

Universidade da Beira Interior

Faculdade de Ciências da Saúde



**Estudo da imunoexpressão
da proteína p53 em
adenocarcinomas colo-rectais:
análise descritiva de 62 casos**

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina

Maio/2009

Magda Joana Terenas Madeira

Universidade da Beira Interior

Faculdade de Ciências da Saúde



**Estudo da imunoexpressão
da proteína p53 em
adenocarcinomas colo-rectais:
análise descritiva de 62 casos**

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina

Maio/2009

Magda Joana Terenas Madeira

Orientador: Prof. Dr. Javier Muñoz

Resumo

Introdução: A incidência dos carcinomas colo-rectais tem vindo a aumentar nos países desenvolvidos. Estes tumores surgem em terceiro lugar no ranking dos carcinomas que mais mortes causam a nível mundial. A grande maioria (98%) dos carcinomas colo-rectais são adenocarcinomas. A proteína p53 é o produto do gene supressor tumoral com o mesmo nome e, é um importante marcador tumoral. O objectivo desta investigação foi analisar 62 casos de adenocarcinomas colo-rectais, realizando um estudo imunohistoquímico da expressão da proteína p53. Identificou-se a sua positividade ou negatividade e quantificou-se em cada caso a percentagem da sua expressão. Os 62 casos foram classificados quanto ao grau de diferenciação tumoral e tentou-se estabelecer uma correlação entre os casos positivos e o grau de diferenciação.

Material e métodos: Este trabalho de investigação foi baseado numa análise descritiva do estudo imunohistoquímico da expressão da proteína p53 (Clone DO-7 da DAKO) em 62 casos de pacientes com adenocarcinomas colo-rectais, ressecados cirurgicamente entre 2001 e 2003. Neste estudo foram avaliados dois parâmetros: intensidade e percentagem da coloração. A intensidade foi valorizada de “+ a +++” e a percentagem de “0 a 100%”. Foram valorizados 50 campos a 400X em cada caso.

Resultados: A p53 esteve presente em 33 dos 62 casos (em 53% dos casos havia imunoexpressão da p53). A maioria dos casos apresentou “+++/++” e só 27% apresentava apenas “+”. Em 15 casos constatou-se que mais de 75% das células da lâmina apresentavam imunomarcção para a p53. Em 9 casos,

aproximadamente 50% apresentava imunomarcação e em 3 casos a imunomarcação representava 100%. Dos 62 adenocarcinomas, 5 eram bem diferenciados (8%), apenas 2 eram pouco diferenciados (3%) e os restantes eram moderadamente diferenciados (89%). Quanto à localização dos tumores: 11 apresentavam-se no recto e os restantes no cólon.

Conclusão: Na maioria dos casos a imunomarcação foi positiva e a expressão da proteína revelou-se numa intensidade e percentagem consideráveis. Quanto à correlação entre grau de diferenciação e imunoexpressão da p53, não foi possível tirar qualquer tipo de relações uma vez que, o número de casos não apresentava significância estatística. Constatou-se que a maioria dos tumores estava localizado no cólon e apenas 18% se apresentava a nível rectal.

Palavras-chave: adenocarcinoma colo-rectal ■ p53 ■ imunohistoquímica ■
imunoexpressão ■ grau de diferenciação ■

Abstract

Introduction: The incidence of colorectal cancer is increasing in developed countries. This cancer is in third place in the ranking of cancers that cause the most deaths worldwide. The vast majority (98%) of colorectal cancers are adenocarcinomas. The p53 protein is the product of the tumor suppressor gene with the same name and is an important tumor marker. The aim of this research was to analyze 62 cases of colorectal adenocarcinomas, performing an immunohistochemical study of p53 protein expression. Its positivity and negativity was identified and in each case the percentage of its expression was quantified. The 62 cases were classified according to the degree of tumor differentiation, to try to establish a correlation between positive cases and the degree of differentiation.

Material and Methods: This research work was based on a descriptive analysis of the immunohistochemical study of p53 protein expression (DAKO, Clone DO-7) in 62 cases of colorectal adenocarcinomas, resected surgically between 2001 and 2003. In this study two parameters were evaluated: intensity and percentage of stain. The intensity was measured from “+ to +++” and the percentage from “0 to 100%”. In each case 50 fields at 400x magnification were evaluated.

Results: The p53 was present in 33 of 62 cases (there was immunostaining of p53 in 53% of the cases). Most cases presented “+++/+++” and just 27% had only “+”. In 15 cases, over 75% of the slide cells showed immunolabeling for p53. In 9 cases, approximately 50% showed immunolabeling and in 3 cases the

immunolabeling was 100%. Of the 62 adenocarcinomas, 5 were well differentiated (8%), only 2 were poorly differentiated (3%) and the rest were moderately differentiated (89%). As the location of the tumors: 11 were in the rectum and the others were in the colon.

Conclusion: In the great majority of cases, the immunolabeling was positive and the protein expressed in a considerable intensity and percentage. Regarding the correlation between degree of differentiation and expression of p53, it was not possible to draw any elation since the number of cases was not statistically significant. It was found that most tumors were located in the colon and only 18% were in the rectum.

Key Words: colorectal adenocarcinoma ■ p53 ■ immunohistochemistry ■
immunoexpression ■ differentiation degree ■

*A Deus, a quem tudo devo e à
minha querida e eterna avó Bia!*



Agradecimentos

À minha família, pois a ela devo toda a minha formação e valores.

Aos meus amigos, pelo incentivo e toda a confiança que incutiram em mim.

Ao meu orientador, pela paciência, dedicação e auxílio que me prestou.

À Dr^a Catarina Ferreira, técnica de laboratório da FCS, pela simpatia e disponibilidade que sempre revelou.

Por último, resta-me agradecer à Faculdade de Ciências da Saúde pela formação que me deu durante estes seis anos, um percurso nem sempre fácil, eivado de obstáculos mas também de muitas alegrias e conquistas. Fomos parte de um projecto pioneiro, um ensino de Medicina em novos moldes no país e somos os frutos do investimento semeado em 2003.



Siglas / Abreviaturas

AAS	Ácido Acetilsalicílico
AINE	Anti-inflamatório Não Esteróide
COX-2	Ciclooxigenase 2
DAB	Diaminobenzidina
HE/H&E	Hematoxilina e Eosina
kDa	Kilodaltons
MOC	Microscópio Óptico Comum
PET	Tomografia de Emissão de Positrões
RM	Ressonância Magnética
TAC	Tomografia Axial Computorizada
TNM	T-Tumor Primário N-Gânglios M-Metástases
VEGF	Factor de Crescimento Endotelial Vascular

Índice

1. Resumo.....	i
2. Abstract.....	iii
3. Agradecimentos.....	vi
4. Siglas / Abreviaturas.....	vii
5. Índice de Figuras, Tabelas e Gráficos.....	x
6. Introdução.....	1
6.1 O Adenocarcinoma Colo-Rectal.....	1
6.1.1 Epidemiologia.....	1
6.1.2 Teorias Etiológicas.....	2
6.1.3 Genética.....	2
6.1.4 Características Anátomo-Patológicas	2
6.1.5 Clínica.....	3
6.1.6 Diagnóstico.....	3
6.1.7 Prevenção e Tratamento.....	4
6.1.8 Prognóstico.....	5
6.2 O Gene Supressor Tumoral e a sua Proteína p53.....	5
6.2.1 Estrutura e Funções.....	5
6.3 A Imunohistoquímica.....	7
6.3.1 Mini-Glossário de Termos Empregues.....	10
6.4 Pertinência deste Estudo.....	12

7. Material e Métodos.....	14
7.1 Amostra e Selecção.....	14
7.2 Delineamento do Estudo.....	14
7.3 Processamento Histológico.....	14
7.4 Imunohistoquímica.....	24
7.4.1 Reagentes Utilizados na Imunohistoquímica.....	29
7.5 Avaliação Histológica.....	36
8. Resultados.....	37
8.1 Imagens das Lâminas – Imunohistoquímica.....	47
8.2 Exemplos dos Graus de Diferenciação.....	55
9. Discussão.....	58
10. Conclusões Finais.....	62
11. Referências Bibliográficas.....	63

Índice de Figuras, Tabelas e Gráficos

Figura 1 – Dez principais causas de mortalidade, em todas as idades, em 2002, em Portugal.	P1
Figura 2 – Carcinoma visualizado mediante colonoscopia	P4
Figura 3 – Peça de ressecção cirúrgica	P5
Figura 4 - Localização do TP53	P6
Figura 5 - Complexo Estreptavidina – Biotina – Peroxidase	P8
Figura 6 - Clone de anticorpos monoclonais reage para um epítipo específico	P9
Mini-Glossário de Termos Empregues	
Figura 7 – Mesa de macroscopia “ SHANDON GROSSLAB JUNIOR”	P16
Figura 8 – Pormenor da mesa de macroscopia	P16
Figura 9 – Processador de tecidos “SHANDON Hypercenter XP”	P18
Figura 10 – Cassete histológica	P19
Figura 11 - Moldes de metal	P19
Figura 12 – Máquina de inclusão em parafina “SHANDON Histocenter2”	P20
Figura 13 – Placa fria	P20
Figura 14 – Bloco de parafina contendo adenocarcinoma colo-rectal	P20
Figura 15 – Micrótomo “MICROM HM 200 ERGOSTAR”	P21
Figura 16 – Banho-maria “SAKURA 1450” e Tina de Vidro	P22
Figura 17 – Estufa “TEQ”	P22
Figura 18 – Colorador “SHANDON Varistain XY”	P23
Figura 19 – Montador de lâminas “ SHANDON Consul”	P23
Figura 20 – Lâmina específica para imunohistoquímica	P25
Figura 21 - Panela de pressão e fogão	P26
Figura 22 – Tampão citrato	P26
Figura 23 – Máquina de imunohistoquímica “TechMate HORIZON”	P26
Figura 24 – Suporte para lâminas, lâminas; PAD e Poços para Buffers (colocados nas estações 1 e 5 respectivamente) – exclusivamente para demonstração do seu funcionamento	P27
Figura 25 – Preparações definitivas – Imunohistoquímica p53	P28
Figura 26 – Microscópio óptico “OLYMPUS BX41”	P29

Figura 27 – Anticorpo primário (p53) e diluente	P31
Figura 28 – Micropipetas	P31
Figura 29 – Soluções tampão e H ₂ O de lavagem	P32
Figura 30 – Kit 5001 da Dako	P32
Figura 31 - Solução bloqueadora da peroxidase endógena	P33
Figura 32 – Esquema síntese das etapas referidas anteriormente	P36
Figura 33 - p53x400 EXEMPLO DE PERCENTAGEM - 0%	P47
Figura 34 - p53x400 EXEMPLO DE PERCENTAGEM - 25%	P48
Figura 35 - p53x400 EXEMPLO DE PERCENTAGEM - 50%	P49
Figura 36 - p53x400 EXEMPLO DE PERCENTAGEM - 75%	P50
Figura 37 - p53x400 EXEMPLO DE PERCENTAGEM - 100%	P51
Figura 38 - p53x400 EXEMPLO DE INTENSIDADE : +	P52
Figura 39 - p53x400 EXEMPLO DE INTENSIDADE : ++	P53
Figura 40 - p53x400 EXEMPLO DE INTENSIDADE : +++	P54
Figura 41 - HEx400. Adenocarcinoma Bem Diferenciado	P55
Figura 42 - HEx400. Adenocarcinoma Moderadamente Diferenciado	P56
Figura 43 - HEx400. Adenocarcinoma Pouco Diferenciado	P57
Tabela 1 – Etapas do processamento tecidual e equipamento utilizado	P16
Tabela 2 – Etapas no processador	P18
Tabela 3 – Etapas da coloração de rotina	P24
Tabela 4 – Estações da máquina de imunohistoquímica	P33
Tabela 5 – Funcionamento da máquina de imunohistoquímica	P34
Tabela 6 – Localização tumoral	P37
Tabela 7 – Resumo dos casos por grau de diferenciação	P38
Tabela 8 – Percentagem e Intensidade de Coloração e Grau de Diferenciação	P39
Tabela 9 - Imunoexpressão da p53	P42
Tabela 10 – Resumo dos casos por intensidade de coloração	P43
Tabela 11 – Percentagem de coloração	P45
Gráfico 1 – Localização tumoral (percentagens)	P37
Gráfico 2 - Percentagens dos graus de diferenciação	P38

Gráfico 3 - Imunoexpressão da p53	P42
Gráfico 4 - Percentagens da imunoexpressão da p53	P43
Gráficos 5 e 6 - Intensidade da imunomarcação	P44
Gráfico 7 – Percentagem de coloração	P45



The first step in applying the scientific method consists in being curious about the world.

--Linus Pauling

Not everything that counts can be counted. And not everything that can be counted counts.

--Albert Einstein

It is what we think we know already that often prevents us from learning.

--Claude Bernard

Seek simplicity, and distrust it.

--Alfred North Whitehead

Introdução

O adenocarcinoma colo-rectal

Epidemiologia

Este tumor é mais frequente nos homens e tem uma distribuição geográfica muito variada, tendo maior incidência nos EUA, Canadá, Austrália, Nova Zelândia, Dinamarca, Suécia, entre outros países desenvolvidos e menor incidência (até 30 vezes inferior) na Índia, América do Sul e África. A incidência no Japão tem vindo a aumentar. ⁽¹⁾

Em Portugal, em 2002, os carcinomas colo-rectais figuravam entre o top ten de causas de mortalidade nacional. (Figura 1)

Top ten causes of death, all ages Portugal, 2002			
Causes	Deaths		Years of Life Lost
	(000)	(%)	(%)
All causes	94	100	100
Cerebrovascular disease	20	21	14
Ischaemic heart disease	10	12	9
Lower respiratory infections	5	6	4
Diabetes mellitus	3	4	3
Colon and rectum cancers	3	3	3
Trachea, bronchus, lung cancers	3	3	4
Stomach cancer	2	3	4
Chronic obstructive pulmonary disease	2	3	2
Prostate cancer	1	2	1
Cirrhosis of the liver	1	2	3

Source: [Death and DALY estimates by cause, 2002](http://www.who.int/entity/healthinfo/statistics/bodgbddeathdalyestimates.xls)
<http://www.who.int/entity/healthinfo/statistics/bodgbddeathdalyestimates.xls>

Figura 1 – Dez principais causas de mortalidade, em todas as idades, em 2002, em Portugal.

Teorias Etiológicas

Factores ambientais, nomeadamente padrões de dieta, estão implicados nestes contrastes geográficos. Como principais erros alimentares incluem-se: baixo conteúdo de fibras vegetais e de micronutrientes como as vitaminas A, C e E, alto conteúdo de carboidratos refinados e gordura. Postula-se que o baixo teor em fibras leva à retenção prolongada de conteúdo fecal e consequentemente à existência de uma flora bacteriana intestinal alterada. Produtos oxidativos, potencialmente tóxicos, resultantes da degradação de carboidratos pelas bactérias intestinais, permanecem assim por maiores períodos, em contacto com a mucosa do cólon. Uma alimentação rica em gorduras leva a uma maior produção de colesterol e ácidos biliares pelo fígado, que podem ser convertidos em potenciais carcinogéneos pelas bactérias intestinais. ⁽¹⁾

Genética

A perda do gene supressor tumoral TP53, devido a mutações, ocorre em 70 a 80% de todos os carcinomas do cólon. A inactivação de genes reparadores do DNA conduz a uma reparação defeituosa do DNA. ⁽¹⁾

Características Anátomo-Patológicas

A grande maioria (98%) dos carcinomas colo-rectais são adenocarcinomas. Inicialmente há uma proliferação epitelial localizada que posteriormente dá origem a pequenos adenomas que crescem progressivamente, tornando-se

cada vez mais displásicos até originarem carcinomas invasivos (sequência adenoma-carcinoma).

O adenocarcinoma é localmente invasivo, porém, pode haver disseminação metastática, antes de surgir sintomatologia local.

A maioria dos adenocarcinomas é composta por tumores que evoluíram a partir de pólipos, que podem estar presentes por 10 anos ou mais antes de sofrerem transformação maligna.

No cólon situam-se 2/3 dos tumores e os restantes encontram-se no recto. ⁽¹⁾

Clinica

Estes tumores desenvolvem-se insidiosamente, podendo estar presentes durante meses a anos, estando o doente assintomático. Entre alguns sintomas e sinais encontram-se: fadiga, alterações dos hábitos intestinais, tenesmo, desconforto no quadrante inferior esquerdo, emagrecimento e anemia ferropénica. ⁽¹⁾

Diagnóstico

Muitas vezes, com um simples toque rectal conseguimos detectar formações tumorais em desenvolvimento.

O diagnóstico pode ser feito através de meios auxiliares de diagnóstico analíticos como o hemograma, a bioquímica e a pesquisa de marcadores tumorais e recorrendo a colonoscopias (Figura 2), raio-x com clisteres opacos de duplo contraste, ecoendoscopias, TAC's abdomino-pélvicas e, RM's e PET's para melhor avaliar recidivas.



Figura 2 – Carcinoma visualizado mediante colonoscopia

Prevenção e Tratamento

É fulcral apostar-se numa boa prevenção primária; numa prevenção secundária com diagnóstico precoce (screening/rastreios) e tratamento das fases pré-clínicas da doença; e numa prevenção terciária visando tratar a doença clínica e minimizar as sequelas da mesma.

O tratamento geralmente é cirúrgico (Figura 3) e pode ser co-adjuvado por quimio ou radioterapia.

Estudos recentes mencionam um eventual papel quimioprotector do AAS e outros AINE's em relação ao adenocarcinoma por indução de apoptose nas células tumorais e inibição da angiogénese, através da inibição da COX-2, inibindo consequentemente a produção de VEGF (factor de crescimento endotelial vascular).⁽¹⁾

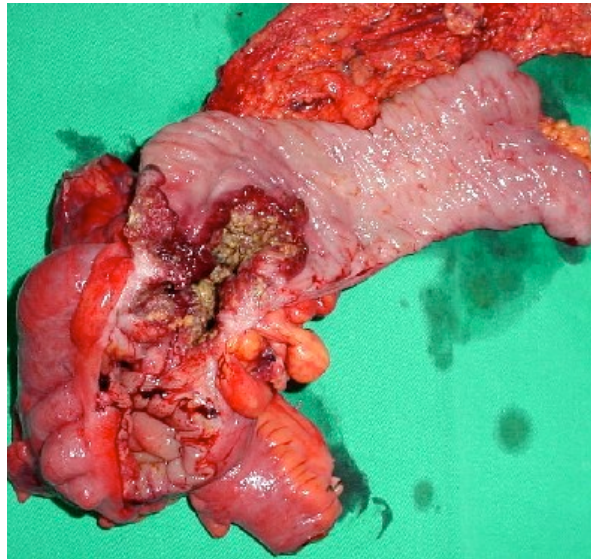


Figura 3 – Peça de ressecção cirúrgica

Prognóstico

O factor de prognóstico mais importante nestes tumores é o seu estágio (classificação TNM).⁽¹⁾

O gene supressor tumoral e a sua proteína p53

Estrutura e Funções

O gene supressor tumoral, TP53, está localizado no braço curto do cromossoma 17 (Figura 4) e codifica uma proteína nuclear de peso molecular equivalente a 53 kDa (sendo esta a razão para a sua designação), com o mesmo nome, a proteína p53. Esta é fulcral na regulação do ciclo celular, intervindo a nível de checkpoints deste, inibindo a proliferação e participando da apoptose. O principal papel da p53 é mediar a resposta celular quando há dano a nível do DNA, sendo assim uma guardiã da estabilidade do genoma. Porém, quando mutada, está associada a diversos graus de comportamento neoplásico.

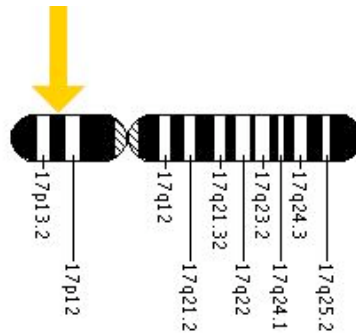


Figura 4 - Localização do TP53

A sua forma activa (*wild type/p53 selvagem*) tem uma semi-vida muito curta (em torno de 6 minutos), devido à sua rápida degradação, de modo que só está presente em quantidades diminutas, geralmente abaixo do nível de detecção por métodos imunohistoquímicos, o que torna extremamente difícil a sua detecção através dessa técnica.⁽²⁾ Ao contrário, as formas mutadas ou inactivas, devido à maior estabilidade molecular e maior tempo de degradação, tendem a acumular-se no núcleo das células, até níveis elevados, permitindo que a expressão da proteína p53 seja usada como indicador indirecto da mutação no gene.^(3,4) A mutação somática do gene é muito frequente no desenvolvimento de neoplasias. Observou-se a acumulação de p53 em 76% de 212 lesões malignas humanas, incluindo carcinomas da mama, cólon e estômago, melanoma, carcinoma embrionário dos testículos, carcinoma transitório da bexiga, carcinoma uterino e sarcomas do tecido mole. Mais de 50% de todos os tumores em humanos apresentam uma mutação ou deleção no gene TP53. As pessoas que apresentam apenas uma cópia funcional do gene, provavelmente desenvolverão tumores numa idade adulta (Síndrome de Li-Fraumeni). O gene pode ser danificado por mutagénicos como radiações,

químicos e vírus.

Assim, a p53 detectada por imunohistoquímica é na maioria das vezes produto da mutação do gene p53, sendo indicador de pior prognóstico em carcinomas do cólon, pulmão e mama. ^(5,6)

Contudo, muitas agressões genómicas conduzem a um aumento nos níveis da p53 selvagem. A p53 do tipo selvagem (a sua forma activa) funciona como factor de transcrição, ou seja, como modulador que pode ligar ou desligar genes cruciais. Assim, dois caminhos poderão ser seguidos: a correcção da mutação através da activação de proteínas de reparo ou a indução da morte celular através da apoptose. ^(7,8)

A imunohistoquímica

A imunohistoquímica é uma técnica utilizada para diversas finalidades. É de extrema utilidade na investigação científica e na obtenção de certos diagnósticos anátomo-patológicos.

A técnica que recorre ao uso do complexo estreptavidina-biotina-enzima (Figura 5) é a mais usada. O complexo é formado pela ligação de uma molécula de estreptavidina com várias de biotina associadas a uma enzima, a peroxidase ou a fosfatase alcalina, que tem como função a conversão de um cromogéneo incolor num produto final que pode conferir diversas cores aos antígenos teciduais marcados. As cores mais comuns são a castanha (peroxidase + diaminobenzidina-DAB) e a vermelha (fosfatase alcalina + fast red). No caso deste trabalho de investigação utilizou-se a peroxidase e o DAB.

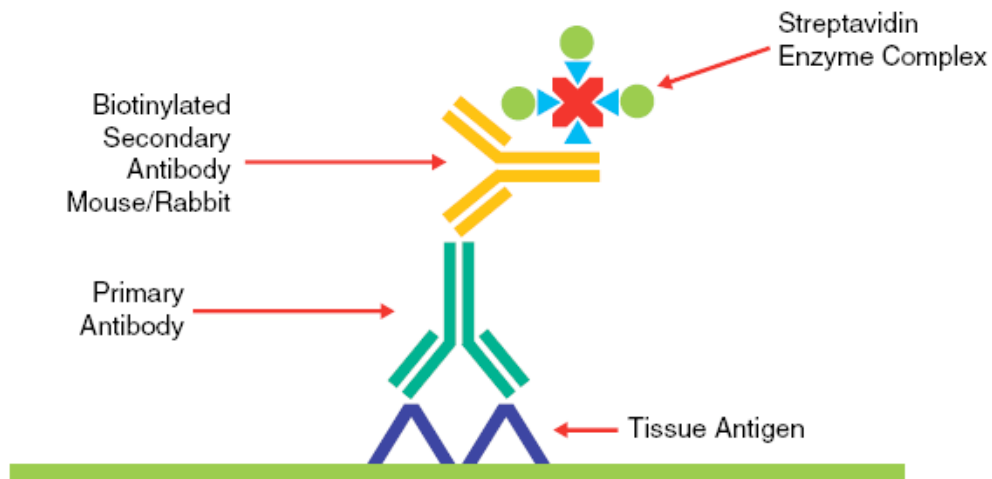


Figura 5 - Complexo Estreptavidina – Biotina – Peroxidase

Cada molécula de estreptavidina contém 4 sítios de ligação para a biotina. A biotina é uma molécula que é facilmente conjugável com anticorpos e enzimas. Assim, é usada ligada aos anticorpos secundários dizendo-se que estes estão biotinilados e por sua vez ao ligar-se também à peroxidase por ter igualmente afinidade para enzimas, faz uma ponte de ligação entre o complexo enzimático estreptavidina peroxidase e o anticorpo secundário. ⁽⁹⁾

Neste estudo o uso desta técnica teve como finalidade a identificação, mediante reacção antigénio-anticorpo, da proteína p53 no núcleo da célula.

Por vezes, para a pesquisa de marcadores de proliferação nuclear como o p53, é necessário recorrer a técnicas complementares como a imunohistoquímica pois não há reagentes capazes de evidenciar a expressão tecidual da proteína p53.

Assim são utilizados anticorpos monoclonais (Figura 6) produzidos especificamente para reagirem com a p53. Os anticorpos monoclonais são o

produto de um clone individual de células plasmáticas. Os anticorpos oriundos do mesmo clone são imunologicamente idênticos e reagem com um epítopo específico de um antígeno para o qual foram prepositadamente criados. Os ratos são as cobaias mais frequentemente usadas para a produção deste tipo de anticorpos. Após uma resposta imune ter sido alcançada, linfócitos B do baço ou de gânglios linfáticos são colhidos e fundidos com células não secretoras mielomatosas. Os linfócitos B fornecem o anticorpo específico e as células mielomatosas conferem longevidade ao hibridoma no meio de cultura. Posteriormente, as células B não reactivas e as células mielomatosas são descartadas e o hibridoma produtor de anticorpos é cultivado e testado quanto à reactividade desejada. A propagação da linhagem celular pode ser efectuada no meio de cultura ou através de transplante do hibridoma para a cavidade peritoneal de ratos singénicos para se colherem posteriormente os anticorpos no líquido ascítico. Pode-se assim produzir grandes quantidades de anticorpos monoclonais específicos e idênticos. ⁽⁹⁾

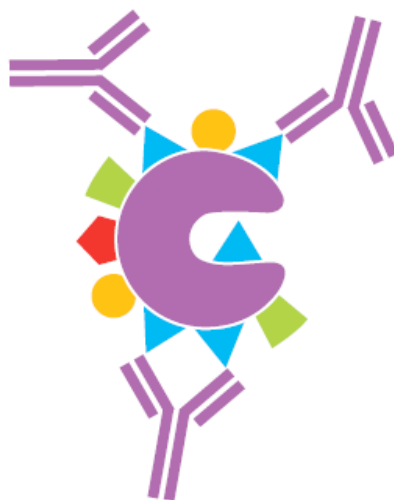


Figura 6 - Clone de anticorpos monoclonais reage para um epítopo específico

Mini-Glossário de Termos Empregues

Anticorpo Primário é o primeiro anticorpo utilizado, liga-se ao antigénio tecidual.

Anticorpo Secundário / Anticorpo de Ligação é o segundo anticorpo utilizado, reage com o anticorpo primário (funciona aqui como antigénio) e forma uma ponte entre este e o reagente subsequente.

“Background” – Este termo diz respeito à coloração de fundo não específica, resultante de artefactos do processamento tecidual.

Cromogéneo – Pertence a um grupo de químicos que podem formar um certo material colorado ou que podem ser identificados por reacção com um reagente apropriado.

(DAB) - 3,3' – diaminobenzida - Leva à produção de um produto final castanho que é altamente insolúvel em álcool e outros solventes orgânicos.

Epítopo/determinante antigénico é a parte estrutural de um antigénio que reage com um anticorpo. Trata-se de agrupamentos de aminoácidos em proteínas globulares e de cadeias de açúcares em polissacarídeos.

Idiótipo é um termo referente aos determinantes antigénicos que se relacionam com a especificidade do anticorpo.

Peroxidase – Enzima que na presença de um dador de electrão (cromogéneo), forma um complexo enzima-substrato e depois oxida o dador de electrão. Este depois de oxidado obtém uma certa coloração e portanto é chamado de cromogéneo.

Recuperação Antigénica / Recuperação de Epítomos – Corresponde à restauração da antigenicidade (imunorreactividade) a um imunogéneo.

Devido à fixação em formalina há uma perda parcial ou total da imunorreactividade antigénica. Se for reversível considera-se que os epítomos estão mascarados, assim sendo, pode-se tentar recuperá-los por via enzimática (tripsina/pepsina a 37°) ou por calor (microondas ou panela de pressão). Os estudos actuais referem um maior sucesso (maior intensidade e percentagem de coloração) com a recuperação pelo calor usando uma solução de recuperação em sistemas pressurizados como a panela de pressão (atingem maiores temperaturas do que os microondas).⁽⁹⁾

Pertinência deste estudo

A escolha deste tema para ser alvo de um estudo deveu-se a vários factores. Em primeiro lugar, é de salientar o aumento da incidência dos carcinomas colo-rectais e o seu importante peso como causa de mortalidade considerável a nível dos países desenvolvidos, nomeadamente em Portugal.

Segundo um estudo estatístico prévio, da autoria do Prof. Dr. Javier Muñoz, constatou-se que houve um grande aumento no número de casos destes tumores, na região da Cova da Beira, entre 2001 e 2003. Nesta região da beira interior, é do domínio geral a tradição de uma alimentação rica em gorduras, nomeadamente enchidos, fumados e queijos típicos da zona. Assim, surge a hipótese de ser uma região de risco para o desenvolvimento deste tipo de tumores.

Em segundo lugar, a escolha da imunohistoquímica para o estudo da p53 deveu-se ao facto de ser um método indirecto e simples de estimar mutações no gene e conseqüentemente na proteína p53.

Segundo alguns estudos, a imunoexpressão da p53 é indicadora de pior prognóstico em carcinomas do cólon, pulmão e mama. ^(5,6) Assim, o conhecimento da existência destes estudos serviu também de base motivacional para a realização deste estudo.

Este trabalho teve como objectivo estudar a imunoexpressão da p53 em adenocarcinomas colo-rectais e tentar correlacioná-la com o grau de diferenciação tumoral, averiguando se existiria uma imunomarcagem num

número considerável de casos e em que intensidade e percentagem seria e se haveria uma maior intensidade e percentagem de coloração nos adenocarcinomas com menor grau de diferenciação, visto serem habitualmente associados a um pior prognóstico.

Pretendeu-se igualmente, que este estudo fosse um trabalho pilar para posteriores estudos, que tentem concluir quanto à validade da imunoexpressão da p53 enquanto factor independente de prognóstico.

Material e Métodos

Amostra e Selecção

A amostra consistiu em 62 blocos de parafina contendo adenocarcinomas colorectais. Todos os casos seleccionados eram peças de ressecções cirúrgicas. Estes tumores foram ressecados cirurgicamente no C.H.C.B, desde 2001 a 2003. Todos os casos eram de tumores primários. Não foram considerados os tumores desenvolvidos em adenomas tubulares ou tubulovilosos. Todos os tumores haviam sido conservados em solução de formol, identificados e processados segundo técnicas histológicas de rotina, e tamponados e fixados em formol. Estes 62 casos foram seleccionados a partir de uma amostra de 133 casos utilizados num estudo epidemiológico prévio do Prof. Dr. Javier Muñoz.

Delineamento do Estudo

Neste trabalho de mestrado, o estudo efectuado foi retrospectivo e descritivo.

Processamento Histológico

As amostras dos tumores ressecados cirurgicamente chegaram ao Serviço de Anatomia Patológica em formol. Verificou-se então o acondicionamento e as informações relativas à peça.

As peças foram abertas pelo bordo anti-mesentérico e distendidas em cortiças para que os lúmens ficassem totalmente expostos, permitindo assim uma melhor subsequente fixação e observação.

As cortiças foram submersas em formol e ficaram overnight. Esta fixação em formol permite diminuir a deterioração celular e uma melhor manipulação da peça.

Procedeu-se depois à descrição macroscópica da peça indicando o tipo de peça (cólon ascendente, transverso, descendente, sigmóide ou recto) e posteriormente indicando dimensões, consistência, descrição da lesão – ulcerada/vegetativa/polipóide. (Figura 7 – Mesa de macroscopia) Foram então seccionadas as zonas da peça com interesse, tendo cuidado para que nas secções ficassem patentes: a zona da lesão, as margens da ressecção e as zonas de transição (zona sã/lesão). Para este estudo, apenas foram utilizadas as secções contendo lesão.

Os fragmentos resultantes tinham de espessura aproximadamente 2/3 mm para permitir a fácil penetração do fixador.

Os fragmentos seccionados foram então colocados em cassetes (Figura 10), nas quais foi efectuada uma identificação do fragmento, para se iniciar o processamento tecidual.



Figura 7 – Mesa de macroscopia “ SHANDON GROSSLAB JUNIOR”



Figura 8 – Pormenor da mesa de macroscopia

ETAPA	APARELHO
Fixação, Desidratação, Diafanização e Impregnação em parafina	Processador – Figura 9
Inclusão em Parafina	Máquina de Inclusão – Figura 12
Microtomia	Micrótomo – Figura 15
Secagem	Estufa – Figura 17
Coloração H&E	Colorador – Figura 18

Tabela 1 – Etapas do processamento tecidual e equipamento utilizado

Etapas:

1. Fixação
2. Desidratação, Diafanização e Impregnação em Parafina
3. Inclusão em Parafina
4. Microtomia
5. Secagem
6. Coloração (H&E)

Resumidamente:

1. Como fixador foi usada uma solução de formol tamponada a 10% da J.T.Baker.
2. Os fragmentos passaram por concentrações crescentes de etanol, (70%,96% e 99,5% - absoluto), posteriormente foram submersos numa solução de partes iguais de etanol absoluto e xilol e de seguida passaram por xilol (xilol do distribuidor José Vaz Pereira). Por último os fragmentos foram embebidos em parafina.

Para mais informações sobre estas etapas consultar a tabela nº 2.



Figura 9 – Processador de tecidos “SHANDON Hypercenter XP”

Passo	Solutos	Tempo
1	Formol	3 h
2	Etanol 70%	1 h
3	Etanol 96%	1 h
4	Etanol 96%	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

Tabela 2 – Etapas no processador

3. Por último os fragmentos foram embebidos em parafina. Quando as cassetes saíram do processador, foram abertas tendo a tampa sido descartada e os fragmentos foram retirados e colocados em moldes de metal (Figura 11), escolhendo os que se adaptassem aos seus tamanhos. Posteriormente na máquina de inclusão foi colocada parafina (Histosec pastilles da Merck) a uma temperatura de 62° (estado líquido) e a base da cassette com a identificação do fragmento foi sobreposta como tampa. Os moldes foram arrefecidos então, na placa fria da máquina de inclusão (Figura 12), a uma temperatura de 6 graus negativos para que se formasse o bloco de parafina solidificada contendo o fragmento. Para um maior arrefecimento e para que o bloco ficasse suficientemente rígido para permitir os cortes no micrótomo, os blocos, já sem os moldes de metal, ficaram numa outra placa fria (Figura 13) para gelarem a uma temperatura de 15 graus negativos.



Figura 10 – Cassete histológica



Figura 11 - Moldes de metal



Figura 12 – Máquina de inclusão em parafina “SHANDON Histocenter2”



Figura 13 – Placa fria

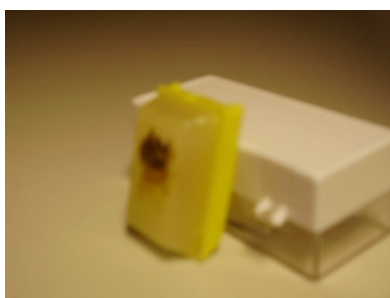


Figura 14 – Bloco de parafina contendo adenocarcinoma colo-rectal

4. Depois de gelados, os blocos (Figura 14) foram submetidos a cortes no micrótomo (Figura 15) com espessuras de 2 μm . Os primeiros cortes foram desprezados e seleccionaram-se os cortes que continham a totalidade da amostra.

Depositaram-se os cortes seleccionados numa tina de fundo preto com água fria (Figura 16) para determinar a viabilidade dos cortes seleccionados.

Os cortes viáveis foram apanhados com uma lâmina e colocados em banho-maria (a uma temperatura inferior à da fusão da parafina – entre 50 e 55°) para remover possíveis artefactos do corte e facilitar a posterior adesão à lâmina. Deste último recipiente são apanhados com a lâmina ficando automaticamente aderidos a esta.

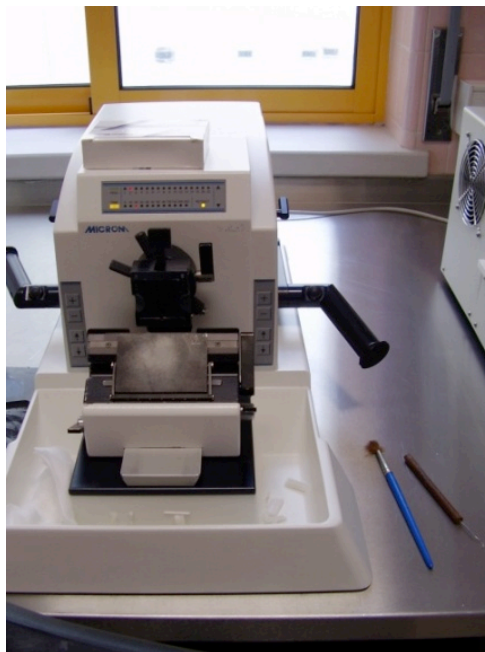


Figura 15 – Micrótomo “MICROM HM 200 ERGOSTAR”



Figura 16 – Banho-maria “SAKURA 1450” e Tina de Vidro

5. Posteriormente as lâminas com os cortes foram à estufa (Figura 17), 1 hora, a 60 graus, para derreter a parafina envolvente e os cortes aderirem melhor à lâmina.



Figura 17 – Estufa “TEQ”

6. No colorador (Figura 18) procedeu-se então à coloração com H&E (Hematoxilina de Harris da Merck e Eosina Y da Shandon) – Tabela 3. Foi realizada a coloração de rotina para possibilitar uma observação geral das alterações histopatológicas. Por último, no montador de lâminas (Figura 19), procedeu-se à colocação das lamelas nas lâminas, utilizando uma resina sintética (Shandon Synthetic Mountant) como meio de montagem.



Figura 18 – Colorador “SHANDON Varistain XY”



Figura 19 – Montador de lâminas “ SHANDON Consul”

**HEMATOXILINA – LOSINA
(COLORAÇÃO DE ROTINA – TISTOLOGIA)**

Passo	Tina	Solução	Tempo
1	1	Xilol	5m
2	2	Xilol	5m
3	3	Etanol 100%	3m
4	4	Etanol 96%	1m
5	5	Etanol 70%	1m
6	21	Água corrente	2m
7	6	Hematoxilina	10m
8	20	Água corrente	3m
9	7	Etanol Clorídrico 1%	10s
10	20	Água corrente	6m
11	8	Etanol 70%	1m
12	9	Eosina	1s
13	10	Etanol 96%	1m
14	11	Etanol 96%	1m
15	12	Etanol 96%	1m
16	13	Etanol 100%	3m
17	14	Etanol 100%	5m
18	15	Xilol	4m
19	16	Xilol	3m
20	END		

Tabela 3 – Etapas da coloração de rotina

Imunohistoquímica

Após a coloração de rotina, observaram-se as lâminas e decidiu-se pelo uso de uma técnica complementar – a imunohistoquímica. Assim, recorreu-se novamente aos blocos originais para efectuar novos cortes que foram então submetidos ao método imunohistoquímico.

Os novos cortes foram apanhados do banho-maria com lâminas específicas de imunohistoquímica (Figura 20) e foram à estufa.



Figura 20 – Lâmina específica para imunohistoquímica
“Capillary Gap Microscope Slides 75 μm – DAKO Real “

Posteriormente foram ao colorador para desparafinação (xilol) e hidratação (concentrações decrescentes de etanol) dos tecidos, de seguida procedeu-se à recuperação antigénica (6 minutos na panela de pressão – Figura 21 - em tampão citrato pH=6 – Figura 22) após a qual as lâminas foram colocadas em água fria para arrefecerem e passarem à máquina de imunohistoquímica (Figuras 23 e 24 e Tabelas 4 e 5) (simultaneamente com uma lâmina controlo de adenocarcinoma mamário que já sabidamente expressava níveis elevados da proteína p53), para as reacções antigénio-anticorpo e coloração nuclear com Hematoxilina de Mayer. Por último sofreram uma desidratação no colorador. Finalmente procedeu-se à montagem das lâminas com um meio de montagem sintético (resina) e colocação de lamelas para obtenção de preparações definitivas (Figura 25) e à observação ao MOC. (Figura 26)



Figura 21 - Panela de pressão e fogão eléctrico



Figura 22 – Tampão citrato



Figura 23 – Máquina de imunohistoquímica “TechMate HORIZON”

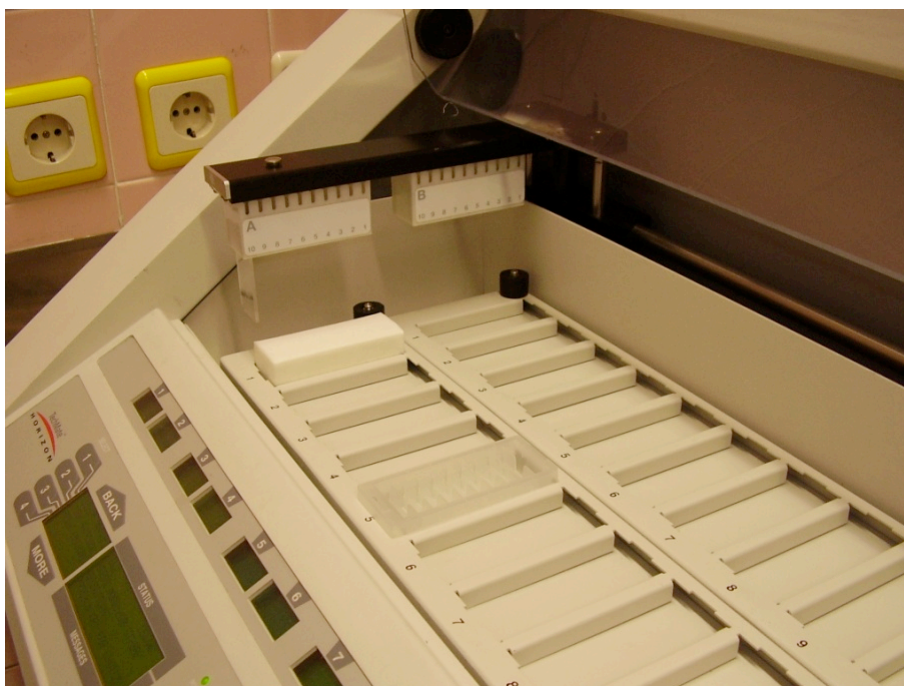


Figura 24 – Suporte para lâminas, lâminas; PAD e Poços para Buffers (colocados nas estações 1 e 5 respectivamente) – exclusivamente para demonstração do seu funcionamento



Figura 25 – Preparações definitivas – Imunohistoquímica p53



Figura 26 – Microscópio óptico “OLYMPUS BX41” com máquina
fotográfica adaptada “OLYMPUS C – 5050”

Reagentes Utilizados na Imunohistoquímica

Tampão Citrato – pH = 6.0

Solução A: (solução de ácido cítrico 0.1M)

Ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) – 18.91g

Água destilada – 900 ml

(Citric Acid Monohydrate – Merck – 1.00242.1000)

Solução B: (solução de citrato de sódio 0.1M)

Citrato de sódio ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot H_2O$) – 34G

Água destilada – 820 ml

(Tri-Sodium Citrate Dihydrate – Merck – 1.06448.1000)

SOLUÇÃO DE TRABALHO:

Solução A – 180 ml

Solução B – 820 ml

Diluir com água destilada até 10 000 ml

Ajustar pH = 6.0

O anticorpo para a p53 utilizado foi o “Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein”. (Figura 27) O anticorpo marca a proteína p53 (tipo selvagem e tipo mutante) e é um instrumento útil para a identificação da acumulação da p53 em neoplasias humanas.

Reagente fornecido: Anticorpo monoclonal de ratinho fornecido na forma líquida como sobrenadante de cultura celular, dialisada contra 0,05 mol/L de Tris/HCl, pH 7,2, contendo 15 mmol/L de NaN₃ (azida sódica).

Clone: DO-7

Isótipo: IgG2b, kappa.

Imunogénio: Proteína p53 do tipo selvagem recombinante humana

Preparação da amostra: O anticorpo utilizado marca secções de tecido envolvidas em parafina e fixadas em formalina. É necessário o pré-tratamento dos tecidos com a recuperação de epítomos induzida por calor.

As secções de tecido não devem secar durante o tratamento nem durante o processo de coloração imunohistoquímica que se segue.



Figura 27 – Anticorpo primário (p53) e diluente
DakoCytomation – Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein
Clone DO-7
DakoCytomation – ChemMate – Antibody Diluent – S.2022
O anticorpo primário foi diluído na razão 1:25.



Figura 28 – Micropipetas



Figura 29 – Soluções tampão e H₂O de lavagem DakoCytomation – ChemMate – Buffer Kit – K.5006:

- 1 – Wash Buffer 1
- 2 – Wash Buffer 2
- 3 – Wash Buffer 3
- 4 – Water Wash



Figura 30 – Kit 5001 da Dako que contém:

- A – Anticorpos secundários / de ligação - Imunoglobulinas biotinizadas anti-ratinho e anti-coelho
- B – Estreptavidina Peroxidase
- C – DAB (Cromogénio)
- D – HRP Tampão Substrato (diluyente do DAB)

DILUIÇÃO DO CROMOGÉNIO - Foi realizada utilizando C e D.

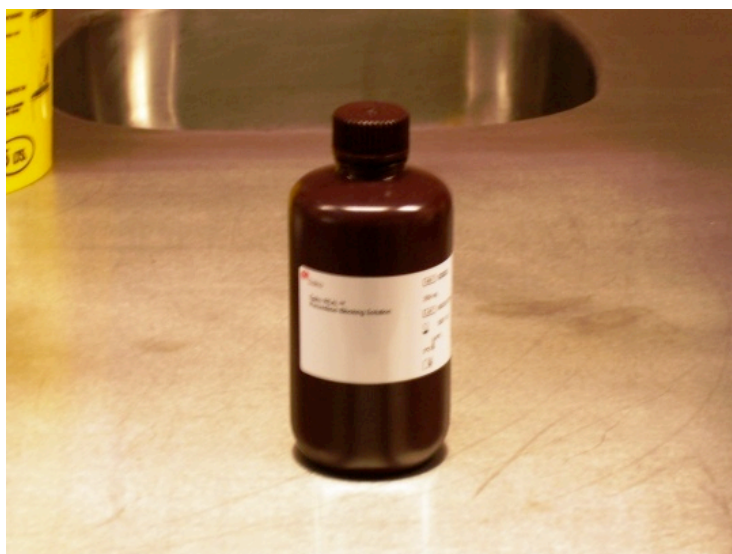


Figura 31 - Solução bloqueadora da peroxidase endógena

HPBK – Dako Real – Peroxidase – Blocking Solution – S.2023

Foram usadas 14 estações e realizados 79 passos na máquina de imunohistoquímica.

Estações	Conteúdo
1-4	Pads
5-7	Buffers
8	H ₂ O
9	Anticorpo Primário – AB1
10	Anticorpo Secundário – AB2
11	HPBK – Enzima Bloqueadora da Peroxidase Endógena
12	HRP Estreptavidina Peroxidase
13	Cromogéneo (DAB)
14	Hematoxilina de Mayer

Tabela 4 – Estações da máquina de imunohistoquímica

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

Tabela 5 – Funcionamento da máquina de imunohistoquímica

Integrating the Modules of Work Flow

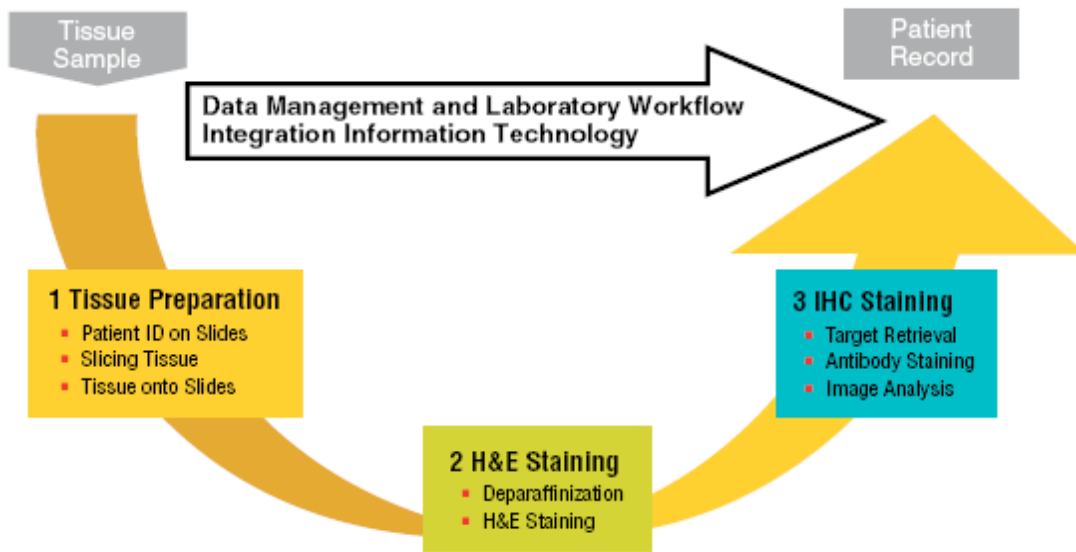


Figura 32 – Esquema síntese das etapas referidas anteriormente

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Os campos foram observados a uma ampliação de 400x e foi realizada a média de 50 campos para se estabelecer a intensidade (de + a +++) e percentagem de coloração (0-25-50-75-100%) para cada lâmina. Estabeleceu-se o grau de diferenciação.

Resultados

Localização	Número de Casos
Sigmóide	13
Recto	11
Outras localizações	38

Tabela 6 – Localização tumoral

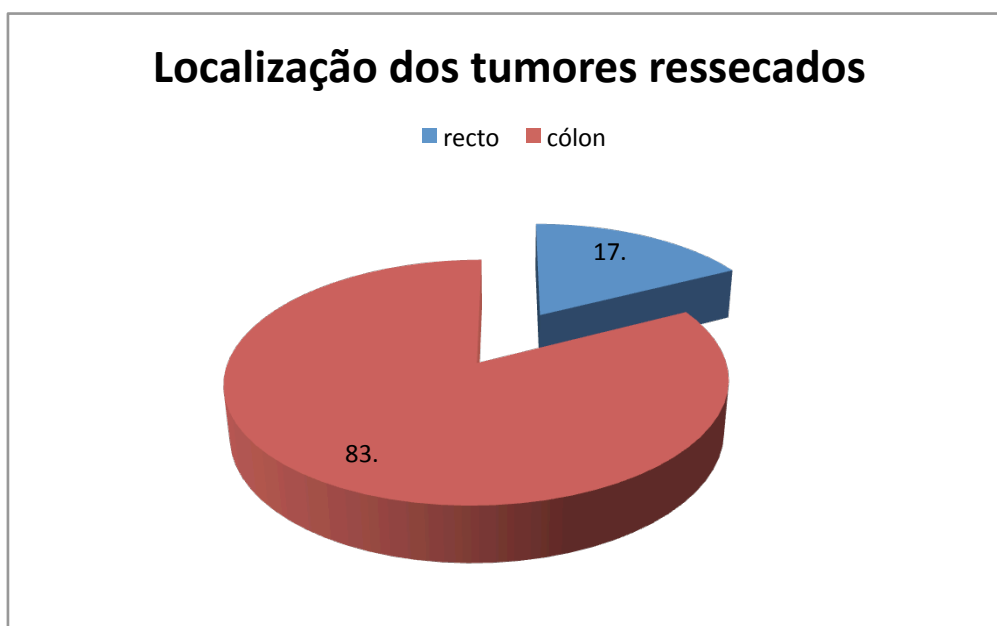


Gráfico 1 – Localização tumoral (percentagens)

Grau de Diferenciação	Nº total de casos - 62
Bem diferenciados	5 casos
Moderadamente diferenciados	55 casos
Pouco diferenciados	2 casos

Tabela 7 – Resumo dos casos por grau de diferenciação

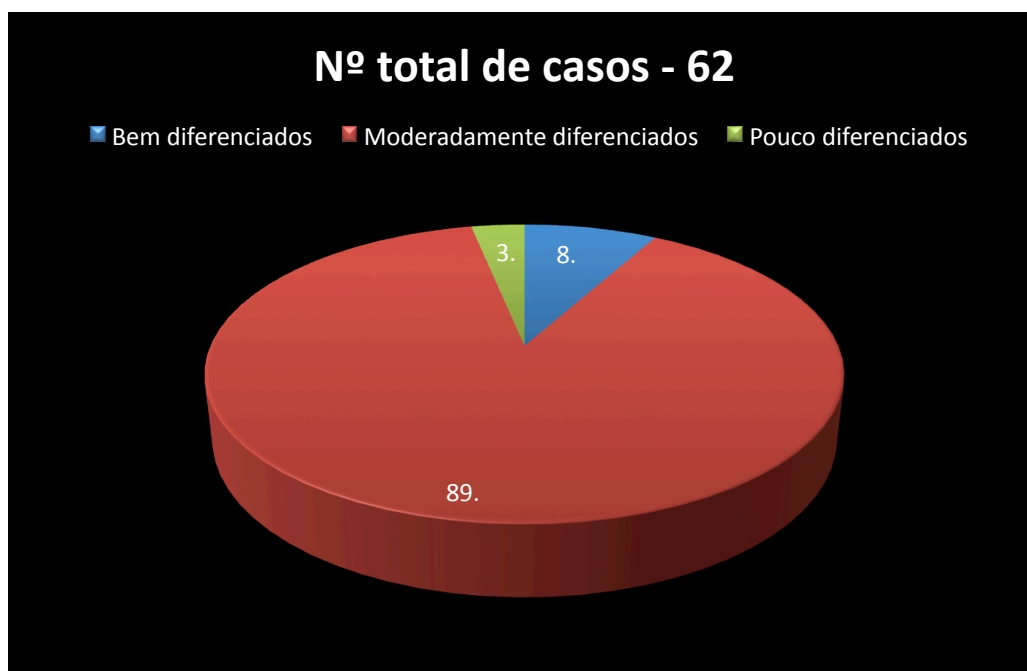


Gráfico 2 - Percentagens dos graus de diferenciação

Dos 62 adenocarcinomas, 5 eram bem diferenciados (8%), apenas 2 eram pouco diferenciados (3%) e os restantes 55 eram moderadamente diferenciados (89%).

IMUNOHISTOQUÍMICA

CASOS	Percentagem de Coloração	Intensidade de Coloração	Grau de Diferenciação
1	50	++	M
2	25	+	M
3	75	+++	M
4	100	+++	B
5	50	+	M
6	25	+	M
7	0	-	P
8	0	-	M
9	0	-	M
10	0	-	M
11	0	-	M
12	75	+++	M
13	100	+++	M
14	0	-	M
15	50	++	B
16	75	++	M
17	25	+	M
18	75	++	M
19	25	+	M
20	75	+++	M

21	0	-	B
22	0	-	M
23	0	-	M
24	25	+	M
25	0	-	M
26	75	+++	M
27	0	-	M
28	50	++	M
29	0	-	M
30	0	-	M
31	0	-	M
32	75	+++	M
33	0	-	M
34	75	+++	P
35	0	-	M
36	0	-	M
37	50	++	B
38	50	++	M
39	75	+++	M
40	75	++	M
41	0	-	M
42	0	-	M
43	0	-	M

44	0	-	M
45	75	+++	M
46	0	-	M
47	0	-	M
48	75	+++	M
49	0	-	M
50	50	++	M
51	0	-	M
52	25	+	M
53	75	+++	M
54	50	+	M
55	0	-	M
56	50	+	M
57	100	+++	M
58	0	-	M
59	0	-	B
60	0	-	M
61	75	+++	M
62	75	++	M

Tabela 8 – Percentagem e Intensidade de Coloração e Grau de Diferenciação

Legenda: B – bem diferenciado; M – moderadamente diferenciado; P – pouco diferenciado

Imunoexpressão p53	Nº total de casos - 62
p53 presente	33 casos
p53 ausente	29 casos

Tabela 9 - Imunoexpressão da p53

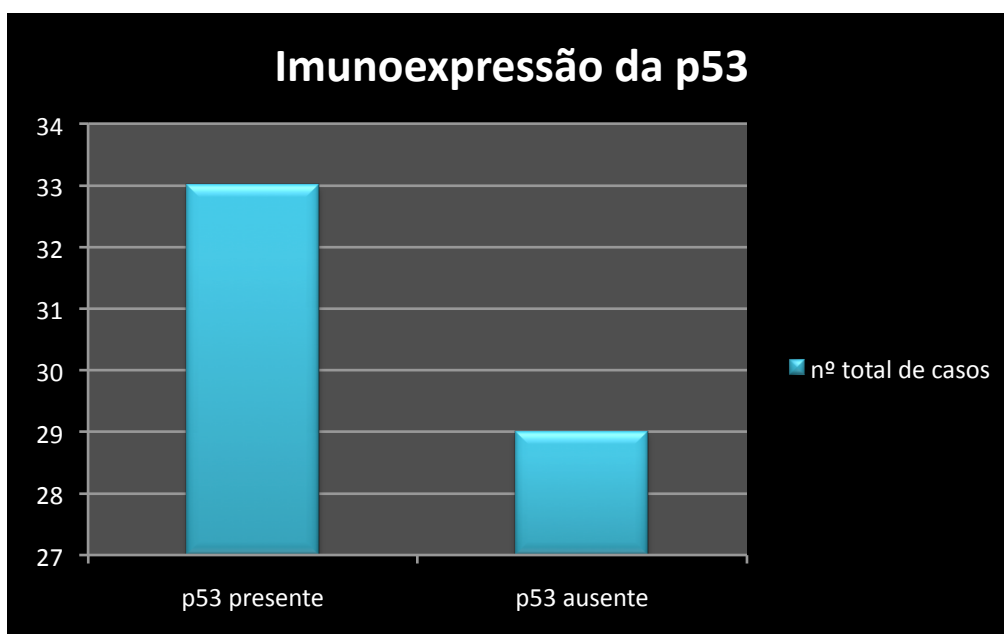


Gráfico 3 - Imunoexpressão da p53

Imunoexpressão da p53

■ p53 presente ■ p53 ausente

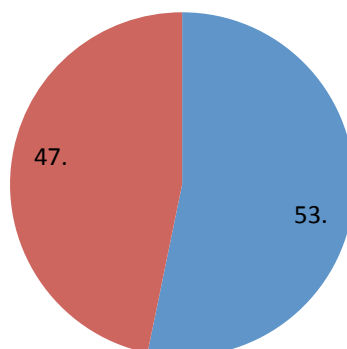


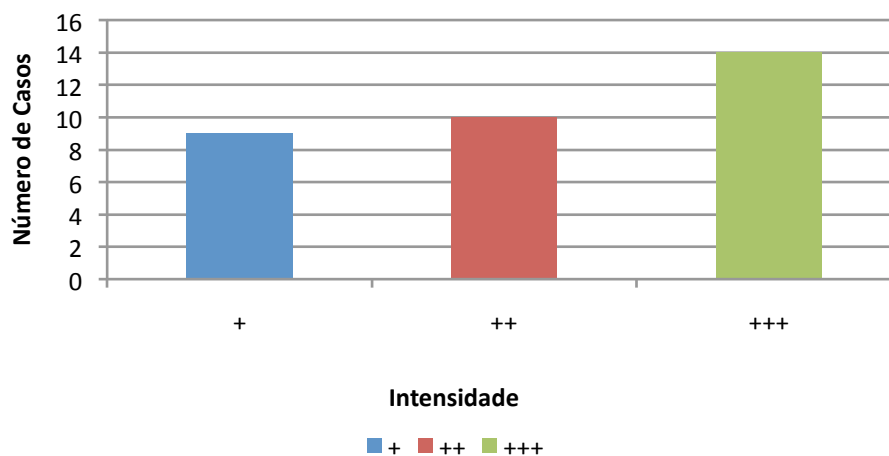
Gráfico 4 - Percentagens da imunoexpressão da p53

A p53 esteve presente em 33 dos 62 casos (em 53% casos havia imunoexpressão da p53).

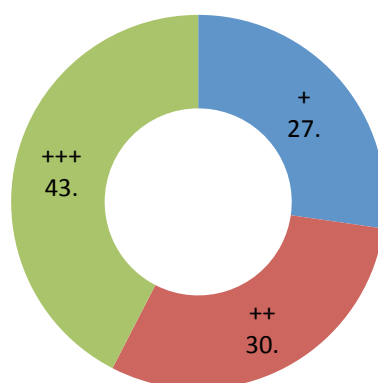
Intensidade	Nº de casos
+	9
++	10
+++	14

Tabela 10 – Resumo dos casos por intensidade de coloração

Intensidade da Imunomarcação



Intensidade da Imunomarcação



Gráficos 5 e 6 - Intensidade da imunomarcação

Dos 33 casos em que a p53 esteve presente, verificou-se que houve um maior número de casos (14) com coloração forte, seguido de 10 casos de coloração moderada e apenas 9 casos de coloração ligeira.

Percentagem	Nº de casos
0%	29
25%	6
50%	9
75%	15
100%	3

Tabela 11 – Percentagem de coloração

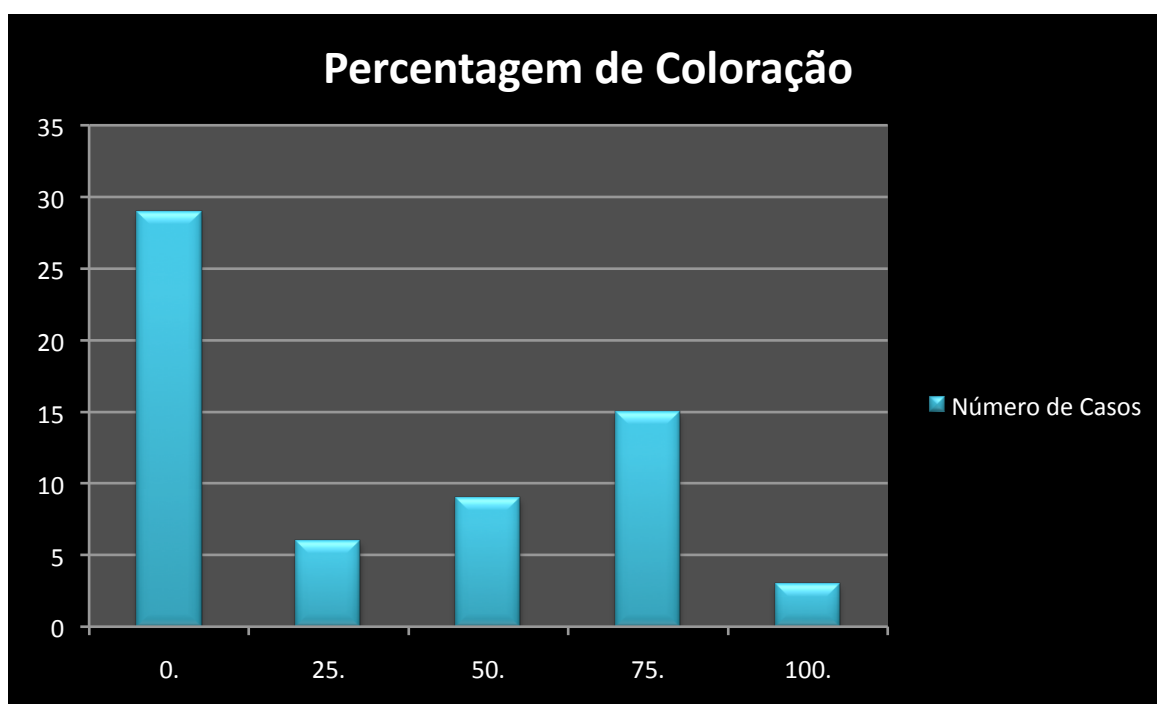


Gráfico 7 – Percentagem de coloração

Em 15 casos constatou-se que mais de 75% das células da lâmina apresentavam imunomarcção para a p53. Em 9 casos, aproximadamente 50% apresentavam imunomarcção e em 3 casos a imunomarcção representava 100%.

IMAGENS DAS LÂMINAS - IMUNOHISTOQUÍMICA

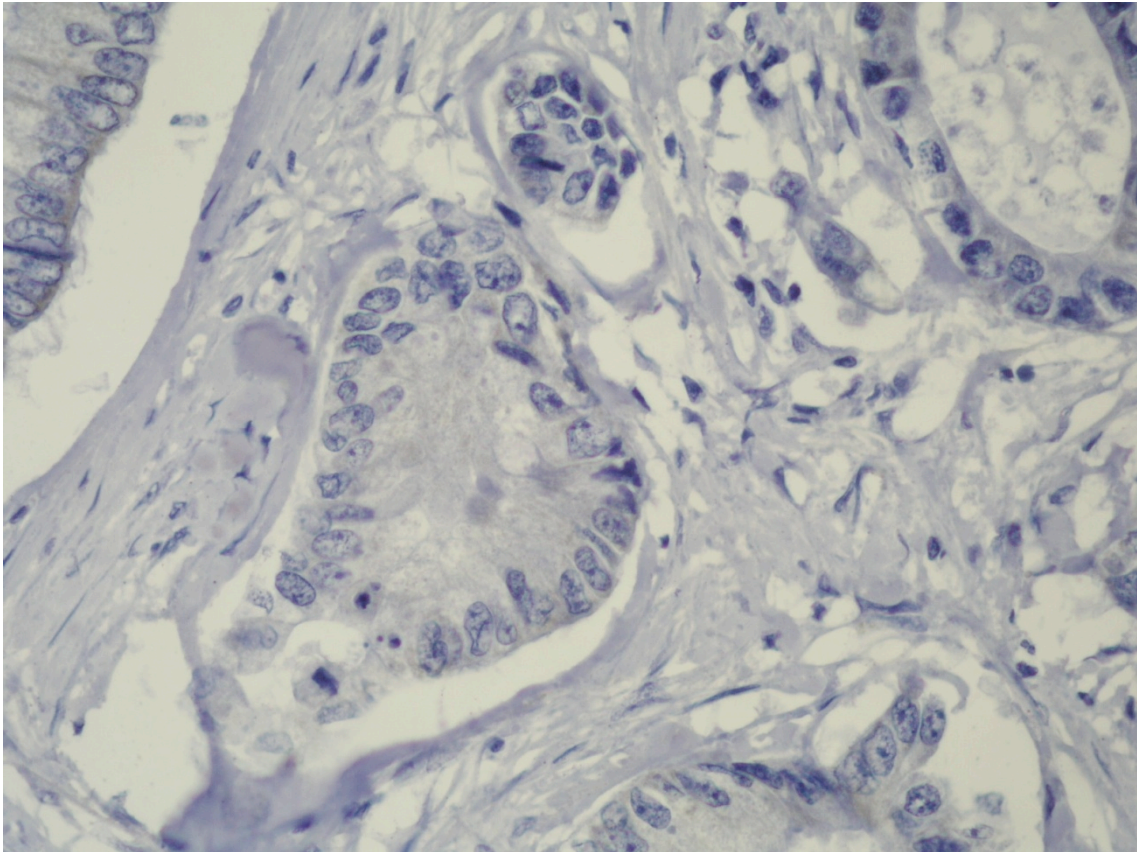


Figura 33 - p53x400 EXEMPLO DE PERCENTAGEM - 0%

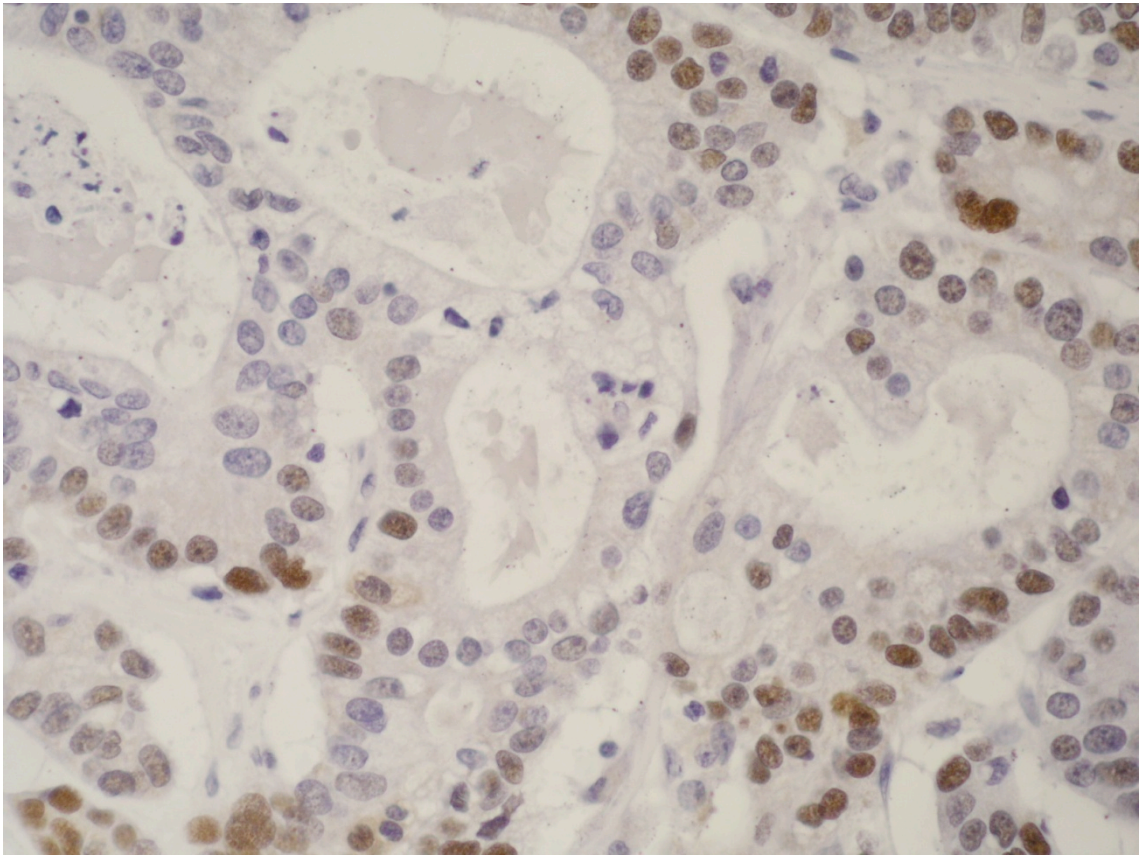


Figura 34 - p53x400 EXEMPLO DE PERCENTAGEM - 25%

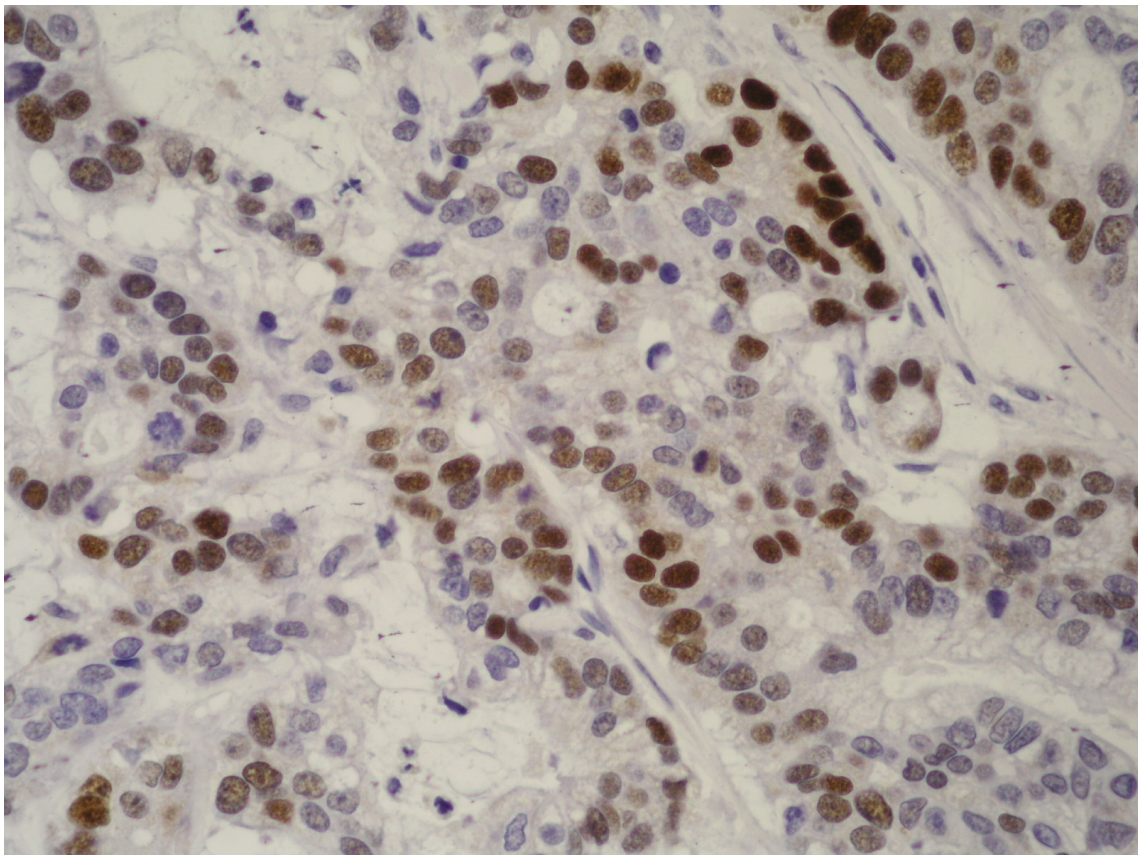


Figura 35 - p53x400 EXEMPLO DE PERCENTAGEM - 50%

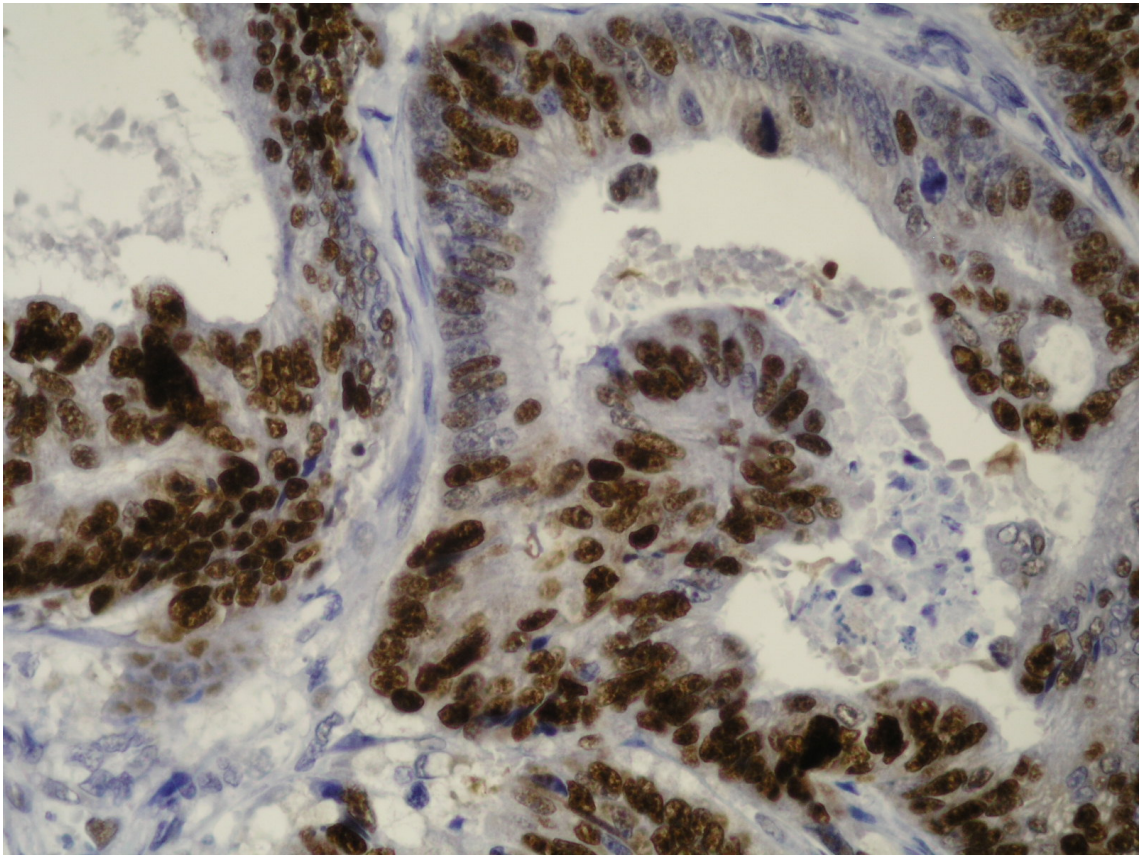


Figura 36 - p53x400 EXEMPLO DE PERCENTAGEM - 75%

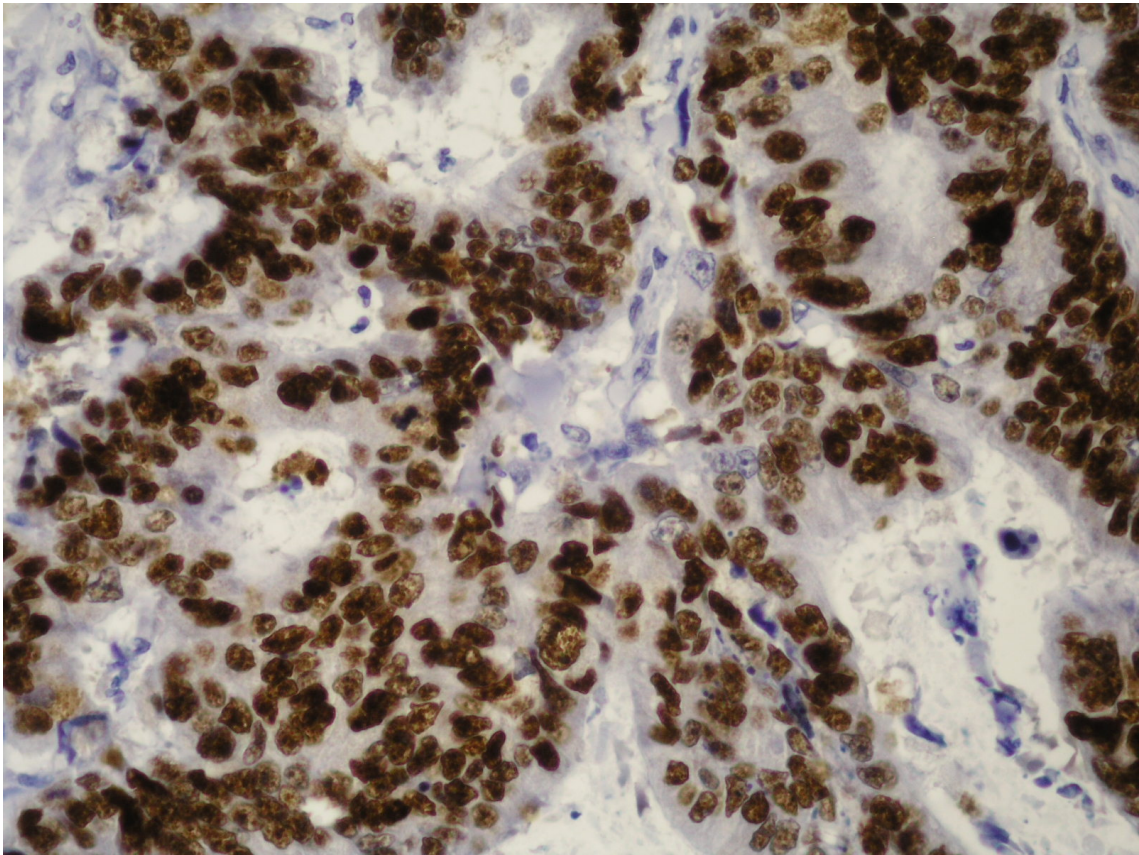


Figura 37 - p53x400 EXEMPLO DE PERCENTAGEM - 100%

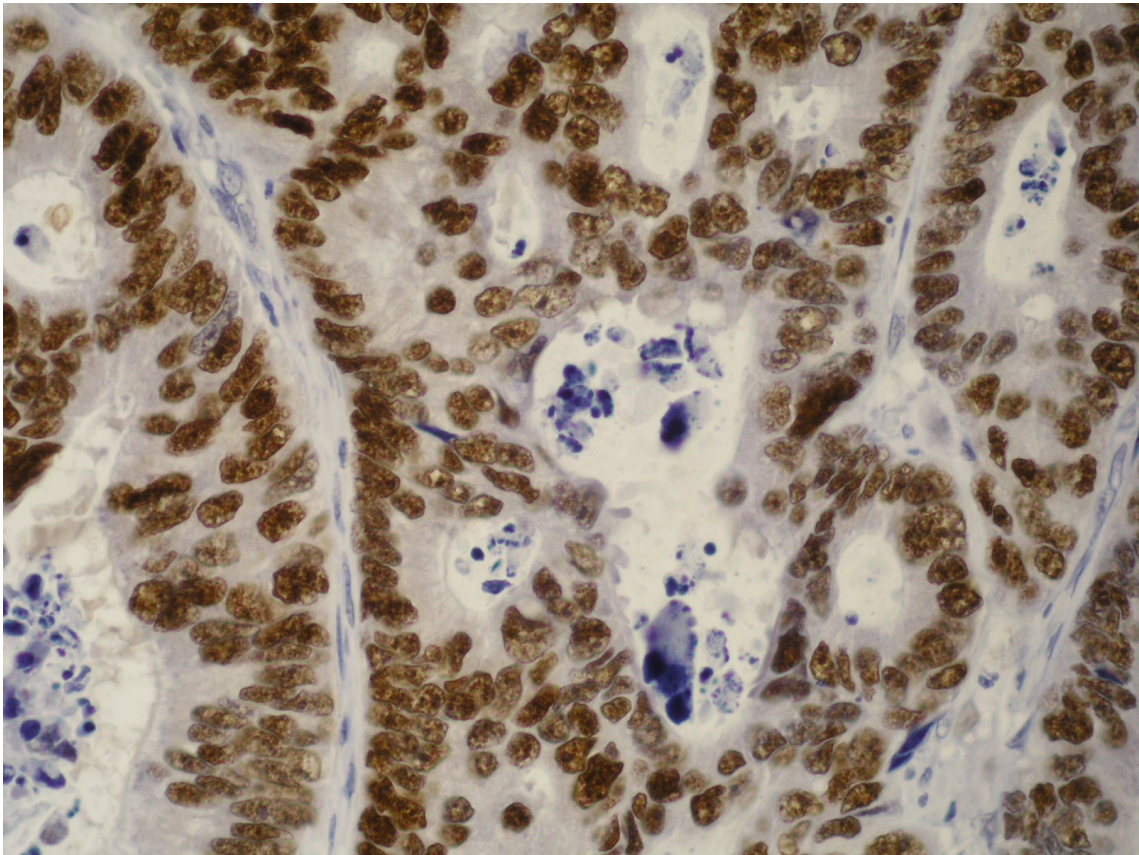


Figura 38 - p53x400 EXEMPLO DE INTENSIDADE : +

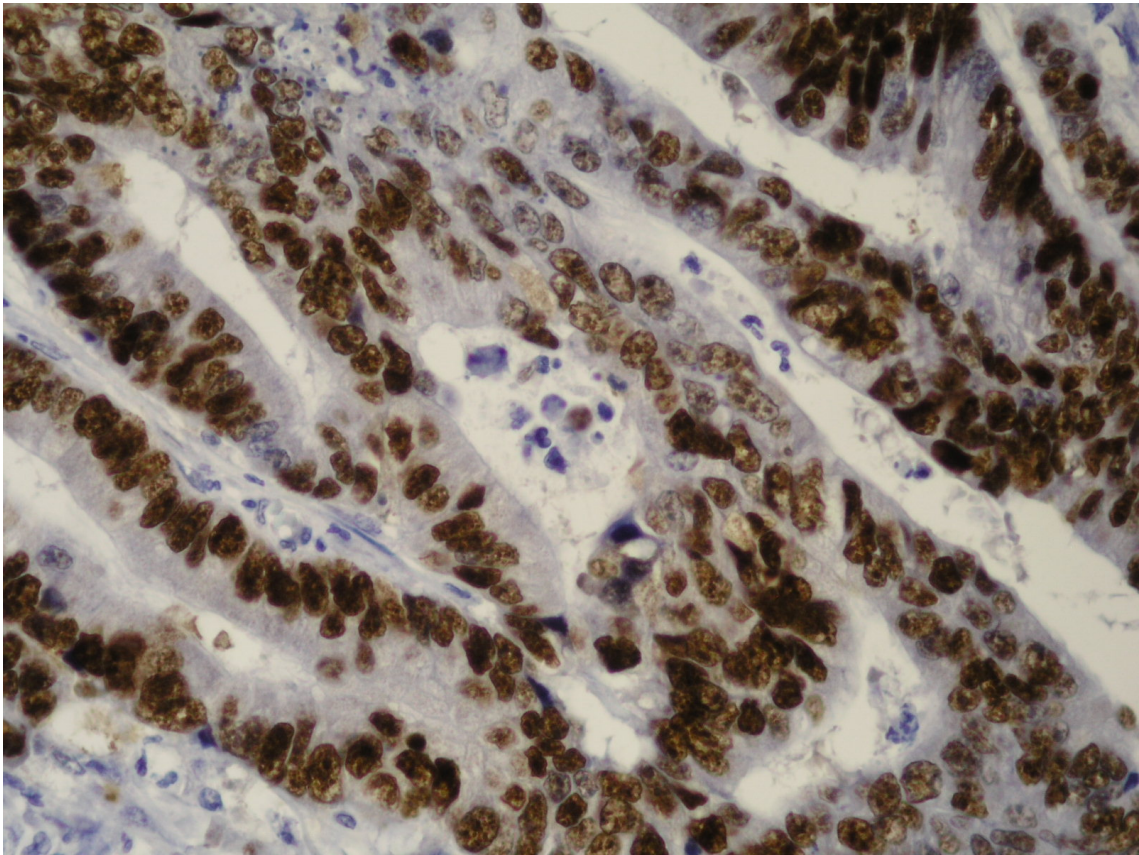


Figura 39 - p53x400 EXEMPLO DE INTENSIDADE : ++

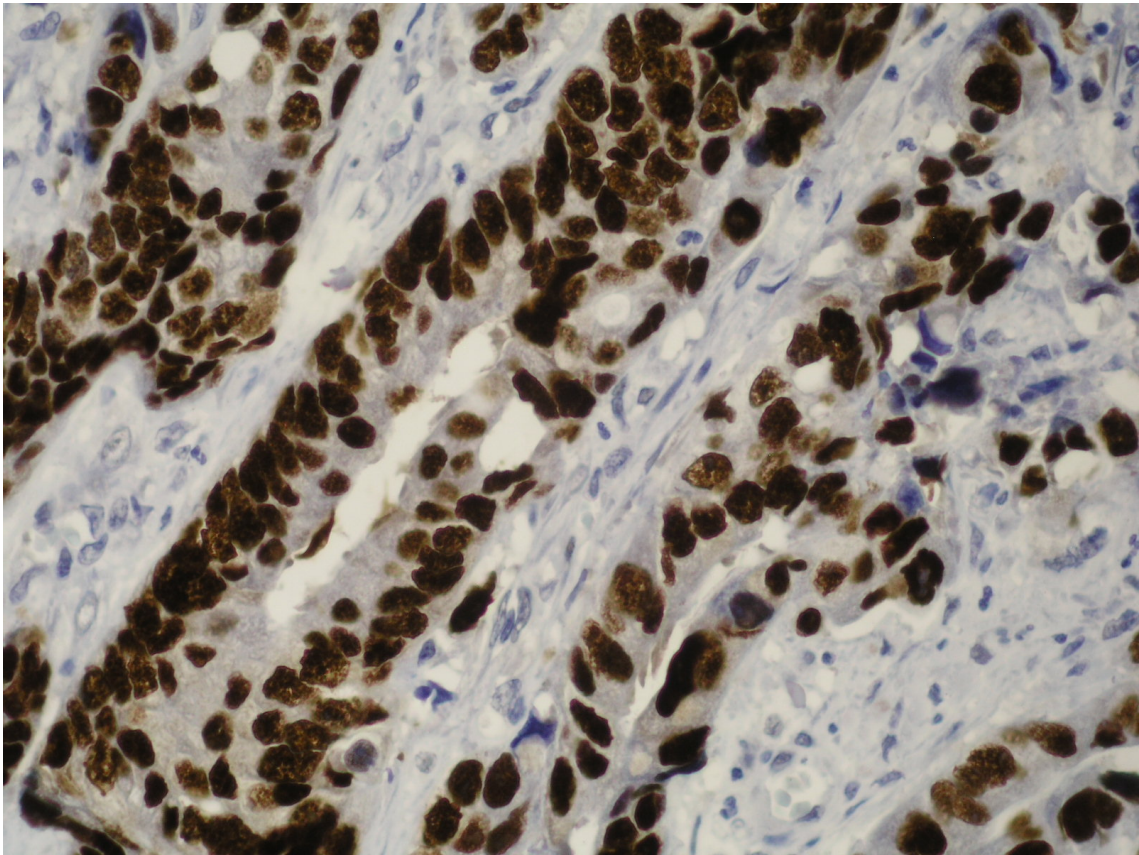


Figura 40 - p53x400 EXEMPLO DE INTENSIDADE : +++

EXEMPLOS DOS GRAUS DE DIFERENCIAÇÃO

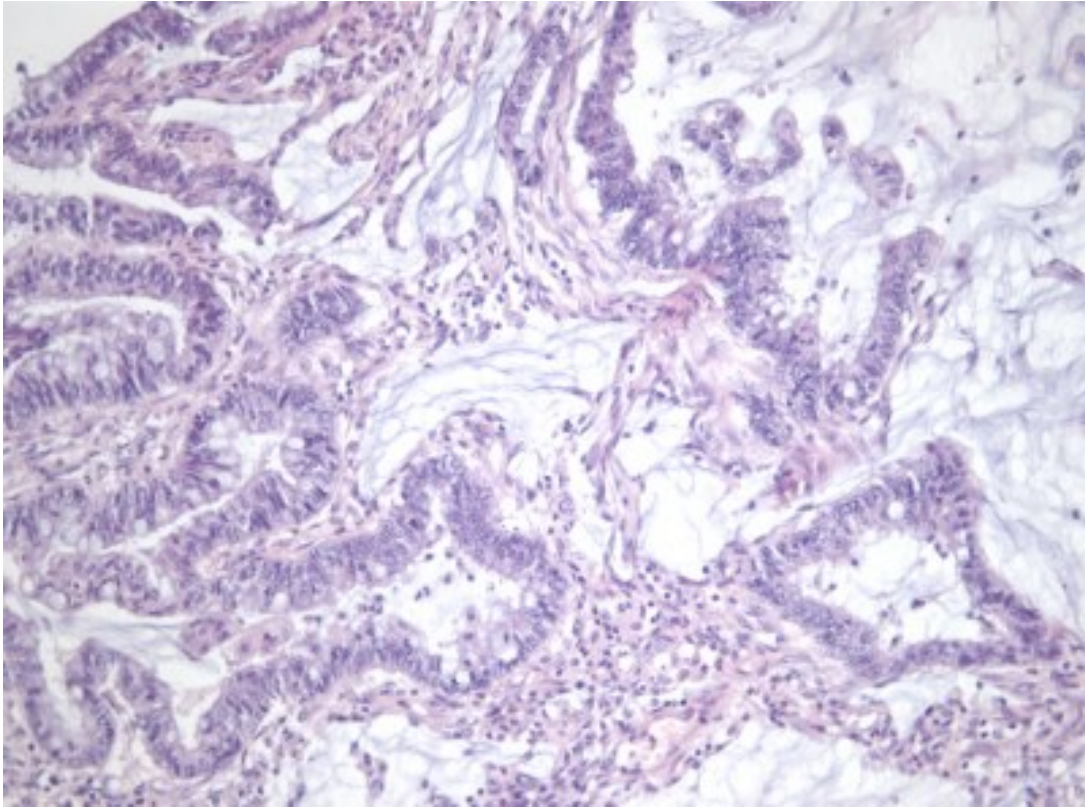


Figura 41 - HEx400. Adenocarcinoma Bem Diferenciado

Glândulas neoplásicas e extensas áreas de muco

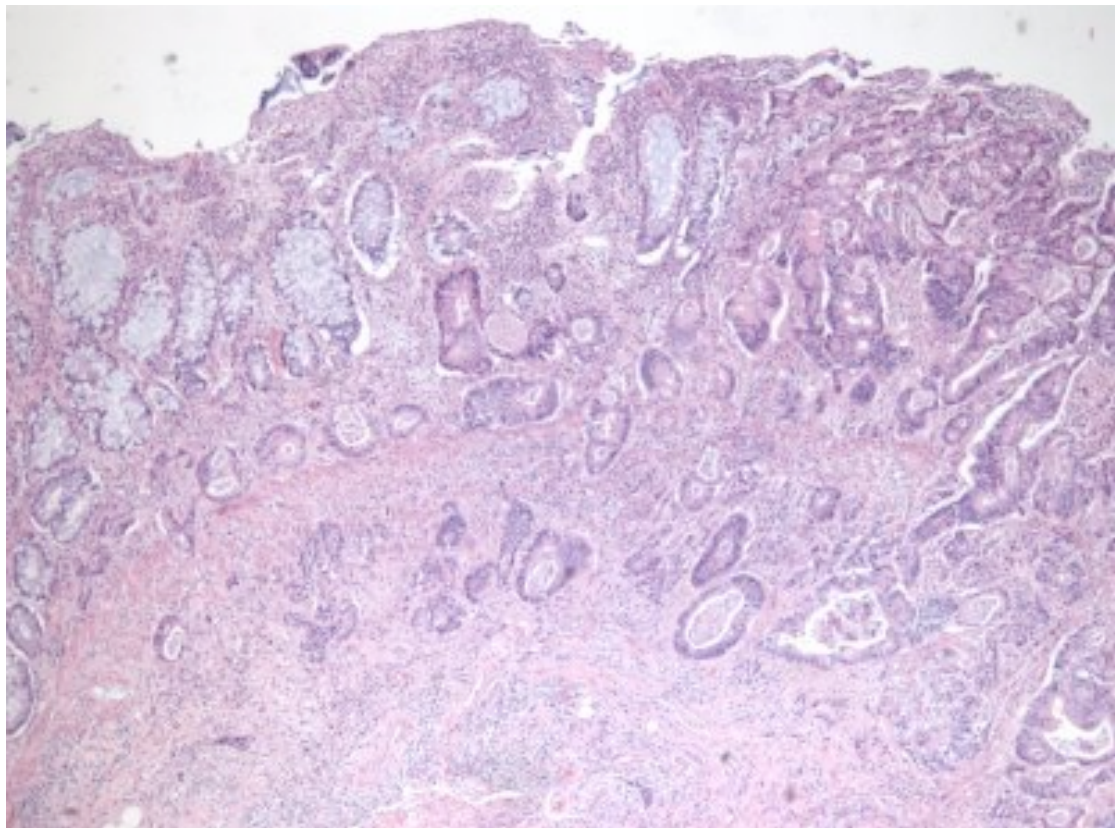


Figura 42 - HEx400. Adenocarcinoma Moderadamente Diferenciado

Reacção desmoplásica

Glândulas neoplásicas com diferentes morfologias

Focos de necrose

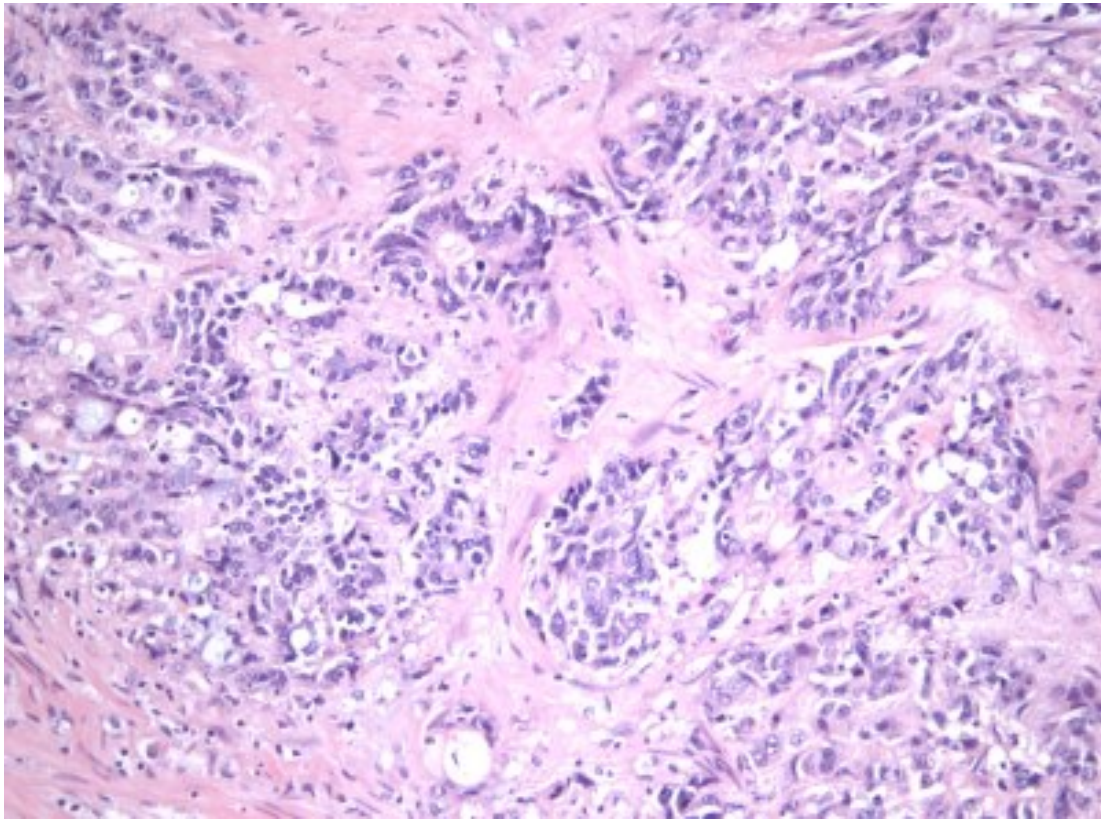


Figura 43 - HEx400. Adenocarcinoma Pouco Diferenciado

Presença de reacção desmoplásica

Glândulas neoplásicas do cólon formam maciços e há neovasos

Discussão

Constatou-se que a maioria dos tumores estavam localizados no cólon e apenas 18% se apresentavam no recto. Resultado este que está de acordo com o conhecimento actual da localização comum deste tipo de tumores.

Na maioria dos casos a imunomarcação foi positiva e a expressão da proteína revelou-se numa intensidade e percentagem consideráveis. Apenas 27% dos casos apresentava coloração global, de uma cruz, de intensidade, os restantes casos apresentavam duas ou três cruces (intensidade moderada a forte). Quanto à percentagem de coloração, 27 casos apresentaram uma imunomarcação de 50% ou mais e somente 6 casos revelaram uma imunomarcação em torno dos 25%.

Resultados estes, que estão de acordo com os actuais estudos, que referem como comum, a imunoexpressão aumentada da p53 (acumulação de p53, provavelmente mutada) em adenocarcinomas colo-rectais.

Tendo em conta que quando há mutações a p53 mutante tende a acumular até níveis elevados, poder-se-á pressupor que uma maior intensidade e percentagem de coloração seja fruto de uma maior acumulação proteica, situação essa que estará provavelmente associada a um pior prognóstico.

Os adenocarcinomas eram, em geral, moderadamente diferenciados, com a excepção de 5 casos de tumores bem diferenciados e 2 casos de tumores

pouco diferenciados. Assim, não foi possível estabelecer qualquer tipo de correlação entre o grau de diferenciação tumoral e a imunexpressão da p53, uma vez que, os casos não eram suficientes (apenas 2 casos de tumores pouco diferenciados e 5 casos de tumores bem diferenciados) para terem significância estatística.

Quanto à imunohistoquímica como técnica de confiança para detectar as mutações no gene TP53 existe ainda uma grande controvérsia. Actualmente realizam-se estudos para tentar determinar se existe concordância entre a imunexpressão positiva da p53 e a mutação do TP53, fazendo uso do estudo por PCR da existência de mutações. Alguns estudos, (como o de KP. Jong et al, 2005) que tentaram relacionar a imunexpressão da proteína e as mutações no gene concluíram que a imunohistoquímica não seria uma técnica de confiança para detectar as mutações. ⁽¹⁰⁾

É importante referir que uma imunexpressão negativa não significa necessariamente que não tenha ocorrido mutação no TP53. Podem ter ocorrido, entre outras possibilidades, mutações sem sentido levando à produção de codões stop ou a proteínas anómalas resultantes instáveis, não havendo assim acumulação de p53. Estudos prévios concluíram que a concordância entre a mutação no gene e o acúmulo da proteína não é perfeita. O acúmulo da proteína pode não indicar a presença de mutação no gene e nem toda a mutação do gene leva ao acúmulo da proteína. ⁽¹¹⁾

Quanto à p53 que a imunohistoquímica permite detectar, também há uma grande controvérsia sobre que tipo de p53 é detectado por esta técnica.

Sabendo que a p53 no seu estado selvagem tem uma semi-vida curta e que se apresenta em baixas concentrações, ao conseguirmos detectá-la por imunohistoquímica acredita-se que a proteína detectada seja uma forma mutante da p53 (tem uma semi-vida prolongada, é muito mais estável, logo acumula-se) ou então uma forma selvagem que foi estabilizada por certos factores. Assim, pela primeira hipótese deduzir-se-ia que ao encontrarmos a p53 por imunoexpressão estaríamos perante uma forma mutante e consequentemente o gene TP53 teria sofrido mutações implicando assim um pior prognóstico.

Num estudo recente tentaram avaliar a significância prognóstica da expressão da p53 em adenocarcinomas do recto e a sua correlação com variáveis clínicas e patológicas, incluindo a sobrevivência, recorrendo a um follow-up de 5 anos dos doentes. Como resultados obtiveram uma associação entre a imunoexpressão positiva e morte, recorrência local, metástases à distância e concluíram que a imunoexpressão provou ser um factor independente de prognóstico naqueles 83 doentes. ⁽¹²⁾

É sabido que a maioria dos adenocarcinomas colo-rectais se desenvolve em pólipos. Embora neste estudo se tenham encontrado tumores desenvolvidos em adenomas tubulares ou tubulovilosos, esses casos não foram seleccionados para a amostra. Um estudo recente, (Vernillo R, 2008) pretendeu estabelecer a significância da imunoexpressão da p53 como indicadora da eventual transformação maligna dos pólipos e do surgimento de novos pólipos. Concluíram, com significância estatística ($p=0.0111$), que a

imunoexpressão positiva da p53 estava relacionada com a transformação maligna e que apenas o número de pólipos primários síncronos ao diagnóstico era o único factor preditivo da formação de novos adenomas, embora sem terem obtido significância estatística. ⁽¹³⁾

Futuramente, o estudo da expressão de marcadores biológicos pode passar a ser uma prática corrente, contudo, são ainda necessários mais estudos para que se possa definir com exactidão o valor preditivo do seu uso.

No futuro residirá provavelmente, a reactivação farmacológica da função endógena da p53. Já se provou num estudo que a restauração da p53 funcional conduziu à regressão tumoral em cobaias. ⁽¹⁴⁾

Contudo, actualmente é sabido que a p53 também desempenha um importante papel na regulação do envelhecimento do organismo, constituindo por isso um desafio a sua manipulação e uso como terapia génica na oncologia. Num estudo foram criadas cobaias com mutações na p53 mas que preservavam a proteína funcional e constatou-se que em relação às cobaias com p53 selvagem, apresentavam uma resistência aumentada a tumores espontâneos, contudo apresentavam também um envelhecimento precoce. ^(15,16)

Limitações do estudo:

É importante ressaltar que a reacção imunológica depende do estado de conservação dos blocos parafinados e de terem sido adequadamente fixados em formalina tamponada; de uma eficaz recuperação antigénica; de uma correcta diluição dos anticorpos; do cumprimento dos tempos e temperaturas

de incubação; do adequado acondicionamento dos reagentes; entre outros factores. É possível que certa coloração de fundo seja atribuível à difusão antigénica (coloração fora do lugar esperado, onde o antigénio se deveria encontrar).

Para minimizar a variabilidade inter-observador poder-se-ia ter utilizado um software que quantificasse automaticamente os núcleos que expressavam imunomarcação e que realizasse a comparação específica de tonalidades como o “ImageLab, Softium Sistemas de Informática” caso houvesse acesso a este recurso.

Conclusões Finais

Este tipo de estudo é um pilar intermédio entre um estudo epidemiológico prévio de 133 casos (da autoria do Prof. Dr. Javier Muñoz) e um estudo futuro que pretenda estabelecer posteriores protocolos que definam critérios diagnósticos e prognósticos para este tipo de tumores.

Assim, num estudo posterior, poder-se-iam incluir outras variáveis como idade e sexo, classificação TNM, para além do grau de diferenciação tumoral. Poder-se-ia ainda incluir o estudo de outro marcador tumoral como o Ki-67 e o estudo dos estilos de vida e hábitos alimentares dos pacientes. Estudar-se-ia mediante imunohistoquímica a imunoexpressão da p53 e por PCR a existência de mutações. Recorrer-se-ia a um período de follow-up, para se determinar após ressecção cirúrgica, qual teria sido a sobrevida, recorrências e metástases.

Utilizando um programa de estatística, como o SPSS, introduzir-se-iam as variáveis de modo a tentar correlacioná-las com a imunexpressão da p53, para se definirem critérios prognósticos e se estabelecerem futuros protocolos.

Referências Bibliográficas

1. Kumar V, Cotran RS, and Robins SL. Basic Pathology. 7th. 582-585
2. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. Nature 1991;351:453-6.
3. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, *et al.* Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc 700 – p53 complex with an altered half - life. Mol Cell Biol 1988; 8:531-9.
4. Hall PA, Lane DP. p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry?- revisited!. J Pathol 1994;172:1-4.
5. Starzynska T, Bromley M, Ghosh A, *et al.* Prognostic significance of p53 overexpression in gastric and colorretal carcinoma. Br J Cancer 1992;66:558-62.
6. Ribeiro UJR, Alves VA, Souza PMSB, *et al.* Correlação das proteínas p53 e KI-67 com o prognóstico de pacientes com adenocarcinoma de reto distal. Rev

Bras Coloproct 2000; 20(4):248-56.

7.Oren M, Rotter V. Introduction: p53 – the first twenty years. Cell Mol Life Sci 1999; 55:9-11.

8.Bullock AN, Feisht AR. Rescuing the function of mutant p53. Nature Rev Cancer 2001;1:68-75.

9. Dako. Immunohistochemical Staining Methods. Fourth Edition

10. KP. Jong et al. P53 mutation analysis of colorectal liver metastases: relation to actual survival, angiogenic status, and p53 overexpression. Clinical Cancer Research. 2005 Jun 1;11(11):4067-73. PMID: 15930341

11.Rocha FTR. Expressão da proteína P53 no adenocarcinoma gástrico: correlação clínica, anatomopatológica e significância prognostica. Rev. Col. Bras. Cir. vol.31 no.3 Rio de Janeiro May/June 2004. doi: 10.1590/S0100-69912004000300008

12. Jurach MT. Expression of the p53 protein and clinical and pathologic correlation in adenocarcinoma of the rectum. Arq Gastroenterol. 2006 Jan-Mar;43(1):14-9. Epub 2006 May 8

13.Vernillo R et al. Immunohistochemical expression of p53 and Ki67 in colorectal adenomas and prediction of malignancy and development of new polyps. Int J Biol Markers. 2008 Apr-Jun;23(2):89-95



14.Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek EE, Weissleder R, Jacks T (2007). "Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo". *Nature* 445 (7128): 661–5. PMID 17251932.

15.Tyner SD et al (2002). "p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes". *Nature* 415 (6867): 45–53. PMID 11780111

16. Foulkes WD. "p53 — Master and Commander" *NEJM*. 2007 Dec 20; 357(25):2539-4. PMID 18094374