



**UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR**

**Ciências da Saúde**

**Estudo Imunohistoquímico do Bcl-2 em  
adenocarcinomas do cólon e do reto**

**Joana Isabel Pires Urzal**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Medicina**

**(ciclo de estudos integrado)**

Orientador: Prof. Doutor Javier Munoz

**Covilhã, Maio de 2012**

Aos meus pais e ao meu avô,  
pelo apoio incondicional  
em todos os projetos  
da minha vida.

# Agradecimentos

Ao **Professor Doutor Javier Munoz** pela sua orientação, sugestões, incentivo e compreensão, durante a realização deste estudo.

À **Dr<sup>a</sup> Catarina Ferreira** por todos os ensinamentos, esclarecimentos e paciência quanto á parte técnica deste trabalho

Aos **meus pais** pelo apoio incansável.

## Resumo

O estudo sobre a carcinogénese colorretal tem tido progressos significativos na etiopatogenia dos tumores malignos, apenas nas últimas décadas.

Segundo o *Relatório GLOBOCAN 2008 da Agência Internacional de Investigação do Cancro (IARC)*, o cancro colorretal (CCR) é o terceiro cancro mais incidente no mundo, e o primeiro em Portugal.

A morte celular programada (apoptose) tem sido implicada no desenvolvimento tumoral e no potencial metastático. O Bcl-2, um proto-oncogene inibidor da apoptose, vem sendo estudado em várias neoplasias incluindo adenocarcinomas do cólon.

Os objetivos deste estudo são observar e descrever a correlação entre a expressão imunohistoquímica (IHQ) do oncogene bcl-2 e o grau de diferenciação histológica de adenocarcinomas colorretais.

Esta tese foi baseada num estudo descritivo da expressão imunohistoquímica do oncogene bcl-2 em 62 casos de pacientes com adenocarcinomas colorretais ressecados cirurgicamente entre 2001 e 2003 no Centro Hospitalar Cova da Beira.

Dos 62 casos de carcinomas colorretais, 6 são bem diferenciados (9,7%), 55 são moderadamente diferenciados (88,7%) e apenas 1 é pouco diferenciado (1,6%). O único caso de CCR pouco diferenciado não apresenta imunoexpressão para o bcl-2 (0%, “-“). Quanto aos CCR moderadamente diferenciados, 35 dos quais não têm imunoexpressão (0%, “-“), 5 apresentam imunoexpressão em 25 % das células com intensidade “+” e apenas 1 caso com intensidade “++”; 10 casos com imunoexpressão de 50% das células, 6 com intensidade “++” e 4 com intensidade “+”; 4 casos com imunoexpressão de 75% das células, dos quais 2 com intensidade “++” e os outros 2 com intensidade “+++”.

Dos 6 CCR bem diferenciados, 4 não apresentam imunoexpressão (0%, “-“). Dos dois casos restantes com imunoexpressão de 75% das células, 1 tem intensidade “+”, e o outro intensidade “++”.

A hipótese de correlação entre a diferenciação histológica e a proliferação do tumor determinada pela presença da proteína bcl-2, não leva a resultados conclusivos.

**Palavras-Chave** adenocarcinoma do cólon; apoptose; bcl-2; IHQ; Progressão tumoral;

# Abstract

Only in the last decades has the study on colorectal carcinogenesis had significant progress in pathogenesis of malignant tumors.

According to the *GLOBOCAN 2008 Report of the International Agency for Research on Cancer (IARC)*, colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide and the first in Portugal.

Programmed cell death (apoptosis) has been implicated in tumor development and metastatic potential. Bcl-2 proto-oncogene, an apoptosis inhibitor, has been studied in various cancers including colon adenocarcinomas.

The aim of this study is to observe and describe the correlation between the immunohistochemistry (IHC) expression of the oncogene bcl-2, and the degree of histological differentiation of colorectal adenocarcinomas.

This thesis was based on a descriptive study of immunohistochemical expression of the bcl-2 oncogene in 62 cases of patients with colorectal adenocarcinomas surgically excised between 2001 and 2003 in Centro Hospitalar Cova da Beira.

Of the 62 cases of colorectal carcinomas (CRC), 6 are well differentiated (9.7%), 55 are moderately differentiated (88.7%) and only one is poorly differentiated (1.6%). The only case of poorly differentiated CRC has no immunoreactivity for bcl-2 (0%, "-"). For CRC moderately differentiated, 35 of whom have no immunoreactivity (0%, "-"), 5 present immunoreactivity in 25% of the cells with intensity "+" and only 1 case with intensity "+ +", 10 cases with immunohistochemical expression of 50% of cells, 6 with intensity "+ +" and 4 with intensity "+"; 4 cases with immunohistochemical expression of 75% of the cells, of which 2 with intensity "+ +" and the other two with intensity "+ + +".

Of the six well-differentiated CRC, 4 did not show immunoreactivity (0%, "-"). Of the two remaining patients with immunoreactivity 75% of the cells, has an intensity "+" and the other, intensity "+ +".

The correlation hypothesis between the histological differentiation and the proliferation of tumor determined by the presence of bcl-2 does not lead to conclusive results.

**KeyWords:** colorectal cancer; apoptosis; bcl-2; IHQ; tumor proliferation.

# Índice

1. Introdução .....	1
2. Materiais e Métodos.....	4
3. Resultados .....	6
4. Discussão.....	14
5. Bibliografia .....	15
6. Anexos.....	20

Índice de Acrónimos.....	10
Índice de Figuras.....	7
Índice de Gráficos .....	9
Índice de Tabelas .....	8

## Lista de Figuras

Figura 1-Adenocarcinoma do cólon bem diferenciado (100xx) .....	6
Figura 2- Adenocarcinoma do cólon moderadamente diferenciado (40xx) .....	6
Figura 3-Adenocarcinoma do cólon com imunoeexpressão negativa para o Bcl-2 (100xx) .....	8
Figura 4-Adenocarcinoma do cólon com intensidade "+++" na imunoeexpressão com Bcl-2 (100x) .....	8
Figura 5-Adenocarcinoma do cólon com imunoeexpressão de 25 % das células (100xx) .....	10
Figura 6-Adenocarcinoma do cólon com imunoeexpressão 50% das células com bcl-2(100xx) ..	10
Figura 7-Adenocarcinoma do cólon com imunoeexpressão de 75 % das células com bcl-2 (100xx) .....	10

## Lista de Tabelas

Tabela 1- Frequências absolutas dos dados relativos à quantidade de células imunoexpressas com bcl-2 e o grau de diferenciação. .... 11

## Lista de Gráficos

Gráfico 1- Intensidade de células imunoexpressas com bcl-2 .....	7
Gráfico 2- Número de células imunoexpressas com bcl-2 .....	9
Gráfico 3-Número de células imunoexpressas com bcl-2 em CCR bem diferenciados.....	12
Gráfico 4- Intensidade das células imunoexpressas com bcl-2 nos CCR bem diferenciados....	12
Gráfico 5-Número de células imunoexpressas com bcl-2 em CCR moderadamente bem diferenciados .....	13
Gráfico 6-Intensidade com que as células são imunoexpressas com bcl-2 em CCR moderadamente bem diferenciados.....	13

# Lista de Acrónimos

**AB1:** anticorpo primário;

**AB2 :** anticorpo secundário;

**APC:** Adenomatose Poliposa do Cólon;

**BCL-2 :** família “B cell lymphoma protein 2”;

**Bcl-2 gene:** gene “B cell lymphoma protein 2”;

**bcl-2 proteína:** “B cell lymphoma protein 2”, proteína com função anti-apoptótica isolada de linfomas foliculares, com t(14;18);

**BUF :** soluções de lavagem;

**CCR:** cancro colorretal;

**DAB:** diaminobenzidina (cromogéneo);

**HPBK:** bloqueio da peroxidase endógena;

**HRP:** streptavidin peroxidase;

**IHQ:** Imunohistoquímica;

**PAD :** “esponjas”;

**t(14;18):** translocação recíproca envolvendo os cromossomas humanos, caracterizada inicialmente em Linfomas Foliculares;

# 1. Introdução

Segundo o Relatório GLOBOCAN 2008, da Agência Internacional de Investigação do Cancro (IARC), o cancro colorretal (CCR) é a terceira neoplasia maligna mais incidente e a quarta causa de morte por cancro no mundo<sup>1</sup>. As taxas de incidência mais elevadas registam-se nos países desenvolvidos, nomeadamente nos Estados Unidos da América, Europa Ocidental e Austrália e as taxas mais baixas ocorrem em África (exceto África do Sul) e Sudeste da Ásia Central.

O CCR, mundialmente, é o terceiro cancro mais comum nos homens (663 000 casos, 10,0% do total) e o segundo nas mulheres (571 000 casos, 9,4% do total).

Estima-se<sup>2</sup> que por ano, ocorram cerca de 609 051 mortes a nível mundial e 222 000 mortes, na Europa por cancro colorretal, sendo diagnosticados em média 450 000 novos casos, por ano, na Europa.

O mesmo relatório sublinha que, em Portugal, o CCR é cancro mais incidente e com maior taxa de mortalidade. Tanto no sexo masculino, como no sexo feminino é o segundo cancro mais comum com 16,4 %, 15,6%, respetivamente.

A este propósito, é de destacar que na Cova da Beira, local onde é realizado este estudo, o CCR é responsável por 34,8% das mortes, registando-se a maior mortalidade na faixa etária dos 75 anos ou mais.<sup>3</sup>

O estudo da carcinogénese colorretal tem sofrido progressos significativos ao longo das últimas décadas com o auxílio das técnicas de imunohistoquímica, citometria de fluxo, aplicação genética e técnicas moleculares para entender os envoltimentos dos genes nos fenómenos de crescimento celular e oncogénese.

A carcinogénese colorretal pode resultar de duas vias patogenticamente diferentes para o desenvolvimento do cancro do cólon<sup>4</sup>. O modelo proposto por Kinzler KW<sup>5,6</sup> é amplamente aceite como sequência de eventos do desenvolvimento do cancro colorretal, sequência adenoma-carcinoma. Esta via, APC/ $\beta$ -catenina, envolve um conjunto de mutações numa série de genes e oncogenes supressores de tumor. A segunda via<sup>7,8</sup> caracteriza-se por uma instabilidade microssatélite, com defeito nos genes de reparação nas lesões de DNA.

Um dos maiores desafios à profissão médica são os adenocarcinomas, pelo que constituem cerca de 98 % de todos os tumores do intestino grosso, que surgem de pólipos, causando sintomas relativamente precoces possíveis à excisão cirúrgica. Apenas alguns tornam-se malignos<sup>9</sup>.

A predisposição genética, a idade, a exposição ambiental como a obesidade, a falta de atividade física, dieta, tabaco, álcool e a aérea geográfica são fatores determinantes do risco de CCR.<sup>10,11</sup>

O pico de incidência do cancro colorretal está entre 60 e 79 anos de idade. Os adenocarcinomas colorrectais permanecem assintomáticos durante anos, desenvolvem-se insidiosamente e estão presentes durante meses ou anos antes do diagnóstico. Os carcinomas do ceco e cólon direito expressam-se clinicamente, muitas vezes, pela manifestação de fadiga, fraqueza e anemia ferropénica. As lesões do lado esquerdo destacam-se pelo sangue oculto nas fezes, alteração do hábito intestinal como, pelo aparecimento de melena, diarreia ou obstipação, ou desconforto sob forma de cólica no quadrante inferior esquerdo.<sup>12</sup>

O cancro do reto e do sigmóide são mais infiltrativos quando diagnosticados do que os proximais, logo têm pior prognóstico.

A disseminação dos tumores colorretais é, por um lado, por extensão direta às estruturas adjacentes e, por outro, por metástases para os gânglios linfáticos e vasos sanguíneos. Os locais mais comuns de disseminação metastática, por ordem decrescente são gânglios linfáticos regionais, fígado, pulmões, ossos, serosa peritoneal, cérebro, entre outros. Quanto aos da região anal são os gânglios linfáticos regionais e distantes.

O indicador mais importante do prognóstico do carcinoma colorretal é a extensão do tumor no momento do diagnóstico. Como tal, usa-se o sistema de classificação e estadiamento TNM da *American Joint Commission on Cancer*, o mais recente de 2009 apresentado no Anexo I.

O prognóstico do CCR ainda está a ser avaliado por fatores histológicos. Recentemente, vários estudos na biologia molecular têm tido como objetivo a identificação de novos parâmetros prognósticos<sup>13,14</sup>.

Os fatores envolvidos na regulação do ciclo celular, no que diz respeito aos mecanismos do crescimento e morte celular, podem afetar o desenvolvimento do tumor<sup>15</sup>.

Segundo *Kehr et al.*, em 1972, que definiram apoptose ou morte celular programada, como um processo genético e fisiologicamente controlado, nos últimos anos tem vindo a ter um interesse crescente<sup>16,17,18</sup>. A descoberta do gene Bcl-2, pelas suas características anti-apoptóticas, abriu novas perspectivas à identificação e compreensão do mecanismo da carcinogénese colorretal<sup>19</sup>.

Neste estudo, utilizarei a expressão BCL-2 para designar a família de genes denominada BCL-2; Bcl-2 quando me estiver a referir ao gene e bcl-2 para identificar a proteína proveniente gene.

O bcl-2 é um proto oncogene da família BCL-2, proteínas reguladoras da apoptose, codificada pelo gene Bcl-2.

O bcl-2 foi descoberto<sup>20</sup> pela primeira vez no linfoma de células B foliculares, (baixo grau de malignidade), devido à translocação entre os genes localizados no locus 21 do braço longo do cromossoma 18, 18q21, e no locus 32 do braço longo do cromossoma 14, 14q32<sup>21</sup>. A translocação 14;18 aproxima o gene bcl-2 aos sítios promotores do gene e cadeia pesada de imunoglobulinas (IgH), originando um RNAm quimérico estável, com conseqüente aumento da expressão de bcl-2. A expressão aumentada de bcl-2 já se verificou em vários subtipos de linfoma, sem apresentarem esta translocação ou outra. Outros processos são responsáveis

pela expressão aumentada de bcl-2, como amplificação do cromossoma 18q, mutações no gene bcl-2 ou deleção de uma região não conservada (resíduos 51-85)<sup>22, 23</sup>.

O bcl-2 é uma proteína, localizada no segmento 18q21.3 do cromossoma, numa orientação do telómero para centrómero<sup>24</sup>. É responsável pela expressão da proteína, bcl-2, que possui 26-KDa, 239 aminoácidos, localizado na mitocôndria, retículo endoplasmático e membrana nuclear<sup>25,26</sup>.

A expressão da bcl-2 identificou-se em vários tecidos tais como pâncreas<sup>27</sup>, mama<sup>28,29,30</sup>, endométrio<sup>31,32</sup>, pulmão<sup>33</sup>, tiróide, próstata<sup>34</sup>, trato gastrointestinal<sup>35,36</sup>, tecido linfático e pele<sup>37</sup>.

O Bcl-2 atua como inibidor da apoptose, em qualquer fase do ciclo celular. O mecanismo de ação da proteína inibidora Bcl-2 parece estar ligado à formação de canais de íões e proteínas, nas membranas em que estas proteínas se encontram, inibindo a permeabilidade da membrana, assim como da mitocôndria. Estudos de Reed (1999) sugerem o mecanismo pelo qual ocorre a inibição da apoptose: inibe a atividade da caspase ou impedindo a libertação do citocromo c da mitocôndria e/ou pela ligação ao fator de ativação da apoptose (Apaf-1).

O papel do bcl-2 no CCR acredita-se que está presente em estádios iniciais da carcinogénese<sup>38</sup>. Níveis mais baixos de bcl-2 podem levar à morte celular por apoptose<sup>39</sup>. A expressão aumentada pode impedir a apoptose nas células lesionadas<sup>40</sup>. Este facto, não só, pode levar à contínua divisão das células lesionadas e eventualmente, à rápida carcinogénese, mas também, pode contribuir<sup>41</sup> para a metastização nalguns carcinomas. Além disso, verifica-se<sup>42</sup> uma maior resistência ao tratamento.

A descrição da diferenciação tumoral e da sua correlação com a imunoexpressão de Bcl-2 em adenocarcinomas do cólon e do reto, é o objetivo deste estudo, constituindo uma contribuição para o esclarecimento da dinâmica e da utilidade deste marcador de proliferação tumoral neste tipo de tumores.

## 2. Materiais e Métodos

A amostra deste estudo consiste em 62 casos de adenocarcinomas do cólon e do reto de pacientes do Centro Hospitalar Cova da Beira, recolhidas entre 2001 e 2003.

As peças após serem biopsadas, coraram-se com Hematoxilina & Eosina, para o diagnóstico. Selecionaram-se as melhores amostras e procedeu-se ao estudo imunohistoquímico.

A descrição dos métodos, que a seguir se expõe, segue um protocolo do CHCB apresentado no anexo 2.

As peças excisadas preservam-se pela fixação em formol a 10 %, são observadas a seguir em macroscopia para descrição da amostra e recolhe-se a área de interesse que se pretende estudar: lesão tumoral, margem cirúrgica, zona de transição entre tecido normal e tumoral e mucosa normal. De seguida, introduz-se em cassetes de plástico convenientemente identificadas com o número de registo e do sequencial referente à zona de colheita.

Posteriormente, colocam-se no processador de tecidos (*Hipercenter XP*), para serem impregnados em parafina durante 16 horas, segundo protocolo standard. Seguidamente, são incluídos em blocos de parafina, e depois arrefecidos no aparelho de inclusão (*Microm*). Quando o bloco estiver frio, fazem-se cortes de 3 µm de espessura, e logo após são colocados em lâminas.

As lâminas sujeitas a coloração histológica de rotina permanecem 1 hora na estufa a 60°C. As lâminas que passam pelo processamento imunohistoquímico com Bcl-2 permanecem na estufa a 60°C overnight.

A coloração histológica de rotina com Hematoxilina & Eosina, foi realizada, segundo protocolo standard do CHCB.

O estudo imunohistoquímico baseia-se na interação antigénio-anticorpo. Assim sendo, passa por uma série de procedimentos standard descritos a seguir.

As lâminas que contêm as amostras, sofrem um processo de desparafinação e hidratação (efetuado na *Varistain XY, Shandon*). De seguida, efetua-se a recuperação antigénica com EDTA 1mM (efetuado na *Dako Cytomation- Target Retrieval Solution pH=9- S2367*) em microondas 750 W (10'+10').

A técnica de imunohistoquímica realiza-se na *Techmate Horizon* que envolve uma série de lavagens e incubações. Como anticorpo primário usa-se *Novocastra Anticorpo Monoclonal líquido de Ratinho, bcl-2 oncoprotein, código: NCL-L-bcl-2*, numa diluição de 1:25. Para o controlo positivo do anticorpo foi usada amostra de amígdala. Seguiu-se mais, mais uma sequência de lavagens e esponjas de 4 minutos, para incubação com o anticorpo secundário *Imunoglobulinas biotiniladas anti-ratinho e anti-coelho*. Para a diluição dos anticorpos usa-se *Dako Cytomation- ChemMate- Antibody Diluent- S. 2022*. Depois da incubação foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com *HP BK- Dako Real- Peroxidase Blocking Solution- S. 2023*, seguindo-se a incubação em estreptavidina peroxidase.

Por fim, para a demonstração da atividade da peroxidase usa-se como cromogéneo uma solução de diaminobenzidina.

Para obter um contraste nuclear usa-se a Hematoxilina de Mayer.

Procede-se de novo à desidratação com etanol crescente e, posteriormente xilol no *Shandon Varistain Y* e efetua-se montagem das lâminas usando meio de montagem sintético para torna-las definitivas.

Após a realização da técnica imunohistoquímica, a classificação foi feita segundo a intensidade e a quantidade de células imunoexpressas por campo. Relativamente à intensidade, a classificação foi feita em “-” (imunoexpressão nula), “+”, “++” e “+++” (intensidade crescente). Quanto à quantidade de células coradas por campo, a classificação foi feita em 0%, 25%, 50%, 75% e 100%.

Os dados recolhidos foram tratados estatisticamente usando Microsoft Office Excel 2007®, tendo sido realizada uma análise estatística descritiva.

### 3. Resultados

Neste estudo, no total, foram analisadas 62 peças cirúrgicas de adenocarcinomas do cólon e do reto, 6 bem diferenciadas (9,7%) (Figura 1), 55 moderadamente diferenciadas (88,7%) (Figura 2) e 1 pouco diferenciada (1,6%).

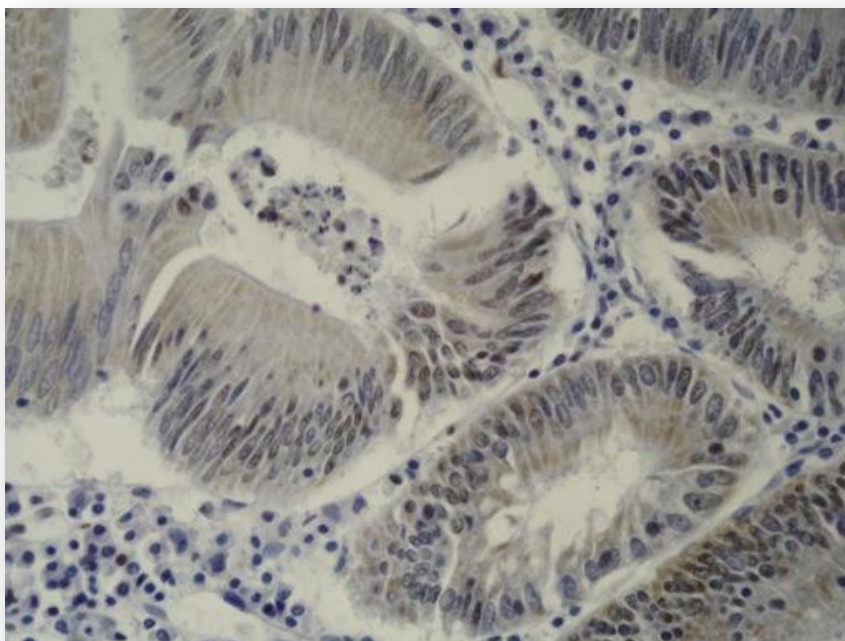


Figura 1-Adenocarcinoma do cólon bem diferenciado (100xx)

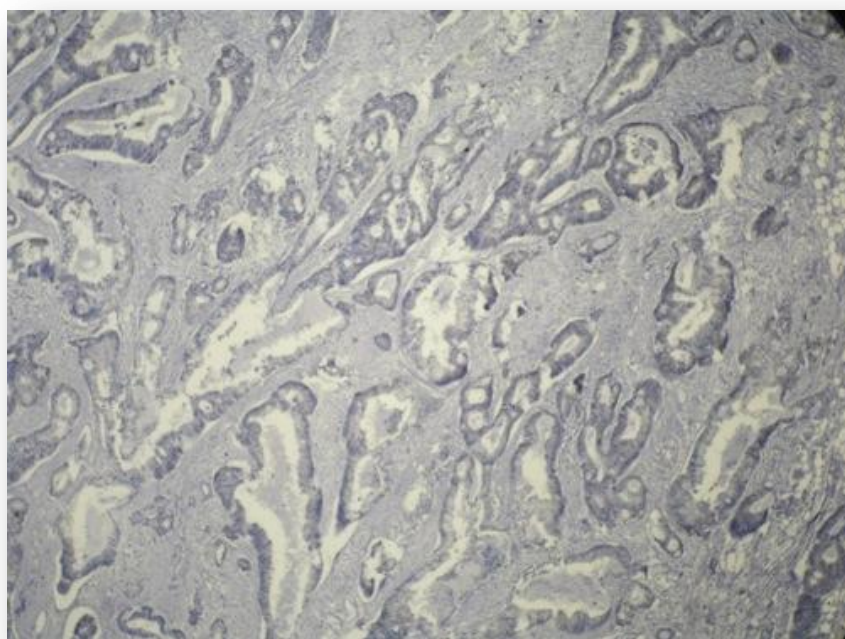


Figura 2- Adenocarcinoma do cólon moderadamente diferenciado (40xx)

Relativamente à intensidade com que os núcleos são imunoexpressos, verifica-se (Gráfico 1) que 40 (64,5%) são imunoexpressos negativamente ("-") (Figura 3), 10 (16,12%) apresentam intensidade "+", 10 (16,12%) intensidade "++" e 2 (3,22%) intensidade "+++" (Figura 4).

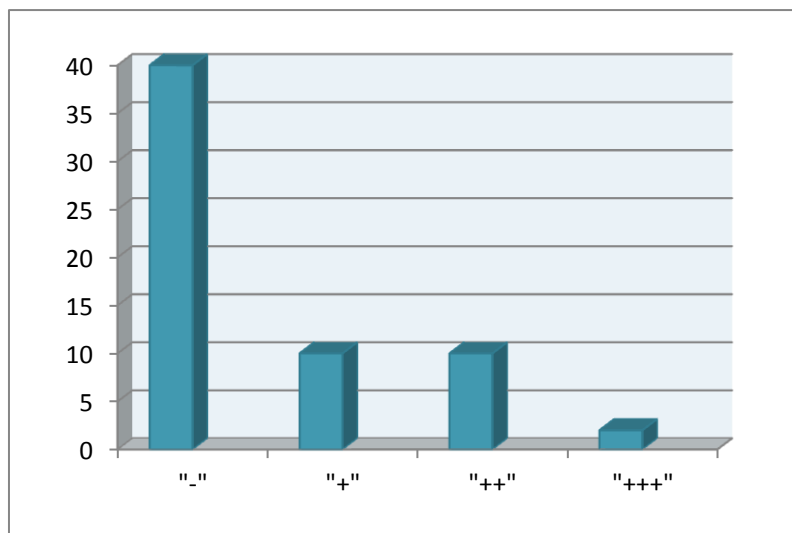


Gráfico 1- Intensidade de células marcadas com bcl-2

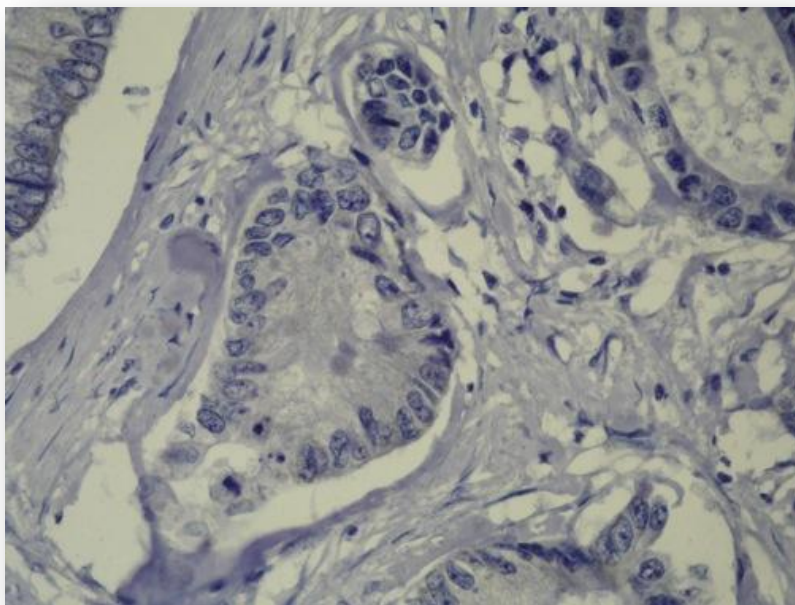


Figura 3-Adenocarcinoma do cólon com imunoexpressão negativa para o Bcl-2 (100xx)

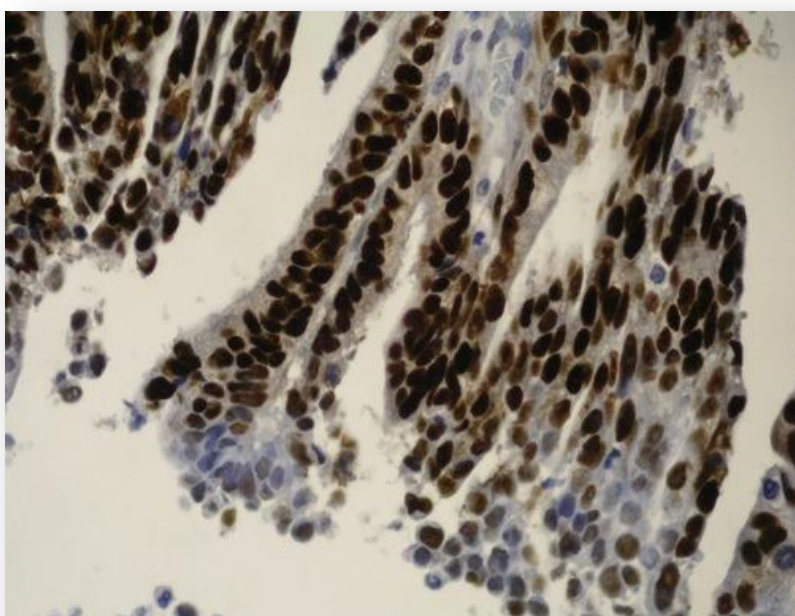


Figura 4-Adenocarcinoma do cólon com intensidade "+++" na imunoexpressão com Bcl-2 (100x)

No que diz respeito à quantidade de células imunoexpressas, constata-se (Gráfico2) 40 casos com imunoexpressão de 0% das células, 6 casos com 25 % (Figura 5), 10 casos com 50 % (Figura 6) e 6 casos com 75% (Figura 7). Não se observa nenhum caso com imunoexpressão de 100% das células.

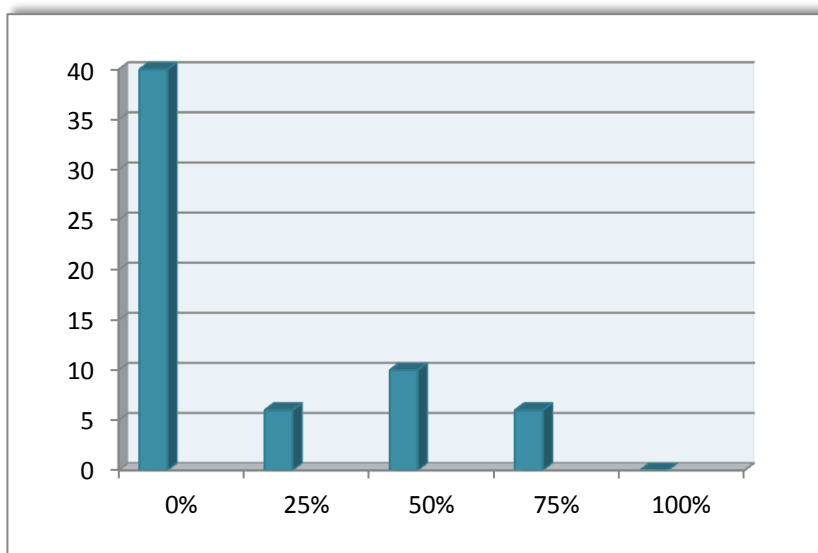


Gráfico 2- Número de células imunoexpressas com bcl-2

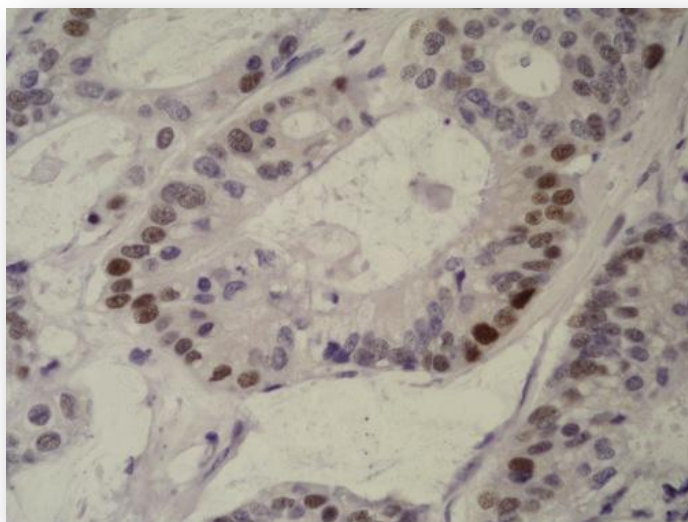


Figura 5-Adenocarcinoma do cólon com imunoexpressão de 25 % das células (100xx)

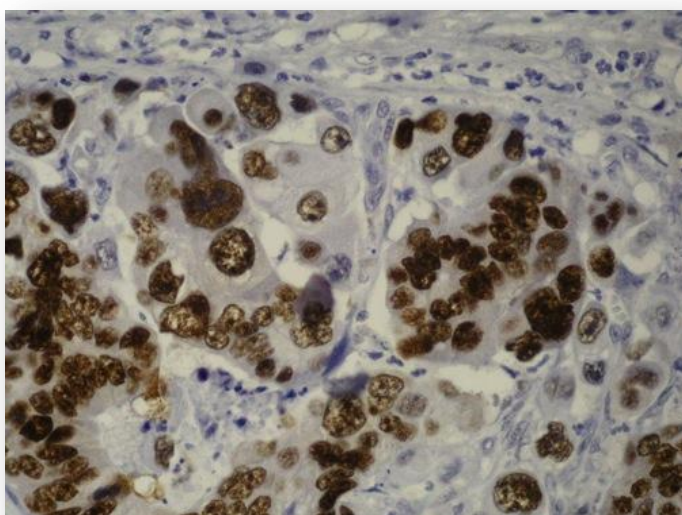


Figura 6-Adenocarcinoma do cólon com imunoexpressão 50% das células com bcl-2(100xx)

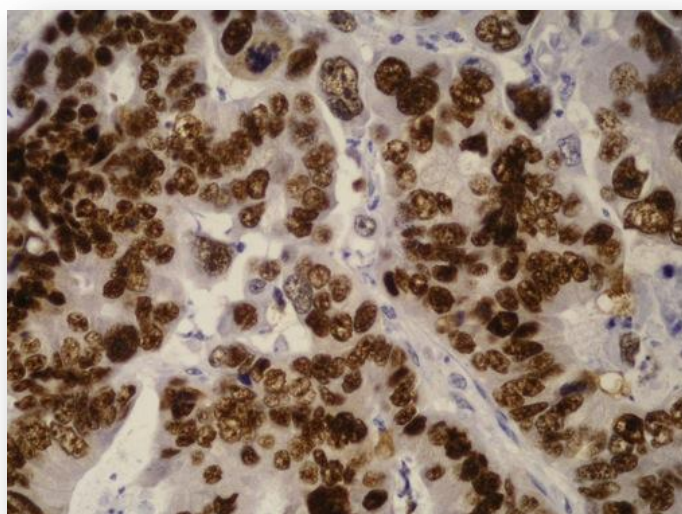


Figura 7-Adenocarcinoma do cólon com imunoexpressão de 75 % das células com bcl-2 (100xx)

Relativamente à relação da expressão do bcl-2 com a diferenciação do CCR verificam-se os seguintes aspetos (Tabela1).

O único caso de CCR pouco diferenciado não apresenta imunoexpressão das células com bcl-2 (0%, “-“).

Quanto aos CCR moderadamente diferenciados, 35 dos quais não têm imunoexpressão (0%, “-“), 5 apresentam imunoexpressão de 25 % das células com intensidade “+”, e apenas 1 com intensidade “++”; 10 casos com imunoexpressão de 50% das células, 6 com intensidade “++” e 4 com intensidade “+”; 4 casos com imunoexpressão de 75% das células, dos quais 2 com intensidade “++” e os outros 2 com intensidade “+++”.

Dos 6 CCR bem diferenciados, 4 não apresentam imunoexpressão (0%, “-“). Dos 2 casos restantes com imunoexpressão de 75% das células, 1 tem intensidade “+”, e o outro caso com intensidade “++”.

Tabela 1- Frequências absolutas dos dados relativos à quantidade de células imunoexpressas com bcl-2 e o grau de diferenciação.

	0%	25%	50%	75%	100%	Total
<b>Pouco diferenciado</b>	1	-	-	-	-	1
<b>Moderadamente diferenciado</b>	35	6	10	4	-	55
<b>Bem diferenciado</b>	4	-	-	2	-	6
<b>Total</b>	40	6	10	6	-	62

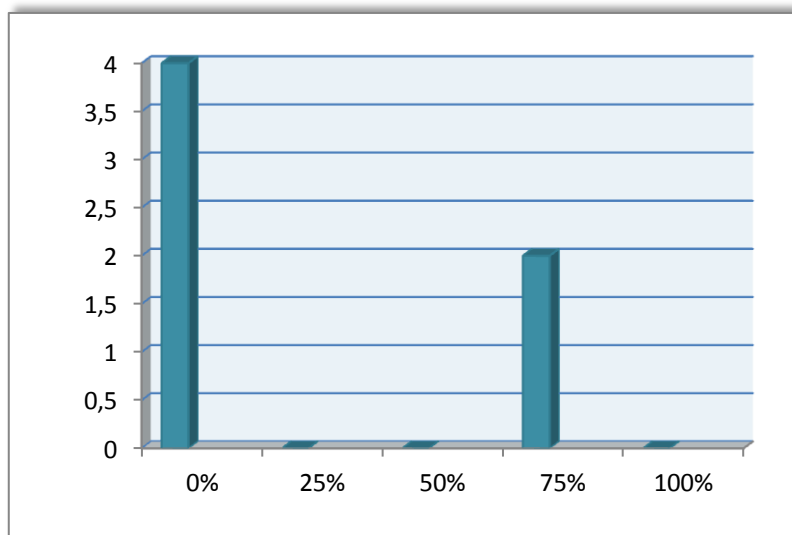


Gráfico 3-Número de células imunoexpressas com bcl-2 em CCR bem diferenciados

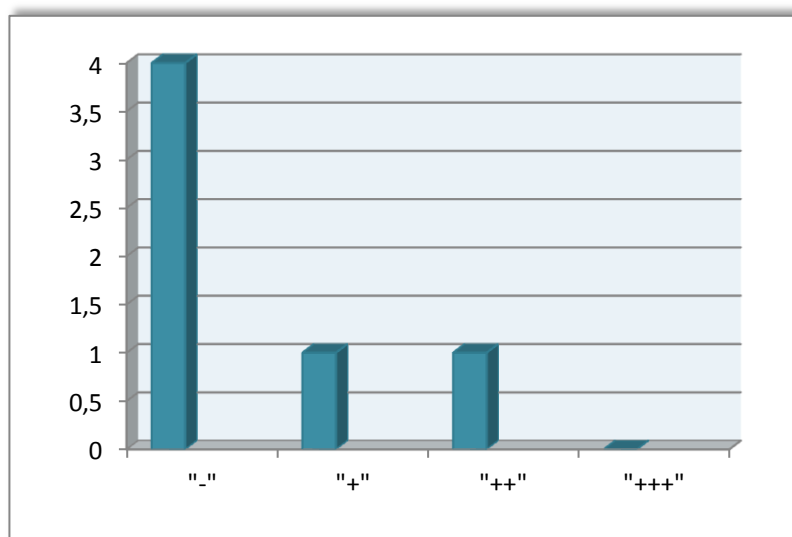


Gráfico 4- Intensidade das células imunoexpressas com bcl-2 nos CCR bem diferenciados

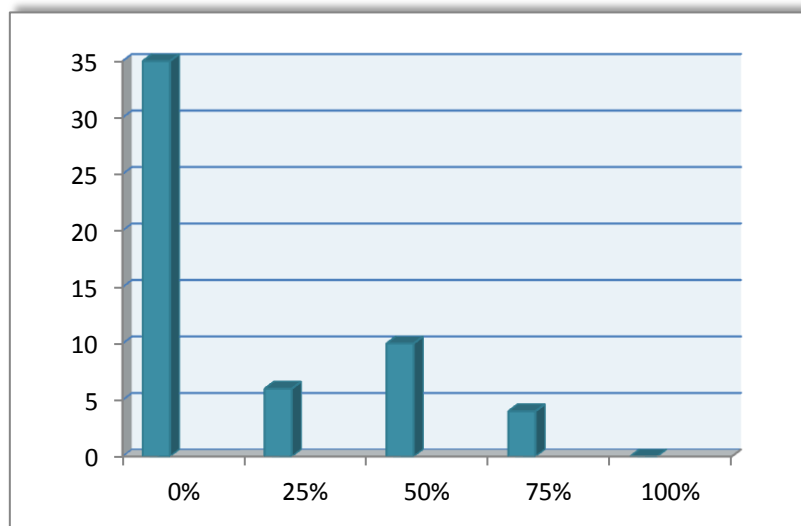


Gráfico 5-Número de células imunoexpressas com bcl-2 em CCR moderadamente bem diferenciados

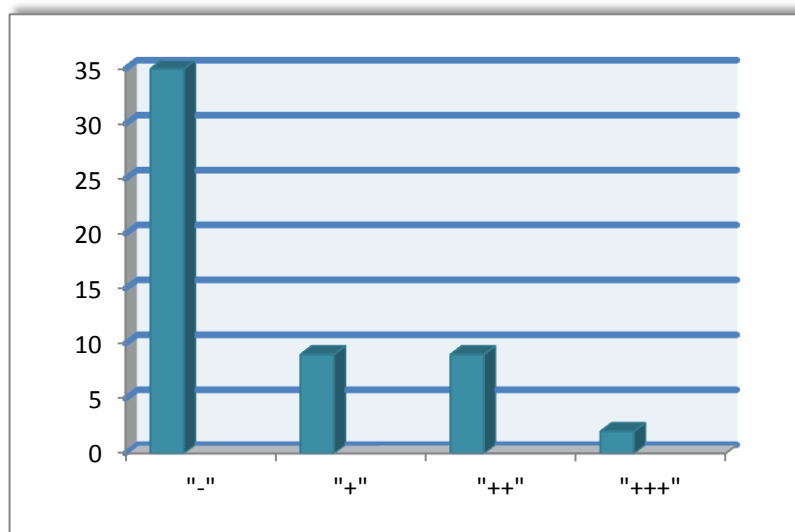


Gráfico 6-Intensidade com que as células são imunoexpressas com bcl-2 em CCR moderadamente bem diferenciados

## 4. Discussão

A morte celular programada (apoptose) tem sido implicada no desenvolvimento tumoral e no potencial metastático. O Bcl-2, um proto-oncogene inibidor da apoptose, tem vindo a ser alvo de estudo de vários tumores.

Este estudo avaliou a expressão IHQ da proteína Bcl-2 em 62 casos de adenocarcinoma do cólon e do reto, onde se evidenciaram 6 bem diferenciados, 55 moderadamente diferenciados e 1 pouco diferenciado.

Neste estudo ao avaliar a relação entre a diferenciação e a marcação com o bcl-2, verifica-se que o único caso pouco diferenciado, não apresenta imunoexpressão com bcl-2. Por outro lado, dos casos moderadamente diferenciados (n=55), 63,6% não apresentam imunoexpressão com bcl-2. Os CCR bem diferenciados (n= 6), 66, 7 % são bcl-2 negativas.

Os tumores pouco diferenciados apresentam uma negatividade na marcação com bcl-2, ou seja, baixa proliferação celular, enquanto que os moderadamente diferenciados apresentam, na sua maioria, bcl-2 negativos, o que demonstra uma baixa proliferação celular.

O padrão de imunorreatividade do oncogene bcl-2 é bastante variável, pode advir mais pelos métodos de interpretação distintos para uma determinada reação imunohistoquímica, do que pela técnica usada. Uma diminuição nos níveis de bcl-2 pode levar à morte por apoptose, enquanto que a expressão aumentada protege as células epiteliais contra a morte celular programada, e conseqüentemente à carcinogénese. Muitos estudos avaliaram a expressão da oncoproteína bcl-2 no cancro colorretal, mas a maior parte dos resultados avaliados nos diferentes estudos não apresentaram significância estatística em relação ao grau de diferenciação <sup>43, 44, 45, 46, 47, 48, 49</sup>.

A análise descritiva deste estudo, permite reforçar os resultados obtidos por outros estudos, visto que a hipótese de correlação entre a diferenciação tumoral e a proliferação celular, determinada pelo bcl-2, não leva a resultados conclusivos. A análise da expressão da oncoproteína bcl-2 em neoplasias, pode ter um papel para previsão da resposta terapêutica e prognóstico do cancro colorretal.

A integração da expressão do bcl-2 com outros indicadores de prognóstico é de extrema importância como ferramenta laboratorial para auxílio dos clínicos na escolha da opção terapêutica mais adequada a determinado doente. O seu potencial uso ainda permanece indeterminado.

## 5. Bibliografia

<sup>1</sup>International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN: Cancer Incidence and Mortality worldwide in 2008 (acedido a 15 de Maio 2011). Disponível na internet: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/colorectal.asp>

<sup>2</sup>International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2008 (IARC) *Section of Cancer Information (15/5/2011)*.

<sup>3</sup> Risco de Morrer em Portugal. Lisboa: Direcção-Geral da Saúde 2006.

<sup>4</sup> Jass JR: Pathogenesis of colorectal cancer. *Surg Clin N Am* 82:891, 2002.

<sup>5</sup> Kinzler KW, Vogelstein B: Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87:159, 1996.

<sup>6</sup> Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y et al. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319:525-532.

<sup>7</sup> Hardy RB, Meltzer SJ, Jankowsky JA. ABC od colorrectal câncer: Molecular basis for risk factos. *BMJ*. 2000 Oct 7;321:886-9.

<sup>8</sup>Hamilton SR, Lauri LA, editors. *Pathology and Genetics of Tumors of the Disgestive System*. Lyon: IARC Press; 2000.

<sup>9</sup> Bugart LJ (2002) Colorectal polyps and other precursor lesions. Need for an expanded view. *Gastronterol Clin North Am* 31:959-970.

<sup>10</sup> Wei EK, et al: Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int J Cancer* 108:443, 2004.

<sup>11</sup> Lieberman DA, et al: Risk factors for advanced colonic neoplasia and hyperplastic polyps in asymptomatic individuals. *JAMA* 290:2959, 2003.

<sup>12</sup> Robbins and Cotran *Pathologic Basis of Disease*, 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders Elsevier;2005. p. 905-909.

<sup>13</sup> Nowell PC. Molecular events in tumor development. *N Engl J MEd*. 1988;319:575-7.

<sup>14</sup> Pricolo VE, Finkelstein SD, Hansen K, Cole BF, Bland KI. Mutated p53 gene in an independent adverse predictor of survival in colon carcinoma. *Arch Surg*.1997;132:371-5.

<sup>15</sup> Moreira LF, Naomoto Y, Hamada M, Orita K. Assessment of apoptosis in oesophageal carcinoma preoperatively treated by chemotherapy and radiotherapy. *Anticancer Res*, 1995;15:639-44.

<sup>16</sup> Meterissian SH. Apoptosis: its role in the progression of and chemotherapy for carcinoma. *J Am Col Surg* 1997 Jun;184:658-66.

<sup>17</sup> Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of celldeath. *Blood* 1992 Aug 15;80(4):879-86.

<sup>18</sup> Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *The Lancet* 1993 May 15;341:1251-54.

<sup>19</sup> Flohil CC, Janssen PA, Bosman FT (1996) Expression of Bcl-2 protein in hyperplastic polyps, adenomas, and carcinomas of the colon. *J Pathol* 178:393-397.

<sup>20</sup> Y Tsujimoto, J Cossman, E Jaffe and CM Croce, Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma, *Science* 21 June 1985: Vol. 228 no. 4706 pp.1440-1443.

<sup>21</sup> Cleary ML and Sklar J: Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7439-7443,1985.

<sup>22</sup> Costas Nicolaidis, Sofia Dimou and Nicholas Pavlidis, Prognostic Factors in Aggressive Non-Hodgkin's Lymphomas, *The Oncologist* 1998;3:189-197.

<sup>23</sup> Outi Monni, Kaarie Franssila, Heikki Joensuu and Sakari Knuutila, Bcl-2 overexpression in Diffuse Large B-Cell Lymphoma, 1999, Vol.34, No.1-2, Pages 45-52.

<sup>24</sup> Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of celldeath. *Blood* 1992 Aug 15;80(4):879-86.

<sup>25</sup> Meyers ML, Balch CM. Diagnosis and treatment of metastatic melanoma. In: Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong S-J. *Cutaneous Melanoma*. Third edition. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc. 1998. p.325-60.).

<sup>26</sup> Reed JC:Bcl-2 and the regulation of programmed cell death.*J Cell Biol* 124:1-6,1994.

<sup>27</sup>Casneuf VF, Fonteyne P, Van Damme N, Demetter P, Pauwels P, de Hemptinne B, De Vos M, Van de Wlele C, Peeters M, Expression of SGLT1, Bcl-2 and p53 in primary pancreatic cancer related to survival, *Cancer Invest*, 2008 Oct;26(8):852-9.

<sup>28</sup> Lee KH, Im SA, Oh DY, Lee SH, Han W, Kim DW, Kim TY, Park IA, Noh DY, Heo DS, Ha SW, Bang YJ, Prognostic significance of bcl-2 expression in stage III breast cancer patients who had received doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel as adjuvant chemotherapy, *BMC Cancer*, 2007 Apr 12;7:63.

<sup>29</sup> Yang Q, Moran MS, Haffty BG, Bcl-2 expression predicts local relapse for early-stage breast cancer receiving conserving surgery and radiotherapy, *Breast Cancer Res Treat*, 2009 May; 115(2):343-8. Epub 2008 May 31.

<sup>30</sup> Von Minckwitz G, Sinn HP, Raab G, Loibl S, Blohmer JU, Eidtmann H, Hilfrich J, Merkle E, Jackisch C, Costa SD, Caputo A, Kaufmann M; German Breast Group, Clinical response after two cycles compared to HER2, Ki-67, p53 and bcl-2 in independently predicting a pathological complete response after preoperative chemotherapy in patients with operable carcinoma of the breast, *Breast Cancer Res*, 2008; 10(2):R30. Epub 2008 Apr 1.

<sup>31</sup> Appel ML, Edelweiss MI, Fleck J, Rivero LF, Rivoire WA, Mônico HI, Dos Reis R., P53 and Bcl-2 as prognostic markers in endometrial carcinoma, *Pathol Oncol Res*, 2008 Mar; 14(1):23-30 Epub 2008 Apr 9

<sup>32</sup> Mazurek A, Plerzynski P, Niklinska W, Chyczewski L, Laudanski T, Angiogenesis and Bcl-2 protein expression in patients with endometrial carcinoma, *Neoplasma*, 2002; 49(3):149-54.

<sup>33</sup> G. Fontanini, S. Vignati, D. Bigini, A. Mussi, M. Lucchi, C. A. Angeletti, F. Basolo, and G. Bevilacqua, Bcl-2 protein: a prognostic factor inversely correlated to p53 in non-small-cell lung cancer, *Br J Cancer*. 1995 May; 71(5):1003-1007.

<sup>34</sup> Sulik M., Guzinska-Ustymowicz K., Bcl-2 immunohistochemical detection in prostate cancer, *Rocz Akad Med Bialymst* 2002;47:254-61

<sup>35</sup> Lima MA, Ferreira MV, Barros MA, Pardini MI, Ferrasi AC, Mota RM, Rabenhorst SH, Relationship between EBV infection and expression of cellular proteins c-Myc, Bcl-2 and Bax in gastric carcinomas, *Diagn Mol Pathol* 2008 Jun; 17(2):82-9

<sup>36</sup> Mallick S, Patil R, Gyanchandani R, Pawar S, Palve V, Kannan S, Pathak KA, Choudhary M, Teni TR, Human oral cancers have altered expression of Bcl-2 family members and increased expression of the anti-apoptotic splice variant of Mcl-1, *J Pathol*, 2009 Feb: 217(3):398-407.

<sup>37</sup> Mikhail M, Velasquez E, Shapiro R, Berman R, Pavlik A, Sorhaindo L, Spira J, Mir C, Panageas KS, Polsky D, Osman I. PTEN Expression in Melanoma: relationship with patient survival, Bcl-2 expression, and proliferation. *Clin Cancer Res* 2005 Jul 15;11(14):5153-7.

<sup>38</sup> BOSARI S., MONEGHINI L., GRAZIANI D., LEE A. K., MURRAY J. J., COGGI G., VIALE G., *bcl-2 oncoprotein in colorectal hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas*, *Hum Pathol*, 1995, 26(5):534-540.

<sup>39</sup> CONTU P. C., CONTU S. S., MOREIRA L. F., *Bcl-2 expression in rectal cancer*, *Arq Gastroenterol*, 2006, 43(4):284-287.

<sup>40</sup> Reed, J.C. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124: 1-6, 1994.

<sup>41</sup> Fernandez Y, Gu B, Martinez A, Torregrosa A, Sierra A. "Inhibition of Apoptosis in Human Breast Cancer Cells: Role in Tumor Progression to the Metastatic State." *Int. J. Cancer* (2002). 101: 317-326.

<sup>42</sup> James, L.A. Comparative genomic hybridization as a tool in tumour cytogenetics. *J Pathol* 187: 385-95, 1999.

<sup>43</sup> Menezes HL, Jucá MJ, Gomes EG, Nunes BL, Costa HQ, Matos D., Analysis of the immunohistochemical expressions of p53, bcl-2 and Ki-67 in colorectal adenocarcinomas and their correlations with the prognostic factors, *Arq Gastroenterol*. 2010 Apr-Jun;47(2):141-7.

<sup>44</sup> Paulo C. CONTU, Simone S. CONTU and Luis F. MOREIRA, Bcl-2 expression in rectal cancer, *Arq Gastroenterol*. V.43-no.4-2006 Out/Dez

<sup>45</sup> Nianfeng Sun, Ph. D., Qingyi Meng, Ph. D., Ailing Tian, M. S., Expressions of the anti-apoptotic genes Bag-1 and Bcl-2 in colon cancer and their relationship, *The American Journal of Surgery* (2010) 200, 341-346.

<sup>46</sup> Laurent Poincloux, Xavier Durando, Jean François Seitz, Emilie Thivat, Valérie-Jeanne Bardou, Marie-Hélène Giovannini, Danièle Parriaux, Nicolas Barriere, Marc Giovannini, Jean-Robert Delpero, Geneviève Monges, Loss of Bcl-2 expression in colon cancer: A prognostic factor for recurrence in stage II colon cancer, *Surgical Oncology* (2009)18, 357e 365.

<sup>47</sup> O. Schwandner, T.H.K. Schiedeck, H.-P. Bruch, M. Duchrow, U. Windhoevel, R. Broll, p53 and Bcl-2 as significant predictors of recurrence and survival in rectal cancer, *European Journal of Cancer* 36 (2000) 348±356.

<sup>48</sup> Athanassios C. TSAMANDAS, Dimitrios Kardamakis, Theodore Petsas, V. Zolota, V. Vassiliou, Th, Matatsoris, Haralabos Kalafonos, Constantine E. Vagianos and Chrisoula D. Scopa, Bcl-2, Bax and p53 Expression in Rectal Adenocarcinoma. Correlation with Classic Pathologic Prognostic Factors and Patients' Outcome, *in vivo* 21: 113-118 (2007)

<sup>49</sup> Chandrakumar Shanmugam, Venkat R. Katkooi, Nirag C. Jhala, William E. Grizzle, Gene P. Siegal, and Upender Manne, p53 Nuclear Accumulation and Bcl-2 Expression in Contiguous Adenomatous Components of Colorectal Adenocarcinomas Predict Aggressive Tumor Behavior, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, Vol 56(3); 305-312, 2008.

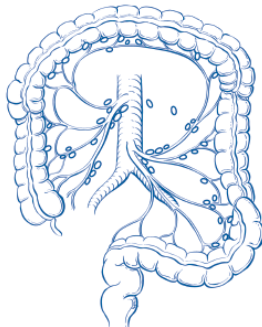
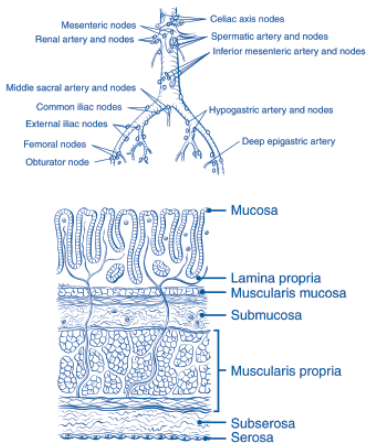
## 6. Anexos

No anexo 1 exponho a classificação TMN mais recente da American Joint Commission on Cancer.

O anexo 2 apresento o protocolo de processamento imunohistoquímico para o Bcl-2, utilizado no CHCB.

## Anexo 1

American Joint Committee on Cancer  
**Colon and Rectum Cancer Staging** 7th EDITION



**Definitions**

**Primary Tumor (T)**

- Tx** Primary tumor cannot be assessed
- T0** No evidence of primary tumor
- Tis** Carcinoma in situ: intraepithelial or invasion of lamina propria<sup>1</sup>
- T1** Tumor invades submucosa
- T2** Tumor invades muscularis propria
- T3** Tumor invades through the muscularis propria into pericolorectal tissues
- T4a** Tumor penetrates to the surface of the visceral peritoneum<sup>2</sup>
- T4b** Tumor directly invades or is adherent to other organs or structures<sup>2,3</sup>



**Regional Lymph Nodes (N)<sup>4</sup>**

- Nx** Regional lymph nodes cannot be assessed
- N0** No regional lymph node metastasis
- N1** Metastasis in 1–3 regional lymph nodes
- N1a** Metastasis in one regional lymph node
- N1b** Metastasis in 2–3 regional lymph nodes
- N1c** Tumor deposit(s) in the subserosa, mesentery, or nonperitonealized pericolic or perirectal tissues without regional nodal metastasis
- N2** Metastasis in 4 or more regional lymph nodes
- N2a** Metastasis in 4–6 regional lymph nodes
- N2b** Metastasis in 7 or more regional lymph nodes

**Distant Metastasis (M)**

- M0** No distant metastasis
- M1** Distant metastasis
- M1a** Metastasis confined to one organ or site (for example, liver, lung, ovary, nonregional node)
- M1b** Metastases in more than one organ/site or the peritoneum

Stage	ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS				
	T	N	M	Dukes <sup>a</sup>	MAC <sup>b</sup>
0	Tis	N0	M0	—	—
I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
IIA	T3	N0	M0	B	B2
IIB	T4a	N0	M0	B	B2
IIC	T4b	N0	M0	B	B3
IIIA	T1–T2	N1/N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
IIIB	T3–T4a	N1/N1c	M0	C	C2
	T2–T3	N2a	M0	C	C1/C2
IIIC	T1–T2	N2b	M0	C	C1
	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3–T4a	N2b	M0	C	C2
	T4b	N1–N2	M0	C	C3
IVA	Any T	Any N	M1a	—	—
IVB	Any T	Any N	M1b	—	—

NOTE: cTNM is the clinical classification, pTNM is the pathologic classification. The y prefix is used for those cancers that are classified after neoadjuvant pretreatment (for example, ypTNM). Patients who have a complete pathologic response are ypT0N0M0 that may be similar to Stage Group 0 or I. The r prefix is to be used for those cancers that have recurred after a disease-free interval (rTNM).  
<sup>a</sup> Dukes B is a composite of better (T3 N0 M0) and worse (T4 N0 M0) prognostic groups, as is Dukes C (any T N1 M0 and Any T N2 M0). MAC is the modified Astler-Coller classification.

**Notes**

- <sup>1</sup> Tis includes cancer cells confined within the glandular basement membrane (intraepithelial) or mucosal lamina propria (intramucosal) with no extension through the muscularis mucosae into the submucosa.
- <sup>2</sup> Direct invasion in T4 includes invasion of other organs or other segments of the colorectum as a result of direct extension through the serosa, as confirmed on microscopic examination (for example, invasion of the sigmoid colon by a carcinoma of the cecum) or, for cancers in a retroperitoneal or subperitoneal location, direct invasion of other organs or structures by virtue of extension beyond the muscularis propria (that is, a tumor on the posterior wall of the descending colon invading the left kidney or lateral abdominal wall) or a mid or distal rectal cancer with invasion of prostate, seminal vesicles, cervix, or vagina).
- <sup>3</sup> Tumor that is adherent to other organs or structures, grossly, is classified T4b. However, if no tumor is present in the adhesion, microscopically, the classification should be pT1–T4a depending on the anatomical depth of wall invasion. The V and L classifications should be used to identify the presence or absence of vascular or lymphatic invasion, whereas the PN site-specific factor should be used for perineural invasion.
- <sup>4</sup> A satellite peritumoral nodule in the pericolorectal adipose tissue of a primary carcinoma without histologic evidence of residual lymph node in the nodule may represent discontinuous spread, venous invasion with extravascular spread (V1/2), or a totally replaced lymph node (N1/2). Replaced nodes should be counted separately as positive nodes in the N category, whereas discontinuous spread or venous invasion should be classified and counted in the Site-Specific Factor category Tumor Deposits (TD).



Financial support for AJCC 7th Edition Staging Posters provided by the American Cancer Society

Copyright © 2009 American Joint Committee on Cancer. Printed with permission from the AJCC.

Adaptado de AJCC Staging Manual, 7th edition

## Anexo 2

Em anexo apresento o Protocolo do Autostainer da TechMateMT Horizon (versão 3.0) para o tratamento de tecidos com Bcl-2.

Tabela 2-Etapas do Protocolo do Autostainer da TechMateMT Horizon (versão 3.0) para o tratamento de tecidos com Bcl-2.

Etapas	Procedimento realizado	Tempo em minutos (‘) e em segundos (‘‘)
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	CROMOGÊNICO - DAB	5'
52	PAD3	29''
53	BUFF3	10''
54	PAD3	45''
55	CROMOGÊNICO - DAB	5'
56	PAD3	29''
57	BUFF3	10''
58	PAD3	45''
59	CROMOGÊNICO - 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''