

CORRELAÇÃO DAS PROTEÍNAS p53 E KI-67 COM O PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM ADENOCARCINOMA DE RETO DISTAL

ULYSSES RIBEIRO JR - TSBCP

VENÂNCIO A. ALVES

PEDRO MARCUS S. BUENO DE SOUZA - FSBCP

ADRIANA V. SAFATLE RIBEIRO - FSBCP

VIVIANE RAWET

SUELI NONOGAKI

JOAQUIM GAMA RODRIGUES - TSBCP

ANGELITA HABR-GAMA - TSBCP

RIBEIRO JR.U, ALVES VA, SOUZA PMSB, RIBEIRO AVS, RAWET V, NONOGAKI S, RODRIGUES JG, HABR-GAMA A - Correlação das Proteínas p53 e Ki67 com o prognóstico de pacientes com Adenocarcinoma do Reto Distal - *Rev bras Coloproct*, 2000; 20(4): 248-256.

RESUMO Introdução: A capacidade de prever o comportamento biológico e a resposta terapêutica seria de grande valia no tratamento do câncer de reto distal. Correlacionou-se a hiperexpressão do p53 e Ki-67 com: parâmetros clinicopatológicos, resposta ao tratamento e prognóstico. Métodos: Cortes histológicos de 72 pacientes com adenocarcinoma de reto distal foram corados para as proteínas p53 e Ki-67. Todos os pacientes receberam radioterapia (5.040 cGy) e quimioterapia (5-fluorouracil + leucovorin). Os pacientes com resposta completa foram acompanhados sem tratamento cirúrgico, enquanto a ressecção foi realizada naqueles com resposta parcial. Resultados: Hiperexpressão do p53 foi detectada em 41/72 (56,9%) tumores e alto índice de proliferação (Ki-67) foi observado em 36/72 (50%) tumores. Amostras teciduais coletadas pré e pós quimio/radioterapia apresentaram fidelidade no estado do p53 em todos os casos. Reatividade ao p53 e Ki-67 correlacionaram-se com recidiva da doença ($p=0,02$, $p=0,006$, respectivamente), contudo não se associou com: idade, sexo, estágio T .N .M. e doença residual após quimio/radioterapia. Expressão do p53 e Ki-67 associou-se com menor índice de sobrevivência geral (68,2 vs. 87,2 meses, $p=0,005$ e 59,9 vs. 89,3 meses, $p=0,001$, respectivamente) e intervalo livre de doença (59,4 vs. 81,7 meses, $p=0,004$ e 48,9 vs. 86,1 meses, $p=0,0009$, respectivamente). Conclusão: As proteínas p53 e Ki-67 podem ser úteis na avaliação prognóstica de pacientes com câncer de reto distal submetidos à terapia multimodal.

UNITERMOS: p53 -MIB-1 -câncer de reto distal- quimioterapia -radioterapia

INTRODUÇÃO

O tratamento ideal para o câncer de reto distal ainda permanece controverso. A ressecção cirúrgica é geralmente o tratamento de escolha para estes tumores. Contudo, a incidência de recidiva local após tratamento cirúrgico curativo varia de 4 a 40%, ou até mesmo 70% de acordo com o estágio tumoral e com o local onde o tratamento foi realizado¹⁻³. Ademais, tumor infiltrativo na parede apresenta risco alto de recidiva local e de aparecimento de metástases à distância quando tratado somente pela cirurgia⁴⁻⁶.

Estes dados encorajam a aplicação de terapia neoadjuvante (quimio e radio) no câncer de reto distal. Assim, radioterapia associada ou não à quimioterapia tem sido utilizada para diminuir as taxas de recorrência pélvica e para melhorar as taxas de sobrevivência, especialmente nos estádios N ou M (Dukes B2 ou C)^{1,2,7-10}. Esta terapia

multimodal também pode ser indicada nas lesões avançadas, fixas ou naquelas aparentemente não ressecáveis com o objetivo de reduzir o volume tumoral e seu estágio clínico-patológico^{2,5,6,10}. Esta tática terapêutica pode teoricamente ajudar os cirurgiões a mudar a conduta de ressecção abdominoperineal (APR) para operações não amputativas, mantendo o esfíncter anorretal^{1,7,8}. Lesões ressecáveis com invasão da gordura perirretal (TJ ou T4) ou envolvendo linfonodos (M1, N2 ou NJ) podem ter melhor controle local através da radioterapia adjuvante.

Em estudo iniciado em 1991, utilizou-se a terapia multimodal nos pacientes com tumores de reto distal potencialmente ressecáveis¹¹. Os pacientes receberam 5.040 cGy em doses fracionadas. A dose de quimioterapia associada à radioterapia foi baseada em estudo da "Mayo Clínic INCCTG"^{12,13}. Neste estudo a dose de leucovorin e 5-fluorouracil foi de 20mg/m² e 425 mg/m³ respectivamente, por cinco dias (QT sem RT). A dose total por ciclo foi: leucovorin = 100, mg/m² e 5-fluorouracil = 1275 mg/m², e o intervalo entre os dois ciclos foi de 36 dias.

A toxicidade foi mínima neste estudo. Radiodermite perineal, proctite ou cistite foram tratadas e controladas por mudanças na fração da radioterapia. Toxicidade hematológica foi frequente, porém não foi necessária hospitalização ou suspensão do tratamento em nenhum caso.

O conceito de melhor seleção de pacientes, antes do planejamento pré-operatório, de quais lesões são mais propensas a responder à irradiação ou irradiação associada a quimioterapia tem se tornado um alvo a ser estudado. Alta dose de radioterapia influencia na função intestinal a longo prazo, assim enfatiza-se a necessidade de se encontrar fatores preditivos de recidiva local e excluir pacientes com alta probabilidade de cura somente com cirurgia, assim como a melhoria nas técnicas de irradiação.¹⁴

A capacidade de prever a agressividade biológica e a resposta terapêutica através da análise tecidual é de valor inestimável para o tratamento dos pacientes com câncer. Se tumores não responsivos pudessem ser identificados, estes pacientes poderiam ser poupados de toxicidade, tempo e gastos financeiros com regimes terapêuticos intensivos ou seriam candidatos ideais para novas modalidades terapêuticas não convencionais. Pacientes com tumores considerados responsivos poderiam se beneficiar de tratamento agressivo. Da mesma maneira, poderiam ser identificados pacientes os quais necessitariam ou não de ressecção como componente terapêutico.¹⁵

O desenvolvimento e progressão do câncer de reto distal é um processo com múltiplas etapas, no qual eventos gênicos específicos parecem seguir uma sequência temporal.¹⁶ Dada a importância das alterações de oncogenes e de genes supressores de tumor neste processo, parece razoável explorar se tais marcadores têm valor preditivo nos pacientes com tumores tais como o do câncer de reto distal. Os marcadores ideais deveriam ser capazes de prever com acurácia o prognóstico de cada caso. A utilização de material de biópsia no momento do diagnóstico é fundamental na avaliação inicial para promover tratamento individualizado.

Dentre os distúrbios gênicos encontrados, estão a hiperexpressão e mutação do p53, gene supressor de tumor localizado no cromossomo 17p, o qual é o gene mais comumente implicado em carcinogênese.^{17,18} Alterações do gene p53 têm sido demonstradas em 60% -80% dos tumores colorretais.^{15,19-31} A proteína p53 selvagem tem um efeito inibitório na proliferação e transformação celulares e este efeito parece ser devido à habilidade de manter as células na fase G1 do ciclo celular.¹⁷ Adicionalmente à sua função na regulação celular, o p53 tem sido implicado na síntese e reparo do DNA,³² na manutenção da estabilidade genômica,³³ na diferenciação celular e apoptose.³⁴ Mu-

tação do gene p53 altera significativamente sua atividade regulatória supressora tumoral.³⁵ Na maioria dos casos, um segundo evento na forma de perda de alelo normal (perda da heterozigose) no cromossomo 17 geralmente ocorre na célula tumoral.¹⁸ Mutações no p53 ocorrem predominantemente no segmento do genoma responsável pelas ligações do DNA codificadas na maior parte das vezes pelos exons 5-8 (região conservada).^{18,35} Estes exons variam em tamanho de 110 a 183 pares de base e são separados por segmentos de introns medindo até 755 bases em comprimento.

Por outro lado, o antígeno definido pelo anticorpo monoclonal Ki-67 é uma proteína nuclear humana encontrada em todas as partes ativas do ciclo celular, sendo largamente empregada como marcador de proliferação.³⁶ O anticorpo monoclonal Ki-67 reconhece a parte lábil do antígeno nuclear, o qual está presente nas células em proliferação (i.e., células nas fases G1, S, G2 e M) mas não em células na fase G0.³⁷ O uso do Ki-67 está restrito ao tecido a fresco, pois o epítipo não sobrevive à fixação histológica de rotina em formaldeído. MIB-1 é um verdadeiro anti-Ki-67 equivalente que pode ser empregado em tecidos fixados em formalina e em tecidos rotineiramente processados com retirada antigênica através de microondas.³⁸

Portanto, utilizou-se a técnica de imunohistoquímica para determinar se as alterações do p53 e Ki-67 correlacionam com: parâmetros clínico-patológicos, resposta à quimio/radioterapia pré-operatória e sobrevida nos pacientes com câncer de reto distal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Clínico:

Entre Junho de 1991 e Agosto de 1996, 118 pacientes com adenocarcinoma de reto distal potencialmente ressecável entraram num protocolo de quimio/radioterapia neoadjuvante seguido de ressecção, na Unidade Colorretal do Departamento de Gastroenterologia da Universidade de São Paulo. Todos os pacientes tinham tumor de reto potencialmente ressecável localizado até 7 cm da margem anal. Após completar a quimio/radioterapia, os pacientes foram re-estadiados com tomografia computadorizada do abdomen e pélvis. Todos os pacientes receberam radioterapia externa na dose de 5.040 cGy em três planos e quimioterapia consistindo de 5-fluorouracil + leucovorin.

Os pacientes foram cuidadosamente avaliados para a presença de doença residual e classificados como: resposta **completa** = desaparecimento de todos os sintomas e sinais clínicos, ausência de tumor ao exame digital e ultrassonografia intraretal, biópsias negativas ou ausência

de tumor no espécime ressecado; **incompleta** = persistência de lesão residual macroscópica ou microscópica em qualquer fase do tratamento. Recorrência local foi definida como câncer crescendo no leito de ressecção prévia ou na parede retal nos casos de ressecções locais e foi documentado clinicamente, através de estudo anátomo-patológico ou por tomografia computadorizada.

Dos 118 tumores de reto consecutivos originariamente incluídos, estavam disponíveis biópsias e ou espécimens ressecados de 72 pacientes que puderam ser utilizados para análise imunohistoquímica.

Os prontuários e laudos anátomo-patológicos foram cuidadosamente revistos e os seguintes dados clínicos foram analisados: idade, sexo, sítio tumoral, e características histopatológicas incluindo tipo tumoral, grau de diferenciação (G 1 = bem diferenciado, G2= moderadamente diferenciado, G3= pouco diferenciado e G4= indiferenciado). Pacientes foram estadiados de acordo com o " American Joint Commission Staging System" (TNM).³⁹

Avaliações Histopatológica e Imunohistoquímica:

Estudaram-se os cortes histológicos para confirmar o diagnóstico histopatológico de tumor, e blocos de tecido correspondente fixados em formalina e embebidos em parafina foram seccionados para análise imunohistoquímica. O material estudado compreendeu biópsias endoscópicas pré-operatórias e espécimens ressecados, e em alguns pacientes (n=20), os tecidos foram examinados antes e após o tratamento com quimio/radioterapia para comparação.

Foram realizados três a cinco cortes histológicos de 4 µm de cada bloco designado. Uma lâmina foi usada para imunohistoquímica do p53 (p53-DO7, Glostrup, Denmark) e outra lâmina para Ki-67 (Mm-1, Immunotech, Marseille, France), através do método do complexo da avidina-biotina-peroxidase.⁴⁰ O anticorpo para o p53 tem a capacidade de detectar ambas proteínas selvagem e mutante. Para a retirada antigênica utilizou-se panela de pressão para o p53 e do aquecimento pelo microondas para o Ki-67 (MIB-1). A técnica de imunohistoquímica já foi descrita anteriormente.⁴¹ Brevemente, a imunodeteção envolveu o uso de cortes histológicos com 4 µm de espessura de tecido fixado em formalina e embebido em parafina, tratados com peróxido de hidrogênio a 4% (H2O2) em metanol por 35 minutos para eliminar a atividade endógena da peroxidase. Os cortes sofreram a retirada antigênica por 10 minutos (microondas ou panela de pressão) e foram lavados com solução salina fosfatada e tamponada (PBS) e incubados com 10% de soro de cavalo para bloquear as ligações não específicas. Após remoção do soro, aplicou-se o anticorpo monoclonal primário (à temperatura ambiente e por uma

hora). Após nova lavagem com PBS, os cortes histológicos foram incubados com anticorpo secundário por 30 minutos, lavados duas vezes e tratados com o complexo de peroxidase Vectastain Elite (Vector Laboratory, Burlingame, CA) por 30 minutos. Seguindo-se nova lavagem com PBS, foram incubados com diaminobenzidina a 0,05% e H2O2 a 0,04%, lavados com água destilada, corados com hematoxilina, e desidratados através de álcoois e xilol. Cortes histológicos de adenocarcinoma de cólon, previamente conhecidos por expressarem altos níveis de p53, foram usados como controles positivos. Os controles negativos corresponderam a cortes histológicos de adenocarcinoma de cólon com o anticorpo primário substituído pelo "Trp-E" 1 :200 em solução salina tamponada. Imunoreatividade nuclear específica para p53 foi classificada semi-quantitativamente numa escala de 0 a 4 para intensidade e distribuição. Todos os cortes foram examinados por dois investigadores, independentemente, usando-se um sistema pré- definido de graduação. O índice de proliferação do Ki-67 foi definido como a porcentagem de células tumorais com coloração nuclear positiva por 1.000 células tumorais contadas.

Análise Estatística:

Os resultados das alterações do gene p53 foram comparados com as características clínico-patológicas, usando-se o teste do qui-quadrado para os dados qualitativos e o teste T de Student para os dados quantitativos, com valor de $p < 0,05$ considerado significativo. As taxas de sobrevivência cumulativa foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier considerando mortes relacionadas ao tratamento e mortes causadas pelo tumor. A análise estatística de comparações foi feita usando-se o teste de log-rank. Usou-se o Modelo de regressão de Cox para avaliar o efeito das diversas variáveis sobre a sobrevivência. Fatores preditivos foram considerados individualmente e em conjunto.

RESULTADOS

Pacientes e Características Tumorais:

Trinta e sete (56,9%) eram homens e 27 mulheres, com média de idade de $57,9 \pm 13,3$ anos. Os pacientes foram submetidos a: ressecção anterior= 32 ressecção abdominoperineal do reto= 27 e ressecção local= 2. A média de seguimento foi de 50 meses (variação de 14 a 96 meses). Todos os tumores eram do tipo adenocarcinoma, incluindo-se: tubular= 49, túbulo-papilífero= 10, túbulo-viloso= 8, e mucinoso= 5. Os tumores foram distribuídos de acordo com o grau de diferenciação em: G1 = 19 (26,4%), G2 = 49 (68,1%), e G3 = 4 (5,5%) (Tabela 1).

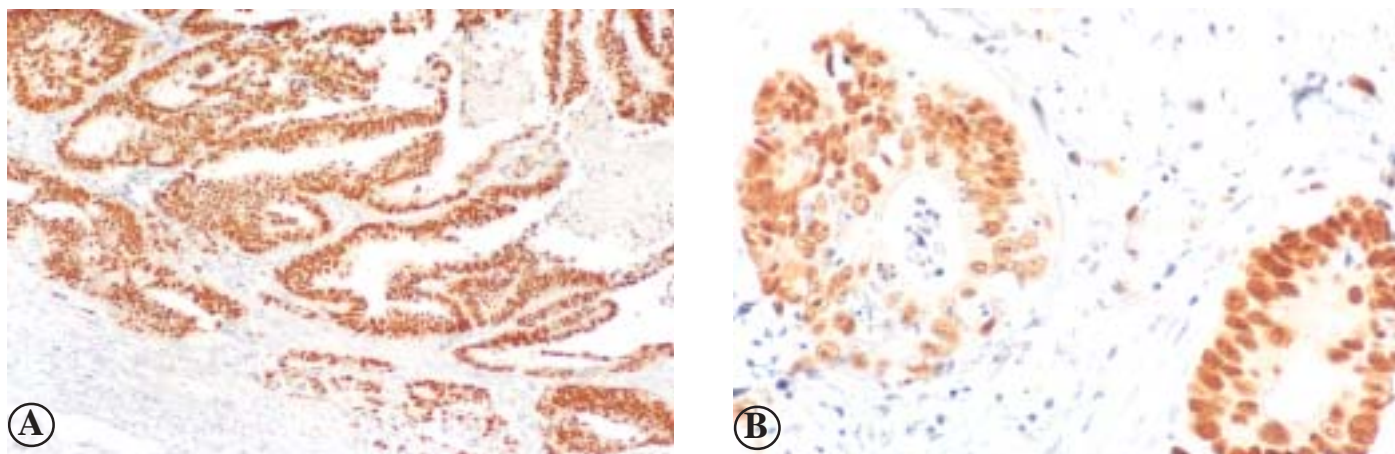


FIGURA 1: Imunohistoquímica para o p53 em paciente com adenocarcinoma de reto distal, evidencia coloração nuclear marrom das células tumorais (400 X) (1A); Foco de coloração positiva em área de fibrose pós radioterapia (100 X) (1B).

Imunohistoquímica para p53 e Ki-67:

Observou-se hiperexpressão do p53 em 41/72 (56,9%) dos pacientes (Tabela 1). Os tecidos coletados pré e pós quimio/radioterapia de 20 pacientes apresentaram o mesmo perfil imunohistoquímico em todos os pacientes. A detecção imunohistoquímica da proteína p53 revelou um padrão variável de coloração, desde completamente ausente até distribuição difusa e com forte reatividade (Figura 1). Entre estes extremos, a intensidade e a distribuição da coloração variou de localizado/fraco para difuso/fraco, e localizado ou forte difuso. Na análise estatística considerou-se coloração nuclear positiva quando mais do que 10% das células apresentavam coloração nuclear.

A distribuição das proteínas p53 e Ki-67 de acordo com os parâmetros clínico-patológicos está demonstrada na Tabela 1. Não se evidenciou associação estatística entre a presença do p53 e idade, sexo, tipo de tumor, grau de diferenciação, tumor (T), envolvimento linfonodal (N), estágio (TNM) e tipo do procedimento cirúrgico (Tabela 1).

O índice de proliferação denotado pelas células coradas pelo Ki-67 foi de $49,2 \pm 20,3$ (variando de 10 a 90%) das células tumorais (Figura 2). Trinta e seis (50%) tumores foram classificados como altamente proliferativos, já que mais do que 50% das células estavam coradas. Não se evidenciou associação estatística entre a presença do Ki-67 e idade, tipo de tumor, grau de diferenciação, tumor (T), envolvimento linfonodal (N), estágio (TNM) e tipo do procedimento cirúrgico (Tabela 1). Houve maior grau de proliferação nos tumores das mulheres quando comparado aos dos homens (Tabela 1).

Resposta à Quimio/radioterapia:

Os pacientes foram cuidadosamente seguidos pelo cirurgião, radioterapeuta e oncologista através do exame clínico, digital, métodos endoscópicos e ultrassonografia

transretal. Resposta completa foi observada em 15 (20,8%) dos pacientes, e parcial em 57 (79,2%) dos pacientes.

Hiperexpressão de ambas proteínas p53 e Ki-67 não foi associada à resposta da quimio/radioterapia, i.e. com a presença de doença residual no espécime ressecado, $p=0,73$. (Tabela 1).

Correlação entre Hiperexpressão do p53 e Ki-67 e Prognóstico:

Os cálculos basearam-se nos dados de 72 pacientes que se submeteram à ressecção curativa e estavam no risco de recidiva. Os pacientes que morreram de causa não relacionada ao tumor retal foram considerados ($n=3$). Dois pacientes morreram no período pós-operatório e não estavam a risco de recidiva. Ocorreram 21 recidivas, sendo que 16 morreram devido à recidiva da doença e cinco estão vivos com doença (censurados). Quarenta e sete dos 72 pacientes permanecem sem doença e foram também considerados censurados.

As curvas de sobrevida foram calculadas baseando-se na hiperexpressão do p53 e Ki-67. A média de sobrevida em pacientes sem hiperexpressão do p53 foi de 87,13 meses (95% CI= 80,7 -93,5), comparada com 68,2 meses (95% CI= 56,2 -80,2) em pacientes com tumores positivos para o p53, $p=0,005$. O intervalo livre de doença foi definido como o período desde a quimio/radioterapia até a recidiva. A média do intervalo livre de doença foi de 81,7 meses (95% CI= 73,2-90,2) em pacientes sem hiperexpressão do p53; e 59,4 meses (95% CI= 45,8- 72,8) em pacientes com alteração no p53, $p=0,004$.

A média de sobrevivência geral em pacientes com baixa proliferação foi de 89,3 meses (95% CI= 81,9 -96,5), comparados a 59,9 meses (95% CI= 49,0- 70,8) em pacientes com tumores com alta taxa proliferativa para Ki-67, $p=0,001$. A média do intervalo livre de doença foi de 86

Tabela 1. Correlação entre Parâmetros Clínico-patológicos vs. Hiperexpressão do p53 e Ki-67 em 72 Pacientes com Carcinoma de Reto

		p53		Análise Estatística	Ki-67		Análise Estatística
		Positivo	Negativo		>50%	<50%	
Idade (anos)	<60	21	16	0,97*	17	20	0,63*
	>60	20	15		19	16	
Sexo	Masculino	23	19	0,80*	16	26	0,03*
	Feminino	18	12		20	10	
Grau de Diferenciação	G1	9	10	0,21	10	9	0,36
	G2	31	18		22	27	
	G3	1	3		4	0	
Classificação TNM	T1	3	4	0,19	1	6	0,61
	T2	19	16		20	15	
	T3	19	11		15	15	
N	N0	33	24	0,9	26	30	0,15
	N1	8	7		10	6	
Estádio TNM	I	17	15	0,45	14	18	0,32
	II	16	8		12	12	
	III	8	8		9	7	
Resposta Terapêutica	Parcial	34	24	0,39*	33	25	0,07*
	Completa	7	8		4	11	
Procedimento Cirúrgico	Nenhum	6	5	0,61	3	8	0,06
	RA	17	15		16	16	
	APR	17	10		15	12	
	RL	1	1		2	0	
Recidiva	Ausente	21	25	0,027	16	30	0,006
	Local	6	2		6	2	
	À Distância	10	3		11	2	

Teste qui-quadrado; *= Teste Exato de Fisher; RA= Ressecção Anterior; APR= Ressecção Abdominoperineal; RL=Ressecção Local

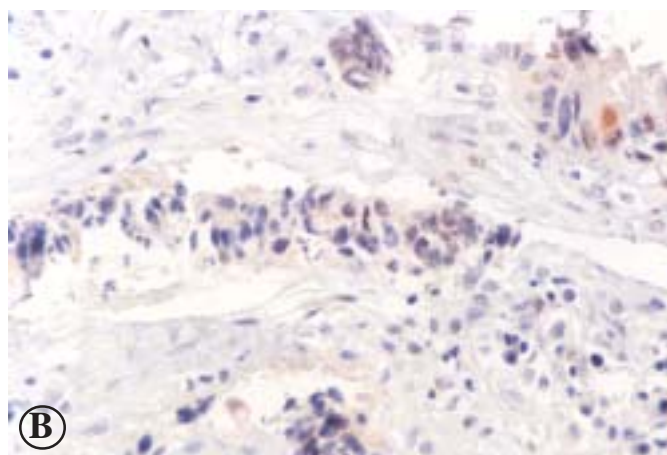
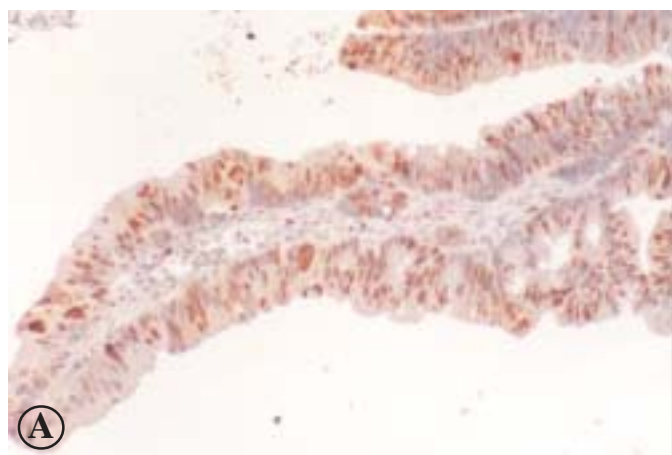


FIGURA 2: Imunohistoquímica para o Ki-67 em paciente com adenocarcinoma de reto distal, evidencia coloração nuclear marrom das células tumorais em alta taxa de proliferação (400 X) (2A); Tumor com baixa taxa proliferativa (400 X) (2B).

meses (95% CI= 76,9 -95,2) em pacientes com baixa proliferação; e de 48,9 meses (95% CI= 36,3- 61,6) em pacientes com alta taxa proliferativa, $p=0,009$.

As curvas de sobrevivência geral e do intervalo livre de doença, assim como teste de log rank estão dispostos nas Figuras 3 e 4.

Na análise multifatorial, p53, Ki-67 e resposta à quimio/radioterapia foram fatores independentes de prognóstico (Tabela 2).

multimodal combinada com intuito de melhorar o controle local e eliminar a doença micrometastática presente no tempo da ressecção. Resposta patológica completa a diversos regimes de quimio/radioterapia, varia entre 15 a 36%, com média de aproximadamente 20%.^{1,5,7,42-50} Adicionalmente, a ausência de doença residual ou a presença de tumor microscópico no espécime ressecado poderia correlacionar com maior intervalo livre de doença e média de sobrevida. A resposta à terapia neoadjuvante pode, portanto, ser

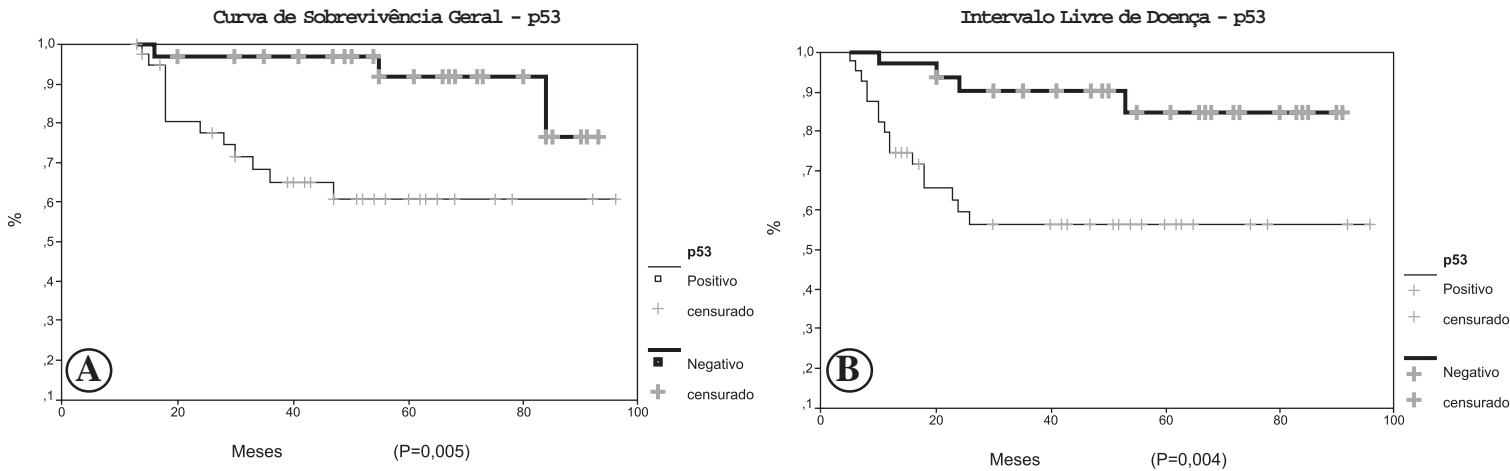


FIGURA 3: Curva Cumulativa de Sobrevivência dos pacientes com adenocarcinoma de reto distal, mostrando a diferença em sobrevivência geral (3A) e intervalo livre de doença (3B) entre os pacientes positivos para a expressão do p53 (linha fina) e os negativos (linha grossa).

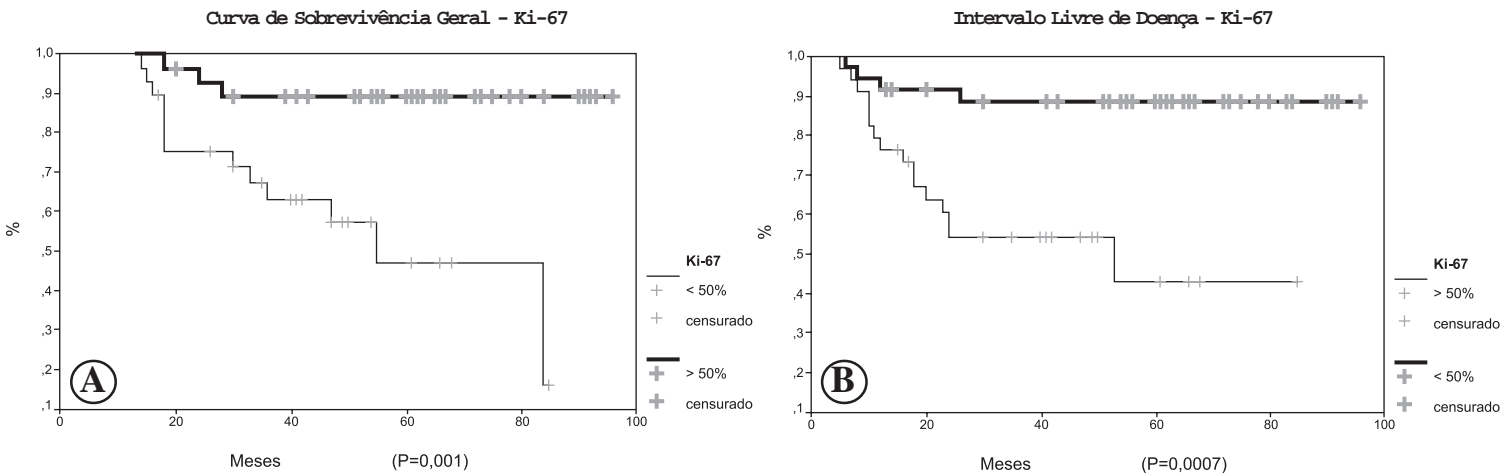


FIGURA 4: Curva Cumulativa de Sobrevivência dos pacientes com adenocarcinoma de reto distal, mostrando a diferença em sobrevivência geral (4A) e intervalo livre de doença (4B) entre os pacientes com alta taxa de proliferação (KI-67) (linha fina) e com baixa taxa (linha grossa).

DISCUSSÃO

A identificação de lesões gênicas responsáveis pela carcinogênese poderia criar um sistema de estadiamento baseado na biologia molecular, que aumentaria a acurácia em prever prognóstico de um indivíduo com câncer.⁵²

Esforços são atualmente empregados na terapia

preditiva de um resultado superior à ressecção em pacientes com câncer de reto distal.^{48,50}

Contudo, o uso de quimio/radioterapia no tratamento do câncer de reto distal é limitado pela alta taxa de morbidade, resposta completa relativamente baixa, eficácia não estabelecida e alto custo. A identificação de marcadores biológicos que pudessem prever com preci-

Tabela 2. "Cox Regression Model" para Sobrevivência em 72 Pacientes com Câncer de Reto Distal

Variáveis	Odds Ratio	Valor de P
Resposta	0,062	0,803
Sexo	0,079	0,778
Diferenciação	0,304	0,581
N	0,432	0,511
Estádio	0,737	0,391
p53	0,929	0,008
Ki-67	2,427	0,0005
T	1,671	0,0019

são a resposta terapêutica e a sobrevida seria de interesse clínico.⁵¹ Parece racional presumir que o grau de agressividade tumoral, assim como a heterogeneidade do comportamento clínico de cada tumor devem-se às alterações intrínsecas gênicas relacionadas ao câncer, afetando parâmetros, tais como: taxa de crescimento, invasão tecidual, probabilidade de recidiva, propensão a desenvolver metástase e resposta ao tratamento.

Esta é uma análise prospectiva usando um grupo bem definido de pacientes, que se submeteram ao mesmo protocolo de quimio/radioterapia, portanto, o risco de seleção aleatória e erros nos dados coletados são minimizados.

Não foi detectada nenhuma correlação da expressão do p53 ou Ki-67 com os achados clínico-patológicos. Foi observada fidelidade na expressão do p53 em todos os casos, quando o tecido tumoral de um mesmo paciente (n=20) foi analisado, antes e após quimio/radioterapia. Este dado é relevante, já que os tecidos disponíveis são geralmente escassos. Alguns autores acreditam que o p53 pode participar na resposta celular à irradiação.^{32,53,54,55,56} Células com ausência de expressão do p53 ou com hiperexpressão do p53 mutado não apresentam repouso na fase G I. Isto sugere que o p53 selvagem pode estar envolvido na inibição da síntese de DNA após dano ao DNA com quimio/radioterapia.^{32,55,56} Adicionalmente, a exposição de células tumorais a drogas como 5-fluorouracil pode levar a aumento na regulação dos níveis de proteína p53 por aumento de estabilidade pela translação da proteína p53.⁵⁶

Os dados apresentados neste estudo, assim como evidências anteriores indicam que hiperexpressão do p53 está relacionada com fenótipo maligno mais agressivo, porém os resultados diferem baseados na histogênese tumoral.²⁷ Alterações do gene p53 tem sido relacionadas com a disseminação tumoral no carcinoma colorretal⁵⁷ e com o comportamento metastático de células de pulmão.⁵⁸ Dados adicionais da participação do p53 na progressão tumoral e no

potencial metastático têm sido observados nas linhagens celulares de carcinoma colorretal⁵⁹ e em linhagens celulares de tumor de camundongo transfectado com p53 mutado.⁶⁰

Imunorreatividade ao p53 tem sido associada com menor sobrevivência em pacientes com carcinoma de vários órgãos.^{15,22-27} O papel das alterações do gene supressor de tumor p53, como determinante da resposta à terapia e prognóstico do câncer de reto distal, permanece controverso e os dados são conflitantes.^{19-23,25,28-30} Esta discrepância pode ser explicada pela diferença nos sistemas de classificação da positividade do p53, e a porcentagem de tumores p53 positivos em diferentes estudos.³¹ Os resultados desta pesquisa estão de acordo com outros estudos que não demonstram associação entre mutações do p53 e a presença de doença residual no espécime ressecado (p=0,08),^{29,30} contudo, intervalo livre de doença e sobrevivência média baseada na presença ou ausência de mutações do p53 foram significativamente diferentes, p=0,02 e p=0,03, respectivamente. Em estudo interessante, Zhang⁶¹ utilizou quatro anticorpos para detectar as alterações do p53. Hiperexpressão do p53 foi mais comumente encontrada no cólon esquerdo e reto, carcinomas não mucinosos, aneuplóides, e em tumores com alta atividade proliferativa. Independentemente de qual anticorpo foi utilizado, o prognóstico foi fortemente desfavorável para tumores p53 positivos quando comparados aos negativos.

Interpretação da demonstração imunohistoquímica da proteína p53 é baseada na premissa de que o p53 selvagem tem meia-vida curta, não sendo detectável.¹⁷ As mutações do p53 tornam a proteína mais estável e, portanto, detectável. Contudo, coloração positiva para p53 não necessariamente implica em mutação, desde que degradação reduzida ou ambiente celular alterado podem similarmente tornar a proteína p53 selvagem detectável.^{62,63} Da mesma maneira, a ausência de coloração pode ocorrer em casos de deleção do gene, falência de transcrição, ou de mutação não estável; todas as quais podem estar associadas com perda de função do p53.^{62,64} Estudos recentes, contudo, demonstram a correlação entre hiperexpressão da proteína p53 e a mutação do gene, especialmente quando está presente coloração intensa. Ademais, a imunohistoquímica foi considerada mais exequível do que o sequenciamento do DNA na avaliação do estado funcional do p53, pois, apesar da estabilização do p53 ocorrer devido às mutações ou outros mecanismos como proteínas virais, a proteína estável e, portanto, detectável à imunohistoquímica pode resultar em perda da função de supressão tumoral.

Alta atividade proliferativa está associada com maior potencial maligno do câncer colorretal.^{65,66} Células em pro-

liferação são mais responsivas ao dano radioterápico, e tumores com diferentes índices de proliferação podem responder diferentemente à radioterapia.³¹ Os resultados aqui apresentados confirmam observações prévias, as quais sugerem que alto índice de Ki-67 não é um bom indicador de resposta tumoral à radiação,^{29,31,67} porém contradizem outros que têm achado associação entre a coloração de PCNA e patológico diminuição do estágio tumoral de reto tratados com irradiação pré-operatória seguidos de cirurgia radical.⁶⁸ Isto pode ocorrer por diferenças na seleção dos pacientes, tamanho da amostra, definição da resposta tumoral à radiação, e critérios para definir a positividade às colorações de marcadores de proliferação.³¹ Os dados desta investigação indicam que o alto Ki-67 associou-se com maior índice de recidiva tumoral e menor sobrevivência média. Três outros estudos da literatura reportam resultados conflitantes quanto à significância prognóstica da expressão de Ki-67 pré-irradiação em tumores de reto tratados com radioterapia pré-operatória seguidos por cirurgia radi-

cal. Dois pequenos estudos demonstram associação entre altos índices proliferativos e menor intervalo livre de doença,^{67,69} porém estes resultados não foram confirmados em grandes estudos e com longo seguimento.⁶⁸

Em resumo, a hiperexpressão do p53 e do Ki-67 mostrou serem variáveis independentes na avaliação prognóstica da resposta terapêutica e resultado dos pacientes com câncer de reto distal. Melhor resposta ao tratamento quimio/radioterápico e maior tempo de sobrevivência correlacionou significativamente com a ausência de hiperexpressão do p53 e baixos níveis de proliferação celulares. A presença ou ausência de mutações gênicas específicas pode prover informação útil que pode alterar a decisão terapêutica no câncer de reto distal e poderia ser usado para direcionar futuros ensaios clínicos de quimio/radioterapia. A habilidade de se indicar o tratamento apropriado aos pacientes baseados nos marcadores de comportamento biológico e de eficácia terapêutica pode ser uma valiosa arma na estratégia terapêutica em pacientes com câncer de reto distal.

SUMMARY: Introduction: The ability to predict biologic behavior and treatment responsiveness would be a valuable asset in the management of low rectal cancer. **p53 e Ki-67 hiperexpression were correlated with: clinicopathological parameters, treatment response and outcome. Methods:** Tissue sections from 72 patients with potentially resectable low rectal adenocarcinoma were stained for p53 and Ki-67 proteins. All patients received external beam radiotherapy (5,040 cGy) and chemotherapy (5-fluorouracil + leucovorin). The complete responders were followed without surgical treatment, while resection was performed for the partial responders. **Results:** p53 hiperexpression was detected in 41/72 (56.9%) tumors and high proliferative rate (MIB-1) was observed in 36/72 (50%) tumors. Tissue samples collected pre- and post chemo/radiotherapy exhibited fidelity in p53 status in all cases. p53 status and Ki-67 reactivity were correlated with recurrent disease (p=0.04, p=0.001, respectively), however did not correlate with: age, gender, T.N.M. stage and residual disease after chemo/radiotherapy. p53 and Ki-67 were associated with diminished overall survival (68.3 vs. 87.2 months, p=0.005 and 60.6 vs. 89.4 months, respectively) and disease-free survival (60.3 vs. 81.9 months, p=0.004 and 49.34 vs. 86.58 months, respectively). **Conclusion:** p53 and Ki-67 proteins may be useful as prognostic markers in preoperatively irradiated low rectal cancer patients.

KEY WORDS: p53 hiperexpression - MIB-1 - low rectal cancer - prognosis - chemotherapy - radiotherapy

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cohen AM, Minsky BD. A phase I trial of preoperative radiation proctectomy and endo-anal reconstruction. *Arch Surg* 1990;125:247-51.
2. Rich T, Gunderson LL, Lew R, et al. Patterns of recurrence of rectal cancer after potentially curative surgery. *Cancer* 1983;52:1317-29.
3. Rider WD, Palmer JA, Mahoney LJ, Robertson CT. Preoperative irradiation in operable cancer of the rectum: Report of the Toronto Trial. *Canadian J Surg* 1977;20:335-8.
4. Cummings BJ. Radiation therapy for colorectal cancer. *Surg Clin North Am* 1993;73: 167-81.
5. Gastrointestinal Tumor Study Group: Survival after postoperative combination treatment of rectal carcinoma. *N Engl J Med* 1986;315:4-1295.
6. Reis Neto JA, Quilici FA, Reis JA Jr. A comparison of nonoperative versus preoperative radiotherapy in rectal carcinoma: a 10-year randomized trial. *Dis Colon Rectum* 1989;32:702-10.
7. Enker WE, Paty PB, Minsky BD, Cohen AM. Restorative or preservative operations in the treatment of rectal cancer. *Surg Oncol Clin North Am* 1992, 1 :57-69.
8. Minsky BD. Rectal Cancer: the preoperative combined modality approach. *Gastroint Cancer* 1994;2:254-60.
9. NIH Consensus Conference. Adjuvant therapy for patient with colon and rectal cancer. *JAMA* 1990;264:1444-50.
10. Pählman L, Glimelius B. The value of adjuvant radio(chemo) therapy for rectal cancer. *Eur J Cancer* 1995; 31A:1347-50.
11. Habr-Gama A, Souza PMS, Ribeiro Jr U, Nadalin W, Gansl R, Souza Jr AHS, Campos FG, Gama-Rodrigues J. Low rectal cancer. Impact of radiation and chemotherapy on surgical treatment. *Dis Colon Rectum* 1998;41:1087-96.
12. O'Connell MJ. A phase III trial of 5-fluorouracil and leucovorin in the treatment of advanced colorectal cancer: a Mayo Clinic / North Central Cancer Treatment Group Study. *Cancer* 1989; 63:1026-30.
13. Poon MA, O'Connell MJ, Moertel CG, et al. Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1989;7:1407-18.
14. Dahlberg M, Glimelius B, Graf W, Pahlman L. Preoperative irradiation affects functional results after surgery for rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1998;41 :543-51.
15. Ribeiro Jr U, FinkeIstein SD, Safatle-Ribeiro AV, et al. p53 sequence analysis predicts treatment response and outcome of patients with esophageal carcinoma. *Cancer* 1998;83:7-18.
16. Fearon ER, VoIgeIstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
17. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 protooncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989;57:1083-93.
18. Hollstein MC, Sidranski D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.
19. Adrover E, Maestro ML, Sanz-Casla MT, deI Barco V, Cerdan J, Fernez C, Balibrea JL. Expression of high p53 levels in colorectal cancer: a favourable prognostic factor. *Br J Cancer* 1999;81:122-6.
20. Broll R, Stark A, WindhöveI U, Best R, Strik MW, SchimmeIpenning H, Schwener O, Kujath P, Bruch H-P, Duchrow M. Expression of p53, mdm2 mRNA and protein in colorectal carcinomas. *Eur J Cancer* 1999;35:1083-8.

21. Diez M, Enriquez JM, Dominguez P, et al. Differences in p53 and PCNA expression in rectal adenocarcinomas due to preoperative adjuvant radiotherapy. *Int J Biol Markers* 1997;12:128-31.
22. Dolcetti R, Dogliani C, Maestro R, Gasparotto D, Barzan L, Pastore A, et al. p53 over-expression is an early event in the development of human squamous-cell carcinoma of the larynx: genetic and prognostic implications. *Int J Cancer* 1992;52: 178-82.
23. Spitz FR, Giacco GG, Hess K, et al. p53 immunohistochemical staining predicts residual disease after chemo-radiation in patients with high-risk rectal cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3: 1685-90.
24. Iwaya K, Tsuda H, Hiraide H, Tamaki K, Tamakuma S, Fukutomi T, et al. Nuclear p53 immunoreaction associated with poor prognosis of breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1991;82:835-40.
25. Luna-Perez P, Arriola EL, Cuadra Y, Alvarado I, Quintero A. p53 protein hiperexpression and response to induction chemoradiation therapy in patients with locally advanced rectal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 1988;5:203-8.
26. Martin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1992;50:859-62.
27. Pricolo VE, Finkestein SD, Wu T, Keller G, Bakker A, Swalsky PA, et al. Prognostic value of Tp53 e K-ras-2 mutational analysis in stage III carcinoma of the colon. *Am J Surg* 1996;171:41-6.
28. Ropponen KM, Kellokoski JK, Lipponen PK, Pietiläinen T, Eskelinen MJ, Alhava EM, Kosma V-M. p21/WAF1 expression in human colorectal carcinoma: association with p53, transcription factor AP-2 and prognosis. *Br J Cancer* 1999;81:133-40.
29. Tannapfel A, Nublein S, Fietkau R, Katalinic A, Kockerling F, Wittekind C. Apoptosis, proliferation, bax, bcl-2 and p53 status prior to and after preoperative radiochemotherapy for locally advanced rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;41:585-91.
30. Scott N, Sagar P, Stewart J, Blair GE, Dixon MF, Quirke P. p53 in colorectal cancer: clinicopathological correlation and prognostic significance. *Br J Cancer* 1991;63: 317-9.
31. Qiu H, Sirivongs P, Rothenberger M, Rothenberger DA, García-Aguilar J. Molecular Prognostic factors in rectal cancer treated by radiation and surgery. *Dis Colon Rectum* 2000;43:451-9.
32. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991;51:6304-11. 33. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-6.
34. Moshe Ozen. Relationship of p53 to the control of apoptotic cell death. *Semin Cancer Biol* 1994;5:221-7.
35. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 1989;342:705-8.
36. Hansen TP, Fenger C, Kronborg O. The expression of p53, Ki-67 and urokinase plasminogen activator receptor in colorectal adenomas with true invasion and pseudo-invasion. *APMIS* 1999;107:689-94.
37. Gerdes J, Lernke H, Baich H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133:1710-15.
38. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992;168:357-63.
39. American Joint Committee on Cancer. Manual for staging of cancer. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1992.
40. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-80.
41. Shi SR, Key ME, Kalra K. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991;39:741-8.
42. Arnauld JP, Nordlinger B, Bosset JF, et al. Radical surgery and postoperative radiotherapy as combined treatment in rectal cancer. Final results of a phase III study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Br J Surg* 1997;84:352-7.
43. Boullis-Wassif S, Gérard A, Loygue J, Camelot D, Buyse M, Suez N. Final results of a randomized trial on the treatment of rectal cancer with preoperative radiotherapy alone or in combination with 5-fluorouracil, followed by radical surgery. Trial of the European Organization on Research and Treatment of Gastrointestinal Cancer Cooperative Group. *Cancer* 1984;53:1811-8.
44. Fisher B, Wolmark N, Rockette H et al. Postoperative adjuvant chemotherapy or radiation therapy for rectal cancer: results from NSABP protocol R-01. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:21-9.
45. Habr-Gama A. Cirurgia radical do câncer do reto com conservação do sistema esfinteriano. *Pren Med Argent* 1980;67:698-703.
46. Haghbin M, Sischy B, Hinson J. Combined modality therapy in poor prognostic rectal adenocarcinoma. *Radiother Oncol* 1988;13:75-81.
47. Medical Research Council Rectal Cancer Working Party. Randomized trial of surgery alone versus surgery followed by radiotherapy for mobile cancer of the rectum. *Lancet* 1996;348:1610-4.
48. Minsky BD, Cohen AM, et al. Enhancement of radiation -induced downstaging of rectal cancer by fluorouracil and high-dose leucovorin chemotherapy. *J Clin Oncol* 1992;10:79-84.
49. Minsky BD, Kemeny N, Cohen AM et al. Preoperative high-dose leucovorin/5-fluorouracil and radiation therapy for unresectable rectal cancer. *Cancer* 1991;67:2859-66.
51. Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on cancer prognostic factors consensus Conference. Colorectal Working Group. *Cancer* 2000;88: 1739-57.
52. Roth JA. P53 Prognostication: paradigm or paradox? *Clin Cancer Res* 1999;5:3345.
53. Jung M, Notario V, Dritschilo A. Mutations in the p53 gene in radiation-sensitive and resistant human squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 1992;52:6390-3.
54. Brachman DG, Beckett M, Graves D, Haraf D, Vokes E, Weichselbaum RR. p53 mutation does not correlate with radiosensitivity in 24 head and neck cancer cell lines. *Cancer Res* 1993;53:3667-9.
55. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, et al. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993;362:847-9.
56. Nabeya Y, Loganzo, Jr F, Maslak P, Lai L, Oliveira AR, Schwartz GK, et al. The mutational status of p53 protein in gastric and esophageal adenocarcinoma cell lines predicts sensitivity to chemotherapeutic agents. *Int J Cancer* 1995;64:37-46.
57. Remvikos Y, Lauren-Puig P, Salmon RJ, Frelat G, Dutilleul-Laux B, Thomas G. Simultaneous monitoring of p53 protein and DNA content of colorectal adenocarcinoma by flow cytometry. *Int J Cancer* 1990;45:450-6.
58. Lendinko N, Constantino RL. Modulation of p53-gene expression and cytokeratin 18 in retinoid-mediated invasion-suppressed lung carcinoma cells. *Anticancer Res* 1990; 10:1335-1339.
59. Trainer DL, Kline T, McCabe FL, Faucette LF, Field J, Chaikin M, et al. Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1988;41:287-96.
60. Pohl J, Lehrmann V, Radler-Pohl A, Schirrmacher V. Induction of the metastatic phenotype by transfection of the nuclear oncogene p53: increases in cytoplasmic diacylglycerol levels and reduction in class-I-MHC antigen expression are not sufficient to explain the changes in metastatic capacities. *J Cancer Res Clin Oncol* 1989; 115: 145-7.
61. Zhang H. Evaluation of four antibodies in detecting p53 protein for predicting clinicopathological and prognostic significance in colorectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 1999;5:4126-32.
62. Wynford-Thomas D. p53 in tumor pathology: can we trust immunocytochemistry? *J Pathol* 1992;166:329-30.
63. Hall PA, Lane DP. p53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry? - revisited. *J Pathol* 1994;172:1-4.
64. Lu X, Lane DP. Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell* 1993;75:765-78.
65. Teixeira CR, Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Surnii K, Kajiyama G. Proliferating cell nuclear antigen expression at the invasive tumor margin predicts malignant potential of colorectal carcinomas. *Cancer* 1994;73:575-9.
66. Tanaka S, Haruma K, Tatsuka S, et al. Proliferating cell nuclear antigen expression correlates with the metastatic potential of submucosal invasive colorectal carcinoma. *Oncology* 1995;52:134-9.
67. Desai GR, Myerson RJ, Higashikubo R, et al. Carcinoma of the rectum: possible cellular predictors of metastatic potential and response to radiation therapy. *Dis Colon Rectum* 1996;39: 1090-6.
68. Willet CG, Warl and G, Hagan MP, et al. Tumor proliferation in rectal cancer following preoperative irradiation. *J Clin Oncol* 1995;13:1417-24.