



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 no adenocarcinoma do cólon e a sua correlação com a localização do tumor, TNM, e tipo histológico

Pedro Fernandes Moura

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

Orientador: Prof. Doutor Francisco Javier Munoz

Covilhã, Março de 2018

Agradecimentos

Ao Prof. Doutor Javier que permitiu que esta tese fosse elaborada através do seu trabalho de investigação, assim como pela sua orientação na concretização do texto final deste trabalho. Muito obrigado.

Aos meus pais, que desde o início me apoiaram e me deram a oportunidade de poder mostrar as minhas capacidades no mestrado integrado, e, conseqüentemente, permitiram a criação deste trabalho.

Resumo

Introdução: O bcl-2 é um gene que codifica um conjunto de proteínas com funções pró-apoptóticas e anti-apoptóticas. A proteína BCL-2 é uma dessas proteínas e, quando em níveis mais elevados pode promover imunidade celular à apoptose.

Associando estas capacidades neoplásicas da BCL-2 ao adenocarcinoma do cólon, um dos mais frequentes carcinomas no país e uma séria causa de morbilidade em Portugal, foi realizado um estudo em 29 pacientes a quem foi realizada cirurgia curativa de excisão de adenocarcinoma do cólon no CHCB.

Objetivo: Verificar se a presença da oncoproteína BCL-2 em células neoplásicas é um fator preditivo do prognóstico, verificando também se é preditivo do estadiamento, localização e diferenciação celular no adenocarcinoma colorretal.

Método: Serão estudados 29 pacientes com Adenocarcinoma Colorretal, submetidos a excisão cirúrgica com intenção curativa entre 2003 e 2005. Estes doentes foram sujeitos a um follow-up pós-operatório, nos 10 anos seguintes.

As amostras neoplásicas foram estudadas relativamente à sua localização e classificação TNM. Além disso, amostras foram sujeitas a um protocolo definido pelo Hospital Pêro da Covilhã de estudo imunohistoquímico da marcação da proteína Bcl-2. Posteriormente, as amostras foram classificadas de acordo com a intensidade e percentagem de células marcadas. Ao longo do estudo as amostras foram também classificadas de acordo com o seu grau de diferenciação histológico.

Com estes dados pretende-se realizar um estudo estatístico que tenta avaliar se existe uma correlação entre a marcação histoquímica de bcl-2 e o prognóstico do cancro colorretal, utilizando $p=0.05$ como significativamente estatístico.

Palavras-chave

Cancro colorretal; bcl-2; Prognóstico; Adenocarcinoma colorretal; imunohistoquímica.

Abstract

Introduction: bcl-2 is a gene that codifies a group of proteins with pro-apoptotic and anti-apoptotic functions. BCL-2 protein is one of those and, when produced in higher levels, may promote cell immunity to apoptosis.

Translating this BCL-2 neoplastic functions to colon adenocarcinoma, one of the most frequent cancers in the country and a serious morbidity cause in Portugal, a study was realized about 29 patients, to whom was realized a curative colon adenocarcinoma excision surgery.

Objective: Verify if the the BCL-2 protein presence in neoplastic cells is a predictive factor of the prognosis, verifying also if it predicts cell staging, lesion location and cell differentiation in colorectal adenocarcinoma.

Method: 29 patients with colorectal adenocarcinoma and subject to cure intendeded cirurgic excision from the year 2003 to 2005 will be studied. These patients were subjeti to a 10 years pos-op follow-up.

Neoplastic samples were studied about its colon location and TNM classification. Also, these samples underwent an immunohistochemical marking protocol defined by Hospital Pêro da Covilhã to mark the protein Bcl-2. Afterwards they were classified according the intensity and percentage of marked cells. Cells from the samples were also studied about its histological differentiation.

With this data, there will be realized a statistic study trying to evaluate if there is a correlation between immunohistochemical marking of Bcl-2 and the prognosis of colorectal adenocarcinoma, using $p=0.05$ as statistical reference.

Keywords

Colorectal cancer; bcl-2; colorectal adenocarcinoma; immunohistochemistry.

Índice

1. Introdução	1
Hipóteses a testar	2
2. Material e Métodos	3
Estudo anatomopatológico	3
Estudo estatístico	5
3. Resultados	7
4. Discussão	15
Fatores limitantes	17
5. Conclusão	19
Bibliografia	21
Anexos	23

Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 no adenocarcinoma do cólon e a sua correlação com a localização do tumor, TNM, e tipo histológico

Lista de Figuras

Figura 1 - Amostra bem diferenciada com boa diferenciação glandular	9
Figura 2 - Amostra moderadamente diferenciada	9
Figura 3 - Amostra mal diferenciada	9

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição da amostra segundo a variável "género"	7
Gráfico 2 - Distribuição da amostra segundo a variável "idade"	7
Gráfico 3 - Distribuição da amostra segundo a variável "localização"	8
Gráfico 4 - Distribuição da amostra segundo a variável "diferenciação histológica"	8
Gráfico 5 - Distribuição da amostra segundo a variável "estadiamento"	10
Gráfico 6 - Distribuição da amostra segundo a variável "percentagem de expressão de Bcl-2"	10
Gráfico 7 - Distribuição da amostra segundo a variável "Intensidade de marcação por Bcl-2"	11

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Relação entre a percentagem de expressão de Bcl-2 e a variável "localização"	11
Tabela 2 - Relação entre a percentagem de expressão de Bcl-2 e a variável "localização"	11
Tabela 3 - Relação entre a percentagem de Expressão do bcl-2 e a variável "diferenciação histológica"	12
Tabela 4 - Relação entre a intensidade de marcação por Bcl-2 e a variável "diferenciação histológica"	12
Tabela 5 - Relação entre a percentagem de Expressão do bcl-2 e a variável "estadiamento"	13
Tabela 6 - Relação entre a intensidade de marcação por Bcl-2 e a variável "estadiamento"	13
Tabela 7 - Relação entre a percentagem de Expressão do Bcl-2 e a variável "prognóstico"	13
Tabela 8 - Relação entre a intensidade de marcação por Bcl-2 e a variável "prognóstico"	14

Lista de Acrónimos

AB1	Anticorpo primário
AB2	Anticorpo secundário
ABD	Adenoma bem diferenciado
AMD	Adenoma moderadamente diferenciado
APD	Adenoma pouco diferenciado
Bcl-2	Proteína Bcl-2
BCL-2	Família de proteínas BCL-2
bcl-2	Gene bcl-2
BUF	Soluções de lavagem
CA	Cólon ascendente
CD	Cólon descendente
CHCV	Centro Hospitalar Cova da Beira
CT	Cólon transversal
DAB	Diaminobenzidina (cromogéneo)
F	Feminino
GRP	Gabinete de Relações Públicas
HPBK	Bloqueio da peroxidase endógena
HRP	Streptavidin peroxidase
M	Masculino
PAD	“esponjas”
R	Reto
RR	Risco Relativo
S	Cólon sigmoide
UBI	Universidade da Beira Interior

1. Introdução

O cancro colorretal é uma das mais frequentes patologias neoplásicas no mundo, sendo uma considerável causa de mortalidade e morbidade¹. Em Portugal, é responsável por 11655 anos potenciais de vida perdidos por causas de morte selecionadas, sendo a 7ª maior causa de perda nesta categoria. Na generalidade, é o 3º tipo de neoplasia maligna mais frequente, sendo mais comum no homem (57,1 por 100000 habitantes) do que na mulher (39,0 por 100000 habitantes)¹.

Relativamente aos fatores de risco, são vários os que podem predispor ao surgimento de lesões carcinogénicas. A idade é um destes fatores, na medida em que >90% dos carcinomas colorretais surgem em pessoas com mais 50 anos de idade, assim como pelo facto da incidência desta doença ser 50 vezes superior em pessoas de idade compreendida entre 60 e 79 anos, comparativamente a pessoas de <40 anos. Além da idade, a história pessoal ou familiar de pólipos adenomatosos, e história pessoal de doença inflamatória intestinal fazem parte do conjunto de fatores de risco não modificáveis desta doença. Por outro lado, são fatores de risco modificáveis, as dietas ricas em gordura, especialmente a gordura animal, a falta de atividade física, a obesidade e a existência de hábitos etílicos e tabágicos².

O cancro colorretal abrange vários subtipos histológicos de neoplasia. Sabe-se, no entanto, que mais de 90% dos carcinomas colorretais são adenocarcinomas³.

De acordo com a classificação histológica do adenocarcinoma, o tecido pode ser classificado em bem diferenciado (contendo >95% de forma glandular), mediantemente diferenciado (>50% e <95% de forma glandular), e mal diferenciado (<50% de forma glandular). De uma forma geral, 70% dos adenocarcinomas são classificados como moderadamente diferenciados, equivalendo uma percentagem de 10% aos bem diferenciados e 20% aos mal diferenciados³. Existem de momento, vários modos de avaliar o prognóstico e evolução da doença. A principal forma usada atualmente é a classificação TNM (Tissue Node Metastasis classification) da International Union Against Cancer (UICC)^{4,5}.

Além da classificação TNM, outros tipos de estudo já são realizados para estudar a gravidade e evolução da doença. Um desses tipos de estudo, é o estudo por imunohistoquímica, que no caso do adenocarcinoma do cólon, usa mais frequentemente os marcadores tumorais Citoqueratina 20 (CK20), Citoqueratina 7 (CK7) e o CDX2^{3,6}.

Com vista na melhoria da qualidade deste tipo de estudos, devem ser encontrados marcadores cada vez mais seguros e específicos para a classificação do prognóstico da doença.

Através da análise do mecanismo de apoptose celular, verifica-se que a família de proteínas BCL-2, tem um papel essencial para a promoção ou inibição do processo. Desta forma, sabendo que a capacidade de evasão do processo natural de apoptose celular é uma importante característica das células neoplásicas⁵, surgiu bastante interesse na comunidade científica em relação à presença ou não destas proteínas em células tumorais, assim como à maneira como estas influenciavam ou não o prognóstico da doença neoplásica⁷.

A família de proteínas BCL-2 compreende tanto elementos pró-apoptóticos, como anti-apoptóticos. O gene *bcl-2*, responsável pela tradução desta família de proteínas foi inicialmente descoberto através do estudo da translocação cromossômica t(14:18) no Linfoma Folicular de células B⁸. De entre os vários elementos da família BCL-2, este estudo aborda diretamente a proteína Bcl-2.

A proteína Bcl-2 tem uma função anti apoptótica, e, como tal, quando sobreexpressa, como no caso da translocação t(14:18), em que o gene passa a estar sobre o controlo transcricional das regiões reguladoras do controlo transcricional do gene da cadeia pesada de imunoglobulina (IGH), se possa dar a formação de células resistentes à apoptose^{8,9}.

Alguns artigos chegam mesmo a afirmar que a desregulação da via intrínseca de apoptose é dos eventos mais importantes na carcinogénese, e, conseqüentemente, a Bcl-2 terá um papel preponderante neste processo⁷.

Outros, defendem que esta pode influenciar a proliferação da doença, assim como pode ajudar a determinar, não só o tipo de tratamento a aplicar, assim como o risco de recorrências após o mesmo^{8,10}.

Hipóteses a testar

Verificar se existe correlação entre a sobreexpressão da oncoproteína Bcl-2 e a localização do adenocarcinoma do cólon.

Verificar se existe correlação entre a sobreexpressão da oncoproteína Bcl-2 e a diferenciação histológica do adenocarcinoma do cólon.

Verificar se existe correlação entre a sobreexpressão da oncoproteína Bcl-2 e a classificação TNM do adenocarcinoma do cólon.

Verificar se existe correlação entre a sobreexpressão da oncoproteína Bcl-2 no adenocarcinoma do cólon e o prognóstico da doença.

2. Material e Métodos

Para realizar este estudo foram utilizados 29 casos de pacientes com adenocarcinoma do cólon do Centro Hospitalar Cova da Beira (CHCV).

Estes foram submetidos a resseção cirúrgica curativa entre o ano 2003 e 2005, e, posteriormente foram seguidos durante 10 anos, analisando-se a sobrevivência de cada indivíduo. O estudo da sobrevivência dos pacientes em relação à data de realização da cirurgia é feito em meses.

Para caracterização dos pacientes, foram recolhidos dados relativos ao sexo e idade dos mesmos, sendo que dos 29 pacientes, 20 (68.97%) são do sexo masculino e 9 (31.03%) são do sexo feminino. Em relação à idade, os doentes foram divididos em 4 grupos: Grupo 1 dos 50 aos 60 anos de idade; Grupo 2 dos 60 aos 65 anos de idade; Grupo 3 dos 65 aos 70 anos de idade; e Grupo 4 com 70 ou mais anos de idade.

Para caracterização das lesões neoplásicas excisadas para o estudo, foram determinadas características como a localização da lesão, estadiamento TNM e nível diferenciação. Além disso, foi também realizado um estudo de imunohistoquímica para verificar a percentagem de células marcadas com BCL-2 assim como a intensidade de células marcadas pelo mesmo marcador.

Em relação à localização dos carcinomas, 2 localizavam-se no cólon ascendente, 1 no cólon transversal, 6 no cólon descendente, 10 no sigmoide e 10 no reto.

Por fim, a preparação das amostras, assim como a coloração com Hematoxilina e Eosina e a realização do estudo de imunohistoquímica para deteção de BCL-2, foi realizada no laboratório de Anatomia Patológica do CHCB, segundo os protocolos Anexo 1, 2 e 3 respetivamente.

Estudo anatomopatológico

O processo de preparação anatomopatológica começou logo após a excisão cirúrgica da lesão, sendo a amostra preservada em formaldeído a 10% até ser enviada e analisada em laboratório. Aí, foi realizada inicialmente uma descrição macroscópica da peça, evidenciando o tamanho, consistência, cor e a presença ou não de lesão macroscópica. De seguida foram escolhidas da peça partes de tecido provenientes da: lesão tumoral, zona de transição entre tecido normal e lesado, margem cirúrgica e do tecido normal para continuar o seu processamento.

Estas amostras foram desidratadas através da desidratação em soluções de concentração sucessivamente maior de etanol, sendo depois realizada uma diafinização com Xilol durante 2 horas, tal como descrito no Anexo 1.

O próximo passo foi colocar as cassetes no processador de tecido (Hipercenter XP), para serem impregnadas em parafina durante 4 horas, sendo posteriormente arrefecidas no

aparelho de inclusão Microm, a temperaturas entre -10° e -15°C . Quando arrefecido e perfeitamente solidificado, o bloco de parafina foi então cortado num micrótomo em peças de 2 a 3 μm de espessura, passíveis de colocar em lâminas. A colocação em lâminas foi realizada a uma temperatura de 60°C para permitir uma maior adesão da peça, sendo este processo realizado numa estufa durante a noite.

Após esta preparação, as peças a serem coradas com hematoxilina-eosina, seguiram o protocolo de reidratação e coloração descrito no Anexo 2.

As peças para análise de imunohistoquímica, seguiram um procedimento diferente de recuperação antigénica. Este procedimento começou com a desparafinização das peças com Xilol, seguindo-se uma hidratação com a imersão em soluções de etanol de cada vez menores concentrações. Finalizada a hidratação das peças, estas foram mergulhadas em EDTA 1mM e colocadas num Micro-ondas durante dois períodos de 10 minutos.

Por fim, acabada a recuperação antigénica por EDTA, as amostras foram colocadas e processadas na máquina de imunohistoquímica do CHCB. O procedimento de funcionamento da máquina encontra-se descrito no Anexo 3.

Na máquina de histoquímica o que se pretende realizar é uma deteção do antígeno Bcl-2 com um anticorpo primário NCL-L-bcl-2 (Novocastra), numa diluição de 1:25 em solução diluente (Dako Cytomation, ChemMate-Antibody Diluent, S.2022). O anticorpo primário é o clone Bcl-2/100/D5 obtido do sobrenadante de ratos de laboratório. De seguida, utilizou-se um anticorpo secundário biotilado de cabra anti-rato e anti-coelho (Dako REAL Tm Link, Biotinylated Secondary Antibodies) com o intuito de amplificar o sinal do cromogénio. Estando os dois anticorpos aplicados à amostra, utilizou-se uma solução bloqueadora da peroxidase endógena Dako REAL TM Peroxidase-Blocking-solution (Daki Denmark, S.2023) a qual permitiu aumentar a especificidade dos valores obtidos. Por fim, foi utilizado um complexo de estreptavidina peroxidase e diaminobenzidina (Dako REAL TM detection Sistem, Peroxidase/DAB+, K.5001), com o intuito de corar de forma acastanhada os cromogénios ativados pelos anticorpos, e, conseqüentemente, permitir a sua deteção à observação microscópica. É de se notar que a aplicação dos anticorpos e compostos descritos acima deve ser sempre intercalada com uma lavagem por Buffer Kit.

Para finalizar a coloração da amostra, foi utilizada a Hematoxilina de Mayer para criar um contraste da estrutura nuclear.

Estando finalizado o processo da máquina de histoquímica, as amostras nas lâminas foram novamente sujeitas a uma desidratação através de imersão em etanol de crescentes concentrações, e posteriormente em xilol, acabando depois por ser preparadas num meio de montagem sintético para tornar definitiva a preparação.

Deve-se notar que, para controlo dos resultados do anticorpo, foi utilizada uma amostra de amígdala sujeita ao mesmo processo referido acima.

Estando finalizada a preparação das lâminas, estas foram analisadas por 1 observadores ao microscópio ótico, com uma ampliação de 400x.

Com a observação à microscopia, pretendeu classificar-se a diferenciação glandular das células em bem diferenciadas, moderadamente diferenciadas, e mal diferenciadas. Note-se que numa amostra com vários graus de diferenciação celular, prevalece a classificação do tecido menos diferenciado.

No que toca à análise da presença ou não da proteína Bcl-2, as células foram classificadas segundo a percentagem de células coradas através do processo imunohistoquímico, e segundo a intensidade da coloração nas mesmas.

A percentagem de células com o sinal positivo foi classificada em 0%, 25%, 50%, 75% ou 100% de células coradas por imunohistoquímica.

A intensidade do sinal positivo foi classificada em -, +, ++, +++, correspondendo “-“ à ausência de marcação e “+++” ao sinal máximo possível de encontrar.

Estudo estatístico

Para a realização da análise estatística deste estudo foram utilizados os softwares Microsoft Office Excel 2016® e IBM SPSS 22.0®.

Inicialmente foi realizada uma análise univariada da estatística de frequências para caracterizar a amostra em relação às várias variáveis em estudo.

De seguida, recorreu-se ao teste exato de Fisher para analisar a associação estatística entre a marcação por Bcl-2 e as variáveis localização, grau de diferenciação histológica, estadiamento e prognóstico. O teste de Fisher é um teste não paramétrico que utiliza a distribuição do qui-quadrado para agrupar as frequências em tabelas de contingência. A opção pelo teste não paramétrico prendeu-se com o facto de as variáveis não apresentarem uma distribuição normal, conforme o teste Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,05$). Este teste é também apropriado quando a amostra é inferior a 20 e quando mais do que 20% das células têm frequência esperada inferior a 5 unidades¹¹.

Foi considerado o Intervalo de Confiança de 95%.

Foi também determinado o Risco Relativo de morte relativamente aos doentes com Expressão de Bcl-2 de 75% e Intensidade de +++ (grupos de controlo). Foi também calculado o RR de obter uma amostra pouco diferenciada (APD) nos doentes com Expressão da Bcl-2 inferior a 75% e Intensidade menor a +++, assim como de os pacientes morrerem em relação aos doentes com Expressão de Bcl-2 de intensidade +++ e percentagem de expressão de 75%. O RR foi calculado de acordo com Altman (1991)¹² segundo a expressão:

$$RR = \frac{\frac{a}{a+b}}{\frac{c}{c+d}}$$

Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 no adenocarcinoma do cólon e a sua correlação com a localização do tumor, TNM, e tipo histológico

3. Resultados

Da população de estudo, 20 (69%) pessoas eram do sexo masculino e 9 (31%) do sexo feminino.

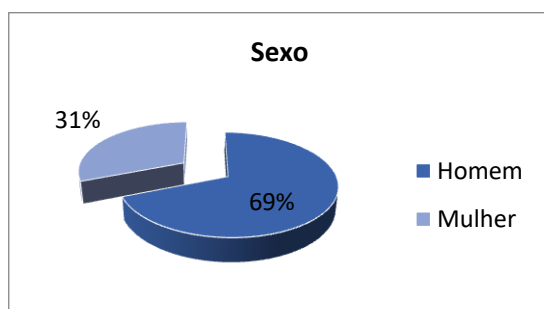


Gráfico 1 - Distribuição da amostra segundo a variável "género"

De acordo com a divisão etária proposta para estudo, 1 pessoa (3%) encontrava-se entre os 50 e 60 anos, 3 pessoas (10%), encontravam-se entre os 60 e 65 anos, 10 pessoas (34%) encontravam-se entre os 65 e os 70 anos, e 15 pessoas (52%) tinham 70 ou mais anos de idade.

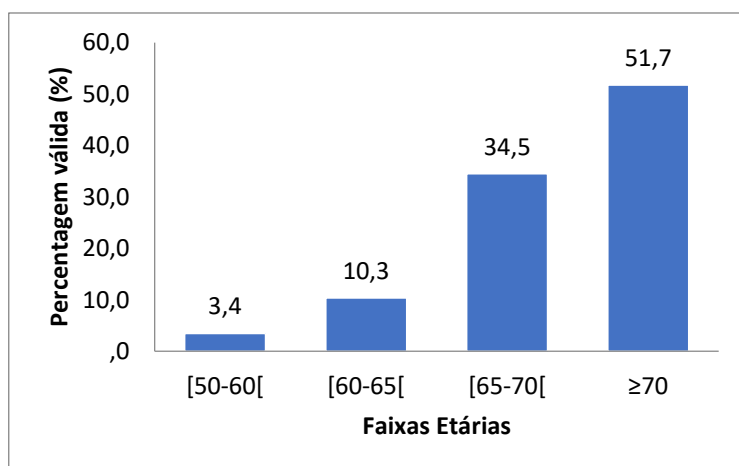


Gráfico 2 - Distribuição da amostra segundo a variável "idade"

Relativamente à localização do adenocarcinoma do cólon, 2 pessoas (7%) tinham lesão no cólon ascendente, 1 pessoa (3%) tinha lesão no cólon transversal, 6 pessoas (21%) tinham lesão no cólon descendente, 10 pessoas (34%) tinham lesão no cólon sigmoide e outras 10 (34%) tinham lesão no reto.

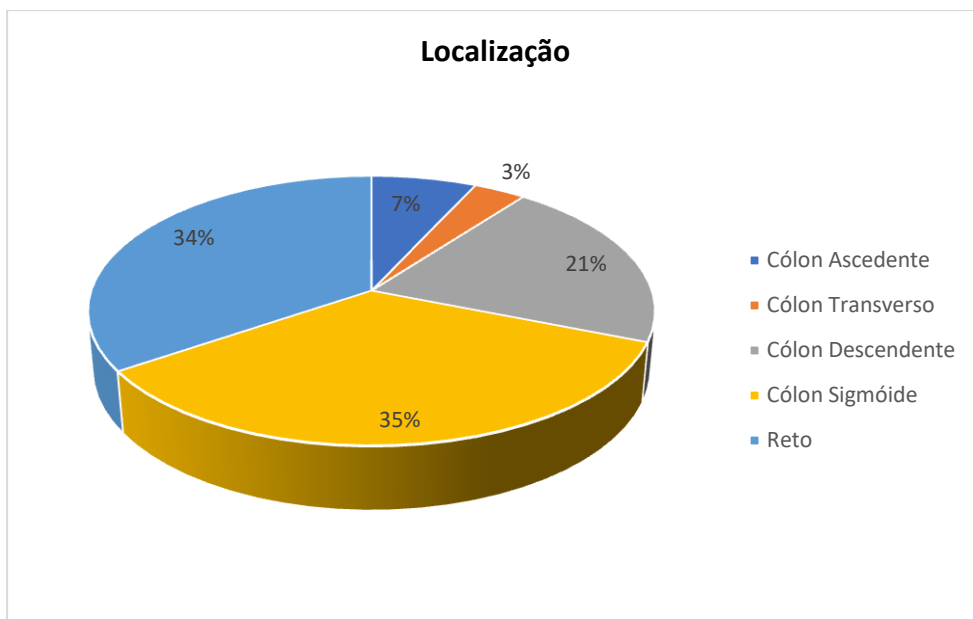


Gráfico 3 - Distribuição da amostra segundo a variável "localização"

A observação das lâminas resultou na classificação da diferenciação histológica de cada amostra, assim como na classificação das lâminas relativamente à percentagem de células com Bcl-2 positivo e também em relação à intensidade com que as células coravam para o Bcl-2.

No que toca à diferenciação histológica, 10 amostras (35%) apresentavam uma boa diferenciação glandular, 16 (55%) apresentavam-se moderadamente diferenciadas, e 3 (10%) apresentavam-se pouco diferenciadas.

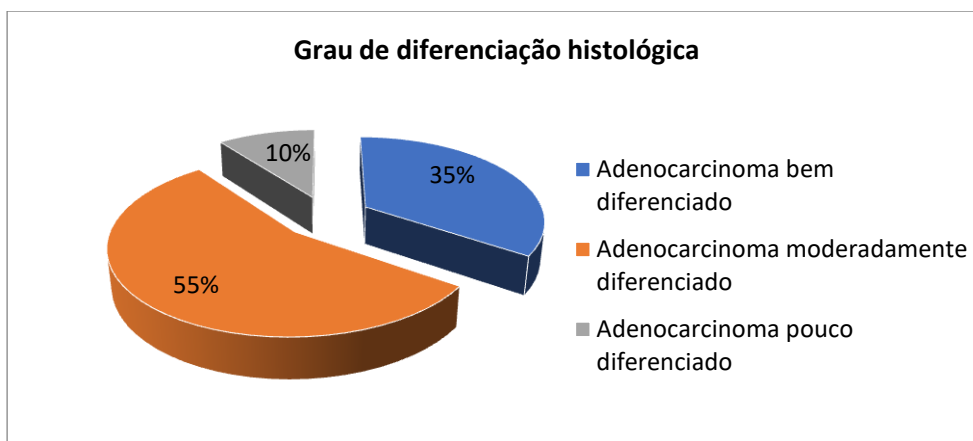


Gráfico 4 - Distribuição da amostra segundo a variável "diferenciação histológica"

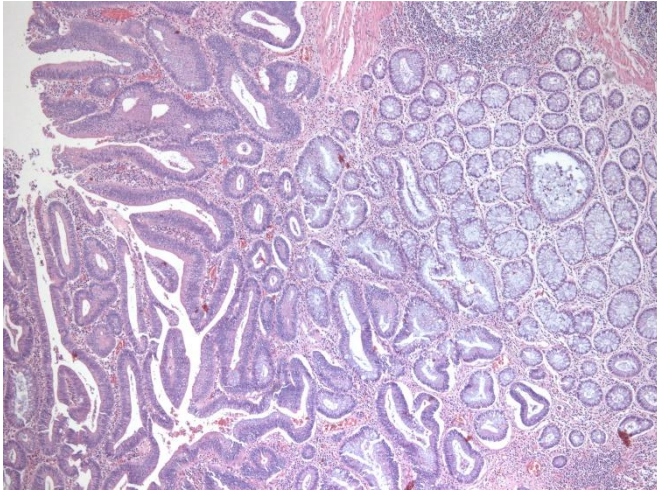


Figura 1 - Amostra bem diferenciada com boa diferenciação glandular

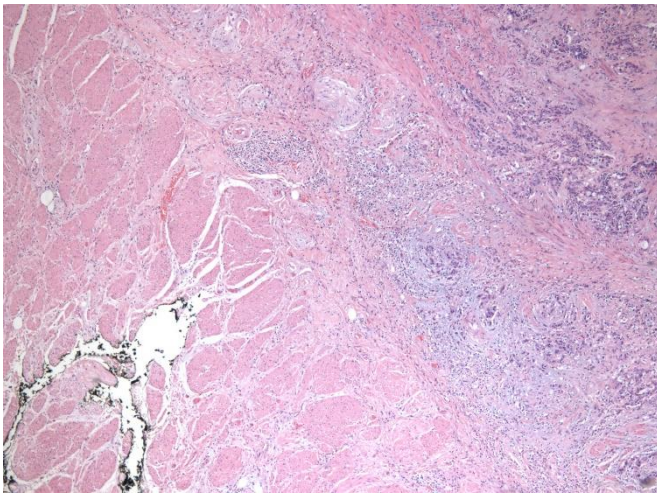


Figura 2 - Amostra moderadamente diferenciada

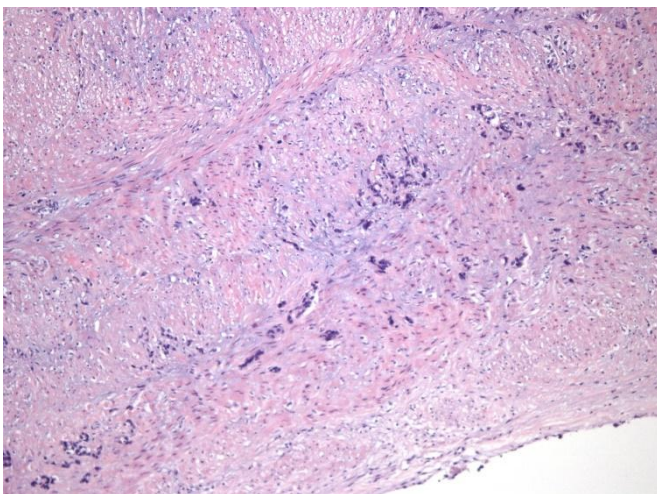


Figura 3 - Amostra mal diferenciada

Da análise da distribuição de classificações TNM da amostra verificou-se que o estadiamento T2N0M0 foi o mais prevalente, tal como se pode verificar no Gráfico 4.

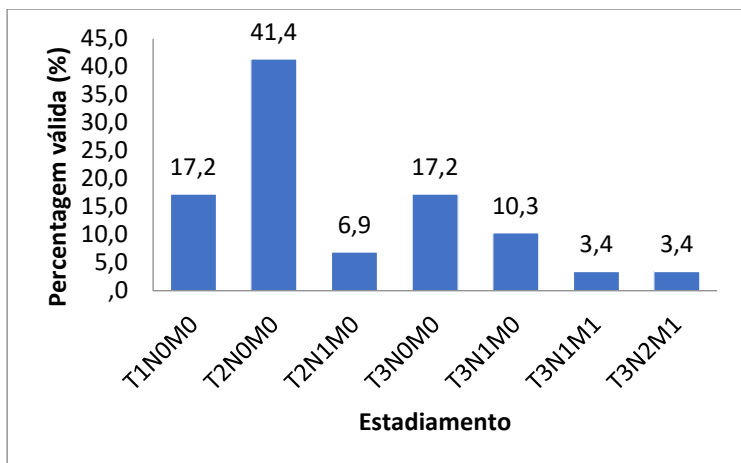


Gráfico 5 - Distribuição da amostra segundo a variável "estadiamento"

Após a coloração imunohistoquímica observou-se que 13 amostras (45%) apresentavam 0% de células coradas com o marcador bcl-2, 6 amostras (21%) apresentavam 25 % de células coradas, 6 amostras (21%) apresentavam 50% de células coradas e 4 amostras (14%) apresentavam 75% de células coradas.

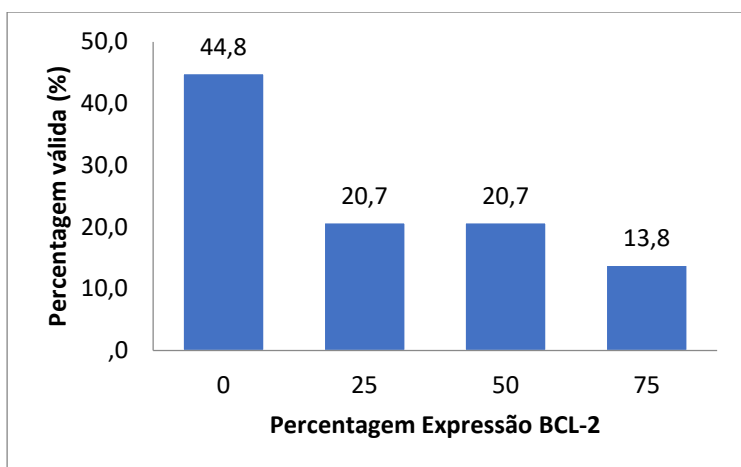


Gráfico 6 - Distribuição da amostra segundo a variável "percentagem de expressão de Bcl-2"

Além disso, verificou-se que 13 (45%) amostras apresentavam intensidade nula (-) de de marcação para o bcl-2, 10 amostras (35%) apresentavam intensidade +, 4 amostras (14%) apresentavam intensidade ++, e 2 amostras (7%) apresentavam a intensidade máxima (+++) de coloração para o marcador em estudo.

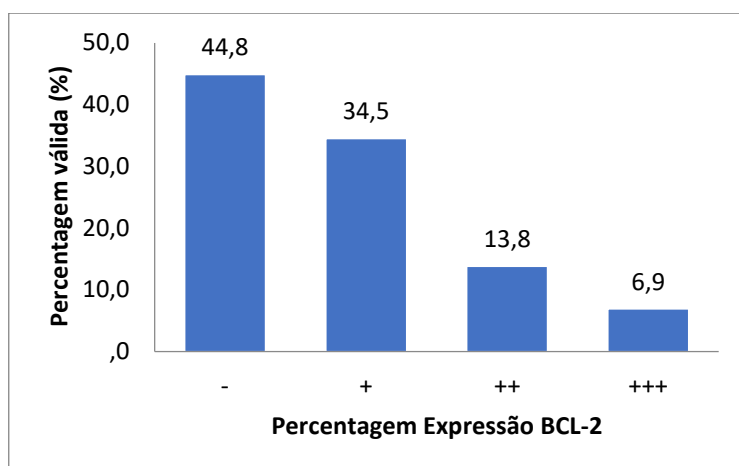


Gráfico 7 - Distribuição da amostra segundo a variável "Intensidade de marcação por Bcl-2"

Para tentar encontrar uma correlação entre a expressão de Bcl-2 e cada uma das variáveis em estudo, foram realizadas as seguintes tabelas.

Tabela 1 - Relação entre a percentagem de expressão de Bcl-2 e a variável "localização"

		CA	CT	CD	S	R	Total	p-valor
Expressão	0	n 0	1	3	6	3	13	,749
		% ,0%	7,7%	23,1%	46,2%	23,1%	44,8%	
	25	n 0	0	2	1	3	6	
		% ,0%	,0%	33,3%	16,7%	50,0%	20,7%	
	50	n 1	0	1	2	2	6	
		% 16,7%	,0%	16,7%	33,3%	33,3%	20,7%	
	75	n 1	0	0	1	2	4	
		% 25,0%	,0%	,0%	25,0%	50,0%	13,8%	
	Total	n 2	1	6	10	10	29	
		% 6,9%	3,4%	20,7%	34,5%	34,5%	100,0%	

Tabela 2 - Relação entre a percentagem de expressão de Bcl-2 e a variável "localização"

		CA	CT	CD	S	R	Total	p-valor
Intensidade	-	n 0	1	3	6	3	13	,447
		% ,0%	7,7%	23,1%	46,2%	23,1%	44,8%	
	+	n 0	0	2	3	5	10	
		% ,0%	,0%	20,0%	30,0%	50,0%	34,5%	
	++	n 1	0	1	1	1	4	
		% 25,0%	,0%	25,0%	25,0%	25,0%	13,8%	
	+++	n 1	0	0	0	1	2	
		% 50,0%	,0%	,0%	,0%	50,0%	6,9%	
	Total	n 2	1	6	10	10	29	
		% 6,9%	3,4%	20,7%	34,5%	34,5%	100,0%	

Em relação à variável "localização" verifica-se, através do teste de Fisher, que não existe uma associação entre esta variável com os valores de percentagem de células marcadas por Bcl-2, já se obteve um p-valor=0,749, não rejeitando a hipótese nula (H0) de que não existe

Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 no adenocarcinoma do cólon e a sua correlação com a localização do tumor, TNM, e tipo histológico

correlação entre as duas variáveis. O mesmo aconteceu com os valores de intensidade de expressão do marcador, tendo-se obtido um p-valor=0,447.

Tabela 3 - Relação entre a percentagem de Expressão do bcl-2 e a variável "diferenciação histológica"

		ABD	AMD	APD	Total	Risco Relativo	p-valor	
Expressão Bcl-2	0	n	1	9	3	13	2,5	,034
		%	7,7%	69,2%	23,1%	44,8%		
	25	n	2	4	0	6	0,7	
		%	33,3%	66,7%	,0%	20,7%		
	50	n	5	1	0	6	0,7	
		%	83,3%	16,7%	,0%	20,7%		
	75	n	2	2	0	4	1	
		%	50,0%	50,0%	,0%	13,8%		
	Total	n	10	16	3	29		
		%	34,5%	55,2%	10,3%	100,0%		

Tabela 4 - Relação entre a intensidade de marcação por Bcl-2 e a variável "diferenciação histológica"

		ABD	AMD	APD	Total	Risco Relativo	p-valor	
Intensidade Bcl-2	-	n	1	9	3	13	1,5	,078
		%	7,7%	69,2%	23,1%	44,8%		
	+	n	6	4	0	10	0,3	
		%	60,0%	40,0%	,0%	34,5%		
	++	n	2	2	0	4	0,6	
		%	50,0%	50,0%	,0%	13,8%		
	+++	n	1	1	0	2	1	
		%	50,0%	50,0%	,0%	6,9%		
	Total	n	10	16	3	29		
		%	34,5%	55,2%	10,3%	100,0%		

O grau de diferenciação histológica apresentou uma associação significativa com a Percentagem de Expressão do marcador Bcl-2, tendo-se obtido um p-valor=0,034, rejeitando-se, portanto, H0. De modo particular, pode-se verificar que os casos de Adenocarcinoma pouco diferenciado são estatisticamente significativos para a expressão de 0% de Bcl-2, correspondendo a 10,3% de casos registados na amostra. Além disso, os casos de Adenocarcinoma bem diferenciado são estatisticamente mais frequentes nos casos com uma expressão de 50% de Bcl-2.

Por outro lado, o grau de diferenciação histológica e a intensidade da expressão do marcador Bcl-2 revelaram-se independentes, ou seja, sem uma associação estatística significativa (p-valor=0,078).

Tabela 5 - Relação entre a percentagem de Expressão do bcl-2 e a variável "estadiamento"

		T1N0 MO	T2N0 MO	T2N1 MO	T3N0 MO	T3N1 MO	T3N1 M1	T3N2 M1	Total	p-valor	
Expressão	0	n	0	2	2	4	3	1	1	13	,163
		%	,0%	15,4%	15,4%	30,8%	23,1%	7,7%	7,7%	44,8%	
	25	n	2	3	0	1	0	0	0	6	
		%	33,3%	50,0%	,0%	16,7%	,0%	,0%	,0%	20,7%	
	50	n	2	4	0	0	0	0	0	6	
		%	33,3%	66,7%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	20,7%	
	75	n	2	4	0	0	0	0	0	4	
		%	33,3%	66,7%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	13,8%	
	Total	n	5	12	2	5	3	1	1	29	
		%	17,2%	41,4%	6,9%	17,2%	10,3%	3,4%	3,4%	100,0%	

Tabela 6 - Relação entre a intensidade de marcação por Bcl-2 e a variável "estadiamento"

		T1N0 MO	T2N0 MO	T2N1 MO	T3N0 MO	T3N1 MO	T3N1 M1	T3N2 M1	Total	p-valor	
Intensidade	-	n	0	2	2	4	3	1	1	13	,070
		%	,0%	15,4%	15,4%	30,8%	23,1%	7,7%	7,7%	44,8%	
	+	n	2	7	0	1	0	0	0	10	
		%	20,0%	70,0%	,0%	10,0%	,0%	,0%	,0%	34,5%	
	++	n	2	2	0	0	0	0	0	4	
		%	50,0%	50,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	13,8%	
	+++	n	1	1	0	0	0	0	0	2	
		%	50,0%	50,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	,0%	6,9%	
	Total	n	5	12	2	5	3	1	1	29	
		%	17,2%	41,4%	6,9%	17,2%	10,3%	3,4%	3,4%	100,0%	

Relativamente ao estadiamento, este não apresentou uma relação significativa com a percentagem de expressão do marcador Bcl-2, tendo apresentado um p-valor=0,163. Não apresentou também uma associação significativa com a intensidade da expressão do Bcl-2 p-valor=0,070.

Tabela 7 - Relação entre a percentagem de Expressão do Bcl-2 e a variável "prognóstico"

		Morre	Vive	Total	Risco Relativo	p-valor	
Expressão	0	n	13	0	13	9,6	,000
		%	100,0%	,0%	44,8%		
	25	n	2	4	6	3,6	
		%	33,3%	66,7%	20,7%		
	50	n	0	6	6	0,7	
		%	,0%	100,0%	20,7%		
	75	n	0	4	4	1	
		%	,0%	100,0%	13,8%		
	Total	n	15	14	29		
		%	51,7%	48,3%	100,0%		

Tabela 8 - Relação entre a intensidade de marcação por Bcl-2 e a variável "prognóstico"

		<i>Morre</i>	<i>Vive</i>	<i>Total</i>	<i>Risco Relativo</i>	<i>p-valor</i>
<i>Intensidade</i>	-	<i>n</i> 13	0	13	5,8	,000
		% 100,0%	,0%	100,0%		
	+	<i>n</i> 2	8	10	1,4	
		% 20,0%	80,0%	100,0%		
	++	<i>n</i> 0	4	4	0,6	
		% ,0%	100,0%	100,0%		
	+++	<i>n</i> 0	2	2	1	
		% ,0%	100,0%	100,0%		
	Total	<i>n</i> 15	14	29		
		% 51,7%	48,3%	100,0%		

O prognóstico revelou uma influência significativa na percentagem de expressão de Bcl-2, já que apresentou um p-valor=0,000, rejeitando a hipótese de as variáveis “Percentagem de expressão do Bcl-2” e “Prognóstico” não estarem correlacionadas. Através da análise dos resultados obtidos, doentes que morreram durante os 10 anos de follow-up surgem estatisticamente associados à percentagem de expressão de 0% do marcador Bcl-2, assim como os doentes que sobreviveram tendem a ser estatisticamente mais frequentes para uma percentagem de expressão de Bcl-2 de 50% e de 75%.

Em relação à variável “Intensidade de marcação por Bcl-2”, verificou-se após análise de todas as tabelas que o prognóstico é a única variável que apresenta uma associação significativa com a intensidade da expressão deste marcador, tendo obtido no teste de Fisher um p-valor=0,000. Os doentes que morreram são estatisticamente mais frequentes para uma intensidade de expressão de Bcl-2 negativa correspondendo a 51,7% da amostra. Os que sobreviveram associam-se significativamente com uma intensidade de expressão + e com a intensidade ++.

4. Discussão

Hoje em dia, os critérios de escolha de tratamento de lesões neoplásicas no cólon baseiam-se primariamente no estadiamento TNM, no status de margens cirúrgicas e na consequente previsão de sobrevida. Esta avaliação influencia a decisão de usar tratamento adjuvante à recissão cirúrgica sob a forma de quimioterapia e/ou radioterapia, tendo, como tal, bastante importância na abordagem da doença do doente⁴. Esta decisão é de extrema importância já que o tratamento adjuvante pode diminuir consideravelmente o risco de recidiva, e como tal deve ser feita com a maior e melhor quantidade de informação prognóstica disponível. Note-se que a recorrência neoplásica é a principal causa de morte nos doentes nos doentes tratados com excisão cirúrgica da lesão¹³.

O estadiamento TNM é o principal método de classificação prognóstica no adenocarcinoma do cólon, concentrando-se em características morfológicas e estruturais tumorais, no entanto, falta um outro método que analise a nível genético e celular as características proliferativas tumorais para complementar a informação prognóstica e decisão terapêutica. É devido a essa falta de especificidade dos valores prognósticos fornecidos pelo estadiamento TNM, que muitas pessoas acabam por não ser tratadas o mais adequadamente possível¹⁴. Sabe-se, no entanto, que os biomarcadores como o Bcl-2 podem acrescentar informação neste sentido¹⁰, ainda que o seu uso não seja feito com regularidade.

Relativamente à investigação realizada neste trabalho, a amostra em estudo é composta por 20 pessoas (69%) do sexo masculino, sendo 9 (31%) do sexo feminino. Esta distribuição de género vai de encontro à incidência aumentada desta neoplasia em doentes do sexo masculino¹.

No que se refere à idade, sabe-se que a idade é um fator de risco para a doença, aumentando a incidência da mesma com o aumento da idade. Esta distribuição pela idade é também verificada na amostra em estudo no trabalho, já que 15 dos indivíduos (52%) em estudo tem 70 ou mais anos, havendo apenas 4 pessoas com idade inferior a 60 anos².

A localização mais frequente de lesão neoplásica nos casos estudados neste trabalho, foi no Sigmoide e Reto, havendo 10 casos (34,5%) em cada uma das localizações. Este padrão de maior incidência de lesões no cólon distal vem também de encontro com a literatura científica, a qual descreve uma maior probabilidade carcinogénese nesta localização. A distribuição mais frequente no cólon descendente, sigmóide e reto em detrimento de uma localização no cólon transversal ou ascendente está de acordo com os achados estatísticos encontrados na literatura científica^{15,16}.

Com a análise de Fisher apenas se conseguiu encontrar uma correlação estatística da expressão de Bcl-2 com o prognóstico e com a diferenciação histológica.

De acordo com os resultados, lesões neoplásicas com uma percentagem superior de células a expressar Bcl-2, têm uma maior probabilidade de serem bem diferenciadas, assim como lesões com uma menor percentagem de expressão deste marcador, têm uma maior probabilidade de serem mal diferenciadas. A análise do Risco Relativo dá uma boa ideia da maneira como uma expressão menor de Bcl-2 aumenta o risco de desenvolver amostras pouco diferenciadas, já que existe uma probabilidade 2,5 vezes maior de desenvolver APD nas amostras com 0%, relativamente às amostras com 75% de Expressão do marcador Bcl-2, e uma probabilidade 1,5 vezes maior nas com Intensidade de marcação nula (-), relativamente às marcadas com intensidade (+++).

Um problema associado à análise da diferenciação celular é o facto de estar sujeita à subjetividade do observador, no entanto, neste caso é clara a tendência para se encontrar um padrão de menor diferenciação celular em células negativas para o marcador.

Além deste achado, verificou-se também que tanto a intensidade do marcador Bcl-2 como a percentagem de células com o marcador positivo estavam relacionadas com o prognóstico dos doentes. Segundo este estudo tanto uma maior percentagem de células com Bcl-2 como uma maior intensidade de marcação, predizem um melhor prognóstico dos doentes. O inverso também é verificado havendo um pior prognóstico associado à ausência do marcador Bcl-2 nas células neoplásicas. Esta associação com o prognóstico não é a relação mais lógica a existir, já que a proteína Bcl-2 é protetora de apoptose e, por isso, logicamente a sua presença deveria estar associada a um desfecho prognóstico mais grave.

No entanto, uma possível explicação para o fator de melhoria prognóstica desta proteína pode ser o facto de a presença da proteína Bcl-2 ser apenas indicadora da transcrição de outras proteínas também expressas pelo mesmo gene (*bcl-2*), as quais, agindo independentemente, poderão ter uma ação estimuladora da apoptose em células neoplásicas. Este mecanismo poderia levar a um desfecho de melhor prognóstico^{7,8} nas células com Bcl-2 presente.

Uma outra explicação possível para este acontecimento, é a noção de que a mortalidade associada a neoplasias deriva não do tamanho do tumor primário mas sim da sua capacidade de metastização para órgãos mais distantes. Tendo isto em conta, é possível que a expressão de Bcl-2 possa estar associada a uma menor capacidade de metastização da lesão primária, apesar de esta hipótese não ser consensual na literatura científica¹⁰.

Apesar de o Bcl-2 ser alvo de estudo da comunidade científica há mais de 30 anos, ainda não há um consenso quanto ao seu real valor prognóstico e clínico no adenocarcinoma do cólon. No entanto, apesar de muitos artigos não conseguirem encontrar uma correlação entre o prognóstico do adenocarcinoma do cólon e a proteína Bcl-2^{5,17,18}, a generalidade dos trabalhos

sobre este tema, tendem a relacionar a existência de um maior nível desta proteína com um prognóstico mais favorável^{7,10,19,20}, tal como se verifica neste estudo.

É de notar até que alguns artigos defendam mesmo a existência de um melhor prognóstico associado a esta proteína no cancro do ovário, cancro não pequenas células do pulmão, e cancro da mama com nodos linfáticos não invadidos^{10,20}.

Fatores limitantes

Apesar dos resultados do trabalho irem de encontro à globalidade dos resultados da comunidade científica, deve-se ter em consideração que este estudo teve apenas 29 casos em estudo, e por isso, os resultados têm significância limitada.

Um outro possível fator limitante é o facto de vários estudos começarem a estudar não a apresentação de um único marcador neoplásico, mas sim padrões de apresentação de vários marcadores^{7,20}. Note-se que a presença de vários marcadores simultaneamente pode ser mais preditiva de um determinado outcome do que a presença de um único, já que revela mais informação sobre a natureza celular da lesão.

Além disso, tal como foi descrito anteriormente, a subjetividade associada à observação das amostras por um observador, leva a que a classificação da diferenciação celular das várias amostras possa ter um carácter mais subjetivo, e, com isso, gerar maior dificuldade em tirar conclusões relativamente ao papel que qualquer marcador celular possa ter na diferenciação celular.

Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 no adenocarcinoma do cólon e a sua correlação com a localização do tumor, TNM, e tipo histológico

5. Conclusão

É inegável a importância estatística que o cancro do cólon tem como causa de morte e de morbilidade na população¹. É como tal essencial garantir que os doentes recebem o melhor e mais apropriado tratamento. Note-se que, tal como visto anteriormente, as recidivas tumorais são a principal causa de morte em doentes a quem foi realizada cirurgia de excisão de lesão neoplásica¹³ e como tal, é essencial garantir o acesso a tratamentos adjuvantes no sentido de diminuir o risco das mesmas. Para ajudar à decisão terapêutica, é essencial compreender as características tumorais, tendo sido encontrada, neste trabalho, associação entre a presença da proteína Bcl-2 com o Prognóstico e a Diferenciação celular. De modo particular, verificou-se que a presença de Bcl-2 está associada a um melhor prognóstico dos doentes, assim como está também associada a uma melhor diferenciação celular. Por outro lado, não foi encontrada, neste trabalho, uma relação entre a presença da proteína Bcl-2 em células neoplásicas do cólon e a localização ou a classificação TNM da lesão.

Com estes achados, complementam-se os vários estudos realizados pela comunidade científica no sentido de desenvolver melhores preditores de proliferação neoplásica e de classificação prognóstica. No entanto, fica também a demonstração do potencial do método de Imunohistoquímica para classificar lesões neoplásicas, assim como o apoio na investigação futura desta técnica.

Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 no adenocarcinoma do cólon e a sua correlação com a localização do tumor, TNM, e tipo histológico

Bibliografia

1. Miranda, N. *et al.* Doenças Oncológicas em Números - 2015. *Direção-Geral da Saúde* 1-66 (2016). doi:ISSN: 2183-0746
2. Haggard, F. a, Boushey, R. P. & Ph, D. Colorectal Cancer Epidemiology : Incidence , Mortality , Survival , and Risk Factors. *Clin. Colon Rectal Surg.* **6**, 191-197 (2009).
3. Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F. & Wang, H. L. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J. Gastrointest. Oncol.* **3**, 153-173 (2012).
4. George, F. H. M. Norma nº 025/2012 de 27/12/2012 atualizada a 28/07/2015. *Norma Da Direção - Geral Da Saúde* **1**, 9 (2013).
5. Zeestraten *et al.* The Prognostic Value of the Apoptosis Pathway in Colorectal Cancer: A Review of the Literature on Biomarkers Identified by Immunohistochemistry. *Biomark. Cancer* **13** (2013). doi:10.4137/BIC.S11475
6. Bayrak, R., Haltas, H. & Yenidunya, S. The value of CDX2 and cytokeratins 7 and 20 expression in differentiating colorectal adenocarcinomas from extraintestinal gastrointestinal adenocarcinomas: cytokeratin 7-/20+ phenotype is more specific than CDX2 antibody. *Diagn. Pathol.* **7**, 9 (2012).
7. Khodapasand, E., Jafarzadeh, N., Farrokhi, F., Kamalidehghan, B. & Houshmand, M. Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer? *Iran. Biomed. J.* **19**, 69-75 (2015).
8. D'Orsi, B., Mateyka, J. & Prehn, J. H. M. Control of mitochondrial physiology and cell death by the Bcl-2 family proteins Bax and Bok. *Neurochem. Int.* doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2017.03.010
9. Sinicrope, F. a, Ruan, S. B., Cleary, K. R., Sinicrope, A. & Cleary, R. bcl-2 and p53 Oncoprotein Expression during Colorectal Tumorigenesis Advances in Brief bcl-2 and p53 Oncoprotein Expression during Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Res.* **55**, 237-241 (1995).
10. Nicholson, A. D., Guo, X., Sullivan, C. A. W. & Cha, C. H. Automated quantitative analysis of tissue microarray of 443 patients with colorectal adenocarcinoma: Low expression of Bcl-2 predicts poor survival. *J. Am. Coll. Surg.* **219**, 977-987 (2014).
11. Marôco, J. *Análise Estatística com o SPSS Statistics.* (2011).
12. Relative Risk Calculator. Available at: https://www.medcalc.org/calc/relative_risk.php.
13. Saigusa, S. *et al.* Gene expression profiles of tumor regression grade in locally advanced rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy. *Oncol. Rep.* **28**, 855-861 (2012).

14. Grabovoy, A. N., Kolesnik, O. O., Savchyn, T. M. & Antoniuk, S. A. Modelling of survival of patients with colon adenocarcinoma based on multivariable analysis of the state of cancer cell nuclear apparatus / A.N. Grabovoy [et al.]. // *Experimental Oncology*. - 2016. - Vol. 38, № 1. - P. 45-48. **2016**, 45-48 (2016).
15. Kim, D. *et al.* Primary tumor location predicts poor clinical outcome with cetuximab in RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *BMC Gastroenterol.* **17**, 121 (2017).
16. Byun, J. H. *et al.* The impact of primary tumor location in patients with metastatic colorectal cancer : a Korean Cancer Study Group CO12-04 study. (2017).
17. Dursun, A., Poyraz, A., Süer, Ö., Sezer, C. & Akyol, G. Expression of Bcl-2 and c-ErbB-2 in colorectal neoplasia. *Pathol. Oncol. Res.* **7**, 24-27 (2001).
18. Kouraklis, G. *et al.* Prognostic Significance and Correlation with Survival of bcl-2 and TGF-B RII in Colon cancer. *Dig. Dis. Sci.* **48**, 2284-2289 (2003).
19. Manne, U. *et al.* Prognostic significance of Bcl-2 expression and p53 nuclear accumulation in colorectal adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* **74**, 346-358 (1997).
20. Saleh, H. A., Jackson, H., Khatib, G. & Banerjee, M. Correlation of bcl-2 oncoprotein immunohistochemical expression with proliferation index and histopathologic parameters in colorectal neoplasia. *Pathol. Oncol. Res.* **5**, 273-279 (1999).

Anexos

Anexo 1 - Protocolo de Processamento

FIXAÇÃO:	FORMOL A 10%	3 HORAS
DESIDRATAÇÃO:	etanol 70%	1 hora
	etanol 95%	1 hora
	etanol 95%	1 hora
	etanol 99.9%	1 hora
	etanol 99.9%	1 hora
	etanol 99.9%	1 hora
DIAFANIZAÇÃO:	Etanol 99.9% e xilol	1 hora
	xilol	1 hora
	xilol	1 horas
	parafina	2 horas
	parafina	2 horas
INCLUSÃO:	parafina	

Anexo 2 - Protocolo de Coloração

DESPARAFINAÇÃO:	XILOL	5 MINUTOS
	xilol	5 minutos
HIDRATAÇÃO:	etanol 99.9%	3 minutos
	Etanol 95%	1 minuto
	etanol 70%	1 minuto
	água corrente	2 minutos
COLORAÇÃO NUCLEAR:	hematoxilina de Harris	10 minutos
LAVAGEM:	Água corrente	3 minutos
DIFERENCIAÇÃO:	etanol clorídrico a 1%	10 segundos
LAVAGEM:	água corrente	6 minutos
COLORAÇÃO CITOPLASMÁTICA:	Etanol 70%	1 minuto
	eosina	1 segundo
DESIDRATAÇÃO:	etanol 95%	1 minuto
	etanol 95%	1 minuto
	etanol 95%	1 minuto
	etanol 99.9%	3 minutos
	etanol 99.9%	5 minutos
	xilol	4 minutos
	xilol	3 minutos
MONTAGEM:	meio sintético	

Anexo 3 - Protocolo de funcionamento de máquina de imunohistoquímica

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

Estudo do valor prognóstico do Bcl-2 no adenocarcinoma do cólon e a sua correlação com a localização do tumor, TNM, e tipo histológico

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''

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

