhor tratamento aos pacientes vítimas desta doença.

Embora o desenvolvimento de uma neoplasia seja um processo complexo e constituído por etapas ainda não esclarecidas, existem diversos marcadores bio-moleculares que podem contribuir para lutar contra esta doença. A interação da marcação imunohistoquímica de Ki-67 com outros possíveis indicadores de prognóstico como p53, bcl-2, KRAS, anti -EGFR não é explorada neste trabalho, mas são motivo de curiosidade científica bastante pertinente, pois poderá estar nesta integração de diversos marcadores a chave para melhor prever o prognóstico de pacientes vítimas de CCR.

Poderá ser útil o desenvolvimento de um “perfil de risco” que englobe a análise de diversos marcadores moleculares e imunohistoquímicos em detrimento do estudo isolado de apenas um marcador, de forma a possibilitar relações com maior precisão clínica e terapêutica. Face ao conhecimento atual, ainda é difícil afirmar com exatidão que marcadores têm validade clínica estabelecida para serem aplicados juntamente com outros num “perfil de risco”, mas, face aos resultados encontrados neste trabalho, o marcador de proliferação celular Ki-67 poderá ter utilidade neste painel de testes, não só porque parece estar relacionado ao estadiamento dos pacientes, e este é determinante principal do prognóstico de pacientes vítimas de CCR, mas também porque o aumento da marcação celular por esta proteína, aparece associado a uma diminuição da sobrevivência dos pacientes em diversos estudos anteriormente citados.

Assim, embora neste trabalho estejam presentes resultados positivos relativamente à influência do marcador Ki-67 no ACR, não é possível afirmar com certeza absoluta que este é útil no manejo de pacientes vítimas desta neoplasia, e o possível uso deste marcador no estudo de ACR de forma isolada, ou em conjunto com outros marcadores, não é todo neste momento consensual a nível da literatura científica. Mais estudos são necessários para esclarecer e solidificar a forma como o marcador Ki-67 interage com o ACR.

Bibliografia

1. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66(4):683–91.
2. Instituto Nacional de Estatística. Causas de morte -2017 [Internet]. Portal do INE. 2019. 53–54 p. Available from: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=358633033&PUBLICACOESmodo=2
3. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 2014;383(9927):1490–502.
4. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol*. 2019;14(2):89–103.
5. Pickhardt PJ, Pooler BD, Kim DH, Hassan C, Matkowskyj KA, Halberg RB. The Natural History of Colorectal Polyps: Overview of Predictive Static and Dynamic Features. *Gastroenterol Clin North Am* [Internet]. 2018;47(3):515–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2018.04.004>
6. Strum WB. Colorectal adenomas. *N Engl J Med*. 2016;374(11):1065–75.
7. Cancer C. Colorectal Cancer Stages | Colorectal Cancer Alliance. 2019; Available from: <https://www.ccalliance.org/colorectal-cancer-information/stage-of-diagnosis>
8. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(3):153–73.
9. Amin, Mahul B., Edge, Stephen, Greene, Frederick, Byrd, David R., Brookland, Robert K., Washington, Mary K., Gershengwald JE. *AJCC Cancer Staging Form Supplement*. *Ajcc Cancer Staging Manual, Eighth Ed*. 2018;(June):303–10.
10. Bavielle F, Ammouri O, Charpin C, Della-Valle V, Soulard M, Guillemin MC, et al. Production of a mouse monoclonal antibody (B1N) reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Comptes Rendus l'Academie des Sci - Ser III*. 1991;312(7):301–7.
11. Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakhivel KM, Rasmi RR. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2019;491(January):39–45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.01.011>
12. Rahmzadeh R, Hüttmann G, Gerdes J, Scholzen T. Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. *Cell Prolif*.

- 2007;40(3):422–30.
13. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311–22.
 14. Ragab HM, Samy N, Afify M, El Maksoud NA, Shaaban HAM. Assessment of Ki-67 as a potential biomarker in patients with breast cancer. *J Genet Eng Biotechnol.* 2018;16(2):479–84.
 15. Folescu R, Levai CM, Grigoraş ML, Arghirescu TS, Talpoş IC, Gîndac CM, et al. Expression and significance of Ki-67 in lung cancer. *Rom J Morphol Embryol.* 2018;59(1):227–33.
 16. Berlin A, Castro-Mesta JF, Rodriguez-Romo L, Hernandez-Barajas D, González-Guerrero JF, Rodríguez-Fernández IA, et al. Prognostic role of Ki-67 score in localized prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Urol Oncol Semin Orig Investig [Internet].* 2017;35(8):499–506. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2017.05.004>
 17. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioural Sciences* (2nd Ed.). New York: Lawrence Erlbaum. In: *Statistical Power Analysis for the Behavioural Science* (2nd Edition). 1988.
 18. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011.
 19. Shin IY, Sung NY, Lee YS, Kwon TS, Si Y, Lee YS, et al. The expression of multiple proteins as prognostic factors in colorectal cancer: Cathepsin D, p53, COX-2, epidermal growth factor receptor, C-erbB-2, and Ki-67. *Gut Liver.* 2014;8(1):13–23.
 20. Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M, Krasnodębski IW. Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol.* 2016;22(5):1745–55.
 21. Nussrat FL, Ali HH, Hussein HG, Al-Ukashi RJ. Immunohistochemical expression of ki-67 and p53 in colorectal adenomas: A clinicopathological study. *Oman Med J.* 2011;26(4):229–34.
 22. Lu P, Fields AC, Vise AS, Shabat G, Irani JL, Bleday R, et al. Anatomic Distribution of Colorectal Adenocarcinoma in Young Patients. *Dis Colon Rectum.* 2019;62(8):920–4.
 23. Ma YL, Peng JY, Zhang P, Liu WJ, Huang L, Qin HL. Immunohistochemical analysis revealed CD34 and Ki67 protein expression as significant prognostic factors in colorectal cancer. *Med Oncol.* 2010;27(2):304–9.
 24. Sen A, Mitra S, Das R, Dasgupta S, Saha K, Chatterjee U, et al. Expression of CDX-2

- and Ki-67 in different grades of colorectal adenocarcinomas. *Indian J Pathol Microbiol.* 2015;
25. Luo ZW, Zhu MG, Zhang ZQ, Ye FJ, Huang WH, Luo XZ. Increased expression of Ki-67 is a poor prognostic marker for colorectal cancer patients: A meta analysis. *BMC Cancer.* 2019;19(1):1–13.
 26. Li P, Xiao ZT, Braciak TA, Ou QJ, Chen G, Oduncu FS. Association between Ki67 index and clinicopathological features in colorectal cancer. *Oncol Res Treat.* 2016;39(11):696–702.
 27. De Divitiis C, Nasti G, Montano M, Fisichella R, Iaffaioli RV, Berretta M. Prognostic and predictive response factors in colorectal cancer patients: Between hope and reality. *World J Gastroenterol.* 2014;20(41):15049–59.

Anexos

Anexo 1- Protocolo de Processamento do CHUCB

Fixação:	formol a 10%	3 horas
Desidratação	etanol 70%	1 hora
	etanol 95%	1 hora
	etanol 95%	1 hora
	etanol 99.9%	1 hora
	etanol 99.9%	1 hora
	etanol 99.9%	1 hora
Diafanização:	Etanol 99.9% e xilol	1 hora
	xilol	1 hora
	xilol	1 horas
	parafina	2 horas
	parafina	2 horas
Inclusão:	parafina	

Anexo 2-Protocolo de coloração usado no CHUCB

Desparafinação:	xilol	5 minutos
	xilol	5 minutos
Hidratação:	etanol 99.9%	3 minutos
	Etanol 95%	1 minuto
	etanol 70%	1 minuto
	água corrente	2 minutos
Coloração nuclear:	hematoxilina de Harris	10 minutos
Lavagem:	Água corrente	3 minutos
Diferenciação:	etanol clorídrico a 1%	10 segundos
Lavagem:	água corrente	6 minutos
Coloração citoplasmática:	Etanol 70%	1 minuto
	eosina	1 segundo
Desidratação:	etanol 95%	1 minuto
	etanol 95%	1 minuto
	etanol 95%	1 minuto
	etanol 99.9%	3 minutos
	etanol 99.9%	5 minutos
	xilol	4 minutos
	xilol	3 minutos
Montagem:	meio sintético	

Anexo 3- Protocolo de funcionamento da máquina de imunohistoquímica usada no CHUCB

PASSOS	ETAPA	TEMPO
1	BUFF1	10"
2	PAD1	29"
3	BUFF1	10"
4	PAD1	29"
5	BUFF1	10"
6	PAD1	29"
7	BUFF1	10"
8	PAD1	45"
9	AB1	25'
10	PAD1	29"
11	BUFF1	10"
12	PAD1	29"
13	BUFF1	10"
14	PAD1	29"
15	BUFF1	10"
16	PAD1	29"
17	BUFF1	10"
18	PAD1	29"
19	BUFF1	10"
20	PAD2	45"
21	AB2	25'
22	PAD2	29"
23	BUFF1	10"
24	PAD2	29"
25	BUFF2	10"
26	PAD2	29"
27	HPBK	2'30"
28	PAD2	29"
29	HPBK	2'30"
30	PAD2	29"
31	HPBK	2'30"
32	PAD2	29"
33	BUFF2	10"
34	PAD2	29"
35	BUFF2	10"
36	PAD2	29"
37	BUFF2	10"
38	PAD2	45"
39	HRP	25'
40	PAD3	29"
41	BUFF2	10"
42	PAD3	29"
43	BUFF2	10"
44	PAD3	29"
45	BUFF3	10"
46	PAD3	29"
47	BUFF3	10"
48	PAD3	29"
49	BUFF3	10"
50	PAD3	45"
51	CROMOGÊNICO - DAB	5'
52	PAD3	29"
53	BUFF3	10"
54	PAD3	45"
55	CROMOGÊNICO - DAB	5'
56	PAD3	29"
57	BUFF3	10"
58	PAD3	45"
59	CROMOGÊNICO - DAB	5'

60	PAD3	29"
61	BUFF3	10"
62	PAD4	29"
63	BUFF3	10"
64	PAD4	29"
65	HEMATOXILINA DE MAYER	1'
66	PAD4	29"
67	BUFF3	10"
68	PAD4	29"
69	BUFF3	1'
70	PAD4	29"
71	BUFF2	1'
72	PAD4	29"
73	BUFF2	10"
74	PAD4	29"
75	H2O	10"
76	PAD4	29"
77	H2O	10"
78	PAD4	29"
79	H2O	10"

Legenda:

BUF – soluções de lavagem;

PAD – “esponjas”;

AB1 – anticorpo primário;

AB2 – anticorpo secundário;

HPBK – bloqueio da peroxidase endógena;

HRP – streptavidin peroxidase;


DAB – diaminobenzidina (cromogéneo).

Anexo 4- Comprovativo de apresentação deste trabalho

Certificado


III Jornadas da Formação Científica e Educação

Certifica-se que AUDRE FILIPE TEIXEIRA BARBOSA, estudante de Medicina da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior e portador do documento de identificação número 14395874, participou no Pecha-Kucha, no âmbito das III Jornadas da Formação Científica e Educação, organizadas pelo MedUBI, no dia 13 de novembro de 2018, pelas 16h30, na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior.


 Professora Doutora Isabel Neto
 Júri


 Professor Doutor Miguel Castelo Branco
 Júri




 Ana Catarina Gonçalves
 Presidente da Direção do MedUBI 2018