

VALOR PROGNÓSTICO DO CONTEÚDO CELULAR DE DNA (PLOIDIA) E DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA TUMORAL NO CÂNCER COLORRETAL. COMPARAÇÃO COM AS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS CONVENCIONAIS

SERGIO EDUARDO ALONSO ARAUJO - ASBCP

ANGELITA HABR-GAMA - TSBCP

AFONSO HENRIQUE DA SILVA E SOUSA JR. - TSBCP

FILADÉLFIO EUCLIDES VENCO

ROBERTO EL-IBRAHIM

ARAÚJO SEA, HABR-GAMA A, SOUSA JR AHS, VENCO FE, EL-IBRAHIM R. Valor Prognóstico do Conteúdo Celular de DNA (Ploidia) e da Atividade Proliferativa Tumoral no Câncer Colorretal, Comparação com as Variáveis Clínico-Patológicas Convencionais. *Rev bras Coloproct*, 2000; 20(3): 178-190

RESUMO: O presente estudo objetivou analisar os resultados e o valor prognóstico da ploidia do DNA e da atividade proliferativa tumoral (AP) no câncer colorretal (CCR) pela técnica da citometria digital de DNA (CD) através da comparação entre estas duas variáveis e variáveis clínico-patológicas convencionais. Foram estudados prospectivamente 50 doentes submetidos a tratamento cirúrgico do CCR. As variáveis clínico-patológicas foram: sexo, idade, localização do tumor, tipo histológico, grau de diferenciação, margem invasora, acometimento linfonodal e estadiamento (Dukes e Jass). Em todos os casos foi possível determinar a ploidia do DNA e a AP. A frequência de aneuploidia foi de 68% e a AP tumoral média foi de 12,34%. A correlação entre as variáveis estudadas e a sobrevida foi realizada por análise uni e multivariada. Conclui-se que a CD é eficaz na determinação do conteúdo celular de DNA e da AP tumoral no CCR. A ploidia do DNA e a AP não estão associadas às variáveis clínico-patológicas estudadas. Não foi possível demonstrar valor prognóstico da ploidia do DNA ou da AP tumoral. A padronização das técnicas de citometria e da estimativa do valor prognóstico constituem medidas necessárias à produção de resultados mais precisos sobre o papel da ploidia e da AP tumoral no prognóstico do CCR.

UNITERMOS: Câncer colorretal, DNA Ploidia, Citometria de fluxo, Prognóstico

O câncer colorretal (CCR) é a terceira neoplasia maligna mais freqüente no mundo⁴⁷ e a segunda maior causa de morte por câncer nos Estados Unidos, desconsiderando-se o sexo³². Em 1998, estima-se que no Brasil ocorreram por volta de 20.000 novos casos de CCR e por volta de 6.000 brasileiros teriam morrido da doença até o final do ano⁷.

O estadiamento anátomo-patológico persiste como o mais importante determinante prognóstico no CCR e, conforme proposto por Dukes¹⁵, representa o instrumento mais freqüentemente utilizado na maioria dos centros médicos para estimar a sobrevida e a ocorrência de recidiva neoplásica^{38,41}. No entanto, a eficácia desta metodologia freqüentemente é de difícil verificação principalmente quando são avaliados os casos de tumores nos estágios B e C de Dukes e que respondem por significativa parcela dos doentes referidos aos serviços de saúde para tratamento. Desta forma, a demanda por variáveis mais objetivamente associadas ao prognóstico e capazes de determinar subgrupos bem

definidos de pacientes que possam se beneficiar de tratamento adjuvante⁵⁸ representa, nos dias atuais, esforço de significativa importância na busca pela melhora dos resultados de sobrevida associados ao tratamento radical do CCR.

Como parte desse esforço empreendido para se dispor de fatores prognósticos objetivos, de fácil determinação e de reduzida variabilidade intra e inter-observador aliado à demonstração de que o conteúdo celular de DNA (ácido desoxirribonucléico) de uma amostra de células de um determinado tumor sólido pode ser determinado por técnicas de citometria de fluxo⁵⁵, numerosas experiências iniciaram-se na literatura mundial objetivando determinar o significado prognóstico das variáveis advindas do estudo do material genético tumoral pelas técnicas de citometria, o conteúdo celular de DNA (ploidia) das células neoplásicas e a fração destas células que se encontram em divisão celular (atividade proliferativa — AP). Desde 1982, quando Wolley e cols.⁵⁷ sugeriram ser de significado prognóstico a distribuição do material genético em células constituintes do câncer do cólon, considerável quantidade de pesquisa foi realizada na área da citometria de DNA.

Diante das evidências da literatura e da rara ocorrência de estudos empregando a metodologia de citometria digital (CD) de DNA para a análise do conteúdo celular de DNA — ainda inéditos em nosso meio —, decidiu-se por empregar, prospectivamente, a metodologia de citometria digital de DNA a fim de conhecer a frequência da aneuploidia conforme determinada por essa metodologia, sua correlação com variáveis clínico-patológicas convencionais e o valor prognóstico das variáveis oriundas da citometria digital de DNA para uma amostra de pacientes com CCR.

PACIENTES E MÉTODOS

Entre junho de 1991 e maio de 1994, a ploidia do DNA tumoral, bem como a medida da AP foram obtidas empregando-se a CD prospectivamente para 50 doentes submetidos a tratamento cirúrgico com diagnóstico de adenocarcinoma invasivo do intestino grosso.

Constituíram critérios de exclusão do presente estudo:

- evidências de anamnese ou propedêutica armada prévia indicando caráter metacrônico da neoplasia diagnosticada;
- diagnóstico de polipose adenomatosa familiar ou doença inflamatória intestinal;
- história de tratamento prévio não-cirúrgico qualquer para a neoplasia em questão — à exceção dos doentes submetidos a quimioirradiação neoadjuvante para o câncer localizado no reto distal¹;

Tabela 1. Distribuição da casuística conforme o sítio anatômico do tumor:

SÍTIO ANATÔMICO	N (%)
reto	27 (54%)
sigmóide	12 (24%)
descendente	4 (8%)
ângulo esplênico	3 (6%)
ceco	1 (2%)
ascendente	1 (2%)
ângulo hepático	1 (2%)
transverso proximal	1 (2%)
TOTAL	50 (100%)

Tabela 3. Indicações de tratamento adjuvante para a casuística[†]

INDICAÇÃO	MODALIDADE	N
metástases linfonodais	quimioterapia sistêmica pós-operatória ¹	10
terapia neoadjuvante do câncer do reto	quimioirradiação pré-operatória ²	2
metástases hepáticas sincrônicas	quimioterapia sistêmica pós-operatória ¹	1
recidiva de câncer do reto	quimioirradiação pós-operatória ²	2

Dos 50 doentes, 23 (46%) eram do sexo masculino e 27 (54%), do feminino.

A idade variou entre 33 e 82 anos com média de 60,7 anos.

Com relação ao grupo étnico, 49 (98%) eram da raça branca e 1 (2%), da amarela.

A distribuição da casuística, conforme o sítio anatômico de localização do tumor, encontra-se relacionada na Tabela 1 e ilustrada na figura 6.

Operação curativa foi realizada em 47 (94%) doentes. Os achados intra-operatórios que motivaram a realização de operação paliativa encontram-se relacionados na Tabela 2. Uma (2%) doente que apresentava metástases hepáticas ao intra-operatório e para a qual foi realizada retossigmoidectomia, foi submetida a hepatectomia sete meses mais tarde e encontra-se até o final do seguimento de 36 meses sem sinais de recidiva.

Tabela 2. Achados intra-operatórios em três (6%) doentes submetidos a operação paliativa

ACHADO	N (%)
metástase hepática	2 (4%)
carcinomatose peritoneal	1 (2%)
TOTAL	3 (6%)

No que se refere às indicações de tratamento adjuvante para a casuística, quinze (30%) doentes receberam tratamento adicional ao cirúrgico no período pré ou pós-operatório (Tabela 3).

Os dados clínicos foram obtidos por ocasião da admissão hospitalar para tratamento cirúrgico que foi realizada em condições eletivas em todos os casos.

Após a operação, o exame anátomo-patológico convencional do espécime cirúrgico foi realizado em todos os casos pelo mesmo patologista.

Constituíram objeto da avaliação clínico-patológica:

- sexo;
- a idade ao diagnóstico;
- a localização do tumor (para a localização no reto, os tumores foram divididos conforme a distância de sua borda inferior à borda anal determinada pela retossigmoido-

dosscopia rígida. Desta forma, foram denominados: de reto inferior —até 5 cm da borda anal—, de reto médio —entre 5 e 10 cm da borda anal—, e de reto superior —acima de 10 cm da borda anal;

- tipo de operação (curativa ou paliativa);
- tipo histológico (os tumores foram classificados em adenocarcinoma tubular, túbulo-viloso, túbulo-papilífero e mucinoso, conforme recomendações da Organização Mundial de Saúde³⁶. Segundo critério de Morson e cols.³⁵, os tumores foram classificados como mucinosos quando muco estava presente representando acima de 50% do tumor;
- grau de diferenciação tubular;
- qualidade da margem invasora (definida de acordo com a classificação de Jass²⁶, como expansiva ou infiltrativa);
- acometimento linfonodal;
- estadiamento conforme Dukes modificado por Turnbull⁵⁴ para os tumores com metástases à distância e Jass²⁶ (Quadro 1);

Quadro 1. Estadiamento do CCR segundo Jass²⁶.

VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS	PONTUAÇÃO
Tumor limitado à parede:	
Sim	0
Não	1
Margem de invasão:	
Expansiva	0
Infiltrativa	1
Número de linfonodos acometidos:	
0	0
1 – 4	1
> 4	2
Infiltrado linfocitário:	
Moderado ou intenso	0
Discreto ou ausente	1
ESTÁGIO	PONTUAÇÃO
I	0 – 1
II	2
III	3
IV	4 – 5

O processamento do material histológico e a interpretação dos resultados da CD foram realizados por médicos patologistas envolvidos na realização da CD de DNA que desconheciam os resultados referentes à avaliação clínica,

¹¹ 5-fluorouracil 500 mg/m² semanais por seis semanas
² quimioterapia: 5-fluorouracil (425 mg/m²) + leucovorin 20 mg/m² (três vezes no início e três vezes no fim da radioterapia)
radioterapia: 5040 cGy em oito semanas

anátomo-patológica convencional, dados do intra-operatório e os relativos ao seguimento pós-operatório.

Para a realização da CD, um bloco de parafina contendo um fragmento representativo do tumor foi selecionado pelo patologista encarregado da avaliação anátomo-patológica convencional. A partir deste bloco obtiveram-se cortes histológicos de cinco micras de espessura, os quais foram submetidos à coloração pelo método de Feulgen para ácidos nucléicos. Nesta reação, o corante (reativo de Schiff) liga-se de forma estequiométrica ao DNA constituinte dos cromossomos e presente no núcleo celular, de forma que, para o corte histológico em análise, a quantidade de corante é proporcional ao conteúdo celular de DNA. O corte histológico é então submetido à análise por microscopia óptica. A densidade óptica, que reflete a coloração de um núcleo celular pelo método descrito em relação ao seu tamanho, foi empregada como variável a ser digitalmente analisada pelo sistema. Ao microscópio, encontra-se acoplada uma mini-câmera de vídeo colorida CCD (*charge-coupled device*) de alta resolução. A câmera, por sua vez, encontra-se em comunicação com microcomputador no qual está instalada placa digitalizadora de imagem. O sistema acima descrito possibilita a digitalização e transferência das imagens obtidas pela câmera de vídeo a uma estação de

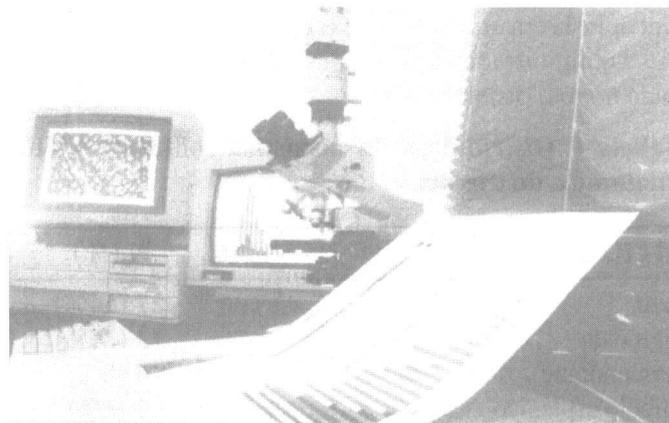


Figura 1 - Sistema utilizado para a citometria digital de DNA.

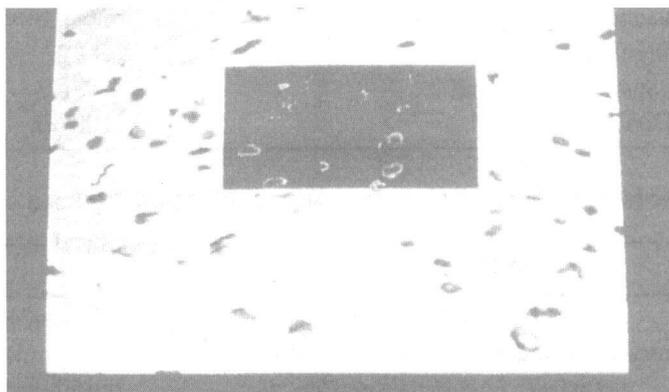


Figura 2 - Seleção da área para exame na imagem digitalizada a partir da microscopia óptica.

trabalho informatizada onde é possível selecionar os núcleos celulares dos quais se deseja conhecer a densidade óptica (figuras 1 e 2).

Objetivando determinar a densidade óptica para a população de células controle (sabidamente diplóide), são selecionados pelo patologista leucócitos ou células estromais do mesmo tecido. A seguir, é escolhido número variável de núcleos de células tumorais para os quais é medida a densidade óptica e comparada à da população controle. Os dados obtidos pela CD são expressos na forma de um histograma de DNA onde figuram as populações em análise (tumoral e controle). A análise do histograma e do índice de DNA (iDNA) para a população de células neoplásicas estudada na amostra resulta na classificação do câncer quanto à ploidia do DNA (diplóide ou aneuplóide). Nesse estudo, população de células aneuplóides tumorais somente era considerada quando dois picos distintos G0/G1 eram identificados de forma evidente. Populações de células neoplásicas cujo iDNA era inferior a 0,8 ou superior a 1,2 foram classificadas como aneuplóides. A estimativa da AP tumoral foi realizada por um índice determinado a partir do seguinte quociente:

$$AP = \frac{Sp_{(Mc + Sc)}}{Ne \times 100}$$

onde :

$Sp_{(Mc + Sc)}$ = soma das frequências das células neoplásicas observadas cujas intensidades tonais superam o valor da soma $Mc + Sc$;

Mc = média das intensidades tonais das células controle;

Sc = desvio-padrão das intensidades tonais das células controle;

Ne = número de núcleos de células neoplásicas observado.

Todos os doentes foram prospectivamente avaliados a intervalos médios de três meses durante o primeiro ano após o tratamento cirúrgico, e a cada seis meses a partir do segundo ano e até o momento da realização do presente estudo. Para os doentes submetidos a ressecções curativas, a ocorrência de recidiva local ou a distância foi avaliada de forma padronizada, através da monitorização dos níveis séricos do CEA (antígeno cárcino-embriogênico), exame proctológico completo e avaliações radiológicas (tomografia computadorizada e ultrassonografia) e colonoscópica anuais.

O seguimento variou entre dois e 70 meses com duração média de 43,4 meses. Onze (22%) doentes tiveram seguimento mínimo de cinco anos.

Para verificar se houve correlação entre as variáveis clínicas e anátomo-patológicas estudadas e os resultados da CD, foram realizados o teste de Fisher e o teste do Qui-quadrado. O teste t de Student foi empregado para verificar se houve diferença entre as médias de duração do

seguimento pós-operatório, entre os grupos diplóide e aneuplóide (comparação entre duas variáveis numéricas simples). A influência das características clínico-patológicas estudadas na sobrevida global e livre de doença foi testada por meio da análise univariada (teste de Wilcoxon¹⁹). Para conhecer as variáveis relacionadas à sobrevida de forma independente, foi realizada análise multivariada através de regressão logística, utilizando o modelo de riscos proporcionais de Cox⁹. As estimativas de sobrevida para os grupos diplóide e não-diplóide foram realizadas seguindo o modelo “produto-limite” conforme proposto por Kaplan e Meier²⁸. Significância estatística foi definida para valor de p inferior a 0,050. Para a realização dos cálculos e métodos estatísticos, foram empregados os programas Lifetest e PHREG do pacote estatístico SAS^{2,50} —SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

RESULTADOS

A maioria (72%) dos adenocarcinomas estudados foi do tipo tubular. Tumores do tipo túbulo-vilosos ocorreram em oito (16%) casos; do tipo túbulo-papilífero, em três (6%). Em três (6%) casos, o exame anátomo-patológico revelou tratar-se de adenocarcinoma mucinoso.

Na medida em que a determinação do grau de diferenciação celular em adenocarcinomas mucinosos pode ser difícil³⁵, ela foi obtida somente para os 47 (94%) doentes portadores de tumores não-mucinosos (Tabela 9). Desta forma, adenocarcinomas bem-diferenciados ocorreram em 34 (68%) dos casos. Tumores moderadamente diferenciados ocorreram em 13 (26%) casos.

Tumores com margem invasora do tipo expansiva figuraram como maioria, ocorrendo em 43 (86%) casos. Neoplasias do tipo infiltrativa ocorreram em seis (12%) casos. No caso de um (2%) doente com tumor localizado no reto e submetido a quimioirradiação pré-operatória neoadjuvante, o exame anátomo-patológico identificou regressão parcial da lesão, classificando-a como ulcerada e residual, não sendo possível o seu enquadramento nas categorias mencionadas. Para este caso, empregou-se a denominação “residual”.

No que se refere ao acometimento linfonodal por células neoplásicas, o número médio de linfonodos dissecados, para a presente casuística, foi de 20,9 com desvio-padrão de 14,4. O número de linfonodos dissecados por peça cirúrgica variou entre quatro e 70. Metástases linfonodais, conforme determinadas pelo exame anátomo-patológico, foram verificadas em 15 (30%) doentes.

A distribuição dos tumores conforme a classificação proposta por Dukes e modificada por Turnbull³⁴ encontra-se disposta na Tabela 4.

Tabela 4. Distribuição dos tumores segundo a classificação de Dukes modificada⁵⁴.

ESTÁGIO (DUKES)	N(%)
A	11 (22%)
B	23 (46%)
C	13 (26%)
D	3 (6%)
TOTAL	50 (100%)

No que se refere à classificação de Jass, em 24 (48%) casos, o tumor foi classificado como estágio I; em 14 (28%), estágio II; oito (16%) casos no estágio III e quatro (8%), no estágio IV.

Foi possível determinar o conteúdo celular de DNA, bem como a AP em todos os casos. Com relação ao conteúdo celular de DNA, em 16 (32%) casos os tumores foram classificados como diplóides e em 34 (68%), como aneuplóides —para os quais foram diagnosticadas uma ou mais populações celulares com conteúdo anormal de DNA.

No que se refere à AP, esta variou entre 6,2% e 18% (percentil 25= 10%; percentil 75=15%) com média de 12,34%. Estabelecendo como valor arbitrário o do percentil

Tabela 5. Caracterização das recidivas em 47 doentes.

RECIDIVA	N (%)
AUSENTE	34 (72,3%)
PRESENTE	13 (27,7%)
LOCAL	2 (4,3%)
A DISTÂNCIA	11 (23,4%)
hepática	7 (14,9%)
hepática e pulmonar	2 (4,3%)
carcinomatose	2 (4,3%)
TOTAL	47 (100%)

75 da distribuição, os tumores foram classificados em de baixa AP até 15% e de alta AP quando superior a 15%. Desta forma, em 40 (80%) casos, os tumores apresentaram baixa AP e, em 10 (20%) doentes, foram encontrados tumores de alta AP.

A duração média do seguimento para os doentes com tumores diplóides foi de 43,7 ± 19 meses e para o grupo de tumores aneuplóides foi de 43,6 ± 17,3 meses. O teste t de Student demonstrou que não houve diferença estatística-

Tabela 6. Correlação entre as características clínicas estudadas e a ploidia do DNA.

	Número de casos	PLOIDIA	
		diplóide	aneuplóide
Sexo			
masculino	23 (100%)	8 (34,8%)	15 (65,2%)
feminino	27 (100%)	8 (29,6%)	19 (70,4%)
p= 0,767			
Idade			
< 65a	32 (100%)	10 (31,2%)	22 (68,8%)
> ou = 65a	18 (100%)	6 (33,3%)	12 (66,7%)
p= 1,000			
Sítio anatômico			
reto	27 (100%)	9 (33,3%)	18 (66,7%)
cólon esquerdo	19 (100%)	6 (31,6%)	13 (68,4%)
cólon direito	4 (100%)	1 (25%)	3 (75%)
p= 0,945			
Sítio anatômico			
reto superior	12 (100%)	2 (16,7%)	10 (83,3%)
reto médio	10 (100%)	5 (50%)	5 (50%)
reto inferior	5 (100%)	2 (40%)	3 (60%)
p = 0,241			

mente significativa entre os grupos diplóide e aneuplóide ($p=0,96$).

A ocorrência de recidiva neoplásica foi avaliada para o conjunto de pacientes que foram submetidos a operações curativas ($N=47$). Ocorreu em 13 (27,7%) doentes, tendo sido localizada em 2(4,3%) casos e à distância em 11 (23,4%). conforme relacionada na Tabela 5.

Não houve relação estatisticamente significativa entre o conteúdo celular de DNA e as características clínicas estudadas (sexo, idade e sítio anatômico do tumor) — Tabela 6.

Como pode ser observado na Tabela 7, não houve relação estatisticamente significativa entre a ploidia do DNA tumoral e os dados advindos do exame anátomo-patológico.

Os resultados da correlação entre os dados clínico-patológicos e a AP tumoral estão relacionados na Tabela 8 e, analogamente ao que ocorreu para a ploidia do DNA tumoral, não houve correlação estatisticamente significativa.

Do total de 16 tumores diplóides, 14 (87,5%) apresentaram baixa AP. Do total de 34 tumores aneuplóides, 26

Tabela 7. Correlação entre as variáveis anátomo-patológicas estudadas e a ploidia do DNA tumoral.

	Número de casos	PLOIDIA	
		diplóide	aneuplóide
Tipo histológico			
tubular	36 (100%)	12 (33,3%)	24 (66,7%)
túbulo-viloso	8 (100%)	2 (25%)	6 (75%)
túbulo-papilífero	3 (100%)	0 (0%)	3 (100%)
mucinoso	3 (100%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)
$p= 0,351$			
Grau de diferenciação tubular			
bem diferenc.	34 (100%)	12 (35,3%)	22 (64,7%)
moder. dif.	13 (100%)	2 (15,4%)	11 (84,6%)
(mucinoso)	3 (100%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)
$p= 0,176$			
Margem invasora			
expansiva	43 (100%)	13 (30,3%)	30 (69,8%)
infiltrativa	6 (100%)	3 (50%)	3 (50%)
residual	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)
$p= 0,490$			
Acometimento linfonodal			
ausente	35 (100%)	13 (37,1%)	22 (62,9%)
presente	15 (100%)	3 (20%)	12 (80%)
$p = 0,328$			
Estadiamento segundo Dukes			
A	11 (100%)	4 (36,4%)	7 (63,6%)
B	23 (100%)	9 (39,1%)	14 (60,9%)
C	13 (100%)	3 (23,1%)	10 (76,9%)
D	3 (100%)	0 (0%)	3 (100%)
$p= 0,472$			
Estadiamento segundo Jass			
I	24 (100%)	9 (37,5%)	15 (62,5%)
II	14 (100%)	3 (21,4%)	11 (78,6%)
III	8 (100%)	4 (50%)	4 (50%)
IV	4 (100%)	0 (0%)	4 (100%)
$p= 0,248$			

Tabela 8. Correlação entre as variáveis clínicas e AP.

	Número de casos	ATIVIDADE PROLIFERATIVA	
		baixa (até 15%)	alta (> 15%)
Sexo			
masculino	23 (100%)	20 (87%)	3 (13%)
feminino	27 (100%)	20 (74,1%)	7 (25,9%)
p= 0,308			
Idade			
< 65a	32 (100%)	23 (71,9%)	9 (28,1%)
= ou > 65a	18 (100%)	17 (94,4%)	1 (5,6%)
p= 0,070			
Sítio anatómico			
reto	27 (100%)	22 (81,5%)	5 (18,5%)
cólon esquerdo	19 (100%)	15 (78,9%)	4 (21,1%)
cólon direito	4 (100%)	3 (75%)	1 (25%)
p= 0,945			
Sítio anatómico			
reto superior	12 (100%)	3 (25%)	9 (75%)
reto médio	10 (100%)	2 (20%)	8 (80%)
reto inferior	5 (100%)	0 (0%)	5 (100%)
p = 0,476			
Tipo histológico			
tubular	36 (100%)	29 (80,6%)	7 (19,4%)
túbulo-viloso	8 (100%)	8 (100%)	0 (0%)
túbulo-papilífero	3 (100%)	1 (33,3%)	2 (66,7%)
mucinoso	3 (100%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)
p= 0,093			
Grau dif. tubular			
bem diferenc.	34 (100%)	26 (76,5%)	8 (23,5%)
moder. dif.	13 (100%)	12 (92,3%)	1 (7,7%)
indif. (mucinoso)	3 (100%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)
p= 0,401			
Margem invasora			
expansivo	43 (100%)	34 (79,1%)	9 (20,9%)
infiltrativo	6 (100%)	5 (83,3%)	1 (16,7%)
residual	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)
p= 0,854			
Acometimento linfonodal			
ausente	35 (100%)	29 (82,9%)	6 (17,1%)
presente	15 (100%)	11 (73,3%)	4 (26,7%)
p =0,328			
Estadiamento segundo Dukes			
A	11 (100%)	9 (81,8%)	2 (18,2%)
B	23 (100%)	19 (82,6%)	4 (17,4%)
C	13 (100%)	9 (69,2%)	4 (30,8%)
D	3 (100%)	3 (100%)	0 (100%)
p= 0,612			

Tabela 8 (continuação). Correlação entre as variáveis anátomo-patológicas e AP.

	Número de casos	ATIVIDADE PROLIFERATIVA	
		baixa (até 15%)	alta (> 15%)
Estadiamento segundo Jass			
I	24 (100%)	22 (91,7%)	2 (8,3%)
II	14 (100%)	10 (71,4%)	4 (28,6%)
III	8 (100%)	5 (62,5%)	3 (37,5%)
IV	4 (100%)	3 (75%)	1 (25%)
p= 0,233			

(76,4%) mostraram baixa AP. Não houve diferença estatisticamente significativa entre estas proporções, conforme indicou o teste exato de Fisher (p=0,468). Este resultado indica que os tumores com conteúdo celular de DNA aneuplóide possuem semelhante fração de células em proliferação quando comparados com tumores diplóides.

Tabela 9. Resultados da análise univariada (teste de Wilcoxon) da sobrevida global.

VARIÁVEL	p
idade	0,017
sexo	0,388
sítio anatômico do tumor	0,086
tipo histológico	0,929
grau de diferenciação tubular	0,694
margem invasora	0,250
acometimento linfonodal	0,068
Dukes	0,136
Jass	0,080
ploidia do DNA tumoral	0,540
atividade proliferativa tumoral	0,502

Tabela 10. Resultados da análise univariada (teste de Wilcoxon) da sobrevida livre de doença.

VARIÁVEL	p
idade	0,201
sexo	0,693
sítio anatômico do tumor	0,098
tipo histológico	0,729
grau de diferenciação tubular	0,835
margem invasora	0,531
acometimento linfonodal	0,745
DUKES	0,569
JASS	0,038
ploidia do DNA tumoral	0,704
atividade proliferativa tumoral	0,372

Os resultados da análise univariada para a sobrevida global realizada para as onze variáveis potencialmente relacionadas ao prognóstico consta da Tabela 9. A única variável significativa foi a idade (p=0,017) do doente por ocasião do diagnóstico. O sítio anatômico do tumor (p=0,086), a presença de metástases linfonodais (p=0,068) e o estadiamento segundo Jass (p=0,080) influenciaram a sobrevida global para a casuística, entretanto sem significância estatística. Não foi possível demonstrar diferença significativa na sobrevida global com relação à ploidia do DNA e à AP.

Os resultados da análise univariada para a sobrevida livre de doença realizada para as onze variáveis potencialmente relacionadas ao prognóstico consta da Tabela 10. A única variável significativa foi o estadiamento do tumor conforme proposto por Jass (p=0,038).

A curva de sobrevida global (Kaplan-Meier) conforme o conteúdo celular de DNA está representada na figura 3.

A curva de sobrevida livre de doença (Kaplan-Meier) conforme o estadiamento (Jass) está representada na figura 4.

Para a análise multivariada da sobrevida global (Tabela 11), foram consideradas as seguintes variáveis: idade, sítio anatômico, grau de diferenciação tubular, estadiamento segundo Jass, ploidia do DNA tumoral e AP tumoral. As variáveis sexo, tipo histológico e estadiamento segundo Dukes foram excluídas devido à fraca correlação com a

Tabela 11. Resultados da análise multivariada (Cox) para a sobrevida global.

VARIÁVEL	p	Risco relativo
idade	0,098	3,693
sítio anatômico	0,330	1,596
grau de diferenciação tubular	0,675	1,350
Jass	0,227	1,611
ploidia do DNA tumoral	0,528	0,578
atividade proliferativa tumoral	0,772	0,715

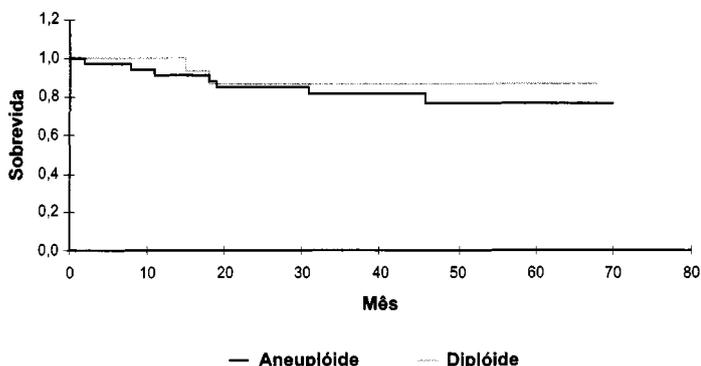


Figura 3 - Curva de sobrevida global conforme o conteúdo celular de DNA ($p=0,540$).

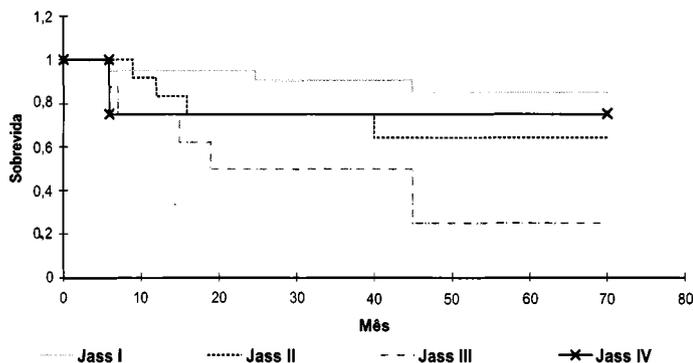


Figura 4 - Curva de sobrevida livre de doença conforme o estadiamento segundo Jass ($p=0,038$).

sobrevida global conforme se observa na Tabela 9. As variáveis margem invasora e acometimento linfonodal foram excluídas devido ao fato de serem determinantes do estadiamento de acordo com Jass.

Observa-se que nenhuma das variáveis listadas na Tabela 11, correlacionou-se de forma significativa à sobrevida global no presente estudo. A idade do doente por ocasião do diagnóstico revelou-se como a variável de maior tendência a esta correlação ($p=0,098$).

Para a análise multivariada da sobrevida livre de doença (Tabela 12), foram consideradas as seguintes variáveis: sítio anatômico, grau de diferenciação tubular, estadiamento segundo Jass, ploidia do DNA tumoral e atividade proliferativa tumoral.

Da mesma forma que para a análise univariada, a variável estadiamento, segundo Jass, para a presente casuística,

Tabela 12. Resultados da análise multivariada (COX) para a sobrevida livre de doença.

VARIÁVEL	p	Risco relativo
sítio anatômico	0.134	1.770
grau de diferenciação tubular	0.418	1.622
Jass	0.073	1.811
ploidia do DNA tumoral	0.436	1.581
atividade proliferativa tumoral	0.549	1.491

revelou-se como aquela mais fortemente correlacionada ao prognóstico ($p=0,07$). As demais variáveis não demonstraram valor prognóstico independente no que se refere à estimativa da sobrevida livre de doença no presente estudo.

DISCUSSÃO

Há enorme interesse na descoberta de novas variáveis capazes de inferir sobre o prognóstico de doentes com câncer colorretal. Amplia-se a busca pelo aperfeiçoamento das técnicas de diagnóstico e estadiamento pré-operatórios devido à possibilidade de beneficiar doentes por meio de tratamento incruento, até recentemente impensada, bem como devido à alternativa para adjuvância pós-operatória. Urge, portanto, a necessidade de se dispor de instrumentos capazes de identificar subgrupo de doentes com prognóstico diferenciado que se encontra ainda inaparente, mais provavelmente oculto em meio ao contingente de doentes cujo tumor invade de forma completa a parede intestinal, mas sem infiltrar os linfonodos.

Grande número de estudos na literatura, com início há mais de 15 anos⁵⁷, ocuparam-se de estudar a correlação entre o conteúdo celular de DNA (ploidia) dos adenocarcinomas colorretais e o prognóstico. De fato, a ploidia do DNA, associada ou não à medida da AP, representaria variável objetiva, pois constituiria medida de fácil obtenção e reprodução, bem como de reduzida variabilidade inter-observador quando comparada ao grau de diferenciação, como exemplo⁵⁶. O estadiamento anátomo-patológico dos carcinomas colorretais, em que pese constituir a variável isolada de mais forte correlação com o prognóstico, apresenta limitações que resultam das diversas classificações utilizadas por diferentes instituições o que pode acarretar confusão e dificuldade na reprodução dos resultados¹¹ bem como da necessidade de efetivamente operar os doentes para obtê-lo.

Diante da inexistência de estudos similares em nosso meio, em junho de 1991, optou-se por iniciar este estudo prospectivo, utilizando a metodologia da CD a fim de determinar o valor prognóstico da ploidia do DNA e da AP tumoral e compará-lo com o das variáveis clínico-patológicas convencionais obtidas para a mesma casuística.

A determinação do conteúdo celular de DNA empregando-se a CD tem como maior vantagem, em relação às técnicas de citometria de fluxo (CF), a possibilidade de o examinador selecionar e avaliar exclusivamente núcleos de células tumorais. Este expediente permite reduzir a contaminação por restos celulares bem como por células não-neoplásicas resultando em maior especificidade. A equivalência com a CF no diagnóstico da aneuploidia está bem documentada por vários autores^{13,17}. Ainda que a

análise do conteúdo celular de DNA a partir de tecido fixado possa resultar em histogramas de inferior qualidade¹⁰, nesta série, foi possível obter os dados relativos à ploidia do DNA e à AP nos 50 casos da amostra, sem elevar o custo da metodologia por força da análise de múltiplas amostras

A ocorrência de aneuploidia em adenocarcinomas colorretais varia entre 39,4%⁵⁷ e 92,5%¹³. Na presente casuística, foi possível identificar uma ou mais populações aneuplóides em 34 casos, resultando em frequência de 68%, o que está em conformidade com os dados da literatura para os estudos onde foi analisada apenas uma amostra^{5,29,48} ou mesmo para os que empregaram mais de uma amostra^{16,27,31,33}. A determinação da AP tumoral representa um importante esforço no objetivo de identificar outra variável de valor prognóstico relacionada ao CCR, com perspectivas de ser empregada de forma isolada⁵ ou associadamente ao conteúdo celular de DNA^{3,40}. O valor médio da AP dos adenocarcinomas colorretais pode variar entre 13%⁵² e 27%²⁴. Para a casuística analisada, o valor de 12,34% para a AP média também foi comparável ao determinado por Meyer e Prioleau³⁴, de 17%, que foi obtido através da técnica de autorradiografias após a incorporação da timidina tritiada. Na medida em que a determinação da AP por meio da CD é uma estimativa calculada tendo por base a "curva" originada no histograma, a inferência sobre o prognóstico baseada em categorias dos valores assumidos pela AP é de difícil realização. Como resultado, ainda não está definido o número de categorias nas quais a amostra deve ser estratificada, tampouco os valores da AP que definem estas categorias.

Com relação às características clínicas estudadas, não se demonstrou correlação entre a ploidia e o sexo conforme os resultados da maioria das experiências na literatura e em oposição aos de Kouri e cols.³¹, onde se verificou associação entre conteúdo celular de DNA diplóide e o sexo feminino.

No que se refere à idade, não houve influência sobre a ocorrência de aneuploidia, tendo sido verificado que tumores aneuplóides representaram a maioria dos tumores analisados nesta casuística tanto entre os doentes com menos ou mais de 65 anos de idade semelhante ao observado por outros autores^{1,3,6,12,13,14,16,18,22,30,38,44,48,51,53}. O pior prognóstico associado à ocorrência do CCR em doentes jovens, ao que tudo indica, não resulta da maior frequência de tumores aneuplóides mas provavelmente do estadiamento avançado por ocasião do diagnóstico conforme encontrado por Shahrudin e Noori⁴⁵. Os resultados obtidos por Simstein e cols.⁴⁹, Safford e cols.⁴³, e Odone e cols.³⁷ vêm confirmar esta hipótese na medida em que não é identificado prejuízo na sobrevida de grupos de doentes jovens com

CCR, uma vez que haja sido corrigido o estadiamento anátomo-patológico.

Ainda não é possível definir se há associação entre a ploidia e a localização do tumor, uma vez que os resultados são amplamente variáveis, talvez devido à fraca intensidade desta associação (se existente) ou em razão de diferenças metodológicas entre os estudos, a saber, a composição das categorias de localização do tumor comparadas em cada caso.

Neste estudo, em três casos, os tumores revelaram-se do tipo mucinoso e foram diagnosticados em indivíduos com 50, 68 e 76 anos de idade, respectivamente no reto, no cólon direito e no cólon esquerdo. Dois destes tumores tinham conteúdo celular de DNA diplóide o que, apesar do pequeno número de casos, pode estar em conformidade com os resultados de outros autores³⁷ que encontraram exatamente a mesma frequência de euploidia em tumores mucinosos. De acordo com estes resultados, pode-se concluir que, a despeito da necessidade de avaliação de maior número de casos, analogamente ao que ocorre para a presença de mucina no CCR⁴¹, o pior prognóstico associado a estes tumores^{39,46} não pode ser explicado por conteúdo celular de DNA anormal.

No que se refere ao grau de diferenciação tubular, não houve correlação estatisticamente significativa entre este e o conteúdo celular de DNA, uma vez que a frequência da aneuploidia revelou-se semelhante entre tumores bem diferenciados (64,7%) e entre tumores moderadamente diferenciados (84,6%) conforme os resultados da maioria dos estudos^{1,3,6,8,16,18,22,33,27,48,51,53,57,59}.

Com relação à margem invasora ou padrão de crescimento, a maioria dos tumores (86%) apresentou-se com margem do tipo expansiva, sendo a ocorrência de aneuploidia maior para este grupo (69,8%) em relação aos de margem infiltrativa (50%). Entretanto este achado não alcançou significância estatística ($p=0,490$). Embora o número de tumores com margem infiltrativa tenha sido pequeno, é possível concluir que, conforme já demonstrado por outros^{13,16}, as características da margem invasora parecem não resultar do conteúdo de DNA.

Não foi possível demonstrar associação entre a presença de metástases linfonodais e o conteúdo celular de DNA. Estes resultados confirmam os achados de Fisher e cols.¹⁸, Kouri e cols.³¹, Tsuchiya e cols.⁵³, Bianchi e cols.⁹ e Pietra e cols.³⁸

No presente estudo, não se demonstrou correlação entre os estágios conforme definidos por Dukes ou Jass e o conteúdo celular de DNA. Deste modo, a aneuploidia parece distribuir-se em igual frequência no adenocarcinoma do intestino grosso de forma independente do estadiamento anátomo-patológico. Ao assumir que não existe significati-

va correlação entre as duas variáveis, parece correto admitir que a aneuploidia ocorre precocemente durante a carcinogênese^{20,23}, de forma independente do estadiamento e, se confirmada como variável prognóstica independente no CCR, sua determinação seria de significativa utilidade no tratamento do CCR, especialmente para os tumores não-avanzados e para os quais não houve disseminação linfonodal.

Não foi demonstrada correlação estatisticamente significativa entre a AP tumoral e as variáveis clínicas ou anátomo-patológicas convencionais estudadas. Como resultado da dificuldade e significativa variabilidade associada às estimativas sobre a AP por citometria de DNA, são poucos os estudos na literatura acerca das correlações entre a AP e as variáveis convencionais, como são raras as experiências com a estimativa da AP através de técnicas de citometria estática^{1,31}.

Com relação ao valor prognóstico das variáveis estudadas, somente a idade por ocasião do diagnóstico foi capaz de influenciar a sobrevida global, conforme determinada pela análise univariada. O acometimento linfonodal, estadiamento segundo Jass e o sítio anatômico apresentaram evidências de associação com a sobrevida global; entretanto, não alcançaram significância estatística. E não foi possível no presente estudo apontar variável correlacionada de forma independente à sobrevida global. Ao contrário do encontrado por Roncucci e cols.⁴², o significado prognóstico da idade não foi verificado quando do emprego da análise multivariada indicando que, conforme se poderia esperar, esta variável parece não relacionada ao prognóstico do CCR de forma independente. Quando se observam os resultados referentes à sobrevida livre de doença, pode-se notar que a única variável que obteve significância estatística foi o estadiamento segundo Jass. O presente estudo, ao identificar o estadiamento segundo Jass como a variável mais importante relacionada ao prognóstico, traz importante contribuição aos ensaios que objetivam aprimorar os atuais sistemas de estadiamento do CCR. Neste estudo, a relativamente curta duração do seguimento, que foi em média de 43,4 meses, pode estar associada à falta de significância estatística na influência sobre o prognóstico atribuída a variáveis como acometimento linfonodal e estadiamento segundo Dukes.

Por razões semelhantes àquelas da maioria dos ensaios clínicos citados neste trabalho, não foi possível determinar o tamanho da amostra na fase de planejamento conforme desejável uma vez que o fator limitante para a casuística foi a disponibilidade de realização da citometria digital de DNA. Assim, há que se atentar para a possibilidade de a falta de significado prognóstico atribuível a variáveis tais como acometimento linfonodal e estadiamento

segundo Dukes constituir consequência de uma amostra insuficiente.

O valor prognóstico da ploidia do DNA e da AP tumoral no CCR permanece incerto. Com relação às dúvidas conceituais, permanece indefinido se o conteúdo celular anormal de DNA no CCR é uma alteração que ocorre precocemente durante a carcinogênese^{20,25} ou se é apenas um marcador cronológico e, portanto, concomitante à evolução da neoplasia^{22,27,33} conforme se pode depreender das evidências de possível associação entre a aneuploidia e estágios avançados da doença e da menor ocorrência de aneuploidia nos tumores de localização no reto após irradiação. Possivelmente, a resposta dependerá da análise de maior número de adenomas com displasia moderada ou intensa e de tumores precoces bem como dos resultados da avaliação por citometria de DNA das lesões não-polipóides. Na medida em que a detecção da aneuploidia por citometria indica uma deterioração grosseira no material genético incomparavelmente superior à produzida por uma mutação cromossômica, há que se perguntar sobre a real possibilidade desta anormalidade influenciar o comportamento biológico das células constituintes do CCR em um determinado hospedeiro e como comparar o potencial dessa variável para influenciar o prognóstico com o das mutações genéticas que ora vêm sendo estudadas.

As dúvidas metodológicas resultam fundamentalmente de diferentes técnicas utilizadas para a citometria de DNA. Mais importante do que a análise rotineira de múltiplas amostras, a comparação dos resultados deve incluir estudos onde o mesmo número de amostras de tecido foi utilizado. Uma vez que a CD ou, mais genericamente, a análise de imagens, ainda que mais trabalhosa, permite aumentar a especificidade da determinação do conteúdo celular de DNA, a investigação de um maior número de doentes por esta técnica pode contribuir para maiores esclarecimentos. Não obstante a metodologia de análise multivariada permita a identificação de variáveis correlacionadas de forma independente ao prognóstico, muitas casuísticas envolvendo menor número de doentes e que, por este motivo, não puderam ser estratificadas, podem ter originado conclusões incertas sobre o valor prognóstico do conteúdo celular de DNA^{4,6,16,17}. Assim, quando da comparação dos resultados, seria desejável dispor de grupos similares no que se refere a variáveis tais como localização do tumor, grau de diferenciação celular e estadiamento. Na medida em que a constituição desse tipo de amostra pode ser de difícil execução em ensaios clínicos, a metodologia de revisões sistemáticas (ou meta-análise) pode representar opção atraente para a reavaliação da significativa quantidade de dados já disponíveis na literatura há mais de quinze anos.

CONCLUSÕES

O emprego da CD para 50 doentes submetidos a tratamento do CCR, após seguimento médio de 43,4 meses, possibilitou as seguintes conclusões:

1. Houve sucesso na determinação do conteúdo celular de DNA por citometria digital, demonstrado pela determinação da ploidia e da atividade proliferativa tumoral em todos os casos, resultando em frequência da aneuploidia de 68%;

2. O estadiamento anátomo-patológico conforme JASS foi a variável de maior correlação com o prognóstico, validando a presente casuística para a estimativa do valor prognóstico associado ao conteúdo celular de DNA ou à atividade proliferativa tumoral.

3. Não foi possível demonstrar correlação entre a ploidia do DNA tumoral e o prognóstico, tampouco entre este e a atividade proliferativa tumoral, conforme determinadas pela citometria digital de DNA.

4. Não houve evidência de associação entre as variáveis oriundas da citometria digital de DNA e as variáveis clínico-patológicas convencionais estudadas, a saber: sexo, idade, localização do tumor, tipo histológico, grau de diferenciação, margem invasora, acometimento linfonodal e estadiamento segundo DUKES e JASS.

SUMMARY: The present study was designed to accomplish the results and prognostic value of tumor cell DNA content (ploidy) and proliferative activity (PA) in colorectal cancer (CRC) through comparison to conventional clinico-pathological variables. Fifty patients who underwent surgical treatment for CRC were prospectively studied. The clinico-pathological criteria studied were: sex, age at diagnosis, anatomic site of the tumor, histologic type, grade of differentiation, invasive margin, presence of lymph node metastasis and pathologic staging according to Dukes and Jass. In all cases, tumor ploidy and PA index were measured. Aneuploidy was observed in 68% of the cases and mean proliferative activity index was 12.34%. Uni and multivariate analysis were used to determine prognostic correlation. It is concluded that image DNA analysis is valuable for measuring tumor cell DNA content and PA in colorectal cancer. DNA ploidy pattern and proliferative activity index did not correlate with other variables and showed no prognostic correlation in this study. Technical variability associated to DNA analysis may play major role in observed inconsistent results. Establishment of standards for DNA content and cell cycle analysis is required to obtain more precise data regarding prognostic value of ploidy and PA in CRC.

KEY WORDS: Colonic neoplasms, DNA, Ploidies, Treatment Outcome, Flow cytometry.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albe X, Vassilakos P, Helfer-Guanori K, Givel JC, Dequay N, Suardet L, Eliason JF, Odartchenko N. Independent prognostic value of ploidy in colorectal cancer. A prospective study using image cytometry. *Cancer* 1990; 66: 1168-75.
- Allison PD. Survival analysis using the SAS System: a practical guide. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1995.
- Armitage NCM, Ballantyne KC, Sheffield JP, Clarke P, Evans DF, Hardcastle JD. A prospective evaluation of the effect of tumor cell DNA content on recurrence in colorectal cancer. *Cancer* 1991; 67: 2599-604.
- Banner BF, Tomas-De La Veja JE, Roseman DL, Coon JS. Should flow cytometric DNA analysis precede definite surgery for colon carcinoma? *Ann Surg* 1985; 202: 740-4.
- Bauer K, Lincoln S, Vera-Roman J, Wallemark CB, Chmiel JS, Madurski ML, Murad T, Scarpelli DG. Prognostic implications of proliferative activity and DNA aneuploidy in colonic adenocarcinomas. *Lab Invest* 1987; 57: 329-35.
- Bianchi A, Mallofre C, Serrano A, Suñol J, Barja J, Ubach M. Estudio del DNA como fator pronóstico en câncer cólo-rectal. Análisis retrospectivo de 34 pacientes. *Ver Esp Enf Dig* 1993; 84: 100-4.
- Brasil. Ministério da Saúde - Instituto Nacional do Câncer / PRO-ONCO. Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil, 1998. Rio de Janeiro, 1998.
- Chapman MAS, Hardcastle JD, Armitage NCM. Five year prospective study of DNA tumor ploidy and colorectal cancer survival. *Cancer* 1995; 76: 383-6.
- Cox D. Regression models and life tables. *J R Stat Soc* 1972; 32: 187-220, 1972.
- Crissman JD, Zarbo RJ, Ma CK, Visscher DW. Histopathologic parameters and DNA analysis in colorectal adenocarcinomas. *Pathol Annu* 1989; 24: 103-47.
- Deans GT, Parks TG, Rowlands BJ, Spence ARJ. Prognostic factors in colorectal cancer. *Br J Surg* 1972; 79: 308-13.
- Deans GT, Williamson K, Hamilton P, Heatley M, Patterson CC, Rowlands BJ, Parks TG, Spence RAJ. DNA densitometry of colorectal cancer. *Gut* 1993; 34: 1566-71.
- Deans GT, Williamson K, Heatley M, Hamilton P, Arthurs K, Crookard A. The role of flow cytometry in carcinoma of the colon and rectum. *Surg Gynecol Obstet* 1993; 177: 377-82.
- Díaz-Aguirregoitia FJ, García-Alonso Montoya I, Iturburu Belmonte I, Portugal Porras V, Alonso Varona A, Echevarría García-Sanfrechoso A, Méndez-Martin J. Valor pronóstico del ADN nuclear de 106 tumores colorrectales, medido por microespectrofotometría. *Rev Esp Enf Dig* 1993; 83: 421-8.
- Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol* 1932; 35: 323-32.
- Emdin S, Stenlins R, Goran R. Prognostic value of DNA in colorectal carcinoma. A flow cytometric study with some methodological aspects. *Cancer* 1987; 60: 1282-7.
- Fausel RE, Burleigh W, Kaminsky DB. DNA quantification in colorectal carcinoma using flow and image analysis cytometry. *Ann Quant Cytol Histol* 1990; 12: 21-7.
- Fisher E, Sideritis RH, Sass R, Fisher B. Value of assessment of ploidy in rectal cancers. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 525-8.
- Gehan EA. A generalized Wilcoxon test for comparing arbitrarily singly-censored samples. *Biometrika* 1965; 52: 15-21.
- Goh HS, Jass JR. DNA content and the adenoma-carcinoma sequence in colorectum. *J Clin Pathol* 1986; 39: 387-92.
- Habr-Gama A, De Souza PM, Ribeiro U Jr, Nadalin W, Gansl R, Sousa Jr AHS. Low rectal cancer: impact of radiation and chemotherapy on surgical treatment. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 1087-96.
- Halvorsen TB, Johannesen E. DNA ploidy, tumour site and prognosis in colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* 1990; 25: 141-8.
- Hamada S, Itoh R, Fujita S. DNA distribution pattern of the so-called

- severe displasias and small carcinomas of the colon and rectum and its possible significance in the tumor progression. *Cancer* 1988; 61: 1555-62.
24. Hammarberg C, Tribukait B, Ohman U. Early effects of preoperative irradiation upon the cell cycle composition in rectal adenocarcinomas. A flow cytometric DNA investigation. *Acta Radiologica Oncology* 1986; 25: 45-50.
25. Jass JR, Atkin WS, Cuzick J, Bussey HJR, Morson B, Northover JMA, Todd IP. The grading of rectal cancer: Historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases. *Histopathology* 1986; 10: 437-59.
26. Jass JR, Love S, Northover J. A new prognostic classification for rectal cancer. *Lancet* 1987; i:1303-5.
27. Jones DJ, Moore M, Schofield PF. Prognostic significance of DNA ploidy in colorectal cancer: a prospective flow cytometric study. *Br J Surg* 1988; 75: 28-33.
28. Kaplan E, Meier E. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 58: 457-81.
29. Kay EW, Mulcahy HE, Curran B, O'Donoghue DP, Leader M. An image analysis study of DNA content in early colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 612-6.
30. Kokal WA, Gardine RL, Shebani K, Morris PL, Prager E, Zak IW, Terz JJ. Tumor DNA content in resectable, primary colorectal carcinoma. *Ann Surg* 1989; 209: 188-93.
31. Kouri M, Pyrhönen S, Mecklin JP, Järvinen H, Laasonen A, Franssila K, Nordling S. The prognostic value of DNA-ploidy in colorectal carcinoma: a prospective study. *Br J Cancer* 1990; 62: 976-81.
32. Landis SH, Murray T, Bolden S. *Cancer statistics, 1998*. *CA Cancer J Clin* 1998; 48: 6-29.
33. Meling GL, Rognum TO, Clausen OPF, Chen Y, Lunde OC, Schlichting E, Wiig JN, Hognestad J, Bakka A, Havig O, Bergan A. Association between DNA ploidy pattern and cellular atypia in colorectal carcinomas. A new clinical application of DNA flow cytometric study? *Cancer* 1991; 67: 1642-9.
34. Meyer JS, Prioleau G. S-phase fractions of colorectal carcinomas related to pathological and clinical features. *Cancer* 1981; 48: 1221-8.
35. Morson BC, Dawson IMP, Day DW, Jass JR, Price A, Williams GT. *Morson & Dawson's Gastrointestinal Pathology, 3rd ed.* UK, Blackwell, 1990.
36. Morson BC, Sobin LH. *Histological typing of intestinal tumors: international histological classification of tumors*. Geneve, World Health Organization, 1976, p.1-70.
37. Odone V, Chang L, Caces J, George SL, Pratt CB. The natural history of colorectal carcinoma in adolescents. *Cancer* 1982; 49: 1716-20.
38. Pietra N, Sarli L, Sansebastiano G, Jotti GS, Peracchia A. Prognostic value of ploidy, cell proliferation kinetics and conventional clinicopathologic criteria in patients with colorectal carcinoma. A prospective study. *Dis Colon Rectum* 1996; 39: 494-503.
39. Pihl E, Nairn RC, Hughes ESR, Cuthbertson AM, Rollo AJ. Mucinous colorectal carcinoma: immunopathology and prognosis. *Pathology* 1980; 12: 439-47.
40. Quirke P, Dixon M, Clayden A, Durdey P, Dyson JED, Williams NS, Bird CC. Prognostic significance of DNA aneuploidy and cell proliferation in rectal adenocarcinomas. *J Pathol* 1987; 151: 285-91.
41. Rawet V. *Carcinoma colorretal: estadiamento e parâmetros prognósticos*. São Paulo, 1998. 194p. Tese (Doutorado) — Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
42. Roncucci L, Fante R, Losi L, Di Gregorio C, Micheli A, Benatti P, Madenis N, Ganazzi D, Cassinadri MT, Lauriola P, Ponz de Leon M. Survival for colon and rectal cancer in a population-based cancer registry. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 295-302.
43. Safford KL, Spebar MJ, Rosenthal D. Review of colorectal cancer on patients under age 40 years. *Am J Surg* 1981; 142: 767-9.
44. Scott NA, Wieand HS, Moertel CG, Cha SS, Beart RW, Lieber MM. Colorectal cancer. Dukes' stage, tumour site, preoperative plasma CEA level, and patient prognosis related to tumour DNA ploidy pattern. *Arch Surg* 1987; 122: 1375-9.
45. Shahrudin MD, Noori SM. Cancer of the colon and rectum in the first three decades of life. *Anticancer Res* 1997; 17: 1227-30.
46. Shepherd NA, Saraga EP, Love SB, Jass JR. Prognostic factors in colonic cancer. *Histopathology* 1989; 14: 613-20.
47. Shike W, Winaver SJ, Greenwald PH, Bloch A, Hill MJ, Swaroop SV. Primary prevention of colorectal cancer: the WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. *Bull World Health Organ* 1990; 6: 377-85.
48. Silvestrini R, D'Agnano I, Faranda A, Costa A, Zupi G, Cosimelli M, Quagliuolo V, Giannarelli D, Gennari L, Cavaliere R. Flow cytometric analysis of ploidy in colorectal cancer: a multicentric experience. *Br J Cancer* 1993; 67: 1042-6.
49. Simstein NL, Kovalcik PJ, Gross GH. Colorectal carcinoma in patients less than 40 years old. *Dis Colon Rectum* 1978; 2: 169-71.
50. Stokes ME, Davis CS, Koch GC. *Categorical data analysis using the SAS System*. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1995.
51. Tomoda H, Kakeji Y, Furusawa M. Prognostic significance of flow cytometric analysis of DNA content in colorectal cancer: a prospective study. *J Surg Oncol* 1993; 53: 144-8.
52. Tribukait B, Hammarberg C, Rubio C. Ploidy and proliferation patterns in colo-rectal adenocarcinomas related to Dukes classification and to histopathological differentiation. *Acta Pathol Microbiol Scand sect A* 1983; 91: 89-95.
53. Tsuchiya A, Ando Y, Ishii Y, Yoshida T, Abe R. Flow cytometric DNA analysis in Japanese colorectal cancer. A multivariate analysis. *Eur J Surg Oncol* 1992; 18: 585-90.
54. Turnbull RB, Kyle K, Watson FR, Spratt J. Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technique on survival rates. *Ann Surg* 1967; 166: 420-7.
55. Vindeløw LL. Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. *Virchows Arch B Cell Path* 1977; 24: 227.
56. Wiggers T, Arends J, Schutte B, Volovics L, Bosman FT. A multivariate analysis of pathologic prognostic indicators in large bowel cancer. *Cancer* 1988; 61: 386-95.
57. Wolley RC, Schreiber K, Koss LG, Karas M, Sherman A. DNA distribution in human colon carcinoma and its relationship to clinical behavior. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69: 15-22.
58. Wolmark N, Rockette H, Fisher B, Wickerham DL, Redmond C, Fisher ER, Jones J, Mamounas E, Ore L, Petrelli NJ. The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1879-87.
59. Yamazoe Y, Maetani S, Nishikawa T, Onodera H, Tobe T, Imamura M. The prognostic role of the DNA ploidy pattern in colorectal cancer analysis using paraffin-embedded tissue by an improved method. *Surg Today* 1994; 24: 30-6.

Endereço para correspondência:

Sérgio Eduardo Alonso Araújo
Rua Oscar Freire 1967 apto. 22B
São Paulo (SP) – CEP 05409 - 011
telefax: 55-11-282.7748 – celulares: 11.9603.8816 e 11-3173.5826