

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EXPRESSÃO DO P53 E RELAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA NO
ADENOCARCINOMA DE RETO

MÁRCIA TERESINHA JURACH

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIS FERNANDO MOREIRA

Porto Alegre

2003

Este trabalho segue as normas padronizadas pelo Sistema Vancouver.

Tudo deve
ser feito
o mais
simplesmente
possível ...
mas não
mais simples
que isso.

Albert Einstein

Ao meu esposo César
pelo carinho, incentivo e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Luis Fernando Moreira**, orientador e amigo, pelo incentivo e oportunidade proporcionada para a realização deste trabalho.

À Dra **Luise Meurer**, patologista do Serviço de Patologia do HCPA pela disponibilidade, presteza e competência na análise das lâminas de HE e Imunoistoquímica e sugestões ao trabalho.

À técnica em histologia **Flávia Giusti**, do Laboratório de Patologia Experimental do HCPA, pelo interesse e presteza demonstrados na coleta dos blocos de parafina e preparação das lâminas.

À Sra. **Estela Maris Araripe**, secretária do Programa de Pós-Graduação, sempre atenciosa e solícita.

Aos **coordenadores do Programa de Pós-Graduação**, por possibilitarem a realização deste projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, pelo auxílio financeiro parcial desta pesquisa.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O adenocarcinoma colorretal é um dos tumores malignos mais frequentes no mundo ocidental. Sua incidência varia mundialmente; nos Estados Unidos (EUA), é o terceiro câncer mais comum entre os homens e o segundo mais comum entre as mulheres, sendo a segunda causa de morte por câncer, superada apenas pelo tumor de pulmão. No Brasil, está entre as seis neoplasias mais frequentes, ocupando a quarta posição em mortalidade. Os principais indicadores prognósticos do adenocarcinoma colorretal incluem a diferenciação histológica, profundidade de invasão e ocorrência de metástases. Recentemente, têm sido realizados diversos estudos usando técnicas de biologia molecular objetivando a identificação de novos parâmetros prognósticos. Entre estes, os fatores que regulam o ciclo celular influenciando no crescimento e mecanismo de apoptose têm demonstrado resultados promissores. O **p53** é um gene supressor de tumores, localizado no braço curto do cromossomo 17; produz uma proteína chamada p53. Sua principal função é controlar pontos de checagem do ciclo celular, promover o reparo do DNA através do estímulo de outras proteínas (p21, por exemplo) e estimular a apoptose. Mutações deste gene produzem uma proteína p53 inativa que acumula nas células tumorais. A expressão desta proteína alterada é detectada em 30 a 70% dos tumores de reto e pode estar relacionada a mau prognóstico. O **p53** é um dos genes mais comumente mutados no câncer humano. O objetivo deste estudo foi correlacionar a expressão imuno-histoquímica da proteína p53 com variáveis clínico-patológicas do adenocarcinoma de reto e sobrevida. Foram estudados 83 casos de pacientes operados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre 1985 e 1997 através de reação

imunohistoquímica utilizando anticorpo monoclonal Pab-1801 em amostras biológicas
fixadas em formalina e

armazenadas em blocos de parafina. Com um ponto de corte de 5%, 44 pacientes (53%) demonstraram expressão imunohistoquímica da proteína p53 maior que 5% e, com um ponto de corte de 20%, 36 pacientes (43,4%) demonstraram a expressão maior que 20%. Não houve associação estatisticamente significativa entre a expressão de p53 e as variáveis idade, gênero, localização, tamanho do tumor e comprometimento circunferencial. Encontramos associação entre p53 e óbito, recidiva local, metástases e recidiva total quando utilizado o ponto de corte de 20%, indicando um pior prognóstico nos pacientes com p53 positivos. Na análise multivariada em relação à sobrevida, o p53 teve poder prognóstico independente em relação às variáveis da classificação Astler-Coller e grau de diferenciação histológica da neoplasia.

ABSTRACT

Colorectal carcinoma is one of the most prevalent solid tumours in the western world. In the United States is the third most frequent neoplasia in men and the second most frequent in women. In Brazil, it is among the six more common neoplasms; it is ranked fifth in mortality. The main prognostic indicators of colorectal adenocarcinoma are histological differentiation, depth of invasion and metastatic involvement. Recently, many studies in molecular biology have been carried out aiming the identification of new prognostic parameters. The factors that regulate cell cycle implicated in cell growth and apoptosis have been shown promising results. **P53** is a suppressor gene, located on the short arm of chromosome 17; the product of the **p53** gene is a protein also called p53. Its main function on cell proliferation includes regulation of the transition from G1 to S phase as a checkpoint control factor and promotion of the DNA repair through stimulation of another protein (p21) and induction of apoptosis. Mutation of this gene produces loss of p53 function and leads to accumulation into cell. **P53** mutation is detected in 30% to 70 % of rectal tumors and it is related with poor prognosis. **P53** is the most frequent mutated gene on human cancer. The aim of this study was to determine the correlation of the immunohistochemical p53 expression with clinical and pathological variables and to determine its prognosis value on rectal carcinoma. We study 83 patients operated on Hospital de Clínicas de Porto Alegre during 1985 to 1997. Pab-1801 monoclonal antibodies against p53 was used in formaline samples fixed. A total of 44 (53%) cases showed p53 expression, with a cutoff of 5% and 36 (43,4%) cases, with cutoff of 20%. We did not find any association of p53 expression with age, gender, tumour site, grade and mucus production at 5% cutoff.

However, we did find association between p53 expression with survival and recurrence on 20% cutoff, clearly indicating poor prognosis in p53 positive patients. Multivariate analysis for survival, showed P53 expression a powerful prognosis independent factor in despite another variables like Astler-Coller system or differentiation tumors.

SUMARIO

Agradecimentos	III
Resumo	IV
Abstract	V
Sumário	VI
Introdução e Justificativa	1
Objetivos	5
Fundamentação teórica	6
Artigo completo	
Abstract	38
Introdução	38
Pacientes e Métodos	40
Resultados	43
Discussão (artigo)	58
Referências bibliográficas (artigo)	61
Discussão	64
Conclusão	69
Referências Bibliográficas	70
Listas de abreviaturas, siglas e unidades	79
Lista de Figuras	81
Lista de Tabelas	82
Lista de Anexos	
Anexo I: Formulário para coleta de dados	83
Anexo I I: Termo de Consentimento	86

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O câncer colorretal é uma das principais causas de morte por doença maligna no mundo ocidental. Nos Estados Unidos, é o terceiro câncer mais comum entre os homens e o segundo entre as mulheres. Constitui-se na segunda maior causa de óbitos por doença maligna, abaixo apenas do carcinoma de pulmão^{1,2,3}. No Brasil, este câncer ocupa a quarta posição em óbitos, tanto em homens quanto em mulheres. Foi estimada uma incidência de 13.473 casos novos e 6.725 mortes para o ano 2002. Cerca de 40% dos casos têm origem no reto. Os números esperados de óbitos por câncer de cólon e reto para 2003 são 3.700 e 4.270 para homens e mulheres, respectivamente.²⁰

Na região sul, a estimativa para câncer do cólon e reto para 2003 foi de 2.800 novos casos e 1.800 óbitos. No Rio Grande do Sul, é a quarta causa de morte por neoplasia e a segunda causa de morte por tumor gastrointestinal. É responsável por 50% dos casos de câncer na população acima dos 65 anos, sendo um dos tumores mais frequentes em mulheres acima desta idade.³ Segundo dados do DATASUS, na região metropolitana de Porto Alegre, em 1997, houve o registro de 329 ocorrências de óbito por neoplasia de cólon e reto.⁴

As taxas de incidência vêm aumentando e esta doença permanece uma grande fonte de morbi-mortalidade. O prognóstico do câncer retal está diretamente relacionado a aspectos histopatológicos como extensão da penetração da parede do reto, invasão da gordura perirretal e comprometimento linfonodal, sendo este fator prognóstico independente. Estas características estão diretamente relacionadas ao estadiamento

patológico.^{5,6} Outros aspectos histopatológicos, como pouca diferenciação celular, margem comprometida na excisão, invasão linfovascular, invasão perineural e produção de muco também têm sido associados a um pior prognóstico, mas sua avaliação é subjetiva, semiquantitativa e variável em diferentes áreas do mesmo tumor. Assim sendo, há necessidade de se buscar parâmetros prognósticos mais objetivos e qualitativos que possam ser obtidos ainda na fase pré-operatória.⁵ Outros fatores relacionados ao tumor, como tamanho, localização, aspecto macroscópico e perfuração trans-operatória também têm sido implicados no prognóstico mas, sem valor prognóstico independente.^{5,6,7}

As neoplasias retais comportam-se de maneira variável e pouco previsível; pacientes com tumores em estágios iniciais e operados com intenção curativa, podem apresentar evolução desfavorável, sendo o contrário verdadeiro.^{1,5} O comportamento biológico e clínico destes tumores não está totalmente esclarecido.⁸

A mortalidade devido ao tumor tem se mantido elevada apesar dos inúmeros avanços no diagnóstico precoce, nos procedimentos de rastreamento para indivíduos de alto risco, nas técnicas cirúrgicas e nos cuidados perioperatórios.^{2,3}

Embora esteja aumentando o diagnóstico de carcinoma “de novo”, a tumorigênese do carcinoma colorretal tem sido considerada um complexo processo de uma série de mutações gênicas, levando lesões precursoras a carcinoma invasivo e metástases (seqüência adenoma-carcinoma). Determinadas alterações genéticas podem levar a graus variáveis de agressividade destes tumores. O estabelecimento de uma correlação entre dano genético e prognóstico tem sido alvo de extensas investigações nos últimos anos.^{7,8,9,10}

Novos fatores prognósticos estão sendo estudados a fim de esclarecer esta evolução desfavorável em pacientes inicialmente considerados curados,^{5,7} como as alterações genéticas e os mecanismos de controle do ciclo celular. Índices

elevados de proliferação e expressão de determinados oncogenes, genes supressores de tumores ou genes de reparo têm sido determinados em várias neoplasias humanas, incluindo-se o carcinoma colorretal.^{5,6,7,9,10}

O **p53** é um dos genes mais comumente mutados no câncer humano, estando inativo em quase metade de todos os tumores. As transições do ciclo celular ocorrem por um mecanismo regulador que recebe uma ampla variedade de sinais, desencadeando o prosseguimento do ciclo de determinada célula. Os controladores dos pontos de checagem informam sobre a integridade do genoma; quaisquer danos, ativação de oncogenes, hipóxia e/ ou infecção viral são sinais de alerta que levam à parada na progressão do ciclo mediado pelo mecanismo regulador cujo, controlador essencial parece ser o **p53**- o “guardião do genoma”.^{8,12}

O gene supressor **p53** está localizado no braço curto do cromossomo 17. Mutações deste gene constituem a alteração genética mais freqüente nas neoplasias malignas e está relacionado a um pior prognóstico. A falha ocorre pela substituição de bases entre os exons 5 e 8 do gene **p53**, produzindo uma proteína mutante p53, inativa, que se acumula no núcleo das células afetadas. A expressão desta proteína (alterada) é detectada em 30 a 70% dos tumores de reto.^{13, 14, 15, 16, 17}

A meia-vida da proteína normal é muito curta, aproximadamente 20 minutos. Por isso a proteína p53 é detectada em baixas doses ou indetectável em células normais, ocorrendo o contrário nas células tumorais, onde a proteína mutante é mais estável. A função desta proteína não está bem estabelecida. Ela age no ciclo celular, regulando a transição da fase G1 a fase S. Na presença de erro na síntese do DNA, a proteína p53 promove a expressão do gene **WAF1/Cip1** (proteína p21) que se liga à CDK (Ciclyl dependent kinases – quinase ciclino-dependente) e inibe a sua atividade. Desta maneira, o ciclo celular é interrompido antes da síntese do DNA, dando oportunidade para reparo do

mesmo. Se o reparo não ocorrer, a presença de p53 normal pode promover a morte celular (apoptose).^{14, 16, 17, 18}

Apesar de inúmeros avanços obtidos na cirurgia colorretal e de novas abordagens multimodais, o tumor de reto ainda é uma patologia de difícil tratamento. O estudo da carcinogênese colorretal pode produzir vários benefícios no manejo deste tumor, desde o diagnóstico até o seguimento pós-operatório.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Avaliar a expressão imuno-histoquímica da proteína p53 no adenocarcinoma de reto, observando as características clínico-patológicas da doença.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Determinar a relação da expressão imuno-histoquímica da proteína p53 com a presença ou ausência de metástases à distância e recorrência loco-regional.

Determinar a relação da expressão imuno-histoquímica da proteína p53 com as variáveis sobrevida livre de doença e sobrevida global.

Comparar a expressão imuno-histoquímica da proteína p53 e o grau de diferenciação tumoral, classificação Astler-Coller e presença de metástases em linfonodos.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O carcinoma colorretal é um dos tumores malignos mais freqüentes no mundo ocidental. Sua incidência varia mundialmente; nos Estados Unidos (EUA), é o terceiro câncer mais comum entre os homens e o segundo mais comum entre as mulheres, sendo a segunda causa de morte por câncer, ficando atrás, apenas, do tumor de pulmão.¹ A cada ano, são diagnosticados aproximadamente 155.000 novos casos de adenocarcinoma colorretal e 50.000 óbitos por esta causa naquele país. A Sociedade Americana de Câncer estima que no ano de 2002 houve 41000 novos casos de câncer de reto, e aproximadamente 8500 pessoas morreram devido a doença.¹⁹

No Brasil, este câncer ocupa a quarta posição em óbitos, tanto em homens quanto em mulheres. No período entre os anos 1979 e 2000 ocorreu uma variação percentual relativa das taxas de mortalidade de 76,7% entre homens, passando de 2,44/100.000 para 4,32/100.000 e de 69% entre mulheres, passando de 2,80/100.000 para 4,75/100.000. O número estimado de novos casos para 2003 é de 9.530 em homens e de 10.545 em mulheres, sendo o número de óbitos esperados entre homens e mulheres, respectivamente, de 3.700 e de 4.270. Cerca de 40% dos casos têm origem no reto.³

No Rio Grande do Sul (RS), o adenocarcinoma colorretal corresponde à quarta causa de morte por neoplasia e à segunda causa de morte por tumor gastrointestinal. É responsável por 50% dos casos de câncer na população acima dos 65 anos, sendo um dos tumores mais freqüentes em mulheres acima desta idade.^{3,4}

Há evidência de que a doença neoplásica exista nos seres humanos desde a pré-história. Múmias do Peru pré-colombiano de 2.400 anos atrás, assim como múmias egípcias de 3000 aC., exibem depósitos esqueléticos metastáticos.²¹ Hipócrates (460-370

aC.) tentou explicar a invasão cancerosa: uma doença com excesso de bile preta, um dos quatro humores do corpo (bile preta, bile amarela, sangue e catarro). Admitia-se que a invasão ocorria por vazamento ou difusão de bile preta para dentro ou para fora do tecido afetado. Essa teoria prevaleceu por mais de 2.000 anos.²²

Hohanner Peter Mueller descreveu pela primeira vez, em 1828, a etiologia celular. E em 1829, Joseph Claude Recamier propôs que a invasão e a propagação distal resultavam da translocação das células, definindo o fenômeno como metástase.²² Desde esta época, muito se descobriu sobre a neoplasia, mas não o suficiente para curá-la totalmente.

Estudos epidemiológicos demonstraram que os hábitos dietéticos podem influenciar o surgimento de pólipos e carcinomas colorretais. A incidência de câncer colorretal é maior nos países industrializados, onde o consumo per capita de carnes, gorduras e carboidratos é alto. Os fatores que se correlacionam mais fortemente com maior risco para o surgimento de câncer colorretal são o consumo de gorduras animais, carnes e o conteúdo de colesterol fecal. As dietas ricas em gorduras induzem uma maior excreção de ácidos biliares que agem como promotores tumorais no cólon. As fibras têm efeito protetor, principalmente aquelas derivadas de frutas e verduras. Estudos prévios têm demonstrado que uma dieta rica em fibras pode reduzir o risco de câncer colorretal em até 40 por cento.^{23,24}

Outros elementos, além das fibras, podem ter efeito benéfico e protetor no intestino, tais como cálcio, vitaminas (A, D, E, C) e selênio. A suplementação de cálcio pode normalizar a proliferação bacteriana no intestino e diminuir os efeitos maléficos que o aumento bacteriano causa.²⁵ Hormônios peptídicos e fatores de crescimento também exercem influência na carcinogênese. A gastrina, formada nas células G do antro gástrico, é um deles. Concentrações elevadas de gastrina foram demonstradas em pacientes com

câncer e pólipos colorretais e receptores de gastrina foram identificados na mucosa intestinal. Foi mostrado que a gastrina promove o crescimento de alguns cânceres gástricos e colônicos *in vitro*.²⁶

Os principais fatores de risco para adenocarcinoma colorretal são: idade, doença inflamatória, história familiar, sexo, raça, consumo de álcool, tabagismo e estilo de vida.²⁷

A idade pode ser considerada um dos principais fatores de risco para tumor de reto. Aproximadamente 90% dos pacientes com esta doença têm mais de 50 anos. O aumento do risco inicia-se a partir dos 40 anos. A média de idade do diagnóstico é 62 anos, e aproximadamente 6% das pessoas entre 75 e 80 anos tem tido câncer colorretal em algum momento de suas vidas.²⁷

As doenças inflamatórias intestinais, retocolite ulcerativa idiopática e doença de Crohn, aumentam o risco de câncer. Em 1925, Crohn e Rosenberg formularam pela primeira vez uma relação entre colite ulcerativa e câncer colorretal. É incontestável que a colite ulcerativa predispõe os pacientes ao adenocarcinoma, especialmente quando o processo inflamatório acometer todo o intestino grosso, a duração da doença for maior do que 10 anos e o início da colite ocorrer em idade jovem. O risco pode chegar a 40% em pacientes que tenham o início de pancolite antes dos 15 anos de idade.^{27,28}

Nas famílias que têm membros com câncer colorretal, o risco é maior. Na Polipose Adenomatosa Familiar (PAF), uma doença rara, autossômica dominante, o adenocarcinoma surge por volta dos 40 anos, se não tratado com cirurgia profilaticamente. Aproximadamente 1% dos adenocarcinomas colorretais, são causados pela PAF e de 5 a 10% são causados pelo Câncer Colorectal Hereditário não Polipóide.²⁷ Nos Estados Unidos, o risco de câncer colorretal em homens é maior do que em mulheres e maior em negros do que em outros grupos raciais. Nos EUA entre 1973 e 1992, o risco de câncer colorretal aumentou na raça negra, 40% para os homens e 16% para as

mulheres. Como a incidência deste câncer é muito baixa na África, acredita-se que este aumento se deva mais a fatores ambientais do que a fatores raciais propriamente ditos.²⁷

Atualmente, embora sejam utilizados exames mais sofisticados para o diagnóstico e estadiamento do câncer retal como a colonoscopia e a tomografia computadorizada, o toque retal não perdeu sua importância, pois ele pode definir claramente características como nível de extensão do tumor, tamanho, forma e comprometimento da parede (fixo ou móvel), nos tumores localizados em reto inferior.²⁹

O câncer de reto é uma doença com elevada morbidade e mortalidade e a cirurgia ainda é a pedra fundamental do seu tratamento, porém com limitações inerentes impostas pelas características biológicas, estágio e localização do tumor. O progresso no seu controle tem sido limitado nas últimas décadas, apesar de melhores métodos de diagnóstico precoce e de tratamento cirúrgico. Tanto as metástases à distância quanto a recorrência pélvica podem afetar o prognóstico de pacientes que são submetidos à ressecção curativa.¹⁹

Os princípios básicos do tratamento cirúrgico do câncer retal foram inicialmente formulados por Moynihan em 1908. No início do século passado, quando a cirurgia era apenas perineal, a recorrência atingia níveis de aproximadamente 100%. Miles desenvolveu uma técnica combinada de ressecção abdominal e perineal. Em 1923, ele relatou uma mortalidade de 9,5% e uma recidiva inicial de 29,5% com esta técnica, indicando que o câncer de reto poderia ser curado pela cirurgia. Seu estudo incluía 65 pacientes. Entretanto a recorrência permaneceu alta num seguimento de 5 anos, aproximadamente 50% até a década de 50, com uma sobrevida global de 16.6% a 37.5 por cento.³¹

Nas últimas décadas, têm ocorrido muitas alterações no tratamento cirúrgico do câncer retal. O aperfeiçoamento das técnicas cirúrgicas, anestesia e cuidados pós-operatórios, têm contribuído para redução da mortalidade.¹⁹

A ressecção curativa é definida como aquela onde é realizada macroscopicamente toda remoção do tumor, incluindo linfonodos loco-regionais e estruturas adjacentes. Está associada a uma melhor sobrevida.³² A melhor compreensão da disseminação do câncer de reto proporcionou uma técnica cirúrgica mais efetiva, com preservação esfinteriana em muitos casos e ampliação cirúrgica com ressecção de tecidos perirretais e mesorreto.^{33,34}

A extensão do limite distal foi repetidamente discutida na literatura. Passou de 5cm para 2cm.³⁵ Com o reconhecimento de 2cm de margem distal como adequada, a preservação esfinteriana foi mais difundida a partir da década de 80. Conseqüentemente, houve uma inversão no número de amputações abdômino-perineais do reto para retossigmoidectomias abdominais com anastomose baixa nos últimos 25 anos, embora isto não tenha sido acompanhado de uma significativa redução de recidiva e morte no mesmo período.^{35,36, 37, 38}

A excisão completa do mesorreto também contribuiu para o prognóstico: estudos com esta técnica têm demonstrado redução da recidiva, tanto local como à distância, bem como melhora da sobrevida. A técnica consiste na ressecção completa do mesorreto em bloco único com a peça cirúrgica, independentemente da topografia do tumor. MacFarlane et cols., em seu estudo com pacientes de alto risco(Dukes B e C), encontrou índices de recidiva de apenas cinco por cento.^{39, 40,41}

O limite da margem circunferencial menor que 1mm foi associado a um risco de recidiva local de 78 por cento. Ng et cols. mostraram que 60% dos pacientes que recidivaram tinham uma margem circunferencial menor que 1mm.^{34,42,43}

Estadiamento

Estágio tumoral é definido como um método (escala) utilizado para descrever o comprometimento anatômico do câncer. Orienta sobre o tratamento a ser utilizado e o prognóstico. O estadiamento patológico avalia a extensão do tumor através de dados anátomo-patológicos.

A avaliação histopatológica do adenocarcinoma colorretal tem sido inalterada nos últimos 50 anos e está baseada na classificação de Dukes. Em 1930, Curthber Dukes introduziu um estadiamento baseado em dados anátomo-patológicos chamado de classificação de Dukes. Esta classificação sofreu várias modificações com o intuito de melhor avaliar a profundidade de invasão tumoral, metástases linfonodais locorregionais e metástases à distância.^{44, 45, 46}

A Classificação de Dukes proposta para Adenocarcinoma de reto em 1932 é referida como “Sistema de Dukes Original”, embora dois anos antes tenha sido publicada uma variante desta classificação. Está definida em três estágios: no estágio A, o câncer não ultrapassa a muscular própria e não há metástases em linfonodos; no estágio B, o tumor ultrapassa a muscular própria, mas não compromete os linfonodos; no estágio C, há presença de metástases linfonodais, independentemente do comprometimento da parede.⁴⁶

Em 1936, o próprio grupo de Dukes alterou o estágio C, subdividindo-o em C1 e C2, isto é, com ou sem metástases em linfonodos apicais, respectivamente. Nos subseqüentes anos, a Classificação de Dukes foi repetidamente modificada. As mais freqüentes modificações utilizadas são: Kirklin et colbs., Astler-Coller, Gunderson e Sosin. Estas modificações incluem diferentes categorizações de profundidade de invasão, diferentes subclassificações de metástases em linfonodos, diferentes definições de A, B e

C e diferentes subdivisões de B e C, resultando muitas vezes em confusão.^{46,47,48} O nosso estudo utilizou a Classificação de Dukes modificada por Astler-Coller, ou chamada simplesmente de Astler-Coller.⁴⁷

A Classificação de Astler-Coller subdivide os estágios em A, B1, B2, C1 e C2. No estágio A, o câncer atinge somente a mucosa; no estágio B1, atinge a submucosa ou a muscular própria sem atravessá-la e não compromete linfonodos; no estágio B2, atinge além da muscular própria, sem invadir linfonodos; no estágio C1, o câncer atinge até a muscular própria sem ultrapassá-la mas compromete os linfonodos; no estágio C2, o câncer ultrapassa a muscular própria e apresenta linfonodos metastáticos.⁴⁷

Embora a classificação de Dukes seja fortemente relacionada ao prognóstico, incoerências são observadas: um terço dos pacientes Dukes C, tem uma sobrevida longa ou cura e um terço dos pacientes Dukes B, morrem de sua doença. Estes achados podem estar relacionados à natureza subjetiva da avaliação patológica. Conseqüentemente, há uma demanda de parâmetros que esclareçam estes fatos.³²

Em 1950, baseado nos trabalhos pioneiros de Pierre Denoix do Instituto Gustav Roussy, Villejuif, França, o Sistema TNM foi desenvolvido pela União Internacional contra o Câncer (International Union Against Câncer -UICC). O sistema TNM dá importância ao número de linfonodos positivos e atribui um pior prognóstico aos pacientes que tenham mais de três linfonodos metastáticos.⁴⁸

Dukes, Astler-Coller e TNM são as classificações mais utilizadas em estudos médicos. Cada uma tem seus prós e contras, não existindo uma classificação ideal. Todas predizem o prognóstico em maior ou menor extensão, mas nenhuma tem 100% de eficácia.

O estadiamento clínico pré-operatório por exames diagnósticos, como toque retal, retossigmoidoscopia, colonoscopia, tomografia computadorizada, ecografia e outros, é

importante mas não conclusivo, pois o estadiamento patológico completo só é possível após exploração e ressecção cirúrgica adequadas.

Adenocarcinoma de Reto e Recidiva

Recorrência local de adenocarcinoma de reto é definida como a recorrência localizada na pelve, períneo ou cicatriz abdominal. Metástases à distância são definidas como metástases fora da pelve, como fígado, pulmão e ossos.

A recorrência local é um importante problema clínico, atingindo níveis que variam entre 5 a 50% em 5 anos. Embora 50% das recorrências locais ocorram sem disseminação da doença, a sobrevida de 5 anos após a re-operação é menor que 30 por cento.⁴¹ Nos pacientes não reoperados, o prognóstico é de 6 a 11 meses.⁴⁸ Gagliardi demonstrou uma sobrevida de 24 meses nos pacientes reoperados por recidiva em comparação com 8 meses de sobrevida naqueles não operados. Além do estadiamento patológico, algumas variáveis foram relacionadas com a melhora da sobrevida, como a intensidade dos sintomas, diâmetro do tumor na recorrência menor que 5 cm, antígeno carcinoembrionário normal no momento do diagnóstico e ressecção completa do tumor.⁴⁸

A recidiva local é mais comum em pacientes com adenocarcinoma de reto do que em pacientes com adenocarcinoma colônico.²⁰ A cirurgia permanece o tratamento de escolha para adenocarcinoma retal com taxas de sobrevida de 40 a 60% em 5 anos, com leve melhora nos últimos anos.³⁰

Em pacientes com Dukes A e B (TNM – estágio I e II), o nível de recorrência está relacionado à localização do tumor em relação à margem anal, com diminuição da recidiva nos pacientes com lesões mais distantes da margem anal. Pacientes com adenocarcinoma de reto em estágio Dukes A localizados no reto inferior, podem

apresentar um índice de recidiva local de 24,1% contra 0% se localizado no reto sigmoides. No estágio Dukes B, o índice de recidiva é de 41,4% em reto inferior e apenas 14,3% em reto sigmoides. Não há relação significativa entre a recorrência local e a distância do tumor em relação à margem anal nos pacientes estágio Dukes C.

Aproximadamente 70% das recidivas são diagnosticadas num período de 24 meses. A sobrevida acima de cinco anos, depois do diagnóstico de recidiva local sem metástases à distância, é de 13,7 por cento. Quando ocorre recorrência local e metástases à distância, a sobrevida de cinco anos é de apenas 2 por cento.³⁰

Aproximadamente, 25% dos pacientes com câncer colorretal têm metástases à distância no momento do diagnóstico e, destas, 80% são metástases hepáticas.^{50,51}

Após a cirurgia, metástases à distância podem ocorrer em 5 a 40% dos pacientes, sendo os locais mais frequentes o fígado e o pulmão, sucessivamente. Na grande maioria, as metástases localizam-se em mais de um sítio. Metástases exclusivamente hepáticas estão presentes em 5 a 20% dos pacientes submetidos à cirurgia por adenocarcinoma colorretal e, destes, 45 a 55% são potencialmente ressecáveis. A sobrevida varia de 3,7 meses a 24 meses, conforme o comprometimento hepático.^{50,51} As metástases pulmonares raramente se manifestam no momento do diagnóstico do tumor, e durante o seguimento afetam 10 a 20% dos pacientes, sendo apenas 1,3 a 4% candidatos à ressecção.⁵²

Adenocarcinoma de Reto e Prognóstico

Todos os sistemas de estadiamento do câncer retal buscam a identificação de fatores clínicos e patológicos que possam predizer o prognóstico e a melhor resposta terapêutica. No câncer retal, a extensão da penetração da parede, a invasão da gordura

perirretal e o comprometimento linfonodal estão intimamente relacionados ao prognóstico, sendo o comprometimento linfonodal um fator prognóstico independente.

Outros fatores foram implicados ao pior prognóstico do câncer de reto; entre eles, fatores relacionados à cirurgia, como margem cirúrgica comprometida e perfuração do tumor no transoperatório; fatores relacionados à histologia do tumor, como pouca diferenciação celular, invasão linfovascular, invasão perineural e produção de muco e; fatores relacionados ao tumor, como tamanho do tamanho maior que 5 cm de diâmetro e aspecto macroscópico ulcerado.^{22,53,54,55} Assim sendo, há necessidade de se buscar parâmetros prognósticos mais objetivos e qualitativos que possam ser obtidos ainda na fase pré-operatória.^{53,54,55}

Recentemente, ficou demonstrado que a invasão vascular pode predizer metástase à distância e a invasão neural, recidiva loco-regional.⁵⁹

Ratto demonstrou que o envolvimento linfático, presença de metástases à distância, obstrução intestinal e gênero do paciente masculino tinham influência negativa significativa sobre o prognóstico.⁵³

O antígeno carcinoembriônico (ACE) é um antígeno oncofetal que está presente normalmente durante a vida fetal permanecendo em concentrações baixas durante a fase adulta, podendo aumentar sua concentração quando há associação a doenças malignas. Durante algum tempo acreditou-se que ele pudesse auxiliar no diagnóstico de adenocarcinoma colorretal, mas esta hipótese foi descartada pois sua sensibilidade e especificidade para este fim são baixas.⁵⁶ Alguns estudos encontraram associação entre ACE pré-operatório elevado e extensão da doença, mas seu valor prognóstico pré-operatório permanece contestado.⁵⁷ O surgimento de níveis elevados de ACE no seguimento pós-operatório sugerem recidiva.⁵⁷

A angiogênese também está implicada no carcinoma colorretal. O crescimento tumoral depende da angiogênese pois é a vascularização que nutre e oxigena as células permitindo a proliferação celular. Os tumores nutrem-se inicialmente por difusão através da microcirculação dos tecidos peritumorais, até o tamanho de 1 a 2 milímetros de diâmetro. Após, necessitam de uma neovascularização para sua nutrição e oxigenação. O grau de angiogênese tumoral pode estar diretamente relacionado com metástases à distância, pois um aumento do número dos vasos tumorais aumenta a chance de células tumorais entrarem na circulação sistêmica.⁵⁹

A habilidade de prever o prognóstico de um paciente com câncer colorretal tem sido o objetivo de muitos estudiosos. Nos últimos anos, a publicação de estudos de citometria de fluxo para avaliação da ploidia têm aumentado. Em adenocarcinoma de reto, a utilidade do prognóstico desta medida tem sido controversa. Enquanto muitos autores têm encontrado relação independente entre a presença de aneuploidia e recidiva, outros não têm o mesmo resultado e atribuem o mau prognóstico a outros fatores como linfonodos positivos, grau de penetração na parede e diferenciação histológica, entre outros.^{58 59}

Com o intuito de melhorar a sobrevivência dos pacientes, a radioterapia e quimioterapia passaram a fazer parte cada vez mais freqüente do tratamento do câncer retal.

Radioterapia e Quimioterapia.

A radiação ionizante lesa o DNA; age na mitose, impedindo a reprodução celular. Inúmeros ensaios clínicos de radioterapia (RXT) coadjuvante foram completados. Inicialmente, apenas verificou-se reduções no risco de recidiva pélvica, sem influência

acentuada nas taxas de recidiva, risco de metástases à distância e sobrevida.²² Atualmente, há fortes evidências de que tanto a radioterapia pré-operatória como a radioterapia pós-operatória reduzem a recorrência local, a mortalidade e aumentam a sobrevida em pacientes com tumores de reto.⁶⁰

A radioterapia pós-operatória tem como objetivo evitar qualquer crescimento adicional das células cancerosas que não foram removidas na ocasião da cirurgia. A radioterapia pré-operatória tem a grande vantagem de reduzir o tamanho do tumor antes da cirurgia, melhorando o estadiamento patológico. Assim, nos tumores de reto inferior, um plano cirúrgico inicial de amputação de reto pode ser convertido em um procedimento cirúrgico com preservação esfinteriana.^{22,61,62,63} Complicações pós-radioterápicas ocorrem nos dois esquemas, com intensidades diferentes. O uso de radioterapia pós-operatória pode levar a complicações sérias causadas pela irradiação de órgãos adjacentes como o intestino delgado (ileíte actínica, estenose), aumentando a morbidade.^{60, 63,64,65}

No ensaio clínico Medical Research Council's MRC CRO3, pacientes com câncer de reto foram randomizados em dois grupos: um recebeu apenas cirurgia e o outro, cirurgia e radioterapia pós-operatória. Houve redução significativa na recidiva nos pacientes do segundo grupo.⁶⁶

Estudos estão sendo realizados a fim de se estabelecer o melhor esquema radioterápico, visando um tratamento efetivo com baixas doses de irradiação e menor morbidade. A radioterapia pré-operatória surgiu com este objetivo. Vários estudos foram realizados e demonstraram melhora estatisticamente significativa na sobrevida total nos pacientes que receberam radioterapia pré-operatória. Em seu estudo, Keith demonstrou que baixas doses de irradiação pré-operatória, 25Gy em 5 sessões, produzem um alto controle pélvico com uma toxicidade aceitável.⁶⁷

O ensaio clínico sueco demonstrou um índice de recidiva pélvica de 27% em pacientes com adenocarcinoma de reto no grupo submetido a apenas cirurgia, contra um índice de 11% no grupo submetido à cirurgia e à radioterapia pré-operatória.⁶⁸ A grande desvantagem deste esquema é que alguns pacientes selecionados receberão radioterapia desnecessariamente.

Também há evidências de que a associação de RXT e quimioterapia (QMX) pode produzir melhores resultados do que a radioterapia isolada.⁶⁹

Em seu estudo, Habr-Gama encontrou resultados surpreendentes com a aplicação de radioquimioterapia pré-operatória em pacientes com adenocarcinoma de reto inferior: 30,5 % dos pacientes tiveram resposta completa, e a grande maioria destes não necessitou de cirurgia.⁶⁹

CARCINOGENESE COLORRETAL

O câncer é uma doença genética causada por alterações em determinados genes. No câncer de reto há o envolvimento de oncogenes e genes supressores de tumores que agem de forma irregular nos diversos pontos de controle do ciclo celular, permitindo o surgimento e desenvolvimento do tumor.

Ciclo Celular

A maior parte de nossas células encontra-se constantemente submetida a um regime de equilíbrio tissular caracterizado por nascimento, diferenciação, ação e morte celular programada (apoptose).⁷⁰ A criação de uma nova célula é o resultado da divisão celular ao final de um ciclo, isto é, o período compreendido desde a ativação de uma célula até a geração de duas células filhas.^{71,72}

O epitélio colorretal é formado por camadas de células organizadas em forma de criptas, que sofrem constantemente diferenciação celular. As células primitivas estão localizadas na base (zona proliferativa), e na medida que vão amadurecendo se deslocam para a superfície, onde vão assumir as funções de epitélio intestinal, como produção de muco, absorção e secreção. Durante esse período, estas células podem sofrer alterações genéticas induzidas pelo meio agressivo inerente à luz intestinal. Para evitar esse processo, a célula intestinal sobrevive poucos dias e acaba sendo submetida ao processo de morte celular programada ou apoptose.⁷⁰

O ciclo celular é desencadeado por estímulos, conforme demonstrado na **Figura 1**. Sinais extracelulares são transmitidos à célula pelos fatores de crescimento (FC), como FC Derivado de Plaquetas, FC Vascular Endotelial, FC Epidérmico, FC Tipo Insulina,

Interleucina II e Eritropoietina. Conforme a necessidade os FC, que são proteínas, estabelecem ligações químicas com estruturas contidas ao nível da membrana celular, chamados de receptores de fatores de crescimento. Estes receptores, também proteínas, possuem uma parte intracelular e outra extracelular. Quando ocorre a ligação química entre um fator de crescimento e seu receptor, este sofrerá modificações estruturais que irão ativar reações bioquímicas no interior da célula, as quais tem por objetivo final transmitir ao núcleo as informações oriundas do meio extracelular. A parte intracelular do receptor de FC acima citada, desencadeia uma série de reações em cascata com outras proteínas intracelulares, que vão ativar posteriormente os fatores responsáveis pela atividade intranuclear. Esta reação em cadeia da membrana celular até o núcleo é denominada transdução de sinal.^{73,74}

A principal via de transdução de sinal da membrana ao núcleo é constituída por proteínas pertencentes à família **ras**; formadas a partir de três genes identificados como **H-ras**, **N-ras** e **K-ras**. Elas possuem ação estimuladora sobre a atividade mitogênica da célula, ou seja, indução à divisão celular. Na vigência de mutação destes genes, a proteína ras estimula a proliferação celular continuamente independente do estímulo extracelular, levando a uma atividade mitótica exacerbada. Mutações deste gene têm sido identificadas em cerca de 60% dos tumores colorretais malignos.^{73,74}

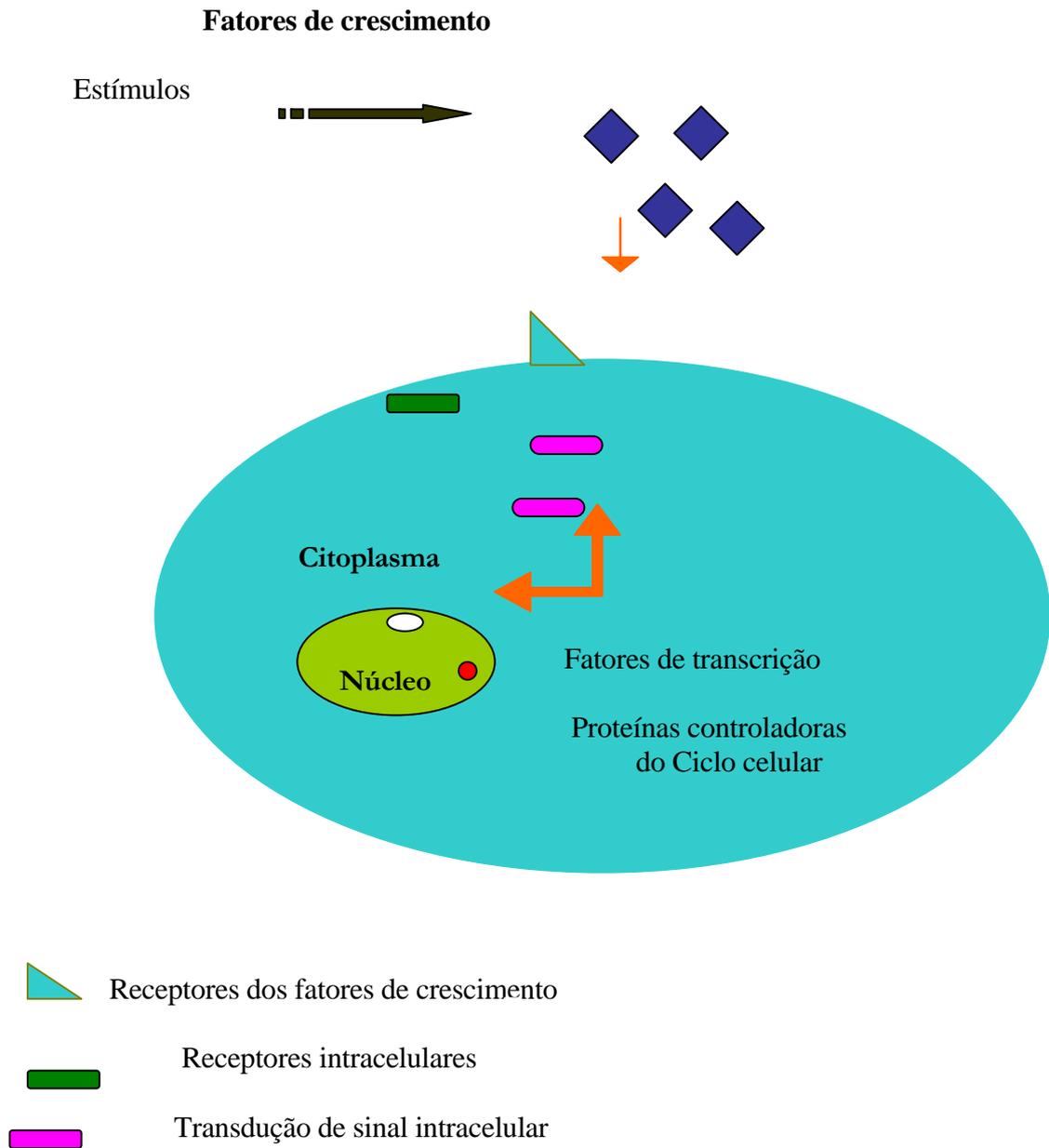


Figura 1: Fatores de Transdução e Transcrição

Os fatores transdutores de sinal apresentados acima transmitem o estímulo mitogênico (proliferativo) desde os receptores de membrana até o núcleo celular, onde fatores de transcrição são ativados. Os fatores de transcrição são proteínas reguladoras que tem como função ativar a expressão dos genes que codificam proteínas que vão atuar no ciclo celular. Neste ponto há expressão do gene **c-myc**, que produz uma proteína que é um fator de transcrição que, em condições normais, estimula a célula a passar do seu

estado de repouso a uma fase de síntese onde ocorre a síntese de proteínas relacionadas com a divisão celular. Outros fatores de progressão como c-Fos, c-Jun estão envolvidos na oncogênese. Níveis elevados de c-myc estão associados à ocorrência de tumores de reto, mama, cólon, pulmão e ovário, entre outros.^{73,74} A proteína c-myc é reconhecida como importante fator na carcinogênese humana, sendo responsável pelos primeiros controles do ciclo celular.⁷⁴

O ciclo celular está dividido em duas fases: a mitose e a interfase, conforme a **Figura 2**. Na mitose, os cromossomos duplicados são separados e a célula é dividida em duas, num processo chamado de citocinese. Na interfase, ocorre a replicação do DNA antes de entrar na mitose. A mitose tem cinco fases (profase, prometáfase, metafase, telófase e anáfase) e a interfase, três (G1, S e G2). Há uma quarta fase, G0. A fase G0 é a fase em que a célula está em repouso. Nesta fase, a célula não se divide e nem se prepara para dividir-se. Pode reentrar no ciclo celular a qualquer momento. Para que a fase G0 se mantenha em repouso é necessária a ação de uma proteína inibitória da fase G0, chamada p27. Fatores exógenos que inibem a atividade dos fatores mitóticos também promovem a fase G0.^{75,76,77} Fatores de crescimento atuam na passagem para a fase G1. A passagem de uma fase para outra é determinada, entre outros fatores, pela interação entre os sinais controladores de crescimento e desenvolvimento celular (fatores de Crescimento) e um complexo protéico formado por três diferentes famílias de proteínas: uma ciclina, uma quinase e um fator inibidor. O primeiro membro do complexo é uma ciclina e o segundo, uma quinase, também chamada de CDK (cyclin-dependent kinase – quinase ciclino-dependente). Formam um complexo ativo, a

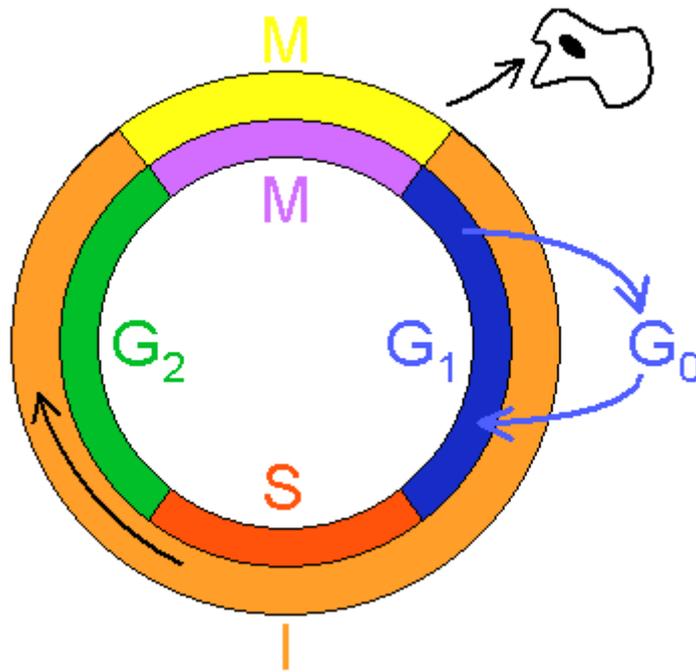


Figura 2: Fases do Ciclo Celular

CDK-ciclina. A CDK não tem capacidade de fosforilar seus substratos sem interação física com uma ciclina específica. O terceiro membro é um complexo formado por uma quinase ciclino-dependente inibitório (CKI - cyclin-dependent kinase inhibitor). A CKI atua como um inibidor competitivo do complexo CDK-ciclina e bloqueia diretamente a atividade da quinase. A atividade da quinase está diretamente relacionada à concentração da CDK/CKI.⁷⁰

Células eucarióticas iniciam seu ciclo com um conteúdo C de DNA permanecendo assim durante a fase G1. O tempo de duração desta fase é de aproximadamente 12 horas. Quando a célula inicia a fase G1, os outros estágios do ciclo celular seguem sucessivamente.

No início da fase G1, sinais mitóticos induzem a expressão de ciclinas da família D (D1, D2 e D3). A ciclina D1 é a ciclina mais prevalente do epitélio colônico. Ela se liga a CDK4 e CDK6. O complexo de ciclina D1/CDK4,6 fosforilisa a proteína retinoblastoma (RB1). Esta proteína em seu estado hipofosforilado liga-se a um fator de transcrição nuclear – o E2F. Quando RB1 está hiperfosforilado pela D1/CDK4,6, o fator E2F é liberado e migra para o núcleo onde estimula a liberação de outras proteínas e enzimas como dihidrofolato redutase, ciclinas A e E, timidina quinase, timidilato sintetase, DNA polimerase- α , CDK1, e ele mesmo. A liberação do E2F é um fator crucial para a iniciação da fase S porque muitas destas proteínas liberadas agem na replicação do DNA.^{70, 72}

Uma das principais maneiras de inibir o RB1 é através da família CKI ^{INK4} conhecida como p16^{ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c} e p19^{Ink4d}. P16^{Ink4a} é a proteína mais prevalente da família das proteínas CKI e tem função específica de ligar-se a CDK4/ciclinaD, impedindo assim a fosforilação do RB1. Quando P16^{Ink4a} liga-se ao complexo CDK4/ciclina D a fosforilação de RB1 é reduzida, E2F permanece no citoplasma e as enzimas envolvidas na replicação não são produzidas. Outros aspectos podem alterar RB1 como por exemplo, a mutação do p16 impedindo sua ação inibitória, mutação do CDK4 não sendo capaz de interagir com o p16^{Ink4}, mutação do RB1 não sendo capaz de ligar-se ao E2F e, alteração do E2F, fazendo com que ele fique constantemente aumentado ou ainda, aumento da expressão da ciclina D que leva a uma inibição do p16. Todos estes mecanismos ocorrem em diferentes tipos de tumores em

humanos. Em adenocarcinoma colorretal, a mutação do p16, RB1 e CDK parece não ocorrer, mas o excesso da expressão da ciclina D1 é freqüente.^{75,77}

Existem outras formas para impedir que o RB1 seja fosforilado. A produção de ciclinas A e E são estimuladas pelo E2F quando ele é liberado do RB1. Estas ciclinas formam um complexo com a CDK2 e afetam a quantidade de E2F livre. O complexo ciclinaE/CDK2 inicia a fase S através da fosforilação de outros substratos que iniciam a replicação do DNA.^{75,77}

Neste estágio, se ocorrer um dano no DNA (através de irradiação ou quimioterapia, por exemplo, conforme a **Figura 3**, o p53 ativa a CKI p21 que inibe a atividade da ciclina E/CDK2. Este efeito do p21 leva a uma diminuição da habilidade da ciclina E/CDK2 em fosforilar RB1. Assim, com RB1 hipofosforilado, há menos liberação de E2F que se mantém ligado ao RB1 e ocorre uma interrupção na progressão da fase G1. A ativação do p21 também inibe a ciclina A/CDK2 e evita o início da fase S através da inibição direta dos efeitos da ciclina A/CDK2 na replicação do DNA. A CKI p27, que pode manter esse processo em repouso, é ativada pelo Fator de Crescimento Tumoral e inibe CDK2 nos complexos com ciclina A e E. A ciclina E/CDK2 também antagoniza o efeito do p27 pela fosforilação desta CKI que é degradada. Assim, observamos que na fase G1 ocorre correção de erros que podem ser originados por mutações endógenas ou exógenas causadas por irradiação e quimioterapia. Tendo a célula fosforilado RB1 e liberado E2F suficiente, continua seu ciclo celular.⁷⁵

Na fase S, ocorre iniciação das origens de replicação em diferentes tempos, originando a duplicação do material genético (conteúdo C). No final dessa fase, a célula contém o dobro do DNA, permanecendo nessa condição durante a fase seguinte (G2). Importantes enzimas estão envolvidas neste processo e, entre elas, podem estar timidilato sintetase, DNA polimerase I- α e topoisomerase tipo II. Outras moléculas

também estão envolvidas, como PCNA (Proliferating cell nuclear antigen - antígeno nuclear de proliferação celular) e substâncias similares que são cofatores DNA polimerase. O percentual de células na fase S tem demonstrado ser um indicador de crescimento tumoral e pior prognóstico, por exemplo, nos tumores de mama e reto. Então, PCNA e muitas outras moléculas induzidas pelo E2F podem ser candidatos a marcadores moleculares de proliferação celular.^{75,76,77}

O Complexo ciclina-A/CDK2 é importante na fosforilização do RB1, inibindo a união do E2F ao DNA e diminuindo a transcrição de algumas moléculas envolvidas na replicação do DNA. Ciclina-A/CDK2 estimula a formação da ciclina B/CDK1 que regula a progressão para a fase G2.^{75,76}

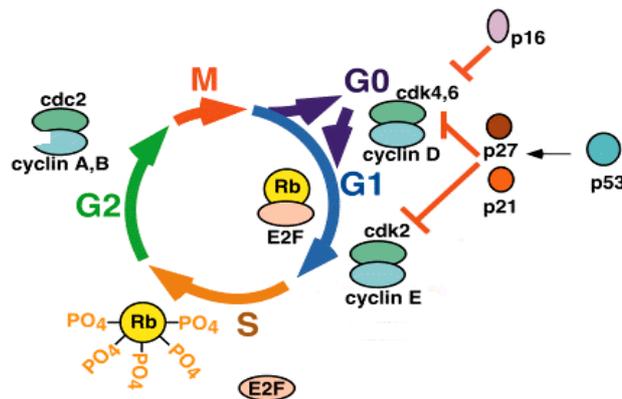


Figura 3: Ciclo celular e seus pontos de controle

Em G2, o núcleo está se preparando para divisão e não ocorre mais replicação do DNA. Nesta fase há o término da replicação do DNA. Há a investigação de erros que possam ter ocorrido na cópia do DNA e iniciação do processo de condensação dos cromossomos para prontificar a célula à mitose. A ciclina da fase G2 é a ciclina B e a

CDK é a CDK1. Estas proteínas são acumuladas durante a fase S e início da fase G2; migram para o núcleo, onde a quinase é ativada para estimular a condensação de cromossomos.^{75,76}

Finalmente na mitose ou fase M, ocorre a divisão do conteúdo do DNA, originando duas células. A progressão destas fases é dada através da fosforilação e desfosforilação das proteínas tirosina ou serina/treonina por enzimas chamadas de proteinoquinase e fosfatase respectivamente. Estas enzimas e proteínas associadas têm como função corrigir erros, danos e mutações do DNA, bem como replicá-lo e corrigir os erros que ocorrerem em sua replicação.⁷⁵

O complexo CDK1/ciclina inicia rapidamente os eventos da mitose. E também causa sua própria inibição pela fosforilação da ciclina B, na qual causa sua degradação pela proteólise. Quando a ciclina é degradada, CDK1 é liberada do complexo na sua forma livre e inativa, e é reciclada para atuar num novo ciclo G2.^{75,76,77}

Se algum defeito intrínseco ocorrer nestes complexos protéicos pode haver proliferação descontrolada ou desenvolvimento de células tumorais. O c-myc, o bcl-2, o Rb, o p53 e o p21, atuam no controle do ciclo celular como pontos de checagem nas suas diversas fases, interferindo desta forma na progressão celular .

Quando ocorre inadequação celular, principalmente em situação de estresse, há um aumento considerável da expressão da proteína p53 que estimula o processo de apoptose.^{74,75} Este controle depende, porém, de uma regulação exercida pelo bcl-2, que atua como inibidor de apoptose. Caso o controle pelo bcl-2 considere a célula apta a progredir, esta, prossegue o ciclo preparando-se para os processos de transcrição e tradução gênicos necessários. No ponto de checagem G1-S, em face de alguma anormalidade do DNA, o gene **Rb**, pela sua proteína Rb1 bloqueia o mecanismo de transcrição do DNA, impedindo a progressão da célula à fase S. Em uma etapa mais avançada, o gene **p53**

exerce novo controle no ponto G1-S, antes da síntese e duplicação do DNA iniciarem e, caso alguma alteração ou dano do DNA seja evidenciado e não houver reparo, ocorre um aumento na expressão do p53 intracelular e é desencadeada a apoptose. Outros fatores estão envolvidos no controle do ciclo celular e apoptose, como o **gene apo-1**, fatores de diferenciação e crescimento, como TGF- α e TGF- β , as citocinas TNF, INF e IL-2, as ciclinas (A, B, D e E), os complexos quinase ciclino-dependentes (CDK 1, 3, 5 e 6), p34 cdc2, p16ink4a, as endonucleases, o cálcio, entre outros. ^{71,72}

Instabilidade Genética e Câncer.

O câncer colorretal é o resultado de mutações dos genes que codificam estas proteínas acima citadas, envolvidas no ciclo celular. Como estas mutações ocorrem de forma seqüencial à medida que a neoplasia colorretal progride, a análise das proteínas envolvidas na carcinogênese colorretal poderá nos fornecer informações a respeito do estágio molecular do tumor, com possíveis conseqüências para o prognóstico do paciente.⁷⁷

A transformação maligna é um processo que se desenvolve em múltiplas etapas e que, na maioria das vezes, resulta do acúmulo de várias alterações genéticas envolvendo diferentes genes que bloqueiam os mecanismos de controle do crescimento celular, causando o desenvolvimento neoplásico e surgimento de metástases. O crescimento tumoral é determinado por três fatores principais: o ciclo celular, a porcentagem de células proliferativas e a quantidade de perda celular.⁷⁷. Tanto o aumento da proliferação quanto a diminuição da morte celular resulta em expansão do número de células e crescimento tumoral. Algumas células neoplásicas se dividem mais lentamente do que as

células normais, mas o câncer pode continuar se expandindo em função do prolongamento da vida das suas células.

Agentes carcinogênicos danificam o DNA ou interferem com enzimas necessárias à sua replicação. A célula pode responder a estas agressões adiando a divisão celular até o reparo do dano, promovendo a morte celular ou progredindo no ciclo sem interrupção.⁷⁵ Para cada tipo de dano do DNA, a célula tem uma enzima de reparo específica. As células neoplásicas costumam apresentar danos adquiridos nos genes reguladores do ciclo celular e, se as mutações não forem reconhecidas pelos pontos de checagem, as células com DNA danificado permanecem no conjunto de células do ciclo e, se não forem eliminadas, podem replicar com conseqüências deletérias.⁷⁸

Os tumores são monoclonais, isto é, originam-se de uma única célula. Várias mutações ocorrem e são transmitidas às células filhas. As mutações gênicas ocorrem ocasionando a ativação de oncogenes e a perda ou inativação dos genes supressores. Os oncogenes formam-se a partir da ativação dos proto-oncogenes, que são a forma normal. Quando um oncogene é anormalmente ativado, ele impulsiona a célula pelo ciclo celular, facilitando a proliferação do clone. Estes genes atuam como aceleradores. Muitos destes genes podem ser classificados como fatores de transcrição ou moléculas envolvidas nos sinais de transdução. São dominantes, ou seja, a alteração de apenas um alelo cromossômico é suficiente para produzir o efeito celular. Os oncogenes mais importantes do adenocarcinoma de reto são: **K-ras**, **myc** e **src**. Ao contrário, os genes supressores, na sua forma selvagem (normal) inibem a proliferação celular e a formação do tumor. Para que eles se tornem inativos, deve haver alteração em ambos alelos cromossômicos. Os principais genes supressores são **APC** (Adenomatous Polyposis Coli), **p53**, **DCC** (Deleted in Colorectal Carcinoma) e **MCC** (Mutated in Colorectal Carcinoma). Quando perdem sua função, desencadeiam o crescimento desenfreado do tumor. Os genes

supressores tumorais atuam de maneira recessiva e promovem o câncer somente quando são inativos em ambos alelos.^{74,80}

Seqüência Adenoma-Carcinoma

O entendimento clínico da carcinogênese colorretal baseia-se na seqüência adenoma-carcinoma. Quase todos os adenocarcinomas colorretais, sejam eles familiares ou esporádicos, surgem a partir dos adenomas. Os pequenos cânceres colorretais sem tecido adenomatoso benigno associado são extremamente raros nos países ocidentais. Os adenomas, tanto esporádicos quanto familiares, exibem o mesmo conjunto de lesões genéticas moleculares.

Há evidências clínicas de que o adenocarcinoma de reto origina-se de um pólipo adenomatoso pelo processo chamado de seqüência adenoma-carcinoma. Estudos clínicos, histológicos e epidemiológicos fortalecem esta teoria. Cânceres invasivos foram descobertos nos locais de pólipos não tratados em pacientes rebeldes⁷⁹. Os adenomas com freqüência são encontrados adjacentes aos cânceres colorretais, bem como em associação a adenocarcinomas, apesar de os cânceres mais invasivos conterem menos resíduos de tecido adenomatoso benigno. As taxas de câncer colorretal são altas nos países com alta prevalência de adenomas, porém baixas em países a prevalência de adenomas é baixa. O diagnóstico de pólipos adenomatosos ocorre em faixa etária 10 anos inferior àquela do carcinoma colorretal. A progressão para carcinoma leva no mínimo 4 anos. A doença que comporta o mais alto risco para o surgimento do câncer colorretal - Polipose Adenomatosa Familiar (PAF)- manifesta-se por pólipos adenomatosos que precedem (idade média de 27 anos por ocasião do início) o surgimento dos carcinomas (idade média

de 39 anos por ocasião do início). Na PAF, os cânceres têm origem habitualmente em adenomas.^{10,11 81,82,83}

A melhor evidência em apoio à hipótese adenoma-carcinoma poderia ser conseguida pelo acompanhamento dos adenomas através do tempo até se tornarem malignos. Esse estudo não é exequível por muitas razões, incluindo as de natureza ética. Também há evidência de que a polipectomia endoscópica reduz o risco de câncer metacrônico.⁸¹ Os adenomas e carcinomas compartilham alguns traços genéticos. O oncogene **k-ras** é descrito em 9% dos adenomas pequenos, em 58% dos adenomas maiores que 1cm, e em 46% dos adenocarcinomas colorretais. A perda alélica do cromossomo 5, é descrita em 29% dos adenomas e em 36% dos adenocarcinomas, e a perda alélica do cromossomo 18 é descrita em 47% dos adenomas e em 73% dos adenocarcinomas. O gene **APC** e **MCC** estão localizados no cromossomo 5 e o gene **DCC**, no cromossomo 18. Pelo fato de os pólipos terem sido associados tão poderosamente ao câncer, Vogelstein e outros tentaram comparar as alterações genéticas nos pólipos adenomatosos com aquelas do câncer colorretal.^{78,81,82}

Nas síndromes neoplásicas colorretais familiares, os indivíduos acometidos herdam um gene defeituoso de um dos progenitores, e essa cópia defeituosa (alelo) fica na linhagem germinativa. Assim, os pacientes com PAF herdam uma cópia modificada (mudada) do gene **APC**, um gene supressor tumoral, porém a outra cópia é normal em suas células epiteliais colônicas por ocasião do nascimento. A formação de adenomas ocorre subsequentemente, após o dano da cópia normal do gene **APC** no tecido colorretal no local do adenoma. Esta segunda lesão genética, confinada ao tecido colorretal neoplásico, recebe a designação de mutação somática.^{14,81,82,83}

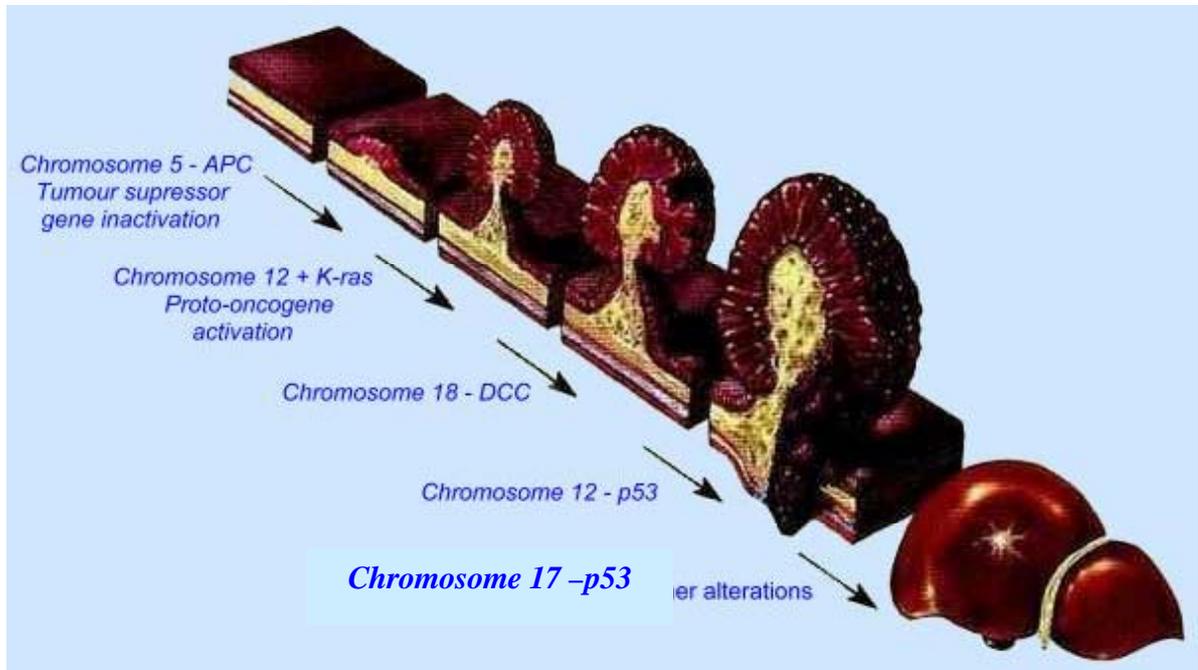
As mutações do gene **APC** encontradas nos adenomas colorretais esporádicos são exclusivamente somáticas. Portanto, a transformação neoplásica (formação de adenomas) ocorre somente depois que ambos os alelos **APC** se tornaram defeituosos.^{83.}

Evolução Genética Molecular da Seqüência Adenoma-Adenocarcinoma.

O adenocarcinoma colorretal não evolui através da alteração gênica de um único gen, mas sim pela alteração sincrônica de alguns genes específicos.

Os princípios básicos para o entendimento do adenocarcinoma colorretal foram descritos por Vogelstein em 1988. Ele estudou mutação do gen ras, deleções do cromossomo 5, 17 e 18 em adenomas e adenocarcinomas. (Os genes **APC** e **MCC** estão localizado no cromossomo 5, p53 está localizado no cromossomo 17 e DCC, no cromossomo 18). A principal observação foi que à medida que o tumor avançava a alteração gênica aumentava. Adenomas esporádicos com ou sem associação a adenocarcinoma tiveram um número intermediário de alterações. Neste estudo, a mutação do gene ras foi incomum em adenomas precoces na PAF.

Deleção do cromossomo 18 ocorreu em 10% dos adenomas precoces, em 50% dos adenomas associados com câncer e em 75% dos adenocarcinomas. A deleção do cromossomo 17 foi rara em adenomas precoces, mas ocorreu em 25% dos adenomas avançados e em 75% dos adenocarcinomas. Estes estudos sugerem uma seqüência de alterações genéticas durante a progressão do adenoma para adenocarcinoma, com deleção do cromossomo 5 e mutação do gen ras inicialmente, e deleção do cromossomo 17 durante os últimos estágios do desenvolvimento do adenocarcinoma.^{81,83,84}



Fonte: Gordon e Nivatvong. Principles and Practice of Surgery for the Colon, Rectum and Anus. QMP 2-ed, 1999

Figura 4: Sequência Adenoma-Carcinoma.

O gene **APC** parece ser o guardião para a formação dos adenomas. As observações de que a frequência das mutações desse gene continua constante, apesar do estágio da neoplasia, e de que as mutações **APC** são encontradas em alguns adenomas minúsculos, proporcionam poderosa evidência de que a inativação do gene **APC** desempenha um papel essencial na iniciação da neoplasia colorretal.⁸⁸

P53

O gene **p53** contém 16 a 20 kb de DNA . Está localizado no braço curto do cromossomo 17, na banda 13(17p13); codifica uma fosfoproteína nuclear com peso molecular de 53kd e contém 393 aminoácidos. Foi identificado pela primeira vez em 1979. Este gene é composto por 11 exons. O primeiro exon não é codificante e localiza-se a uma distância de 8 a 10 kb do segundo exon. O gene **p53** tem sido conservado durante a evolução. A proteína p53 tem cinco regiões altamente conservadas dentre os aminoácidos 13-19, 117-142, 171-181, 234-258 e 270-286. Existem códons onde ocorre um maior nível de mutações, chamados de “pontos quentes” (hot spots). Nas regiões conservadas, há no mínimo quatro “pontos quentes”, localizados nos aminoácidos 175, 248, 273 e 282, os quais são responsáveis por 30% das mutações ocorridas no **p53**. A meia-vida da proteína p53 é curta, 20 minutos e por isso é encontrada em baixas quantidades em células normais mas em grande quantidade em células alteradas em cultura ou em tumores humanos. ^{11,14,18,82}

O **p53** faz a checagem da passagem da fase G1 para a fase S no ciclo celular. Quando há um dano no DNA, a proteína p53 identifica este defeito e promove a expressão de outro gene, o **WAF1/Cip1**, que produz uma proteína chamada p21. Esta proteína liga-se a uma quinase ciclino-dependente específica (CDK- cyclin-dependent-kinases) e inibe a atividade do ciclo celular. Desta maneira, o ciclo celular se torna suspenso antes da síntese do DNA e à célula é dada a oportunidade de corrigir o dano no DNA. Se isto não for possível, a presença do **p53** normal pode alternativamente induzir a morte celular (apoptose).^{14,18} Entretanto, estes processos não ocorrem em células tumorais se a proteína p53 estiver ausente ou inativa por uma mutação do **gene p53** ou alteração da própria proteína. ^{16,18,85}

Waga e cols. têm demonstrado que WAF1/Cip1 pode também inibir diretamente o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA – proliferating-cell nuclear antigen) na ausência de uma ciclina/CDK, bem como bloquear a capacidade do PCNA em ativar a enzima DNA polimerase, uma das principais enzimas da replicação do DNA. Este mecanismo resulta de uma interação direta entre o p21 e o PCNA. Assim, se o dano é realizado antes da fase S, o WAF1/Cip1 evita a duplicação do DNA pela inibição do complexo ciclina/CDK. Entretanto, se o dano do DNA ocorrer durante a fase S, o WAF1/Cip 1 impede a duplicação do DNA pela inativação do PCNA.^{14,16,18,83}

A mutação do **p53** é a mais comum alteração genética identificada no câncer em humanos. Pode ser encontrada na metade de todos os tumores e até em 70% nos adenocarcinomas colorretais.¹⁶ Tem sido relatado que a mutação do **p53** está relacionada com pior prognóstico em adenocarcinoma colorretal, embora alguns estudos comprovem o contrário.^{16,17,84}

A expressão imuno-histoquímica da proteína não está diretamente relacionada com a mutação do gene **p53**.¹⁸ A proteína p53 pode se tornar inativa por uma mutação do gene ou por uma alteração direta na proteína.^{16,18,85}

A proteína p53 perde sua função devido a vários mecanismos:¹⁸

- Alterações genéticas do gene **p53** tais como: mutações somáticas, mutações germinativas, deleções, alterações no rearranjo estrutural do cromossomo e inserções genômicas.¹⁸

- Formação da proteína com oncoproteínas virais (antígeno SV40 T, adenovírus E1B, papilomavirus E6, Antígeno da Hepatite B, antígeno nuclear Epstein-Barr 5, vírus Epstein Barr. A união da proteína p53 com o papilomavirus E6 resulta em sua rápida degradação.¹⁸

- União a produtos de outros genes celulares. (MDM2). A proteína MDM2 ao se ligar à proteína p53, a inativa.

Mutação é alteração genética mais encontrada. Aproximadamente metade dos tumores em adultos de cólon, estômago, pulmão, esôfago, mama, fígado, cérebro, tecido hematopoiético contém mutação do gene **p53**. Mais de 90% das mutações estão localizadas entre os exons 5 e 8, e a maioria localizada nas 5 regiões conservadas.^{15,18}

A proteína p53 tem como uma das funções, ser um fator de transcrição, portanto para agir ela deve ser transferida ao núcleo celular.

Em alguns tumores pode ocorrer a perda de um ou ambos alelos e ocasionar apenas uma diminuição da concentração da proteína selvagem, em outros, pode ocorrer uma mutação grosseira e formar uma proteína truncada (não ativa). Mais frequentemente ocorre a perda de um alelo e a mutação de outro.

Estudos têm demonstrado que carcinógenos ambientais alteram o gene **p53**, sendo os mais comuns:

- raios ultravioletas: ocasiona uma mutação de transição no sítio de uma dipirimidina, ou seja a seqüência CC é copiada como TT ao invés de GG, ocasionando câncer de pele.

- Ingesta de aflatoxina B1: ocasiona uma transversão; a G:T é copiada como T:A, levando a uma substituição da serina no codon 249 do gene **p53** em carcinoma hepatocelular.

- Exposição ao tabaco: ocasiona um transversão da seqüência G:C para T:A em carcinomas do pulmão, esôfago e cabeça e pescoço.

- Fatores endógenos também podem provocar alterações mutagênicas no **p53**. Por exemplo, a alta freqüência da transição da base C para T no dinucleotídeo CpG em

adenocarcinoma de cólon é devido a uma mutação endógena provocada pela enzima citosina-5-metil transferase.

ARTIGO COMPLETO

Expressão do p53 e Relação Clínico-Patológica no Adenocarcinoma de Reto

Márcia Teresinha Jurach

Luis Fernando Moreira

ABSTRACT: p53 is a tumor suppressor gene that has been implicated in the pathogenesis of a wide range of tumor types including colorectal cancer. Immunostaining for p53 was performed in a series of 83 patients with rectal cancer with a minimum follow-up of 5 years. The aim of the study was to evaluate the prognostic significance of p53 protein expression and their correlation with clinicopathologic variables e survival. P53 expression was correlated with pathologic disease stage, histology grade and recidivate. P53 expression power to considered prognostic factor independent.

INTRODUÇÃO:

O câncer colorretal é um tumor freqüente no mundo ocidental que vem aumentando sua incidência nas últimas décadas.¹ Permanece uma grande fonte de morbimortalidade, apesar de inúmeros avanços no diagnóstico precoce, nos procedimentos de rastreamento para indivíduos de alto risco, nas técnicas cirúrgicas e tratamento adjuvante.^{2,3,4,5}

O comportamento biológico e clínico deste tumor não está totalmente esclarecido. Embora seu prognóstico esteja relacionado com aspectos histopatológicos como

penetração da parede do reto, invasão da gordura perirretal e comprometimento linfonodal, pacientes com tumores em estágios iniciais e operados com intenção curativa, podem apresentar evolução desfavorável, sendo o contrário verdadeiro.^{1,4,5}

Novos fatores prognósticos estão sendo estudados a fim de esclarecer esta evolução desfavorável, como as alterações genéticas e os mecanismos de controle do ciclo celular. O desenvolvimento do câncer colorretal ocorre em várias etapas, explicadas pela seqüência adenoma-carcinoma. O estabelecimento de uma correlação entre dano genético e prognóstico tem sido objeto de extensas investigações nos últimos anos, assim como os mecanismos de controle do ciclo celular. Índices de proliferação anormal, modificações relacionadas à morte celular e a expressão de determinados genes tem sido constatada em várias neoplasias humanas, incluindo-se o carcinoma colorretal.^{5,6,7,8}

O **p53** é um gene supressor, localizado no braço curto do cromossomo 17; produz uma proteína chamada p53^{10,11}. Sua principal função é controlar pontos de checagem do ciclo celular, promover o reparo do DNA por do estímulo de outras proteínas (p21) e estimular a apoptose. Mutações deste gene produzem uma proteína p53 inativa que acumula nas células tumorais. A expressão desta proteína alterada é detectada em 30 a 70% dos tumores de reto e pode estar relacionada a mau prognóstico. O **p53** é um dos genes mais comumente mutados no câncer.^{12,13,14}

Este estudo descreve a relação entre p53 e fatores clínico-patológicos, prognóstico e sobrevida, utilizando imuno-histoquímica.

PACIENTES E MÉTODOS:

Avaliamos 83 pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de reto, localizados até 12 cm da margem anal, submetidos a cirurgia no Serviço de Colo-Proctologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de 1985 a 1997 . O estudo seguiu um delineamento de Coorte, com eixo de temporalidade histórico e unidade de estudo individual. A proteína p53 foi o fator de estudo e a situação de vida até 5 anos de pós-operatório ou óbito, o desfecho.

Foram excluídos do estudo pacientes com cirurgia sem intenção curativa, (ressecção “higiênica do tumor” ou desvio do trânsito intestinal), com neoplasias concomitantes ou história de tumores malignos prévios, portadores de doença inflamatória intestinal ou polipose de qualquer tipo, com metástases à distância no momento da cirurgia, com ausência de seguimento pós-operatório e pacientes cujos dados não foram adequadamente revisados, perfazendo um total de 77 pacientes excluídos.

As variáveis estudadas foram idade, sexo, localização do tumor, sintomas, tipo de cirurgia, estadiamento, tempo de sobrevida, sobrevida livre de doença, aspecto e tamanho do tumor, margem distal livre de neoplasia, radioterapia, quimioterapia, recidiva loco-regional e metástases à distância.

Os dados clínico-patológicos foram coletados do prontuário do paciente onde foram analisadas as evoluções clínicas com seus respectivos exames diagnósticos e o laudo anátomo-patológico da cirurgia.

Análise anátomo-patológica e preparação tecidual: a análise da peça cirúrgica incluiu a determinação da profundidade de penetração do tumor na parede do reto, do comprometimento linfonodal, do comprometimento das margens (proximal, distal e

circunferencial) e do grau de diferenciação histológica. O estágio do tumor foi definido de acordo a Classificação de Astler-Coller.

A avaliação imuno-histoquímica do p53 foi realizada a partir da peça cirúrgica dos 83 pacientes com adenocarcinoma de reto. A avaliação do p53 pela técnica de imuno-histoquímica (IHC) utilizou anticorpos específicos Pab-1801, e sua expressão foi classificada de acordo com a porcentagem de expressão (0 a 100%). Para p53 positivo, considerou-se dois pontos de corte: 5% e 20%. O p53 foi considerado positivo quando apresentava mais de 5% ou 20% de núcleos intracelulares corados por campo microscópico de 400 aumentos, conforme o ponto de corte analisado (5% ou 20%). A preparação das lâminas (IHC e HE) e avaliação das mesmas foram realizadas pelo Serviço de Patologia do HCPA, a partir dos blocos de parafina das peças cirúrgicas estocadas neste serviço e analisadas por patologistas com experiência em patologia gastrointestinal.

Anticorpos e reagentes

Como anticorpos primários foram utilizados o anticorpo monoclonal Pab 1801 que reconhece a proteína p53 (Sigma Biosciences, St Louis, MO, USA), tanto na forma selvagem como na forma mutante da proteína p53.

Técnica de imuno-histoquímica

As amostras de tecido tumoral foram processadas para expressão da proteína p53 por técnica de imuno-histoquímica de rotina do Serviço de Patologia do HCPA, utilizando anticorpos primários anteriormente descritos. Após desparafinização e reidratação, recuperação antigênica, inativação da atividade da peroxidase endógena e bloqueio das reações inespecíficas, os corte foram encubados por 12 horas a 4 graus

centígrados com uma solução diluída dos anticorpos primários a 1:100 . A localização do anticorpo primário foi alcançada pela aplicação subsequente do complexo estreptavidina-biotina peroxidase (LSAB, Dako) e a revelação com a utilização do diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako). A contracoloração das lâminas foi feita com a hemotoxilina de Meyer. Todas as reações foram executadas com controles positivos (câncer de mama) e negativos (sem utilização do anticorpo primário).

ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os dados quantitativos foram descritos com média e desvio padrão. Nas variáveis categóricas utilizamos frequência absoluta e percentual. A ocorrência de óbito e proporção livre de doença foram inicialmente descritas por curvas de Kaplan-Meier. Associação bivariada entre os desfechos de interesse e as características dos pacientes incluindo a determinação p53 foi avaliado por risco relativo (RR), intervalo de confiança (IC) e significância por teste de Qui-quadrado. O impacto simultâneo dos efeitos de diversas variáveis sobre a ocorrência de óbito e recidiva local e ocorrência de metástases foi avaliado por modelo de regressão de Cox, obtendo-se riscos relativos ajustados e seus respectivos intervalos de confiança. O nível de significância nas análises bivariadas foi de $\alpha=0,05$ e na regressão multivariada foi utilizada $\alpha=0,10$. Os dados foram processados e analisados com o auxílio do programa SPSS versão 10.

RESULTADOS:

Estudamos 83 casos de adenocarcinoma de reto; 47% dos pacientes (39) eram do sexo masculino. A idade média dos pacientes no momento da cirurgia foi de 61,8 anos (± 14.3). Os sintomas mais frequentes foram sangramento, diarreia, constipação, dor anal e emagrecimento com uma média de 9,4 quilos. O tempo de evolução dos sintomas antes do diagnóstico foi em média 9,2 meses.

Em relação à topografia do tumor, 48% localizava-se no reto inferior, 34% no reto médio e 18% no reto superior (**Figura 5**). A média e o desvio padrão(DP) da distância entre o tumor e a margem anal foi de 7 cm (3,9). Os procedimentos cirúrgicos realizados foram: amputação abdomino-perineal do reto (AAP) em 42 pacientes; retossigmoidectomia abdominal com anastomose manual em 21 pacientes; retossigmoidectomia abdominal com anastomose mecânica em 11 pacientes; retossigmoidectomia abdominal com anastomose coloanal em 3 pacientes e retossigmoidectomia abdominal associada a Hartman em 6 pacientes (**Figura 6**). A grande incidência de amputação de reto é justificada em parte pela localização do tumor (a menos de 2cm da margem anal) e em parte pela época da realização da cirurgia, quando os critérios de preservação esfinteriana ainda não estavam totalmente estabelecidos no serviço.

O estudo macroscópico do tumor na peça cirúrgica (**Tabela 1**) observou as seguintes características: a média(DP) da margem distal foi de 2,3cm (1.5) em 41 casos. Os outros 42 casos foram submetidos à amputação de reto. O tamanho do tumor, medido em sua maior extensão, teve uma média de 5,5cm de comprimento (± 2 cm). O aspecto macroscópico da lesão foi denominado como vegetante, estenosante e ulcerado, conforme

sua apresentação. Na maioria dos casos, houve associação entre duas ou entre as três formas. O aspecto vegetante foi observado em 81,3% dos casos. Em 8 casos, não houve relato da forma macroscópica (**Tabela 1**).

As peças cirúrgicas dos 83 pacientes operados por adenocarcinoma de reto foram analisadas pela classificação anátomo-patológica de Astler-Coller (modificação da classificação de Dukes). Como não houve nenhum caso de Astler-coller A, os casos foram divididos em quatro categorias apenas: B1, B2, C1 e C2, conforme a **Tabela 1**. Quanto à diferenciação histológica, observamos que 13,3% eram bem diferenciados, 73,5% eram moderadamente diferenciados e 13,3%, pouco diferenciados. Observamos metástases linfonodais em 46 pacientes (**Tabela 1**). O número de linfonodos examinados por peça foi em média (DP) 15,42 (9,2). A média de linfonodos comprometidos foi 5,63.

Dos 83 casos examinados, 43,4% (36 pacientes) apresentaram recidiva tumoral; 16,9% (14 pacientes), recidiva local; 19,3% (16 pacientes), metástases à distância e 7,2% (6 pacientes) apresentaram recidiva local associada a metástases à distância, conforme a **Tabela 2**. Dos pacientes com recidiva local, 6 foram submetidos a cirurgia, sendo que em 5 pacientes a recidiva foi considerada irrecorrível. Na **Tabela 3**, descrevemos os tipos de metástases à distância encontrados durante um seguimento de 60 meses.

O estudo da sobrevida foi realizado em relação ao tempo livre de doença e sobrevida total segundo o método de Kaplan-Meier, mostrados na **Figura 7**. Nos pacientes que apresentaram recidiva, a média (DP) de tempo livre de doença foi de 17 meses (10,6).

Na **Tabela 4**, é apresentada a relação entre vários fatores, como idade, sexo, LCC (limite circunferencial comprometido), aspecto macroscópico da lesão, classificação de

Astler-Coller, diferenciação histológica e positividade imuno-histoquímica para p53 com pontos de corte de 5% e 20%.

O limite circunferencial comprometido (LCC) foi estudado em 75 pacientes; em 69 pacientes havia LCC livre e em 6 eram comprometidos. O RR foi de 1.66, IC de 0.58 a 4.70 e $p=0.34$. Outras variáveis como distância da margem anal, sintomas, limite distal, tamanho do tumor, tipo de cirurgia também foram analisadas, mas não houve relação entre elas e sobrevida ($p>0,05$).

Foi realizado radioterapia pós-operatória em 33 pacientes, sendo 6 pacientes B1, 4 B2, 5 C1 e 19 C2. Destes, em 32 pacientes foi associada a quimioterapia ao tratamento.

Na avaliação imuno-histoquímica do p53 com um ponto de corte de 5%, 39 pacientes (47%) apresentaram p53 negativo (**Tabela 5**). Com um ponto de corte de 20%, observamos que 47 pacientes (56,6%) apresentaram p53 menor ou igual a 20% (**Tabela 5**).

Nas **Tabelas 4, 4a, 4b e 4c** observamos a associação de alguns fatores com a ocorrência de óbito, recidiva local, metástases à distância e recidiva total. Na análise multivariada analisamos as variáveis: classificação de Astler-Coller (A-C), grau de diferenciação histológica e p53 com pontos de corte de 5% e 20%

Em relação ao óbito, na análise bivariada, p53 positivo com um ponto de corte de 5% ($>5\%$) apresentou RR (risco relativo) de 1.58, $p=0,18$ e IC (intervalo de confiança) de 0.17 a 3.05. Com um ponto de corte de 20%, o RR foi de 2.27, IC de 1.18 a 4.36 e $p=0.01$. Na análise multivariada, para p53 com um ponto de corte de 5%, encontramos um RR aj (risco relativo ajustado) 1.62, IC de 0.92 a 2.84 e $p=0.16$. Para um ponto de corte de 20% ($>20\%$), o RR aj foi de 2.32, IC de 1.34 a 4.03 e $p=0.001$. (**Tabela 4**)

Na **Tabela 4a**, analisamos fatores como A-C, grau histológico e p53 positivo com pontos de corte de 5% e 20% em associação com recidiva local. Encontramos $p=0.04$,

RR:2.71, IC(1.06-6.84) e $p= 0.05$, RRaj:2.64, IC(1.19-5.83) para p53 positivo com um ponto de corte de 20% na análise bivariada e multivariada respectivamente.

Na **Tabela 4b**, analisamos os fatores acima em associação a metástases; encontramos para p53 positivo com ponto de corte de 20%, $p=0.03$, RR:2.54, IC(1.07-6.00) e $p=0.04$, RRaj:2.45, IC(1.18-5.07) para as duas análises respectivamente.

E na **Tabela 4c**, analisamos a recidiva total. Para p53 positivo com um ponto de corte de 20% observamos $p=0.01$, RR:2.54, IC(1.29-5.03) na análise bivariada e $p=0.01$, RRaj:2.43 e IC (1.36-4.33) na análise multivariada

Na **Tabela 6**, mostramos a associação entre p53 com um ponto de corte de 20% e óbito, recidiva locorregional, metástases à distância e recidiva total e na **Figura 8** mostramos a curva de sobrevida representando dois estratos de p53, menor ou igual a 20% e maior a 20%.

Na **Figura 9**, mostramos fotos de lâminas coradas para análise de imunohistoquímica com expressão do p53 positivo.

FIGURA 5: ADENOCARCINOMA DE RETO X LOCALIZAÇÃO

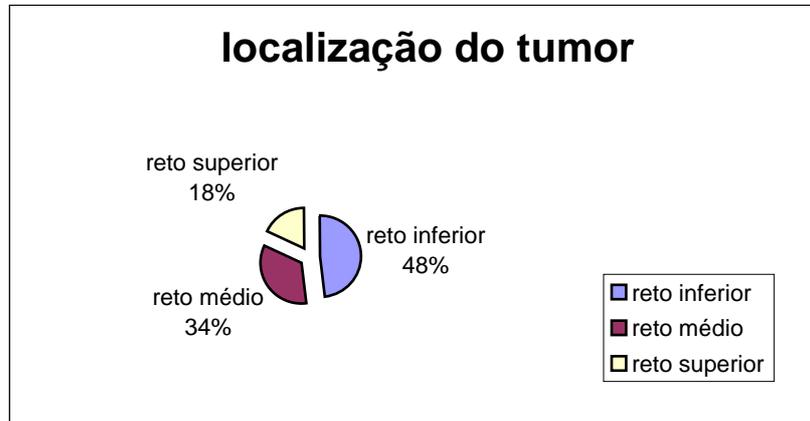


FIGURA 6: TIPOS DE CIRURGIAS

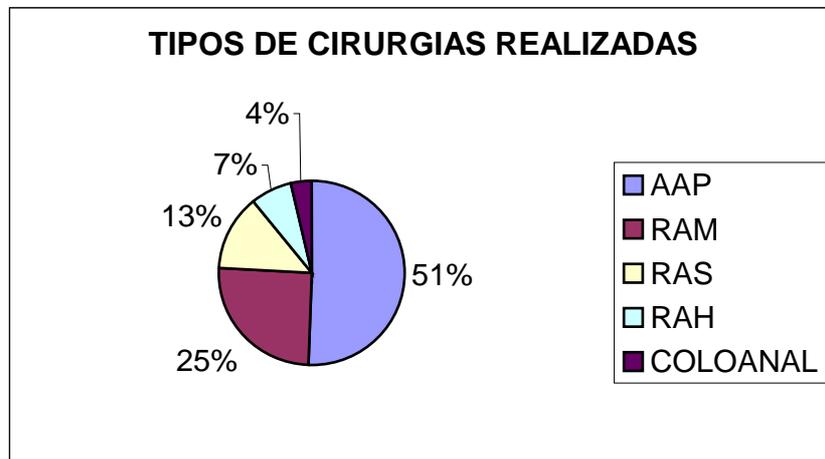


Figura 6: AAP: amputação abdômico-perineal de reto, RAM: retossigmoidectomia abdominal com anastomose manual, RAS: retossigmoidectomia abdominal com anastomose mecânica, RAH: retossigmoidectomia associada a Hartman; Coloanal: retossigmoidectomia com anastomose coloanal (manual).

Tabela 1: Características demográficas e basais dos pacientes
incluídos no estudo

Variável	n	descrição
Idade, anos	83	61.8±14.3
Sexo masculino, f (%)	83	39 (47,0)
Distância da margem anal, cm	83	7.0±3.9
Limite distal (cm)	43	2.3±1.5
Tamanho do tumor, cm	73	5.5±2.0
Aspetos macroscópicos	75	
Ulcerado		59 (78.7)
Estenosante		23 (27.7)
Vegetante		61 (82.4)
Classificação de Astler-Coller, f (%)	83	
B1		21 (25.3)
B2		16 (19.3)
C1		10 (12.0)
C2		36 (43.4)
Grau de diferenciação histológica, f (%)	83	
bem diferenciado		11 (13.3)
Moderadamente diferenciado		61 (73.5)
Pouco diferenciado		11 (13.3)

Os dados são apresentados com média±desvio padrão ou frequência (percentual)

Tabela 2: Classificação de Astler-Coller e sua relação com recidiva e óbito

A-C	N	RL	MTS	MTS/RL	RT	OBITO
B1	21	3	2	0	5	5
B2	16	1	2	0	3	3
C1	10	1	5	2	8	7
C2	36	9	7	4	20	2
Total	83	14(16,9%) 20(24,15%)*	16(19,3%) 22(26,5%)**	6(7,2%)	36(43,4%)	35

RL:recidiva local; MTS: metástase à distância; MTS/RL: metástase à distância associada a recidiva local; RT: recidiva total(RL+MTS); *número total de recidiva local, inclusive os casos associados a metástases; ** número total de metástases, inclusive os casos associados a recidiva local.

Tabela 3: Tipos de Metástases Apresentadas Pelos Pacientes

Tipo de Metástases	N	Recidiva local associada
Hepática	9	1
Pulmonar	5	1
Óssea	2	1
Óssea + pulmonar	3	1
Hepática + pulmonar	3	1
Axilar + pulmonar	1	1
Total	23	6

Figura 7: Gráficos de Kaplan-Meier representando a ocorrência de óbito (A) e de proporção livre de doença (B) ao longo do período de seguimento em pacientes

com adenocarcinoma de reto (n=83).

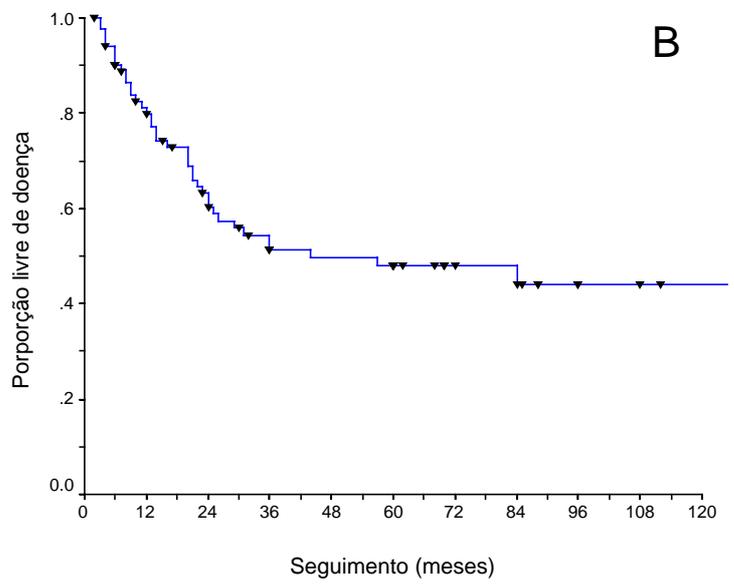
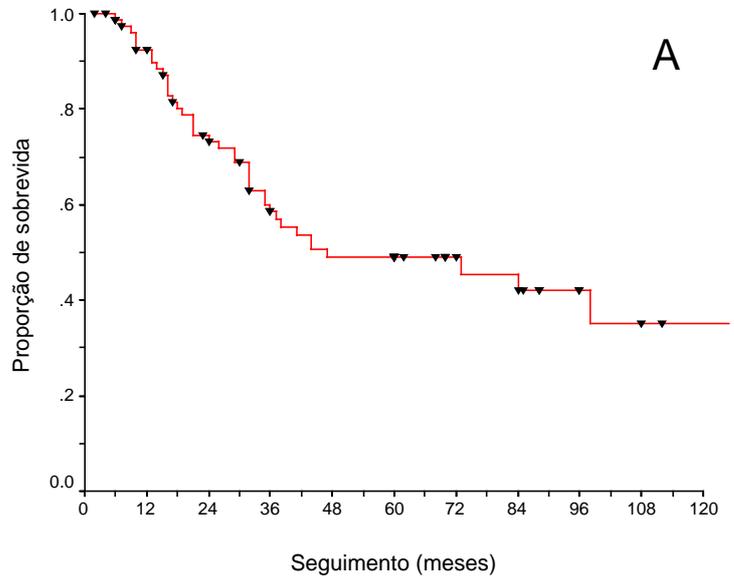


Tabela 4: Avaliação da associação de diversos fatores com a ocorrência de **óbito** em pacientes com adenocarcinoma de reto

Variável	n	Análise bivariada			Análise multivariável		
		RR*	IC95%	P	RRaj	IC90%	P
Idade, anos	80	1.01	0.99 a 1.04	0.33	–		
sexo masculino	81	1.63	0.86 a 3.05	0.13	–		
LCC	75	1.66	0.58 a 4.70	0.34	–		
Macroscopia	75						
Ulcerado		1.53	0.64 a 3.66	0.34	–		
Estenosante		1.08	0.53 a 2.18	0.83	–		
Vegetante		1.12	0.49 a 2.55	0.78	–		
Astler-Coller	83						
B1 ^(a)		1.00			1.00 ^(b)		
B2		2.24	0.60 a 8.37	0.23	2.65	0.84 a 8.37	0.17
C1		5.29	1.62 a 17.22	<0.01	4.83	1.65 a 14.10	0.02
C2		4.77	1.63 a 13.95	<0.01	4.00	1.47 a 10.88	0.02
Histologia	83						
BD ^(a)		1.00			1.00 ^(b)		
MD		1.92	0.58 a 6.31	0.28	1.04	0.35 a 3.12	0.95
PD		8.18	2.04 a 32.78	<0.01	3.28	0.90 a 11.88	0.13
P53 (5%)	83						
[+]		1.58	0.17 a 3.05	0.18	1.62 ^(c)	0.92 a 2.84	0.16
[-] ^(a)		1.00			1.00		
[+] > 20%		2.27	1.18 a 4.36	0.01	2.32 ^(b)	1.34 a 4.03	0.01
[-] ≤ 20% ^(a)		1.00			1.00		

*RR: razão de densidades de incidência; IC: intervalo de confiança; LCC: limite circunferencial comprometido; BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pouco diferenciado; (a): categoria de referência; (b) RR ajustado em modelo de regressão de Cox contendo os termos: Astler-Coller + histologia + P53 ([+] > 20% vs [-] ≤ 20%); (c) RR ajustado em modelo de regressão de Cox contendo os termos: Astler-Coller + histologia + P53 ([+] > 5% vs [-] ≤ 5%)

Tabela 4a: Avaliação da associação de diversos fatores com a ocorrência de **recidiva local** em pacientes com adenocarcinoma de reto

Variável	n	Análise bivariada			Análise multivariável		
		RR*	IC95%	P	RRaj	IC90%	P
Astler-Coller	83						
B1 ^(a)		1.00			1.00 ^(b)		
B2		0.63	0.09 a 4.18	0.68	0.62	0.09 a 4.26	0.68
C1		2.36	0.61 a 9.10	0.29	1.88	0.46 a 7.73	0.46
C2		3.61	1.24 a 10.47	0.05	2.69	0.85 a 8.53	0.16
Histologia	83						
BD ^(a)		1.00			1.00 ^(b)		
MD		3.24	0.43 a 24.50	0.25	2.41	0.39 a 14.90	0.43
PD		6.23	0.55 a 70.70	0.14	3.22	0.36 a 28.75	0.38
P53 (5%)	83						
[+]		1.83	0.69 a 4.81	0.22	1.80 ^(c)	0.79 a 4.11	0.24
[-] ^(a)		1.00			1.00		
P53	83						
[+] > 20%		2.71	1.06 a 6.84	0.04	2.64 ^(b)	1.19 a 5.83	0.05
[-] ≤ 20% ^(a)		1.00			1.00		

*RR: razão de densidades de incidência; IC: intervalo de confiança; LCC: limite circunferencial comprometido; BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pouco diferenciado; (a): categoria de referência; (b) RR ajustado para Astler-Coller + histologia em modelo de regressão de Cox contendo os termos: + P53 ([+] > 20% vs [-] ≤ 20%); (c) RR ajustado em modelo de regressão de Cox contendo os termos: Astler-Coller + histologia + P53 ([+] > 5% vs [-] ≤ 5%)

Tabela 4b: Avaliação da associação de diversos fatores com a ocorrência de **metástase** em pacientes com adenocarcinoma de reto

Variável	N	Análise bivariada			Análise multivariável		
		RR*	IC95%	P	RRaj	IC90%	P
Astler-Coller	83						
B1 ^(a)		1.00			1.00 ^(b)		
B2		1.68	0.32 a 8.71	0.61	2.11	0.39 a 11.50	0.47
C1		7.51	2.00 a 28.19	0.01	7.01	1.66 a 30.11	0.03
C2		5.28	1.50 a 18.61	0.03	4.45	1.07 a 18.46	0.09
Histologia	83						
BD ^(a)		1.00			1.00 ^(b)		
MD		1.33	0.30 a 5.83	0.71	0.64	0.16 a 2.57	0.60
PD		10.87	2.04 a 58.01	0.01	3.81	0.79 a 18.28	0.16
P53 (5%)	83						
[+] >5%		2.11	0.86 a 5.16	0.10	1.99 ^(c)	0.93 a 4.30	0.14
[-] ^(a)		1.00			1.00		
P53 (20%)	83						
[+] > 20%		2.54	1.07 a 6.00	0.03	2.45 ^(b)	1.18 a 5.07	0.04
[-] ≤ 20% ^(a)		1.00			1.00		

*RR: razão de densidades de incidência; IC: intervalo de confiança; LCC: limite circunferencial comprometido; BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pouco diferenciado; (a): categoria de referência; (b) RR ajustado para Astler-Coller + histologia em modelo de regressão de Cox contendo os termos: + P53 ([+] > 20% vs [-] ≤ 20%); (c) RR ajustado em modelo de regressão de Cox contendo os termos: Astler-Coller + histologia + P53 ([+] > 5% vs [-] ≤ 5%)

Tabela 4c: Avaliação da associação de diversos fatores com a ocorrência de **recidiva total** em pacientes com adenocarcinoma de reto

Variável	n	Análise bivariada			Análise multivariável		
		RR*	IC95%	P	RRaj	IC90%	P
Astler-Coller	83						
B1 ^(a)		1.00			1.00 ^(b)		
B2		1.05	0.32 a 3.50	0.95	1.24	0.36 a 4.30	0.77
C1		3.60	1.41 a 9.23	0.03	3.21	1.16 a 8.92	0.06
C2		3.54	1.55 a 8.09	0.01	2.89	1.14 a 7.33	0.06
Histologia	83						
BD ^(a)		1.00			1.00 ^(b)		
MD		1.60	0.48 a 5.29	0.44	0.99	0.33 a 3.03	0.99
PD		7.94	1.97 a 32.02	0.01	3.57	0.97 a 13.18	0.11
P53 (5%)	83						
[+]		1.81	0.90 a 3.63	0.10	1.71 ^(c)	0.94 a 3.10	0.14
[-] ^(a)		1.00			1.00		
P53 (20%)	83						
[+]		2.54	1.29 a 5.03	0.01	2.43 ^(b)	1.36 a 4.33	0.01
[-] ^(a)		1.00			1.00		

*RR: razão de densidades de incidência; IC: intervalo de confiança; LCC: limite circunferencial comprometido; BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pouco diferenciado; (a): categoria de referência; (b) RR ajustado para Astler-Coller + histologia em modelo de regressão de Cox contendo os termos: + P53 ([+] > 20% vs [-] ≤ 20%); (c) RR ajustado em modelo de regressão de Cox contendo os termos: Astler-Coller + histologia + P53 ([+] > 5% vs [-] ≤ 5%)

Tabela 5: p53 e Classificação de Astler-Coller.

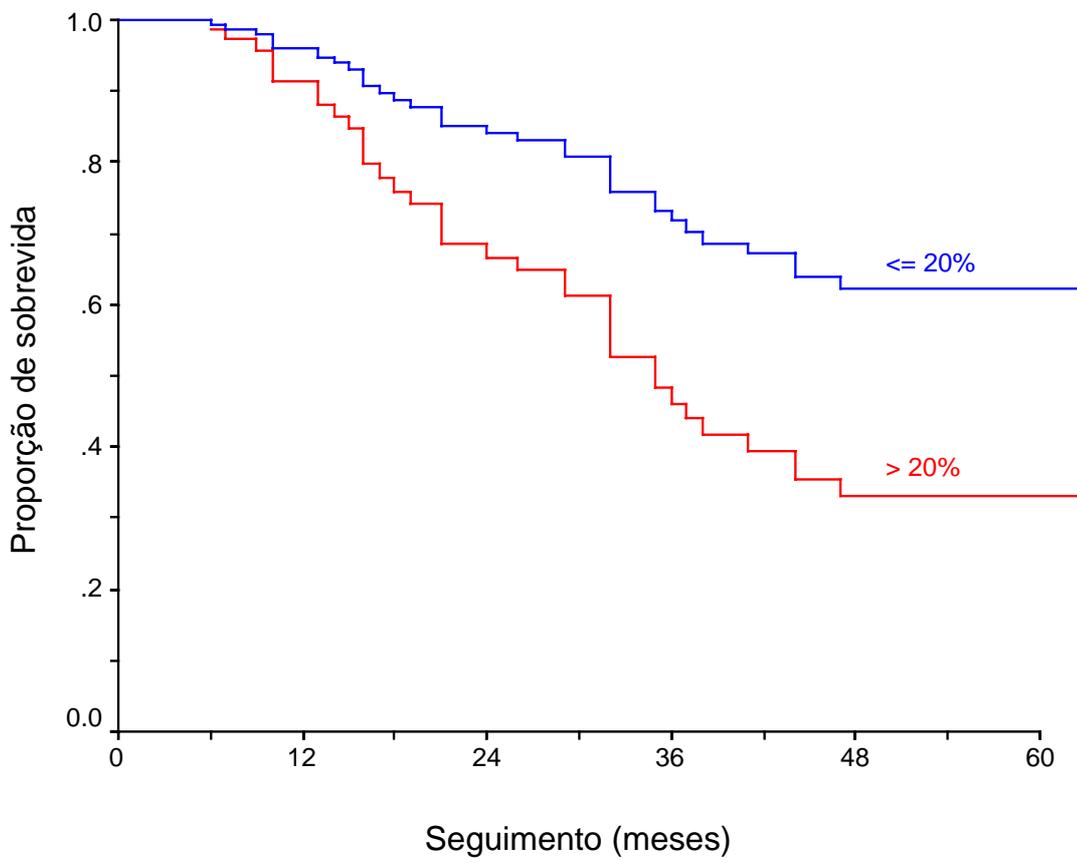
	P53			
	5%	>5%	20%	>20%
B1	8	13	11	10
B2	10	6	11	5
C1	5	5	6	4
C2	16	20	19	17
Total	39(47%)	44(53%)	47(56,6%)	36(43,4%)

Tabela 6: Relação do p 53 e Recidiva.

P53	P53					
	P53 positivo (5%)			P53 positivo (20%)		
	RR	IC	P	RR	IC	P
Recidiva						
<i>Recidiva local</i>	1.83	0.69-4.81	0.22	2.71	1.06-6.84	0.04 *
<i>Metástases</i>	2.11	0.86-5.16	0.10	2,54	1.07-6.00	0.03 *
<i>Recidiva total</i>	1.81	0.90-3.63	0.10	2,54	1.29-5.03	0.01*

* diferença estatística

Figura 8: Curva de sobrevida representando dois estratos de P53 ([+] > 20% vs [-] ≤ 20%) ajustada em modelo de regressão de Cox para os termos Astler-Coller (B1, B2, C1 e C2) e histologia (bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado) em pacientes com adenocarcinoma de reto (n=83).



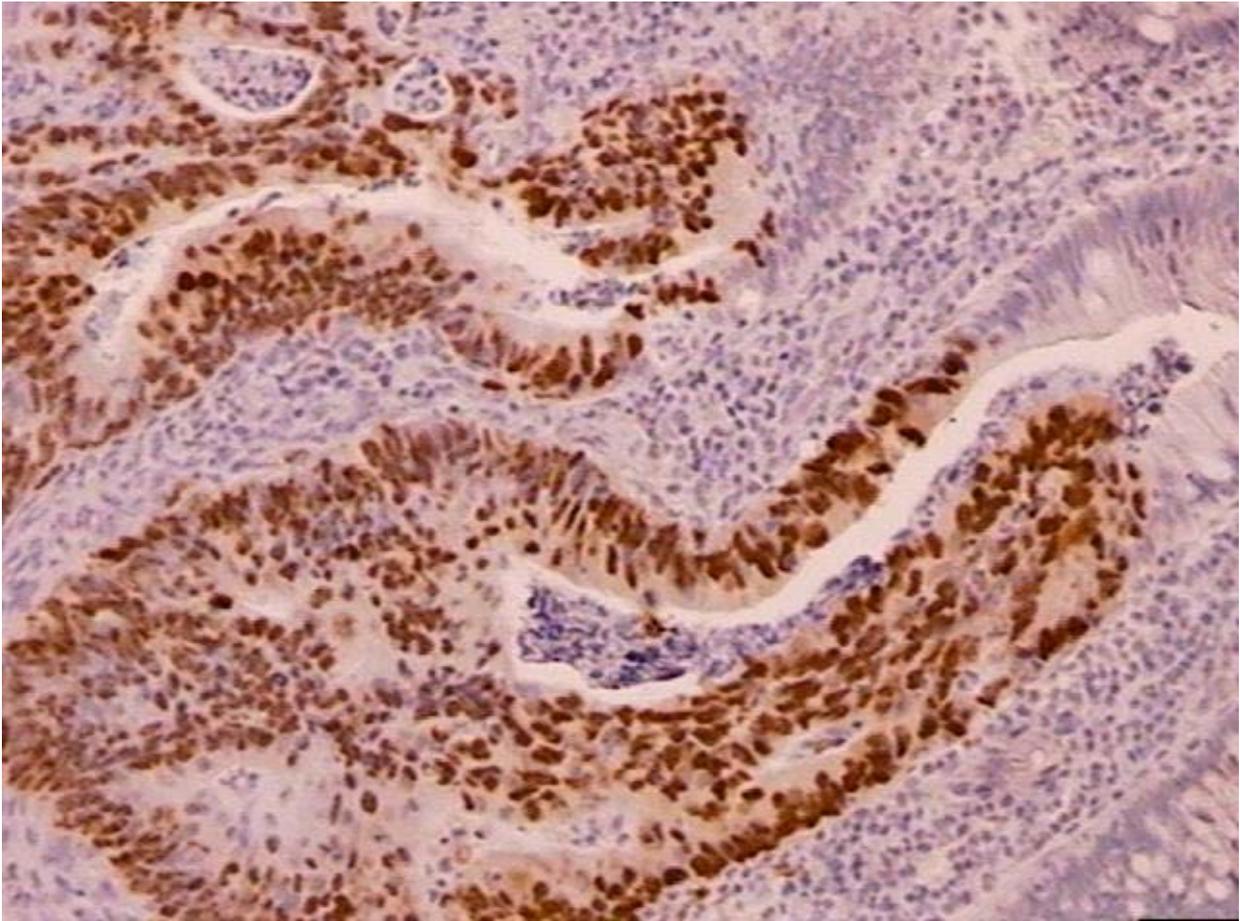


Figura 9: Expressão da proteína P53 em lâmina de imuno-histoquímica

DISCUSSÃO (artigo)

O prognóstico de adenocarcinoma retal está basicamente determinado pelo estágio histológico no momento da cirurgia, mas uma proporção de pacientes apresenta recidiva apesar de cirurgia curativa e estadiamento patológico inicial.^{7,8,9} O estabelecimento de uma correlação entre dano genético e prognóstico tem sido objeto de extensas investigações nos últimos anos, assim como os mecanismos de controle do ciclo celular.^{7,10}

Tem sido proposto que alterações genéticas adquiridas durante a formação tumoral possam ter informação prognóstica. No câncer de reto, mutação do p53 e perda alélica no braço curto do cromossomo 17 levam a alterações gênicas que inativam a função supressora do p53.^{11,12,13} A carcinogênese colorretal é um processo altamente complexo, na qual muitos elementos estão implicados como possíveis causas, entre eles o meio ambiente e fatores genéticos. Fearon and Vogelstein,¹⁷ com o seu modelo para base genética da seqüência adenoma-carcinoma, tem contribuído fortemente para elucidação deste processo. Sob este aspecto, analisamos a expressão da proteína p53 intranuclear em 83 casos de adenocarcinoma de reto, e correlacionamos com a sobrevida e grau histológico, entre outras variáveis.

Em nosso estudo, não houve diferença estatística entre os dois sexos em relação à sobrevida e à incidência tumoral. Em alguns países, como Estados Unidos, há um predomínio do tumor no sexo masculino.

Em nosso trabalho, apenas 18% dos tumores localizavam-se no reto superior, divergindo um pouco dos achados obtidos por Goliguer em seu clássico trabalho, de 1941.

As variáveis clínico-patológicas, tais como sintomas, localização, tamanho e aspecto macroscópico do tumor e limite circunferencial comprometido não mostraram relação com a recidiva e sobrevida ($p>0.05$).

Encontramos uma média de linfonodos examinados por peça de 15.42, adequada segundo a literatura, a qual preconiza a análise de no mínimo 12 linfonodos por peça.^{19,20}

Em nosso estudo, a sobrevida num seguimento de 60 meses foi de 54,3%. Notamos que alguns pacientes possuem sobrevida de 120 meses ou mais; naturalmente, não foi possível calcular a sobrevida deste período a todos pacientes pois muitos deles foram operados há um período bem menor. A nossa taxa de recidiva total foi de 43,4%; a taxa de recidiva local, 16,9%; a taxa de metástases, 19,3% e a taxa de metástases associadas à recidiva, 7,2%. A média do tempo livre da doença foi de 17 meses. Na literatura encontramos taxas de recidiva total que variaram entre 30 e 50%. O amplo estudo multicêntrico da Noruega²¹ encontrou índices de recidiva local de 28,4% e 70% dos pacientes foram diagnosticados num período menor de 24 meses. Em relação a metástases à distância encontramos variações de 6 a 40% na literatura, sendo mais alta nos grupos de alto risco.²³

Na análise da diferenciação histológica, em relação à sobrevida, encontramos diferença estatística entre casos pouco diferenciados e bem diferenciados ($p<0.01$), mas não encontramos diferença para os casos moderadamente diferenciados. Assim como na literatura,^{6,8} não conseguimos definir a variável pouco diferenciado como fator prognóstico independente ($p=0.13$).

A classificação de Astler-Coller (Dukes modificado) é considerada uma classificação de prognóstico confiável e é muito usada na clínica cirúrgica. Encontramos associação estatística entre os grupos C2 e óbito ($p<0.01$), recidiva local ($p=0.05$), metástases ($p=0.03$) e recidiva total ($p=0.01$). No grupo C1, houve associação na

ocorrência de óbito ($p < 0.01$), metástases à distância ($p = 0.01$) e recidiva total ($p = 0.03$). Não houve relação com recidiva local ($p = 0.29$).

A avaliação do p53, pelo método de imuno-histoquímica, que avalia a concentração nuclear da proteína p53 alterada, tem sido intensamente investigada.^{10,11} O valor prognóstico e a aplicação clínica do p53 no câncer de reto permanece controverso, levando muitos autores a acreditar que a melhor avaliação do p53 seria pelo estudo da mutação do p53 (seqüência do DNA) e não pela avaliação por imuno-histoquímica.^{16,24} A falta de consenso entre os trabalhos é atribuída a períodos de seguimentos curtos, critérios de estadiamento não homogêneos e o uso de pacientes selecionados.

Em nosso trabalho, observamos associação entre p53 positivo, com um ponto de corte de 20% e óbito ($p = 0.01$), recidiva local ($p = 0.04$), metástases à distância ($p = 0.03$) e recidiva total ($p = 0.01$). Não observamos associação entre p53 positivo com um ponto de corte de 5% e óbito ($p = 0.18$), recidiva local ($p = 0.22$), metástases ($p = 0.10$) e recidiva total ($p = 0.10$) sugerindo que talvez este ponto de corte (5%), amplamente difundido na literatura, não seja o ideal. Em nosso estudo, encontramos associação independente entre p53 positivo para um ponto de corte de 20% e óbito (0.01), recidiva local (0.05), metástases (0.04) e recidiva total (0.01), quando ajustadas para A-C, grau histológico, o que lhe confere fator prognóstico independente.

Assim, nossos achados indicam que a utilização de um ponto de corte mais elevado para a categorização de positividade do p53 apresenta melhor poder discriminador para indivíduos com risco de ocorrência de óbitos e recidiva tumoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (Artigo)

1. American Cancer Society. Cancer facts and figures. Available in sep^{30th} 2002 from <http://www.cancer.org/statistics>.
2. Jama, Screening for Colorectal Cancer - United States, 1999 vol 281 (17) may5
3. Miller SF, Knigh AR. The early detection of colorectal cancer. Cancer. 1997; 40 (2): 945-49.
4. Hertz REL, Deddish MR, Daye E. Value of examination in detecting cancer of the rectum and colon. Postgrad Med 1960; 27: 290-94.
5. Khankhanian N, Mauligit GM, RusseL WO. Prognostic significance of vascular invasion in colorectal cancer of Dukes B class. Cancer 1997; 39: 1195-200
6. Olson RM, Perencevich NP, AW, Caffey JT, Wilson RE - Patterns of recurrence following curative resection of adenocarcinoma of the colon and rectum. Cancer 1980. 45: 2969-74.
7. Ratto C, Sofo L, Ippoliti M, merico M, Doglietto GB, Crucitti F. Prognostic factors in colorrectal cancer. Litterture review for clinical application. Dis Colon Rectum 1998; 41;1033-49.
8. Rich T, Gunderson II, Lew R, Galdibini JJ, Cohen AM, Donalsdsib G - Patterns of recurrence of rectal cancer after potentially curative surgery. Cancer 1983; 52: 1317-29
9. Moreira Iwagaki H, Hizuta A, Sakagami K, Orita K. Outcome in patients with early colorectal carcinoma. Br. J Surg (May) 1992; 79:436-38.
10. Bell SM, Scott N, Cross D, Dagar P, Lewis FA. Prognostic Value of p53 Overexpression and c-ki-ras Gene Mutations in Colorectal Cancer. Gastroenterology 1993; 104, 57-64.

11. Kressner U, Inganäs M, Bydin S, Blikstad I, Pählman L, Glimelius B, Lindmark G. Prognostic value of p53 genetic changes in colorectal cancer 1999 feb; 17(2): 593-99.
12. Chang KJ, Enker WE, Melamed M. Influence of tumor cell DNA ploidy on the natural history of rectal cancer. *A J Surg* 1987; 153:184-88
13. Nowell PC. Molecular events in tumor development. *Engl J Med* 1988 Sep; 319(9):575-77.
14. Baba S. Recent Advances in Molecular Genetic of Colorectal Cancer. *World J. Surg* 1997; 21: 678-87.
15. Stower MJ, Hardcastle JD - He results of 1115 patients with colorectal cancer treated over on year period in a single hospital. *Eur J Surg Oncol* 1985; 11(2): 119-23.
16. Bosari S, Viale G, Roncalli M, Graziani D, Borsani G, Lee AKC, Doggi G. P53 Gene Mutations, p54 protein accumulation and compartmentalization in colorectal adenocarcinoma. *A J Pathol* 1995; 147(3):790-98.
17. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1988, 319: 525-32.
18. Goligher JC. Treatment of carcinoma of the rectum. In: *Surgery of the anus, rectum and colon*, 4th edn. Bailliere Tindall, London, 1980, 502-666.
19. Fielding LP, Arsenault PA, Chapuis PH. Working party report to the world congress of gastroenterology, Sidney 1990. *J. Gastroenterol* 1991; 6:325-44.
20. Goldstein NS, Sanford W. Coffey M. et. Colbs. Lymph node recovery from colorectal resection specimens removed for adenocarcinoma. Trends over time and a recommendation for a minimum number of lymph nodes to be recovered. *Am J Clin Pathol* 1996 Aug; 106(2):209-16.

21. Medical Research Council Rectal Cancer Working Party. Randomised trial of surgery alone versus surgery followed by radiotherapy for mobile cancer of the rectum. *Lancet* 1996; 348:1610-614.

22. Horn A, Dahl O, Morild I. Venous and neural invasion as predictors of recurrence in rectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 1991; 34:798-804.

23. Adson MA, Heerden JA, Wagner JS, Ilstrup DM. Resection of Hepatic Metastases from Colorectal Cancer. *Arch Surg* 1984; 119:647-51.

24. Chang F, Syrjänen S, Syrjänen K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *Journal of clinical oncology*. 1995; 13: 1009-22

DISCUSSÃO:

O prognóstico do adenocarcinoma retal está basicamente determinado pelo estágio histológico no momento da cirurgia, mas uma proporção de pacientes apresenta recidiva apesar de cirurgia curativa e estadiamento patológico inicial. O estabelecimento de uma correlação entre dano genético e prognóstico tem sido objeto de extensas investigações nos últimos anos, assim como os mecanismos de controle do ciclo celular.

A cirurgia é a pedra fundamental no tratamento do câncer de reto, porém com limitações inerentes impostas pela biologia e pelo estágio do tumor, bem como por sua localização. A técnica cirúrgica, com o melhor entendimento da disseminação tumoral, permitiu uma ressecção mais eficaz, com ressecção total do mesorreto e preservação esfinteriana. Isto reduziu o número de amputações de reto proporcionando uma melhor qualidade de vida aos pacientes, embora o impacto sobre a sobrevida não tenha sido proporcional. O diagnóstico do câncer retal evoluiu nos últimos anos com o advento da colonoscopia, mas não invalidou a utilidade diagnóstica de exames simples e acessíveis, tais como o toque retal e a retossigmoidoscopia. O estadiamento clínico pré-operatório tem valor limitado, pois o estadiamento patológico completo só é possível após exploração e ressecção cirúrgica adequada.

Ratto demonstrou que os fatores que influenciaram significativamente e independentemente os resultados foram o envolvimento linfático, a presença de metástases à distância, a obstrução intestinal e o gênero do paciente, com melhor prognóstico nas mulheres. Wiggers demonstrou que o estágio do tumor foi o parâmetro prognóstico mais importante. Em relação a fatores como diferenciação histológica, tamanho do tumor, invasão linfática, invasão perineural, idade e gênero, existem controvérsias na literatura, com resultados altamente conflitantes.

Tem sido proposto que alterações genéticas adquiridas durante a formação tumoral possam ter informação prognóstica. No câncer de reto, a mutação do p53 e a perda alélica no braço curto do cromossomo 17 levam a alterações gênicas que inativam a função supressora do p53. Mutações deste gene produzem uma proteína p53 inativa que é detectada em 30 a 70% dos tumores de reto e pode estar relacionada a mau prognóstico. O p53 é um dos genes mais comumente mutados no câncer humano.

A carcinogênese colorretal é um processo altamente complexo, na qual muitos elementos estão implicados como possíveis causas, entre eles o meio ambiente e os fatores genéticos. Fearon and Vogelstein⁷⁸ com o seu modelo para base genética da seqüência adenoma-carcinoma tem contribuído fortemente para elucidação deste processo. Sob este aspecto, analisamos a expressão da proteína p53 pelo do seu acúmulo nuclear em 83 casos de adenocarcinoma de reto e correlacionamos com a sobrevida e grau histológico entre outras variáveis.

Em nosso estudo, não houve diferença estatística entre os dois sexos em relação à sobrevida e a incidência tumoral, contrapondo a literatura norte-americana que relata nos EUA um predomínio do tumor no sexo masculino.

A localização do tumor em relação à topografia do reto, no nosso trabalho, divergiu um pouco dos resultados obtidos por Goliguer em seu clássico trabalho de 1941, quando avaliou 1096 casos de amputação de reto operados no Hospital São Marcos em Londres. Goliguer encontrou a seguinte distribuição topográfica: 36% das lesões (395) se encontravam no terço superior, 28,6% (314) no terço médio e 35,3% (387), no terço distal ou canal anal. Ele considerou o reto superior, aquele localizado entre 11 e 15cm (terço superior) da margem anal; reto médio, aquele localizado entre 7 e 11cm e reto inferior, aquele localizado abaixo de 7 cm. Em nosso trabalho apenas 18 % dos tumores localizavam-se no reto superior.

Em nosso estudo, variáveis clínico-patológicas como sintomas, localização, tamanho e aspecto macroscópico do tumor e limite tangencial comprometido não mostraram relação com recidiva, sobrevida e p53 ($p>0.05$).

Embora a presença de linfonodos positivos seja o indicador prognóstico mais importante de sobrevida, o número ideal de linfonodos dissecados pelo cirurgião e analisados pelo patologista ainda é motivo de discussão. Em 1990, foi proposto que fossem analisados no mínimo 12 linfonodos, mas a média na literatura varia entre 6 a 17 linfonodos. Deste modo, podemos dizer que a nossa análise foi adequada pois a média foi de 15,42 linfonodos por peça analisada.

Em nosso estudo, a sobrevida num seguimento de 60 meses foi de 54,3 por cento. As taxas de sobrevida com seguimento de 5 anos variam de 40% a 60% e estão diretamente relacionadas ao estágio tumoral. Atinge, aproximadamente, níveis de 75% quando a doença é localizada e atinge níveis de 6% quando há metástases à distância. A nossa taxa de recidiva total foi de 43,4%; recidiva local, 16,9%; metástases, 19,3% e metástases associadas à recidiva, 7,2%. A média do tempo livre da doença foi de 17 meses. Na literatura encontramos taxas de recidiva total que variam de 5 a 60%. O amplo estudo multicêntrico da Noruega encontrou índices de recidiva local de 28,4% e 70% dos pacientes foram diagnosticados num período menor de 24 meses. Em relação a metástases à distância encontramos variações de 6 a 40% na literatura, sendo mais alta nos grupos de alto risco.

Na análise da diferenciação histológica em relação à sobrevida, encontramos diferença estatística entre pacientes pouco diferenciado e bem diferenciados ($p<0.01$), mas não encontramos diferença para os pacientes moderadamente diferenciados. Assim como na literatura, não conseguimos definir o fator pouco diferenciado como fator prognóstico independente ($p=0.13$).

A classificação de Astler-Coller (Dukes modificado - 1954) é considerada uma classificação de prognóstico confiável sendo muito usada na clínica cirúrgica. Encontramos associação estatística entre os grupos C2 e óbito ($p < 0.01$), recidiva local ($p = 0.05$), metástases ($p = 0.03$) e recidiva total ($p = 0.01$). No grupo C1, encontramos associação na ocorrência de óbito ($p < 0.01$), metástases à distância ($p = 0.01$) e recidiva total ($p = 0.03$). Não encontramos relação com recidiva local ($p = 0.29$).

A associação do p53, pelo estudo de imuno-histoquímica que avalia a concentração nuclear da proteína p53 alterada tem sido intensamente investigada. O valor prognóstico e a aplicação clínica do p53 no câncer de reto permanece controverso, levando muitos autores a acreditar que a melhor avaliação do p53 seria pelo estudo da mutação do p53 (seqüência do DNA) e não a avaliação por imuno-histoquímica.^{16,15} A falta de consenso entre os trabalhos é atribuída a períodos de seguimentos curtos, critérios de estadiamento não homogêneos e o uso de pacientes selecionados.

Kressner et cols analisaram em seu estudo, a seqüência do DNA e encontraram mutações em 52% das amostras. As principais alterações genéticas encontradas foram mutações, deleções e inserções. Setenta e quatro por cento das mutações estavam localizadas na região pertencente ao p53. A avaliação imuno-histoquímica, no mesmo estudo, demonstrou expressão da proteína p53 em 48% dos pacientes, e quando relacionada com a seqüência do DNA, houve concordância nos resultados em 74%. Embora a correlação seja estatisticamente significativa, ($p < 0.01$), estes dois métodos tiveram diferentes sensibilidades para detectar alterações do p53. A avaliação da seqüência do DNA mostrou melhor prognóstico em relação ao estudo imuno-histoquímico. ($p = 0.04$).¹⁶ Entretanto, este trabalho considerou expressão do p53 como presença ou ausência da coloração nuclear. Não há consenso na literatura sobre critérios para a interpretação dos resultados da imuno-histoquímica, ou seja, a quantidade de

coloração nuclear (expressão) necessária para considerar o p53 positivo não está bem claro. A grande maioria dos pesquisadores considera p53 positivo àqueles que expressam (coloram) mais de 5% da lâmina examinada.

O significado prognóstico do p53 no tratamento do câncer colorretal é controverso. Muitos autores têm encontrado relação entre p53 positivo e melhora da sobrevida, como Bosari,⁸⁷ Soong⁸⁸, Sun⁸⁹ Leahy,⁹⁰ e Zeng,⁹¹ enquanto outros não encontraram a mesma relação.^{92,93,94,95} Os pontos de cortes destes trabalhos variaram, sendo a maioria de 5 por cento.

Diaz and Moeda encontraram um aumento significativo no risco de recorrência em tumor imunopositivo, enquanto outros não encontraram a mesma relação.^{96,97}

Em nosso trabalho, observamos associação entre p53 positivo, com um ponto de corte de 20% e óbito ($p=0.01$), recidiva local ($p=0.04$), metástases à distância ($p=0.03$) e recidiva total ($p=0.01$). Não observamos associação entre p53 positivo com um ponto de corte de 5%: óbito($p=0.18$), recidiva local ($p=0.22$), metástases ($p=0.10$) e recidiva total ($p=0.10$), sugerindo que talvez este ponto de corte (5%), amplamente difundido na literatura, não seja o ideal. Em nosso estudo, encontramos associação entre p53 positivo para um ponto de corte de 20% e óbito (0.01), recidiva local (0.05), metástases (0.04) e recidiva total (0.01), quando ajustadas para A-C, grau histológico, o que lhe confere fator prognóstico independente.

Assim, nossas análises indicam que a utilização de um ponto de corte mais elevado para a categorização de positividade do p53 apresenta melhor poder discriminador para indivíduos com risco de ocorrência de óbitos e recidiva tumoral .

CONCLUSÃO

O estudo da expressão imuno-histoquímica da proteína p53 é adequado para definir prognóstico em pacientes com adenocarcinoma de reto.

A hiperexpressão imuno-histoquímica da proteína p53 está correlacionada a variáveis estabelecidas de pior prognóstico como estágio tumoral C1 e C2 da Classificação Astler-Coller e grau histológico pouco diferenciado.

A hiperexpressão da proteína p53 está relacionada com o aumento da recidiva locorregional, metástases e recidiva global.

A hiperexpressão da proteína p53 está relacionada com a diminuição da sobrevida.

A expressão imuno-histoquímica da proteína p53 pode ser considerada como fator prognóstico independente.

Estudos adicionais serão necessários para estabelecer o melhor ponto de corte para se considerar p53 positivo. Nossos achados indicaram que a utilização de um ponto de corte mais elevado para a categorização de positividade do p53 apresenta melhor poder discriminador para indivíduos com médio e alto risco de ocorrência de óbitos e recidiva tumoral .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Boyle P, Langman JS. Clinical review. ABC of colorectal cancer. *Epidemiology*. *BMJ* 2000; 321:805-08.
2. Miller SF, Knigh AR. The early detection of colorectal cancer. *Cancer*. 1997; 40 (2): 945-
3. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Disponível na Internet em 20/02/2003. <http://www.inca.gov.br>
4. Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS. Disponível na Internet em 05/07/02. <http://www.datasus.gov.br>
5. Khankhanian N, Mauligit GM, RusseL WO. Prognostic significance of vascular invasion in colorectal cancer of Dukes B class. *Cancer* 1997; 39: 1195-200.
6. Olson RM, Perencevich NP, AW, Caffey JT, Wilson RE - Patterns of recurrence following curative resection of adenocarcinoma of the colon and rectum. *Cancer* 1980. 45: 2969-74.
7. Stower MJ, Hardcastle JD - He results of 1115 patients with colorectal cancer treated over on 8 year period in a single hospital. *Eur J Surg Oncol* 1985; 11(2): 119-23.
8. Rich T, Gunderson II, Lew R, Galdibini JJ, Cohen AM, Donaldsib G - Patterns of recurrence of rectal cancer after potentially curative surgery. *Cancer* 1983; 52: 1317-29.
9. Moreira LF, Iwagaki H, Hizuta A, Sakagami K, Orita K. Outcome in patients with early colorectal carcinoma. *Br. J Surg* (May) 1992; 79:436-438.
10. Nowell PC. Molecular events in tumor development. *Engl J Med* (Sept) 1988; 319(9): 575-577.

11. Baba S – Recent Advances in Molecular Genetic of Colorectal Cancer. World J. Surg 1997; 21: 678-687.
12. Bhatavdekar MJ, Patel DD, Ghosh N, Chikhlikar PR, Trivedi TI, Suthar TP, Sonali S, Shah NG, Balar DB. Coexpression of Bcl-2, c-Myc, and p53 oncoproteins as prognostic discriminants in patients with colorectal carcinoma. Dis Colon Rectum, 1997; 40(7): 785-790.
13. Gilbertsen VA. The prevention of invasive cancer of the rectum. Cancer 1978; 41: 1137-139.
14. Bosari S, Viale G, Roncalli M, Graziani D, Borsani G, Lee AKC, Doggi G. P53 Gene Mutations, p54 protein accumulation and compartmentalization in colorectal adenocarcinoma. American journal of pathology (Sept) 1995; 147(3):790-798.
15. Bell SM, Scott N, Cross D, Dagar P, Lewis FA – Prognostic Value of p53 Overexpression and c-ki-ras Gene Mutations in Colorectal Cancer. Gastroenterology.1993; 104, 57-64.
16. Kressner U, Inganäs M, Bydin S, Blikstad I, Pählman L, Glimelius B, Lindmark G. Prognostic value of p53 genetic changes in colorectal cancer. 1999 (feb); 17(2): 593-599.
17. Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, Jego N, Asselain B, Remvikos Y, Girode J, Salmon R, Gilles T. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. Gastroenterology. 1994; 106(1): 42-58.
18. Chang F, Syränen S, Syrjänen K – Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. Journal of clinical oncology. 1995; 13: 1009-22.
19. American Cancer Society. Cancer facts and figures. Available in sep^{30th} 2002 from <http://www.cancer.org/statistics>.
20. Instituto Nacional do Cancer. INCA. 10/03/2003, <http://www.inca.org.br>

21. Urtego O, Pock GT: On the antiquity of melanoma. *Ccer* 19:607-610, 1966.
22. Murray JJ. *Clínicas Cirúrgicas da América do Norte*. 1, 1993
23. Miller AB, HowweGR, jais M,: Food items and foof groups as risk factors in a case-control study in Greece. *It J Cancer* 1985, 32:1-5.
24. Burkitt DP: epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1971,28:3-13.
25. Garland C, Shekelle RB, Barrett-Connor E, et al : Dietary vitamin D and calcium and risk of colorectal cancer : A 19-year prospective study in men. *Lancet* 1985, 1:307.
26. Okhura H, Kazudo H, Maruyama K, et al; Gastrin-enhanced tumor growth of a xenotransplanted human gastric carcinoma in nude mice. *J J Clin Oncol* 1980, 10:255-64,
27. Site Mayo Clinic. What is Colorectal Cancer? 08/09/2002.
www.mayoclinic.com
28. Ekbon A, Helimick C, Zack M, et al: Cancer risks and life expectancy of children with ucerative colitis. *N Engl J Méd* 1990,323:1228-233.
29. Goligher JC. Treatment of carcinoma of the rectum. In: *Surgery of the anus, rectum and colon*, 4th edn. Bailliere Tindall, London, 1980, 502-666.
30. Carlsson U, Larson A, Ekelund G. Recurrence rates after curative surery for rectal cancer with special reference to their accuracy. *Dis Colon Rectum* 1987,30:431-36.
31. Harnsberger JR, Vernava Am, Longo WE 1994 Radical abdominopelvic: lymphadenectomy historic perspective and current role in the in the surgycal management of rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 37: 73-87.
32. Jones DJ, Moore M, Schofield PF .Prognostic significance of DNA ploidy in colorectal cancer: a prospective flow cytometry udy. *Br J Surg* 1988; 75:28-23.

33. Martin IG .Role of circumferential margin involvement in the local recurrence of rectal cancer. *Lancet* 1994; 344:707-11.
34. Ng IOL, Luk ISC, Yuen ST. Surgical lateral clearance in resected rectal carcinomas. *Cancer* 1993; 71:1972-976.
35. Pollet WG, Nicholls RJ. The relationship between the extent of distal clearance and survival and local recurrence rates after curative anterior resection for adenocarcinoma of the rectum *Ann Surg* 1982;198:159-63.
36. Goliguer JC. Recent trends in the practice of sphincter saving exision for rectal cancer. *Ann R all Surg Eng* 1979; 61:169-73.
37. Kirwan WO, O’riordam MG, Waldron R. Declining indications for abdomino-perineal resection – *Br. J. Surg* 1989;76:1061-63.
38. Williams NS. Changin patters in the treatment of rectal cancer. *Br. J Surg* 1986;76: 5-6
39. Sitken RJ. Mesorectal excision for rectal Cancer. *Br J Surg* 1996;83: 214-16.
40. Arbman g, Nilsson e, Hallbook o. Local Recurrence following total mesorectal excision for rectal cancer . *Br. J. Surg* 1996; 83: 375-79.
41. MacFarlane Jk, Ryall RDH, Heald Rj. Mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet* 341:460.
42. Phillips RK, Hittinger R, Blesovsky L, Fry JS, Fielding LP. Local recurrence folowing “curative”surgery for large bowel cancer: II. The rectum and rectosigmoid. *Br. J. Surg* 1984; 71 112-20.
43. Pahlman L, Glimelius B. Local recurrences after surgical treatment for rectal carcinoma. *Acta Chir Scand* 1994;150: 331-35.
44. Goliguer JC – the Dukes A, B and C carcinoma and the extend of spread of carcinomas of the rectum. *Surg Gynec Obstet* 1973; 143:93.

45. Dukes CE. The spread of cancer of the rectum. *Br J Surg* 1930; 17:643-48.
46. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol* 1932; 35:323-32.
47. Astler VB, Coller FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *An Surg* 1954; 139:846-51.
48. Gagliardi G, Hawley PR, Hershman MJ, Arnott SJ, Prognostic factors in surgery for local recurrence of rectal cancer. *B J Surg* 1995, 82, 1401-405.
49. Ballantyne G, Quin J, Surgical Treatment of liver Metastases in patients with colorectal cancer. *Cancer Supplement*. 1993, 71 (12)4250-266
50. Adson MA, Heerden JA, Wagner JS, Ilstrup DM. Resection fo Hepatic Metastases from Colorectal Cancer. *Arch Surg* 1984; 119:647-51.
51. SteeleG, Ravikumar TS, Benotti PN. Ressecção of hepatic metastases from colorectal cancer: Biologic perspectives. *Ann Surg* 1989;210:27.
52. MarCormack PM, Burt ME, Bains MS. Lung resection for colorectal metastases: 10-year results. *Arch Surg* 1992; 127: 1403.
53. Ratto C, Sofo L, Ippoliti M, merico M, Doglietto GB, Crucitti F. Prognostic factors in colorrectal cancer. *Litterture review for clinical application*1033-49.
54. Horn A, DahL O, Morild I. Venous and neural invasion as predictors of recurrence in rectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 1991; 34:798-804.
55. Fletcher RH. Carcinoembryonic Antigen. *Ann Int Med* 1986; 104:66-73.
56. Moertel CG, O'Fallon JR, Go VLW, O'Connell MJ, Thynne GS. The preoperative carcinoembryonic antigen test in the diagnosis, staging and prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 1986; 58:603-10.

57. Wiggers T, Arends JW, Schutte B, Volovics L, Bosman FT. A multivariate analysis of pathologic prognostic indicators in large bowel cancer. *Cancer* 1988; 61:386-395.
58. Chang KJ, Enker WE, Melamed M. Influence of tumor cell DNA ploidy on the natural history of rectal cancer. *A J Surg* 1987; 153:184-188.
59. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64:327-36.
60. Steele RJC, Sebah-Montefiore D, Adjuvant for rectal cancer. *Br J Sur* 1999, 86, 1233-234
61. Pahlman L, Glimelius B. The value of adjuvant radio(chemo)therapy for rectal cancer. *Eur J Cancer* 1995; 31^A;1347-350.
62. Rider WD, Palmer JÁ, Mahoney LJ, Robertson CT. Preoperative irradiation in operable cancer of the rectum: report of the Toronto Trial. *C J Surg* 1977; 20: 335-38.
63. Minsky BD, Kemny N, Cohen AM, et al. Preoperative high-dose leucovorin/5-fluorouracil and radiation therapy for unresectable rectal cancer. *Cancer* 1991; 67:2859-866.
64. Nadalin W, Habr-Gama. O papel da Radioterapia no câncer retal. *Oncologia Clínica*. 1994; 4: 124-33.
65. Byuse M, Zeleniuch-Jacquotte A, Chalmer TC. Adjuvant therapy of colorectal cancer, why still don't know. *Jama* 1988, 259:3571-578.
66. Medical Research Council Rectal Cancer Working Party. Randomised trial of surgery alone versus surgery followed by radiotherapy for mobile cancer of the rectum. *Lancet* 1996; 348:1610-614.
67. Keith T, Hay J, Ma R, Toy E, Larsson S, MacFarlane J, Short-source preoperative radiation therapy for operable rectal cancer. *The American Journal of Surgery* 2002, 183:509-511.

68. Swedish Rectal cancer Trial. Improved survive with preoperative radiotherapy in resecable cancer rectal. *N Engl J Med* 1997; 336:980-87
69. Habr-Gama A, Souza PMS, Ribeiro U, Nadalin W, Gansl R, Sousa AHS, Campos FG, Gama-Rodrigues J. Impact of Radiation and Chemotherapy on Sugical Treatment. *Dis Colon Rectum*, 1998; 41(9): 1087-96.
70. Pinho M, Rossi BM. O ciclo celular. *Rev Bras Coloproct* 1998; 18(3):214-15.
71. Hetts SW. To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA*, 1998; 279:300-07.
72. Lichtenfel P, Barrios CH, Moreira LF. Apoptose: morte celular programada. In: Lerner L. Ed. *Acta Médica*. EDIPUCRS. Porto Alegre, RS; 1999; 341:1251.
73. Pinho MSL Como as proteínas regulam a proliferação celular?. *Rev bra Coloproct* 1999; 19(3):223-25.
74. Korsmeyer SJ, Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulator of cell death. *Blood*, 1992; 80:879-86.
75. Jessup JM. The cell cycle, regulatory proteins and Colorectal carcinoma. vol 281 (17) may5Sherr CJ. *Cancer cell cycles*. *Science* 1996; 274:1672-677.
76. Stauton MJ, Gaffney EF. Apoptosis: basics concept and potential significance in human cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122:310-19.
77. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-32.
78. Morson BC: The polup-cancer sequence in the large bowel. *Proc R Soc Méd* 1984; 223:1028-1033.
79. Waga S, Hannon GJ, Beach D. The p21 inhibitor of cyclin-dependente kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994; 369.
80. Winawer SJ: Follow-up after polypectomy. *World J Surg* 1991;15:25-28.

81. Madoff RD, Wong KS. The Multistep Model of Colorectal Carcinogenesis. *Dis Colon Rectum*; 9(1): 30-7.
82. Langlois NEI, Lamb J, Eremin O, Heys SD, Apoptosis in colorectal carcinoma occurring in patients aged 45 years and under: relationship to prognosis, mitosis, and immunohistochemical demonstration of p53, c-myc and bcl-s protein products. *J Pathol*. 1997; 182: 392-97.
83. Waga S, Hannon GJ, Beach D. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994; 369:520-21.
84. Dix B, Robbins P, Soong R. The common molecular genetic alterations in Dukes B and C colorectal carcinomas are not short-term prognostic indicators of survival. *Int J Cancer* 1994; 59:747-51.
85. Petersen S, Thames HD, Nieder C, Petersen c, Baumann M. the results of colorectal Cancer treatment by p53 status. *Dis Colon Rectum* 2001; 44(3):322-34.
86. Bosari S, Viale G, Bossi P. Cytoplasmic accumulation of p53 protein: an independent prognostic indicator in colorectal adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86:681-87.
87. Soong R, Grieu F, Robbins P. p53 alterations are associated with improved prognosis in distal colonic carcinomas. *Clin Cancer Res* 1997; 3:1405-411.
88. Sun XF, Carstensen JM, Stal O. Prognostic significance of p53 expression in relation to DNA ploidy in colorectal adenocarcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993; 423:443-38.
89. Leahy DT, Salman R, Mulcahy, Sheahan K, O'Donoghue DP, Parfrey NA. Prognostic significance of p53 abnormalities in colorectal carcinoma detected by PCR-SSP and immunohistochemical analysis. *J Pathol* 1996;180:364-70.

90. Zeng ZS, Sarkis AS, Zhang ZF. P53 nuclear overexpression: an independent predictor of survival in lymph node-positive colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 1994; 12:2043-50.
91. Smith DR, Ji C, Goh HS. Prognosis significance of p53 overexpression and mutation in colorectal adenocarcinomas. *Br. J Cancer* 1996; 74:216-23.
92. Nathanson SD, Linden MD, Tender P. Relationship among p53, stage, and prognosis of large bowel cancer. *Dis Colon Rectum* 1994;37:527-34.
93. Pereira H, Silva S, Julião R. Prognostic markers for colorectal cancer: expression of p53 and Bcl2. *World J Surg* 1997; 21:210-13.
94. Kressner U, Lindmark G, Gerdin B. Immunohistological p53 staining is of limited value in the staging and prognostic prediction of colorectal cancer. *Anticancer Res* 1996; 16:951-57.
95. Diez M, Enriquez JM, Camunas J. Prediction of recurrence in B-C stages of colorectal cancer by p53 nuclear overexpression in comparison with standard pathological features. *Eur J Surg Oncol* 1995; 21:635-59.
96. Maeda K, Chung YS, Kang SM. Overexpression of cyclin D1 and p53 associated with disease recurrence in colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1997; 74:310-15.
97. Galandiuk S, Wieand HS, Moertel CG. Patterns of recurrence after curative resection of carcinoma of the colon and rectum. *Surg Gynecol Obstet* 1992; 174: 27-32.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

A	Adenina
AC	Antes de Cristo
AP	Anátomo-Patológico
APC	Gen - Adenomatous Polyposis Coli
bcl-2	Gene bcl-2
CC	Ctosina-Citosina
CDK	Quinase ciclino-dependente (cyclin dependent kinases)
ACE	Antígeno Cárcino-Embriônico
CKI	Quinase ciclino-dependente inibitória
c-myc	Gene c-myc
c-myc	Proteína c-myc
DCC	DCC: Deleted in Colorectal Carcinoma
DNA	Ácido Desoxirribonucleico.
E2F	Fator epitelial 2 (epitelial 2 factor)
END:	Endereço
EO	Enema Opaco
EUA	Estados Unidos da América
FC	Fator de Crescimento
G	Guanina
G1	Fase do ciclo celular – G1
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
H-ras	Gen H-ras
IHC	Imuno-histoquímica
IL-2	Interleucina 2
Kb	Kilobase
K-ras	Gen K-ras
LN	Linfonodos
MCC	Gene MCC: Mutated in Colorectal Carcinoma (mutação em adenocarcinoma colorretal)
MDM2	Gene MDM2

Met.	Metástases
MRC CRO3	Ensaio Clínico
N-ras	Gen N-ras
OBS	Observação
p21	Gene p21
p53	Gene p53
p53	Proteína p53
PAF	Polipose Adenomatosa Familiar
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
QMX	Quimioterapia
RB1	proteína retinoblastoma
RS	Rio Grande do Sul
RSC	Retossigmoidoscopia
RXT	Radioterapia
S	fase do ciclo celular – síntese
TC	Tomografia Computadorizada
TGF	Fator de Crescimento Tumoral (Tumour grow factor)
TLD	Tempo livre de doença
TNF	Fator de Necrose Tumoral (tumour necrosis factor)
TNM	Classificação TNM (tumor, linfonodo, metástase)
TT	Timina-timina
UICC	União Internacional de Combate ao Câncer
WAF1/Cip1	Gene p21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fatores de Transdução e Transcrição	21
Figura 2	Fases do Ciclo Celular	23
Figura 3	Ciclo Celular e seus pontos de controle	26
Figura 4	Sequência Adenoma-Carcinoma	33
Figura 5	Adenocarcinoma de Reto X Localização	47
Figura 6	Tipos de Cirurgias Realizadas	47
Figura 7	Gráficos de Kaplan-Meier	50
Figura 8	Curva de sobrevida representando dois estratos de p53: $> 20\%$ ou $\leq 20\%$.	56
Figura 9	Expressão do p53	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características demográficas e basais dos paciente incluídos no estudo	48
Tabela 2	Classificação de Astler-Coller e sua relação com recidiva e óbito	49
Tabela 3	Tipos de Metástases apresentadas pelos pacientes	49
Tabela 4	Avaliação da associação de diversos fatores com a ocorrência de óbito em pacientes com adenocarcinoma de reto	51
Tabela 4a	Avaliação da associação de diversos fatores com a ocorrência de recidiva local em pacientes com adenocarcinoma de reto	52
Tabela 4b	Avaliação da associação de diversos fatores com a ocorrência de metástases em pacientes com adenocarcinoma de reto	53
Tabela 4c	Avaliação da associação de diversos fatores com a ocorrência de recidiva total em pacientes com adenocarcinoma de reto	54
Tabela 5	P53 e Classificação de Astler-Coller	55
Tabela 6	Relação do p53 e Recidiva	55

LISTA DE ANEXOS:

ANEXO I - FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS

REVISÃO DE PRONTUÁRIO:

Registro: _____ AP: _____

Nome: _____

END: _____

Data de Nasc: _____ Idade (cirurgia): _____

Sexo: (1) Masculino (2) Feminino

1. Avaliação pré-operatória

Sintomas: _____ evolução: _____

Diagnóstico: ()toque () RSC () colonoscopia ()EO

Lesão sincrônica () sim () não Local:.....

Fixação ()sim () não

Localização do Tumor: ----- cm da margem anal Tamanho:.....

() 0-6cm m.a (excluir canal) () 6-12cm m.a

Biópsia retal: () bem dif () modera/ () indiferenciado () mucinoso

CEA:..... () normal () elevado

Met. Hepática () sim () não ECO () TC () () outras.....

.RX tórax () () normal Mts ()

2. Avaliação cirúrgica:

Cirurgia - Data: ----/----/19----

Procedimento: () retossigmoidectomia c/ anastomose manual () retossigmoidectomia c/
anastomose mecânica () retossigmoidectomia s/ anastomose (Hartmann) () amputação
abdominoperineal de reto () preservação esfinteriana (colo-anal)

OBS:.....

Fixação: () móvel () fixo

Complicações () obstrução () perfuração espontânea () abscesso

() perfuração transoperatória

Evidências clínicas de mts: () peritoneal () LN () hepática Quantas? Biópsia () sim ()

não

Excisão do tumor: () Completa () indefinida () incompleta

Cirurgia curativa () sim () não

Tumor: extensão Largura (circunferencial)..... Limite dista:.....

3. Histologia

Anátomo-patológico - No.:

() adenocarcinoma () mucinoso

() ulcerado () vegetante

Diferenciação : () bem () moderada/ () indiferenciado

Reação linfocítica () densa () esparsa

LN isolados: (+) (_).....

Tam. tumor:Lim distal:.....

Invasão local:

Submucosa (pT1) () muscular própria (pT2) () além da mm própria (T3) () Invasão do peritônio/ulceração serosa (pT4) () invasão de órgãos adjacentes () pT4 () qual órgão?.....

Margens:distal () sim () não Limite distal

Circunferencial: () sim () não

Linfonodos: () + () _ LN examinados:..... LN+.....

Dukes: () A () B1 () B2 () C1 () C2 () D

T: () 1 () 2 () 3 () 4 N: N0 () N1 () N2 () N3 ()

M0 () M1 () M2 () R0 () R1 () R2 ()

TNM:Estágio: () I () II () III () IV

Expressão p53 (IH - anti-Pab 1801/ Amc CM1):

Expressão:% Obs 1: Obs2:

RXT: () sim () não total:..... () neo () adj

QMT: () sim () não Esquema: n- de ciclos: () neo () adj

Situação atual de vida - última revisão em: ----/----/19----

Tempo livre de doença(tempo): TLD

Recidiva : () sim () não

1. () local/locorregional (onde e data):

() à distância (onde e data):

() ressecada (----/----/----)

() não ressecada (----/----/----/)

() outros

OBS:

Óbito - data: ----/----/19----

causa:

Reestadiamento (últimos exames - colocar a data):

CEA sérico (comparar c/ pré-op):

Fosfatase Alcalina:

RX Tórax: ()sp ()-----

Eco Abdominal: ()sp ()-----

RSC ou Colono: ()sp ()-----

Cintilo óssea: ()sp ()-----

TC Abdominal: ()sp ()-----

ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO

O Serviço de Proctologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre está fazendo um levantamento dos resultados de seu atendimento por cirurgias realizadas no período de 1985 a 1997. Para que esta análise de prontuários e lâminas seja realizada necessitamos do consentimento de Vossa Senhoria.

Será mantido sigilo absoluto com relação à identidade do portador das informações coletadas. O risco estimado para tal procedimento é nulo, visto que o material coletado não atinge física ou moralmente o paciente e os exames solicitados, quando necessário, serão os mesmos realizados na sua revisão pós-operatória.

Eu, -----, estou ciente, fui informado e tive todas as minhas dúvidas esclarecidas. Consinto na revisão dos dados constantes em meu prontuário e do material analisado pelo setor de Patologia.

Porto Alegre, ---- de ----- de ---- .