



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências da Saúde

**Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 em  
adenocarcinoma do colon e reto e sua correlação  
com os graus de diferenciação e localização do  
respetivo tumor**

**Aliya Nurala Madatali Nurdin**

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

Orientador: Prof. Doutor Javier Muñoz Moreno

**Covilhã, abril de 2016**

Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 em adenocarcinoma do cólon e reto e sua correlação com os graus de diferenciação e localização do respetivo tumor

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Doutor Javier Munoz, pela disponibilidade e apoio demonstrados desde o início do projeto.

Ao Dr. Miguel Freitas pela disponibilidade e colaboração na análise estatística.

## Resumo

**Objectivo:** Analisar a imunexpressão do marcador tumoral bcl-2 no cancro do cólon e reto, a sua localização e grau de diferenciação e correlacionar com o prognóstico clínico-patológico.

**Métodos:** Foram estudados 30 pacientes com adenocarcinoma do colon e reto, submetidos à resseção cirúrgica do tumor no Centro Hospitalar Cova da Beira no período compreendido entre 2001 a 2003. As peças cirúrgicas foram analisadas segundo técnicas de marcação imunohistoquímica para a proteína bcl-2, classificadas em adenocarcinoma bem, moderadamente ou pouco diferenciado, de acordo com a presença de padrão glandular. Os dados obtidos foram analisados pelos teste não paramétrico Teste U de Mann-Whitney para verificar a relação entre o prognóstico e percentagem de células positivas para o bcl-2 e os testes de  $\chi^2$  e de Cramer para as variáveis localização do tumor e relação com o prognóstico e grau de diferenciação e relação com o prognóstico. Os dados foram analisados através do Pacote de Software para ciências Sociais (SPSS), versão 22.0®, e um *valor-p* inferior ou igual a 0,05 foi considerado significativo em todos os testes estatísticos.

**Resultados:** A expressão imunohistoquímica do bcl-2 foi positiva em 16 tumores (53%) e negativa em 14 (47%). Verificamos a existência de uma correlação estatisticamente significativa entre a percentagem de células marcadas para bcl-2 e o prognóstico do paciente ( $p=0,002$ ). Não foi encontrada correlação entre o grau de diferenciação do adenocarcinoma ou a localização e o prognóstico do paciente ( $p=0,292$  e  $p=0.563$  respetivamente).

**Conclusões:** A expressão imunohistoquímica do bcl-2 está associada ao prognóstico clínico-patológico do paciente, sendo que uma maior expressão do marcador confere um melhor prognóstico ao paciente. Relativamente ao grau de diferenciação e localização do adenocarcinoma não foi encontrada correlação significativa com o prognóstico do paciente.

## Palavras-chave

Adenocarcinoma do cólon e reto, bcl-2, Imunohistoquímica, Localização do tumor, Grau de diferenciação, Prognóstico

## Abstract

**Objective:** To analyze the immunoexpression of the protein bcl-2 in colorectal adenocarcinomas, the degree of cell differentiation and localization of the tumor and correlate with the clinical-pathological prognostic factors.

**Method:** Immunohistochemistry was used to detect the expression of bcl-2 in 30 cases of colorectal carcinoma who had undergone surgery at Cova da Beira Academic Hospital Centre between 2001 and 2003. The study variables were analyzed using the chi-square and Cramer to investigate associations between the degree of cell differentiation and localization of the tumor and the prognosis, and Mann-Whitney U Test to evaluate the expression of the protein bcl-2 and the prognosis. Data was analyzed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS), version 22.0®, and *p-value* less than or equal to 0,05 was regarded as significant for all statistical tests.

**Results:** The immunohistochemical expression of bcl-2 was positive in 16 tumors (53%) and negative in 14 (47%). There was statistically significant correlation between the expression of bcl-2 and prognosis ( $p=0,002$ ). However there is no significant association between the degree of cell differentiation and localization of the tumor and the clinical- pathological prognostic factors ( $p=0,292$  e  $p=0,563$  respectively).

**Conclusion:** The immunohistochemical expression of bcl-2 may be valuable in predicting the prognosis of the patient. Higher expression of bcl-2 were related to patients with better prognosis. No significant correlation was found between the degree of cell differentiation and localization of the tumor and patients prognosis clinical - pathological factors.

## Keywords

Colorectal adenocarcinoma, bcl-2, Immunohistochemistry, Localization of the tumor, Degree of cell differentiation, Prognosis

# Índice

Agradecimentos .....	ii
Resumo .....	iii
Abstract.....	iv
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Gráficos .....	viii
Lista de Acrónimos.....	ix
Introdução.....	1
Materiais e métodos.....	4
Resultados.....	10
Discussão .....	18
Limitações Futuras .....	19
Conclusões .....	20
Referências .....	21
Anexos .....	23

## Lista de Figuras

- Figura 1. Amostra de adenocarcinoma com marcação negativa para imunohistoquímica .....8
- Figura 2. Amostra de adenocarcinoma com 50% de células positivas para imunohistoquímica ..8
- Figura 3. Amostra de adenocarcinoma com 75% de células positivas para imunohistoquímica..9

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Protocolo CHCB - Fases do processo de desidratação e inclusão em parafina .....	5
Tabela 2. Protocolo CHCB - Fases do processo de rehidratação e coloração com Hematoxilina e Eosina .....	6

## Lista de Gráficos

Gráfico 1. Distribuição por sexo da população estudada.....	10
Gráfico 2. Distribuição por grupo etário da população estudada.....	11
Gráfico 3. Distribuição por localização do adenocarcinoma .....	12
Gráfico 4. Distribuição por grau de diferenciação do adenocarcinoma.....	13
Gráfico 5. Distribuição dos casos por percentagem de células marcadas para bcl-2.....	14
Gráfico 6. Relação entre a percentagem de células marcadas para bcl-2 e o prognóstico do paciente.....	15
Gráfico 7. Relação entre o grau de diferenciação do adenocarcinoma e o prognóstico clínico patológico.....	16
Gráfico 8. Relação entre a localização do adenocarcinoma e o prognóstico clínico patológico.....	17

## Lista de Acrónimos

AB1	Anticorpo primário
AB2	Anticorpo secundário
ABD	Adenocarcinoma bem diferenciado
AMD	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado
APD	Adenocarcinoma pouco diferenciado
bcl-2	Proteína anti-apoptótica
Bcl-2	Proteína B-cell lymphoma 2
<i>BCL2</i>	Gene que codifica a proteína Bcl-2
BUFF	Soluções de lavagem
CHCB	Centro Hospitalar Cova da Beira
DAB	Diaminobenzidina
HPBK	Bloqueio da peroxidase endógena
HRP	Estreptavidina peroxidase
SPSS®	<i>Software Package for Social Sciences</i>

# Introdução

O cancro do cólon e reto é uma das neoplasias mais prevalentes no mundo Ocidental e com incidência crescente.<sup>1</sup>

Segundo o relatório da GLOBLCAN 2012 realizado pela International Agency for Research on Cancer da WHO, o cancro do cólon e reto é a terceira neoplasia com maior incidência no mundo no sexo masculino (746.298 casos) e a segunda no sexo feminino (614.304 casos). Existe uma variação geográfica relativamente à incidência da neoplasia, sendo que taxas mais elevadas registam-se nas regiões mais desenvolvidas, no entanto a distribuição entre sexos é semelhante, sendo maior no sexo masculino.

Relativamente à taxa de mortalidade, estimam-se 694.000 mortes por ano, o que equivale a cerca de 8.5% mortes totais.<sup>2</sup>

Segundo a World Cancer Research Fund international, a incidência de cancro do colon e reto em Portugal em 2012 foi de 246.2/100.000, sendo a segunda neoplasia com maior incidência em ambos os sexos.<sup>3</sup>

O cancro do cólon e reto é uma neoplasia que se desenvolve lentamente ao longo de anos. Normalmente inicia-se como um pólipó (tumor benigno) na camada mais interna que, devido à acumulação de anormalidades cromossómicas, mutações genéticas, epigenéticas e consequente desregulação do crescimento celular, diferenciação e apoptose, pode transformar-se em maligno.<sup>4,5,6</sup>

Existem diversos fatores de risco que podem potenciar o desenvolvimento da malignidade, entre os quais fatores de risco não modificáveis: doença inflamatória intestinal; história familiar de cancro ou pólipos no cólon e reto; síndrome genética como polipose adenomatosa familiar ou síndrome de Lynch; idade avançada (maior que 50 anos) e, por outro lado, factores de risco relacionados com o estilo de vida: inatividade física; dieta pobre em fruta, vegetais, fibras e com alto teor em gorduras; *Diabetes Mellitus* tipo II; obesidade; consumo de álcool e tabaco; terapia de radiação.<sup>7,8</sup>

Atualmente, o prognóstico do cancro cólon e reto tem como base o estadiamento TNM - extensão do tumor, envolvimento de nódulos linfáticos e metástases<sup>9</sup> mas, devido a elevadas discrepâncias no desenvolvimento clínico, necessidade de terapias e prognóstico dentro do mesmo estadio, são necessários melhores marcadores. Nos últimos anos tem havido uma crescente investigação baseada no estudo imunohistoquímico de marcadores tumorais em peças cirúrgicas que possibilita uma análise biológica individual e confere elevada especificidade relativamente ao tumor estudado. Ideal seria que estes marcadores conseguissem prever a disseminação tumoral aquando da primeira resseção cirúrgica para selecionar pacientes que beneficiariam de terapia adjuvante - quimioterapia ou radioterapia.<sup>10</sup>

Um dos marcadores que tem vindo a ser estudado é o gene BCL-2, localizado no cromossoma 18. As proteínas da família Bcl-2 regulam os grandes tipos de morte celular, necrose, apoptose e autofagia. Nesta grande família de proteínas Bcl-2 existe um grupo pró-apoptótico representado pelo Bax e um grupo anti-apoptótico representado pelo bcl-2. <sup>11, 12</sup>

A proteína bcl-2 permite o prolongamento da sobrevivência mesmo na ausência de fatores de crescimento, visto que esta inibe a apoptose, promove a divisão celular e contribui para o crescimento do tumor. <sup>11</sup> A bcl-2 está presente apenas nas células basais de tecidos em que existe renovação celular ou que a apoptose tem um papel relevante para formar estruturas mais complexas, como é o caso da pele, intestino, pulmão, entre outros, sendo que o seu padrão de expressão é diferente consoante o tecido. <sup>13</sup>

Nos últimos anos tem vindo a ser realizadas experiências com o intuito de perceber o papel destas proteínas no desenvolvimento do cancro, se a sua expressão pode estar relacionada com o prognóstico e ação terapêutica. <sup>14</sup>

Estudos da expressão do bcl-2 em tumores sólidos demonstraram que o aumento do marcador estava relacionado com bom prognóstico no carcinoma pulmonar de células pequenas e cancro da mama. Em neuroblastomas, a expressão do bcl-2 está relacionada com um estadio mais elevado e histologia desfavorável, relacionado com a expressão restrita a células menos diferenciadas<sup>13</sup>

Vários estudos demonstraram que a proteína bcl-2 está super-expressa em adenomas e carcinomas colorretais e a maioria de estudos clínicos associaram que a deteção de bcl-2 citoplasmática nestas neoplasias parece estar relacionado com parâmetros clínicos mais favoráveis e melhor prognóstico. No entanto, outros estudos demonstraram uma associação entre bcl-2 e baixa sobrevivência. <sup>11</sup>

Em suma, a forma como atualmente se classifica o cancro do colon e reto resulta numa discrepância de sobre e sub tratamento. Nenhum dos estudos realizados até então forneceram suporte suficiente para a implementação de um marcador molecular na prática clínica. <sup>3</sup>

#### Objetivo:

Analisar a imunoexpressão da proteína bcl-2 e correlacionar com os fatores de prognósticos clínico-patológicos. Correlacionar a localização e o grau de diferenciação do adenocarcinoma com o prognóstico do paciente.

Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 em adenocarcinoma do cólon e reto e sua correlação com os graus de diferenciação e localização do respetivo tumor

Hipóteses:

Verificar se existe:

1. Relação entre a percentagem de células marcadas bcl-2 e o prognóstico do paciente.
2. Relação entre a localização do adenocarcinoma e o prognóstico.
3. Relação entre o grau de diferenciação do adenocarcinoma e o prognóstico.

## Materiais e métodos

Para a realização deste estudo foram selecionados 30 casos de pacientes submetidos à ressecção cirúrgica de adenocarcinomas colorretais no Centro Hospitalar Cova da Beira (CHCB) entre 2001 e 2003. A partir de 2011 foram recolhidos dados de sobrevivência para posterior estudo longitudinal retrospectivo.

Os pacientes incluídos no estudo foram todos os pacientes submetidos à ressecção cirúrgica curativa da neoplasia no Centro Hospital Cova da Beira no referido período. A realização desta investigação foi aprovada pela Comissão de Ética do CHCB.

Entre os 30 casos selecionados, 21 são do sexo masculino (70%) e 9 do sexo feminino (30%). Foram divididos em 4 grupos etários: entre 50 a 60 anos apenas 1 paciente (3,33%); 60 a 65 anos 3 pacientes (10%); entre 65-70 anos 10 pacientes (33,33%); acima de 70 anos 16 pacientes (53,33%).

Relativamente à localização, 2 pacientes apresentaram a neoplasia no cólon ascendente direito (6,66%), 1 no cólon transversal (3,33%), 6 no cólon descendente esquerdo (20%), 10 no cólon sigmoide (33,33%) e 11 no reto (36,66%).

Todas as cirurgias realizadas foram curativas.

A partir de 2011 foi investigado a sobrevivência destes 30 pacientes recorrendo a telefonemas a familiares.

O estudo anatomopatológico das peças cirúrgicas foi realizado no laboratório de Anatomia Patológica do CHCB, segundo o protocolo anexado.

Cada peça cirúrgica foi conservada numa solução de formaldeído a 10% e enviada para o laboratório, onde, inicialmente, realizaram uma descrição macroscópica da peça. De seguida, colheram-se amostras de cerca de 3 mm de espessura das diferentes localizações que se pretende estudar: zona de lesão, margem cirúrgica, zona de transição tecido normal-lesão e mucosa normal. Cada amostra foi introduzida numa cassete e devidamente identificada.

As amostras foram submetidas a desidratação, diafanização e impregnação em parafina (Tabela 1). Para a realização do último passo foi necessário retirar cada amostra das cassetes para serem colocadas em moldes de metal preenchidos de parafina líquida a 62°C que foram, posteriormente arrefecidos sobre uma placa fria, a uma temperatura entre -10°C e -15°C, inicialmente dentro e depois fora do molde metálico.

Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 em adenocarcinoma do cólon e reto e sua correlação com os graus de diferenciação e localização do respetivo tumor

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

Tabela 1 - Protocolo CHCB - Fases do processo de desidratação e inclusão em parafina

Depois de solidificados, os blocos de parafina foram cortados com um micrótomo em amostras de 2 $\mu$ m de espessura. Cada corte foi colocado num recipiente de fundo escuro com água para se observar a qualidade. Os com boa qualidade foram dispostos sob lâminas de vidro, colocados em água e aquecidos em banho-maria a 50-55° para remover artefactos e posteriormente colocados em lâminas.

As lâminas foram colocadas numa estufa a 60° para promover a adesão do corte à lâmina. Este processo durou cerca de uma hora para as lâminas que seriam coloridas com Hematoxilina-Eosina e cerca de um dia para as que foram submetidas a imunomarcção.

A coloração com Hematoxilina-Eosina foi realizada segundo o protocolo do CHCB. (Tabela 2)

Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 em adenocarcinoma do cólon e reto e sua correlação com os graus de diferenciação e localização do respetivo tumor

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	<b>Eosina alcoólica</b>	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

Tabela 2 - Protocolo CHCB - Fases do processo de reidratação e coloração com Hematoxilina e Eosina

As restantes lâminas foram preparadas para serem submetidas a técnicas de imunohistoquímica. Depois da secagem na estufa foram desparafinizadas com Xilol, hidratadas com concentrações decrescentes de etanol e colocadas numa panela de pressão, durante 6 minutos, com o tampão citrato de pH de 6.0. De seguida foram processadas pela máquina de imunohistoquímica de acordo com o protocolo do CHCB (em anexo).

Inicialmente utilizou-se o anticorpo monoclonal líquido NCL-L-bcl-2 (Novocastra), obtido a partir do sobrenadante de culturas de células de ratinhos. O anticorpo foi colocado em concentração de 1:25 em solução diluente (Dako Cytomation, ChemMate -Antibody Diluent, S.2022). De seguida utilizou-se um anticorpo secundário, obtido por imunoglobulinas

biotiniladas de cabra anti-rato e anti-coelho (Dako REAL Tm Link, Biotinylated Secondary Antibodies). Posteriormente bloqueou-se a peroxidase endógena pela aplicação da Dako REAL TM Peroxidase-Blocking-solution (Daki Denmark, S.2023) e, por último, adicionado um complexo de estreptavidina peroxidase e diaminobenzidina (Dako REAL TM detection System, Peroxidase/DAB+, K.5001). Todos os passos anteriormente citados foram intercalados por uma lavagem com Buffer Kit.

Obteve-se um complexo onde a ligação do antígeno específico ao anticorpo primário vai levar à ativação do cromogéneo, a diaminobenzidina, conferindo então uma cor acastanhada ao tecido.

Por fim, realizou-se a coloração dos núcleos com Hematoxilina de Meyer e a montagem das lâminas nem um meio sintético

Todo o processo foi realizado simultaneamente em lâminas de controle constituídas por amostras de tecido de amígdalas humanas.

As lâminas foram observadas ao microscópio ótico com uma ampliação de 400x.

Em primeiro lugar, classificaram-se as lâminas segundo o tipo histológico em adenocarcinoma bem diferenciado, moderadamente diferenciado e mal diferenciado. Esta classificação baseou-se no padrão glandular da amostra da lâmina.

Assim, a presença de padrão glandular em uma grande extensão seria considerada bem diferenciado, em pouco tecido, mal diferenciado e grau intermédio, moderadamente bem diferenciado.

Se na mesma lâmina encontrássemos zonas de diferentes graus, seria considerado o grau menos diferenciado.

Em segundo lugar, classificou-se as lâminas quanto à percentagem de células coradas no processo imunohistoquímico (0, 25, 50, 75, 100% das células da amostra) e a intensidade de marcação (-, +, ++, +++).

Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 em adenocarcinoma do cólon e reto e sua correlação com os graus de diferenciação e localização do respetivo tumor

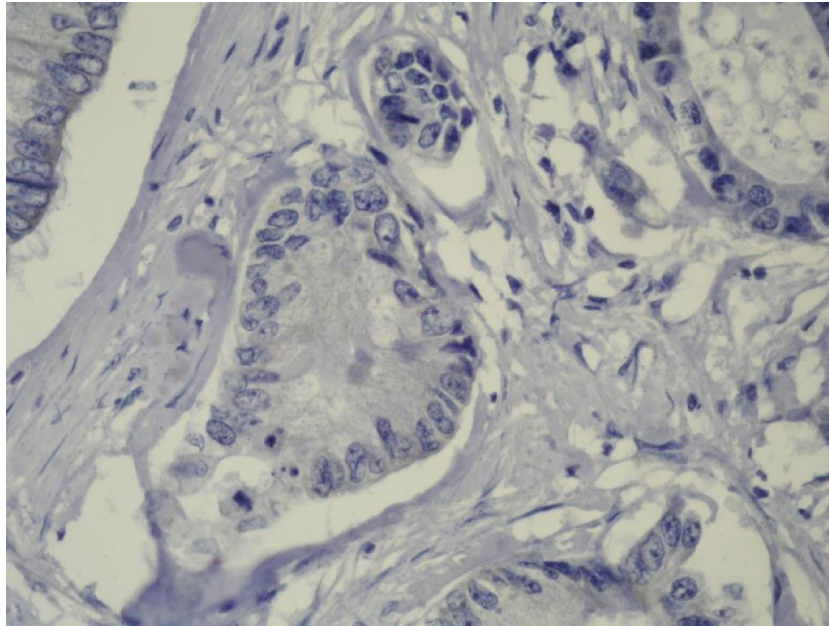


Figura 1 - Amostra de adenocarcinoma colorretal negativa para a marcação imunohistoquímica.

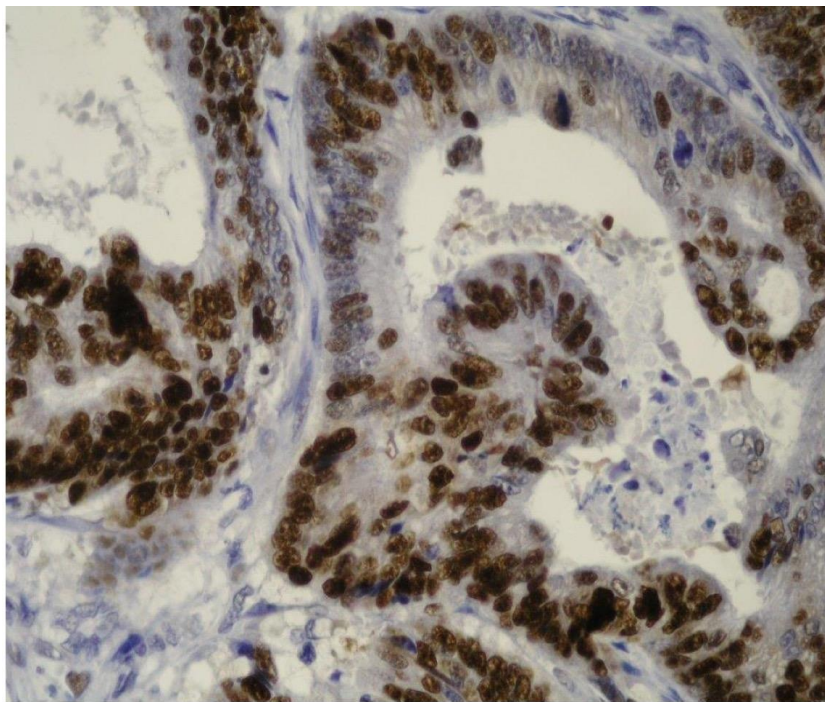


Figura 2 - Amostra de adenocarcinoma colorretal com 50% de células positivas para a marcação imunohistoquímica.

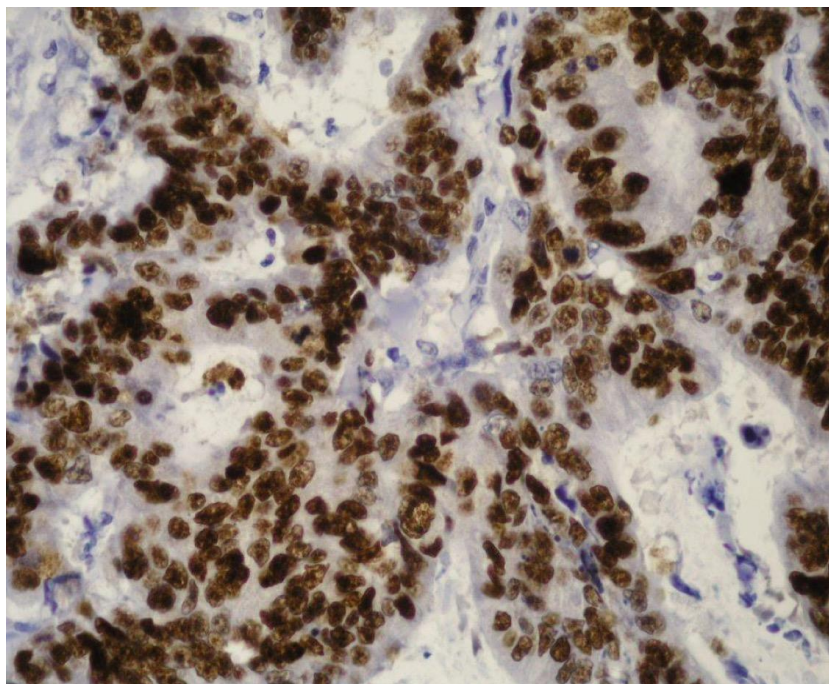


Figura 3 - Amostra de adenocarcinoma colorretal com 75% das células positivas

Baseou-se a investigação na relação entre a percentagem de células marcadas pelo bcl-2 e o prognóstico do cancro colorretal.

Os dados obtidos foram tratados e analisados nos programas Microsoft Office Excel® e IBM SPSS 22.0®.

Foram realizados o teste não paramétrico Teste U de Mann-Whitney para analisar a relação entre o prognóstico e percentagem de células positivas para a marcação imunohistoquímica e os testes de  $\chi^2$  e de Cramer para as variáveis localização do tumor e relação com o prognóstico e grau de diferenciação e relação com o prognóstico.

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

## Resultados

Foram estudados 30 pacientes submetidos à resseção curativa do adenocarcinoma colorretal no período de 2002 a 2005 no CHCB e, posteriormente, em 2011 foi verificada por via telefônica, a sobrevivência.

Numa primeira fase apresenta-se a caracterização da amostra em estudo.

Dos 30 pacientes analisado, 21 são do sexo Masculino (70%) e 9 do sexo Feminino (30%),

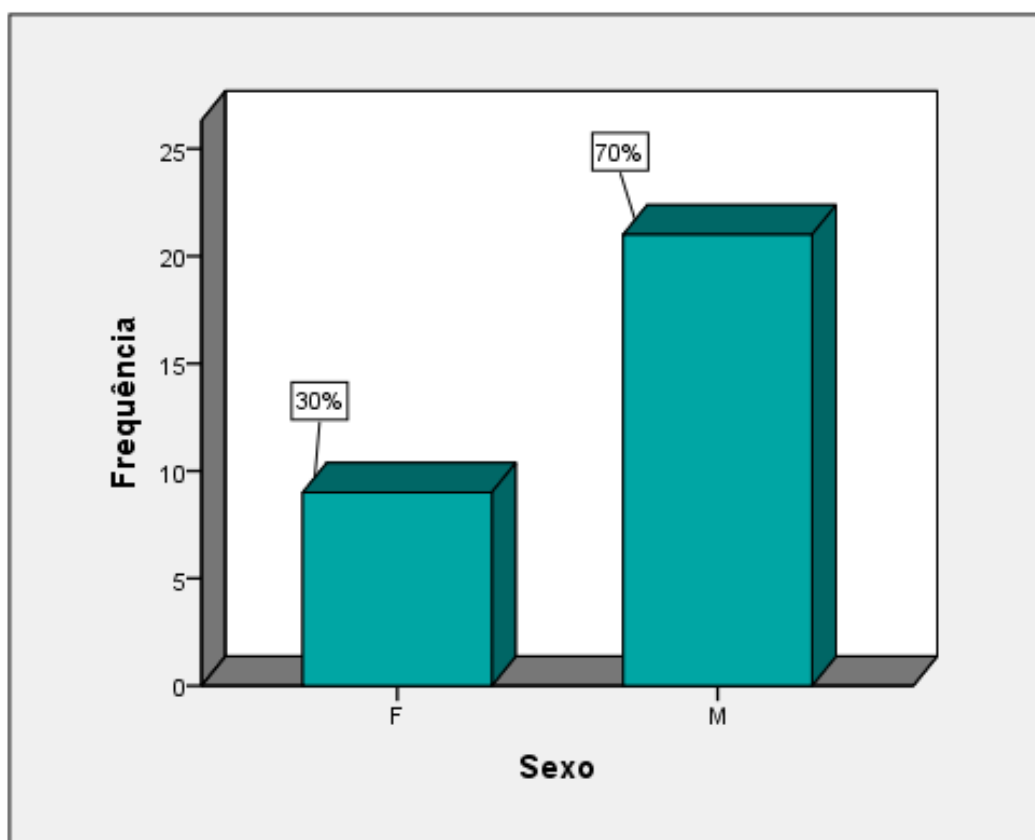


Gráfico 1 - Distribuição por sexo da população estudada

Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 em adenocarcinoma do cólon e reto e sua correlação com os graus de diferenciação e localização do respetivo tumor

A amostra foi dividida em quatro grupos etários.

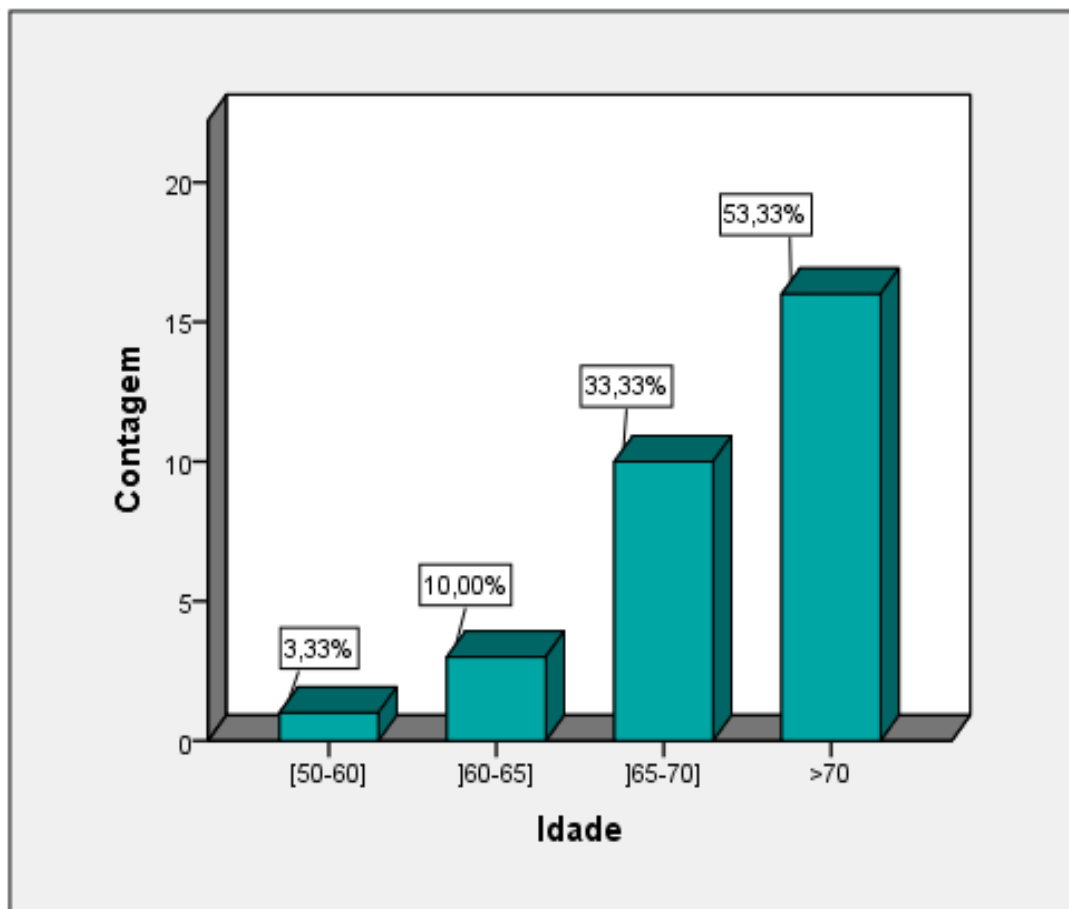


Gráfico 2 - Distribuição por grupo etário da população estudada

Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 em adenocarcinoma do cólon e reto e sua correlação com os graus de diferenciação e localização do respetivo tumor

Foi anotada a localização das peças ressecadas, sendo que 2 localizavam-se no cólon ascendente (7%), 1 colon no transverso (3%), 6 cólon no descendente (20%), 10 no sigmoide (33%) e, por fim, 11 no reto (37%).

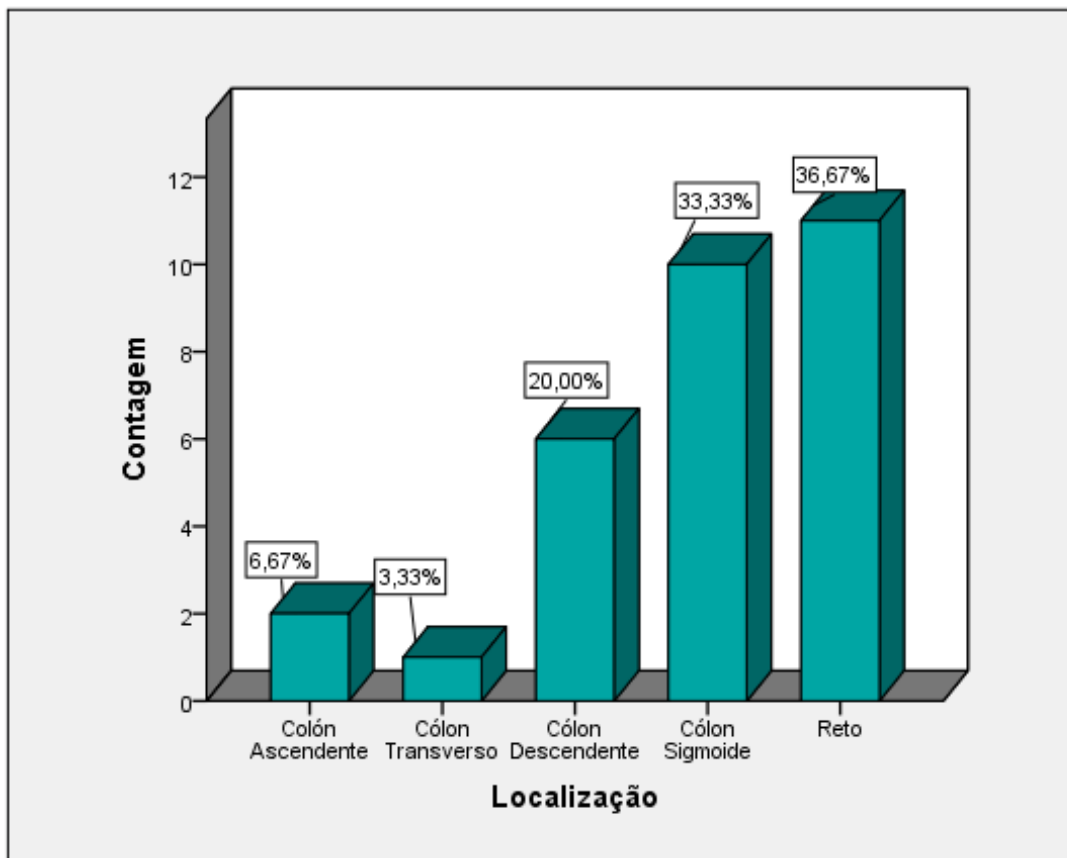


Gráfico 3 - Distribuição por localização

Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 em adenocarcinoma do cólon e reto e sua correlação com os graus de diferenciação e localização do respetivo tumor

Cada lâmina foi analisada quanto ao grau de diferenciação do adenocarcinoma, sendo que 9 (30%) eram bem diferenciados, 17 (57%) moderadamente diferenciados e 4 (13%) pouco diferenciados.

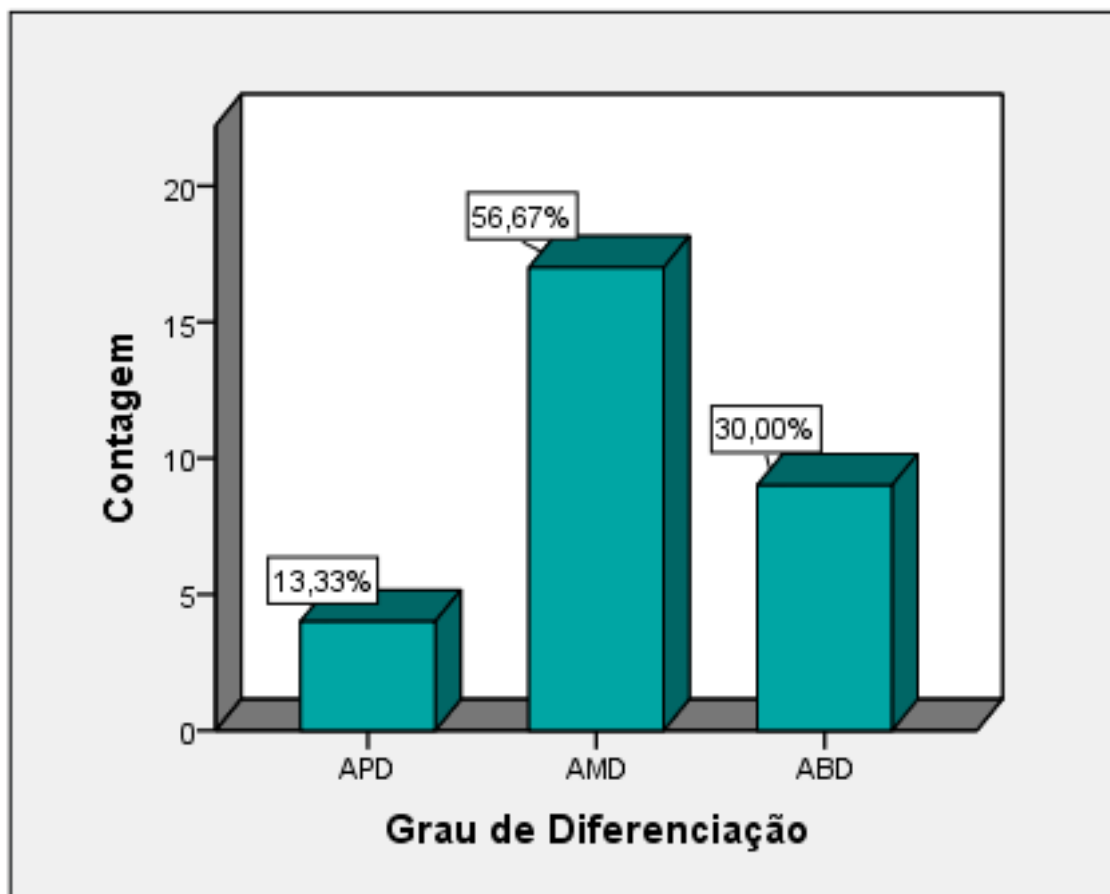


Gráfico 4 - Distribuição por grau de diferenciação do adenocarcinoma

Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 em adenocarcinoma do cólon e reto e sua correlação com os graus de diferenciação e localização do respetivo tumor

Com o recurso às técnicas de imunohistoquímica, verificou-se que 14 amostras eram negativas para Bcl-2 (47%) e as restantes 16 positivas (53%). Entre as positivas, observou-se que 6 tinham 25% de células marcadas (20%), 6 com 50% (20%), 4 com 75% (13%) e nenhum caso com 100% de marcação.

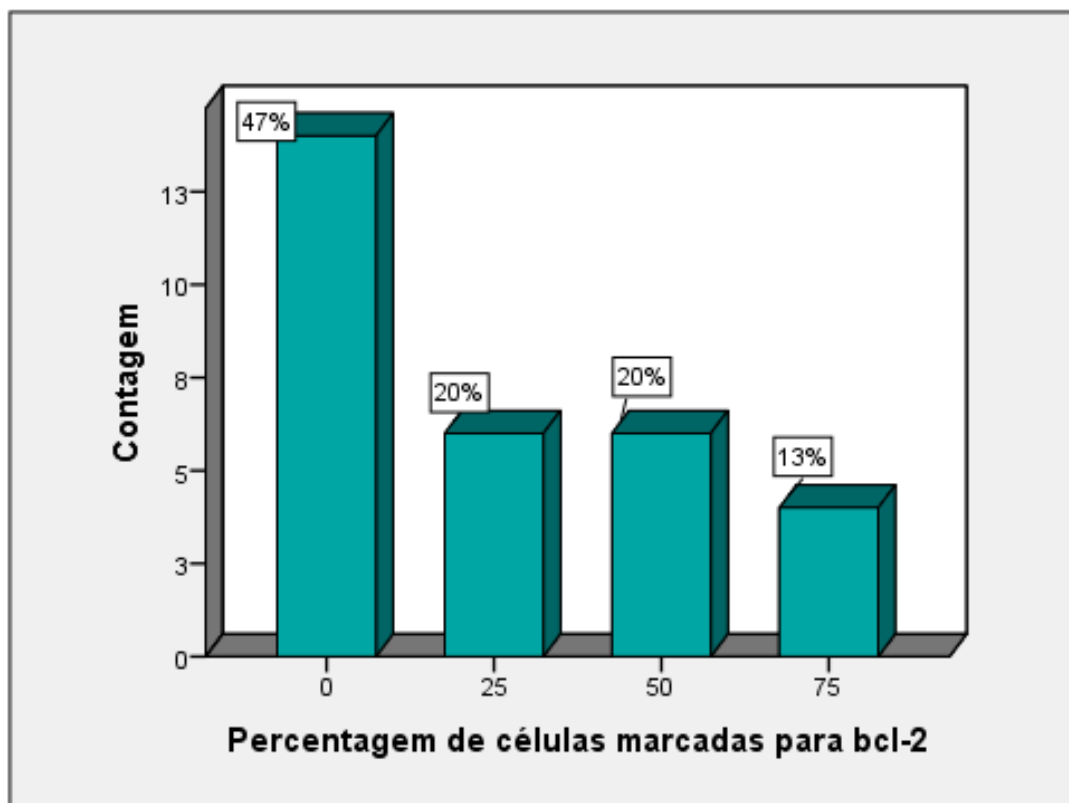


Gráfico 5 - Distribuição dos casos por percentagem de células marcadas para bcl-2

Com base nos dados recolhidos relativamente à sobrevivência do paciente, constatamos que em 2011 16 pacientes estavam vivos (59,3%) e 14 pacientes morreram (46,7%).

Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 em adenocarcinoma do cólon e reto e sua correlação com os graus de diferenciação e localização do respetivo tumor

Nesta segunda fase apresenta-se a análise estatística para testar as hipóteses definidas no estudo.

A primeira hipótese colocada, verificamos pelo teste não paramétrico Teste U de Mann-Whitney e Cramer que se rejeita a hipótese nula, com um  $p=0,02$ , ou seja existe correlação entre o marcador bcl-2 e o prognóstico do paciente.

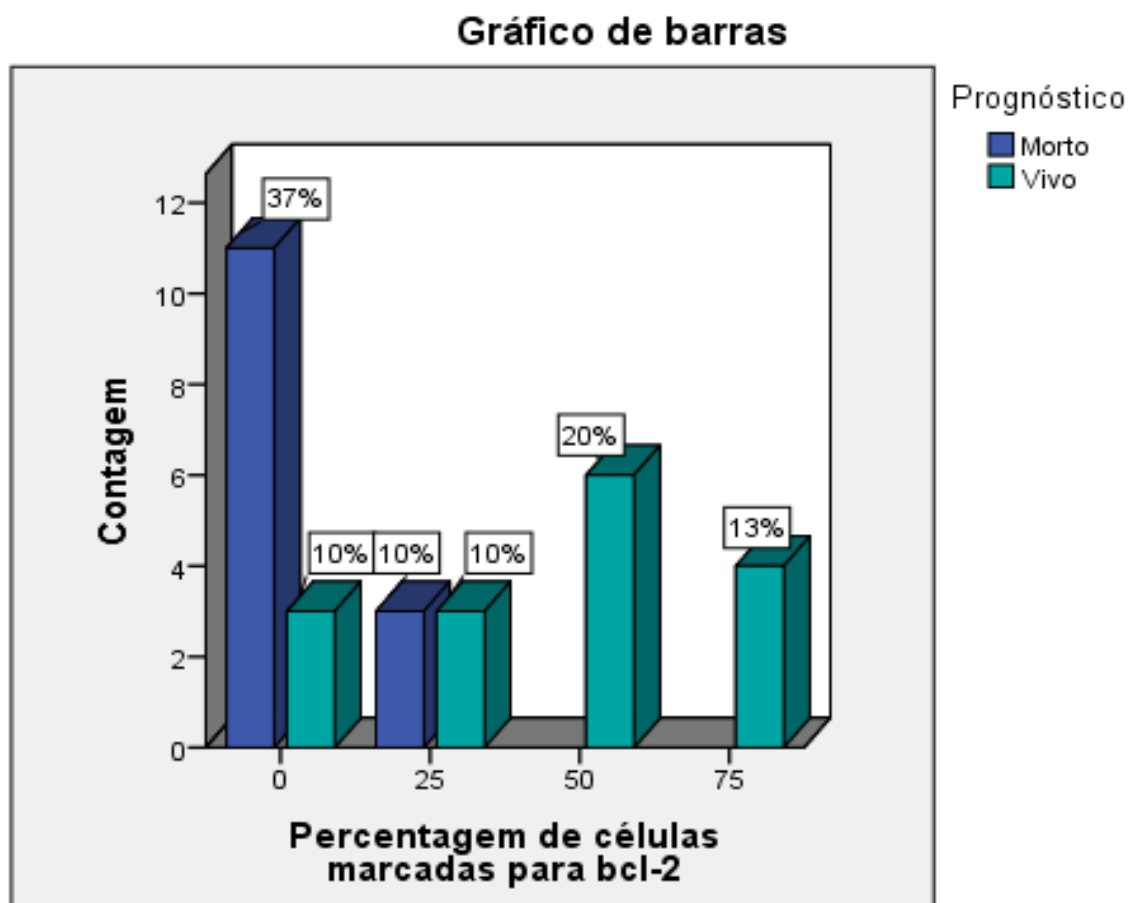


Gráfico 6 - Relação entre a percentagem de células marcadas para bcl-2 e o prognóstico do paciente.

A segunda hipótese colocada foi rejeitada pelos testes de  $\chi^2$  e de Cramer ( $p=0,292$ ), sendo que não existe correlação estatisticamente significativa entre o grau de diferenciação do tumor e o prognóstico do paciente.

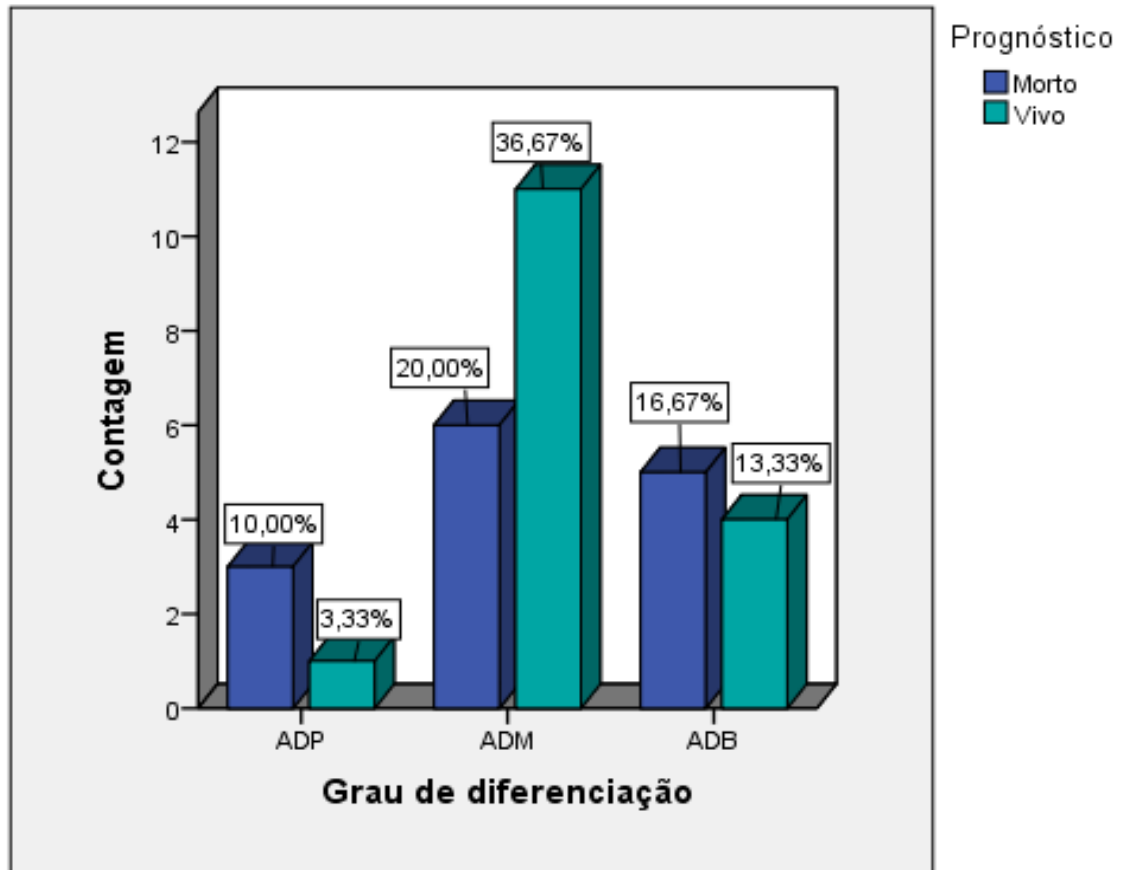


Gráfico 7 - Relação entre o grau de diferenciação do adenocarcinoma e o prognóstico clínico patológico.

Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 em adenocarcinoma do cólon e reto e sua correlação com os graus de diferenciação e localização do respetivo tumor

Relativamente à terceira hipótese constata-se pelos testes de  $\chi^2$  e de Cramer que não existe correlação estatisticamente significativa entre a localização e o prognóstico clínico patológico ( $p=0,563$ ).

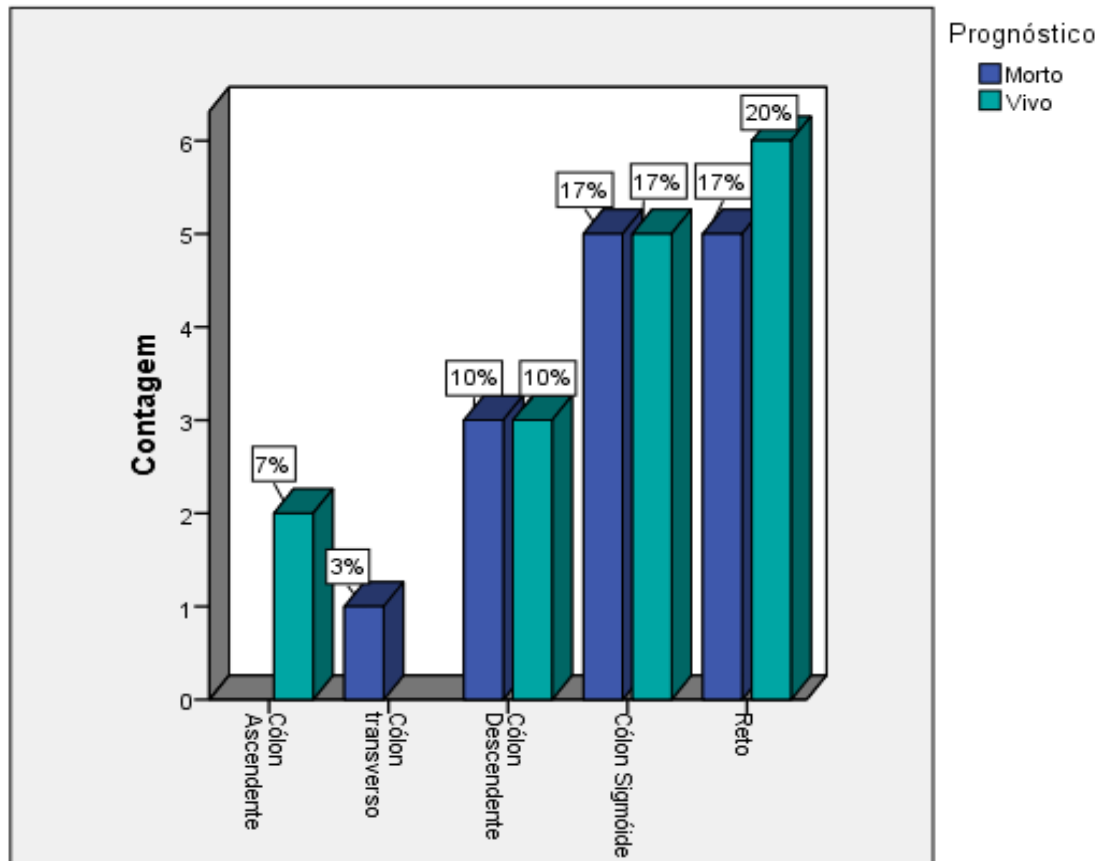


Gráfico 8 - Relação entre a localização do tumor e o prognóstico do paciente.

## Discussão

Atualmente, o estadiamento do adenocarcinoma colorretal baseia-se no sistema anatomopatológico, TNM, a partir do qual se tiram ilações acerca do prognóstico e decisões terapêuticas. Com base neste sistema, os indivíduos com adenocarcinomas em estadios iniciais que realizaram uma cirurgia potencialmente curativa são dispensados da realização de quimioterapia adjuvante. No entanto cerca de 20 a 30% apresenta recorrência da neoplasia.<sup>11</sup> Por outro lado, alguns pacientes iniciam o tratamento de quimioterapia desnecessariamente. Assim, devido a elevadas discrepâncias no desenvolvimento clínico dentro do mesmo estágio, existe necessidade de identificar melhores marcadores de prognóstico de forma a individualizar a terapia, evitando assim o sub e sobre tratamento.<sup>15</sup>

Uma das áreas em que tem vindo a ser alvo de investigações é a dos marcadores tumorais. A identificação das alterações genéticas que são responsáveis pela carcinogénese podem criar um novo sistema de estadiamento baseado na biologia molecular, que aumentaria a acurácia em prever o prognóstico e, conseqüentemente selecionar terapias. A acrescentar, a identificação de marcadores moleculares que determinam o comportamento e agressividade do tumor é importante para o desenvolvimento de terapias para os cancros. No entanto, até agora foram apenas identificados poucos marcadores com relevância prognóstica. A maior barreira é a multiplicidade de proto oncogenes, genes supressores de tumor e antigénios oncofetais com contribuições relativas para a progressão tumoral e metástase. A melhor forma de compreender o comportamento e agressividade tumoral é através de técnicas de imunohistoquímica.<sup>11</sup>

A amostra analisada é formada por todos os pacientes submetidos à resseção do adenocarcinoma do cólon e reto no CHCB no período de 2001 a 2003.

Dos 30 casos analisados, a maioria é do sexo masculino (70%) e com idades superiores a 65 anos (87%).

A prevalência ano sexo masculino está de acordo com os dados epidemiológicos. A incidência desta neoplasia aumenta com a idade e, no estudo, 90% dos pacientes têm mais de 50 anos.

Em relação à localização e grau de diferenciação do tumor, a maioria dos tumores encontram-se no cólon sigmoide (33%) e reto (97%), e são essencialmente moderadamente bem diferenciados (56,67%), seguido de bem diferenciados (30%) e por fim pouco diferenciados (13,33%)

É de elevada relevância conhecer a localização do tumor, visto que existem diferenças na anatomia e fisiologia do cólon antes e depois da flexura esplénica, conseqüentemente na epidemiologia, comportamento clínico, tumorigénese e aspetos histopatológicos do tumor. Tal

como apresentado na literatura, a maioria dos tumores localiza-se no colon distal, nomeadamente colon sigmoide e reto. No que concerne ao grau de diferenciação, os sistemas de classificação são baseados na formação glandular e são subjetivo, na medida em que dependem da experiência do observador, por isso têm relevância limitada.<sup>16</sup>

Neste estudo, não se verificou correlação estatisticamente significativa entre o grau de diferenciação do tumor e o prognóstico do paciente, e a localização do tumor e o prognóstico tal como acima referido. No entanto, verificou-se uma correlação estatisticamente significativa,  $p=0,002$ , entre o bcl-2 e o prognóstico do paciente, sendo que uma expressão aumentada do bcl-2 está relacionada com uma maior sobrevivência e melhor prognóstico. Assim sendo, pensa-se que a expressão do bcl-2 está associada a uma fase mais precoce da carcinogénese.<sup>12</sup>

Na literatura existem diversos estudos que corroboram a hipótese acima mencionada, de a expressão de bcl-2 estar relacionada com um prognóstico mais favorável, o que sugere que a transformação neoplásica relacionada com a inibição da apoptose resulta em tumores menos agressivos. Assim, uma diminuição na expressão deste marcador leva à progressão do tumor. Por outro lado, existem alguns estudos que não confirmam esta hipótese ou, por outro lado, estão inversamente relacionados.<sup>16,17</sup>

## Limitações futuras

Os resultados do estudo apresentado são consonantes com a maioria da literatura sobre o tema. No entanto, esta investigação tem diversas limitações entre as quais, a amostra reduzida (apenas 30 casos); a ausência de critérios de exclusão, como é o caso de ter concomitantemente outra patologia; a ausência de informação acerca da realização posterior de terapias adjuvante; e a limitação em atribuir a causa de morte à neoplasia do cólon e reto.

Por outro lado, o Bcl-2 é apenas um dos marcadores que influencia a tumorigénese, sendo que teria elevada relevância realizar um estudo de associação com outros marcadores.

## Conclusões

Em suma, verificamos uma relação entre a expressão do Bcl-2 e o prognóstico do paciente, sendo que uma maior expressão está relacionada a um prognóstico mais favorável. No entanto não se verificou relação significativa entre a localização do tumor e o prognóstico ou o grau de diferenciação e o prognóstico.

Apesar das limitações referidas anteriormente, os resultados obtidos estão de acordo com o esperado, sendo então este estudo mais um elemento que favorece a utilização do marcador Bcl-2 na prática clínica permitindo então determinar de forma mais económica e precisa, o risco individual dos pacientes com adenocarcinoma do cólon e reto após cirurgia e determinar o que beneficiariam de quimioterapia adjuvante.

## Referências

1. Oliveira LA De, Artigiani-Netoricardo R, Waisberg DR, Fernandes LC, Lima FDO, Waisberg J. NM23 Protein expression in colorectal carcinoma using TMA (tissue microarray): Association with metastases and survival. *Arq Gastroenterol.* 2010;47(4):361-367. doi:10.1590/S0004-28032010000400008.
2. Fact Sheets by Cancer. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx?cancer=colorectal](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=colorectal). Accessed December 29, 2015.
3. Colorectal cancer statistics | World Cancer Research Fund International. <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/colorectal-cancer-statistics>. Accessed December 29, 2015.
4. Cancer prevention and early detection. *Semin Oncol Nurs.* 1986.
5. Zhao D, Ding X, Peng J, Zheng Y, Zhang S. Prognostic significance of bcl-2 and p53 expression in colorectal carcinoma. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2005;6(12):1163-1169. doi:10.1631/jzus.2005.B1163.
6. Conlin a, Smith G, Carey F a, Wolf CR, Steele RJC. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut.* 2005;54:1283-1286. doi:10.1136/gut.2005.066514.
7. CDC - What Are the Risk Factors for Colorectal Cancer? [http://www.cdc.gov/cancer/colorectal/basic\\_info/risk\\_factors.htm](http://www.cdc.gov/cancer/colorectal/basic_info/risk_factors.htm). Accessed December 29, 2015.
8. Colon cancer Risk factors - Mayo Clinic. <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/colon-cancer/basics/risk-factors/con-20031877>. Accessed December 29, 2015.
9. Fenoglio-preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. on Cancer American Joint Committee on. 2000.
10. Tollenaar RA, van Krieken JH, van Slooten HJ, et al. Immunohistochemical detection of p53 and Bcl-2 in colorectal carcinoma: no evidence for prognostic significance. *Br J Cancer.* 1998;77(11):1842-1847. doi:10.1038/bjc.1998.306.
11. Menezes HL De, Jucá MJ, Gomes EGD a, Nunes BLBBP, Costa HO, Matos D. Artigo Original / Original Article Analysis of the Immunohistochemical and Their Correlations With the Prognostic Factors. *Arq Gastroenterol.* 2010;(2):141-147.
12. Guzińska-ustymowicz K, Pryczynicz A. Correlation between Proliferation Markers : PCNA , Ki-67 , MCM-2 and Antiapoptotic Protein Bcl-2 in Colorectal Cancer. 2009;3052:3049-3052.
13. Kaklamanis L, Savage A, Whitehouse R, et al. Bcl-2 protein expression: association with p53 and prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1998;77(11):1864-1869. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2150362&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

14. Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*. 2008;27(50):6398-6406. doi:10.1038/onc.2008.307.
15. Resnick MB, Routhier J, Konkin T, Sabo E, Pricolo VE. Epidermal Growth Factor Receptor , c-MET ,  $\beta$ -Catenin , and p53 Expression as Prognostic Indicators in Stage II Colon Cancer : A Tissue Microarray Study. 2004;10(401):3069-3075.
16. Gaco V, Porschen R, Gregor M, Klump B. Studies on p53 , BAX and Bcl-2 protein expression and microsatellite instability in stage III ( UICC ) colon cancer treated by adjuvant chemotherapy : major prognostic impact of proapoptotic. 2007;(April):1409-1418. doi:10.1038/sj.bjc.6603728.
17. Poincloux L, Durando X, Seitz JF, et al. Loss of Bcl-2 expression in colon cancer: A prognostic factor for recurrence in stage II colon cancer. *Surg Oncol*. 2009;18(4):357-365. doi:10.1016/j.suronc.2008.09.003.

## Anexos

### Anexo I

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

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

Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 em adenocarcinoma do cólon e reto e sua correlação com os graus de diferenciação e localização do respetivo tumor

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''