



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

**Estudo do valor prognóstico do Ki-67 em  
adenocarcinomas do colon e reto e sua correlação  
com o grau de diferenciação histológica,  
localização e prognóstico de pacientes com o  
respetivo tumor**

**Ana Rita Vergílio Alves**

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

Orientador: Professor Doutor Javier Muñoz

**Covilhã, maio de 2016**



## Dedicatória

“Não somos o que sabemos, somos o que estamos dispostos a aprender.”

Dedico a todos aqueles que não desistem dos seus sonhos e que lutam todos os dias por eles!



## Agradecimentos

Um especial agradecimento ao meu Orientador de Tese, Professor Doutor Javier Muñoz, por toda a disponibilidade, compreensão e profissionalismo demonstrado ao longo deste trabalho. Sem dúvida que sem a sua ajuda este percurso teria sido mais difícil.

Um obrigada também ao Prof. Miguel Freitas por simplificar aquilo que parecia indecifrável.

Obrigada à minha Família por me possibilitar a concretização deste sonho e estar sempre ao meu lado e, em especial, à minha Mãe por não me deixar desanimar nos momentos mais críticos.

Obrigada aos meus Amigos por todo o apoio e por me fazerem acreditar que tudo é possível, desde que não desistamos.

E, por fim, um agradecimento, também ele muito especial, ao JP por toda a sua persistência, ajuda, carinho e por estar presente em todos os momentos deste percurso.



## Resumo

### Introdução:

Num mundo onde as neoplasias são cada vez mais causa de perda de qualidade de vida, ou até de morte, torna-se imprescindível o estudo do seu comportamento, tanto pelo interesse num diagnóstico precoce, como também no estabelecimento de um prognóstico.

O Cancro Colorretal é a segunda neoplasia mais comum na Europa. O estadio do tumor, a classificação histológica, a presença/ausência de linfadenopatias e/ou metástases à distância, têm sido reconhecidos como factores de prognóstico. No entanto, estas características, por si só, não permitem prever na totalidade qual o resultado clínico final.

Por esta razão, têm sido feitos esforços no sentido de tentar identificar novos marcadores moleculares que auxiliem, como factores de prognóstico isolados, ou em combinação com dados clínico-histopatológicos, a melhorar a previsão do desfecho e a determinar a abordagem terapêutica mais adequada.

Um deles é o antigénio Ki-67, uma proteína expressa no núcleo das células durante todo o ciclo celular, com exceção da fase G0. A sua presença estritamente relacionada com o ciclo celular sugere o seu papel importante na regulação deste.

Dos estudos até agora concretizados, a sua utilização como marcador de proliferação celular tem mostrado o seu reconhecimento como factor de prognóstico independente para o cancro da próstata, mama, entre outros. Contudo, no que concerne ao Adenocarcinoma Colorretal a literatura disponível revela resultados controversos quanto ao seu valor prognóstico.

### Objetivos:

1. Analisar a expressão imunohistoquímica da proteína Ki-67 e dos factores clínico-histopatológicos: “género”, “idade”, “prognóstico dos pacientes”, “grau de diferenciação histológica do tumor”, “localização do tumor” e “classificação TMN” de pacientes com Adenocarcinomas Colorretais.
2. Estudar o valor prognóstico da proteína Ki-67 em Adenocarcinomas Colorretais e a sua correlação com alguns parâmetros clínico-histopatológicos.

## **Métodos:**

Foram estudados 35 pacientes com Adenocarcinoma Colorretal que foram submetidos a ressecção cirúrgica do tumor com intenção curativa, entre janeiro de 2001 e janeiro de 2003, no Centro Hospitalar Cova da Beira. Nenhum recebeu terapia neoadjuvante, tendo sido depois sujeitos a um follow-up pós-operatório de 10 anos.

As amostras foram processadas histologicamente, segundo o protocolo definido pela instituição anteriormente referida, para a marcação imunohistoquímica da proteína Ki-67. Foram depois classificadas de acordo com o “grau de diferenciação histológica do tumor”, e consideradas tanto a “intensidade” como a “percentagem” de células marcadas pela proteína Ki-67.

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

## **Resultados:**

Foi encontrada correlação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre a “expressão imunohistoquímica de células marcadas pela proteína Ki-67” e o “prognóstico dos pacientes”. Contudo, não se verificaram resultados estatisticamente significativos entre a “expressão imunohistoquímica de células marcadas pela proteína Ki-67” relativamente à “localização do tumor” e “grau de diferenciação histológica do tumor”. Ao fim de 10 anos a mortalidade foi de 37,1%.

## **Palavras-chave**

Adenocarcinoma Colorretal, Ki-67, localização, grau de diferenciação histológica, prognóstico.

## Abstract

### Introduction:

In a world where cancer is increasingly a cause of loss of quality of life or death it is essential to study its behavior, either by an interest in early diagnosis as well as in establishing a prognosis.

The Colorectal cancer is the second most common cancer in Europe. The tumour stage, histological type, the presence/absence of lymphadenopathy and/or distant metastases have been recognized as prognostic factors. However these characteristics, in itself, didn't allow us to fully predict the clinical outcome.

For this reason efforts have been made to try and identify new molecular markers that aid, as individual prognosis factors or in combination with clinicalhistopathological data, to improve prediction of the outcome and to determine the most appropriate therapeutic approach.

One of them is the Ki-67 antigen, a protein expressed in the nucleus of cells throughout the cell cycle, except G0. Its presence strictly related to cell cycle suggesting its important role in the regulation thereof.

From studies completed so far, its use as a marker of cellular proliferation has shown its recognition as an independent prognostic factor for prostate cancer, breast cancer and other cancers. However, regarding the Colorectal Adenocarcinoma available literature reveals conflicting results concerning its prognostic value.

### Goals:

1. Analyze the immunohistochemical expression of Ki-67 protein and clinicalhistopathological parameters: "gender", "age", "prognosis of patients", "histological type of the tumour", "location of the tumour" and "TMN classification" of patients with colorectal adenocarcinomas.
2. Study the prognostic value of Ki-67 protein in colorectal adenocarcinomas correlated with some clinicalhistopathological parameters.

## Methods:

35 patients with Colorectal Adenocarcinoma were studied who underwent surgical resection of the tumour with curative intent, between January 2001 and January 2003, at Centro Hospitalar Cova da Beira. None received neoadjuvant therapy, having been subjected to a post-operative follow-up of 10 years.

Samples were histologically processed according to the protocol defined by the aforementioned institution for the immunohistochemical staining of the Ki-67 protein. They were then classified according to histological type of the tumour and considering both the intensity and the percentage of stained cells by the Ki-67 protein.

The data were analyzed considering a p value  $<0.05$  considered statistically significant.

## Results:

Statistically significant correlation ( $p < 0,05$ ) was found between “immunohistochemical expression of cells stained by the Ki-67 protein” and the “prognosis of patients”. However, there were no statistically significant results within the “immunohistochemical expression of stained cells by the Ki-67 protein” with respect to the “location of the tumour” and “histological type of the tumour”. After 10 years, the mortality rate was 37.1%.

## Keywords

Colorectal Adenocarcinoma, Ki-67, location, histological type, prognosis.

# Índice

<b>Dedicatória</b> .....	<b>iii</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>v</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>vii</b>
Introdução: .....	vii
Objetivos: .....	vii
Métodos: .....	viii
Resultados: .....	viii
Palavras-chave .....	viii
<b>Abstract</b> .....	<b>ix</b>
Introduction: .....	ix
Goals: .....	ix
Methods: .....	x
Results: .....	x
Keywords .....	x
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Lista de Gráficos</b> .....	<b>xv</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>xvii</b>
<b>Lista de Acrónimos</b> .....	<b>xix</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Hipóteses a testar .....	2
1.2 Objetivos do Estudo .....	3
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	<b>5</b>
2.1 Preparação e Determinação Imunohistoquímica .....	5
2.2 Análise Estatística .....	9
<b>3. Resultados</b> .....	<b>11</b>
<b>4. Discussão</b> .....	<b>21</b>
4.1 Limitações .....	25
4.2 Implicações .....	26
<b>5. Conclusão</b> .....	<b>27</b>
<b>6. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>29</b>
<b>7. Anexos</b> .....	<b>33</b>



## Lista de Figuras

Figura 1 - Amostra de Adenocarcinoma Colorretal que apresenta uma percentagem de células marcadas pela proteína Ki-67 de 25% (x400). .....	8
Figura 2 - Amostra de Adenocarcinoma Colorretal que apresenta uma percentagem de células marcadas pela proteína Ki-67 de 50% (x400). .....	8
Figura 3 - Amostra de Adenocarcinoma Colorretal que apresenta uma percentagem de células marcadas pela proteína Ki-67 de 75% (x400). .....	9



## Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição dos casos em estudo segundo a “idade” dos pacientes (N=35). .....	11
Gráfico 2 - Distribuição dos casos em estudo segundo a “localização do tumor” (N=35). .....	12
Gráfico 3 - Distribuição dos casos em estudo segundo o “grau de diferenciação histológica do tumor” (N=35). .....	12
Gráfico 4 - Distribuição dos casos em estudo segundo a “classificação TMN” (N=35). .....	13
Gráfico 5 - Distribuição dos casos em estudo segundo a “intensidade de marcação imunohistoquímica pela proteína Ki-67” (N=35). .....	14
Gráfico 6 - Distribuição dos casos em estudo segundo a “percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67” (N=35). .....	15
Gráfico 7 - Relação entre a “percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67” e o “prognóstico dos pacientes”. .....	22
Gráfico 8 - Relação entre a “intensidade de marcação imunohistoquímica pela proteína Ki-67” e o “prognóstico dos pacientes”. .....	23



## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Distribuição dos casos em estudo segundo a “percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67” e o “grau de diferenciação histológica do tumor”.....	15
Tabela 2 - Distribuição dos casos em estudo segundo a “percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67” e a “localização do tumor”.....	16
Tabela 3 - Distribuição dos casos em estudo segundo a “intensidade de marcação imunohistoquímica pela proteína Ki-67” e a “localização do tumor”.....	16
Tabela 4 - Distribuição dos casos em estudo segundo a “intensidade de marcação imunohistoquímica pela proteína Ki-67” e o “grau de diferenciação histológica do tumor”. .	16
Tabela 5 - Relação entre a “percentagem” e “intensidade” de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67.....	18
Tabela 6 - Correlação entre a “percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67” e o “prognóstico dos pacientes” após um follow-up pós-cirúrgico de 10 anos ( $p=0,002$ ) e respetivos riscos relativos. ....	19
Tabela 7 - Correlação entre a “intensidade de marcação imunohistoquímica pela proteína Ki-67” e o “prognóstico dos pacientes” após um follow-up pós-cirúrgico de 10 anos ( $p=0,005$ ) e respetivos riscos relativos.....	20



## Lista de Acrónimos

ABD - Adenocarcinoma Bem Diferenciado

ACR- Adenocarcinoma Colorretal

AMD - Adenocarcinoma Moderadamente Diferenciado

APD - Adenocarcinoma Pouco Diferenciado

CA - Colon Ascendente

CCR - Cancro Colorretal

CD- Colon Descendente

CHCB - Centro Hospitalar Cova da Beira

CS - Colon Sigmoides

CT - Colon Transverso

F - Feminino

M - Masculino

N - Valor absoluto

R - Reto



# 1. Introdução

O Cancro Colorretal é uma das neoplasias malignas mais comuns, ocupando o 1º lugar no panorama nacional no que toca à sua incidência e mortalidade, (1) estimando-se que até 2035 sejam diagnosticados cerca de 2,4 milhões de novos casos/ano mundialmente (1,36 milhões em homens e 1,08 milhões em mulheres). (2)

Aproximadamente 20-25% dos pacientes com esta neoplasia apresentam doença metastática no momento do diagnóstico, (3-4) com taxas de sobrevivência aos 5 anos de apenas 35%. (5) Porém, quando diagnosticado nos estadios iniciais, estas taxas podem atingir os 60-95%. (5)

A sua prevalência é maior nos países mais desenvolvidos (54%), (5) facto atribuível a factores de risco, como hábitos alimentares e ambientais, os quais associados a um fundo de suscetibilidade geneticamente determinada (6-8) se acredita estarem na origem do aumento constante da sua incidência nos últimos anos.

Coerente com o seu papel de lesão precursora, a prevalência de adenomas cólicos correlaciona-se com a de CCR, ambos com semelhante distribuição no colon, (9) estimando-se que 5% destes pólipos se convertam em malignidade, num processo que varia entre 2 a 10 anos. (5-6) Morfologicamente, 98% dos CCR são classificados como adenocarcinomas. (5,8)

Apesar da evolução científica, o tratamento primordial deste tumor continua a ser a cirurgia curativa, realizada em até 90% dos pacientes. (10) Contudo, aproximadamente 50% dos que acreditam estarem livres da doença após tratamento cirúrgico apresentam recaída e, subsequentemente, morrem dela. (6,10)

Atualmente são conhecidos vários parâmetros de prognóstico clínico-patológicos, como o tipo histológico, a localização, o grau de invasão, a presença/ausência de metástases loco-regionais e à distância, (3,8) contudo não são suficientes para avaliar com precisão o risco individual. Tornam-se, assim, necessários métodos adicionais que auxiliem a identificação de pacientes capazes de beneficiar de terapias adjuvantes, as quais contribuam para um prognóstico favorável.

São poucos os marcadores moleculares de prognóstico conhecidos para o CCR e, por essa razão, têm sido feitos esforços com o intuito de identificar novos marcadores que, isolados,

ou em combinação com factores clínico-histopatológicos, possam melhorar o resultado clínico e determinar a abordagem terapêutica mais apropriada.

Sendo a proliferação uma característica adquirida pelas células tumorais durante o processo de carcinogénese, a sua quantificação pode ser determinada através da expressão de níveis de antígenos específicos relacionados com o ciclo celular, recorrendo à imunohistoquímica.

O presente estudo visa analisar o anticorpo monoclonal Ki-67, desenvolvido por Gerdes (1984), (11) localizado a nível nuclear e nucleolar (9,12-13) no cromossoma 10 (10q25). (8,14) O antígeno por ele definido está presente nas células proliferativas (normais e tumorais) (10,15) durante as fases ativas do ciclo celular (fase tardia de G1, S, G2 e M), e ausente na fase G0 e durante os processos de reparação de DNA. (9) Atualmente encontra-se a ser amplamente usado como marcador de proliferação celular, sendo evidente que a sua presença determina a fração de crescimento de uma dada população de células. (15) Embora estudos confirmem que o seu nível de expressão reflete o grau de proliferação celular, (3) o seu papel funcional durante esta não é totalmente conhecido. (15) Várias investigações, relativas à variabilidade da sua expressão ao longo do ciclo celular, têm demonstrado inconsistência, o que levanta a questão de que forma esta alteração de intensidade de coloração estará relacionada com a sua função biológica. (15) Sabe-se, porém, que esta imunoreactividade se encontra associada à proliferação tumoral, e que o seu índice de marcação apresenta significado prognóstico no cancro da mama, pulmão, próstata, fígado, sarcoma, (16) linfomas malignos e astrocitomas (3). Contudo, relativamente ao CCR a sua correlação com os parâmetros clínico-histopatológicos mostra-se inconsistente e as razões para tal permanecem obscuras. (3,11,17-20) Os resultados, aparentemente contraditórios, podem advir de uma heterogeneidade acentuada da sua expressão nos diversos tipos de neoplasias. (6,18-19)

## 1.1 Hipóteses a testar

Existe correlação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre a expressão imunohistoquímica da proteína Ki-67 no ACR e:

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

## 1.2 Objetivos do Estudo

- Detetar através do método de coloração imunohistoquímica os níveis de expressão da proteína Ki-67.
- Analisar a expressão imunohistoquímica da proteína Ki-67 e dos parâmetros clínico-histopatológicos em estudo.
- Determinar o valor prognóstico da expressão da proteína Ki-67 em pacientes com ACR e a sua correlação com os parâmetros clínico-histopatológicos: “grau de diferenciação histológica do tumor”, “localização do tumor” e “prognóstico dos pacientes”.



## 2. Materiais e Métodos

Este estudo retrospectivo foi realizado num total de 35 pacientes diagnosticados com ACR e submetidos a ressecção cirúrgica tumoral com intenção curativa no Serviço de Cirurgia Geral do CHCB, entre janeiro de 2001 e janeiro de 2003. Nenhum dos pacientes recebeu qualquer terapia neoadjuvante, tendo sido depois sujeitos a um follow-up pós-operatório de 10 anos. O estudo foi realizado em colaboração com o Laboratório de Anatomia Patológica do referido Hospital.

Os critérios de inclusão foram: diagnóstico de ACR submetido a ressecção cirúrgica tumoral com intenção curativa em doentes sem qualquer terapêutica neoadjuvante ou adjuvante; doentes com idade igual ou superior a 50 anos.

Não houve critérios de exclusão previamente definidos, exceto os que se contrapõem aos critérios de inclusão anteriormente referidos.

Os parâmetros clínico-histopatológicos avaliados incluíram: “género” e “idade” do paciente, “localização do tumor”, “grau de diferenciação histológica do tumor”, “classificação TMN”, “intensidade” e “percentagem” de células marcadas pela proteína Ki-67, e “prognóstico dos pacientes”.

### 2.1 Preparação e Determinação Imunohistoquímica

O material em estudo foi obtido através das peças cirúrgicas ressecadas durante o momento operatório, tendo sido posteriormente conservado numa solução de formaldeído a 10%, e enviado ao laboratório de Anatomia Patológica do CHCB, onde foi feita inicialmente uma descrição macroscópica da peça. De seguida foram colhidas amostras de aproximadamente 3 mm de espessura de diferentes localizações: zona da lesão, margem cirúrgica, zona de transição tecido normal-lesão e mucosa normal. Neste trabalho foram considerados exclusivamente os espécimes provenientes da lesão.

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

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

Todas as amostras foram então colocadas na estufa a 60°C para promover a adesão do corte à lâmina; esta secagem durou uma hora para as lâminas destinada à coloração com Hematoxilina-Eosina, e prolongou-se um dia inteiro para aquelas em que, posteriormente, foi realizada a imunomarcação para a proteína Ki-67.

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

Nas lâminas destinadas às técnicas de imunohistoquímica, depois da secagem em estufa, foi realizada a desparafinação com xilol e a hidratação com concentrações decrescentes de etanol; estas foram posteriormente colocadas numa panela de pressão durante 6 minutos com um tampão citrato de pH=6.0. De seguida, foram realizadas em cada amostra técnicas de marcação para a proteína Ki-67 através do processamento em máquina de imunohistoquímica, de acordo com o protocolo definido pelo CHCB, que inclui 79 passos (anexo 3).

Sendo a proteína Ki-67 um marcador apenas detetado nas células frescas em proliferação (isto é, células nas fases G1, S, G2 e M, e não em células na fase G0), a sua aplicação encontra-se restrita a tecido fresco, pois o epítipo não sobrevive à fixação histológica de rotina em formalina. Por este facto, a avaliação da expressão imunohistoquímica do marcador molecular Ki-67 foi realizada utilizando-se o anticorpo monoclonal dirigido ao antígeno Ki-67 humano, o MIB-1, obtido a partir do sobrenadante de culturas de células de rato (Dako Denmark, M7240), o qual reconhece a parte lábil do antígeno nuclear Ki-67 nas amostras de tecido embebidas em parafina e fixadas em formaldeído, não sendo a sua reatividade afetada, mesmo que haja um atraso na fixação. (16) O anticorpo foi empregue em concentrações de 1:300, em solução diluente (Dako Cytomation, ChemMate - Antibody Diluent, S.2022). Posteriormente, adicionou-se um anticorpo secundário; neste caso foram utilizadas imunoglobulinas biotiniladas de cabra anti-rato e anti-coelho (Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies). Foi depois obtido o bloqueio da peroxidase endógena pela aplicação da Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution (Dako Denmark, S.2023) e, de seguida, adicionou-se um complexo de estreptavidina peroxidase e diaminobenzidina (Dako REAL™ detection System, Peroxidase/DAB+, K.5001).

Todos os passos referidos anteriormente foram intercalados por uma lavagem com Buffer Kit (Dako Cytomation, ChemMate, Buffer Kit, K.5006). O resultado foi a obtenção de um complexo que, ao ligar-se ao antígeno específico do anticorpo primário, ativa o cromogénio (a diaminobenzidina) que confere uma cor acastanhada ao tecido onde o mesmo é expresso.

Finalmente foi realizada a coloração dos núcleos com Hematoxilina de Meyer, e feita a montagem das lâminas em meio sintético. O processo descrito foi executado paralelamente em lâminas de controlo constituídas por amostras de tecido amigdalino humano.

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

Relativamente à marcação imunohistoquímica, foi realizada uma classificação das lâminas segundo a “percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67” (0%, 25%, 50%, 75% ou 100%), estabelecendo-se um *cutoff*>0% para definir o resultado como positivo (Figuras 1, 2 e 3). Para a “intensidade” dessa mesma marcação considerou-se “-“, na ausência de qualquer marcação, e “+”, “++” e “+++”, para uma marcação cada vez mais intensa. O índice de marcação da proteína Ki-67 foi definido pela razão entre a percentagem de células tumorais coradas positivamente pelo anticorpo Ki-67 por cada 1000 células tumorais contadas a partir de áreas tumorais consecutivas, sendo a coloração nuclear o critério de positividade mais comumente utilizado. Tal proporção de células marcadas pela proteína Ki-67 facultou a medida de fração de crescimento dessa mesma população.

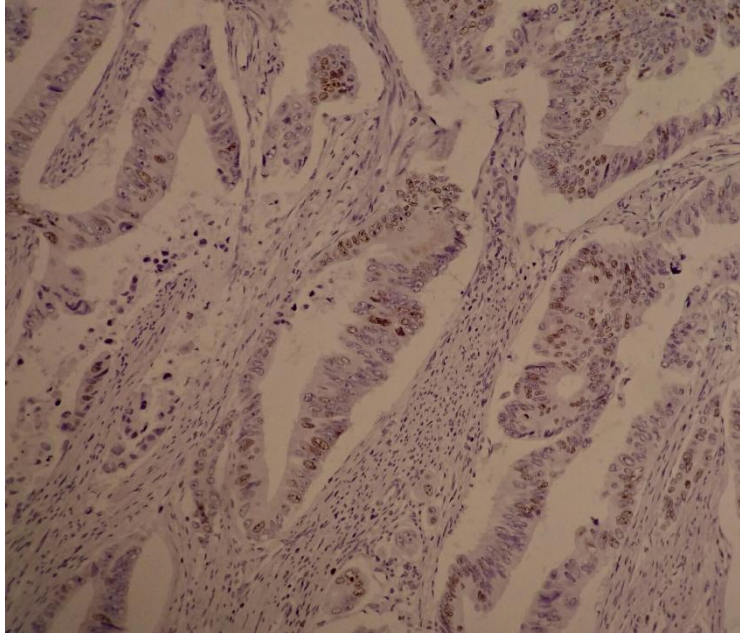


Figura 1 - Amostra de Adenocarcinoma Colorretal que apresenta uma percentagem de células marcadas pela proteína Ki-67 de 25% (x400).

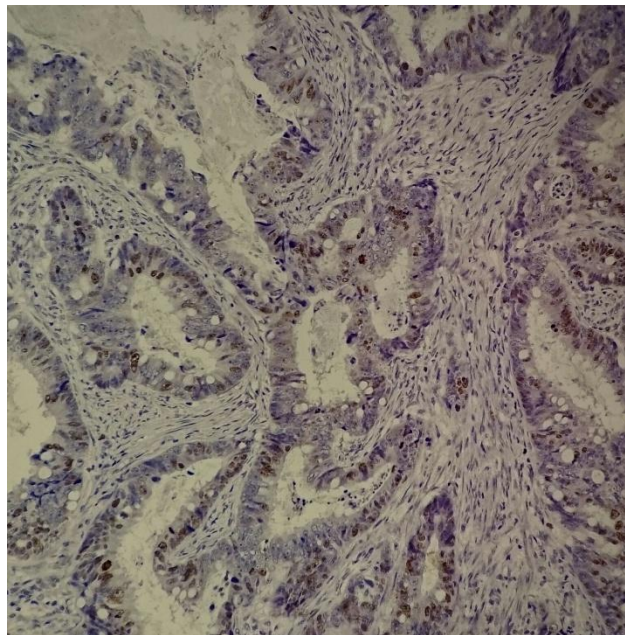


Figura 2 - Amostra de Adenocarcinoma Colorretal que apresenta uma percentagem de células marcadas pela proteína Ki-67 de 50% (x400).

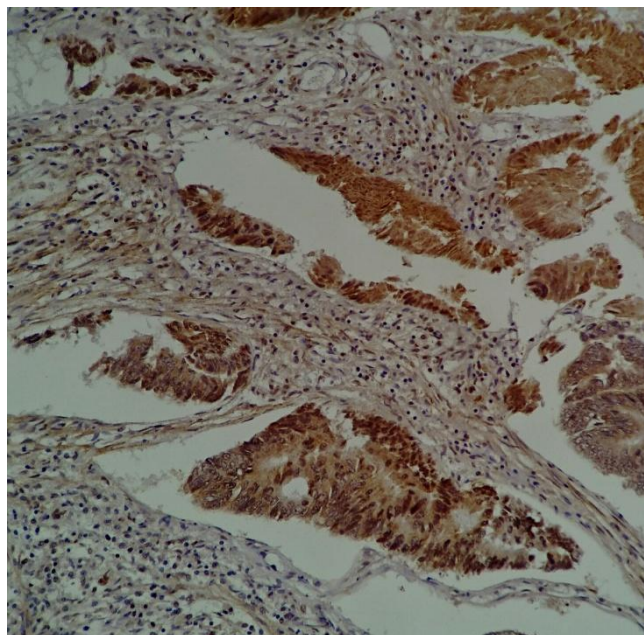


Figura 3 - Amostra de Adenocarcinoma Colorretal que apresenta uma percentagem de células marcadas pela proteína Ki-67 de 75% (x400).

## 2.2 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o Microsoft Office Excel 2007® e IBM SPSS 22.0®.

Foram realizados os testes  $\chi^2$  e de Cramer para averiguar a existência de correlação estatisticamente significativa entre os seguintes pares de variáveis:

- “percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67” com o “grau de diferenciação histológica do tumor”, “localização do tumor” e “prognóstico dos pacientes”.
- “intensidade de marcação imunohistoquímica pela proteína Ki-67” com o “grau de diferenciação histológica do tumor”, “localização do tumor” e “prognóstico dos pacientes”.

Foram calculados riscos e riscos relativos nos casos relevantes.

Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.



### 3. Resultados

Dos 35 pacientes incluídos neste estudo, 20 (57,1%) eram do género masculino e 15 (42,9%) do género feminino, numa relação M/F=1,3:1.

A maior percentagem de idades encontrava-se compreendida entre os 66 a 70 anos (42,9%) variando contudo, desde os 50, a mais de 70 anos (Gráfico 1).

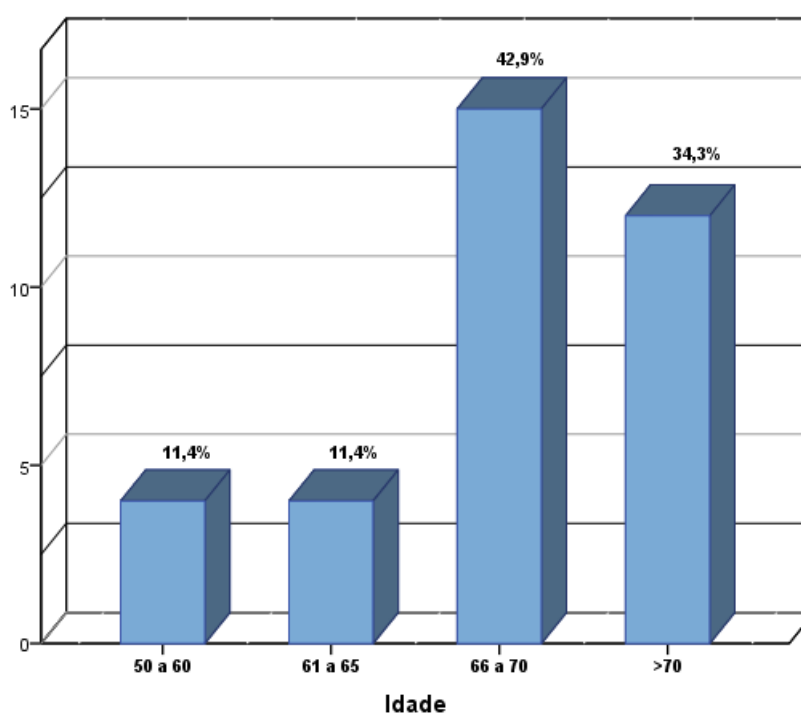


Gráfico 1 - Distribuição dos casos em estudo segundo a “idade” dos pacientes (N=35).

Relativamente à “localização do tumor” verificou-se um predomínio no lado esquerdo (definido como neoplasia localizada no CD, CS e R) com 32 casos (91,4%), em detrimento dos 3 (8,6%) casos localizados no lado direito (definido como neoplasia localizada no CA e CT) (Gráfico 2).

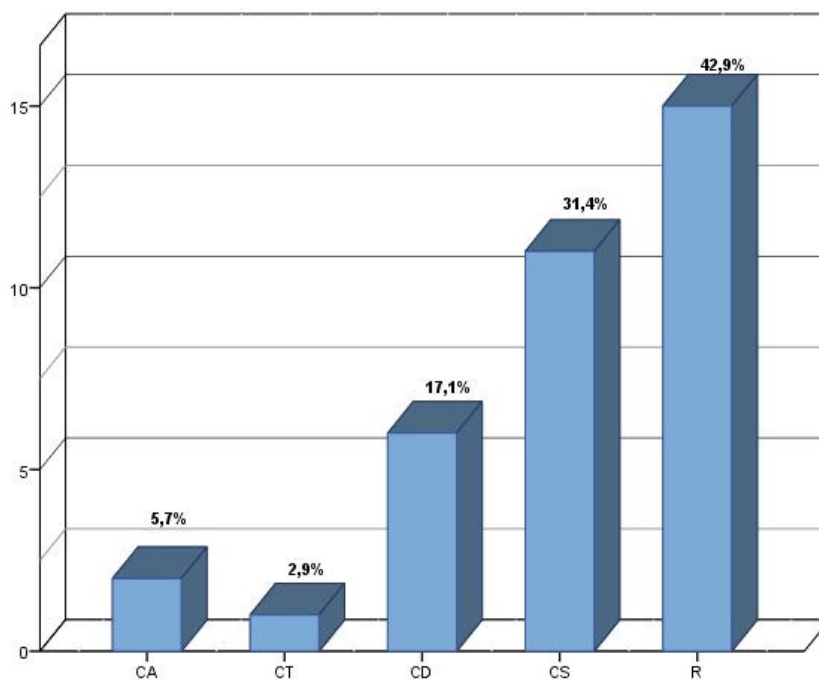


Gráfico 2 - Distribuição dos casos em estudo segundo a “localização do tumor” (N=35).

No que toca ao “grau de diferenciação histológica do tumor”, um total de 8 (22,9%) pacientes apresentaram APD, 19 (54,3%) AMD, e 8 (22,9%) ABD (Gráfico 3).

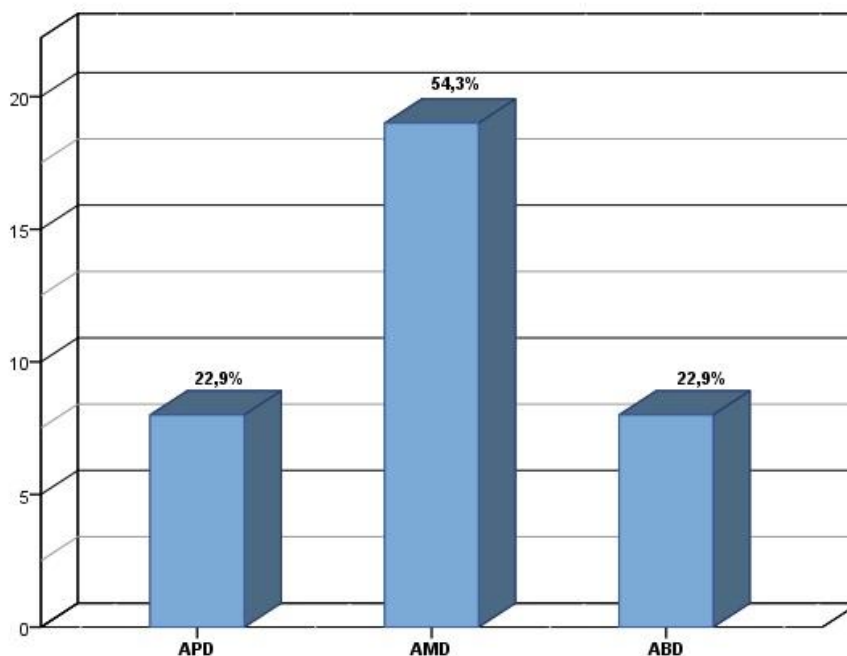


Gráfico 3 - Distribuição dos casos em estudo segundo o “grau de diferenciação histológica do tumor” (N=35).

---

Relativamente à “classificação TMN”, verificou-se que 29 (82,9%) casos se apresentaram como tumores T2M0N0 (Gráfico 4).

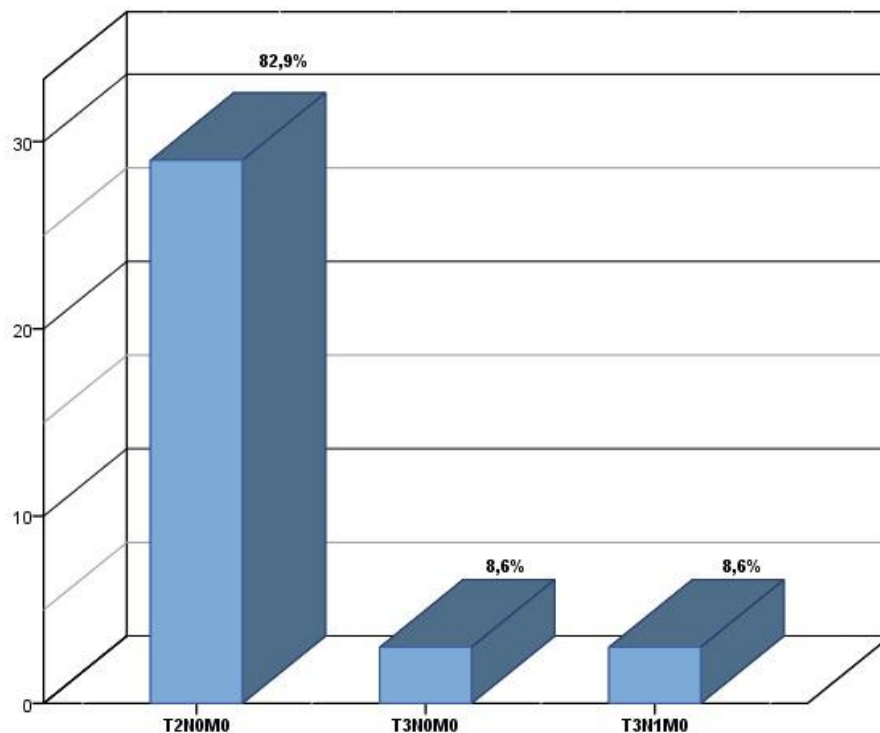


Gráfico 4 - Distribuição dos casos em estudo segundo a “classificação TMN” (N=35).

No que diz respeito à “intensidade de marcação imunohistoquímica pela proteína Ki-67”, observou-se que 13 (37,1%) tumores não exibiram qualquer marcação, tendo esta sido detetada em 22 (62,9%) casos (Gráfico 5).

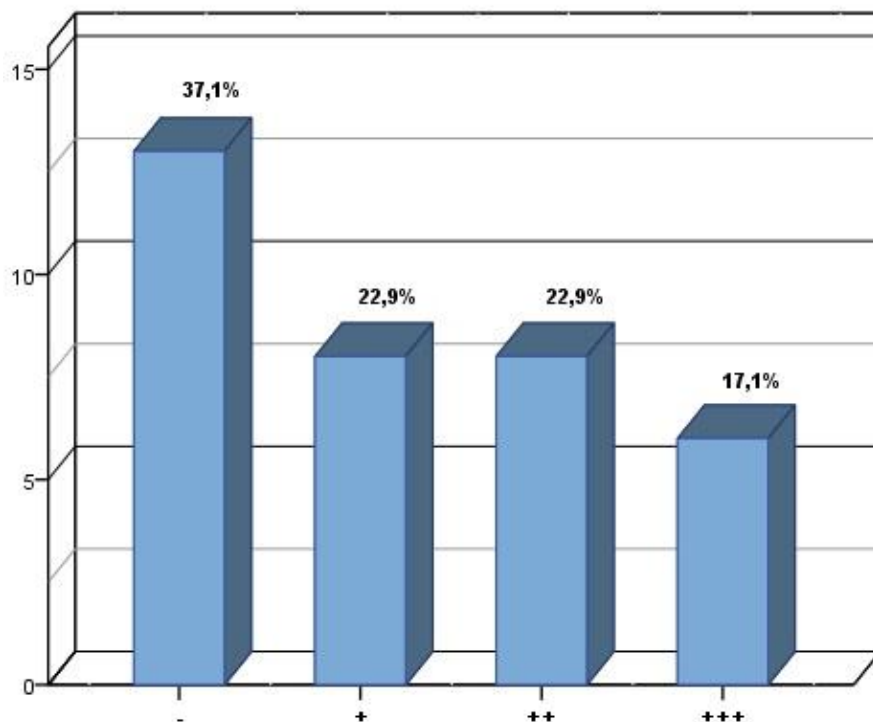


Gráfico 5 - Distribuição dos casos em estudo segundo a “intensidade de marcação imunohistoquímica pela proteína Ki-67” (N=35).

Relativamente à “percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67”, 13 (37,1%) dos pacientes não apresentaram qualquer percentagem de células marcadas pelo marcador Ki-67, e apenas 2 (5,7%) apresentaram marcação máxima, isto é, 100% (Gráfico 6).

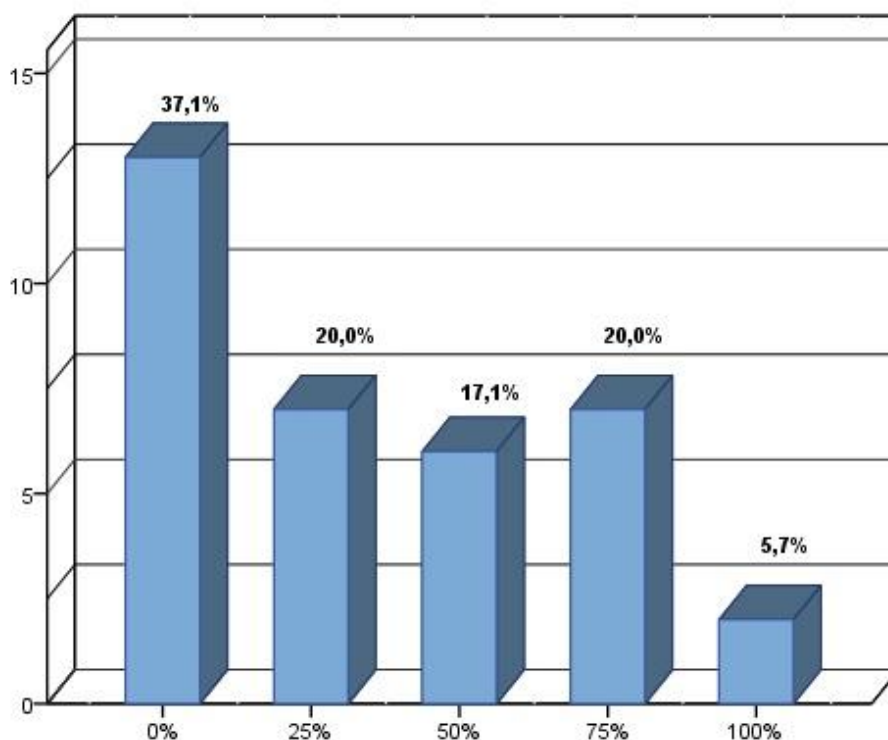


Gráfico 6 - Distribuição dos casos em estudo segundo a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67" (N=35).

Dos 35 doentes, 22 (62,9%) sobreviveram e 13 (37,1%) acabaram por falecer, durante o follow-up pós-operatório de 10 anos.

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

Tabela 1 - Distribuição dos casos em estudo segundo a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67" e o "grau de diferenciação histológica do tumor".

		GRAU DE DIFERENCIAÇÃO HISTOLÓGICA			TOTAL
		APD	AMD	ABD	
PERCENTAGEM DE CÉLULAS MARCADAS POR Ki-67	0%	2	8	3	13
	25%	2	2	3	7
	50%	1	4	1	6
	75%	3	3	1	7
	100%	0	2	0	2
TOTAL		8	19	8	35

Tabela 2 - Distribuição dos casos em estudo segundo a “percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67” e a “localização do tumor”.

		LOCALIZAÇÃO DO TUMOR					TOTAL
		CA	CT	CD	CS	R	
PERCENTAGEM DE CÉLULAS MARCADAS POR Ki-67	0%	0	1	4	6	2	13
	25%	0	0	0	2	5	7
	50%	1	0	0	1	4	6
	75%	1	0	2	1	3	7
	100%	0	0	0	1	1	2
TOTAL		2	1	6	11	15	35

Tabela 3 - Distribuição dos casos em estudo segundo a “intensidade de marcação imunohistoquímica pela proteína Ki-67” e a “localização do tumor”.

		INTENSIDADE DE MARCAÇÃO POR Ki-67				TOTAL
		-	+	++	+++	
LOCALIZAÇÃO DO TUMOR	CA	0	0	1	1	2
	CT	1	0	0	0	1
	CD	4	0	2	0	6
	CS	6	2	1	2	11
	R	2	6	4	3	15
TOTAL		13	8	8	6	35

Tabela 4 - Distribuição dos casos em estudo segundo a “intensidade de marcação imunohistoquímica pela proteína Ki-67” e o “grau de diferenciação histológica do tumor”.

		INTENSIDADE DE MARCAÇÃO POR Ki-67				TOTAL
		-	+	++	+++	
GRAU DE DIFERENCIAÇÃO HISTOLÓGICA	APD	2	2	1	3	8
	AMD	8	3	5	3	19
	ABD	3	3	2	0	8
TOTAL		13	8	8	6	35

Observa-se que a distribuição de casos pelos diferentes grupos é heterogénea, parecendo não existir relação entre a presença do marcador em estudo (proteína Ki-67) e qualquer uma das características de interesse.

Ao analisar estatisticamente, com os testes  $\chi^2$  e de Cramer, a “percentagem” e a “intensidade” de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67 com o “grau de diferenciação histológica do tumor” não foram observadas quaisquer correlações estatisticamente significativas entre estas variáveis, tendo-se alcançado os valores de  $p=0,614$  e  $p=0,488$ , respetivamente. De salientar, ainda, que dos resultados obtidos, dois dos pacientes com APD não revelaram qualquer “percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67”, assim como nenhum dos APD apresentou “percentagem” máxima, isto é, 100%, contrariamente aos AMD, nos quais a “percentagem” máxima foi detetada em dois casos, verificando-se a sua ausência em oito dos dezanove casos (Tabela 1). Além disso, em nenhum dos casos de ABD se verificou expressão máxima de marcação pela proteína Ki-67, isto é, “percentagem” e “intensidade” máximas (Tabelas 1 e 4).

Também não se verificaram correlações estatisticamente significativas entre a “percentagem” e a “intensidade” de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67 relativamente à “localização” dos ACR, tendo-se obtido os valores de  $p=0,434$  e  $p=0,231$ , respetivamente. Referente ainda à relação entre estes pares de variáveis “percentagem” e “intensidade” de marcação imunohistoquímica pela proteína Ki-67 com a “localização do tumor” observou-se que todos os casos, à exceção de um, apresentaram expressão máxima do marcador Ki-67 apenas quando o tumor se localizava no CS ou R (Tabelas 2 e 3).

Não foi também evidenciada qualquer associação estatisticamente significativa entre a “percentagem” e a “intensidade” de células marcadas imunohistoquimicamente pelo marcador Ki-67 no que diz respeito à “idade” e “género” dos pacientes.

Foi obtido um valor de  $p<0,000$  quando se correlacionou a “percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67” com a “intensidade” dessa mesma marcação, verificando-se que a uma maior percentagem de células marcadas por Ki-67 correspondia uma maior intensidade da respetiva marcação imunohistoquímica (Tabela 5).

Tabela 5 - Relação entre a “percentagem” e “intensidade” de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67.

		INTENSIDADE DE MARCAÇÃO POR Ki-67				TOTAL
		-	+	++	+++	
PERCENTAGEM DE CÉLULAS MARCADAS POR Ki-67	0%	100,0%	—	—	—	100,0%
	25%	—	85,7%	14,3%	—	100,0%
	50%	—	33,3%	66,7%	—	100,0%
	75%	—	—	42,9%	57,1%	100,0%
	100%	—	—	—	100,0%	100,0%

Um outro resultado estatisticamente significativo foi encontrado entre a “percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67” e o “prognóstico dos pacientes” após o follow-up pós-operatório de 10 anos (tendo-se obtido um valor de  $p=0,002$ ), isto é, a uma maior percentagem de células marcadas pela proteína Ki-67 corresponde uma maior mortalidade, verificando-se também o inverso, ou seja, para uma menor percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente por Ki-67, maior será o número de pessoas com vida (Tabela 6).

Assim, o risco de morrer quando a percentagem de células marcadas pela proteína Ki-67 é de “0%”, “25%”, “50%”, “75%” ou “100%” é, respetivamente 7,7%, 14,3%, 50%, 85,7% e 100%. Desta forma, o risco relativo quando estão presentes as percentagens “25%”, “50%”, “75%” e “100%” relativamente à percentagem “0%” é de 1,9; 6,5; 11,1 e 13,0 respetivamente. Assim, a probabilidade de morrer quando a “percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente por Ki-67” é “25%”, “50%”, “75%” e “100%” é respetivamente de 1,9; 6,5; 11,1 ou 13,0 vezes maior do que com “0%” (Tabela 6).

Tabela 6 - Correlação entre a “percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67” e o “prognóstico dos pacientes” após um follow-up pós-cirúrgico de 10 anos ( $p=0,002$ ) e respetivos riscos relativos.

		PROGNÓSTICO		TOTAL	RISCO RELATIVO	
		Morto	Vivo			
PERCENTAGEM DE CÉLULAS MARCADAS POR KI-67	0%	N	1	12	13	1
		%	7,7%	92,3%	100%	
	25%	N	1	6	7	1,9
		%	14,3%	85,7%	100%	
	50%	N	3	3	6	6,5
		%	50,0%	50,0%	100%	
	75%	N	6	1	7	11,1
		%	85,7%	14,3%	100%	
	100%	N	2	0	2	13,0
		%	100%	0%	100%	
	TOTAL	N	13	22	35	
		%	37,1%	62,9%	100%	

No que se refere à relação entre a “intensidade de marcação imunohistoquímica pela proteína Ki-67” e o “prognóstico dos doentes” foi também encontrado um resultado significativamente estatístico ( $p=0,005$ ), revelando que quanto maior a intensidade de marcação imunohistoquímica pelo marcador Ki-67, pior será o prognóstico, visto o número de mortes aumentar. O inverso também é observado, uma vez que para uma menor intensidade de marcação imunohistoquímica, maior é o número de doentes com vida (Tabela 7).

O risco de morrer quando a “intensidade de marcação imunohistoquímica pela proteína Ki-67” é “-”, “+”, “++” ou “+++” é, respetivamente 7,7%, 25%, 62,5% e 83,3%, sendo o risco relativo das intensidades “+”, “++” e “+++” relativamente à intensidade “-” de 3,2; 8,2 e 10,8, respetivamente. Assim, a probabilidade de morrer com “+”, “++” e “+++” é respetivamente 3,2; 8,1 ou 10,8 vezes maior do que com “-” (Tabela 7).

Tabela 7 - Correlação entre a “intensidade de marcação imunohistoquímica pela proteína Ki-67” e o “prognóstico dos pacientes” após um follow-up pós-cirúrgico de 10 anos ( $p=0,005$ ) e respetivos riscos relativos.

		PROGNÓSTICO		TOTAL	RISCO RELATIVO		
		Morto	Vivo				
INTENSIDADE DE MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA POR KI-67	-	N	1	12	13	1	
		%	7,7%	92,3%	100%		
	+	N	2	6	8	3,2	
		%	25%	75%	100%		
	++	N	5	3	8	8,1	
		%	62,5%	37,5%	100%		
	+++	N	5	1	6	10,8	
		%	83,3%	16,7%	100%		
	TOTAL		N	13	22	35	
			%	37,1%	62,9%	100%	

Ainda neste estudo, mesmo para uma ausência de “percentagem” e “intensidade” de células marcadas pelo marcador Ki-67, registou-se a perda de uma vida (Tabelas 6 e 7). Contudo, para uma “percentagem” de marcação imunohistoquímica de 100% não se observou qualquer caso com vida (Tabela 6), enquanto que para intensidades de “++” e “+++” se observaram sobreviventes (Tabela 7).

De forma sucinta, de acordo com os resultados obtidos, uma maior “expressão de marcação imunohistoquímica pela proteína Ki-67” encontra-se associada a um pior prognóstico, isto é, a morte.

## 4. Discussão

Embora as decisões terapêuticas relativas ao tratamento do ACR se debrucem sobre prognósticos apoiados nas características anatomo-histopatológicas deste tumor, nos últimos anos têm sido dirigidos grandes esforços na tentativa de criar sistemas de estadiamento baseados na biologia molecular, que sejam mais personalizados e mais exatos na previsão do prognóstico de cada doente oncológico. Para o alcançar é necessário conhecer quais os marcadores moleculares que são influenciados pelo comportamento dos tumores, bem como o papel de cada um, quer na evolução da doença, como também na resposta às terapêuticas disponíveis. (7)

Neste contexto enquadra-se a presente investigação, que enfoca o seu estudo sobre o valor prognóstico da proteína Ki-67, a qual se sabe estar associada ao ciclo e multiplicação celular. Embora este marcador de proliferação celular seja reconhecido como um factor de prognóstico independente no cancro da próstata, da mama, entre outros, o seu real valor prognóstico no ACR permanece controverso. (21)

Da amostra presente neste trabalho, observou-se que a maioria dos pacientes era do “género” masculino (57,1%), e possuíam mais de 65 anos (77,2%), o que se encontra de acordo com as estatísticas mundiais, que indicam uma maior proporção de homens com este tipo de neoplasia relativamente ao género feminino. (22) Neste estudo em concreto encontrou-se uma proporção de 1,3:1, semelhante à da maioria das investigações que indicam também uma ligeira predominância masculina de 1,4:1. (22)

Também é do conhecimento geral que a incidência desta neoplasia aumenta com a idade, (5) ocorrendo em cerca de 90% dos casos depois dos 50 anos e, em 80% acima dos 65 anos de idade. (22) Facto este também evidenciado pela amostra apresentada, na qual grande parte dos indivíduos possuía mais de 65 anos (77,2%).

Relativamente à “localização do tumor”, a maioria destes situavam-se no CS (31,4%) e R (42,9%), dados mais uma vez concordantes com o descrito na literatura atual. (5,23) O estudo da localização tumoral mostra-se relevante uma vez que é conhecida a existência de diferenças nas características genéticas e anatomopatológicas dos tumores originados de diferentes zonas do colon, com conseqüente influência na evolução e resposta às diferentes modalidades de tratamento e prognóstico. (19)

Quanto à distribuição por “grau de diferenciação histológica do tumor”, a maior parte das amostras obtidas foram classificadas em AMD (54,3%). Salienta-se que a distribuição por grau de diferenciação histológica tumoral nem sempre é de fácil comparação com outros estudos

pois, apesar de existirem sistemas universais de classificação, grande parte deste processo depende do observador, fazendo com que a categorização de muitos dos casos seja subjetiva e dependente de critérios relacionados com a experiência de quem o realiza.

Referente à “expressão imunohistoquímica do marcador Ki-67”, esta foi identificada em 22 (62,9%) pacientes, encontrando-se ausente em 13 (37,1%).

De salientar ainda que a mortalidade após o follow-up pós-operatório de 10 anos para este grupo de doentes rondou os 37,1%, percentagem não negligenciável.

Relativamente às hipóteses a testar referidas inicialmente verificou-se que:

- “Percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67” apresentou valor estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) quando relacionada com o “prognóstico dos pacientes”, isto é, se o paciente se encontra vivo ou morto após o follow-up pós-cirúrgico de 10 anos (Gráfico 7).

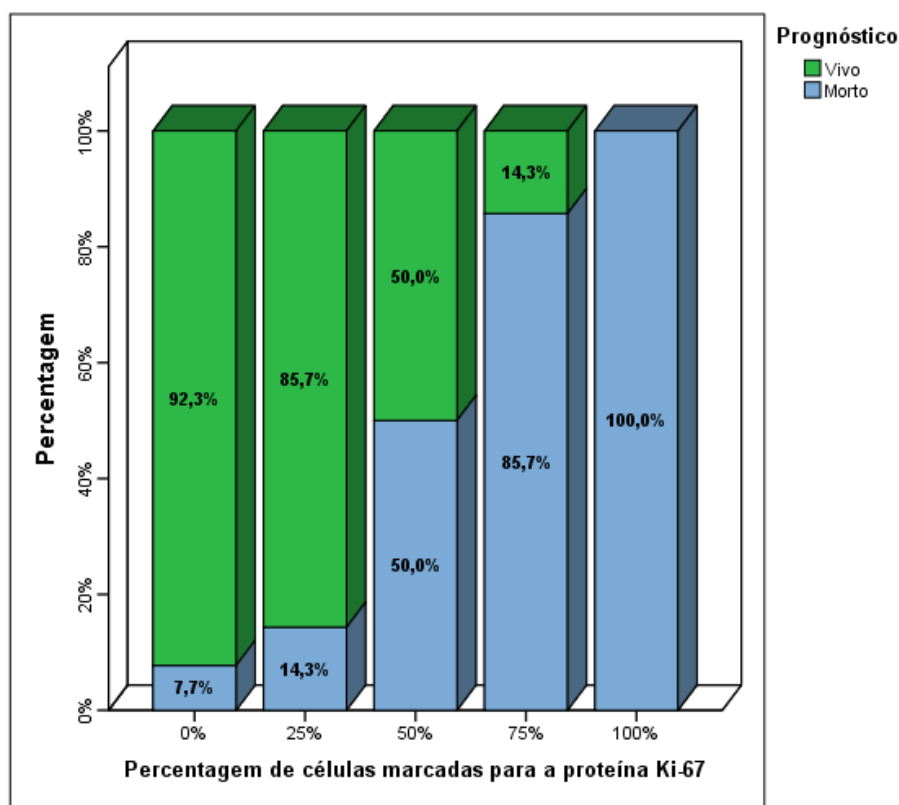


Gráfico 7 - Relação entre a “percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67” e o “prognóstico dos pacientes”.

Resultado semelhante foi obtido entre a “intensidade de marcação imunohistoquímica pela proteína Ki-67”, quando correlacionada com o “prognóstico dos pacientes” ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 8).

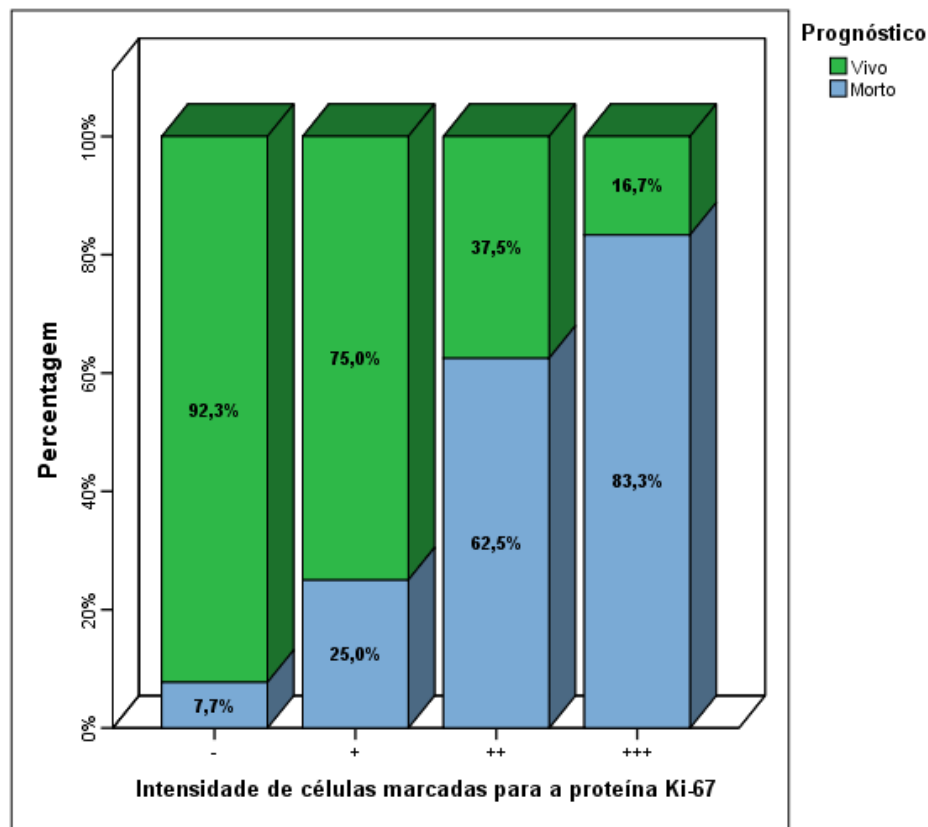


Gráfico 8 - Relação entre a “intensidade de marcação imunohistoquímica pela proteína Ki-67” e o “prognóstico dos pacientes”.

Os estudos de Chen *et al.* (21) e Z.He *et al.* (24) corroboram os resultados aqui obtidos, ou seja, de que o aumento da expressão do marcador Ki-67 se encontra associado a um pior prognóstico em pacientes com ACR. Kimura *et al.* (19) e Chrisoula D. Scopa *et al.* (25) defendem também que níveis mais elevados da expressão da proteína Ki-67 se encontram associados a mau prognóstico em doentes com este tipo de tumor. Contudo, Allegra *et al.* (26) contrapõe tais descobertas ao afirmar que expressões mais marcadas da proteína Ki-67 ditam um melhor prognóstico, (26) assim como Palmqvist *et al.* (19) que concluiu que baixos níveis desta proteína se associavam a pior prognóstico. Um outro estudo, o de Mogoanta *et al.* (5) revelou, porém, que a expressão desta proteína não apresenta qualquer relação com a sobrevivência do paciente, isto é, não a influencia e, por conseguinte, não pode ser considerada como factor de prognóstico.

Já no que diz respeito à relação entre a “expressão imunohistoquímica da proteína Ki-67” e o “grau de diferenciação histológica” dos ACR, este estudo não apresentou resultados estatisticamente significativos, o que se encontra de acordo com Ribeiro Jr. *et al.* (11)

Contudo, Saleh *et al.* (11) e Z. He *et al.* (24) mostraram que a expressão do marcador Ki-67 apresentava correlação estatisticamente significativa com tumores pouco diferenciados, isto é, quanto menor era a diferenciação tumoral, maior era a expressão do marcador Ki-67, ao contrário do apresentado por Uzma Nabi *et al.*, (8) o qual evidenciou que a atividade proliferativa tumoral exibida pela proteína Ki-67 era menor em ACR com menor grau de diferenciação.

Os resultados obtidos nesta investigação também não permitiram concluir a existência de uma relação estatisticamente significativa entre a “expressão imunohistoquímica da proteína Ki-67” e a “localização do tumor”. Tal facto está de acordo com o estudo de L. Vasile *et al.*, (27) que também apontou não haver qualquer correlação significativamente estatística entre a “expressão imunohistoquímica da proteína Ki-67” e o “grau de diferenciação histológica do tumor”.

Como se observa, os resultados de investigações semelhantes a esta têm-se mostrado muito heterogéneos e, no geral, inconclusivos no que concerne à influência do marcador Ki-67 na patogénese do ACR. A única informação bem assente e aceite em toda a literatura científica atual é a de que este é um bom estimador da atividade proliferativa tumoral, apesar de não se saber se, e de que maneira, se relaciona com o desenvolvimento do tipo de carcinoma ou com outras características, como a resposta a fármacos ou o prognóstico.

Uma grande maioria das investigações referenciadas anteriormente está de acordo com o observado neste estudo relativamente ao facto de não ser evidente uma correlação entre a “percentagem” e “intensidade” de células marcadas imunohistoquimicamente pela proteína Ki-67 em amostras de ACR, com a “localização” ou o “grau de diferenciação histológica do tumor”. E, embora os resultados obtidos não apresentem valor estatisticamente significativo, de forma geral, a tendência mostra que quanto menos diferenciado o grau histológico do tumor, maior será a expressão da marcação imunohistoquímica pelo marcador Ki-67, existindo contudo casos que distorcem tal realidade (Tabelas 1 e 4), facto também mostrado na literatura disponível como já foi referido. Desta forma, talvez se possa inferir que, apesar de muitos dos AMD se apresentarem negativos pelo marcador Ki-67, quando apresentam positividade esta ocorre com maior intensidade e percentagem de células marcadas pela proteína Ki-67, comparativamente aos ABD.

O Ki-67, apesar de não permitir determinar a taxa de proliferação celular, constitui um marcador de proliferação celular, indicando a fração de crescimento, ou seja, o potencial de divisão celular a que um grupo específico de células está sujeito num determinado momento.

## 4.1 Limitações

Na maioria dos casos, estudos que envolvam marcadores biológicos, com o intuito de perceber a sua relação com o prognóstico de pacientes com CCR, geram resultados inconclusivos. (11) Não sendo exceção, este trabalho revela também o papel controverso do marcador Ki-67 no mundo da investigação do ACR.

Na presente investigação, embora os resultados obtidos estejam concordantes com grande parte da literatura descrita para o tema, não se pode afirmar que seja um estudo representativo da população geral devido, não só à pequena dimensão da amostra disponível (N=35), assim como à distribuição desigual dos casos pelos diferentes grupos, havendo maior representação de alguns em detrimento de outros (por exemplo localização colon esquerdo vs. localização colon direito). Por este motivo, talvez fosse importante a realização de um estudo idêntico com um maior número de pacientes.

Populações não homogêneas, diferentes protocolos de tratamento, bem como factores que dizem respeito à aplicação da técnica imunohistoquímica, à avaliação subjetiva dos resultados e a variações de análises estatísticas, são alguns dos pontos que também poderão contribuir para obtenção de resultados divergentes. (11)

Uma outra limitação, não menos relevante, foi o facto de não se ter avaliado a possível existência de uma relação entre a expressão do marcador Ki-67 e outras características clinico-histopatológicas de pacientes oncológicos, nomeadamente tamanho do tumor, resposta às diferentes terapêuticas, metastização, recorrência do tumor, todos vistos como os resultados finais de maior interesse no tratamento e, conseqüentemente, prognóstico destes doentes.

Além disso, muitas vezes este tipo de estudos possui uma quantidade limitada de amostras de tecido que podem, juntamente com a variação na expressão do marcador, ser demasiado pequenas para detetar diferenças de prognóstico, o que limita, naturalmente, os resultados. (7)

Outra questão prende-se com o facto de que a utilização de marcadores de proliferação celular, como a expressão da proteína Ki-67 avaliada por métodos imunohistoquímicos, implica algumas restrições no que diz respeito à avaliação da taxa de proliferação pois, ao fornecer informação sobre a fração de crescimento tumoral, está a descrever apenas o número de células em ciclo celular ativo, não tendo em conta o tempo necessário para que o ciclo celular se complete proporcionando, portanto, informação acerca de um estado de proliferação, e não sobre a taxa de proliferação.

Outra causa de incongruência de resultados a ter em conta é a heterogeneidade da expressão do marcador molecular Ki-67 nos ACR (19) e a existência de células não tumorais que poderão estar incluídas no estroma tumoral.

## 4.2 Implicações

A relação entre a proliferação tumoral averiguada pelo marcador Ki-67 e o resultado obtido com outros possíveis indicadores de prognóstico, como a expressão das proteínas p53 ou bcl-2, entre outras, não estão integradas no âmbito deste trabalho, mas são de extrema relevância.

Num estudo de Moreno *et al.* (28) realizado em AMD de classificação T3N0M0 verificou-se que estes tumores eram positivos, na sua maioria (74,0%), para o marcador molecular Ki-67, embora não existisse uma marcada hiperexpressão da proteína p53. Estes resultados vêm destacar a importância de estabelecer relações entre a expressão do marcador Ki-67 e outros possíveis indicadores de prognóstico, o que tem sido alvo de vários estudos.

Assim, o interesse desta investigação e de outras semelhantes prende-se com a importância de encontrar um conjunto de indicadores de prognóstico que prevejam, o mais fielmente possível, a evolução clínica, permitindo a criação de uma ferramenta que auxilie os clínicos na escolha da opção terapêutica mais adequada para determinado doente.

## 5. Conclusão

Numerosos estudos clínicos e epidemiológicos têm apontado que o CCR se tornou, nos últimos anos, um problema médico e social a nível mundial, encontrando-se a sua incidência a aumentar. Ocorre sobretudo numa população com mais de 50 anos, em proporções quase equivalentes para ambos os géneros.

Sabe-se hoje que o seu processo de carcinogénese é complexo e envolve várias alterações nas vias de controlo da proliferação celular, da apoptose, da capacidade de invasão e metastização.

Embora as técnicas de imagiologia médica, genética e bioquímica tenham dado um contributo significativo no diagnóstico precoce deste tumor, é a investigação assente na biologia molecular que tem vindo a revolucionar as expectativas de que a sua melhor compreensão possa aperfeiçoar o nosso conhecimento acerca da etiologia e, conseqüentemente, do seu tratamento. Estudos recentes têm comprovado que as características moleculares dos ACR se encontram associadas ao prognóstico e à resposta à terapêutica.

O Ki-67 é um marcador de proliferação celular e a determinação da sua correlação com o “grau de diferenciação histológica” e “localização” dos ACR tem-se mostrado, na maior parte dos estudos, não estatisticamente significativa, levando a pensar que tal relação não é passível de ser estabelecida. Esta investigação veio reforçar os resultados até agora obtidos, de que a hipótese de correlação entre o “grau de diferenciação histológica” e “localização” tumoral relativamente à proliferação celular, determinada pela proteína Ki-67, não levou a resultados conclusivos.

Contudo, o resultado significativamente estatístico alcançado no que concerne à “expressão da marcação imunohistoquímica” por esta proteína com o “prognóstico dos pacientes”, veio corroborar o que outros estudos, anteriormente referidos, têm vindo a comprovar, que este marcador pode ter efetivamente valor prognóstico.

No entanto, a possibilidade de um marcador tumoral poder contribuir individualmente para a avaliação prognóstica do ACR ainda é remota, considerando o conhecimento atual disponível sobre a carcinogénese deste tumor.

Não deixa, porém, de ser importante salientar que a integração da expressão imunohistoquímica da proteína Ki-67 associada a outros indicadores de prognóstico possibilitará, por certo, a criação de uma ferramenta que auxilie os clínicos na escolha da opção terapêutica mais adequada a determinado doente, visto que o estadiamento do tumor continua ainda a ser o principal factor determinante na sobrevivência desses pacientes. (11)



## 6. Referências Bibliográficas

- 1) Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2012 v1.1 Cancer Incidence and Mortality Worldwide. [Internet]. 2012 [citado em 2015 Nov 29]. Disponível na Internet: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx).
- 2) World Cancer Research Fund International. [Internet]. 2012 [citado em 2015 Nov 29]. Disponível na Internet: <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/colorectal-cancer-statistics#BOTH>.
- 3) Marlies S. Reimers, Eliane C.M. Zeestraten, Peter J.K. Kuppen, Gerrit Jan Liefers, Cornelis J.H. van de Velde. Biomarkers in precision therapy in colorectal cancer. *Gastroenterology Report* 1. 2013; 166-183.
- 4) Marssoni Deconto Rossoni. Factores prognósticos e recidiva neoplásica em pacientes com adenocarcinoma colorretal estágio I e II (TNM), submetidos a tratamento cirúrgico com intenção curativa: o papel do fenômeno brotamento tumoral avaliado por dois métodos histológicos diferentes. [Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica] Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.
- 5) Stelian Ștefăniță Mogoantă, Ion Vasile, Bogdan Totolici, Carmen Neamțu, Liliana Streba, Cristina Jana Busuioc, Garofița Olivia Mateescu. Colorectal cancer - clinical and morphological aspects, *Rom J Morphol Embryol* 2014; 55(1):103-110.
- 6) R. Bendardaf, H. Lamlum, S. Pyrhonen. Prognostic and Predictive Molecular Markers in Colorectal Carcinoma. *Anticancer Research*. 2004; 24: 2519-2530.
- 7) P Qu, H Chu, JG Ibrahim, J Peacock, XJ Shen, J Tepper, RS Sandler, TO Keku. Statistical strategies to improve the efficiency of molecular studies of colorectal cancer prognosis. *British Journal of Cancer*. 2008; 99: 2001 - 2005.
- 8) Nabi U, Nagi AH, Sami W. KI-67 Proliferating Index and histological grade, type and stage of colorectal carcinoma. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2008; 20(4) 44-8.

- 9) Nussrat, F. L., Hussam Hasson Ali, Haider Ghazi Hussein, Raghad Jawad Al-Ukashi. Immunohistochemical Expression of ki-67 and p53 in Colorectal Adenomas: A Clinicopathological Study. *Oman Med J.* 2011; 26(4): 229-234.
- 10) Tadashi Terada. An immunohistochemical study of primary signet-ring cell carcinoma of the stomach and colorectum: III. Expressions of EMA, CEA, CA19-9, CDX-2, p53, Ki-67 antigen, TTF-1, vimentin, and p63 in normal mucosa and in 42 cases. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013; 6(4):630-638.
- 11) Hinaldo Lima de Menezes, Mário Jorge Jucá, Edmundo Guilherme de A. Gomes, Benício L. Bulhões B. P. Nunes, Henrique Oliveira Costa, Delcio Matos. Analysis of the immunohistochemical expressions of p53, bcl-2 and Ki-67 in colorectal adenocarcinoma and their correlations with the prognostic factors. *Arq Gastroenterol.* 2010; 47:141-47.
- 12) Di Vizio D, Demichelis F, Simonetti S, Pettinato G, Terracciano L, Tornillo L, Freeman MR, Insabato L. Skp2 expression is associated with high risk and elevated Ki67 expression in gas-trointestinal stromal tumours. *BMC Cancer* 2008; 8: 134.
- 13) Miao-Xia Lin, Zhuo-Fu Wen, Zhi-Ying Feng, Dan He. Expression and significance of bmi-1 and ki67 in colorectal carcinoma tissues. 2008 Dec; 27(12):1321-6.
- 14) David E. MacCallum, Peter A. Hall. The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKi67. *J Pathol* 2000; 191: 286-298.
- 15) Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology.* 2000 Mar; 182(3):311-322.
- 16) Ustymowicz GK, Poczynicz A, Kemon A, Czyzewska J. Correlation between proliferation markers PCNA, Ki-67, MCM-2 and antiapoptotic protein Bcl-2 in colorectal cancer. *Anticancer research.* 2009; 29:3049-52.
- 17) Annelies Debucquoya, Louis Libbrechtb, Valerie Roobrouckc, Laurence Goethalsd, William McBridee, Karin Haustermansa. Morphological features and molecular markers in rectal cancer from 95 patients included in the European Organization for Research and Treatment of Cancer 22921 trial: Prognostic value and effects of preoperative radio (chemo) therapy. *Eur J Cancer.* 2008 April; 44(6): 791-797.

- 18) Holt PR, Moss SF, Kapetanakis AM, Petrotos A, Wang S. Is Ki-67 a better proliferative marker in the colon than proliferating cell nuclear antigen? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997 Feb; 6(2):131-5.
- 19) Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology.* 2002; 40:2-11.
- 20) Fluge Ø, Gravdal K, Carlsen E et al. Expression of EZH2 and Ki-67 in colorectal cancer and associations with treatment response and prognosis. *Br J Cancer.* 2009; 101:1282-89.
- 21) Il Yong Shin, Na Young Sung, Youn Soo Lee, Taek Soo Kwon, Yoon Si, Yoon Suk Lee, Seong Taek Oh , In Kyu Lee. 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 and Liver, Vol. 8, No. 1, 2014 January; pp. 13-23.*
- 22) Mikov MM, Dugandžija T, Štabuc B, Muzikravić L. Colorectal cancer: current data on epidemiology, screening and follow-up. *Archive of oncology.* 2010 Sep; 18(1):11-12.
- 23) Annelies Debucquoy, Laurence Goethals, Louis Libbrecht, Christiaan Perneel, Karel Geboes, Nadine Ectors, William H. McBride, Karin Haustermans. Molecular and clinic-pathological markers in rectal cancer: a tissue micro-array study. *Int J Colorectal Dis.* 2009; 24(2): 129-138.
- 24) Zhenyu He, Chuanbing Shi, Hao Wen, Fanglong Li, Baolin Wang, Jie Wang, The potential of carcinoembryonic antigen, p53, Ki-67 and glutathion Stransferase-π as clinic-histopathological markers for colorectal cancer. *Journal of Biomedical Research.* 2010; 24(1):51-57.
- 25) Chrisoula D. Scopa, MD, Athanassios C. Tsamandas, MD, Vicky Zolota, MD, Haralabos P. Kalofonos, MD, Anna Batistatou, MD, PhD, Constantine Vagianos, MD. Potential Role of bcl-2 and Ki-67 Expression and Apoptosis in Colorectal Carcinoma. A Clinicopathologic Study. *Digestive Diseases and Sciences.* 2003 October; Vol. 48, No. 10 pp. 1990-1997.
- 26) Carmen J. Allegra, Soon Paik, Linda H. Colangelo, Allyson L. Parr, Ilan Kirsch, George Kim, Pamela Klein, Patrick G. Johnston, Norman Wolmark, H. Samuel Wieand. Prognostic Value of Thymidylate Synthase, Ki-67 and p53 in Patients With Dukes' B and C Colon Cancer: A

National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2003, January 15; Vol 21, No 2: pp 241-250.

27) L Vasile, A. Olaru, M. Munteanu, I. E. Pleşea, V. Şurlin, C Tudoraşcu. Prognosis of colorectal cancer: clinical, pathological and therapeutic correlation. *Rom J Morphol Embryol*. 2012; 53(2):383-391.

28) Moreno JM, Agostinho C, Merino T, Faria MC. Estudio de correlación de p-53 y Ki-67 en 32 casos de tumores colorectales: Análisis de resultados. Ed: X. Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica; 2009.

## 7. Anexos

Anexo I - Fases do processo de desidratação e inclusão em parafina segundo o protocolo do CHCB.

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

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

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

Anexo III - Protocolo de funcionamento da máquina de imunohistoquímica utilizada no CHCB.

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

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