

Expressão imunohistoquímica da proteína p53 no adenocarcinoma colorretal e a sua correlação com o grau de diferenciação histológico, localização e prognóstico

Diana Filipa Ferreira Lopes

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

Orientador: Professor Doutor Javier Muñoz Moreno

Maio de 2020

Expressão imunohistoquímica da proteína p53 no adenocarcinoma colorretal e a sua correlação com o grau de diferenciação histológico, localização e prognóstico

Agradecimentos

A presente dissertação resultou de um percurso que foi trilhado com perseverança e dedicação, contando com o contributo de várias pessoas a quem agradeço e muito me honra destacar.

Em primeiro lugar, agradeço ao Professor Doutor Javier Muñoz que aceitou orientar a minha dissertação de mestrado, revelando total disponibilidade e especial atenção no trato. A sua partilha e entusiasmo pela área foram essenciais para a seleção do tema e para a construção deste trabalho de investigação. Agradeço-lhe também os conselhos, as críticas e as sugestões que sempre me motivaram e valorizaram não só o meu trabalho mas também o meu pensamento.

Ao André, meu colega de curso e de investigação. Com ele partilhei a similaridade do tema, as dúvidas, as angústias, as certezas e as conquistas. Agradeço-lhe o apoio e a partilha pois foram essenciais para a construção deste projecto.

Aos meus colegas de curso e amigos que estiveram ao meu lado durante todo o meu percurso académico. A todos agradeço a disponibilidade, a união e o impulso para querer fazer sempre mais e melhor.

À Universidade da Beira Interior e à Faculdade de Ciências da Saúde pelo acolhimento e por tudo o que me proporcionaram a nível académico, profissional e pessoal.

Expressão imunohistoquímica da proteína p53 no adenocarcinoma colorretal e a sua correlação com o grau de diferenciação histológico, localização e prognóstico

Resumo

O cancro colorretal é o terceiro cancro mais comum a nível mundial e o segundo mais mortal, registando-se um aumento crescente do número de casos. Em Portugal, este tipo de cancro ocupa o primeiro lugar em termos de incidência, com baixa sobrevida aos 5 anos.

Apesar dos avanços em termos de diagnóstico precoce e tratamento, nas últimas décadas, não se conseguiu dar uma resposta eficaz a este problema.

Os fatores de prognóstico que se dispõe actualmente são insuficientes (estadiamento TNM, presença/ausência de doença residual pós-cirurgia, classificação histológica, presença/ausência de invasão ganglionar e/ou metástases à distância). Como tal, torna-se necessário investigar a existência de novos marcadores moleculares que sirvam como fatores de prognóstico e como elementos facilitadores da decisão terapêutica.

A proteína p53 regula vários processos celulares como a apoptose, a reparação do ADN e o funcionamento do ciclo celular. Neste sentido, a sua mutação condiciona estas funções reguladoras e confere-lhe um papel essencial na carcinogénese.

Este marcador molecular tem sido alvo de investigação científica, nos últimos anos, com o intuito de se perceber qual o seu valor prognóstico no cancro colorretal. Apesar do investimento nesta área, os resultados da literatura existente ainda são controversos.

Objetivos:

- 1) Detetar através do método de coloração imunohistoquímica a expressão da oncoproteína p53.
- 2) Analisar a expressão imunohistoquímica da oncoproteína p53 e dos parâmetros clínico-histopatológicos em estudo.
- 3) Determinar o valor prognóstico da expressão da proteína p53 em doentes com cancro colorretal e a sua correlação com os parâmetros clínico-histopatológicos: grau de diferenciação, localização e prognóstico.

Métodos:

Estudo clínico-patológico retrospectivo realizado nas peças cirúrgicas de 32 doentes, com mais de 50 anos, que foram submetidos a uma ressecção cirúrgica do cancro do colorretal, no Serviço de Cirurgia do Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira, na Covilhã, entre 2002-2005.

As amostras foram processadas histologicamente no serviço de Anatomia Patológica do mesmo hospital. Foram, de seguida, diagnosticadas de acordo com o tipo histológico, grau de diferenciação e estadiamento TMN. Posteriormente, foram consideradas de acordo com a intensidade e percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53.

Os dados foram analisados estatisticamente considerando-se um $p\text{-value}<0,05$ e $p\text{-value}<0,1$, como estatisticamente significativos.

Resultados:

A “expressão imunohistoquímica de células marcadas pela oncoproteína p53” encontrou-se associada a “estadiamentos TNM” mais avançados ($p\text{-value}<0,05$) e a “adenocarcinomas pouco diferenciados” ($p\text{-value}<0,1$). Os “adenocarcinomas bem diferenciados” foram estatisticamente associados à ausência de marcação pela oncoproteína p53 ($p\text{-value}<0,05$). Não se verificaram resultados estatisticamente significativos entre a “expressão imunohistoquímica de células marcadas pela oncoproteína p53” e a “localização do tumor”. Os resultados também não foram significativos em relação ao “prognóstico”, apesar da análise da frequência indicar que a marcação com o p53 está associada a menor sobrevida.

Conclusão:

Apesar das potencialidades, ainda não é possível atribuir valor prognóstico ao p53. Deverão ser efectuados estudos mais representativos e que associem o conhecimento da genética, bem como outros marcadores.

Palavras-chave

Cancro Colorretal; p53; Localização; Grau de diferenciação histológica; Prognóstico.

Abstract

Colorectal cancer is the third most common cancer worldwide and the second most deadly, with increasing number of cases. In Portugal, this type of cancer ranks first in terms of incidence, with low survival at 5 years.

Despite advances in early diagnosis and treatment, the problem has not been effectively addressed, in recent decades.

The currently available prognostic factors are insufficient (TNM staging system, presence/absence of post-surgery residual disease, histological classification, presence/absence of lymph nodes invasion and distant metastases). So, it is necessary to investigate the existence of new molecular markers that can be used as prognostic factors and as facilitating elements of the therapeutic decision.

The p53 protein regulates various cellular processes such as apoptosis, DNA repair and the proper functioning of cell cycle. In this sense, p53 mutation changes its regulatory functions and plays an essential role in carcinogenesis.

This molecular marker has been the target of scientific research in recent years, aiming to understand its prognostic value in colorectal cancer. Despite the investment in this area, the results of the existing literature still are controversial.

Objectives:

- 1) Detect through immunohistochemical staining the oncoprotein p53 expression.
- 2) Analyse the immunohistochemical staining of the oncoprotein p53 and the clinical-histopathological parameters of this study.
- 3) Determine the prognostic value of p53 expression in patients with colorectal cancer and its correlations with clinical-histopathological parameters: histological differentiation degree, location and prognostic.

Methods:

Retrospective clinical-pathological study accomplished on the surgical samples of 32 patients, with more than 50 years, that were submitted to surgical resection of the colorectal cancer in the Department of Surgery of Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira, in Covilhã, between 2002-2005.

The samples were histologically processed in the Department of Pathologic Anatomy of the hospital. Then they were categorized according to the histological type, differentiation

degree and TNM staging system. Lastly, there were considerable according with the intensity and percentage of the immunohistochemical staining by the oncoprotein p53.

The data were statistically analysed by taking into consideration a p -value $<0,05$ and p -value <0.1 as statistically significant.

Results:

The “expression of immunohistochemical cells stained by the oncoprotein p53” was associated with advanced "TNM staging system" (p -value <0.05) and "poorly differentiated adenocarcinomas" (p -value <0.1). "Well differentiated adenocarcinomas" were statistically associated with lack expression of the p53 oncoprotein (p -value <0.05). There were no significant results between “expression of immunohistochemical cells stained by the oncoprotein p53” and “tumor localization”. Although frequency analysis indicated that p53 expression is associated with shorter survival, the results were also not significant about the "prognostic of patients".

Conclusion:

Despite the potentialities, it is not possible to assign prognostic value to p53, yet. More representative studies, associated with knowledge of genetics and other markers should be performed.

Keywords

Colorrectal cancer; p53; Location; Histological differentiation degree; Prognostic.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 Hipóteses a testar	2
1.2 Objetivos do estudo.....	2
2. Materiais e Métodos	3
2.1 Preparação e Determinação IHQ.....	3
2.2 Análise Estatística	5
3. Resultados	7
4. Discussão	25
4.1 Limitações do estudo e implicações para o futuro.....	28
5. Conclusão.....	31
6. Referências Bibliográficas	33
7. Anexos.....	37

Expressão imunohistoquímica da proteína p53 no adenocarcinoma colorretal e a sua correlação com o grau de diferenciação histológico, localização e prognóstico

Lista de Gráficos

Gráfico 1- Distribuição dos casos segundo o "género" dos doentes (N=32)	7
Gráfico 2- Distribuição dos casos segundo a "idade" dos doentes (N=32)	7
Gráfico 3- Distribuição dos casos segundo a "localização" do carcinoma (N=32).....	8
Gráfico 4- Distribuição dos casos segundo a presença de "pólipo" (N=32).....	8
Gráfico 5- Distribuição dos casos segundo a "diferenciação histológica do tumor"(N=32) .	9
Gráfico 6- Distribuição dos casos segundo o "estadiamento" (N=32)	10
Gráfico 7- Distribuição dos casos segundo a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" (N=32)	10
Gráfico 8- Distribuição dos casos segundo a "intensidade de expressão da oncoproteína p53" (N=32).....	11
Gráfico 9- Distribuição dos casos segundo a "sobrevida" dos doentes após <i>follow-up</i> (N=32)	11
Gráfico 10- Relação entre a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e o "tempo de sobrevida em meses"	22
Gráfico 11- Relação entre a "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53" e o "tempo de sobrevida em meses"	24

Expressão imunohistoquímica da proteína p53 no adenocarcinoma colorretal e a sua correlação com o grau de diferenciação histológico, localização e prognóstico

Lista de Tabelas

Tabela 1- Associação estatística entre "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e o "género"	12
Tabela 2- Associação estatística entre "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53" e o "género"	13
Tabela 3- Associação estatística entre a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e a "idade"	13
Tabela 4- Associação estatística entre a "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53" e a "idade"	14
Tabela 5- Associação estatística entre a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e a "localização do tumor"	15
Tabela 6- Associação estatística entre a "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53" e a "localização do tumor"	16
Tabela 7- Associação estatística entre a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e a "presença de pólipos"	17
Tabela 8- Associação estatística entre a "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53" e a "presença de pólipos"	17
Tabela 9- Associação estatística entre "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53" e o "grau de diferenciação histológica do tumor"	18
Tabela 10- Associação estatística entre "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e o "grau de diferenciação histológica do tumor"	19
Tabela 11- Associação estatística entre a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e a "classificação TNM"	20
Tabela 12- Associação estatística entre a "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53" e a "classificação TNM"	21
Tabela 13- Associação estatística entre a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e o "prognóstico"	22
Tabela 14- Estatísticas descritivas e teste Anova entre o "tempo de sobrevivência (em meses)" e a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53"	23
Tabela 15- Associação estatística entre a "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53" e o "prognóstico"	23
Tabela 16- Estatísticas descritivas e teste Anova entre o "tempo de sobrevivência (em meses)" e a "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53"	24

Expressão imunohistoquímica da proteína p53 no adenocarcinoma colorretal e a sua correlação com o grau de diferenciação histológico, localização e prognóstico

Lista de Siglas e Acrónimos

ABD	Adenocarcinoma Bem Diferenciado
AMD	Adenocarcinoma Moderadamente Diferenciado
APC	<i>Adenomatous Polyosis Coli</i>
APD	Adenocarcinoma Pouco Diferenciado
BAX	<i>Bcl-2 associated protein X</i>
Bcl-2	<i>B cell lymphoma protein 2</i>
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
CCR	Cancro Colorretal
CHUCB	Centro Hospitalar Universitário Cova da Beira
COX2	Ciclooxigenase-2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Ho	Hipótese nula
H1	Hipótese alternativa
IHQ	Imunohistoquímica
Ki-67	Proteína nuclear indicadora de proliferação celular
p53	Proteína 53
TNM	<i>Tissue Node Metastasis</i>
TP53	<i>Tumor Protein p53</i>
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

Expressão imunohistoquímica da proteína p53 no adenocarcinoma colorretal e a sua correlação com o grau de diferenciação histológico, localização e prognóstico

1. Introdução

O cancro é a segunda causa de morte a nível mundial e a que mais cresceu nos últimos anos.^{1,2} Segundo dados do GLOBOCAN, estima-se que, em 2018, surgiram 18.1 milhões de novos casos de cancro e 9,6 milhões de mortes por esta patologia.^{1,3,4}

O cancro colorretal (CCR) é um dos que mais contribuiu para estas estatísticas, devido à tendência crescente das suas taxas de incidência e de mortalidade. Este é o terceiro cancro mais incidente a nível mundial e o segundo mais mortal, com baixa sobrevida aos 5 anos.^{1,2,4,5} Em Portugal, estes números são ainda mais expressivos dado que, em 2018, o CCR foi o cancro mais incidente, seguido do cancro da mama e da próstata, com mais de 10 mil novos casos diagnosticados.⁴

De facto, o CCR apresenta dados epidemiológicos alarmantes e com previsão de agravamento futuro, estimando-se um aumento de 77% na incidência e de 80% na mortalidade, até 2030.^{6,7} Como tal, torna-se necessário investir nesta área e assim se estabelecer novos métodos que auxiliem o diagnóstico e orientem o tratamento desta doença.

O CCR é uma doença heterogénea causada pela interacção de factores genéticos e epigenéticos que condicionam a transformação neoplástica do epitélio da mucosa do cólon e reto.^{5,6,8,9} A maioria dos CCR são esporádicos^{6,7} e desenvolvem-se a partir de adenomas, num período de cerca de 10-15 anos.⁶ Apesar deste período de evolução, o diagnóstico é efectuado frequentemente em estádios mais avançados, aquando da manifestação dos sintomas, o que contribui para o flagelo da doença.¹⁰

Estão descritas três vias da carcinogénese associadas ao CCR: A via APC/ β -catenina que envolve acumulação de mutações que resultam na activação de oncogenes e na inactivação de genes supressores de tumores; a via da instabilidade de microssatélites que envolve mutação de genes que regulam a reparação do DNA; e a via da hipermetilação que silencia a atividade dos genes atingidos.^{5,6,8} Entre as mutações genéticas descritas no CCR, a mutação do p53 é a mais comumente implicada no processo de carcinogénese^{5,11-13}, sendo descrita como essencial na transformação adenoma-carcinoma.^{5,14}

O TP53 é um gene supressor de tumor, localizado no cromossoma 17p, que codifica o p53, proteína reguladora do ciclo celular. Esta impede a transformação neoplásica por interrupção do ciclo em G₀ ou G₁, de forma temporária (quiescência) ou permanente (senescência).^{5,15,16} Além disso, participa na síntese, reparação e manutenção da

estabilidade do DNA, na diferenciação celular e na apoptose/necrose.^{5,13,16} Assim, diferentes mutações bi-alélicas do gene levam à acumulação da oncoproteína p53, detectável por imunohistoquímica (IHQ), com conseqüente alteração das funções anteriormente descritas e participação na gênese e progressão tumoral.^{5,15,17}

Dada a importância da mutação do TP53 para o desenvolvimento deste tipo de cancro e a carga da doença demonstrada nos dados estatísticos atuais, o presente estudo visa avaliar o valor prognóstico deste marcador tumoral. A capacidade deste predizer a agressividade biológica e a resposta à terapêutica seria de um valor inestimável, o que tornaria o p53 num recurso facilitador da decisão e orientação terapêutica dos doentes com esta patologia.

Hipóteses a testar

Existe correlação estatisticamente significativa entre a expressão IHQ da oncoproteína p53 no CCR e:

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

Objetivos do estudo

1. Determinar, através do método de coloração IHQ, a expressão da oncoproteína p53.
2. Analisar a expressão IHQ da oncoproteína p53 e dos parâmetros clínico-histopatológicos em estudo.
3. Determinar o valor prognóstico da expressão da proteína p53 em doentes com CCR e a sua correlação com parâmetros clínico-histopatológicos: grau de diferenciação, localização e prognóstico.

2. Materiais e Métodos

O presente trabalho de investigação trata-se de um estudo clínico-patológico retrospectivo realizado nas peças cirúrgicas de 32 doentes, que foram submetidos a uma ressecção cirúrgica de CCR, no Serviço de Cirurgia do Centro Hospitalar Universitário da Cova da Beira (CHUCB), entre 2002 e 2005. O estudo foi realizado em colaboração com o laboratório de Anatomia Patológica do hospital, com parecer favorável do Comité de Ética.

Os critérios de inclusão neste estudo foram: diagnóstico de CCR submetido a ressecção cirúrgica tumoral com intenção curativa; ausência de terapêutica neoadjuvante; e idade igual ou superior a 50 anos. Os critérios de exclusão não foram previamente definidos.

Os parâmetros clínico-histopatológicos avaliados incluíram: "género", "idade", "localização do tumor", "grau de diferenciação histológica", "classificação TNM", "intensidade e percentagem de células marcadas pela oncoproteína p53" e "prognóstico".

Para tal, as amostras obtidas foram preparadas e processadas no laboratório de Anatomia Patológica do CHUCB. Aqui, foram diagnosticadas com de acordo com o tipo histológico, grau de diferenciação e estadiamento TMN. Foram também processadas por IHQ o que permitiu conhecer a expressão da oncoproteína p53 e comparar com os parâmetros clínico-histopatológicos considerados.

Para além dos dados das amostras, foi valorizada a sobrevivência dos doentes. Assim, todos os participantes foram sujeitos a um *follow-up* pós-operatório de 10 anos, onde a sobrevida foi documentada em meses, em relação à data da realização da cirurgia.

2.1 Preparação e Determinação IHQ

O material deste estudo foi obtido de peças cirúrgicas ressecadas durante o período operatório, tendo sido posteriormente conservado, numa solução de formaldeído 10%, e enviado ao laboratório de Anatomia Patológica do CHUCB.

No laboratório foi feita a descrição macroscópica da peça: tamanho, consistência, cor, presença ou ausência de lesão e distância à margem. De seguida, foram feitas amostras de aproximadamente 3 mm de espessura de diferentes localizações: zona de lesão, margem cirúrgica, zona de transição tecido normal/lesão e mucosa normal. Neste trabalho, foram considerados exclusivamente amostras provenientes da zona de lesão.

Cada amostra foi colocada numa cassete e identificada para ser, posteriormente, submetida a desidratação, diafanização e, finalmente, impregnação em parafina (Anexo I). Neste último passo, as amostras foram retiradas da cassete e colocadas em moldes de metal preenchidos com parafina líquida a 62°C. Posteriormente, foram arrefecidas numa placa fria, entre -10°C e -15°C, primeiro dentro, e depois, fora do molde metálico. Após a solidificação dos blocos de parafina, procedeu-se à obtenção de cortes de 2µm de espessura, tendo depois sido colocados, individualmente, num recipiente de água de fundo escuro de forma a avaliar-se a qualidade dos mesmos. Os cortes utilizáveis foram dispostos sobre lâminas de vidro, colocados em água e aquecidos em banho maria (50-55°C) de forma a remover eventuais artefactos.

Todas as amostras obtidas foram, de seguida, colocadas na estufa a 60°C, para promover-se a adesão do corte à lâmina. Este processo demorou cerca de uma hora para as lâminas destinadas à coloração com Hematoxilina-Eosina e um dia para aquelas que, posteriormente, foram sujeitas a imuno-marcação para a oncoproteína p53.

Procedeu-se à coloração com Hematoxilina-Eosina segundo o protocolo do CHUCB (Anexo 2). As lâminas destinadas às técnicas de IHQ foram desparafinizadas com xilol e, posteriormente, hidratadas com concentrações decrescentes de etanol. Após este processo, foram colocadas numa panela de pressão, durante 6 minutos, com um tampão citrato de pH=6.0. De seguida, procedeu-se à marcação para a oncoproteína p53 através do processamento em máquina de IHQ, de acordo com o protocolo definido pelo CHUCB, que inclui 79 passos (Anexo 3).

A avaliação da expressão IHQ do marcador molecular p53 foi realizada utilizando-se o anticorpo monoclonal dirigido à oncoproteína p53, o DO7, obtido a partir do sobrenadante de culturas de ratos (*Dako Denmark*, M7001). O anticorpo foi de seguida empregue em concentrações de 1:25, em solução diluente (*DakoCytomation, ChemMate – Antibody Diluent*, S.2022). Posteriormente, adicionou-se um anticorpo secundário, no qual foram utilizadas imunoglobulinas biotiniladas de cabra anti-rato e anti-coelho (*Dako REALTM Link, Biotinylated Secondary Antibodies*), tendo-se feito o bloqueio da peroxidase endógena pela aplicação da *Dako REAL TM Peroxidase-Blocking Solution* (*Dako Denmark*, S.2023). Em sequência, foi adicionado um complexo de estreptavidina peroxidase e diaminobenzidina (*Dako REAL TM detection System, Peroxidase/DAB+*, K.5001). Este complexo, ao ligar-se ao antígeno específico do anticorpo primário, ativa o cromogénio (diaminobenzidina), conferindo uma cor acastanhada ao tecido onde a oncoproteína p53 é expressa. Todos os passos referidos anteriormente foram intercalados por uma lavagem com *Buffer Kit* (*DakoCytomation, ChemMate, Buffer Kit*, K.5006).

Por fim, realizou-se a coloração dos núcleos celulares com Hematoxilina de *Meyer* e fez-se a montagem das lâminas em meio sintético. Este processo foi executado, paralelamente, em lâminas de controlo constituídas por amostras de tecido mamário humano.

Após este processamento das amostras, as lâminas obtidas foram observadas ao microscópio ótico a uma ampliação de 400x, por dois observadores independentes, e foram classificadas segundo o grau de diferenciação histológica em: adenocarcinoma bem (ABD), moderadamente (AMD) ou pouco diferenciado (APD). Esta classificação teve como critério a presença de padrão glandular na amostra. Assim, a ausência total ou quase total deste padrão categorizou os tumores em APD, a presença na maior parte do tecido categorizou em ABD, e o grau intermédio em AMD. Nos casos em que na mesma zona se classificavam graus diferentes, o CCR recebeu a categorização da menor diferenciação.

Relativamente à marcação IHQ, foi feita uma classificação das lâminas segundo a "percentagem" de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53 (0%, 25%, 50%, 75%, 100%), estabelecendo-se um *cut-off* >0% para definir o resultado como positivo. Foi também feita a classificação das lâminas segundo a "intensidade" da marcação IHQ, considerando-se "-" na ausência de marcação, e "+", "++" e "+++", para uma marcação cada vez mais intensa.

O índice de marcação da oncoproteína p53 foi definido pela percentagem de células tumorais coradas positivamente, por cada 1000 células contadas a partir de áreas tumorais consecutivas. A coloração nuclear foi o critério de positividade mais utilizado.

2.2 Análise Estatística

A análise e o tratamento dos dados obtidos foram efetuados com recurso ao Microsoft Office Excel 2007® e ao IBM SPSS 24.0® (Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, IL).

Inicialmente, procedeu-se à análise descritiva das variáveis em estudo, com o intuito de caracterizar a população. As variáveis nominais e ordinais foram caracterizadas através de frequências absolutas e relativas. Para as variáveis contínuas foram testados os pressupostos de distribuição normal e, como se tratam de variáveis quantitativas, foram apresentados os valores mínimo e máximo, média e desvio-padrão.

Para analisar a associação estatística entre células imunohistoquimicamente marcadas pela oncoproteína p53 e as variáveis: "grau de diferenciação histológica do tumor", "localização", "estadiamento por TMN", "prognóstico", "género" e "idade", recorreu-se ao

teste de independência do Qui-Quadrado. Este teste não paramétrico permite a análise da associação estatística entre variáveis categóricas sob a hipótese nula (H_0) de que as variáveis são independentes, contra a hipótese alternativa (H_1) de que as variáveis são dependentes. Como tal, quando $p\text{-value} > \alpha$ não se rejeitou H_0 .

O teste do Qui-Quadrado pressupõe que nenhuma célula da tabela 2x2 tenha frequência esperada inferior a 1 e que não mais de 20% das células tenham frequência esperada inferior a 5 unidades. Nos casos em que estes pressupostos não foram assegurados, recorreu-se ao teste Exato de Fisher cujas hipóteses são as mesmas do teste do Qui-Quadrado.

Na análise da associação estatística entre a "intensidade e percentagem de expressão de células imunohistoquimicamente marcadas pela oncoproteína p53" e as variáveis grau de "diferenciação histológica do tumor" e "idade", recorreu-se ao teste da associação linear de Mantel-Haenszel (outra variante do teste de independência do Qui-Quadrado).

Para analisar a associação do tempo de sobrevida, em meses, e a marcação com a oncoproteína, recorreu-se ao teste paramétrico da ANOVA (análise da variância). Este teste permitiu comparar os valores médios da variável contínua. Ou seja, permitiu a comparação entre os quatro níveis de intensidade e entre os cinco níveis da percentagem, sob H_0 da igualdade das médias.

O teste paramétrico da ANOVA requer que estejam assegurados os pressupostos da normalidade dos dados e da homogeneidade das variâncias nos grupos em comparação. O pressuposto da normalidade da distribuição da variável "tempo de sobrevida" foi verificado através do teste do Shapiro-Wilk ($N < 30$). O pressuposto da homogeneidade das variâncias foi avaliado pelo teste de Levene, cuja H_0 é a de que as variâncias são homogêneas. Quando não verificado este último pressuposto, recorreu-se à estatística da Anova com a correção de Welch.

Foi considerado um nível de significância de 5% ($\alpha \leq 0,05$), mais robusto, e 10% ($\alpha \leq 0,1$). Consequentemente, foram valorizados os resíduos ajustados quando superiores a 1,96 e 1,64, respetivamente.

3. Resultados

O estudo é constituído por 32 doentes diagnosticados com CCR, dos quais 21 (65,6%) são do género masculino e 10 (31,3%) do género feminino. Não se obteve informação relativa ao género de um dos doentes incluídos neste estudo (3,1%) (Gráfico 1).

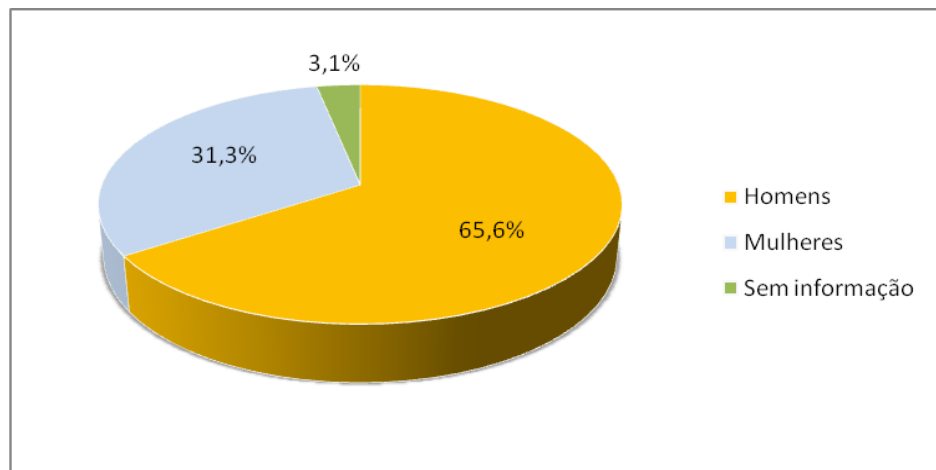


Gráfico 1- Distribuição dos casos segundo o "género" dos doentes (N=32)

Quanto à idade, todos os participantes tinham 50 ou mais anos, tal como mencionado nos critérios de inclusão. Dos grupos etários definidos, o mais frequente foi o de ">70 anos", correspondendo a 53,1% (n=17) dos participantes (Gráfico 2). Seguidamente, 34,4% dos doentes (n=11) apresentou idade compreendida entre "[65-70[anos", 9,4% (n=3) entre "[60-65[anos" e, por último, 3,1% (n=1) entre os "[50-60[anos".

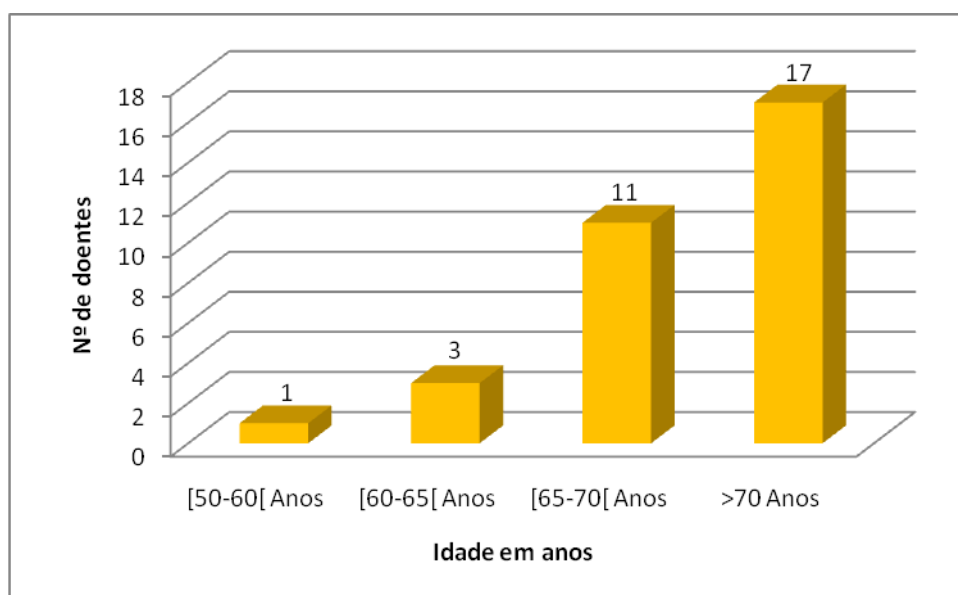


Gráfico 2- Distribuição dos casos segundo a "idade" dos doentes (N=32)

Relativamente à “localização do tumor”, constatou-se um claro predomínio esquerdo e distal (definido como neoplasia do cólon descendente, cólon sigmóide e reto), com 93,8% dos casos (n=30). Destes, a neoplasia do reto foi a mais frequente, seguida da neoplasia do cólon sigmóide, correspondendo a 43,8% (n=14) e 34,4% (n=11) dos casos, respectivamente. A localização direita e mais proximal (definida como neoplasia do cólon ascendente e cólon transverso) foi observada em 2 casos estudados, totalizando apenas 6,2% das observações.

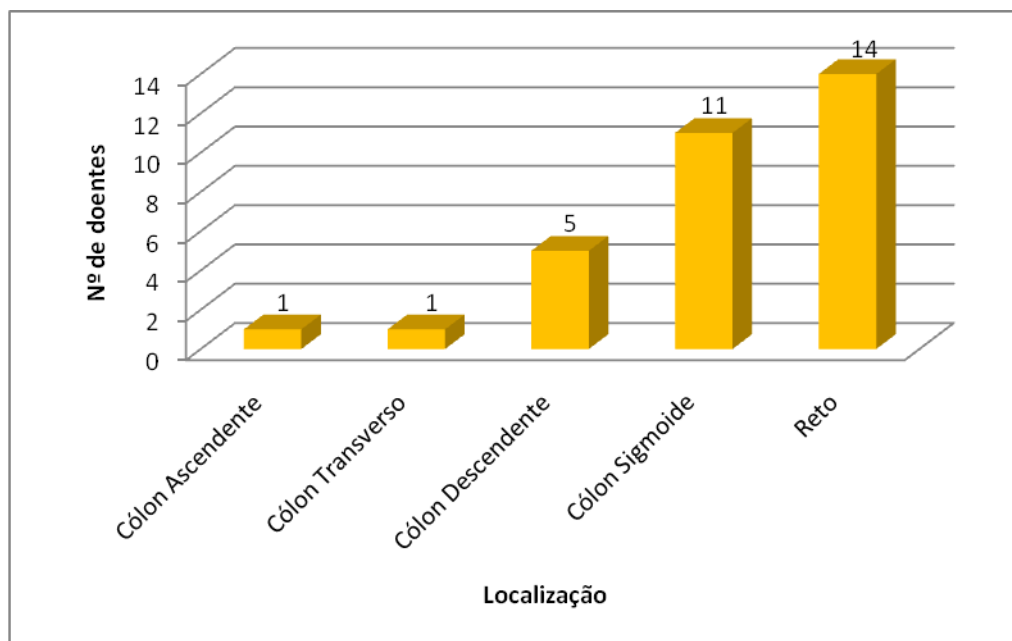


Gráfico 3- Distribuição dos casos segundo a “localização” do carcinoma (N=32)

Aquando do diagnóstico histológico, 17 doentes (53,1%) apresentaram lesão polipóide enquanto que 15 (46,9%) não apresentaram esta característica.

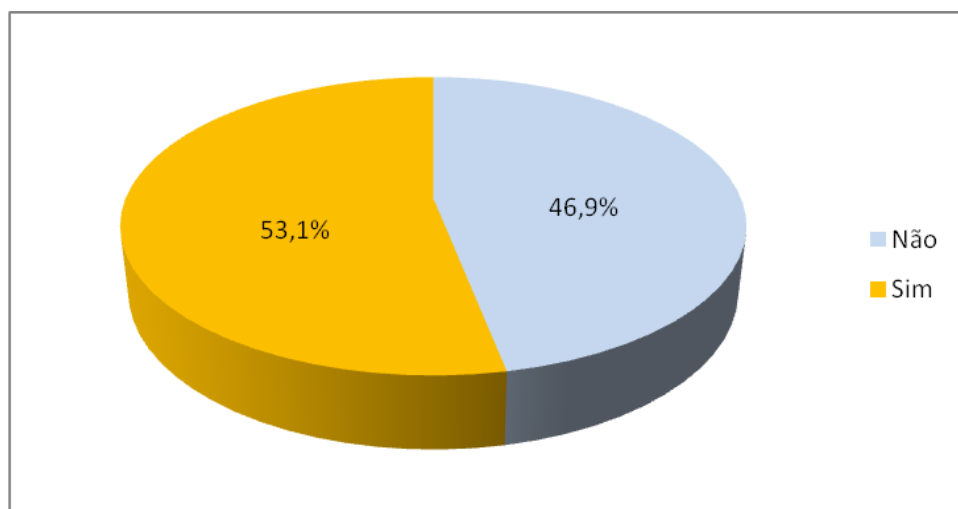


Gráfico 4- Distribuição dos casos segundo a presença de “pólipo” (N=32)

Quanto ao “grau de diferenciação histológica do tumor”, a maioria dos doentes apresentou um AMD, totalizando 59,4% (n=19) dos casos. Em seguida, surge o ABD com 31,3% (n=10) e, por fim, o APD com 9,4% (n=3) (Gráfico 5).

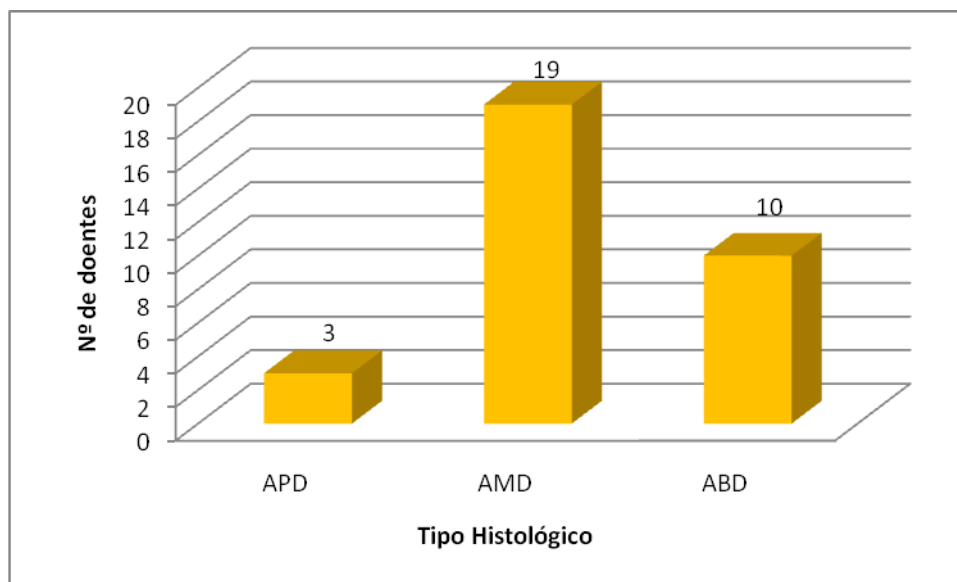


Gráfico 5- Distribuição dos casos segundo a "diferenciação histológica do tumor"(N=32)

No que se refere à “classificação TNM”, identificaram-se 7 categorias diferentes de classificação tumoral, sendo os carcinomas T2N0M0 os mais prevalentes, correspondendo a 46,9% (n=15) dos casos. É ainda de destacar que 78,1% (n=25) dos carcinomas identificados não apresentam invasão ganglionar nem metastização à distância, apesar da variabilidade do tamanho. A invasão ganglionar foi observada em 21,9% (n=7) dos participantes e a metastização à distância em 12,5% (n=4).

Os tumores T0N0M0 e T3N2M1, os extremos das classificações obtidas, foram os menos frequentes, correspondendo cada um a 3,1% dos casos observados (n=1).

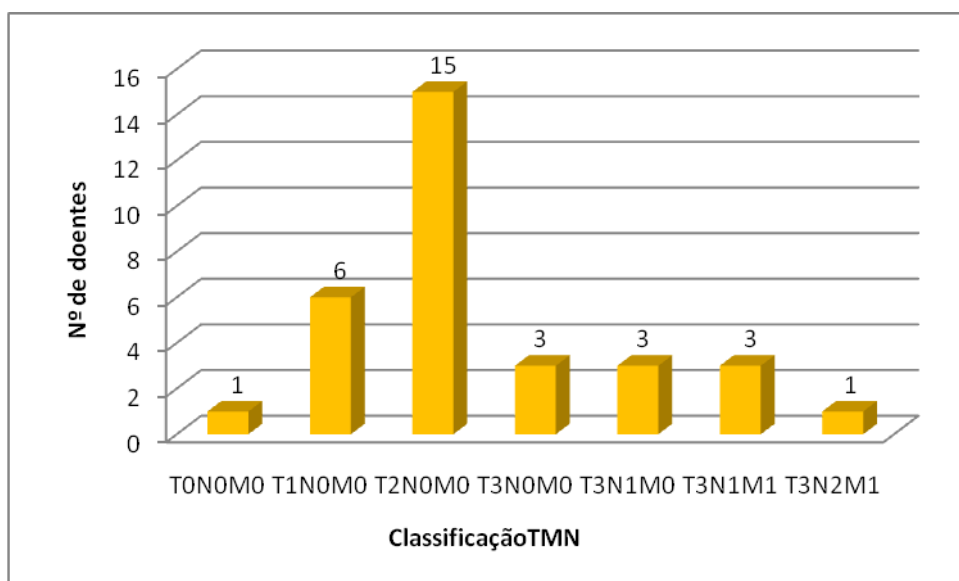


Gráfico 6- Distribuição dos casos segundo o "estadiamento" (N=32)

Os dados relativos à "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" revelam que 34,4% (n=11) dos doentes não apresentaram células marcadas. Dos participantes que exibiram marcação celular pela oncoproteína em estudo (n=21), apenas 4,8% (n=1) exibiram marcação máxima (100%). As percentagens de marcação de "50%" e "75%" foram as mais frequentemente observadas, estando cada uma associada a 33,3% (n=7) dos casos que exibiram marcação celular. A percentagem de marcação de "25%" teve uma frequência semelhante, ocorrendo em 28,8% (n=6) dos doentes que exibiram marcação (Gráfico 7).

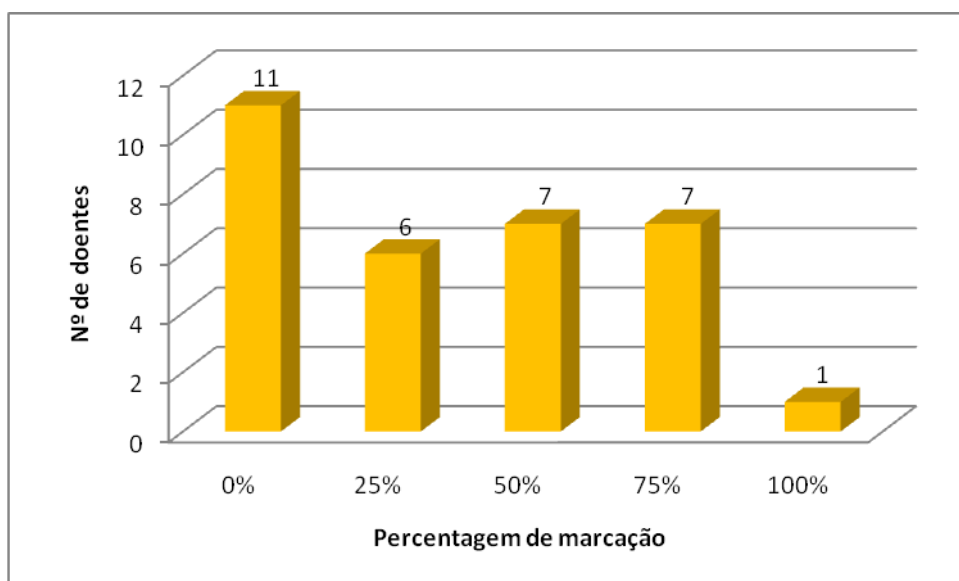


Gráfico 7- Distribuição dos casos segundo a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" (N=32)

No que diz respeito à “intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53”, constatou-se que 34,4% (n=11) dos tumores não exibiram marcação. Dos 21 (65,6%) casos marcados com a oncoproteína, a maioria exibiu a marcação de menor intensidade "+", totalizando 52,4% (n=11) dos casos marcados. A marcação com intensidade "++" foi identificada em 33,3% das marcações e a intensidade "+++" em 14,3%. (Gráfico 8).

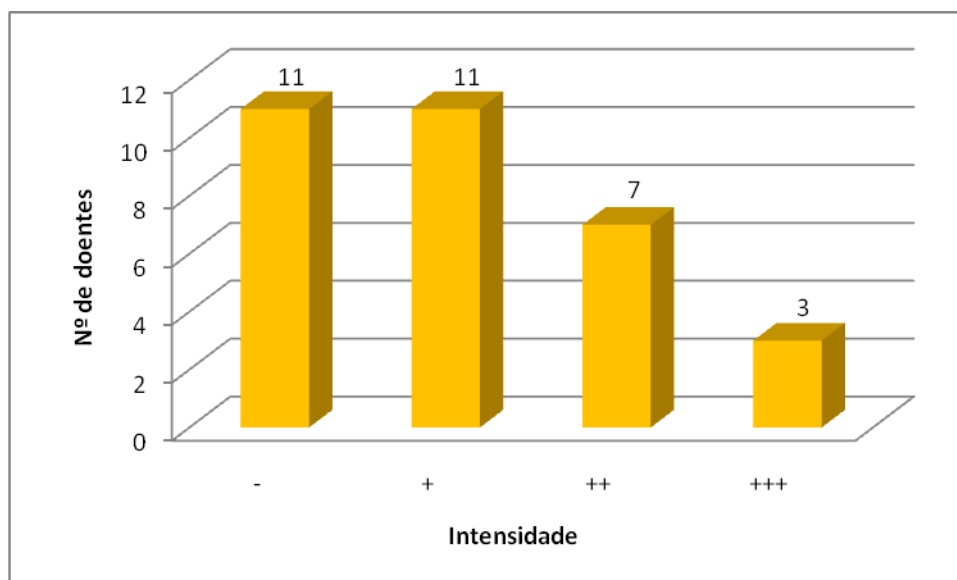


Gráfico 8- Distribuição dos casos segundo a "intensidade de expressão da oncoproteína p53" (N=32)

Por último, da análise da "sobrevida" dos doentes conclui-se que 13 (40,6%) sobreviveram e 19 (59,4%) faleceram, durante o *follow-up* pós-operatório de 10 anos (Gráfico 9).

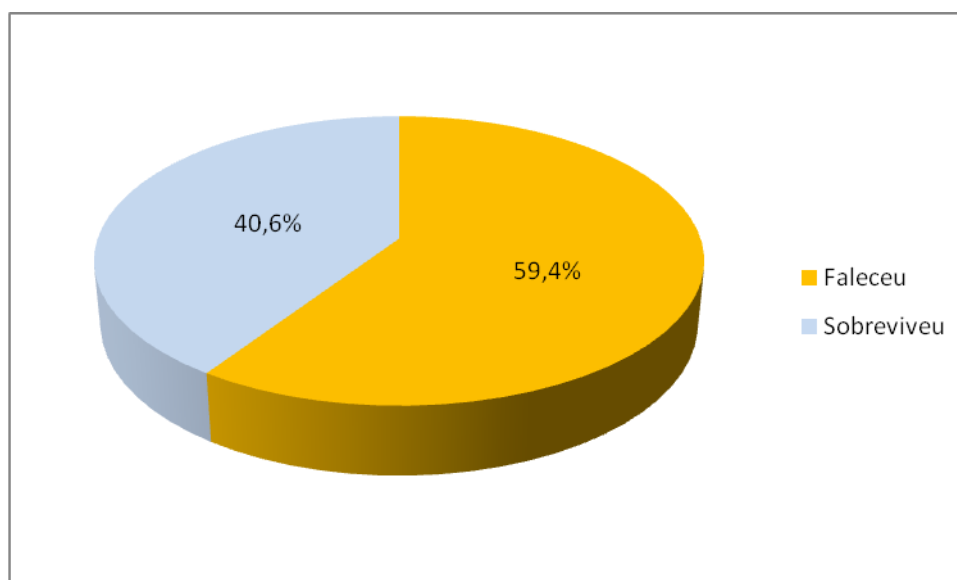


Gráfico 9- Distribuição dos casos segundo a "sobrevida" dos doentes após *follow-up* (N=32)

A "sobrevida" dos participantes que faleceram (n=19) variou de 36 a 196 meses, tendo como média os 89,68 meses (Quadro 1).

Quadro 1- Estatística descritiva do tempo de "sobrevida" (em meses) para a amostra (n=19)

	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50 (Mediana)	Percentil 75
Tempo de Sobrevida (meses)	19	89,68	33,946	36,00	196,00	78,00	90,00	100,00

Seguindo a mesma ordem da caracterização anterior, serão apresentados, em seguida, os resultados referentes à associação estatística entre as variáveis em estudo.

Em relação ao "gênero", concluiu-se que não há associação estatisticamente significativa com a "percentagem" e a "intensidade" de células marcadas imunohistoquimicamente pelo marcador p53. Não há evidência estatística para rejeitar H_0 de independência das variáveis dado que $p\text{-value} > 0,05$ (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1- Associação estatística entre "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e o "gênero"

		Percentagem					Total	$X^2(df)$ $p\text{-value}$	
		0%	25%	50%	75%	100%			
Sexo	Masculino	Frequência	8	3	3	7	0	21	$X^2(4)=7,259$ $p\text{-value} = 0,089$
		% Sexo	38,1%	14,3%	14,3%	33,3%	,0%	100,0%	
		% Percentagem	72,7%	50,0%	50,0%	100,0%	,0%	67,7%	
		Resíduos Ajustados	,4	-1,0	-1,0	2,1	-1,5		
	Feminino	Frequência	3	3	3	0	1	10	
		% Sexo	30,0%	30,0%	30,0%	,0%	10,0%	100,0%	
		% Percentagem	27,3%	50,0%	50,0%	,0%	100,0%	32,3%	
		Resíduos Ajustados	-,4	1,0	1,0	-2,1	1,5		
Total	Frequência	11	6	6	7	1	31		
	% Sexo	35,5%	19,4%	19,4%	22,6%	3,2%	100,0%		
	% Percentagem	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%		

Teste Exato de Fisher

Tabela 2- Associação estatística entre "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53" e o "gênero"

		Intensidade				Total	X ² (df) p-value	
		-	+	++	+++			
Sexo	Masculino	Frequência	8	7	4	2	21	X ² (3)=0,589 p-value =1,000
		% Sexo	38,1%	33,3%	19,0%	9,5%	100,0%	
		% Intensidade	72,7%	63,6%	66,7%	66,7%	67,7%	
		Resíduos Ajustados	,4	-,4	-,1	,0		
	Feminino	Frequência	3	4	2	1	10	
		% Sexo	30,0%	40,0%	20,0%	10,0%	100,0%	
		% Intensidade	27,3%	36,4%	33,3%	33,3%	32,3%	
		Resíduos Ajustados	-,4	,4	,1	,0		
Total	Frequência	11	11	6	3	31		
	% Sexo	35,5%	35,5%	19,4%	9,7%	100,0%		
	% Intensidade	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%		

Teste Exato de Fisher

Já na associação entre "idade" e "percentagem de células marcadas" rejeita-se H₀ de independência, X²(1)=1,095, p-value<0,05 (Tabela 3). Neste caso, verifica-se que existe uma associação significativa entre os doentes mais novos, com [50-60[anos, e a percentagem de marcação celular de 25% (100%; Res. Ajust.=2,1). Em associação, verifica-se também que a faixa etária dos [60-65[anos está mais associada à percentagem de marcação celular de 50% pela oncoproteína (66,7%; Res. Ajust.=2,0).

Tabela 3- Associação estatística entre a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e a "idade"

		Percentagem					Total	X ² (df) p-value	
		0%	25%	50%	75%	100%			
Idade	[50-60[Frequência	0	1	0	0	0	1	X ² (1)=1,095 p-value=0,041
		% Idade	,0%	100,0%	,0%	,0%	,0%	100,0%	
		% Percentagem	,0%	16,7%	,0%	,0%	,0%	3,1%	
		Res.Ajust.	-,7	2,1	-,5	-,5	-,2		
	[60-65[Frequência	1	0	2	0	0	3	
		% Idade	33,3%	,0%	66,7%	,0%	,0%	100,0%	
		% Percentagem	9,1%	,0%	28,6%	,0%	,0%	9,4%	
		Res. Ajust.	,0	-,9	2,0	-1,0	-,3		
	[65-70[Frequência	6	1	2	2	0	11	
		% Idade	54,5%	9,1%	18,2%	18,2%	,0%	100,0%	
		% Percentagem	54,5%	16,7%	28,6%	28,6%	,0%	34,4%	
		Res. Ajust.	1,7	-1,0	-,4	-,4	-,7		
	>70	Frequência	4	4	3	5	1	17	
		% Idade	23,5%	23,5%	17,6%	29,4%	5,9%	100,0%	
		% Percentagem	36,4%	66,7%	42,9%	71,4%	100,0%	53,1%	
		Res. Ajust.	-1,4	,7	-,6	1,1	1,0		
Total	Frequência	11	6	7	7	1	32		
	% Idade	34,4%	18,8%	21,9%	21,9%	3,1%	100,0%		
	% Percentagem	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%		

Mantel-Haenszel Linear by Linear association

Os resultados são menos robustos quando se analisa a associação estatística entre a "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53" e a "idade". Há evidência estatística para rejeitar H_0 de independência das variáveis, porém, a um nível de significância de 10% ($p\text{-value}<0,1$). Neste caso, a ausência de marcação celular pela oncoproteína p53 é mais prevalente nos doentes com idades compreendidas entre os [65-70[anos (54,5%; Res. Ajust.=1,70).

Tabela 4- Associação estatística entre a "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53" e a "idade"

		Intensidade				Total	X ² (df) p-value	
		-	+	++	+++			
Faixas etárias	[50-60[Frequência	0	1	0	0	1	X ² (1)=0,980 p-value=0,061
		% Idade	,0%	100,0%	,0%	,0%	100,0%	
		% Intensidade	,0%	9,1%	,0%	,0%	3,1%	
		Resíduos Ajustados	-,7	1,4	-,5	-,3		
	[60-65[Frequência	1	1	1	0	3	
		% Idade	33,3%	33,3%	33,3%	,0%	100,0%	
		% Intensidade	9,1%	9,1%	14,3%	,0%	9,4%	
		Resíduos Ajustados	,0	,0	,5	-,6		
	[65-70[Frequência	6	3	1	1	11	
		% Idade	54,5%	27,3%	9,1%	9,1%	100,0%	
		% Intensidade	54,5%	27,3%	14,3%	33,3%	34,4%	
		Resíduos Ajustados	1,7	-,6	-,13	,0		
	>70	Frequência	4	6	5	2	17	
		% Idade	23,5%	35,3%	29,4%	11,8%	100,0%	
		% Intensidade	36,4%	54,5%	71,4%	66,7%	53,1%	
		Resíduos Ajustados	-,14	,1	1,1	,5		
Total	Frequência	11	11	7	3	32		
	% Idade	34,4%	34,4%	21,9%	9,4%	100,0%		
	% Intensidade	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%		

Mantel-Haenszel Linear by Linear association

Quanto à associação entre a "localização do tumor" e a "percentagem de marcação celular pela proteína p53", concluiu-se que não há evidência estatística para rejeitar H_0 de independência das variáveis, dado que o $p\text{-value}=0,473$ (Tabela 5).

Tabela 5- Associação estatística entre a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e a "localização do tumor"

			Percentagem					Total	X ² (df) p-value
			0%	25%	50%	75%	100%		
Localização	Cólon Ascendente	Frequência	0	0	1	0	0	1	X ² (16)=17,582 p-value=0,473
		% Localização	,0%	,0%	100,0%	,0%	,0%	100,0%	
		% Percentagem	,0%	,0%	14,3%	,0%	,0%	3,1%	
		Resíduos Ajustados	-,7	-,5	1,9	-,5	-,2		
	Cólon Transverso	Frequência	1	0	0	0	0	1	
		% Localização	100,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	100,0%	
		% Percentagem	9,1%	,0%	,0%	,0%	,0%	3,1%	
		Resíduos Ajustados	1,4	-,5	-,5	-,5	-,2		
	Cólon Descendente	Frequência	3	1	1	0	0	5	
		% Localização	60,0%	20,0%	20,0%	,0%	,0%	100,0%	
		% Percentagem	27,3%	16,7%	14,3%	,0%	,0%	15,6%	
		Resíduos Ajustados	1,3	,1	-,1	-1,3	-,4		
	Sigmóide	Frequência	5	1	2	2	1	11	
		% Localização	45,5%	9,1%	18,2%	18,2%	9,1%	100,0%	
		% Percentagem	45,5%	16,7%	28,6%	28,6%	100,0%	34,4%	
		Resíduos Ajustados	1,0	-1,0	-,4	-,4	1,4		
Reto	Frequência	2	4	3	5	0	14		
	% Localização	14,3%	28,6%	21,4%	35,7%	,0%	100,0%		
	% Percentagem	18,2%	66,7%	42,9%	71,4%	,0%	43,8%		
	Resíduos Ajustados	-2,1	1,3	-,1	1,7	-,9			
Total	Frequência	11	6	7	7	1	32		
	% Localização	34,4%	18,8%	21,9%	21,9%	3,1%	100,0%		
	% Percentagem	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%		

Teste Exato de Fisher

Também a associação entre a “localização do tumor” e a “intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53”, não revelou evidência estatística para rejeitar a Ho de independência, dado que o *p-value*=0,736 (Tabela 6).

Tabela 6- Associação estatística entre a "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53" e a "localização do tumor"

			Intensidade				Total	X ² (df) <i>p-value</i>
			-	+	++	+++		
Localização	Cólon Ascendente	Frequência	0	1	0	0	1	X ² (12)=10,420 <i>p-value</i> =0,736
		% Localização	,0%	100,0%	,0%	,0%	100,0%	
		% Intensidade	,0%	9,1%	,0%	,0%	3,1%	
		Resíduos Ajustados	-,7	1,4	-,5	-,3		
	Cólon Transverso	Frequência	1	0	0	0	1	
		% Localização	100,0%	,0%	,0%	,0%	100,0%	
		% Intensidade	9,1%	,0%	,0%	,0%	3,1%	
		Resíduos Ajustados	1,4	-,7	-,5	-,3		
	Cólon Descendente	Frequência	3	1	1	0	5	
		% Localização	60,0%	20,0%	20,0%	,0%	100,0%	
		% Intensidade	27,3%	9,1%	14,3%	,0%	15,6%	
		Resíduos Ajustados	1,3	-,7	-,1	-,8		
	Sigmóide	Frequência	5	3	2	1	11	
		% Localização	45,5%	27,3%	18,2%	9,1%	100,0%	
		% Intensidade	45,5%	27,3%	28,6%	33,3%	34,4%	
		Resíduos Ajustados	1,0	-,6	-,4	,0		
	Reto	Frequência	2	6	4	2	14	
		% Localização	14,3%	42,9%	28,6%	14,3%	100,0%	
		% Intensidade	18,2%	54,5%	57,1%	66,7%	43,8%	
		Resíduos Ajustados	-2,1	,9	,8	,8		
Total	Frequência	11	11	7	3	32		
	% Localização	34,4%	34,4%	21,9%	9,4%	100,0%		
	% Intensidade	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%		

Teste Exato de Fisher

Seguindo a mesma linha de análise, para a variável "presença de pólipos" concluiu-se a existência de uma associação estatisticamente significativa com a "percentagem de células marcadas pelo p53" $X^2(4)=9,468$, $p\text{-value}<0,05$. A ausência de marcação está significativamente associada à existência de pólipos (52,9%; Res. Ajust.=2,4), enquanto que a percentagem de marcação a 75% é significativamente mais prevalente na ausência de pólipos (40%; Res. Ajust.=2,3).

Tabela 7- Associação estatística entre a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e a "presença de pólipos"

		Percentagem					Total	X ² (df)	
		0%	25%	50%	75%	100%		<i>p-value</i>	
Pólipo	Não	Frequência	2	2	4	6	1	15	
		% Pólipo	13,3%	13,3%	26,7%	40,0%	6,7%	100,0%	
		% Percentagem	18,2%	33,3%	57,1%	85,7%	100,0%	46,9%	
		Resíduos Ajustados	-2,4	-,7	,6	2,3	1,1		
	Sim	Frequência	9	4	3	1	0	17	X ² (4)=9,468
		% Pólipo	52,9%	23,5%	17,6%	5,9%	,0%	100,0%	<i>p-value</i>
		% Percentagem	81,8%	66,7%	42,9%	14,3%	,0%	53,1%	=0,035
		Resíduos Ajustados	2,4	,7	-,6	-2,3	-1,1		
Total	Frequência	11	6	7	7	1	32		
	% Pólipo	34,4%	18,8%	21,9%	21,9%	3,1%	100,0%		
	% Percentagem	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%		

Teste Exato de Fisher

A associação desta variável com os dados da "intensidade" da marcação revelou resultados semelhantes. Verifica-se que há evidência estatística para rejeitar H₀ de independência das variáveis e assumir que há uma associação significativa entre a ausência de marcação e a existência de pólipos, X²(3)=7,193, *p-value*<0,05. Ou seja, a existência de pólipos está significativamente associada à ausência de marcação (52,9%; Res. Ajst.=2,4).

Tabela 8- Associação estatística entre a "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53" e a "presença de pólipos"

		Intensidade				Total	X ² (df)	
		-	+	++	+++		<i>p-value</i>	
Pólipo	Não	Frequência	2	6	4	3	15	
		% Pólipo	13,3%	40,0%	26,7%	20,0%	100,0%	
		% Intensidade	18,2%	54,5%	57,1%	100,0%	46,9%	
		Resíduos Ajustados	-2,4	,6	,6	1,9		
	Sim	Frequência	9	5	3	0	17	X ² (3)=7,193
		% Pólipo	52,9%	29,4%	17,6%	,0%	100,0%	<i>p-value</i>
		% Intensidade	81,8%	45,5%	42,9%	,0%	53,1%	=0,044
		Resíduos Ajustados	2,4	-,6	-,6	-1,9		
Total	Frequência	11	11	7	3	32		
	% Pólipo	34,4%	34,4%	21,9%	9,4%	100,0%		
	% Intensidade	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%		

Teste Exato de Fisher

Seguindo com a análise das hipóteses em estudo, verificou-se que existe uma associação estatisticamente significativa entre a "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53" e o "grau de diferenciação histológica do tumor" (Tabela 9). Através do teste da associação linear de Mantel-Haenszel, assume-se esta conclusão uma vez que há evidência estatística para rejeitar H₀ da independência, X²(1)=-1,335, *p-value*=0,051, considerando um nível de significância a 10% (*p-value*<0,1). A análise dos resíduos ajustados mostra

que os casos de ABD estão mais associados à ausência de marcação (60%; Res. Ajust.=2,1), enquanto que os casos com APD estão significativamente associados à marcação intensidade "++" pela oncoproteína p53 (66,7%; Res. Ajust.=2,0). Pelo contrário, os dados referentes aos AMD revelaram uma heterogeneidade no que diz respeito à "intensidade" de marcação.

Tabela 9- Associação estatística entre "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53" e o "grau de diferenciação histológica do tumor"

		Intensidade				Total	X ² (df) p-value	
		-	+	++	+++			
Tipo Histológico	APD	Frequência	1	0	2	0	3	X ² (1)=-1,335 p-value=0,051
		% Tipo Histológico	33,3%	,0%	66,7%	,0%	100,0%	
		% Intensidade	9,1%	,0%	28,6%	,0%	9,4%	
		Resíduos Ajustados	,0	-1,3	2,0	-,6		
	AMD	Frequência	4	9	4	2	19	
		% Tipo Histológico	21,1%	47,4%	21,1%	10,5%	100,0%	
		% Intensidade	36,4%	81,8%	57,1%	66,7%	59,4%	
		Resíduos Ajustados	-1,9	1,9	-,1	,3		
	ABD	Frequência	6	2	1	1	10	
		% Tipo Histológico	60,0%	20,0%	10,0%	10,0%	100,0%	
		% Intensidade	54,5%	18,2%	14,3%	33,3%	31,3%	
		Resíduos Ajustados	2,1	-1,2	-1,1	,1		
Total	Frequência	11	11	7	3	32		
	% Tipo Histológico	34,4%	34,4%	21,9%	9,4%	100,0%		
	% Intensidade	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%		

Mantel-Haenszel Linear by Linear association

Da associação estatística entre a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e o "grau de diferenciação histológica do tumor" conclui-se que há evidência estatística para rejeitar H₀ da independência, X²(1)=-1,596, p-value=0,027. Mais uma vez, a análise dos resíduos ajustados mostra que os casos ABD estão associados à ausência de marcação com a oncoproteína p53 (60%; Res. Ajust.=2,1). Nos casos de APD e AMD, verificou-se maior heterogeneidade de resultados.

Tabela 10- Associação estatística entre "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e o "grau de diferenciação histológica do tumor

		Percentagem					Total	X ² (df)	
		0%	25%	50%	75%	100%		p-value	
Tipo Histológico	APD	Frequência	1	0	1	1	0	3	X ² (1)=-1,596 p-value =0,027
		% Tipo Histológico	33,3%	,0%	33,3%	33,3%	,0%	100,0%	
		% Percentagem	9,1%	,0%	14,3%	14,3%	,0%	9,4%	
		Resíduos Ajustados	,0	-,9	,5	,5	-,3		
	AMD	Frequência	4	5	4	5	1	19	
		% Tipo Histológico	21,1%	26,3%	21,1%	26,3%	5,3%	100,0%	
		% Percentagem	36,4%	83,3%	57,1%	71,4%	100,0%	59,4%	
		Resíduos Ajustados	-1,9	1,3	-,1	,7	,8		
	ABD	Frequência	6	1	2	1	0	10	
		% Tipo Histológico	60,0%	10,0%	20,0%	10,0%	,0%	100,0%	
		% Percentagem	54,5%	16,7%	28,6%	14,3%	,0%	31,3%	
		Resíduos Ajustados	2,1	-,9	-,2	-1,1	-,7		
Total	Frequência	11	6	7	7	1	32		
	% Tipo Histológico	34,4%	18,8%	21,9%	21,9%	3,1%	100,0%		
	% Percentagem	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%		

Mantel-Hanzel Linear by Linear association

No que se refere ao "estadiamento do tumor", constatou-se uma associação estatisticamente significativa com a "intensidade de marcação celular pela oncoproteína p53", mas não com a "percentagem de marcação" (Tabelas 11 e 12). De facto, segundo o teste exacto de Fisher, não existe uma associação estatística significativa entre a percentagem de células marcadas e o estadiamento TNM, ou seja, não há evidência para rejeitar H₀ de independência das variáveis (*p-value*=0,415).

Tabela 11- Associação estatística entre a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e a "classificação TNM"

			Percentagem					Total	X ² (df) p-value
			0%	25%	50%	75%	100%		
TMN	ToNoMo	Frequência	1	0	0	0	0	1	X ² (24)=26,040 p-value=0,415
		% TMN	100,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	100,0%	
		% Percentagem	9,1%	,0%	,0%	,0%	,0%	3,1%	
		Resíduos Ajustados	1,4	-,5	-,5	-,5	-,2		
	T1NoMo	Frequência	3	1	2	0	0	6	
		% TMN	50,0%	16,7%	33,3%	,0%	,0%	100,0%	
		% Percentagem	27,3%	16,7%	28,6%	,0%	,0%	18,8%	
		Resíduos Ajustados	,9	-,1	,8	-1,4	-,5		
	T2NoMo	Frequência	6	4	3	2	0	15	
		% TMN	40,0%	26,7%	20,0%	13,3%	,0%	100,0%	
		% Percentagem	54,5%	66,7%	42,9%	28,6%	,0%	46,9%	
		Resíduos Ajustados	,6	1,1	-,2	-1,1	-1,0		
	T3NoMo	Frequência	0	1	1	1	0	3	
		% TMN	,0%	33,3%	33,3%	33,3%	,0%	100,0%	
		% Percentagem	,0%	16,7%	14,3%	14,3%	,0%	9,4%	
		Resíduos Ajustados	-1,3	,7	,5	,5	-,3		
	T3N1Mo	Frequência	1	0	1	1	0	3	
		% TMN	33,3%	,0%	33,3%	33,3%	,0%	100,0%	
		% Percentagem	9,1%	,0%	14,3%	14,3%	,0%	9,4%	
		Resíduos Ajustados	,0	-,9	,5	,5	-,3		
	T3N1M1	Frequência	0	0	0	2	1	3	
		% TMN	,0%	,0%	,0%	66,7%	33,3%	100,0%	
		% Percentagem	,0%	,0%	,0%	28,6%	100,0%	9,4%	
		Resíduos Ajustados	-1,3	-,9	-1,0	2,0	3,2		
T3N2M1	Frequência	0	0	0	1	0	1		
	% TMN	,0%	,0%	,0%	100,0%	,0%	100,0%		
	% Percentagem	,0%	,0%	,0%	14,3%	,0%	3,1%		
	Resíduos Ajustados	-,7	-,5	-,5	1,9	-,2			
Total	Frequência	11	6	7	7	1	32		
	% TMN	34,4%	18,8%	21,9%	21,9%	3,1%	100,0%		
	% Percentagem	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%		

Teste Exato de Fisher

Como mencionado anteriormente, observa-se uma associação estatística significativa entre a "intensidade de marcação celular pela proteína p53" e o "estadiamento TMN", $X^2(18)=28,523$ e $p\text{-value}=0,001$. A marcação celular com intensidade "+" está significativamente associada ao estadiamento T2NoMo (53,3%;Res. Ajst.=2,0), enquanto que a marcação com intensidade "++" é mais significativa nos casos de estadiamento T3NoMo (66,7%;Res. Ajst.=2,0) e T3N1Mo (66,7%;Res. Ajst.=2,0). O estadiamento T3N1M1 é significativamente mais prevalente nos casos com intensidade "+++" (100%;Res. Ajst.=5,7).

Tabela 12- Associação estatística entre a "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53" e a "classificação TNM"

		Intensidade				Total	X ² (df) p-value	
		-	+	++	+++			
TMN	ToNoMo	Frequência	1	0	0	0	1	X ² (18)=28,523 p-value=0,001
		% TMN	100,0%	,0%	,0%	,0%	100,0%	
		% Intensidade	9,1%	,0%	,0%	,0%	3,1%	
		Resíduos Ajustados	1,4	-,7	-,5	-,3		
	T1NoMo	Frequência	3	2	1	0	6	
		% TMN	50,0%	33,3%	16,7%	,0%	100,0%	
		% Intensidade	27,3%	18,2%	14,3%	,0%	18,8%	
		Resíduos Ajustados	,9	-,1	-,3	-,9		
	T2NoMo	Frequência	6	8	1	0	15	
		% TMN	40,0%	53,3%	6,7%	,0%	100,0%	
		% Intensidade	54,5%	72,7%	14,3%	,0%	46,9%	
		Resíduos Ajustados	,6	2,1	-2,0	-1,7		
	T3NoMo	Frequência	0	1	2	0	3	
		% TMN	,0%	33,3%	66,7%	,0%	100,0%	
		% Intensidade	,0%	9,1%	28,6%	,0%	9,4%	
		Resíduos Ajustados	-1,3	,0	2,0	-,6		
	T3N1Mo	Frequência	1	0	2	0	3	
		% TMN	33,3%	,0%	66,7%	,0%	100,0%	
		% Intensidade	9,1%	,0%	28,6%	,0%	9,4%	
		Resíduos Ajustados	,0	-1,3	2,0	-,6		
	T3N1M1	Frequência	0	0	0	3	3	
		% TMN	,0%	,0%	,0%	100,0%	100,0%	
		% Intensidade	,0%	,0%	,0%	100,0%	9,4%	
		Resíduos Ajustados	-1,3	-1,3	-1,0	5,7		
T3N2M1	Frequência	0	0	1	0	1		
	% TMN	,0%	,0%	100,0%	,0%	100,0%		
	% Intensidade	,0%	,0%	14,3%	,0%	3,1%		
	Resíduos Ajustados	-,7	-,7	1,9	-,3			
Total	Frequência	11	11	7	3	32		
	% TMN	34,4%	34,4%	21,9%	9,4%	100,0%		
	% Intensidade	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%		

Teste Exato de Fisher

Por fim, resta a análise da associação entre “prognóstico dos doentes”, após o *follow-up* de 10 anos, e as variáveis "percentagem" e a "intensidade" de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53. Em relação à associação entre "percentagem de marcação celular" e "sobrevida dos doentes", conclui-se que não existe significância estatística entre as variáveis, dado que o *p-value*=0,111 (Tabela 13). Pela análise da frequência, conclui-se que a ausência de marcação esteve mais associada à sobrevivência (n=8) e que, pelo contrário, a marcação esteve associada a um pior prognóstico. Não se registaram sobreviventes com percentagem de marcação de 100%.

Tabela 13- Associação estatística entre a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e o "prognóstico"

		Percentagem					Total	X ² (df)	
		0%	25%	50%	75%	100%		p-value	
Sobrevida	Faleceu	Frequência	3	5	5	5	1	19	X ² (4)=7,079 p-value =0,111
		% Sobrevida	15,8%	26,3%	26,3%	26,3%	5,3%	100,0%	
		% Percentagem	27,3%	83,3%	71,4%	71,4%	100,0%	59,4%	
		Resíduos Ajustados	-2,7	1,3	,7	,7	,8		
		<hr/>							
	Sobreviveu	Frequência	8	1	2	2	0	13	
		% Sobrevida	61,5%	7,7%	15,4%	15,4%	,0%	100,0%	
		% Percentagem	72,7%	16,7%	28,6%	28,6%	,0%	40,6%	
		Resíduos Ajustados	2,7	-1,3	-,7	-,7	-,8		
		<hr/>							
Total	Frequência	11	6	7	7	1	32		
	% Sobrevida	34,4%	18,8%	21,0%	21,0%	3,1%	100,0%		
	% Percentagem	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%		

Teste Exato de Fisher

Os diagramas de extremos e quartis sugerem ligeiras diferenças no tempo de sobrevida entre as 5 categorias estabelecidas para a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53". Verificou-se maior dispersão de dados na ausência de marcação. Na "percentagem de marcação de 25%", o tempo mediano de sobrevida é superior aos casos com "percentagem de marcação de 50% e 75%". O menor tempo mediano de sobrevida foi observado na "percentagem de marcação de 75%".

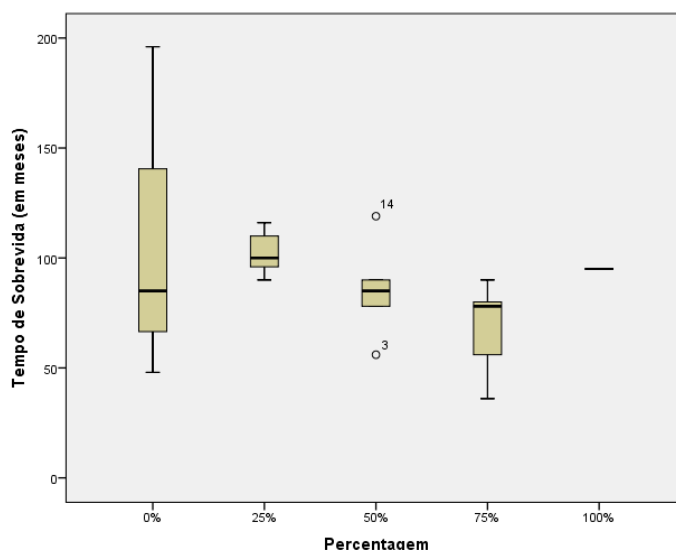


Gráfico 10- Relação entre a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e o "tempo de sobrevida em meses"

Uma vez que se verificou que o "tempo de sobrevida" segue uma distribuição normal nas 5 categorias estabelecidas para a percentagem de marcação, pelo teste do Shapiro-Wilk ($p\text{-value} > 0,05$), aplicou-se o teste paramétrico da Anova, para comparar os valores médios

do "tempo de sobrevida", em função da percentagem de marcação celular. De acordo com o resultado $F(4, 14)=0,961$ e $p\text{-value}=0,459$, não há evidência estatística para rejeitar H_0 da igualdade do tempo de sobrevida entre as diferentes categorias estabelecidas.

Tabela 14- Estatísticas descritivas e teste Anova entre o "tempo de sobrevida (em meses)" e a "percentagem de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53"

	N	Média	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança para a Média de 95%		Mínimo	Máximo	Teste Anova (df) <i>p-value</i>
				Limite Inferior	Limite Superior			
0%	3	109,67	77,022	44,468	-81,67	301,00	48	
25%	5	102,40	10,526	4,707	89,33	115,47	90	
50%	5	85,60	22,744	10,172	57,36	113,84	56	$F(4, 14)=0,961$
75%	5	68,00	21,772	9,737	40,97	95,03	36	$p\text{-value}=0,459$
100%	1	95,00	95	
Total	19	89,68	33,946	7,788	73,32	106,05	36	

Por outro lado, observa-se uma associação significativa entre "intensidade de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53" e a "sobrevida dos participantes" porém, apenas considerando uma significância de 10%, $X^2(3)=7,197$, $p\text{-value}<0,1$ (Tabela 15). Os casos de sobrevivência são significativamente mais frequentes nos doentes que não apresentam marcação celular pela oncoproteína (61,5%; Res. Ajust.=2,7). Pela análise da frequência, também se conclui o pior prognóstico da marcação celular, uma vez que esteve associada a maior mortalidade.

Tabela 15- Associação estatística entre a "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53" e o "prognóstico"

		Intensidade				Total	$X^2(df)$ <i>p-value</i>	
		-	+	++	+++			
Sobrevida	Faleceu	Frequência	3	8	6	2	19	$X^2(3)=7,197$ $p\text{-value}=0,065$
		% Sobrevida	15,8%	42,1%	31,6%	10,5%	100,0%	
		% Intensidade	27,3%	72,7%	85,7%	66,7%	59,4%	
		Resíduos Ajustados	-2,7	1,1	1,6	,3		
	Sobreviveu	Frequência	8	3	1	1	13	
		% Sobrevida	61,5%	23,1%	7,7%	7,7%	100,0%	
		% Intensidade	72,7%	27,3%	14,3%	33,3%	40,6%	
		Resíduos Ajustados	2,7	-1,1	-1,6	-,3		
Total	Frequência	11	11	7	3	32		
	% Sobrevida	34,4%	34,4%	21,9%	9,4%	100,0%		
	% Intensidade	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%		

Teste Exato de Fisher

Os diagramas de extremos e quartis sugerem ligeiras diferenças do tempo de sobrevida entre os 4 níveis de intensidade. Verifica-se maior dispersão de dados na ausência de marcação; na intensidade "+" o tempo mediano de sobrevida é superior aos casos com

intensidade "+"; e nos casos de intensidade "+++", o tempo mediano de sobrevida foi semelhante ao da marcação de menor intensidade (Gráfico 11).

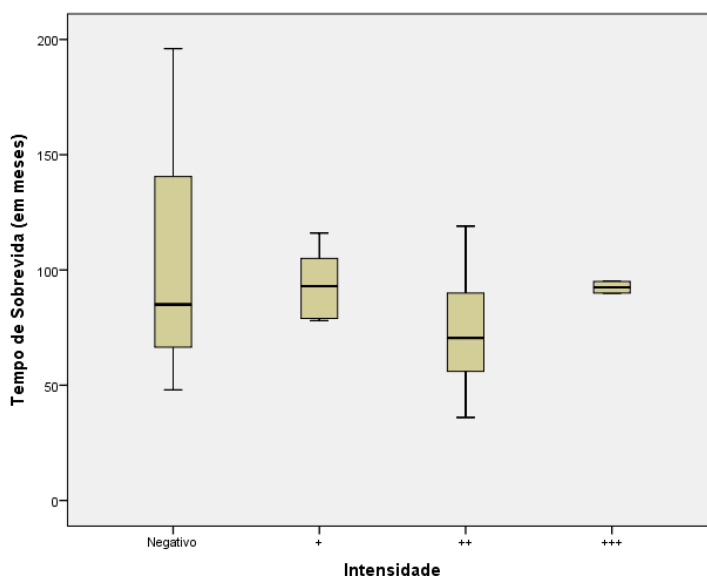


Gráfico 11- Relação entre a "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53" e o "tempo de sobrevida em meses"

Uma vez que se verificou que o tempo de sobrevida segue uma distribuição normal, pelo teste do Shapiro-Wilk ($p\text{-value} > 0,05$) aplicou-se o teste paramétrico da Anova para comparar os valores médios do tempo de sobrevida em função da intensidade. De acordo com o resultado $F(3;6,042)=0,689$, $p\text{-value}=0,591$ não há evidência estatística para rejeitar H_0 (Tabela 16).

Tabela 16- Estatísticas descritivas e teste Anova entre o "tempo de sobrevida (em meses)" e a "intensidade da marcação IHQ pela oncoproteína p53"

	N	Média	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança para a Média de 95%		Mínimo	Máximo	Teste Anova* (df) <i>p-value</i>
				Limite Inferior	Limite Superior			
Negativo	3	109,67	77,022	-81,67	301,00	48	196	$F(3;6,042)=0,689$ $p\text{-value}=0,591$
+	8	93,50	14,648	81,25	105,75	78	116	
++	6	73,67	29,978	42,21	105,13	36	119	
+++	2	92,50	3,536	60,73	124,27	90	95	
Total	19	89,68	33,946	73,32	106,05	36	196	

*Teste da Anova com a estatística da correção de Welch

4. Discussão

Atualmente, o *status* anátomo-patológico do CCR, traduzido na classificação TMN, tipo histológico e margens cirúrgicas, é a base do prognóstico e da tomada de decisão terapêutica.^{10,18-20} Destes determinantes, o estadiamento TMN, aquando do diagnóstico, tem sido usado como o principal preditor da tomada de decisão.²¹ Estima-se que os estádios iniciais da doença estejam associados a sobrevida elevada (75-90%) e que os estádios mais avançados estejam associados a sobrevida inferior a 15%.⁶ Contudo, em doentes com estadiamento inicial, excluídos de tratamento adjuvante pelo potencial curativo da cirurgia, originam-se recidivas na ordem dos 20 a 30%.¹⁸ Isto sugere que o estadiamento anátomo-patológico é insuficiente para garantir o prognóstico. Assim, a investigação dos marcadores moleculares ganha importância, uma vez que o seu potencial valor prognóstico permitiria uma estratificação individualizada e tratamento mais adequado.^{10,18,20-23}

É neste contexto que se enquadra o presente estudo de investigação, onde se pretende avaliar o valor prognóstico da oncoproteína p53, marcador associado a vários tipos de cancro.^{12,17,22,23} A mutação do gene TP53 é um importante passo no estabelecimento da carcinogénese¹⁷, uma vez que induz a acumulação de oncoproteína no núcleo da célula, com disrupção das suas funções. Estando comprometida a regulação da divisão celular, o controlo da progressão do ciclo celular e a apoptose^{8,20,24}, torna-se essencial conhecer qual o papel da oncoproteína p53 na indução, comportamento e agressividade tumoral, esclarecendo o seu valor prognóstico no CCR.

Em relação ao presente estudo e de acordo com os resultados anteriormente apresentados, observou-se que a maioria dos doentes é do género masculino (66%) e com idade igual ou superior a 65 anos (87,5%). Estes dados estão de acordo com as estatísticas mundiais, que indicam que a incidência do CCR esporádico aumenta com a idade e é mais frequente em homens.^{1,2,6,25}

Os resultados obtidos em relação à "localização do tumor" revelaram uma maior incidência deste tipo de cancro no cólon esquerdo e reto (93,8%), tal como os estudos de Vasile *et al*¹⁰, Melincovici *et al*²³, Ahnen *et al*²⁶ e Willauer *et al*²⁷. Tem sido descrita uma alteração gradual da localização do CCR, traduzida no aumento da incidência deste cancro no cólon direito ou próximo^{10,28}, porém tal alteração não foi evidenciada no estudo.

A "localização" do tumor é uma variável extremamente relevante, uma vez que existem diferenças na origem embriológica, nas características genéticas, anátomo-patológicas e

vias carcinogénicas entre o cólon direito e esquerdo, com consequente influência na evolução clínica e resposta ao tratamento.²⁹⁻³¹ Neste sentido, estudos recentes indicam que os tumores do cólon direito estão associados a adenomas planos e de difícil visualização endoscópica, a instabilidade microssatélite e a mutação BRAF, o que lhes confere um pior prognóstico.^{29,31} Tendo em atenção a oncoproteína em estudo, é de referir que os tumores do cólon esquerdo e distais estão mais associados à mutação TP53³⁰, tal como será discutido mais à frente.

Quanto à distribuição por “grau de diferenciação histológica” do tumor, a maior parte das amostras obtidas foram classificadas como AMD (59,4%). Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Vasile *et al*¹⁰, no estudo retrospectivo com uma *cohort* de 302 doentes, onde mais de 75% dos participantes apresentaram AMD. No entanto, é de ressaltar que esta variável confere limitações à comparação com outros estudos, uma vez que a classificação histológica depende do observador e da sua experiência, sendo assim um processo subjectivo.

O desenvolvimento de CCR é um processo multifatorial que envolve a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumores.⁵ Uma das mutações que mais contribui para a transformação adenoma-carcinoma é a mutação do gene TP53, estando presente em 60% a 80% dos cancros colorretais.^{5,12,17,18,32,33} No presente estudo, a expressão IHQ da oncoproteína p53 foi identificada nas amostras de 21 doentes (65,6%), encontrando-se ausente em 11 (34,4%). A elevada percentagem de expressão desta oncoproteína também foi encontrada nos estudos de Melincovici *et al* (65,22%)²³, Wang *et al* (63%)³⁴, Mardi *et al* (70%)³⁵ e Kruschewski *et al* (63%)³⁶. A elevada expressão é indicativa de mutação^{21,36}, pelo que os resultados confirmam o supradito relativamente à sua elevada frequência no CCR.

É também de salientar a significativa mortalidade durante o *follow-up* pós-operatório de 10 anos, traduzida na morte de 59,4% dos participantes. Estes resultados alinham-se com as estatísticas atuais que apontam o CCR como uma das principais causas de morte, com baixa sobrevida aos 5 anos.^{5,6}

Para além da análise exposta, no presente estudo propôs-se determinar o valor prognóstico da expressão da proteína p53 fazendo a correlação desta variável com o grau de diferenciação, localização e prognóstico dos doentes. Em relação à “expressão IHQ da oncoproteína p53” e ao “grau de diferenciação histológica” do CCR, obteve-se uma relação estatisticamente significativa entre os ABD e a ausência de marcação. Concluiu-se também que os APD estão associados à marcação intensidade “++” pela oncoproteína p53, considerando uma significância estatística de 10%. Em consonância com estes resultados,

os recentes estudos de Chen *et al*³⁷ e Nakayama *et al*^{12,17} comprovaram que a mutação da proteína p53 está associada a tumores com pouca diferenciação celular, tal como também foi mencionado nos trabalhos de Solomon *et al*³⁸ e de Aloni-Grinstein *et al*³⁹.

Contrariamente, Mardi *et al*³⁵, num estudo similar com 60 casos, concluiu que a expressão IHQ do p53 foi positiva maioritariamente em ABD, porém, sem significância estatística. Os estudos de Wang *et al*³⁴ e Melincovici *et al*²³ também não se revelaram estatisticamente significativos na associação destas variáveis.

Em relação à associação entre a “expressão IHQ da oncoproteína p53” e o “estadiamento TNM”, concluiu-se que a marcação celular é mais intensa nos estádios de TNM mais graves. Em consonância, Wuang *et al*⁴⁰ concluiu que a oncoproteína p53 é positiva em tumores avançados, pouco diferenciados e com TNM elevado. Também no estudo de Perraud *et al*⁴¹ verificou-se que o p53 é um importante marcador de tumores em estágio avançado, tendo sido considerado um factor prognóstico da doença.

Quanto à associação entre a “expressão IHQ da oncoproteína p53” e a “localização do tumor”, concluiu-se que não existe relação estatística entre as variáveis. Estes resultados são concordantes com os estudos de Wang *et al*³⁴, Melincovici *et al*²³ e Mardi *et al*³⁵. Por outro lado, Huemer *et al*⁴² e Wuang *et al*⁴⁰ obtiveram significância estatística entre a “expressão da oncoproteína p53” e os CCR que atingem o cólon esquerdo ou distal.

Por último, verificou-se que a “percentagem” e “intensidade” de células marcadas imunohistoquimicamente pela oncoproteína p53 não apresentaram valores estatisticamente significativos quando relacionadas com a “sobrevida” dos doentes. Apesar da análise da frequência indicar que a marcação com o p53 está associada a menor “sobrevida”, não foi evidenciada significância estatística robusta nesta associação. Como tal, o valor prognóstico do p53 não foi confirmado neste parâmetro.

Estudos semelhantes como os de Lustosa *et al*²⁰, Du *et al*²¹, Zhang *et al*²² e Lotter *et al*⁴³ concluíram que a expressão desta oncoproteína não têm relação com a sobrevivência do doente e, como tal, não deve ser considerada como fator de prognóstico.

Pelo contrário, estudos como o de Menezes *et al*¹⁸, Melincovici *et al*²³, Wang,L *et al*³⁴, Wang,P *et al*⁴⁰ e Cao *et al*⁴⁴ mostraram que o aumento da expressão do marcador p53 se encontra associado a um pior prognóstico em doentes com CCR, confirmando que a oncoproteína contribui para a agressividade e invasão tumoral.⁵

Assim, conclui-se que os resultados dos diversos trabalhos de investigação, semelhantes ao exposto, são muito heterogêneos, dificultando o consenso na atribuição de valor

prognóstico à oncoproteína p53. A concordância inegável, relativamente a este marcador, surge em relação ao seu papel determinante na carcinogénese^{5,11,45} e progressão tumoral.^{9,12,17} Como tal, no sentido de se conhecer melhor o valor prognóstico desta oncoproteína, estudos recentes apontam a importância da determinação das mutações genéticas a ela associadas.^{17,46} Diferentes mutações no gene TP53 parecem condicionar padrões de desenvolvimento e progressão tumoral distintos^{12,17}, sugerindo que os estudos genéticos, aliados ao estudo dos marcadores moleculares, poderão contribuir para consensos futuros.

4.1 Limitações do estudo e implicações para o futuro

Nos últimos anos, têm surgido diversos estudos que envolvem biomarcadores, contudo, muitos deles, com resultados inconclusivos e com pouca aplicabilidade prática no controlo do problema do CCR, tal como verificado no presente trabalho de investigação.

Apesar da concordância dos resultados obtidos com a literatura atual, é de referir que a principal limitação do trabalho relaciona-se com o número de participantes no estudo (N=32). Dada a dimensão do problema e a sua representatividade em Portugal, não se pode afirmar que o presente estudo seja representativo da população, considerando a pequena dimensão da amostra disponível. Além disso, verificou-se uma distribuição desigual dos casos pelas diferentes categorias em estudo, havendo maior representação de algumas em detrimento de outras, o que poderá estar a condicionar os resultados. Assim, seria importante a reprodução do estudo com um maior número de doentes e com maior homogeneidade da amostra.

Outro aspeto a salientar é a questão do tratamento adjuvante. A resposta ao tratamento é um dos factores essenciais para o prognóstico destes doentes e o facto de não ser contemplado no estudo causa uma limitação major aos resultados apresentados. Como tal, o tipo de tratamento instituído deveria ser um aspeto a considerar em estudos futuros.

De facto, populações heterogéneas, diferentes protocolos de tratamento e de *follow-up*, factores relativos à aplicação da técnica de IHQ (diferentes anticorpos, métodos de fixação, deteção de marcação), avaliação subjetiva dos resultados da IHQ e variações de análises estatística, são factores limitantes do estudo, podendo contribuir para a obtenção de resultados divergentes, em estudos semelhantes.¹⁸

Para além dos aspetos desenvolvidos anteriormente, tem sido descrito que a avaliação por IHQ poderá não ser o método mais fiável para este tipo de estudo, uma vez que os

resultados da marcação do p53 poderão não estar associados à mutação do gene Tp53.¹⁸ Assim, indicam-se novas linhas de investigação orientadas para a melhor forma de se detetar a expressão da oncoproteína p53. A orientação mais recente da literatura atual aponta para a necessidade da associação do estudo genético, com a análise por *microarray*, neste tipo de estudo.

Por último, é de referir que, no presente trabalho, não foi estudada a relação entre a expressão do marcador p53 e outros possíveis indicadores de prognóstico do CCR, como a expressão das proteínas Ki-67, Bcl-2, COX2, Bax. Em estudos futuros, a associação de diferentes marcadores tumorais deverá também ser considerada

Expressão imuno-histoquímica da proteína p53 no adenocarcinoma colorretal e a sua correlação com o grau de diferenciação histológico, localização e prognóstico

5. Conclusão

Os dados relativos à incidência e à mortalidade mostram o CCR como um dos principais problemas da saúde da atualidade, a nível mundial. A tendência crescente dos indicadores epidemiológicos tem motivado diversos estudos de investigação, de forma a compreender melhor as características fisiopatológicas, o processo de carcinogénese e os factores preditores da doença.

Apesar da evolução das técnicas de imagiologia, da genética, da bioquímica e da farmacologia, que muito contribuem para o diagnóstico precoce e orientação terapêutica do CCR, os resultados clínicos atuais mostram-se insuficientes para controlar o crescimento dos indicadores atrás referidos.

Como tal, torna-se mandatário expandir a investigação do CCR para o campo da biologia molecular, com a finalidade de estudar e compreender os factores preditores da doença e assim orientar, mais eficazmente, o tratamento.

A mutação da proteína p53 tem sido descrita como essencial na carcinogénese do CCR. A determinação do seu valor prognóstico no desenvolvimento e progressão desta patologia, é algo que tem sido alvo de investigação, à semelhança do presente trabalho.

Considerando os objectivos propostos, conclui-se que a expressão IHQ da oncoproteína p53 está associada a doentes mais velhos, com APD e com estadiamentos mais avançados da doença. Por outro lado, a ausência de expressão está associada a ABD. Estes resultados estão concordantes com estudos semelhantes que mostram esta mesma associação.

No que se refere à “localização do tumor”, a literatura atual apresenta grande disparidade de resultados. Muitos estudos correlacionam a expressão da oncoproteína p53 com a localização no cólon esquerdo e distal, enquanto que estudos mais recentes a correlacionam com o cólon direito e proximal. No presente estudo, não foi possível obter nenhuma correlação estatisticamente significativa relativa à expressão da oncoproteína p53 e a “localização tumoral”.

Por fim, apesar da análise da frequência indicar que a marcação com a oncoproteína p53 está associada a menor sobrevida, não foi evidenciada significância estatística nesta associação.

Assim, dada a incongruência dos resultados obtidos nas variáveis em estudo, conclui-se que não é possível atribuir um valor prognóstico ao p53 pelo que o estadiamento tumoral continua a ser o principal factor de prognóstico destes doentes. Em consonância, a literatura atual considera que este marcador parece ter um valor prognóstico limitado no CCR, dada a inconsistência dos resultados obtidos em diferentes estudos.

Estudos futuros mais representativos, com mais pessoas, poderão contribuir para uma melhor avaliação deste aspeto. Além disso, considerando o conhecimento atual sobre carcinogénese, parece pouco provável que um marcador possa contribuir individualmente como indicador de prognóstico. Estudos de associação com outros marcadores genéticos e moleculares poderiam conduzir a resultados mais promissores, robustos e conclusivos.

6. Referências Bibliográficas

- 1 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L, Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424.
- 2 Siegel R, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(1):7–34.
- 3 World Health Organization. Cancer [Internet]. 2018 [cited 2019 Nov 15]. Available from: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- 4 International for Research on Cancer, World Health Organization. Global Cancer Observatory [Internet]. 2018 [cited 2019 Dec 22]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie>.
- 5 Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. P53 mutations in colorectal cancer: molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol.* 2015;21(1):84–93.
- 6 Binefa G, Rodríguez-Moranta F, Teule À, Medina-Hayas M. Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine. *World J Gastroenterol.* 2014;20(22):6786–808.
- 7 Karsa LV, Lignini TA, Patnick J, Lambert R, Sauvaget C. The dimensions of the CRC problem. *Best Pract Res Clin Gastroenterol [Internet].* 2010;24(4):381–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2010.06.004>.
- 8 Coppedè F, Lopomo A, Spisni R, Migliore L. Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2014;20(4):943–56.
- 9 Sakai E, Fukuyo M, Matsusaka K, Ohata K, Doi N, Takane K, et al. TP53 mutation at early stage of colorectal cancer progression from two types of laterally spreading tumors. *Cancer Sci.* 2016;107(6):820–7.
- 10 Vasile L, Olaru A, Munteanu M, Pleşea I. Prognosis of colorectal cancer: clinical, pathological and therapeutic correlation. *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(2):383–91.
- 11 Yue X, Zhao Y, Xu Y, Zheng M, Feng Z, Hu W. Mutant p53 in cancer: accumulation, gain-of-function and therapy. *J Mol Biol.* 2017;429(11):1595–606.
- 12 Nakayama M, Sakai E, Echizen K, Yamada Y, Oshima H, Han T, et al. Intestinal cancer progression by mutant p53 through the acquisition of invasiveness associated with complex glandular formation. *Oncogene [Internet].* 2017;36(42):5885–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2017.194>.

- 13 Wiegering A, Matthes N, Mühling B, Koospal M, Quenzer A, Peter S, et al. Reactivating p53 and Inducing Tumor Apoptosis (RITA) Enhances the Response of RITA-Sensitive Colorectal Cancer Cells to Chemotherapeutic Agents 5-Fluorouracil and Oxaliplatin. *Neoplasia (United States)* [Internet]. 2017;19(4):301–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neo.2017.01.007>.
- 14 Wen S, Gao J, Zhang L, Zhou H, Fang D, Feng S. P53 increase mitochondrial copy number via up-regulation of mitochondrial transcription factor A in colorectal cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2016;7(46). Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/12514>.
- 15 Kim S, An SS. Role of p53 isoforms and aggregations in cancer. *Med*. 2016;95(26).
- 16 Miller M, Shirole N, Tian R, Pal D, Sordella R. The Evolution of TP53 Mutations: From Loss-of-Function to Separation-of-Function Mutants. *J Cancer Biol Res* [Internet]. 2016;4(4):6–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28191499> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5298884>.
- 17 Nakayama M, Oshima M. Mutant p53 in colon cancer. *J Mol Cell Biol*. 2019;11(4):267–76.
- 18 Menezes HL, Jucá MJ, Gomes EG, Nunes B, Costa HO, Matos D. Analysis of the immunohistochemical expressions of p53, bcl-2 and Ki-67 in colorectal adenocarcinoma and their correlations with the prognostic factors. *Arq Gastroenterol*. 2010;47(2):141–7.
- 19 Patil ST, Clement Wilfred D, Prasanna Shetty B. Histopathological evaluation and analysis of immunohistochemical expression of bcl-2 oncoprotein in colorectal carcinoma. *Iran J Pathol*. 2019;14(4):317–21.
- 20 Lustosa S, Logullo A, Artigiani R, Saad SS, Goldenberg A. Analysis of the correlation between p53 and bcl-2 expression with staging and prognosis of the colorectal adenocarcinoma. *Acta Cir Bras*. 2005;20(5):353–7.
- 21 Du P, Xu B, Zhang D, Shao Y, Zheng X. Hierarchical investigating the predictive value of p53, COX2, EGFR, nm23 in the post-operative patients with colorectal carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(1):954–66.
- 22 Zhang M, Cui F, Lu S, Lu H, Jiang T, Chen J, et al. Increased expression of prothymosin- α , independently or combined with TP53, correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(8):4867–76.
- 23 Melincovici C, Miha C, Marginean M, Bosca A, Coneac A, Moldovan I, et al. The prognostic significance of p53, Bax, Bcl-2 and cyclin E protein overexpression in colon cancer: an immunohistochemical study using the tissue microarray technique. *Rom J Morphol Embryol*. 2016;57(1):81–9.

- 24 Liu J, Zhang C, Feng Z. Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2013;46(3):1–10.
- 25 Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 2017;66(4):683–91.
- 26 Ahnen DJ, Wade SW, Jones WF, Sifri R, Silveiras JM, Greenamyer J, et al. The Increasing Incidence of Young-Onset Colorectal Cancer: A Call to Action. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2014;89(2):216–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.09.006>.
- 27 Willauer AN, Liu Y, Pereira AL, Lam M, Morris JS, Raghav KS, et al. Clinical and Molecular Characterization of Early-Onset Colorectal Cancer. *Cancer.* 2019;125(12):2002–10.
- 28 Ansa BE, Coughlin S, Alema-Mensah E, Smith S. Evaluation of Colorectal Cancer Incidence Trends in the United States (2000–2014). *Jounal Clin Med.* 2018;7(22).
- 29 Shida D, Tanabe T, Boku N, Takashima A, Yoshida T. Prognostic Value of Primary Tumor Sidedness for Unresectable Stage IV Colorectal Cancer: A Retrospective Study. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2019;26(5):1358–65. Available from: <https://doi.org/10.1245/s10434-019-07209-x>.
- 30 Lee MS, Menter DG, Kopetz S. Right Versus Left Colon Cancer Biology: Integrating the Consensus Molecular Subtypes. *J Natl Compr Cancer Netw.* 2017;15(3):411–9.
- 31 Ulanja MB, Rishi M, Beutler BD, Sharma M, Patterson DR, Gullapalli N, et al. Colon Cancer Sidedness, Presentation, and Survival at Different Stages. *J Oncol.* 2019;2019(Lcc).
- 32 López I, Oliveira LP, Tucci P, Álvarez-valín F, Coudry RA, Marín M. Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer. *Gene* [Internet]. 2012;499(1):81–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.02.011>.
- 33 Zhao Y, Li Y, Sheng J, Wu F, Li K, Huang R, et al. P53-R273H mutation enhances colorectal cancer stemness through regulating specific lncRNAs. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;9(38):1–16.
- 34 Wang L, Liu Z, Fisher KW, Ren F, Lv J, Davidson DD, et al. Prognostic value of programmed death ligand 1, p53, and Ki-67 in patients with advanced stage colorectal cancer. *Hum Pathol.* 2017;71:20-29.
- 35 Mardi K, Sharma M, Bhardwaj M, Rao M. p53 expression in colorectal carcinomas and its correlation with clinicopathological parameters. *Clin Cancer Investig J.* 2017;6:26–9.
- 36 Kruschewski M, Mueller K, Lipka S, Budczies J, Noske A, Buhr HJ, et al. The

- Prognostic Impact of p53 Expression on Sporadic Colorectal Cancer Is Dependent on p21 Status. *Cancers (Basel)*. 2011;3:1274–84.
- 37 Chen X, Guan H, Liu X-D, Xie D-F, Wang Y, Ma T, et al. p53 positively regulates the expression of cancer stem cell marker CD133 in HCT116 colon cancer cells. *Oncol Lett*. 2018;16:431–8.
- 38 Solomon H, Dinowitz N, Pateras IS, Cooks T, Shetzer Y, Molchadsky A, et al. Mutant p53 gain of function underlies high expression levels of colorectal cancer stem cells markers. *Oncogene*. 2018;37:1669–84.
- 39 Aloni-grinstein R, Shetzer Y, Kaufman T, Rotter V. p53: The barrier to cancer stem cell formation. *FEBS Lett*. 2014;588:2580–9.
- 40 Wang P, Liang J, Wang Z, Hou H, Shi L, Zhou Z. The prognostic value of p53 positive in colorectal cancer: A retrospective cohort study. *Tumor Biol*. 2017;39(5):1–7.
- 41 Perraud A, Akil H, Nouaille M, Petit D, Labrousse F, Jauberteau M, et al. Expression of p53 and DR5 in normal and malignant tissues of colorectal cancer: Correlation with advanced stages. *Oncol Rep*. 2011;26(14):1091–7.
- 42 Huemer F, Thaler J, Piringer G, Hackl H, Pleyer L, Hufnagl C, et al. Sidedness and TP53 mutations impact OS in anti-EGFR but not anti-VEGF treated mCRC - an analysis of the KRAS registry of the AGMT (Arbeitsgemeinschaft Medikamentöse Tumortherapie). *BMC Cancer*. 2018;18(11):1–11.
- 43 Lotter O, Amr A, Safi F. Prognostic significance of p53-expression in colorectal carcinoma as measured by a luminometric immunoassay. *Ger Med Sci*. 2010;8:1–9.
- 44 Cao D-Z, Ou X-L, Yu T. The association of p53 expression levels with clinicopathological features and prognosis of patients with colon cancer following surgery. *Oncol Lett*. 2017;13(5):3538–46.
- 45 Fahraeus R, Olivares-Illana V. P53 isoforms gain functions. *Oncogene*. 2010;29:5113–9.
- 46 Nikolova D, Chalovska-Ivanova V, Genadieva-Dimitrova M, Eftimov A, Jovanovik R. TP53 Mutation in Correlation to Immunohistochemical Expression of P53 Protein in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Maced J Med Sci*. 2018;6(7):1181–6.

7. Anexos

Anexo I- Protocolo do CHUCB referente ao processamento das amostras

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

Anexo II- Protocolo do CHUCB referente à coloração das amostras

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

Anexo III - Protocolo do CHUCB referente ao processamento imunohistoquímico das amostras

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''

Expressão imuno-histoquímica da proteína p53 no adenocarcinoma colorretal e a sua correlação com o grau de diferenciação histológico, localização e prognóstico

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 (MAYER)	1'
66	PAD4	29''
67	BUFF3	10''
68	PAD4	29''
69	BUFF3	1'
70	PAD4	29''
71	BUFF2	1'
72	PAD4	29''
73	BUFF2	10''
74	PAD4	29''
75	H2O	10''
76	PAD4	29''
77	H2O	10''
78	PAD4	29''
79	H2O	10''

Legenda:

BUF – soluções de lavagem;
 PAD – “esponjas”;
 AB1 – anticorpo primário;
 AB2 – anticorpo secundário;

HPBK – bloqueio da peroxidase endógena;
 HRP – streptavidin peroxidase;
 DAB – diaminobenzidina (cromogéneo).