Rodrigo Oliva Perez

Determinação da expressão da Ciclina G no câncer do reto

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Cirurgia do Aparelho
Digestivo e Coloproctologia

Orientadora: Profa. Dra. Angelita Habr-Gama

**São Paulo
2006**

RODRIGO OLIVA PEREZ

**Determinação da expressão da
Ciclina G no câncer do reto**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Cirurgia do Aparelho
Digestivo

Orientadora: Profa. Dra. Angelita Habr-Gama

São Paulo
2006

À minha família, Cindy, Guilherme,
Carolina e Mariana, razão única
de tanto esforço e que sempre me
apoiou mesmo nos momentos de
maior ausência.

Agradecimentos

À Professora Angelita Habr-Gama, por todas oportunidades oferecidas, orientação constante e dedicação incansável na busca pela perfeição em absolutamente todos os seus atos;

Ao Professor Joaquim Gama-Rodrigues, pelo estímulo constante, apoio incondicional e irrestrito;

Ao Professor Ivan Cecconello, pelo incentivo e apoio oferecidos;

Ao Professor Robert Beart, pela oportunidade do convívio, estímulo e participação direta na origem do estudo;

Ao Professor Desidério Roberto Kiss, pelo apoio oferecido;

Ao Professor Cláudio José Caldas Bresciani, amigo verdadeiro, médico, pai e marido exemplar; crítico preciso, pela oportunidade do diálogo e do aprendizado constante;

Ao Dr. Afonso Henrique Silva e Sousa Júnior, pela oportunidade de aprendizado constante de crescimento científico;

Ao Professor José Eduardo Krieger, pelo estímulo constante e oportunidades oferecidas;

Ao Professor Venâncio Alves Avancini, pela oportunidade de aprendizado e pelas inestimáveis contribuições metodológicas e conceituais;

À Dra Viviane Rawet, pela sua carinhosa amizade e grande contribuição na análise e discussão do material histopatológico;

Ao acadêmico Igor Proscurshim, pelo convívio, amizade e críticas construtivas durante todo o processo;

Ao Dr. Edwin Parra, pelo auxílio na avaliação dos resultados;

À bióloga Ana Garippo, pelo auxílio na metodologia e preparo das lâminas;

Ao Dr. Victor Edmond Seid, pelo apoio e estímulo;

Aos doutores Fábio Campos, Antonio Rocco Imperiale e Edésio Vieira Silva Filho pelo convívio durante os atendimentos ambulatoriais do Serviço de Coloproctologia;

À Sra. Neusa Zuppo, pelo auxílio durante os atendimentos dos pacientes envolvidos e carinho oferecido;

À Sra. Marta Regina Rodrigues, pelo auxílio na pesquisa bibliográfica;

À Sra. Adriana Bruscatto, pelo auxílio no estudo estatístico;

Às secretárias Maria Cristina Rabelo, Marisa Ochner, Myrtes Freire de Lima Graça, Maria Joelice dos Reis Santos, Fabiana Renata Soares Bispo e Vilma de Jesus Libério pela paciência e carinho;

Aos colegas do Serviço de Coloproctologia pelo companheirismo e auxílio.

“O que não pode ser curado com medicamentos é curado pela faca, o que a faca não pode curar é curado com ferro em brasa, e o que isso não pode curar, deve ser considerado incurável.”

Hipócrates, cerca de 480 a.C.

Normalização Adotada

Esta tese está de acordo com:

Referências: Adaptado do International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Agradecimentos	
Normalização Adotada	
Lista de Figuras	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Siglas	
Resumo	
Summary	

Introdução	1
<i>Tratamento Cirúrgico</i>	3
<i>Terapia Adjuvante</i>	6
<i>Resultados do Tratamento Combinado</i>	8
<i>Ciclo Celular, Ciclinas e Carcinogênese</i>	9
<i>Novas Alternativas Terapêuticas</i>	15
Objetivos	17
Métodos	19
<i>Casuística</i>	20
<i>Estudo Histopatológico</i>	22
<i>Estudo Imunohistoquímico</i>	23
<i>Análise dos Resultados de Imunohistoquímica</i>	25
Controles	25
Análise Quantitativa	28
Análise Semi-quantitativa	28
Comparação da Expressão Imunohistoquímica	32
Comparação Entre os Grupos	32
<i>Estudo Estatístico</i>	33
Cálculo da Amostra	33
Testes	33
Valor Crítico da Diferença do Porcentual Tumor versus Normal	33
Resultados	35
<i>Características Clínicas e Anátomo-patológicas</i>	36
<i>Morfologia e Distribuição</i>	38
<i>Análise Quantitativa</i>	39
<i>Análise Semi-quantitativa (cruzes)</i>	40
<i>Análise Semi-quantitativa (escore)</i>	42
<i>Correlação entre os Testes</i>	43
<i>Resultados de Curvas ROC</i>	44
Ausência de Metástase Linfonodal	45
Ausência de Metástases	46
Recidiva	47
Resultado Cruzes Tumor>Normal	48

Resultado Escore Tumor>Normal	49
<i>Correlação entre os Resultados e Características dos Pacientes</i>	50
Variáveis Categóricas	50
Variáveis Contínuas	51
<i>Sobrevivência</i>	52
Discussão	55
Conclusões	76
Referências	78

APÊNDICE I	Dados Clínicos e Epidemiológicos
APÊNDICE II	Dados Clínicos e Anátomo-patológicos
APÊNDICE III	Dados Anátomo-patológicos
APÊNDICE IV	Expressão Quantitativa no Tecido Normal
APÊNDICE V	Expressão Quantitativa no Tecido Tumoral
APÊNDICE VI	Diferença de Expressão Quantitativa
APÊNDICE VII	Resultado da Expressão Semi-quantitativa (cruzes)
APÊNDICE VIII	Discordâncias entre os Examinadores
APÊNDICE IX	Resultado da Expressão Semi-quantitativa (escore)
APÊNDICE X	Resultados das Curvas ROC
APÊNDICE XI	Correlação entre Imunoexpressão e Variáveis Categóricas
APÊNDICE XII	Correlação entre Imunoexpressão e Variáveis Contínuas
APÊNDICE XIII	Dados de Seguimento

Lista de Figuras

Figura 1	Foto de microscopia com imunoexpressão positiva da Ciclina G em tecido tumoral.	26
Figura 2	Foto de microscopia com padrão de distribuição de células com imunoexpressão positiva em tecido normal preferencialmente na região da base das criptas.	26
Figura 3	Foto de microscopia com imunoexpressão negativa da Ciclina G em tecido tumoral.	27
Figura 4	Foto de microscopia com a presença de retículo 10x10x10µm para contagem das células.	27
Figura 5	Foto de microscopia com diferentes resultados de imunoexpressão conforme quantificação imunohistoquímica através de método semi-quantitativo (A- Tumor duas cruzes; B – Tumor três cruzes).	30
Figura 6	Fotos de microscopia com diferentes resultados de imunoexpressão conforme quantificação imunohistoquímica através de método semi-quantitativo (A- Normal escore baixo; B – Tumor escore alto).	31
Figura 7	Curva ROC com imunoexpressão da Ciclina G (quantitativa) e ausência de metástases linfonodais (área de 0,69 e p=0,05).	45
Figura 8	Curva ROC com imunoexpressão da Ciclina G (quantitativa) e ausência de metástases a distância (área de 0,69 e p=0,16).	46
Figura 9	Curva ROC com imunoexpressão da Ciclina G (quantitativa) e recidiva (área de 0,52 e p=0,81).	47
Figura 10	Curva ROC com imunoexpressão da Ciclina G (quantitativa) e imunoexpressão da Ciclina G (cruzes) (área de 0,87 e p=0,001).	48
Figura 11	Curva ROC com imunoexpressão da Ciclina G (quantitativa) e imunoexpressão da Ciclina G (escore) (área de 0,81 e p=0,001).	49

Figura 12	Curvas de sobrevivência geral e livre de doença comparando pacientes com resultado de imunoexpressão quantitativa Tumor>Normal e Normal≥Tumor (p=0,075 e p=0,84 respectivamente).	53
Figura 13	Curvas de sobrevivência geral e livre de doença comparando pacientes com resultado de imunoexpressão semi-quantitativa (cruzes) Tumor>Normal e Normal≥Tumor (p=0,18 e p=0,84 respectivamente).	53
Figura 14	Curvas de sobrevivência geral e livre de doença comparando pacientes com resultado de imunoexpressão semi-quantitativa (escore) Tumor>Normal e Normal≥Tumor (p=0,33 e p=0,63 respectivamente).	54

Lista de Tabelas

Tabela 1	Dados quantitativos e qualitativos para determinação da expressão semi-quantitativa.	29
Tabela 2	Características clínico-cirúrgicas gerais.	36
Tabela 3	Características anátomo-patológicas gerais.	38
Tabela 4	Análise semi-quantitativa – resultado da expressão (cruzes).	40
Tabela 5	Concordância dos resultados entre os examinadores.	41
Tabela 6	Resultado da análise semi-quantitativa conforme sistema de pontuação (escore).	42
Tabela 7	Representação da distribuição de pacientes conforme a comparação entre o resultado de escore nos tecidos tumoral e normal.	42
Tabela 8	Concordância no resultado do teste de escore entre os examinadores.	43
Tabela 9	Correlação entre os resultados dos testes (porcentual, cruzes e escore).	44
Tabela 10	Correlação entre imunoeexpressão e parâmetros de acometimento linfonodal (pN).	51
Tabela 11	Sobrevivência geral e livre de doença em 3 anos entre pacientes com resultado de imunoeexpressão (quantitativo e semi-quantitativos) Tumor>Normal e Normal≥Tumor.	52

Lista de Siglas

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
CEA	antígeno cárcino-embrionário
DNA	ácido desoxirribonucleico
Ig	Imunoglobulina
RNA	ácido ribonucleico
ROC	<i>Receiver Operating Curve</i> (curva de características operacionais)
UICC	União Internacional Contra o Câncer

Resumo

Perez RO. Determinação da expressão da Ciclina G no câncer do reto [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 93p

Introdução: A identificação de mecanismos genéticos envolvidos no processo de carcinogênese do câncer colorretal levou ao surgimento de novas estratégias terapêuticas como a terapia gênica. Através do bloqueio ou estímulo de determinados alvos genéticos ou moleculares seria possível interromper o ciclo celular de células transformadas. Uma das estratégias sugeridas foi a utilização de seqüências “anti-sense” do gene da ciclina G que revelou resultados iniciais clínicos e experimentais promissores em diversas neoplasias, inclusive na colorretal. Assim seria esperado que a expressão da ciclina G estivesse freqüentemente alterada de maneira seletiva nas células do câncer colorretal quando comparado às células normais. Por estas razões, decidiu-se estudar a expressão da ciclina G em pacientes com câncer do reto.

Métodos: Dados clínicos, epidemiológicos, anátomo-patológicos e de sobrevivência de 36 pacientes com câncer do reto foram obtidos e correlacionados com os resultados de expressão imunohistoquímica da ciclina G. O tecido neoplásico e normal distante da lesão primária foram submetidos a reação imunohistoquímica com anticorpo monoclonal anti-ciclina G e quantificados através de três métodos: (1) quantitativo, obtido a partir da contagem de células determinando a razão entre o número de células positivas e o número total de células contadas em 10 campos; (2) semi-quantitativo (cruzes), obtido a partir da pontuação em sistema de cruzes conforme a intensidade e quantidade de células positivas em áreas de maior impregnação do corante; (3) semi-quantitativo (escore), obtido a partir da pontuação em sistema de escore (alto ou baixo) conforme a intensidade e quantidade de células positivas em áreas de maior impregnação do corante. O estudo estatístico incluiu teste T de student, Qui-quadrado, exato de Fisher, teste *t* pareado, Wilcoxon, log-rank e curva ROC sendo considerados significativos quando o valor de $p < 0,05$.

Resultados: A expressão da ciclina G foi positiva em $76,5 \pm 30\%$ das células contadas, com média de $3,2 \pm 1,1$ cruzes e escore alto em 32 pacientes no tecido tumoral. No tecido normal dos pacientes a positividade foi de $42,2 \pm 27,4\%$, com média de $1,9 \pm 1,1$ cruzes e escore alto em 16 casos. Quando comparados os tecidos tumoral e normal de cada paciente, o resultado tumor > normal foi obtido em 28 (77,8%) pacientes (quantitativa), 27 (75%) pacientes (semi-quantitativa/cruzes) e 18 (50%) pacientes (semi-quantitativa/escore). A diferença de expressão entre tecido tumoral e tecido normal maior que 10% apresentou correlação com ausência de metástases sistêmicas

enquanto que a diferença maior que 38% apresentou correlação com a ausência de metástases linfonodais (área da curva 0,69 nos dois casos). Houve correlação entre o resultado tumor>normal e a ausência de metástases linfonodais quando o método de quantificação foi semi-quantitativo (cruzes e escore; $p=0,02$ e $0,04$). Não houve correlação entre o resultado tumor>normal e as demais características. Não houve influência do resultado tumor>normal nas curvas de sobrevivência (3 anos).

Conclusões: A expressão da ciclina G é maior no tecido neoplásico do câncer colorretal quando comparada ao tecido normal. Apesar disso, a expressão da ciclina G é raramente nula no tecido normal. A expressão de ciclina G tumor>normal esteve associada a ausência de metástases linfonodais quando mensurada através de métodos semi-quantitativos. Apesar disso, a expressão alterada da ciclina G não tem influência sobre sobrevivência precoce em pacientes com câncer do reto.

Summary

Perez RO. Determination of Cyclin G expression in rectal cancer [thesis]. São Paulo: University of São Paulo School of Medicine; 2006. 93p

Introduction: Identification of genetic mechanisms involved in colorectal cancer carcinogenesis led to the development of new treatment strategies such as gene therapy. The aim of this strategy is to interrupt cell-cycle of transformed malignant cells by blocking or stimulating specific gene expression. Utilization of cyclin G antisense constructs has been suggested with clinical and experimental promising results in various neoplasias, including colorectal cancer. In this setting, one would expect that cyclin G would be selectively overexpressed in colorectal cancer cells as opposed to normal tissue. For this reason, we decided to study cyclin G expression in patients with rectal cancer.

Methods: Clinical, epidemiological, pathological and survival data from 36 patients with rectal cancer was collected and correlated with Cyclin G immunohistochemical expression. Neoplastic and non-adjacent normal tissue were stained with monoclonal anti-Cyclin G antibody and quantified according to 3 different methods: (1) quantitative, obtained from cell count and determined by the ratio between positive counted cells and total number of counted cells observed in 10 microscopic fields; (2) semi-quantitative (crosses), obtained from a scoring system that takes into account both quantity and intensity of most strongly stained areas; (3) semi-quantitative (score), obtained from a scoring system that takes into account both quantity and intensity of most strongly stained areas. Statistical analysis included ROC curves, student's T, Chi-square, Fisher's exact, log rank, Wilcoxon, and paired *t* test. Significant differences were considered for $p < 0.05$.

Results: In tumor-tissue, positive Cyclin G expression was observed in $76.5 \pm 30\%$ of counted cells, with a mean number of 3.2 ± 1.1 crosses and high expression score in 32 patients (89%). In normal tissue, positive cyclin G expression was observed in $42.2 \pm 27.4\%$ of counted cells, with a mean of 1.9 ± 1.1 crossed and high expression score in 16 patients. When comparing tumor and normal tissue within each patient, a result of tumor > normal cyclin G expression was observed in 28 (77.8%) patients (quantitative method), 27 (75%) patients (semi-quantitative crosses) and 18 (50%) patients (semi-quantitative score). A difference of cyclin G expression between tumor and normal tissue greater than 10% was associated with the absence of metastatic disease. A difference of cyclin G expression between tumor and normal tissue greater than 38% was associated with the absence of lymph node metastases (ROC curve area of 0.69 in both cases). There was significant association between cyclin G expression tumor > normal result and the absence of lymph node metastases when using semi-quantitative quantification methods ($p = 0.02$ for crosses;

p=0.04 for score). There was no association between cyclin G expression and other patient's characteristics or survival.

Conclusion: Cyclin G expression is greater in tumor tissue when compared to normal tissue in patients with rectal cancer. However, cyclin G expression in normal tissue is rarely absent. Tumor>normal cyclin G expression is significantly associated with absence of lymph node metastases when quantified using semiquantitative methods. However, cyclin G expression had no influence in short-term survival.

CAPÍTULO 1

Introdução

Introdução

Acredita-se que o câncer colorretal seja responsável por aproximadamente um milhão de casos novos e 500.000 mortes por ano em todo mundo (Jemal et al., 2005). Excluindo-se os tumores de pele, sua incidência mundial é menor apenas do que a do câncer de mama e a do câncer de pulmão (Parkin et al., 2005). Somente nos Estados Unidos, cerca de 135.000 casos novos são diagnosticados anualmente e 57.000 pacientes morrerão da doença neste período, correspondendo à segunda causa mais freqüente de morte por câncer naquele país (Greenlee et al., 2001; Ayanian et al., 2003). A participação do câncer do reto nestes números é expressiva, sendo responsável por aproximadamente 41.000 casos novos diagnosticados por ano nos Estados Unidos (Jemal et al., 2005).

Embora os dados específicos sobre câncer do reto não estejam disponíveis no Brasil, estima-se que aproximadamente 20.000 casos novos de câncer colorretal sejam diagnosticados anualmente, acarretando mortalidade de 7.000 indivíduos neste período e correspondendo à quinta causa de morte por câncer no país (Brasil, 2004).

Trata-se, portanto, de doença muito freqüente e com mortalidade significativa. Isto implica que novas alternativas terapêuticas que levem a um incremento, mesmo que modesto, na sobrevivência dos pacientes possam ter enorme impacto na saúde pública destes países (James et al., 2003).

A abordagem atual do câncer do reto é complexa e envolve diversas modalidades terapêuticas como a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia (Saltz e Minsky, 2002; Colquhoun et al., 2003).

Tratamento Cirúrgico

Foi Moynihan em 1908 o primeiro a descrever os princípios do tratamento cirúrgico para o câncer do reto. Neste mesmo ano, Miles descreveu a operação de abordagem combinada pelo abdome e pelo períneo para retirada do reto, o mesocólon pélvico e a “zona de disseminação cefálica”, já acenando para a preocupação com a ressecção dos linfonodos no câncer do reto (Miles, 1908; Miles, 1971).

Lockhart-Mummery em 1926 e Dukes em 1932, propuseram pela primeira vez o estadiamento do câncer colorretal conforme o seu grau de penetração na parede do órgão e a presença de metástases linfonodais. O próprio Dukes em 1943 iniciou a classificação das metástases linfonodais no câncer do reto conforme sua localização em relação ao pedículo vascular do órgão já que isto poderia ter influência no prognóstico dos pacientes. Além disso, Dukes e Bussey (1958) estabeleceram a importância de outros achados do exame anátomo-patológico no prognóstico de pacientes operados por câncer colorretal, como a presença de invasão vascular. Este conceito levou os cirurgiões a estudarem o efeito de ligaduras vasculares precoces (antes da mobilização cirúrgica do segmento intestinal sede do tumor) no prognóstico dos pacientes (Turnbull et al., 1967; Wiggers et al., 1988). Assim, a extensão da dissecação linfonodal também foi objetivo de estudo para comprovar a vantagem da ligadura da artéria mesentérica inferior junto à sua origem ou não com relação ao prognóstico dos pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico radical, supostamente justificada pela maior extensão da linfadenectomia pela primeira (Bacon e Khubchandani, 1964; Pezim e Nicholls, 1984; Surtees et al., 1990; Slanetz e Grimson, 1997). De fato, embora não tenha sido comprovado benefício em termos de sobrevivência tardia, a ligadura arterial na sua origem tem sido recomendada durante o tratamento cirúrgico radical para o câncer do reto (Tjandra et al., 2005).

Durante muitos anos, o procedimento proposto por Miles, conhecido como amputação abdomino-perineal do reto, foi considerada a operação padrão no tratamento cirúrgico do câncer do reto, resultando em pacientes com colostomias definitivas e com graus variados de disfunções do aparelho urinário e sexual (Miles, 1908; Daly e DeCosse, 1983; Luna-Perez et al., 2001b). A observação de que a ressecção radical do reto com margem livre distal de dois centímetros do tumor primário do ponto de vista macroscópico seria suficientemente segura para evitar a recidiva local da doença, fez com que as operações com preservação do aparelho esfinteriano com anastomose colorretal ou coloanal passassem a ser alternativas à amputação de reto em algumas situações (Parks, 1982; Parks e Percy, 1982; Pollett e Nicholls, 1983; Williams et al., 1983; Parc et al., 1986; Guillem et al., 2003). Aliado a este fato, o surgimento de grampeadores mecânicos contribuíram para facilitar a realização destas operações em pacientes com tumores de reto anteriormente considerados apenas para amputação de reto (Kyzer e Gordon, 1992). Quirke alertou que além da margem distal, é importante a verificação da margem radial através de estudo anátomo-patológico minucioso da peça cirúrgica (Quirke et al., 1986). Desta forma, tanto a margem distal como a radial, a ligadura da artéria mesentérica inferior na sua origem e a ressecção combinada de estruturas adjacentes tornaram-se princípios básicos a serem respeitados durante o tratamento cirúrgico do câncer do reto para se obter a radicalidade oncológica da operação.

Apesar da compreensão e aplicação destes princípios, os resultados do tratamento cirúrgico eram insatisfatórios com relação ao controle local da doença. As taxas de recidiva local da doença após o tratamento cirúrgico considerado radical variavam entre 12% a 38% (Kapiteijn et al., 2002; Kapiteijn e van de Velde, 2002).

Heald em 1979 introduziu o conceito de excisão total do mesorreto,

com dissecação através de visão direta da camada externa gordurosa do mesorreto em plano avascular. Os resultados obtidos em pacientes com o emprego desta técnica revelaram índices muito menores de recidiva local da doença quando comparados aos de outros autores (Heald e Ryall, 1986). Apesar dos resultados iniciais promissores, houve dificuldade de se reproduzir os mesmos baixos índices de recidiva local em outros centros (Kapiteijn et al., 1999). Atualmente, o próprio Heald considera que o emprego da excisão total do mesorreto pode oferecer índices muito baixos de recidiva em casos selecionados, principalmente relacionados às características do tumor primário como a profundidade de penetração na parede do órgão, tamanho e mobilidade do tumor (Simunovic et al., 2003).

Há que se ressaltar que a experiência do cirurgião e da instituição podem ter influência no resultado final tanto do ponto de vista imediato como tardio dos pacientes tratados por câncer de reto. A incidência de complicações pós-operatórias imediatas bem como a sobrevivência geral dos pacientes podem ser significativamente diferentes conforme o cirurgião ou instituição com grande volume de casos quando comparados àqueles com menor número de casos (Fielding et al., 1980; Flood et al., 1984b; Flood et al., 1984a; Hannan et al., 1989; McArdle e Hole, 1991; Kessler et al., 1993; Hermanek et al., 1995; Simons et al., 1997; Porter et al., 1998). Apesar disso, é grande a dificuldade de se valorizar exclusivamente estes fatores quando outros, extremamente variáveis podem ter influência ainda maior nos resultados destes pacientes como a anestesia, cuidados pré e pós-operatório, seguimento ambulatorial, aplicação de terapias adjuvantes, e finalmente o diagnóstico e tratamento da recidiva da doença. Mesmo assim, fica claro que o resultado do tratamento cirúrgico pode ser considerado decepcionante em determinadas instituições e com cirurgiões com baixo volume de casos, reforçando a idéia de que as operações para o câncer do reto merecem treinamento específico por parte

de cirurgiões em instituições especializadas.

Terapia Adjuvante

A observação estrita aos princípios oncológicos aplicáveis durante o tratamento cirúrgico do câncer do reto pode resultar na remoção completa do tecido neoplásico viável. Apesar disso, o risco da presença de tecido tumoral microscópico fora da área de ressecção justifica o emprego de terapêutica adjuvante (Saltz e Minsky, 2002). Especificamente no câncer do reto, existe a preocupação também do controle local além do controle sistêmico da doença (Saltz e Minsky, 2002).

O principal fator determinante no prognóstico do câncer do reto é o estadiamento final da doença dado pelo estudo anátomo-patológico do espécime ressecado. Desta forma, o grau de penetração do tumor na parede do reto (pT), a presença de metástases linfonodais (pN) ou ainda de metástases à distância (M) são as características que têm maior influência na sobrevivência dos pacientes após tratamento cirúrgico considerado curativo no controle do tumor primário (Dukes, 1932; Astler e Coller, 1954; Jass, 1988; Jass, 1995; Greene et al., 2002). Portanto, pacientes com tumores com invasão da parede do reto além da camada muscular sem linfonodos comprometidos (estadio II) ou ainda com a presença de metástases linfonodais (estadio III) têm risco significativamente maior de apresentarem doença residual microscópica e são candidatos à complementação terapêutica (Minsky et al., 1988; Saltz e Minsky, 2002; Tjandra et al., 2005).

Inicialmente, o emprego de 5-Fluoracil (5-FU) isoladamente como terapêutica adjuvante no câncer colorretal não conseguiu demonstrar incremento da sobrevivência geral e sobrevivência livre de doença em pacientes com estágio II e III (Dwight et al., 1973; Higgins et al., 1976; Gastrointestinal Tumor Study Group, 1984). Contudo, estudos com grande número de pacientes,

distribuídos de maneira aleatória, com o emprego de 5-FU associado ao ácido folínico conseguiu demonstrar aumento da sobrevivência em pacientes em estágio III do câncer colorretal, muito embora o mesmo incremento não fosse observado em pacientes em estágio II da doença (Wolmark et al., 1988; Laurie et al., 1989; Moertel et al., 1990; Moertel et al., 1995a; Moertel et al., 1995b; International Multicentre Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials (IMPACT B2) Investigators, 1999)

Como o controle local da doença também é objetivo da complementação terapêutica especificamente no câncer do reto, a irradiação da pelve tem papel relevante nesta situação (Saltz e Minsky, 2002). Isoladamente, a radioterapia pode ter impacto significativo na redução da recidiva local do câncer de reto (Swedish Rectal Cancer Trial, 1997; Kapiteijn et al., 2001). Contudo, a combinação de radioterapia com quimioterapia pode oferecer resultados ainda melhores quando utilizadas concomitantemente no período pós-operatório (Gastrointestinal Tumor Study Group, 1985; Krook et al., 1991; Wolmark et al., 2001).

O emprego de radioterapia e quimioterapia no período pré-operatório de pacientes com câncer de reto pode ter vantagens sobre seu emprego no período pós-operatório como menor toxicidade aguda, maior sensibilidade à radioterapia em função da presença de células com melhor oxigenação levando a um melhor resultado oncológico. Além disso, a regressão do tumor primário em consequência da aplicação da radioterapia associada à quimioterapia pode levar a uma maior possibilidade de preservação esfinteriana (Minsky, 1996; Habr-Gama et al., 1998; Saltz e Minsky, 2002; Habr-Gama et al., 2004; Sauer et al., 2004). Esta regressão do tumor (conhecida pelo termo “downstaging” da língua inglesa) pode ser parcial ou ainda completa levando à ausência de células tumorais viáveis nos espécimes ressecados verificado pelo exame histopatológico. Esta resposta patológica completa pode ser observada em

5% a 29% dos casos, muito embora ainda sejam escassas as informações sobre a sua influência nos índices de sobrevivência geral e livre de doença a longo prazo (Habr-Gama et al., 1998; Luna-Perez et al., 2001a; Medich et al., 2001; Habr-Gama et al., 2005).

Resultados do Tratamento Combinado

Mesmo com a realização de intervenções cirúrgicas consideradas radicais, incluindo a excisão total do mesorreto, em associação com a radioterapia e quimioterapia pré ou pós-operatórias, os índices de recidiva local ou sistêmica podem ser elevados. Acredita-se que a cada 100 pacientes com câncer colorretal ressecados, aproximadamente 50 serão curados, dez falecerão com recidiva pélvica, cinco com recidiva por infiltração linfática e 35 com recidiva sistêmica em função de metástases por via hematogênica (Morson et al., 1990).

Além disso, aproximadamente 70% dos casos são ressecáveis no momento do diagnóstico, restando assim cerca de 30% dos casos sem possibilidade de cura através de tratamento cirúrgico (Wade et al., 1996).

A recidiva local ou pélvica do câncer do reto tem impacto negativo significativo na sobrevivência e na qualidade de vida dos pacientes (Camilleri-Brennan e Steele, 2001). Cerca de um terço dos pacientes podem, ainda assim, ser submetidos a procedimentos cirúrgicos radicais de resgate com ressecção completa da recidiva pélvica. Estes procedimentos estão associados a altos índices de morbidade e mortalidade e com resultados de sobrevivência em 5 anos que variam de 0-38% (Yamada et al., 2001).

Na recidiva sistêmica, a metástase hepática é o evento mais comum e as taxas de ressecabilidade variam entre 5% a 7% de todos os casos (Fortner et al., 1984a; Fortner et al., 1984b; Registry of Hepatic Metastases, 1988; Fortner e Lincer, 1990; Wanebo et al., 1996). Nestes pacientes, os resultados

de sobrevivência em longo prazo podem variar entre 25-48% (Scheele et al., 1995; Fong et al., 1999).

Portanto, resta uma parcela significativa de pacientes com câncer colorretal sem possibilidade de tratamento curativo seja por doença inicial irresssecável, ou recidiva pós-operatória, incluídos neste segundo grupo as metástases sistêmicas e as recidivas pélvicas, freqüentemente irresssecáveis (Gunderson et al., 1985).

Ciclo Celular, Ciclinas e Carcinogênese

Atualmente, o câncer é considerado o resultado de múltiplas etapas dirigidas por alterações genéticas que determinam a formação de uma célula ou um clone de células com características de proliferação e diferenciação celular distintas das células normais. Em geral, estas características são consequência de descontrole do ciclo celular, fazendo com que a célula seja constantemente estimulada a entrar e progredir no ciclo celular ou então, seja impedida de sair deste ciclo, através de sua diferenciação final em célula com função especializada ou ainda, através de morte celular programada (apoptose) (Kerr et al., 1972; Vogelstein e Kinzler, 2002).

O processo de replicação celular é conhecido como ciclo celular. Deste processo surgem duas células-filhas idênticas, capazes de repetir o processo de duplicação. Para que este fenômeno de reprodução ocorra são necessários: replicação do material genético (genoma); duplicação da massa celular (no que diz respeito aos demais componentes celulares não-cromossômicos); e segregação precisa do material genético replicado. A execução destes eventos pode ser dividida em quatro fases do ciclo celular: (1) duplicação do material genético (cromossômica) durante a fase de síntese (fase S); (2) segregação dos componentes celulares e cromossomos entre duas células filhas na fase de mitose (fase M); duas fases intermediárias, chamadas de fase G1 e G2 (do

inglês “gap”, significando intervalo entre as fases S e M), a primeira antes e a segunda depois da fase S. A reprodução fiel de uma célula requer coordenação perfeita entre as fases do ciclo celular. Apesar disto, estas fases ocorrem de maneira independente uma das outras, sendo reguladas por mecanismos distintos como veremos a seguir (Clurman e Roberts, 2002).

Eventos bioquímicos específicos determinam a passagem de uma das fases para a fase seguinte do ciclo celular (“checkpoints”). Este mecanismo de defesa evita que uma célula se divida quando há, por exemplo, defeitos grosseiros na replicação de seu material genético ou então, replicação incompleta deste material (Gillett e Barnes, 1998; Clurman e Roberts, 2002).

Dependendo do tipo de célula e estado de diferenciação, ela pode deixar o ciclo celular e se manter viável, também conhecido como estado de quiescência (fase G0). Em geral, células totalmente diferenciadas entram na fase G0 de maneira irreversível. Apesar disso, existem células que podem manter-se quiescentes indefinidamente como os hepatócitos, e portanto voltar a se replicar em situações específicas (Gillett e Barnes, 1998).

Em geral, a replicação celular só ocorre quando há necessidade para tal, sinalizada por estímulos extracelulares. Desta forma, células normais são recrutadas para o estado de replicação de maneira periódica. Frequentemente, células tumorais são recrutadas de maneira contínua para o estado de replicação celular em situações que células normais não estariam se replicando. Além disso, a célula tumoral pode perder o mecanismo de defesa (checkpoints), de tal forma que o ciclo celular segue para a fase seguinte mesmo que a fase anterior apresente erros grosseiros (Gillett e Barnes, 1998; Clurman e Roberts, 2002).

O ciclo celular tem duração de acordo o tipo celular específico e mesmo as células normais com duração da replicação mais curta, tem duração de pelo menos 24 horas. As células tumorais não têm ciclo celular acelerado

ou abreviado. Ao contrário, sua duração é semelhante a sua contrapartida normal. A diferença é que esta célula está sendo constantemente recrutada para a replicação celular, levando a um alto ritmo de proliferação celular e independente de estímulos externos (Gillett e Barnes, 1998; Clurman e Roberts, 2002).

Mutações em genes específicos podem alterar a função ou expressão de seu produto final, a proteína. Esta proteína poderá ter papel essencial durante o controle do processo de replicação celular. Algumas proteínas podem ter função reguladora ou inibitória do ciclo celular, de tal maneira que a perda de sua função ou diminuição significativa de sua expressão podem levar a perda deste efeito inibitório. Esta célula torna-se então, altamente suscetível a fatores estimulantes e a favor da entrada no processo de replicação celular (ciclo celular). Estes genes, cuja perda de função podem contribuir para o processo de desregulação do ritmo de proliferação celular são conhecidos como genes supressores de tumor (Vogelstein e Kinzler, 2002).

Por outro lado, algumas proteínas podem ser responsáveis pelo estímulo de progressão da célula no processo de replicação celular através do ganho de função. Em condições normais, a expressão dos genes responsáveis por estas proteínas pode ser insuficiente para promover ou deflagrar o processo. Algumas mutações ou alterações genéticas podem levar a um aumento de sua expressão tornando-a suficiente para estimular a célula a se replicar. Estes genes que podem contribuir para processo de desregulação do ciclo celular através de ganho de sua função são chamados de oncogenes. A sua contrapartida normal, quando sua expressão é incapaz de promover a proliferação celular, é chamada de proto-oncogene (Park, 2002).

Desta forma, estes genes codificam proteínas com diferentes funções, mas que podem de alguma forma interferir nos mecanismos de regulação do ciclo celular (Clurman e Roberts, 2002).

Até recentemente, os mecanismos bioquímicos envolvidos no controle do ciclo celular eram pouco conhecidos. Duas descobertas contribuíram de maneira significativa para sua compreensão, mesmo que ainda de maneira incompleta. A primeira foi a identificação de duas proteínas (ciclínas) que apresentam padrão de expressão cíclica durante o ciclo celular de microrganismos marinhos (Evans et al., 1983). Estas proteínas apresentam aumento de sua expressão de maneira persistente em fases específicas do ciclo celular (G1-S-G2) e queda durante a fase de mitose (M). A segunda descoberta foi a identificação de genes mutados que codificavam proteínas que interrompiam o ciclo celular, também em fases específicas (Hartwell et al., 1973; Gillett e Barnes, 1998). Esta observação sugeria que os genes normais deveriam codificar proteínas que regulavam a progressão da célula no ciclo celular, e, portanto, na ausência da sua expressão, ou ainda na ocorrência de expressão de proteína diferente da normal em função de mutação no gene responsável, não permitiria a passagem da célula para a fase seguinte (Clurman e Roberts, 2002).

O controle do ciclo celular é feito através da fosforilação de proteínas, executada por uma família de enzimas denominadas quinases-dependentes de ciclínas ("cyclin dependent kinases" - CDK). Cada uma das enzimas desta família parece ter função diferente durante fases específicas do ciclo. Estas enzimas (CDK) são ativadas por proteínas (ciclínas) específicas, que são assim chamadas graças às concentrações cíclicas que apresentam durante o ciclo celular. Desta maneira, a CDK só pode ser ativada quando a sua ciclina correspondente atinge concentrações críticas, exercendo assim sua atividade e sendo desativada com a diminuição da concentração da ciclina. Algumas CDKs, entretanto, são ativadas por mais de uma ciclina, formando um complexo que pode ficar ativado por período maior de tempo (Morgan, 1995; Morgan, 1997; Gillett e Barnes, 1998).

Pelo menos 14 subgrupos de ciclinas já foram identificados (chamadas de ciclina A a J, algumas com subdivisões como G1 e G2). Comum à estrutura de todos os membros desta família são uma série de 100 aminoácidos chamados de cyclin box. Além disso, muitas delas possuem seqüências similares na sua porção amino-terminal chamada de “destruction box” que tem função na sua própria degradação (Lees e Harlow, 1993; Murray, 1995; King et al., 1996; Chellappan et al., 1998; Gillett e Barnes, 1998).

O estímulo para divisão celular pode ser feito por meio de inúmeros sinais externos, incluindo fatores de crescimento e hormônios. Quando estas moléculas ligam-se a receptores celulares específicos desencadeiam sinais para célula em repouso (G0) iniciar progressão no ciclo celular e finalmente resultar em divisão celular. Estes sinais iniciais afetam as concentrações das ciclinas D e E, chamadas também de ciclinas da fase G1. Ao final desta fase, ocorre elevação das concentrações da ciclina E logo antes da fase de síntese (S) (Sherr, 1995; Gillett e Barnes, 1998).

Quando a célula entra na fase S ocorre rápida degradação da ciclina E e elevação da concentração da ciclina A. Uma vez terminada a fase S, a fase G2 promove um intervalo entre os eventos fundamentais de síntese e divisão mitótica do DNA. Neste momento, a célula se certifica que o DNA foi replicado de maneira completa e acurada (Minnick e Kunkel, 1996; Stillman, 1996; Gillett e Barnes, 1998).

A divisão mitótica do DNA somente se inicia quando ocorre ativação da CDK1 pela ciclina B. Após seu término, ocorre degradação da ciclina B e a célula pode voltar a G0 ou G1 (Morgan, 1995; Gillett e Barnes, 1998).

A transição entre as diversas fases do ciclo tem ainda a participação de proteínas chamadas de inibidores da CDK (CDKI). Estes inibidores podem bloquear a ativação das CDKs pelas ciclinas. Desta forma, podem interromper temporariamente a célula durante o ciclo até que existam condições para o

seu prosseguimento ou então ativar o processo de morte celular programada (apoptose) (Gillett e Barnes, 1998).

A ciclina G, foi inicialmente identificada como um dos alvos da expressão do gene supressor de tumor p53 e é a única ciclina cuja expressão está associada à transcrição deste gene (Wu et al., 1994; Skotzko et al., 1995; Smith et al., 1998). Além disso, o gene da ciclina G não possui seqüência que determine a degradação de seu produto, também conhecida como “destruction box” (Horne et al., 1996). Apesar de sua homologia com outras ciclinas, sua quinase correspondente ainda não foi identificada. Ao contrário dos demais genes com expressão influenciada pela transcrição do gene p53 como o BAX, p21 e outros, a ciclina G parece não exercer função inibitória da proliferação celular como os genes supressores de tumor, mas sim a função de promover a proliferação celular como outras ciclinas e oncogenes (Wu et al., 1994; Skotzko et al., 1995; Smith et al., 1998). Na realidade, a ciclina G (também denominada ciclina G1) pertence a um subgrupo de ciclinas com similaridade estrutural que também inclui a ciclina G2 e a ciclina I (Horne et al., 1996; Jensen et al., 2000). Contudo, a fim de se evitar confusões de nomenclatura, já que existe a fase do ciclo celular conhecida como G1, assim como as ciclinas envolvidas na fase G1 são rotuladas com a mesma sigla, utilizaremos o nome de ciclina G referindo-se a ciclina G1 durante todo o texto (Bates et al., 1996; Horne et al., 1996; Jensen et al., 1999; Jensen et al., 2003).

A exposição de linhagens de células tumorais de câncer de cólon (RKO) à expressão aumentada do gene da ciclina G resulta em uma aceleração do crescimento celular sugerindo mecanismo de ação deste gene semelhante ao dos proto-oncogenes e ao das outras ciclinas (Smith et al., 1997).

A identificação da expressão alterada do gene da ciclina G nos cânceres da mama, próstata e osteossarcoma “in vitro” e “in vivo” sugere que ocorra desregulação da sua expressão durante o processo de carcinogênese

destes tumores. Além disso, esta expressão alterada do gene da ciclina G pode contribuir para o processo de carcinogênese de alguns tipos de tumores. Assim sendo, o gene da ciclina G merece estudo para avaliar seu valor no diagnóstico, no prognóstico e como alvo de novas alternativas terapêuticas para os diversos tumores em que sua expressão alterada possa estar envolvido no processo de carcinogênese.

Novas Alternativas Terapêuticas

Com o objetivo de melhorar os resultados obtidos com o tratamento cirúrgico, radioterápico e quimioterápico, além de oferecer alternativa terapêutica a pacientes com doença irrecorrível ou recorrente, justifica-se o estudo e o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas como a radioterapia intraoperatória, a braquiterapia, as vacinas, os anticorpos monoclonais e a terapia gênica no câncer colorretal (Goes et al., 1997; Kuehne et al., 2003; Mocellin e Campana, 2005; Mocellin et al., 2005; Moehler et al., 2005).

A partir da década de 1990, têm sido desenvolvidos estudos de terapia gênica como alternativa terapêutica para diversos tipos de neoplasia incluindo o câncer colorretal. Trata-se de uma estratégia que envolve a oferta de material genético através de vetor específico com o objetivo de corrigir, substituir ou bloquear a expressão de algum gene potencialmente envolvido no processo de carcinogênese de determinado tumor. Uma maneira descrita para este objetivo inclui a oferta de material genético complementar a uma sequência específica (sequência “anti-sense”) que é capaz de bloquear a expressão de determinado gene. A terapia gênica utilizando a sequência anti-sense da ciclina G poderia se apresentar como alternativa promissora para o tratamento complementar do câncer colorretal irrecorrível, metastático ou recidivado. O bloqueio da expressão da ciclina G, além do mecanismo de bloqueio direto

da proliferação tumoral, poderia atuar sobre células endoteliais durante o processo de angiogênese causando desproporção entre a massa celular e a vascularização com conseqüente isquemia e necrose.

Desta forma, com o objetivo de avaliar se a ciclina G é candidata a alvo eficiente de terapia gênica é necessária a determinação da expressão da ciclina G no adenocarcinoma do reto e (1) verificando a freqüência da expressão alterada no câncer do reto e (2) determinando se a expressão imunohistoquímica deste gene no câncer do reto é maior, menor ou igual quando comparada à mucosa normal. No caso da ciclina G ser expressa de maneira aumentada e freqüente no tecido neoplásico quando comparado ao tecido normal torna este gene promissor para esta forma de terapia. Se não houver diferença entre a expressão no tumor e no tecido normal, isto provavelmente indica pouca participação da desregulação da expressão deste gene no processo de carcinogênese do câncer do reto. Finalmente no caso de haver diferença de expressão entre o tumor e o tecido normal, porém tratar-se de evento ocasional ou raro, tornaria o gene um alvo útil se bem que a um número muito restrito de casos dado à baixa freqüência do evento.

A hipótese que será testada no estudo proposto é que a expressão imunohistoquímica da Ciclina G é maior no adenocarcinoma do reto quando comparada com o tecido normal.

CAPÍTULO 2

Objetivos

Objetivos

1. Comparar a expressão do gene da ciclina G entre o câncer do reto e a mucosa do reto normal distante da lesão primária.
2. Correlacionar as características clínicas dos pacientes e anátomo-patológicas dos tumores com neoplasia do reto com a expressão da ciclina G no câncer do reto.
3. Correlacionar a ocorrência de recidiva e taxas de sobrevivência precoce dos pacientes tratados por câncer de reto (3 anos), com a expressão tumoral da ciclina G.

CAPÍTULO 3

Métodos

Métodos

Casuística

Foram incluídos no estudo, de maneira retrospectiva, 40 pacientes consecutivos, portadores de adenocarcinoma do reto, submetidos a tratamento cirúrgico no período de fevereiro de 1999 a novembro de 2002, na Disciplina de Coloproctologia do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), que tinham blocos de parafina do tumor primário e do tecido normal disponíveis no Serviço de Anatomia Patológica deste Hospital.

Foram incluídos somente os pacientes com tumores localizados a menos de 15 centímetros da borda anal, verificado por exame endoscópico, (colonoscopia ou proctoscopia). Foram excluídos os pacientes com qualquer tipo de tratamento pré-operatório com radioterapia, quimioterapia ou a combinação de ambos.

O método cirúrgico empregado incluiu a ressecção radical do tumor primário do reto, incluindo a excisão total do mesorreto nos casos de tumor de reto médio ou distal e excisão do mesorreto até 5 cm distalmente à lesão primária no casos de tumor de reto alto; ligadura da artéria mesentérica inferior na sua origem; margens macroscópicas distal e radial de ressecção livres e maiores que dois e um centímetros respectivamente; e as estruturas adjacentes quando houvesse suspeita de invasão por contigüidade foram ressecadas em bloco (Tjandra et al., 2005). Todas as operações foram realizadas pela equipe de cirurgiões da Divisão de Clínica Cirúrgica II - Disciplina de Coloproctologia do HC-FMUSP. Os tipos de intervenção cirúrgica realizada incluíram a amputação abdomino-perineal do reto, retossigmoidectomia com anastomose colorretal ou coloanal primária (ressecção anterior do reto) ou com colostomia terminal (operação de Hartmann). Ileostomia em alça, de proteção, foi

confeccionada nos pacientes em que a anastomose colorretal foi considerada de alto risco para deiscência (localização baixa distando a menos de cinco centímetros da borda anal ou extravasamento de ar ou corante durante o teste para verificação da integridade da anastomose no intraoperatório). A operação de retossigmoidectomia sem anastomose (operação de Hartmann) foi realizada quando não havia condições clínicas do paciente (como por exemplo anemia, hipoalbuminemia ou ocorrência instabilidade hemodinâmica durante a operação).

O estágio da doença foi determinado seguindo as recomendações da AJCC considerando os dados clínicos radiológicos, anátomo-patológicos e os achados intraoperatórios para determinar os parâmetros T, N e M (Greene et al., 2002). Todos os pacientes em qualquer estágio da doença eram submetidos a seguimento ambulatorial em consultas a cada três meses com médico da Disciplina de Coloproctologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Em todas as consultas eram realizados exame clínico e proctológico completos associado a dosagem sérica do antígeno cárcino-embriônico (CEA). Exames radiológicos complementares eram solicitados anualmente de maneira rotineira (ultrassonografia ou tomografia computadorizada do abdome e radiografia do tórax) ou ainda a critério do médico especialista.

Pacientes com estágio II (pT3-4 N0 M0) ou III (pT N1-3 M0) eram encaminhados para o serviço de oncologia para a avaliação de indicação de tratamento adjuvante com radioterapia e/ou quimioterapia. Pacientes com metástases (estadio IV) eram avaliados por oncologista clínico além do cirurgião colorretal para definição da melhor estratégia terapêutica.

Os dados de anamnese, exame físico, exames laboratoriais, exames radiológicos, exames endoscópicos, de descrição cirúrgica, de achados intraoperatórios, de terapêutica complementar com radioterapia ou quimioterapia,

e de seguimento foram obtidos a partir da revisão dos prontuários arquivados no Serviço de prontuários do HC-FMUSP. Quando o paciente havia perdido seguimento no Ambulatório do Serviço de Coloproctologia, o contato telefônico foi utilizado, reconvocando-o para o seguimento adequado naquele Serviço.

Estudo Histopatológico

O exame histopatológico dos espécimes ressecados foram realizados por médico patologista experiente do Departamento de Patologia do HC-FMUSP e revisados por um único patologista (VR). Caracterizou-se o grau de diferenciação conforme a classificação de Broders, a profundidade da penetração do tumor na parede do reto, a ocorrência e o número de metástases linfonodais, a ocorrência de componente mucinoso, a invasão peri-neural, a invasão angiolinfática, o grau de desmoplasia, o infiltrado inflamatório peritumoral e estadiamento UICC/AJCC (Greene et al., 2002).

Os blocos parafinizados referentes aos tecidos da margem proximal e aos tumores primários de cada paciente foram recuperados no Serviço de Arquivo do Departamento de Patologia do HC-FMUSP e lâminas com coloração de hematoxilina e eosina referentes a cada um dos blocos foram re-examinadas por dois observadores independentes (VR e ROP) para confirmar a presença de tecido normal no bloco denominado margem proximal e a presença de tecido tumoral no bloco denominado tumor primário.

Após a confirmação dos tecidos normal e tumoral através de lâminas com coloração de hematoxilina e eosina, foram obtidos novos cortes de cada um dos blocos para realização de reação de imunohistoquímica com anticorpos anti-ciclina G.

Estudo Imunohistoquímico

A partir dos blocos de parafina armazenados no Departamento de Patologia do HC-FMUSP foram obtidas lâminas contendo cortes de tecido de aproximadamente 3 µm de espessura em suporte adequado para desparafinização. As lâminas foram então colocadas em xilol durante 20 minutos, em estufa aquecida entre 60 e 65 °C. Posteriormente as lâminas foram colocadas em banho de xilol frio (temperatura ambiente) por três vezes com duração de um minuto cada banho.

Após a desparafinização deu-se início ao processo de hidratação do material que consistiu na exposição das lâminas a dois banhos em álcool absoluto por um minuto, seguido de um banho em álcool 95% por outro minuto e um último banho em álcool 70% por mais um minuto. Terminados os banhos, submeteu-se o material à lavagem com água corrente seguido de lavagem com água deionizada.

O processo de bloqueio da peroxidase endógena do material foi realizado com a colocação das lâminas em água oxigenada (10 volumes) durante cinco minutos. Este processo foi repetido por sete vezes, seguido de lavagem por água corrente, água deionizada e com solução tampão salino-fosfato (PBS).

A recuperação antigênica foi realizada através da colocação das lâminas em solução de citrato 10 mM, pH=6,0 em alta temperatura em panela a vapor por 50 minutos. Terminado este processo, o material foi retirado da panela aguardando atingir a temperatura ambiente (duração de 20 minutos). Em seguida, o material foi lavado com solução PBS por cinco minutos e posteriormente colocado em banho de leite desnatado 2% por 20 minutos com o objetivo de bloquear as reações inespecíficas (bloqueio de IgG inespecíficas). Finalmente as lâminas foram secadas manualmente ao redor do corte.

A incubação ocorreu após diluição do anticorpo anti-ciclina G primário

(1:20) e colocação das lâminas em câmara úmida. Em seguida, o anticorpo foi colocado sobre os cortes utilizando-se uma micropipeta. As lâminas foram então incubadas em geladeira durante período de 18 a 20 horas. Após este período, o material foi lavado com solução PBS por três vezes durante cinco minutos. Após aplicação do anticorpo secundário biotinilado (Vectastain Elite ABC- Código PK 6102) as lâminas foram incubadas em câmara úmida durante uma hora à temperatura de 37 °C. O processo de lavagem com solução de PBS por três vezes durante cinco minutos foi repetido. As lâminas foram então incubadas com o complexo conjugado com peroxidase (Vectastain Elite ABC- PK 6102) em câmara úmida por 30 minutos à temperatura de 37 °C. Mais uma vez terminado este processo o material foi lavado com solução PBS (três lavagens de cinco minutos cada). Finalmente as lâminas foram colocadas em solução de cromógeno (70 mg de DAB-3'3 Diaminobenzidina - Sigma Cód.:8001), 70 ml de solução PBS e 4 ml de água oxigenada 10 volumes. Após aguardar período de cinco minutos para revelação, o material foi lavado em água corrente por cinco minutos e em seguida contra-corado por solução de hematoxilina de Harris (Merck) por 20 a 25 segundos. Após terminado este processo o material foi novamente lavado em água corrente por cinco minutos.

A montagem das lâminas foi realizada colocando-as em suporte próprio, submetendo-as a banho de álcool 70% por aproximadamente um minuto seguida de outro banho em álcool 95% por outro minuto e finalmente por três banhos seguidos de um minuto cada em álcool absoluto. Terminado este processo, o material foi diafanizado em três banhos seguidos de xilol com duração de um minuto cada. Finalmente a lâmina foi montada com resina sintética e rotulada com o número empregado pelo serviço de arquivo de anatomia patológica não sendo possível a identificação do paciente a não ser pelo pesquisador.

Análise dos Resultados de Imunohistoquímica

A análise da expressão imunohistoquímica foi realizada por 2 examinadores independentes (VR e ROP).

Controles

O controle positivo da reação foi realizado através da utilização de tecido obtido de amígdala normal proveniente do serviço de verificação de óbitos da capital da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A reação de imunohistoquímica, quando positiva, resulta em coloração com tonalidade próxima do marrom e vermelho, localizada no núcleo da célula. A reação, quando negativa, resulta em coloração azul do núcleo da célula.

O controle negativo foi realizado através da realização da reação sem a adição do anticorpo secundário.

O estudo imunohistoquímico, quando positivo, resultou em coloração acastanhada de intensidade variável do núcleo celular (Figuras 1 e 2). Células do estroma, linfócitos e células da camada muscular do reto apresentaram positividade infreqüente e não foram incluídos na análise do resultados. Quando negativo, a coloração nuclear permaneceu na tonalidade azul escuro (Figura 3).

Figura 1 Foto de microscopia com imunoexpressão positiva da Ciclina G em tecido tumoral.

Figura 2 Foto de microscopia com padrão de distribuição de células com imunoexpressão positiva em tecido normal preferencialmente na região da base das criptas.

Figura 3 Foto de microscopia com imunoexpressão negativa da Ciclina G em tecido tumoral.

Figura 4 Foto de microscopia com a presença de retículo 10x10x10µm para contagem das células.

Análise Quantitativa

As células foram contadas com auxílio de um retículo em uma das oculares do microscópio, de dimensões 10x10x10µm (Figura 4). Todas as células do epitélio do reto que eram interseccionadas pelos traços do retículo foram contabilizadas por um observador (ROP), de tal maneira que para cada campo visualizado ao microscópio com aumento de 400x, havia um número de células positivas e um número de células negativas. As células do estroma ou do infiltrado inflamatório peritumoral não foram incluídas na contagem. A contagem foi realizada em 10 campos visuais distintos e aleatórios com aumento de 400x para cada lâmina de tecido tumoral e cada lâmina de tecido normal. Ao término da contagem de 10 campos visuais para cada lâmina era possível determinar uma percentagem de positividade determinada pelo número de células positivas (p) dividido pelo número total células contabilizadas resultante da soma do número de células negativas (n) e células positivas ($p/(p+n)$).

Desta forma, para cada paciente obtivemos uma percentagem de positividade do tecido tumoral (T) e outra referente ao tecido normal (N). Consideraram-se assim, dois grupos, o primeiro no qual ocorreu porcentual de células positivas maior no tecido tumoral (Tumora>Normal) e outro no qual o porcentual de células positivas foi maior ou igual no tecido normal (Normal≥Tumora).

Análise Semi-quantitativa

Além do método exposto acima, foi utilizado também o sistema que leva em conta a intensidade e quantidade da coloração da região considerada mais representativa da reação de imunohistoquímica (“hot spot”) (Yoshikawa e Utsunomiya, 1996). A intensidade de coloração foi dividida em ausente, moderada (valor 1) intensa ou forte (valor 2). O número de células coradas

(razão ou porcentagem) foi dividido em ausente, ocasional ($<1/3$), até um terço das células (valor 1), até dois terços das células (valor 2) e mais do que dois terços das células (valor 3).

Associando os dois resultados, a classificação seguiu a seguinte ordem: negativo quando não houver células coradas; positivo 1 (+) quando houve células ocasionais positivas independente da sua intensidade; positivo 2 (++) quando houve até um terço das células coradas de moderada intensidade; positivo 3 (+++) quando houve até um terço das células coradas de forte intensidade (valor 2) ou até dois terços das células coradas de moderada ou forte intensidade ou ainda mais que dois terços das células coradas em moderada intensidade; e finalmente positivo 4 (++++) quando mais que dois terços coradas de forte intensidade (Tabela 1) (Figura 5).

Tabela 1 Dados quantitativos e qualitativos para determinação da expressão semi-quantitativa.

Fração de Células	Intensidade da Coloração		
	Ausente	Moderada	Forte
Nenhuma	Negativo	Negativo	Negativo
Ocasionais	Negativo	Positivo 1 (+)	Positivo 1 (+)
Até 1/3	Negativo	Positivo 2 (++)	Positivo 3 (+++)
Até 2/3	Negativo	Positivo 3 (+++)	Positivo 3 (+++)
Mais que 2/3	Negativo	Positivo 3 (+++)	Positivo 4 (++++)

Quadros de fundo branco: expressão baixa ou ausente

Quadros de fundo azul: expressão alta

Conforme a classificação proposta acima, considerou-se expressão alta (escore) para a ciclina G apenas os casos classificados como Positivo 3 cruces (+++) e Positivo 4 cruces (++++), isto é, assinalados pelas caselas azuis da tabela 1. Ao contrário, a expressão baixa foi considerada quando os casos forem classificados como Negativo, Positivo 1 cruz (+) ou Positivo 2 cruces (++) , indicados pelas caselas brancas da tabela 1 (Figura 6).

Figura 5 Foto de microscopia com diferentes resultados de imunoexpressão conforme quantificação imunohistoquímica através de método semi-quantitativo (A- Tumor duas cruces; B – Tumor três cruces).

Figura 6 Fotos de microscopia com diferentes resultados de imunoexpressão conforme quantificação imunohistoquímica através de método semi-quantitativo (A- Normal escore baixo; B – Tumor escore alto).

Comparação da Expressão Imunohistoquímica

A avaliação dos resultados do estudo imunohistoquímico foi realizada através da comparação de três métodos:

1. Comparação entre os valores percentuais

Comparação entre as médias das contagens de células através do retículo, obtendo-se desta forma a média da razão do número de células positivas sobre o número total de células contadas para o tecido normal e outra média da mesma razão para o tecido normal (quantitativa).

2. Comparação entre os números de cruces (valor absoluto)

Comparação entre o valor absoluto do número de cruces entre o tecido tumoral e o tecido normal para cada paciente obtido conforme a classificação proposta.

2. Comparação entre o Escore obtido

Comparação entre o escore obtido no tumor e no tecido normal conforme a classificação proposta.

Comparação Entre os Grupos

Com isto, foram considerados 2 grupos para cada tipo de quantificação separadamente: aqueles pacientes em que a expressão da ciclina G no tumor era maior que no tecido normal (Tumor>Normal) e vice versa. Estes dois grupos foram obtidos conforme os três tipos de quantificação: percentual de células positivas (Tumor versus Normal), valor absoluto de cruces (Tumor versus Normal) e escore (considerando Tumor>Normal apenas quando o paciente apresentava a combinação de expressão alta no tumor e baixa no tecido normal).

Estudo Estatístico

Cálculo da Amostra

O cálculo da amostra foi realizado através da estimativa utilizando-se um intervalo de confiança igual a 95% e um poder igual a 80%, tendo valores da normal iguais a 1,96 e 0,84 respectivamente. A proporção estimada para o tecido tumoral foi de 75% e erro amostral máximo de 20%.

A fórmula $N = (1,96 + 0,84)^2 \cdot [p (1 - p)] \cdot (\text{erro}^2)^{-1}$, resultou no valor de 36, sendo este número considerado aceitável seguindo as condições de confiança, poder e erro amostral descritas acima.

Testes

O estudo estatístico foi realizado utilizando os testes de Qui-quadrado e Exato de Fisher para comparação entre os resultados e variáveis categóricas. Para a comparação dos resultados com variáveis contínuas foi utilizado o teste *t* de Student. Para comparação entre os resultados entre os tecidos dos mesmos pacientes foi utilizado o teste *t* pareado e o teste de Wilcoxon. As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier foram comparadas conforme o teste de log-rank. Foram consideradas diferenças significativas quando o valor de *p* foi inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

Valor Crítico da Diferença do Porcentual Tumor versus Normal

Foi realizada a correlação entre a diferença de positividade imunohistoquímica entre o tumor e o tecido normal de cada paciente e as características anátomo-patológicas e de recidiva da doença. Com isto poder-se-iam determinar valores para expressão de ciclina G que teriam correlação com resultado biológico ou desfecho clínico final.

Empregou-se a avaliação pela curva ROC (originário do inglês,

“Receiver Operating Characteristic Curve”) que é uma representação gráfica da relação entre as taxas de falso negativo e falso positivo para cada valor de corte. Com isto representa-se a relação entre sensibilidade e especificidade do teste para cada valor escolhido. Tradicionalmente, utilizam-se os dados ou taxa de falso-positivo ($1 - \text{especificidade}$) no eixo das abscissas (X) enquanto que a taxa de falso negativo (sensibilidade) no eixo das ordenadas (Y) (Metz, 1978).

Esta representação gráfica auxilia a escolha de valores para determinado teste, como diferença de expressão de determinada proteína para determinar a ocorrência de um determinado evento, como por exemplo, recidiva da doença neoplásica. Assim, a curva permite identificar o valor da diferença de expressão da proteína que pode determinar a ocorrência de recidiva com taxa de sensibilidade e especificidade precisos (Metz, 1978).

Foram utilizadas como variável estável o valor da diferença porcentual de células consideradas positivas entre o tecido tumoral e o tecido normal, e a variável teste o valor verdadeiro ou falso para as diferentes características. Cada curva determina uma área que varia de 0,5 a 1,0. Além disso, obtém-se um valor crítico com determinada sensibilidade e especificidade, acima do qual, a variável estudada ocorre.

CAPÍTULO 4

Resultados

Resultados

Características Clínicas e Anátomo-patológicas

Dentre os 40 pacientes, a disponibilidade dos blocos de parafina contendo tecido normal e tumoral representativos da neoplasia somente foi possível em 36 casos. As características epidemiológicas e clínicas pré-operatórias dos pacientes estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 Características clínico-cirúrgicas gerais.

	N=36
Sexo	
Feminino	15 (41,7%)
Masculino	21 (58,3%)
Idade Média	62,0 ± 12,7 anos
Raça	
Branca	26 (72,2%)
Não Branca	10 (27,7%)
Tempo de Sintomas	8,5 ± 5,2 meses
Sintoma Principal	
Sangramento	19 (52,8%)
Alteração do Hábito Intestinal	12 (33,3%)
Dor Retal	4 (11,1%)
Emagrecimento	1 (2,8%)
Distância da Borda Anal	10,3 ± 3,1 cm
CEA pré-operatório [†]	
CEA Médio	28,2 ± 64,9 ng/ml
CEA Normal (≤ 4 ng/ml)	17 (47,2%)
Cirurgia Realizada	
Retossigmoidectomia	29 (80,6%)
Operação de Hartmann	3 (8,3%)
Amputação do Reto	4 (11,1%)

[†] CEA pré-operatório não disponível em 5 pacientes

O procedimento cirúrgico realizado nos 36 pacientes estudados incluiu 29 retossigmoidectomias com anastomose primária, sendo que em um caso, por acesso vídeo-laparoscópico. Em dois pacientes, ileostomia de proteção em alça também foram confeccionadas e um paciente foi submetido a ressecção hepática não-regrada (nodulectomia) no mesmo procedimento. Três pacientes foram submetidos a retossigmoidectomia sem anastomose primária com colostomia terminal (operação de Hartmann). Quatro outros pacientes foram submetidos a amputação abdomino-perineal de reto incluindo a ressecção da parede posterior da vagina em todos. Em cinco pacientes a ressecção do tumor primário envolveu a ressecção associada de outros órgãos por suspeita de invasão por contigüidade ou suspeita de doença metastática como a ressecção do útero em um caso, do útero e anexos em dois casos, de parte da bexiga em um caso e de uma metástase hepática em um caso.

As características anátomo-patológicas dos tumores ressecados estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 Características anátomo-patológicas gerais.

	N=36
Grau de Diferenciação (Broders)	
Bem Diferenciado	4 (11,1%)
Moderadamente Diferenciado	31 (86,1%)
Pouco ou Indiferenciado	1 (2,8%)
Componente Mucinoso	2 (5,5%)
Tamanho médio	6,1 ± 2,4 cm
Margem distal média	2,5 ± 1,7 cm
Profundidade de invasão (pT)	
pT1	1 (2,8%)
pT2	6 (16,7%)
pT3	27 (75,0%)
pT4	2 (5,5%)
Metástases Linfonodais (pN)	
pN0	20 (55,6%)
pN1-3	16 (44,4%)
Metástases à distância	
M0	32 (88,9%)
M1	4 (11,1%)
Estadiamento UICC	
I	4 (11,1%)
II	17 (47,2%)
III	11 (30,6%)
IV	4 (11,1%)
Invasão perineural	12 (33,3%)
Invasão angiolinfática	13 (36,6%)
Infiltrado peritumoral	28 (77,7%)
Desmoplasia	20 (55,5%)

Morfologia e Distribuição

No tecido tumoral ou neoplásico considerados positivos, com a presença de coloração nuclear acastanhada, não houve localização preferencial das células positivas em relação à sua localização criptoglandular. Ao contrário, no tecido normal, a presença de células com coloração acastanhada em 20 (55,5%) casos ocorreu de maneira concentrada na região da base ou fundo da

cripta enquanto que na crista das glândulas as células positivas eram raras. Nos casos em que houve altas taxas de positividade da coloração ou ainda nos casos em que não houve impregnação pelo corante, não foi possível estabelecer este padrão de distribuição glandular.

Análise Quantitativa

Considerando-se apenas o tecido tumoral de todos os pacientes, os valores percentuais variaram de 0 a 100% da razão de células positivas sobre o total de células contadas durante a visualização com retículo ao microscópio. O valor médio deste percentual foi de $76,5 \pm 30,0\%$. Considerando-se o tecido normal, o percentual observado variou de 0 a 96%, sendo o valor médio de $42,2 \pm 24,7\%$ (Apêndices IV e V). A diferença entre os valores observados entre o tecido normal e o tecido tumoral foi estatisticamente significativo ($p < 0,0001$), notando-se valores superiores no tecido tumoral quando comparado ao tecido normal.

Além disso, quando foi considerado em cada paciente o percentual do tumor comparado ao percentual do normal, notou-se que em 28 pacientes (77,8%) o tecido tumoral apresentou percentual superior ao tecido normal, enquanto que o percentual do tecido normal foi superior ao tecido tumoral em apenas oito pacientes (22,2%) (Apêndice VI). A distribuição revelou diferença significativa favorecendo o resultado tumor superior ao normal ($p < 0,001$).

A média da diferença percentual entre os tecidos tumoral e normal para os pacientes foi de $34,3 \pm 38,9\%$, variando entre -51,1% e 92,3% (sendo os valores negativos para pacientes em que o percentual do tecido normal foi superior e positivo quando o tecido tumoral foi superior).

Análise Semi-quantitativa (cruzes)

A verificação do número de cruzes obtidos a partir da análise quantitativa e qualitativa dos tecidos resultou no tecido tumoral, em três pacientes (8,3%) com nenhuma cruz, um paciente (2,8%) com duas cruzes, quatorze pacientes (38,9%) com três cruzes e 18 pacientes (50%) com quatro cruzes. O resultado de uma cruz não foi observado. No tecido normal, cinco pacientes (13,9%) apresentaram resultado de nenhuma cruz, oito pacientes (22,2%) apresentaram resultado de uma cruz, sete pacientes (19,4%) tiveram resultado de duas cruzes e em 16 pacientes (44,4%) o resultado foi de três cruzes. Não houve paciente em que o tecido normal apresentou resultado de quatro cruzes (Tabela 4 e Apêndice VII).

Tabela 4 Análise semi-quantitativa – resultado da expressão (cruzes).

Cruzes	Tumor	Normal	p
0	3 (8,3%)	5 (13,9%)	0,20
1	0	8 (22,2%)	
2	1 (2,8%)	7 (19,4%)	
3	14 (38,9%)	16 (44,4%)	
4	18 (50%)	0	

A distribuição acima exposta reflete o resultado final fruto da comparação entre os resultados de dois examinadores independentes. A análise independente do tecido tumoral revelou a concordância no número de cruzes para cada paciente em 22 casos (61,1%), enquanto que houve discordância de pelo menos uma cruz em 14 pacientes (38,9%). Nestes 14 pacientes em que houve discordância no valor final de cruzes, a diferença entre os valores observados pelos examinadores foi de uma única cruz em 13 casos (92,8%) e de duas cruzes em apenas um caso (7,2%). Quando ocorreu a discordância entre os valores de cruzes, houve subestimação do resultado

em nove casos (64,2%) e superestimação em cinco casos (35,8%) quando comparados ao resultado final após concordância dos dois examinadores. Não houve discordância entre os resultados de cruces no tecido normal entre os dois examinadores (VR e ROP). Assim, a concordância geral das análises foi de 80,5% (58 tecidos no total de 72) (Tabela 5 e Apêndice VIII).

Tabela 5 Concordância dos resultados entre os examinadores.

	Examinador 1 x 2
Geral	
Concordância	58 (80,5%)
Tumor	
Concordância	22 (61,1%)
Discordância	14 (39,9%)
Diferença: 1 cruz	13 (92,8%)
Diferença: 2 cruces	1 (7,2%)
Normal	
Concordância	36 (100%)

Comparando-se o resultado de número de cruces do tecido tumoral ao número de cruces do tecido normal, observamos que o valor foi superior em 27 casos (75%), igual em sete (19,4%) e menor em dois pacientes (5,6%). A distribuição revelou diferença significativa favorecendo o resultado tumor superior ao normal ($p < 0,001$).

O valor médio de cruces no tecido tumoral de todos os pacientes foi de $3,2 \pm 1,1$ cruces/paciente enquanto no tecido normal foi $1,9 \pm 1,1$ cruces/paciente. Esta diferença é significativa, notando-se superioridade no número de cruces no tecido tumoral quando comparado ao tecido normal ($p < 0,001$).

Análise Semi-quantitativa (escore)

O resultado da análise da expressão imunohistoquímica através do sistema de pontuação (escore) revelou no tecido tumoral, a presença de 32 pacientes (88,9%) com expressão considerada alta enquanto quatro pacientes (11,1%) apresentaram expressão considerada baixa. Quanto ao tecido normal observaram-se 16 pacientes com expressão considerada alta (44,4%) enquanto 20 pacientes apresentaram expressão considerada baixa (55,6%). Quando consideramos a combinação dos resultados, a ocorrência tumor-alta expressão e normal-baixa expressão foi comprovada em 18 pacientes (50%), tumor e normal com a mesma pontuação em 16 pacientes (44,4%) e normal-alta expressão e tumor-baixa expressão em apenas 2 casos (5,6%) (Tabelas 6, 7 e Apêndice IX).

Tabela 6 Resultado da análise quantitativa e qualitativa conforme sistema de pontuação (escore).

Tecido	Escore		p
	Alta	Baixa	
Tumor	32 (88,9%)	4 (11,1%)	0,81/1,0
Normal	16 (44,4%)	20 (55,6%)	

Tabela 7 Representação da distribuição de pacientes conforme a comparação entre o resultado de escore nos tecidos tumoral e normal.

Escore	Tumor > Normal	Normal ≥ Tumor	p
N(%)	18 (50%)	18 (50%)	1,0

A comparação entre os resultados anotados pelos dois observadores, notou-se a discordância no resultado final do escore em apenas um paciente no tecido tumoral (2,8%), revelando uma taxa de concordância de 97,2% dos casos (Tabela 8).

Tabela 8 Concordância no resultado do teste de escore entre os examinadores

	Examinador 1 x 2
Geral	
Concordância	71 (98,6%)
Tumor	
Concordância	35 (97,2%)
Discordância	1 (2,8%)
Normal	
Concordância	36 (100%)

Correlação entre os Testes

Com o objetivo de correlacionar o resultado entre os testes, procurou-se identificar relação significativa entre o resultado obtido (Tumor>Normal versus Normal≥Tumor) para análise quantitativa (porcentual) semi-quantitativa (cruzes e escore).

Desta forma, observou-se que 23 pacientes (63,9%) apresentaram resultado da expressão imunohistoquímica de Tumor>Normal tanto na análise quantitativa, quanto na análise semi-quantitativa (cruzes). Não houve correlação de significativa entre os dois testes ($p=0,06$) (Tabela 9).

Por outro lado, 17 pacientes apresentaram resultado da análise da expressão imunohistoquímica Tumor>Normal (47,2%) para análise quantitativa (porcentual) e semi-quantitativa (escore). Houve correlação significativa entre o resultado das duas análises para todo o grupo de pacientes ($p=0,016$).

Finalmente, 18 pacientes apresentaram resultado da análise da expressão imunohistoquímica Tumor>Normal (50%) para análise semi-

quantitativa através de cruzes e através de escore. Houve também correlação significativa entre os dois resultados ($p=0,001$).

Tabela 9 Correlação entre os resultados dos testes (porcentual, cruzes e escore).

Teste	p (Porcentual)	p (Cruzes)	p (Escore)
p (Porcentual)		0,06	0,016
p (Cruzes)			<0,001
p (Escore)			

Resultados de Curvas ROC

As curvas ROC determinadas pelas variáveis presença de invasão angiolinfática, ausência de invasão perineural, ausência de infiltrado inflamatório e presença de desmoplasia apresentaram áreas muito próximas de 0,5. Portanto não é possível determinar valor crítico significativo na expressão da Ciclina G (porcentual) para cada uma destas variáveis (Apêndice X).

Ausência de Metástase Linfonodal

A curva ROC determinada por estas variáveis apresentou área de 0,69 ($p=0,05$) de tal modo que uma diferença acima de 37% de expressão Tumor-Normal, indica a ausência de metástase linfonodais com 75% de sensibilidade e 69% de especificidade (Figura 7).

Figura 7 Curva ROC com imunoexpressão da Ciclina G (quantitativa) e ausência de metástases linfonodais. (área de 0,69 e $p=0,05$).

Ausência de Metástases

A curva ROC determinada por estas variáveis apresentou área de 0,69 ($p=0,16$) de tal modo que uma diferença acima de 10% de expressão Tumor-Normal, indica a ausência de metástase à distância com 81% de sensibilidade e 60% de especificidade (Figura 8). Uma diferença acima de 46% de expressão Tumor-Normal, indica a ausência de metástases à distancia com 42% de sensibilidade e 80% de especificidade.

Figura 8 Curva ROC com imunoexpressão da Ciclina G (quantitativa) e ausência de metástases a distância (área de 0,69 e $p=0,16$).

Recidiva

A curva ROC determinada por estas variáveis apresentou área de 0,52 ($p=0,81$), refletindo decréscimo significativo da especificidade para cada incremento da sensibilidade nos valores da diferença do percentual em relação a presença de recidiva (Figura 9). Com isto, não se obteve valor crítico de diferença percentual de expressão da Ciclina G Tumor-Normal que pudesse corresponder a ocorrência de recidiva do tumor com sensibilidade e especificidade apreciáveis. Assim, uma diferença acima de 10% de expressão Tumor-Normal, indica a presença de recidiva do tumor com 75% de sensibilidade e 25% de especificidade. Ao contrário, um diferença acima de 71% de expressão Tumor-Normal, indica a presença de recidiva com 25% de sensibilidade e 70% de especificidade.

Figura 9 Curva ROC com imunoexpressão da Ciclina G (quantitativa) e recidiva. (área de 0,52 e $p=0,81$).

Resultado Cruzes Tumor>Normal

A curva ROC determinada por estas variáveis apresentou área de 0,87 ($p=0,001$) refletindo qualidade satisfatória da capacidade de valores da diferença de porcentual determinarem o resultado de cruzes Tumor>Normal (Figura 10). Assim, uma diferença acima de 21% de expressão Tumor-Normal, indica o resultado de cruzes tumor>normal com 82% de sensibilidade e 68% de especificidade.

Figura 10 Curva ROC com imunoexpressão da Ciclina G (quantitativa) e imunoexpressão da Ciclina G (cruzes). (área de 0,87 e $p=0,001$).

Resultado Escore Tumor>Normal

A curva ROC determinada por estas variáveis apresentou área de 0,81 ($p=0,001$) refletindo qualidade satisfatória da capacidade de valores da diferença de porcentual determinarem o resultado de escore Tumor>Normal (Figura 11). Assim, uma diferença acima de 38% de expressão Tumor-Normal, indica a o resultado de escore tumor>normal com 83% de sensibilidade e 78% de especificidade.

Figura 11 Curva ROC com imunoexpressão da Ciclina G (quantitativa) e imunoexpressão da Ciclina G (escore). (área de 0,81 e $p=0,001$).

Correlação entre os Resultados e Características dos Pacientes

Variáveis Categóricas

A comparação entre o grupo de pacientes com expressão imunohistoquímica da Ciclina G maior no tumor (Tumor>Normal) e o grupo de pacientes com expressão maior no tecido normal (Normal≥Tumor) não apresentou diferenças significativas ($p>0,05$) quanto às variáveis sexo, raça, tipo de sintoma, tipo de operação realizada, grau de diferenciação (Broders), profundidade de acometimento da parede do reto (pT), presença de metástase a distância (M), classificação final da doença (conforme UICC), presença de invasão perineural, presença de invasão angiolinfática, presença de desmoplasia, presença de infiltrado inflamatório peritumoral, ou recidiva da doença de maneira independente do método de quantificação imunohistoquímica utilizada (quantitativo ou semi-quantitativo) (Apêndice XI).

Houve diferença significativa entre os grupos de pacientes de acordo com a expressão imunohistoquímica (Tumor>Normal versus Normal≥Tumor) e o parâmetro N (metástase linfonodal, de acordo com classificação TNM proposta pela UICC) quando analisado conforme o resultado de cruzes. ($p=0,03$) Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes e o parâmetro N quando analisado conforme o resultado porcentual ou escore ($p=0,5$ e $0,2$ respectivamente). Além disso, os pacientes com resultado de imunoexpressão da Ciclina G Tumor>Normal apresentaram maior frequência de tumores com ausência de metástases linfonodais (N0) quando comparados aos pacientes com resultado Normal≥Tumor conforme o resultado cruzes ou escore ($p=0,2$ e $0,4$ respectivamente) (Tabela 10 e Apêndice XI).

Tabela 10. Correlação entre imunoexpressão e parâmetros de acometimento linfonodal (pN).

	Método de quantificação	pN	Tumor > Normal	Normal ≥ Tumor	p
pN	Quantitativo	pN0	16 (80,0%)	4 (20,0%)	0,50
		pN1	4 (100,0%)	0	
		pN2	5 (62,5%)	3 (37,5%)	
		pN3	3 (75,0%)	1 (25,0%)	
	Cruzes	pN0	18 (90,0%)	2 (10,0%)	0,03
		pN1	3 (75,0%)	1 (25,0%)	
		pN2	3 (37,5%)	5 (62,5%)	
		pN3	3 (75,0%)	1 (25,0%)	
	Escore	pN0	13 (65,0%)	7 (35,0%)	0,10
		pN1	1 (25,0%)	3 (75,0%)	
		pN2	2 (25,0%)	6 (75,0%)	
		pN3	2 (50,0%)	2 (50,0%)	
Presença de Acometimento Linfonodal	Quantitativo	pN0	16 (80,0%)	4 (20,0%)	0,72
		pN1-3	12 (75,0%)	4 (25,0%)	
	Cruzes	pN0	18 (90,0%)	2 (10,0%)	0,02
		pN1-3	9 (56,3%)	7 (43,7%)	
	Escore	pN0	13 (65,0%)	7 (35,0%)	0,04
		pN1-3	5 (68,8%)	11 (31,2%)	

Variáveis Contínuas

A análise dos resultados de expressão imunohistoquímica da Ciclina G não revelou correlação significativa ($p \geq 0,05$) entre o resultado Tumor>Normal e as variáveis idade, tempo de sintomas, distância do tumor da borda anal, dosagem de antígeno carcino-embrionário, tamanho da lesão e margem distal. Estes resultados foram independentes do tipo de quantificação utilizado (quantitativo ou semi-quantitativo) (Apêndice XII).

Sobrevivência

As taxas sobrevivência geral de 3 anos (estádios I a IV) e livre de doença (estádios I a III) foram de 96% e 68% respectivamente. Não houve diferença de sobrevivência geral e livre de doença significativa entre os pacientes conforme o estadio final da doença.

As curvas de sobrevivência geral e livre de doença também foram realizadas a partir da comparação dos resultados de porcentual de células positivas, resultado de cruces e escore. Não houve diferença significativa na sobrevivência geral ou livre de doença entre pacientes com resultado de imunoexpressão Tumor>Normal e Normal≥Tumor, independente do método de quantificação (Tabela 11 e Figuras 12, 13 e 14).

Tabela 11 Sobrevivência geral e livre de doença em 3 anos entre pacientes com resultado de imunoexpressão (quantitativo e semi-quantitativos) Tumor>Normal e Normal≥Tumor.

Método de Quantificação	Sobrevivência em 3 anos	Tumor>Normal	Normal≥Tumor	p
Quantitativo	Geral	100%	83%	0,08
	Livre de Doença	66%	68%	0,84
Cruzes	Geral	100%	88%	0,18
	Livre de Doença	68%	64%	0,84
Escore	Geral	100%	92%	0,63
	Livre de Doença	74%	61%	0,33

Finalmente, a comparação das médias de sobrevivência livre de doença e geral para cada um dos subgrupos de acordo com o tipo de resultado (porcentual, cruces e escore) não revelou diferenças significativas (Apêndice XIII).

Figura 12 Curvas de sobrevivência geral e livre de doença comparando pacientes com resultado de imunoexpressão quantitativa Tumor>Normal e Normal $\geq$ Tumor ($p=0,075$ e $p=0,84$ respectivamente).

Figura 13 Curvas de sobrevivência geral e livre de doença comparando pacientes com resultado de imunoexpressão semi-quantitativa (cruzes) Tumor>Normal e Normal $\geq$ Tumor ($p=0,18$ e $p=0,84$ respectivamente).

Figura 14 Curvas de sobrevivência geral e livre de doença comparando pacientes com resultado de imunoexpressão semi-quantitativa (escore) Tumor>Normal e Normal $\geq$ Tumor ($p=0,33$ e $p=0,63$ respectivamente).

CAPÍTULO 5

Discussão

Discussão

A identificação de proteínas e genes envolvidos no processo de desregulação do ciclo celular oferece a oportunidade para a identificação de potenciais alvos para terapia gênica. Inicialmente idealizada para o tratamento de doenças benígnas, como a síndrome da imunodeficiência combinada congênita grave (SCID), esta forma de tratamento passou a ser alvo de estudo para o tratamento do câncer (Hunt e Vorburger, 2002). Trata-se da oferta de material genético, conhecido também como transgene, a ser distribuído por um vetor escolhido, freqüentemente viral ou lipossomal, em que o objetivo é corrigir, substituir, bloquear ou incrementar a expressão de determinado gene a fim de produzir a cura da doença (Thompson, 1993; Harrington et al., 2002a; Harrington et al., 2002b). A eficiência desta modalidade dependerá em última análise, de três características principais: o gene alvo a ser corrigido, bloqueado ou substituído; o vetor, que levará o material genético às células-alvo; e o controle do material genético oferecido. Para tanto, seria ideal oferecer material genético eficiente no controle da doença, ao maior número possível de células doentes e evitar ao máximo o dano às células normais (Harrington et al., 2002b).

A necessidade de obtenção de melhores resultados de sobrevivência, sobretudo pela alta freqüência de recidiva no tratamento de diversas neoplasias, levou ao estudo do emprego da terapia gênica como busca de nova ferramenta terapêutica (Kouraklis, 2000).

A oferta de material genético que interferisse no processo de controle do ciclo celular poderia levar ao bloqueio da proliferação celular de uma célula ou um clone delas (Harrington et al., 2002b). Para isto, o material genético oferecido deveria corrigir, substituir ou bloquear a expressão de algum dos genes envolvidos no processo de proliferação celular. As ciclinas e seus genes

são, portanto, candidatos imediatos para alvo de terapia gênica com objetivo de controlar ou interromper o ciclo celular de células neoplásicas.

Desta forma, são necessárias algumas características desta alternativa terapêutica, como eficiência do material genético em causar tal efeito. Isto é, o gene que terá sua expressão interferida deverá idealmente ter papel ativo no bloqueio da proliferação das células neoplásicas. Além disso, esta interferência deverá ser a mais seletiva possível de tal maneira que os efeitos somente se dêem sobre o tecido doente e não sobre o tecido sadio. Esta característica parece ser de muita importância para o resultado final desta modalidade terapêutica. A falta de seletividade do tratamento pode tanto diminuir a sua eficácia por efeito de diluição como também possivelmente causar efeitos indesejáveis em tecido sadio. Estes efeitos podem ser de grande importância já que as neoplasias são em geral fruto da desregulação do processo de proliferação e tem sido freqüente a utilização de transgenes que interfiram com o controle do ciclo celular na terapia gênica. Contudo, estes genes têm função ativa também nas células normais e o efeito do seu bloqueio ou estímulo pode se dar tanto no tumor como nos tecidos normais quando empregados de maneira sistêmica. Por este motivo, surgiu o interesse de se comparar a diferença de expressão da ciclina G no tecido normal de maneira comparativa ao tecido tumoral. Com isto, seria possível não somente determinar a participação deste evento genético no processo de carcinogênese bem como avaliar sua especificidade a este processo já visando como potencial alvo para o uso na terapia gênica.

Na realidade, este modelo de estudo que poderia indicar potenciais alvos para terapia gênica deveria portanto preceder os estudos experimentais utilizando o transgene ofertado através de vetor a animais implantados com células tumorais. Contudo, os estudos de terapia gênica utilizando a ciclina G como alvo e tendo neoplasia produzida por implantação de linhagens de

células tumorais colorretais, não obedeceram esta regra. Na realidade, estudos de fase I com a seqüência anti-sense da ciclina G com vetor retroviral em humanos já havia sido aprovada nos Estados Unidos da América sem que houvesse uma reação de imunohistoquímica deste gene em câncer colorretal no ser humano (Lenz et al., 2002).

Uma vez que se decide pela investigação de expressão alterada de determinado gene, o método imunohistoquímico se apresenta como alternativa muito interessante, já que permite identificar o produto final e agente executivo das ações atribuídas a determinado gene. Isso faz com que alterações genéticas, seja da constituição do DNA, seja da expressão de RNA, sejam ignoradas quando não tiverem repercussão no produto final determinado pelo gene (Leong, 2004).

Por este motivo, foi realizado um estudo inicial através de reação de imunohistoquímica com anticorpos monoclonais anti-ciclina G em tumores colorretais ressecados que confirmou o achado freqüente de expressão aumentada no tecido tumoral (Perez et al., 2003). O referido estudo, no entanto, incluiu neoplasias não somente de reto mas também de cólon (Perez et al., 2003). Muito embora reto e cólon tenham estrutura histológica idêntica, muitas vezes de difícil delimitação anatômica exata, são sede de neoplasias de mesmo aspecto histopatológico, mas com comportamento biológico distintos. Além da origem embriológica do cólon distal e reto ser diferente do cólon proximal, os padrões de disseminação, de recidiva da doença e sensibilidade à radioterapia, tornam o câncer do reto entidade isolada e única entre os adenocarcinomas do trato digestivo, diferenciado inclusive do adenocarcinoma usual do cólon (Bufill, 1990; Iacopetta, 2002).

Embora este estudo tenha confirmado o achado da expressão aumentada da ciclina G especificamente no câncer do reto, de maneira até mais intensa que do cólon, algumas críticas de natureza metodológicas

merecem ser feitas (Perez et al., 2003). A primeira diz respeito ao método de quantificação imunohistoquímica utilizando valores arbitrários para determinação de expressão positiva e negativa. A outra, diz respeito ao uso de mucosa normal adjacente ao tumor como tecido controle normal.

Certamente, o estudo imunohistoquímico veio ocupar o lugar de outros estudos moleculares e bioquímicos para a análise de proteínas expressas pelas células em função do custo, facilidade técnica e exigência de pequenas quantidades de tecido (Leong, 2004). Com isto, esforços vêm sendo aplicados a fim de se quantificar e padronizar os resultados obtidos com a imunohistoquímica (Leong, 2004). Métodos de quantificação desta técnica incluem a simples contagem de células, métodos mais complexos considerando quantidade e intensidade da reação, e finalmente, até o emprego de mensuração computadorizada (Seidal et al., 2001; Leong, 2004). Independente do método, há a necessidade de padronização da quantificação imunohistoquímica para permitir a reprodutibilidade e comparação adequada entre os resultados (Leong, 2004). Além disso, vale lembrar que cabe única e exclusivamente ao médico patologista o estudo de anatomia patológica para determinar se a coloração resultante da reação tem valor biológico, acometendo células específicas e assim como determinadas áreas da célula ou organelas (Leong, 2004).

Algumas variáveis podem interferir na reação ou resultado da reação imunohistoquímica e devem ser reconhecidas para se compreender a validade dos métodos de mensuração (Leong, 2004). Algumas variáveis podem ser consideradas modificáveis ou extrínsecas e incluem a diluição e clone do anticorpo, o método de detecção da coloração e cromógeno, recuperação antigênica e interpretação dos resultados. De fato, as técnicas de detecção da coloração tem melhorado sua sensibilidade de modo a permitir o estudo de material fixado em parafina e não apenas em material fresco congelado. Este

aumento da sensibilidade deve ser interpretado com cuidado pois com isto, quase qualquer antígeno pode ser detectado em qualquer tecido, e portanto a diferenciação do que é positivo e negativo deve ter sua sensibilidade também incrementada (Rishi et al., 1993). Neste aspecto, diversos tipos de enzimas proteolíticas têm sido empregadas pelos laboratórios com objetivo de evitar o efeito da formalina nestes tecidos (Leong, 2004). Não somente variam os tipos de enzimas, bem como as concentrações e temperaturas recomendadas são fatores que interferem de maneira significativa no resultado da reação imunohistoquímica (Fetsch e Abati, 1999; Leong, 2004). A recuperação antigênica também influenciada por grande variedade de técnicas, principalmente no que diz respeito à exatidão da temperatura e do tempo de aquecimento que podem levar a resultados significativamente diferentes (Fetsch e Abati, 1999). Aspectos físico-químicos como a molaridade e pH da solução de recuperação antigênica também têm grande interferência no resultado da intensidade da reação e portanto devem ser consideradas na análise final (Fetsch e Abati, 1999). Fica evidente que, neste sentido, torna-se mandatória a realização de estudo imunohistoquímico em condições técnicas padronizadas. Ao se comparar estudos diferentes, deve-se atentar para as diferenças técnicas durante a obtenção da coloração e idealmente, deve-se procurar realizar a reação de todas as amostras de maneira agrupada de forma a minimizar variações sutis de tempo e temperatura exatas de aquecimento (Leong, 2004). Diante destas considerações, no presente estudo, padronizaram-se os detalhes técnicos da reação e realizou-se toda a casuística de maneira agrupada de forma a evitar todas as variantes aqui referidas.

Contudo, talvez uma variável que pode ser mais inconstante é a interpretação do observador. A ausência de padronização na interpretação de resultados tem levado a variações expressivas entre os estudos prejudicando

de maneira significativa a interpretação dos resultados (Leong, 2004).

Do ponto de vista qualitativo, não há consenso sobre a região do tumor a ser considerada: periferia ou central; área invasiva ou área de carcinoma *in situ*; área aleatórias ou áreas consideradas mais representativas. De fato, o reconhecimento de aspectos citológicos e morfológicos devem ser indispensáveis para assegurar a análise da população celular adequada. Assim, pode-se evitar a consideração de positividade do tumor (adenocarcinoma) quando ocorre a presença de impregnação exclusiva da população de células inflamatórias peritumorais, como linfócitos, por exemplo. Além disso, a localização intra-celular deve também ser considerada já que a coloração de alguns antígenos no núcleo não tem o mesmo significado de seu encontro no citoplasma, devendo ser considerada positividade em uma situação e não em outra.

Do ponto de vista quantitativo ocorre o mesmo, já que inexistente padronização (Leong, 2004). O número de células necessário para determinar um resultado positivo pode variar de maneira significativa nas diferentes pesquisas, isso sem considerar os aspectos técnicos da reação. A contagem de células positivas e negativas de um determinado tecido utilizando-se amostras aleatórias em número suficiente pode ser muito útil na determinação do significado clínico daquela quantidade de expressão. É possível determinar o valor porcentual de células positivas que tem correlação clínica significativa. Na realidade, este deveria ser o significado ideal de positividade de expressão, já que só interessa considerar positivo ou negativo na medida que a expressão positiva ou negativa tenha algum impacto clínico objetivo e significativo. Como exemplo, de nada adiantaria classificar a expressão de p53 por determinado tumor como positivo quando acima de 50% das células se o pior prognóstico somente está associado aos tumores com expressão acima de 75%, ou ainda de valor inesperado como 67.5% (Allred et al., 1998). Assim, a determinação

de valores quantitativos de acordo com parâmetros clínicos objetivos de fato deveria ser obrigatória quando se pretende estudar o valor da expressão de qualquer proteína ou antígeno. Com isso, poder-se-ia determinar em grandes amostras a quantidade exata ou aproximada de expressão necessária ou suficiente para se obter determinado efeito biológico observado pelo tumor e pelos pacientes. Cria-se então, noção distinta de expressão ou imunoexpressão positiva ou negativa do ponto de vista clínico-patológico, um conceito diferente de positividade, quando deve-se decidir caso uma única célula é positiva ou negativa para imunoexpressão do antígeno.

Admite-se ainda que esta validação clínico-patológica para determinação de valor crítico de expressão quantitativa deva ser realizada de maneira retrospectiva e em uma única instituição, buscando assegurar homogeneidade técnica (Leong, 2004).

Por esta razão decidimos estudar os valores percentuais de positividade da expressão da ciclina G que fossem capazes de ter associação com evento biológico objetivo e significativo. Além disso, seria possível determinar quanto é realmente necessário do ponto de vista quantitativo para determinar uma diferença no método semi-quantitativo.

Na década de 1950, foram desenvolvidas as curvas ROC como subproduto de pesquisas realizadas na obtenção de sinais de rádio isentos da contaminação por ruídos. Logo, percebeu-se sua utilidade na prática médica (Metz, 1978). A avaliação da curva nada mais é do que avaliação do teste empregado. Isto é, a curva é sempre de boa qualidade, enquanto o que está sendo avaliado é o teste, como a associação entre a diferença de expressão imunohistoquímica de determinada proteína e um desfecho clínico específico. O teste ideal, é aquele que consegue obter baixos índices de falso-positivo e falso-negativo em uma faixa significativa de seus resultados. Ao contrário, testes considerados ruins são aqueles em que os resultados determinam altos

índices de falso-positivo com baixos índices de falso-negativo, ou vice-versa (Metz, 1978).

Os testes ideais, determinam uma curva com rápido crescimento vertical (alta sensibilidade e alta especificidade), determinando concavidade para o ângulo inferior direito e convexidade para o ângulo superior esquerdo. Nesta condição, a área determinada pela curva chega próximo a 1,0. Ao contrário, curvas de testes considerados ruins chegam próximo a uma reta diagonal (onde qualquer incremento na especificidade está acompanhado de decréscimo na sensibilidade) e a área aproxima-se de 0,5 (Zweig e Campbell, 1993; Song, 1997).

Ao aplicar a curva ROC, pôde-se identificar que de fato, a diferença de expressão da ciclina G entre o tecido tumoral e normal determinadas pela análise semi-quantitativa foi determinada por uma diferença de 21% (cruzes) e 38% (escore) de expressão com boa sensibilidade e especificidade. Embora a presença de diferença expressão mensurável do método semi-quantitativo, criticado por utilizar metodologia pouco objetiva e muito subjetiva, estes resultados apontam também para a diferença significativa entre dois métodos semi-quantitativos. Considerando que os métodos deveriam apresentar equivalência permitindo a reprodutibilidade do método semi-quantitativo, nota-se que a mensuração da diferença quantitativa entre os métodos revelou diferença quase duas vezes maior no poder de comparação entre os métodos utilizando cruzeiros ou escore (38% versus 21%).

Quando se observam os resultados obtidos em outras publicações, nota-se que a mensuração semi-quantitativa sem correlação com desfecho clínico, isto é, expressão alta ou baixa são determinadas de maneira empírica, resultam em estudos concordantes e não demonstram correlação significativa entre a expressão da ciclina G e dados clínicos, patológicos e de sobrevivência no câncer colorretal (Li et al., 2003; Perez et al., 2003). No presente estudo,

a única correlação significativa foi entre a maior expressão da ciclina G no tumor que no tecido normal (quando comparada através de método semi-quantitativo) e a ausência de metástases linfonodais.

Utilizando o método quantitativo puro, e com a aplicação da curva ROC puderam-se encontrar resultados interessantes no que diz respeito à diferença de expressão entre o tecido tumoral e normal e desfechos clínicos específicos. De fato, os desfechos clínicos de maior interesse para o pesquisador na área de oncologia dizem respeito à recidiva da doença ou ainda mortalidade por câncer. Como a intenção final é a avaliação de um gene candidato à terapia gênica, identificar diferença de expressão relacionada a estes dois desfechos clínicos específicos, pode ter maior valor. Isto ocorre já que a determinação de valor crítico de expressão que estaria associada à recidiva ou morte pela doença, poderia indicar maior utilidade da terapia (através do bloqueio deste gene) nos casos mais avançados ou ainda de maior risco de recidiva, uma vez que sua expressão estaria aumentada.

Embora não se tenha obtido resultado significativo nestes desfechos quanto à diferença de expressão tumoral comparada ao normal nesta série de pacientes, foi possível identificar algumas diferenças significativas que talvez venham contribuir para o entendimento do papel da ciclina G no processo de carcinogênese colorretal, no caso específico do câncer do reto.

Por meio do emprego das curvas ROC, foi possível identificar que a diferença de expressão no tumor comparada ao tecido normal com determinada magnitude poderia ter correlação com algumas características anátomo-patológicas do tumor primário. Esta informação pode ser de grande importância visto que possivelmente, a expressão aumentada de determinado gene somente levará ao desfecho final quando ultrapassar determinado valor. Assim, foi possível identificar nesta casuística, que pacientes com expressão quantitativa do tumor maior que 10% comparada ao tecido normal, estavam

associados à ausência de metástases sistêmicas com boa sensibilidade e especificidade. Da mesma forma, pôde-se identificar que pacientes com expressão quantitativa do tumor maior que 37% comparada ao tecido normal, estavam associados a ausência de metástases linfonodais, não somente confirmando o dado obtido através da análise semi-quantitativa, mas também determinando valores precisos e objetivos para esta diferença.

Durante o estudo da expressão imunohistoquímica do gene da ciclina G, faz-se necessário o uso de um grupo controle para que possa ser possível a comparação da expressão entre o tecido o tumoral e este controle. Como existe a possibilidade de variações individuais de expressão gênica, o controle ideal seria o tecido normal de mesma origem do neoplásico e do mesmo paciente portador da neoplasia. Com alguma freqüência, este grupo controle é constituído por mucosa histologicamente normal adjacente ao tumor em função de algumas conveniências. Em primeiro lugar, a utilização da mucosa normal imediatamente adjacente ao tumor permite o emprego de uma única reação de imunohistoquímica para estudo do caso e controle ao mesmo tempo. Em segundo lugar facilita a comparação entre os resultados uma vez que coloca lado a lado no mesmo campo visual do microscópio os dois resultados. Contudo, essa avaliação pode estar muito prejudicada. Isto ocorre por que a mucosa imediatamente adjacente ao tumor, denominada também como mucosa transicional pode apresentar alterações genéticas e moleculares não identificadas por métodos de histopatologia convencional. Estudos têm apontado para um estado de proliferação intensa na mucosa transicional e maior que a mucosa normal distante (mais de 10 cm da lesão primária) (Yoshikawa e Utsunomiya, 1996). Assim sendo, a utilização da mucosa normal adjacente deve ser considerada inadequada para avaliação da expressão gênica relacionada aos genes envolvidos no processo de carcinogênese colorretal, especialmente na avaliação da expressão gênica de

genes controladores do ciclo celular, como é o caso da ciclina G. Por esta razão, considera-se mais adequada a utilização da mucosa normal distante do tumor como controle para cada paciente estudado ao contrário do que se fez anteriormente, que incluía apenas a mucosa normal imediatamente adjacente ao tumor (Perez et al., 2003).

No presente estudo, a expressão da ciclina G foi significativamente maior no tecido tumoral quando comparada ao tecido normal. Contudo a expressão no tecido normal também é significativa e não nula, como idealmente se desejaria. Assim sendo, a diferença de expressão da ciclina G entre o tecido normal e tumoral pode não ser suficiente para determinar alta seletividade do tratamento através da oferta de seqüência anti-sense deste gene, bloqueando sua expressão. Por outro lado, a diferença observada entre o tecido tumoral e o tecido normal indica que este gene alvo pode ser capaz de exercer seu efeito de maneira eficiente nas células tumorais já que a identificação da sua expressão aumentada pode refletir um possível papel no processo de carcinogênese da doença. Além disso, o fato de ter sido identificada esta alteração na maioria dos pacientes da casuística estudada e ocorrer em fração significativa das células, pode indicar que seu efeito seja mais importante do que se utilizasse um alvo freqüentemente presente, porém em fração pequena das células, ou ainda em poucos pacientes de dada casuística.

Mesmo assim, a questão da seletividade ainda não fica resolvida de maneira definitiva já que a expressão do gene não é exclusivamente observada no tumor e algumas estratégias têm sido desenvolvidas de modo a resolver esta questão (Harrington et al., 2002a). A primeira seria o acoplamento de mecanismos de expressão de determinado transgene a sítios específicos (Harrington et al., 2002b). Isto tem sido descrito tanto para tecidos específicos como tumores específicos. No primeiro caso, a oferta do material genético (transgene) seria feita de maneira combinada com uma área promotora

dependente de uma substância específica de determinado tecido. É o caso da próstata, onde o material genético tem sua expressão regulada por promotor dependente do antígeno-prostático-específico (PSA). Com isso, assegura-se que o transgene somente será expresso na presença de PSA, portanto somente na próstata e não no sistema nervoso central ou trato gastrointestinal. No segundo caso, a área promotora do transgene pode ser estimulada por moléculas específicas de tumores, como no caso da alfa-feto-proteína (AFP). Nesta situação, o transgene passa ser expresso somente na presença de AFP, portanto de maneira muito intensa no hepatocarcinoma (Harrington et al., 2002a).

Outra estratégia que tem sido utilizada é o direcionamento seletivo dos vetores, fazendo com que transgene somente pudesse ser ofertado ao tecido alvo doente e não aos tecidos saudáveis. Uma das maneiras de se obter tal efeito seria através da expressão na superfície do vetor, de moléculas específicas de reconhecimento do tecido doente (Harrington et al., 2002a). Um exemplo desta estratégia inclui a expressão de receptores da molécula do fator de von Willebrand na superfície do vetor (Hall et al., 2000). Ocorre que durante o processo de carcinogênese, os tumores estimulam o processo de angiogênese para que possam obter energia necessária para proliferação (Hanahan e Folkman, 1996). Com isso, surgem vasos neo-formados que têm a particularidade de apresentar endotélio fenestrado com exposição de colágeno e fator de von Willebrand, permitindo assim maior concentração do vetor e aumentando de maneira significativa sua eficácia (Xu et al., 2001).

Até o presente momento, nenhum gene envolvido no processo de carcinogênese parece ser suficientemente específico para o emprego na terapia gênica com o objetivo de se obter máxima eficiência terapêutica com mínimo efeito sobre os tecidos normais. A ciclina G, provavelmente se encaixa nesta situação, e para que tenha sua utilidade no tratamento do câncer do

reto, necessitará de associação de estratégias de seletividade de expressão ou de direcionamento do vetor.

No câncer da mama e da próstata, o estudo da expressão alterada da ciclina G foi realizado através de técnicas de Western Blot e imunohistoquímica comprovando o aumento de sua expressão em células neoplásicas quando comparado à expressão em células normais (Reimer et al., 1999). Neste mesmo estudo, verificaram-se diferenças no padrão de expressão do gene da ciclina G durante o ciclo celular entre linhagens de células normais e linhagens de células tumorais da mama. Nas células normais, verificou-se nível baixo da proteína e também do RNA mensageiro da ciclina G durante a fase G1, aumento progressivo durante a fase S sustentados durante todo o período que incluiu as fases S, G2 e M. Ao contrário, na linhagem de células tumorais não houve expressão cíclica da proteína mas altas taxas de expressão sustentadas durante todas as fases do ciclo celular. Além disso, a localização da expressão da ciclina G através da reação de imunohistoquímica se deu preferencialmente ou quase que exclusivamente no núcleo das células (Reimer et al., 1999).

Em osteossarcoma humano a expressão da ciclina G também mostrou-se aumentada através de estudo utilizando técnicas de imunohistoquímica (Skotzko et al., 1995; Chen et al., 1997).

O bloqueio da ação da ciclina G pode ser realizado através da administração de uma sequência complementar ao RNA mensageiro conhecida como sequência “anti-sense”. Assim, se considerarmos que a expressão alterada (aumentada) deste gene pode estar envolvido no processo de carcinogênese de determinado tumor, o bloqueio de sua expressão poderia teoricamente levar a bloqueio deste processo (Gordon et al., 2001).

O efeito da administração de sequência anti-sense da ciclina G foi testado em células de linhagem tumoral e em modelos animais de osteossarcomas. Observou-se a inibição do crescimento tumoral em ambos os modelos (“in

vitro” e “in vivo”) com a identificação de incremento significativo na incidência de apoptose destas células (Gordon et al., 2001).

Em modelo animal de camundongos (“nude mice”) com metástases hepáticas, a deleção do alelo mutante da ciclina G levou à inibição significativa do crescimento tumoral metastático “in vivo” (Gordon et al., 2001).

Finalmente, o uso de seqüências “anti-sense” anti-ciclina G através de vetores retrovirais injetados em veia periférica de camundongos levou ao aumento da taxa de apoptose de células neoplásicas e de células endoteliais peritumorais, além de ter levado à inibição do crescimento tumoral de metástases hepáticas de diversas linhagens de células. O bloqueio do crescimento tumoral de células metastáticas ocorreu de maneira seletiva, isto é, poupando os hepatócitos normais adjacentes (Gordon et al., 2001).

Determinados genes podem ter maior ou menor participação no processo de carcinogênese e esta característica pode influenciar a eficácia da sua utilização como terapia gênica (Harrington et al., 2002b). Um dos genes mais estudados e envolvidos no processo de carcinogênese de diversas neoplasias, é o gene p53 (Vogelstein et al., 2000). Na realidade, o gene p53 participa de maneira central em uma verdadeira rede de outros genes e seus produtos, envolvidos no processo de manutenção da homeostase do ciclo celular e de replicação, segregação do material genético durante estimulação intrínseca e extrínseca por diversos sinais de estresse (Vogelstein et al., 2000). Este processo resulta na ativação específica da proteína p53, determinada por modificações pós-translacionais e que culminará na interrupção do ciclo celular, na indução de senescência ou ainda na indução do processo de apoptose (Harris e Levine, 2005). Mais freqüentemente, ocorrem alterações moleculares ou genéticas que determinam perda de função do p53, fazendo com que a célula não tenha a capacidade de escapar do ritmo constante de proliferação celular (Harris e Levine, 2005). Por outro lado, algumas alterações

do p53 podem determinar aquisição de função e desta forma também contribuir para o processo de carcinogênese (Harris e Levine, 2005). Isso ocorre porque determinadas mutações do p53 podem tornar a proteína capaz de inibir outros mecanismos de apoptose não dependentes do p53 em condições normais (Dittmer et al., 1993; de Vries et al., 2002). Assim sendo, como em qualquer fenômeno biológico, há a necessidade de mecanismos de controle de determinado evento molecular e portanto há a necessidade de eventos que estimulem determinadas ações mas também que inibam outras. A via do p53 não é exceção, sendo necessários mecanismos que interrompam a ativação desta proteína (Harris e Levine, 2005). Vários mecanismos de inibição da via do p53 vêm sendo estudados, e um deles tem a participação da ciclina G (Harris e Levine, 2005). Acredita-se que o gene da ciclina G seja estimulado pela ativação do gene p53 já que tem sua expressão rapidamente aumentada após ativação do p53 em diversas linhagens celulares (Okamoto e Beach, 1994; Zauberman et al., 1995; Bates et al., 1996; Yardley et al., 1998). A proteína do gene da ciclina G é capaz de formar complexo com uma fosfatase (PP2A), que por sua vez é capaz de ativar a proteína MDM2 (Okamoto et al., 2002; Zhao et al., 2003). O aumento da atividade desta proteína parece ter efeito inibitório sobre o gene p53. Estes mecanismo também tem suporte experimental de vez que camundongos com inativação para o gene da ciclina G feita por meio de engenharia genética (“knock out mice”) são viáveis e fibroblastos com gene da ciclina G inativo têm concentração elevada de p53 mesmo em situação de repouso (Kimura et al., 2001; Okamoto et al., 2002). Estas observações demonstram que este mecanismo auto-regulatório inibitório está funcionando “in vivo” e em situação de p53 basal na homeostase, ou seja, sem a necessidade de estímulo de estresse (Harris e Levine, 2005).

Neste contexto, poderiam ser feitas algumas considerações sobre o papel da ciclina G no processo de carcinogênese do câncer do reto. Primeiro,

a hipótese de que o aumento da expressão da ciclina G determinada por algum estímulo carcinogênico levaria a inibição da expressão do gene p53. Isto tornaria a célula incapaz ou menos capaz de interromper o ciclo, envelhecer ou ainda ingressar no processo de apoptose, contribuindo assim para aquisição da “imortalidade”. Neste caso, o gene da ciclina G teria grande interesse como alvo da terapia gênica, já que, a oferta de seqüência anti-sense, determinando o bloqueio de sua expressão, poderia levar à expressão normalizada ou ainda aumentada do p53 normal. Este fato tornaria a célula capaz de ser excluída do ciclo celular e assim tornar-se “mortal”. A outra hipótese é que a mutação do p53 tenha ocorrido nestas células, causando aumento exagerado da expressão da ciclina G devido ao seu efeito estimulatório neste gene. Assim, não é possível inibir a expressão do p53 através do circuito auto-regulatório uma vez que sua expressão deixou de ser controlada pelos mecanismos habituais de uma célula normal. Neste caso, o gene da ciclina G, não teria papel causal no processo de carcinogênese do câncer do reto e a terapia gênica através da oferta da sua seqüência anti-sense se limitaria ao efeito de bloqueio do ciclo celular por interferir na expressão desta ciclina. Assim sendo, a terapia gênica com seqüência “anti-sense” da ciclina G deveria ter eficiência bastante reduzida.

O estudo da participação da expressão alterada da ciclina G sobre o processo de carcinogênese do hepatocarcinoma trouxe informações muito interessantes (Jensen et al., 2003). Em primeiro lugar, notou-se que após a realização de hepatectomia parcial em camundongos, a expressão da ciclina G mostrou-se elevada após três dias do procedimento, identificada por aumento do RNA e da proteína. Este aumento da expressão manteve-se até uma semana após o processo de regeneração hepática (Jensen et al., 1998). Aumento semelhante da ciclina G foi notado em neurônios após isquemia cerebral, indicando sua participação no processo de reparação dos tecidos

(Morita et al., 1996).

Além disso, através de modelo experimental de carcinogênese do hepatocarcinoma pela de indução química, demonstrou-se que animais sem os alelos da ciclina G, quando submetidos à exposição do carcinógeno, apresentavam menor incidência de tumor quando comparados a animais controles (Jensen et al., 2003). Além disso, os tumores no grupo de camundongos sem o gene da ciclina G eram de menor número e de tamanho significativamente inferior (Jensen et al., 2003). Estes dados sugerem fortemente que a ausência da expressão de ciclina G resultou na inibição das fases de iniciação e promoção tumoral induzida por agentes carcinógenos no fígado. Mais uma vez, neste estudo verificou-se aumento significativo da expressão da proteína p53 nos animais sem expressão da ciclina G (Jensen et al., 2003). Os pesquisadores, sugeriram que a redução da incidência bem como da multiplicidade e proliferação dos tumores deveu-se ao aumento da expressão do gene p53, confirmando as sugestões de que a ciclina G teria efeito inibitório sobre a expressão do primeiro. Depreende-se disto, a explicação para os resultados do efeito da terapia gênica anti-ciclina G sobre modelos experimentais: o bloqueio da expressão do gene da ciclina G, levaria a um aumento da expressão do p53 normal, tornando a célula menos suscetível ou protegida do estado de proliferação desordenada e indiferenciação celular (Jensen et al., 2003). Neste sentido, o seu efeito sobre células normais não traria malefícios, mas sim levaria possivelmente a proteção ou prevenção da transformação frente a estímulos carcinogênicos.

No presente estudo, embora se tenha identificado expressão da ciclina G maior no tumor que no tecido normal em pelo menos 50% dos pacientes, os dados obtidos a partir das curvas ROC e métodos semi-quantitativos indicaram a associação entre a expressão aumentada e características de menor agressividade do tumor. Assim, considerando a hipótese de que a expressão

aumentada da ciclina G contribuiria para o processo de carcinogênese, ficaria difícil justificar que a expressão aumentada do gene da ciclina G no tumor estaria associada a características como ausência de metástases sistêmicas e linfonodais, encontradas no presente estudo.

No entanto, outros estudos têm confrontado a idéia de que a expressão alterada e aumentada da ciclina G contribuiria para a proliferação celular desregulada (Zhao et al., 2003). Observações de que sua expressão está aumentada em tecidos com grande diferenciação celular, em hepatócitos com interrupção do ciclo na fase G2, após indução com agentes que causam dano ao DNA e durante a interrupção do ciclo celular induzida por TGF-beta confirmaram a hipótese de que a ciclina G possa ter algum papel na inibição do ciclo celular (Jensen et al., 1998; Shimizu et al., 1998; Okamoto e Prives, 1999), (Horne et al., 1996). Mais recentemente foi demonstrado que em fibroblastos de camundongos a expressão da ciclina G não produziu efeito sobre sua proliferação além de sensibilizar estas células para apoptose mediada por TNF-alfa (Okamoto e Beach, 1994; Okamoto e Prives, 1999).

Estudos realizados com fibroblastos de camundongos puderam esclarecer alguns aspectos destes dados conflitantes (Zhao et al., 2003). Após a introdução de gene exógeno da ciclina G nestas células, foi possível observar que as células que apresentaram interrupção do ciclo celular apresentavam expressão muito elevada da ciclina G, enquanto que as células em que a expressão deste gene era modesta, exibiam ritmo de proliferação celular intenso (Zhao et al., 2003). Estes dados sugerem, efetivamente, que os efeitos da ciclina G sobre o ciclo celular poderiam ser dependentes da magnitude de sua expressão (Zhao et al., 2003). Com isto ressalta-se mais uma vez a importância da quantificação da imunohistoquímica, já que a expressão elevada pode resultar em eventos biológicos completamente diferentes de acordo com sua intensidade ou quantidade.

De fato, os presentes resultados realmente confirmaram que em alguns pacientes, o tecido normal apresentava alta intensidade de expressão imunohistoquímica da ciclina G, altamente diferenciado. Uma das possibilidades para explicar este aparente paradoxo é que a expressão muito aumentada da ciclina G nestes pacientes, ao invés de contribuir para o processo de carcinogênese passou a exercer efeito protetor em função da magnitude da sua expressão e portanto, reduzir a incidência de metástases linfonodais e metástases à distância.

Embora a expressão muito elevada da ciclina G possa levar a aumento da expressão e ativação da proteína p53, seu efeito inibitório sobre a proliferação celular não é dependente deste mecanismo, pois o mesmo pôde ser observado em linhagens celulares na ausência do p53 (Bates et al., 1996; Okamoto e Prives, 1999; Reimer et al., 1999). Ao contrário, em células sem p53 e também sem o gene RB (retinoblastoma), a ciclina G não é capaz de exercer seu efeito de inibição da proliferação celular, sugerindo que este gene seja indispensável no processo (Zhao et al., 2003). Apesar destas observações, não há indícios de que a ciclina G funcione como gene supressor de tumor, visto que camundongos sem nenhum dos alelos deste genes não apresentaram incidência elevada de neoplasias ou alterações embrionárias significativas levando à morte em função de erros grosseiros da divisão celular (Kimura et al., 2001; Zhao et al., 2003). Ao contrário, este gene parece contribuir para o processo de proliferação celular em respostas ao dano do material genético celular ou em momentos específicos do desenvolvimento da célula (Kimura et al., 2001).

Assim sendo, muito embora o papel exato da expressão do gene da ciclina G seja ainda motivo de discussão, a terapia gênica através do emprego de seqüência anti-sense da ciclina G, com a utilização de vetor retroviral direcionado para o tecido alvo tem apresentado resultados promissores.

Recentemente, um estudo fase I envolvendo esta estratégia terapêutica foi apresentado para o adenocarcinoma do pâncreas, mostrando resultados de baixa toxicidade e efeitos colaterais, além de apresentar sinais de atividade com estabilização da doença considerada incurável (Gordon et al., 2004). Uma explicação possível para este fato, seria que o bloqueio da ciclina G estaria sendo realizado em pacientes com tumores sem a mutação do p53. Assim, este bloqueio levaria a aumento da expressão do p53 normal, permitindo a interrupção do ciclo celular de células malignas.

O gene da Ciclina G tem expressão maior no câncer do reto quando comparado ao tecido normal, confirmando a hipótese formulada inicialmente. Apesar disso, este gene também está expresso de maneira significativa em tecidos normais. Desta forma a eficiência da terapia gênica com seqüência “anti-sense” no câncer colorretal não pode ser justificada exclusivamente pela especificidade de expressão do gene ao tecido tumoral. Possivelmente, outros fatores como capacidade de distribuição pelo vetor bem como a interferência sobre outros mecanismos moleculares de importância no controle do ciclo celular (como a via do p53) contribuem para a eficiência desta alternativa terapêutica.

CAPÍTULO 6

Conclusões

Conclusões

1. A expressão imunohistoquímica da ciclina G é maior no adenocarcinoma do reto quando comparado ao tecido normal.
2. A expressão imunohistoquímica da ciclina G no tecido colorretal normal distante da neoplasia é raramente nula, embora frequentemente menor que no tecido neoplásico.
3. A expressão aumentada da ciclina G no adenocarcinoma do reto tem correlação com a ausência de metástases linfonodais.
4. A expressão da ciclina G não tem valor prognóstico isolado no câncer do reto em três anos de seguimento.

REFERÊNCIAS

Referências

- Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*. 1998;11(2):155-68.
- Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg*. 1954;139(6):846-52.
- Ayanian JZ, Zaslavsky AM, Fuchs CS, Guadagnoli E, Creech CM, Cress RD, O'Connor LC, West DW, Allen ME, Wolf RE, Wright WE. Use of adjuvant chemotherapy and radiation therapy for colorectal cancer in a population-based cohort. *J Clin Oncol*. 2003;21(7):1293-300.
- Bacon HE, Khubchandani IT. The Rationale of Aortoiliopelvic Lymphadenectomy and High Ligation of the Inferior Mesenteric Artery for Carcinoma of the Left Half of the Colon and Rectum. *Surg Gynecol Obstet*. 1964;119:503-8.
- Bates S, Rowan S, Vousden KH. Characterisation of human cyclin G1 and G2: DNA damage inducible genes. *Oncogene*. 1996;13(5):1103-9.
- Brasil. Ministério da Saúde. *Estimativa 2005: Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA; 2004.
- Buflin JA. Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Ann Intern Med*. 1990;113(10):779-88.
- Camilleri-Brennan J, Steele RJ. The impact of recurrent rectal cancer on quality of life. *Eur J Surg Oncol*. 2001;27(4):349-53.
- Chellappan SP, Giordano A, Fisher PB. Role of cyclin-dependent kinases and their inhibitors in cellular differentiation and development. In: Vogt, PK, Reed, S. *Cyclin dependent Kinase (CDK) inhibitors*. ed. Berlin ; New York: Springer; 1998. 57-103.
- Chen DS, Zhu NL, Hung G, Skotzko MJ, Hinton DR, Tolo V, Hall FL, Anderson WF, Gordon EM. Retroviral vector-mediated transfer of an antisense cyclin G1 construct inhibits osteosarcoma tumor growth in nude mice. *Hum Gene Ther*. 1997;8(14):1667-74.
- Clurman BE, Roberts JM. Cell Cycle Control: An Overview. In: Vogelstein, B, Kinzler, KW. *The genetic basis of human cancer*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2002. 145-62.
- Colquhoun P, Wexner SD, Cohen A. Adjuvant therapy is valuable in the treatment of rectal cancer despite total mesorectal excision. *J Surg Oncol*. 2003;83(3):133-9.

Daly JM, DeCosse JJ. Complications in surgery of the colon and rectum. *Surg Clin North Am*. 1983;63(6):1215-31.

de Vries A, Flores ER, Miranda B, Hsieh HM, van Oostrom CT, Sage J, Jacks T. Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(5):2948-53.

Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky AK, Moore M, Finlay C, Levine AJ. Gain of function mutations in p53. *Nat Genet*. 1993;4(1):42-6.

Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol*. 1932;35:323-32.

Dukes CE. The Surgical Pathology of Rectal Cancer. *Proc R Soc Med*. 1943;37:131-44.

Dukes CE, Bussey HJ. The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. *Br J Cancer*. 1958;12(3):309-20.

Dwight RW, Humphrey EW, Higgins GA, Keehn RJ. FUDR as an adjuvant to surgery in cancer of the large bowel. *J Surg Oncol*. 1973;5(3):243-9.

Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*. 1983;33(2):389-96.

Fetsch PA, Abati A. Overview of the clinical immunohistochemistry laboratory: regulations and troubleshooting guidelines. *Methods Mol Biol*. 1999;115:405-14.

Fielding LP, Stewart-Brown S, Blesovsky L, Kearney G. Anastomotic integrity after operations for large-bowel cancer: a multicentre study. *Br Med J*. 1980;281(6237):411-4.

Flood AB, Scott WR, Ewy W. Does practice make perfect? Part II: The relation between volume and outcomes and other hospital characteristics. *Med Care*. 1984a;22(2):115-25.

Flood AB, Scott WR, Ewy W. Does practice make perfect? Part I: The relation between hospital volume and outcomes for selected diagnostic categories. *Med Care*. 1984b;22(2):98-114.

Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg*. 1999;230(3):309-18; discussion 18-21.

Fortner JG, Silva JS, Cox EB, Golbey RB, Gallowitz H, Maclean BJ. Multivariate analysis of a personal series of 247 patients with liver metastases from colorectal cancer. II. Treatment by intrahepatic chemotherapy. *Ann Surg.* 1984a;199(3):317-24.

Fortner JG, Silva JS, Golbey RB, Cox EB, Maclean BJ. Multivariate analysis of a personal series of 247 consecutive patients with liver metastases from colorectal cancer. I. Treatment by hepatic resection. *Ann Surg.* 1984b;199(3):306-16.

Fortner JG, Lincer RM. Hepatic resection in the elderly. *Ann Surg.* 1990;211(2):141-5.

Gastrointestinal Tumor Study Group. Adjuvant therapy of colon cancer--results of a prospectively randomized trial. *N Engl J Med.* 1984;310(12):737-43.

Gastrointestinal Tumor Study Group. Prolongation of the disease-free interval in surgically treated rectal carcinoma. *N Engl J Med.* 1985;312(23):1465-72.

Gillett CE, Barnes DM. Demystified ... cell cycle. *Mol Pathol.* 1998;51(6):310-6.

Goes RN, Beart RW, Jr., Simons AJ, Gunderson LL, Grado G, Streeter O. Use of brachytherapy in management of locally recurrent rectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 1997;40(10):1177-9.

Gordon EM, Chen ZH, Liu L, Whitley M, Liu L, Wei D, Groshen S, Hinton DR, Anderson WF, Beart RW, Jr., Hall FL. Systemic administration of a matrix-targeted retroviral vector is efficacious for cancer gene therapy in mice. *Hum Gene Ther.* 2001;12(2):193-204.

Gordon EM, Cornelio GH, Lorenzo CC, 3rd, Levy JP, Reed RA, Liu L, Hall FL. First clinical experience using a 'pathotropic' injectable retroviral vector (Rexin-G) as intervention for stage IV pancreatic cancer. *Int J Oncol.* 2004;24(1):177-85.

Greene FL, American Joint Committee on Cancer., American Cancer Society. *AJCC cancer staging manual.* 6th ed. New York: Springer-Verlag; 2002.

Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin.* 2001;51(1):15-36.

Guillem JG, Moore HG, Paty PB, Cohen AM, Wong WD. Adequacy of distal resection margin following preoperative combined modality therapy for rectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2003;10(7):824.

Gunderson LL, Martin JK, O'Connell MJ, Beart RW, Kvols LK, Nagorney DM. Residual, recurrent, or unresectable gastrointestinal cancer. Role of radiation in single or combined modality treatment. *Cancer.* 1985;55(9 Suppl):2250-8.

Habr-Gama A, de Souza PM, Ribeiro U, Jr., Nadalin W, Gansl R, Sousa AH, Jr., Campos FG, Gama-Rodrigues J. Low rectal cancer: impact of radiation and chemotherapy on surgical treatment. *Dis Colon Rectum*. 1998;41(9):1087-96.

Habr-Gama A, Perez RO, Kiss DR, Rawet V, Scanavini A, Santinho PM, Nadalin W. Preoperative chemoradiation therapy for low rectal cancer. Impact on downstaging and sphincter-saving operations. *Hepatogastroenterology*. 2004;51(60):1703-7.

Habr-Gama A, Perez RO, Nadalin W, Nahas SC, Ribeiro U, Jr., Silva ESAH, Jr., Campos FG, Kiss DR, Gama-Rodrigues J. Long-term results of preoperative chemoradiation for distal rectal cancer correlation between final stage and survival. *J Gastrointest Surg*. 2005;9(1):90-9; discussion 9-101.

Hall FL, Liu L, Zhu NL, Stapfer M, Anderson WF, Beart RW, Gordon EM. Molecular engineering of matrix-targeted retroviral vectors incorporating a surveillance function inherent in von Willebrand factor. *Hum Gene Ther*. 2000;11(7):983-93.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86(3):353-64.

Hannan EL, O'Donnell JF, Kilburn H, Jr., Bernard HR, Yazici A. Investigation of the relationship between volume and mortality for surgical procedures performed in New York State hospitals. *Jama*. 1989;262(4):503-10.

Harrington KJ, Bateman AR, Melcher AA, Ahmed A, Vile RG. Cancer gene therapy: Part 1. Vector development and regulation of gene expression. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2002a;14(1):3-16.

Harrington KJ, Melcher AA, Bateman AR, Ahmed A, Vile RG. Cancer gene therapy: Part 2. Candidate transgenes and their clinical development. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2002b;14(2):148-69.

Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 2005;24(17):2899-908.

Hartwell LH, Mortimer RK, Culotti J, Culotti M. Genetic control of the cell division cycle in yeast: V. Genetic analysis of CDC mutants. *Genetics*. 1973;74(2):267-86.

Heald RJ. A new approach to rectal cancer. *Br J Hosp Med*. 1979;22(3):277-81.

Heald RJ, Ryall RD. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet*. 1986;1(8496):1479-82.

Hermanek P, Wiebelt H, Staimmer D, Riedl S. Prognostic factors of rectum carcinoma--experience of the German Multicentre Study SGCRC. German Study Group Colo-Rectal Carcinoma. *Tumori*. 1995;81(3 Suppl):60-4.

Higgins GA, Humphrey E, Juler G, LeVeen HH, McCaughan J, Keehn RJ. Adjuvant chemotherapy in the surgical treatment of large bowel cancer. *Cancer*. 1976;38(4):1461-7.

Horne MC, Goolsby GL, Donaldson KL, Tran D, Neubauer M, Wahl AF. Cyclin G1 and cyclin G2 comprise a new family of cyclins with contrasting tissue-specific and cell cycle-regulated expression. *J Biol Chem*. 1996;271(11):6050-61.

Hunt KK, Vorburger SA. Tech.Sight. Gene therapy. Hurdles and hopes for cancer treatment. *Science*. 2002;297(5580):415-6.

Iacopetta B. Are there two sides to colorectal cancer? *Int J Cancer*. 2002;101(5):403-8.

International Multicentre Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials (IMPACT B2) Investigators. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17(5):1356-63.

James RD, Donaldson D, Gray R, Northover JM, Stenning SP, Taylor I. Randomized clinical trial of adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil infusion in colorectal cancer (AXIS). *Br J Surg*. 2003;90(10):1200-12.

Jass JR. The pathological grading and staging of rectal cancer. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1988;149:21-38.

Jass JR. Pathological staging and prognostic indicators in rectal cancer. *Hum Pathol*. 1995;26(1):127.

Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(1):10-30.

Jensen MR, Factor VM, Thorgeirsson SS. Regulation of cyclin G1 during murine hepatic regeneration following Dipin-induced DNA damage. *Hepatology*. 1998;28(2):537-46.

Jensen MR, Audolfsson T, Keck CL, Zimonjic DB, Thorgeirsson SS. Gene structure and chromosomal localization of mouse cyclin G2 (Ccng2). *Gene*. 1999;230(2):171-80.

Jensen MR, Audolfsson T, Factor VM, Thorgeirsson SS. In vivo expression and genomic organization of the mouse cyclin I gene (Ccni). *Gene*. 2000;256(1-2):59-67.

Jensen MR, Factor VM, Fantozzi A, Helin K, Huh CG, Thorgeirsson SS. Reduced hepatic tumor incidence in cyclin G1-deficient mice. *Hepatology*. 2003;37(4):862-70.

Kapiteijn E, Kranenbarg EK, Steup WH, Taat CW, Rutten HJ, Wiggers T, van Krieken JH, Hermans J, Leer JW, van de Velde CJ. Total mesorectal excision (TME) with or without preoperative radiotherapy in the treatment of primary rectal cancer. Prospective randomised trial with standard operative and histopathological techniques. Dutch ColoRectal Cancer Group. *Eur J Surg*. 1999;165(5):410-20.

Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ, Pahlman L, Glimelius B, van Krieken JH, Leer JW, van de Velde CJ. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med*. 2001;345(9):638-46.

Kapiteijn E, Putter H, van de Velde CJ. Impact of the introduction and training of total mesorectal excision on recurrence and survival in rectal cancer in The Netherlands. *Br J Surg*. 2002;89(9):1142-9.

Kapiteijn E, van de Velde CJ. The role of total mesorectal excision in the management of rectal cancer. *Surg Clin North Am*. 2002;82(5):995-1007.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.

Kessler H, Hermanek P, Jr., Wiebelt H. Operative mortality in carcinoma of the rectum. Results of the German Multicentre Study. *Int J Colorectal Dis*. 1993;8(3):158-66.

Kimura SH, Ikawa M, Ito A, Okabe M, Nojima H. Cyclin G1 is involved in G2/M arrest in response to DNA damage and in growth control after damage recovery. *Oncogene*. 2001;20(25):3290-300.

King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science*. 1996;274(5293):1652-9.

Kouraklis G. Gene therapy for cancer: from the laboratory to the patient. *Dig Dis Sci*. 2000;45(6):1045-52.

Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, Wieand HS, Collins RT, Beart RW, Kubista TP, Poon MA, Meyers WC, Mailliard JA, et al. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N Engl J Med*. 1991;324(11):709-15.

Kuehne J, Kleisli T, Biernacki P, Girvigian M, Streeter O, Corman ML, Ortega AE, Vukasin P, Essani R, Beart RW. Use of high-dose-rate brachytherapy in the management of locally recurrent rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2003;46(7):895-9.

Kyzer S, Gordon PH. Experience with the use of the circular stapler in rectal surgery. *Dis Colon Rectum*. 1992;35(7):696-706.

Laurie JA, Moertel CG, Fleming TR, Wieand HS, Leigh JE, Rubin J, McCormack GW, Gerstner JB, Krook JE, Malliard J, et al. Surgical adjuvant therapy of large-bowel carcinoma: an evaluation of levamisole and the combination of levamisole and fluorouracil. The North Central Cancer Treatment Group and the Mayo Clinic. *J Clin Oncol*. 1989;7(10):1447-56.

Lees EM, Harlow E. Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol Cell Biol*. 1993;13(2):1194-201.

Lenz HJ, Anderson WF, Hall FL, Gordon EM. Clinical protocol. Tumor site specific phase I evaluation of safety and efficacy of hepatic arterial infusion of a matrix-targeted retroviral vector bearing a dominant negative cyclin G1 construct as intervention for colorectal carcinoma metastatic to liver. *Hum Gene Ther*. 2002;13(12):1515-37.

Leong AS. Quantitation in immunohistology: fact or fiction? A discussion of variables that influence results. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004;12(1):1-7.

Li JQ, Kubo A, Wu F, Usuki H, Fujita J, Bando S, Masaki T, Saoo K, Takeuchi H, Kobayashi S, Imaida K, Maeta H, Ishida T, Kuriyama S. Cyclin B1, unlike cyclin G1, increases significantly during colorectal carcinogenesis and during later metastasis to lymph nodes. *Int J Oncol*. 2003;22(5):1101-10.

Lockhart-Mummery J. Two-hundred cases of cancer of the rectum treated by perineal excision. *Br J Surg*. 1926;14:110-24.

Luna-Perez P, Rodriguez-Ramirez S, Rodriguez-Coria DF, Fernandez A, Labastida S, Silva A, Lopez MJ. Preoperative chemoradiation therapy and anal sphincter preservation with locally advanced rectal adenocarcinoma. *World J Surg*. 2001a;25(8):1006-11.

Luna-Perez P, Rodriguez-Ramirez S, Vega J, Sandoval E, Labastida S. Morbidity and mortality following abdominoperineal resection for low rectal adenocarcinoma. *Rev Invest Clin*. 2001b;53(5):388-95.

McArdle CS, Hole D. Impact of variability among surgeons on postoperative morbidity and mortality and ultimate survival. *Bmj*. 1991;302(6791):1501-5.

Medich D, McGinty J, Parda D, Karlovits S, Davis C, Caushaj P, Lembersky B. Preoperative chemoradiotherapy and radical surgery for locally advanced distal rectal adenocarcinoma: pathologic findings and clinical implications. *Dis Colon Rectum*. 2001;44(8):1123-8.

Metz CE. Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med.* 1978;8(4):283-98.

Miles WE. A method of performing abdominal-perineal resection of the rectum and of the terminal portion of the pelvic colon. *Lancet.* 1908;2:1812-13.

Miles WE. A method of performing abdomino-perineal excision for carcinoma of the rectum and of the terminal portion of the pelvic colon (1908). *CA Cancer J Clin.* 1971;21(6):361-4.

Minnick DT, Kunkel TA. DNA synthesis errors, mutators and cancer. *Cancer Surv.* 1996;28:3-20.

Minsky BD, Mies C, Recht A, Rich TA, Chaffey JT. Resectable adenocarcinoma of the rectosigmoid and rectum. I. Patterns of failure and survival. *Cancer.* 1988;61(7):1408-16.

Minsky BD. Multidisciplinary management of resectable rectal cancer. *Oncology (Williston Park).* 1996;10(11):1701-8, 13-4; discussion 14-18.

Mocellin S, Campana LG. [Trends in colorectal cancer vaccination]. *Recenti Prog Med.* 2005;96(7-8):338-43.

Mocellin S, Lise M, Nitti D. Targeted therapy for colorectal cancer: mapping the way. *Trends Mol Med.* 2005;11(7):327-35.

Moehler M, Teufel A, Galle PR. New chemotherapeutic strategies in colorectal cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2005;165:250-9.

Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Goodman PJ, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH, et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med.* 1990;322(6):352-8.

Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH, et al. Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer. *J Clin Oncol.* 1995a;13(12):2936-43.

Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, Ungerleider JS, Emerson WA, Tormey DC, Glick JH, Veeder MH, Mailliard JA. Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report. *Ann Intern Med.* 1995b;122(5):321-6.

Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature.* 1995;374(6518):131-4.

Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997;13:261-91.

Morita N, Kiryu S, Kiyama H. p53-independent cyclin G expression in a group of mature neurons and its enhanced expression during nerve regeneration. *J Neurosci*. 1996;16(19):5961-6.

Morson BC, Dawson IMP. *Morson & Dawson's gastrointestinal pathology*. 3rd ed. Oxford ; Boston: Blackwell Scientific Publications; 1990.

Moynihan B. The surgical treatment of the sigmoid flexure and rectum: with special attention to the principles observed. . *Surg Gynecol Obstet*. 1908;6:463-66.

Murray A. Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell*. 1995;81(2):149-52.

Okamoto K, Beach D. Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *Embo J*. 1994;13(20):4816-22.

Okamoto K, Prives C. A role of cyclin G in the process of apoptosis. *Oncogene*. 1999;18(32):4606-15.

Okamoto K, Li H, Jensen MR, Zhang T, Taya Y, Thorgeirsson SS, Prives C. Cyclin G recruits PP2A to dephosphorylate Mdm2. *Mol Cell*. 2002;9(4):761-71.

Parc R, Tiret E, Frileux P, Moszkowski E, Loygue J. Resection and colo-anal anastomosis with colonic reservoir for rectal carcinoma. *Br J Surg*. 1986;73(2):139-41.

Park M. Oncogenes. In: Vogelstein, B, Kinzler, KW. *The genetic basis of human cancer*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2002. 177-96.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(2):74-108.

Parks AG. Per-anal anastomosis. *World J Surg*. 1982;6(5):531-8.

Parks AG, Percy JP. Resection and sutured colo-anal anastomosis for rectal carcinoma. *Br J Surg*. 1982;69(6):301-4.

Perez R, Wu N, Klipfel AA, Beart RW, Jr. A better cell cycle target for gene therapy of colorectal cancer: cyclin G. *J Gastrointest Surg*. 2003;7(7):884-9.

Pezim ME, Nicholls RJ. Survival after high or low ligation of the inferior mesenteric artery during curative surgery for rectal cancer. *Ann Surg*. 1984;200(6):729-33.

Pollett WG, Nicholls RJ. The relationship between the extent of distal clearance and survival and local recurrence rates after curative anterior resection for carcinoma of the rectum. *Ann Surg*. 1983;198(2):159-63.

Porter GA, Soskolne CL, Yakimets WW, Newman SC. Surgeon-related factors and outcome in rectal cancer. *Ann Surg*. 1998;227(2):157-67.

Quirke P, Durdey P, Dixon MF, Williams NS. Local recurrence of rectal adenocarcinoma due to inadequate surgical resection. Histopathological study of lateral tumour spread and surgical excision. *Lancet*. 1986;2(8514):996-9.

Reimer CL, Borrás AM, Kurdistani SK, Garreau JR, Chung M, Aaronson SA, Lee SW. Altered regulation of cyclin G in human breast cancer and its specific localization at replication foci in response to DNA damage in p53+/+ cells. *J Biol Chem*. 1999;274(16):11022-9.

Registry of Hepatic Metastases. Resection of the liver for colorectal carcinoma metastases: a multi-institutional study of indications for resection. *Surgery*. 1988;103(3):278-88.

Rishi M, Schwarting R, Kovatich AJ, Ehya H. Detection of growth fraction in tumors by Ki67 monoclonal antibody in cytologic smears: a prospective study of 40 cases. *Diagn Cytopathol*. 1993;9(1):52-6; discussion 7-8.

Saltz LB, Minsky B. Adjuvant therapy of cancers of the colon and rectum. *Surg Clin North Am*. 2002;82(5):1035-58.

Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, Karstens JH, Liersch T, Schmidberger H, Raab R. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(17):1731-40.

Scheele J, Stang R, Altendorf-Hofmann A, Paul M. Resection of colorectal liver metastases. *World J Surg*. 1995;19(1):59-71.

Seidal T, Balaton AJ, Battifora H. Interpretation and quantification of immunostains. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(9):1204-7.

Sherr CJ. D-type cyclins. *Trends Biochem Sci*. 1995;20(5):187-90.

Shimizu A, Nishida J, Ueoka Y, Kato K, Hachiya T, Kuriaki Y, Wake N. CyclinG contributes to G2/M arrest of cells in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;242(3):529-33.

Simons AJ, Ker R, Groshen S, Gee C, Anthone GJ, Ortega AE, Vukasin P, Ross RK, Beart RW, Jr. Variations in treatment of rectal cancer: the influence of hospital type and caseload. *Dis Colon Rectum*. 1997;40(6):641-6.

Simunovic M, Sexton R, Rempel E, Moran BJ, Heald RJ. Optimal preoperative assessment and surgery for rectal cancer may greatly limit the need for radiotherapy. *Br J Surg*. 2003;90(8):999-1003.

Skotzko M, Wu L, Anderson WF, Gordon EM, Hall FL. Retroviral vector-mediated gene transfer of antisense cyclin G1 (CYCG1) inhibits proliferation of human osteogenic sarcoma cells. *Cancer Res*. 1995;55(23):5493-8.

Slanetz CA, Jr., Grimson R. Effect of high and intermediate ligation on survival and recurrence rates following curative resection of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 1997;40(10):1205-18; discussion 18-9.

Smith ML, Kontny HU, Bortnick R, Fornace AJ, Jr. The p53-regulated cyclin G gene promotes cell growth: p53 downstream effectors cyclin G and Gadd45 exert different effects on cisplatin chemosensitivity. *Exp Cell Res*. 1997;230(1):61-8.

Smith ML, Bortnick RA, Sheikh MS, Fornace AJ, Jr. Chromatin relaxation by overexpression of mutant p53, HPV16-E6, or cyclin G transgenes. *Exp Cell Res*. 1998;242(1):235-43.

Song HH. Analysis of correlated ROC areas in diagnostic testing. *Biometrics*. 1997;53(1):370-82.

Stillman B. Cell cycle control of DNA replication. *Science*. 1996;274(5293):1659-64.

Surtees P, Ritchie JK, Phillips RK. High versus low ligation of the inferior mesenteric artery in rectal cancer. *Br J Surg*. 1990;77(6):618-21.

Swedish Rectal Cancer Trial. Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. *N Engl J Med*. 1997;336(14):980-7.

Tjandra JJ, Kilkenny JW, Buie WD, Hyman N, Simmang C, Anthony T, Orsay C, Church J, Otchy D, Cohen J, Place R, Denstman F, Rakinic J, Moore R, Whiteford M. Practice parameters for the management of rectal cancer (revised). *Dis Colon Rectum*. 2005;48(3):411-23.

Turnbull RB, Jr., 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(3):420-7.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408(6810):307-10.

Vogelstein B, Kinzler KW. *The genetic basis of human cancer*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2002.

Wade TP, Virgo KS, Li MJ, Callander PW, Longo WE, Johnson FE. Outcomes after detection of metastatic carcinoma of the colon and rectum in a national hospital system. *J Am Coll Surg*. 1996;182(4):353-61.

Wanebo HJ, Chu QD, Vezeridis MP, Soderberg C. Patient selection for hepatic resection of colorectal metastases. *Arch Surg*. 1996;131(3):322-9.

Wiggers T, Jeekel J, Arends JW, Brinkhorst AP, Kluck HM, Luyk CI, Munting JD, Povel JA, Rutten AP, Volovics A, et al. No-touch isolation technique in colon cancer: a controlled prospective trial. *Br J Surg*. 1988;75(5):409-15.

Williams NS, Dixon MF, Johnston D. Reappraisal of the 5 centimetre rule of distal excision for carcinoma of the rectum: a study of distal intramural spread and of patients' survival. *Br J Surg*. 1983;70(3):150-4.

Wolmark N, Fisher B, Rockette H, Redmond C, Wickerham DL, Fisher ER, Jones J, Glass A, Lerner H, Lawrence W, et al. Postoperative adjuvant chemotherapy or BCG for colon cancer: results from NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst*. 1988;80(1):30-6.

Wolmark N, Colangelo L, Wieand S. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project trials in colon cancer. *Semin Oncol*. 2001;28(1 Suppl 1):9-13.

Wu L, Yee A, Liu L, Carbonaro-Hall D, Venkatesan N, Tolo VT, Hall FL. Molecular cloning of the human CAK1 gene encoding a cyclin-dependent kinase-activating kinase. *Oncogene*. 1994;9(7):2089-96.

Xu F, Prescott MF, Liu PX, Chen ZH, Liao G, Gordon EM, Hall FL. Long term inhibition of neointima formation in balloon-injured rat arteries by intraluminal instillation of a matrix-targeted retroviral vector bearing a cytotoxic mutant cyclin G1 construct. *Int J Mol Med*. 2001;8(1):19-30.

Yamada K, Ishizawa T, Niwa K, Chuman Y, Akiba S, Aikou T. Patterns of pelvic invasion are prognostic in the treatment of locally recurrent rectal cancer. *Br J Surg*. 2001;88(7):988-93.

Yardley G, Zauberman A, Oren M, Jackson P. Individual promoter and intron p53-binding motifs from the rat Cyclin G1 promoter region support transcriptional activation by p53 but do not show co-operative activation. *FEBS Lett*. 1998;430(3):171-5.

Yoshikawa R, Utsunomiya J. Cell proliferation kinetics are abnormal in transitional mucosa adjacent to colorectal carcinoma. *Br J Surg*. 1996;83(1):36-9.

Zauberman A, Lupo A, Oren M. Identification of p53 target genes through immune selection of genomic DNA: the cyclin G gene contains two distinct p53 binding sites. *Oncogene*. 1995;10(12):2361-6.

Zhao L, Samuels T, Winckler S, Korgaonkar C, Tompkins V, Horne MC, Quelle DE. Cyclin G1 has growth inhibitory activity linked to the ARF-Mdm2-p53 and pRb tumor suppressor pathways. *Mol Cancer Res*. 2003;1(3):195-206.

Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem*. 1993;39(4):561-77.

APÊNDICE I

Dados Clínicos e Epidemiológicos

Dados Clínicos e Epidemiológicos

Nome	Registro Hospitalar	Número do Bloco	Idade	Sexo	Raça	Tempo de sintomas (meses)	Tipo de sintoma	Distância da BA(cm)	CEA pré
RRCN	3293310j	3997952	61	f	branca	5	dor	6	1,4
TMB	3286560k	4000269	47	f	branca	18	diarreia	8	não
MCA	3299194d	4026403	62	f	negra	1	sangramento	15	3,6
JFC	3284581c	4061373	59	m	branca	6	sangramento	10	17
AMR	3318466a	4088492	46	m	parda	12	diarreia	6	4,7
MSP	3318471c	4103114	49	m	branca	6	dor	7	42,9
OMS	3319590k	4123506	67	f	amarela	12	sangramento	8	2,0
DNV	3028308c	4211820	46	f	parda	11	sangramento	10	30,8
SR	3318155f	4222245	68	m	negra	12	sangramento	15	4,2
JGR	13505099a	4259440	68	f	branca	12	diarreia	15	10,7
ABS	5129047i	4279530	62	m	branca	12	sangramento	13	2,9
LMOI	3308198h	4296435	79	m	branca	12	diarreia	8	0,8
JCF	3118411b	4304438	73	m	branca	5	diarreia	12	20,6
TAPM	3340053a	4325346	80	f	branca	11	diarreia	10	não
EDOP	3330794j	4343859	68	f	parda	24	sangramento	10	20,6
CM	13516122c	4496230	48	f	branca	12	diarreia	8	1,0
LF	13517945a	4620267	64	f	branca	12	sangramento	13	235
GN	3332453c	4628993	50	m	parda	7	sangramento	10	2,0
WGG	13520120g	4635353	44	m	branca	12	sangramento	12	8,7
NC	3350954b	4636961	64	m	branca	16	diarreia	10	não

Dados Clínicos e Epidemiológicos

Nome	Registro Hospitalar	Número do Bloco	Idade	Sexo	Raça	Tempo de sintomas (meses)	Tipo de sintoma	Distância da BA(cm)	CEA pré
MJBP	13514517f	4643046	73	f	branca	4	sangramento	12	3
MB	13526390c	4652886	68	m	branca	4	diarreia	12	1,1
LVL	13531028c	4726189	87	f	branca	2	sangramento	2	88,1
HBC	3114866h	4747798	92	f	branca	2	sangramento	13	4,5
AO	13542744f	4864255	69	m	branca	12	diarreia	13	4,4
GC	13548114i	4920929	55	m	branca	2	sangramento	8	2,8
JR	13554892f	5021960	54	m	branca	9	sangramento	10	15,8
SP	2831426i	5065372	66	f	branca	12	sangramento	13	2,3
FJO	13543520h	5075149	66	m	negra	5	sangramento	8	3,3
TT	13563423h	5144906	77	m	amarela	3	sangramento	6	287
MACF	13440437b	5271770	44	f	branca	2	dor	15	não
EPS	13565466e	5370680	63	m	branca	8	diarreia	8	não
JROS	5255777k	5559553	51	m	branca	1	dor	15	30,6
NJB	13465664f	5595177	66	m	branca	10	emagrecimento	14	21,5
MA	13470831g	5622778	61	m	parda	10	sangramento	10	1,7
SC	13463015j	5624584	36	m	branca	3	diarreia	8	1,4

APÊNDICE II

Dados Clínicos e Anátomo-patológicos

Dados Clínicos e Anátomo-patológicos

Nome	Registro Hospitalar	Tipo de SO	Tipo histológico	Diferenciação	Tamanho (cm)	Margem distal (cm)
RRCN	3293310j	Hartmann	Adenoca soe	bem	5	2
TMB	3286560k	RA	Adenoca soe	bem	5	2,6
MCA	3299194d	RA lap	Adenoca soe	mod	6	3
JFC	3284581c	RA	Adenoca soe	mod	2,5	3
AMR	3318466a	RA	Adenoca soe	mod	5	2
MSP	3318471c	RA	Adenoca soe	mod	4,5	2,5
OMS	3319590k	RA + ileostomia	Adenoca soe	mod	5,1	1
DNV	3028308c	RA	Adenoca soe	mod	8	3,5
SR	3318155f	RA	Adenoca soe	mod	4,2	1
JGR	13505099a	Hartmann	Adenoca soe	pouco	2	4
ABS	5129047i	RA	Adenoca soe	mod	5	2,5
LMOI	3308198h	AAPR	Adenoca soe	bem	11	8
JCF	3118411b	RA	Adenoca muc	mod	5,2	2
TAPM	3340053a	RA	Adenoca soe	mod	9	3
EDOP	3330794j	RA	Adenoca soe	mod	6,5	2,5
CM	13516122c	RA + hepatec.	Adenoca soe	mod	5,5	3,5
LF	13517945a	RA	Adenoca soe	mod	5	2,5
GN	3332453c	RA	Adenoca soe	mod	5	2
WGG	13520120g	RA	Adenoca soe	mod	4,5	2
NC	3350954b	RA	Adenoca muc.	mod	5,5	2

Dados Clínicos e Anátomo-patológicos

Nome	Registro Hospitalar	Tipo de SO	Tipo histológico	Diferenciação	Tamanho (cm)	Margem distal (cm)
MJBP	13514517f	RA	Adenoca soe	mod	6,5	2,5
MB	13526390c	RA + ileostomia	Adenoca soe	bem	6	1,4
LVL	13531028c	AAPR	Adenoca soe	mod	6	2
HBC	3114866h	RA	Adenoca soe	mod	3,7	2
AO	13542744f	Hartmann	Adenoca soe	mod	7,2	1
GC	13548114i	RA	Adenoca soe	mod	3	1
JR	13554892f	RA	Adenoca soe	mod	6,5	2,5
SP	2831426i	RA	Adenoca soe	mod	7	2
FJO	13543520h	RA	Adenoca soe	mod	6	2
TT	13563423h	AAPR	Adenoca soe	mod	9	3
MACF	13440437b	RA	Adenoca soe	mod	11	2
EPS	13565466e	RA	Adenoca soe	mod	7	2
JROS	5255777k	RA	Adenoca soe	mod	6,2	1,8
NJB	13465664f	RA	Adenoca soe	mod	7	1
MA	13470831g	RA	Adenoca soe	mod	4	1,8
SC	13463015j	AAPR	Adenoca soe	mod	14,5	10

APÊNDICE III

Dados Anátomo-patológicos

Dados Anátomo-patológicos

Nome	Registro Hospitalar	T	N	M	Estadio	Invasão neural	Invasão angiolinfática	Infiltrado inflamatório	Desmoplasia
RRCN	3293310j	2	0	0	2	n	n	moderada	intensa
TMB	3286560k	3	0	0	2	p	p	não	não
MCA	3299194d	3	2	1	4	p	p	moderada	moderada
JFC	3284581c	3	2	0	3	n	n	leve	não
AMR	3318466a	3	0	0	2	n	p	leve	não
MSP	3318471c	3	1	0	3	p	n	não	não
OMS	3319590k	2	2	0	3	n	n	moderada	não
DNV	3028308c	3	2	0	3	p	p	moderada	moderada
SR	3318155f	2	0	0	1	n	n	moderada	moderada
JGR	13505099a	3	0	0	2	n	n	leve	leve
ABS	5129047i	2	0	0	1	n	n	moderada	não
LMOI	3308198h	3	0	0	2	n	n	leve	moderada
JCF	3118411b	3	2	0	3	p	n	moderada	moderada
TAPM	3340053a	4	2	0	3	p	p	moderada	moderada
EDOP	3330794j	3	0	0	2	n	n	leve	não
CM	13516122c	3	2	1	4	n	p	moderada	moderada
LF	13517945a	2	1	1	4	p	n	não	não
GN	3332453c	3	3	0	3	p	n	moderada	leve
WGG	13520120g	3	1	0	3	n	n	moderada	não
NC	3350954b	3	0	0	2	n	n	moderada	leve

Dados Anátomo-patológicos

Nome	Registro Hospitalar	T	N	M	Estadio	Invasão neural	Invasão angiointifática	Infiltrado inflamatório	Desmoplasia
MJBP	13514517f	3	1	0	3	n	n	leve	não
MB	13526390c	3	0	0	2	n	n	moderada	leve
LVL	13531028c	3	0	0	2	n	n	leve	leve
HBC	3114866h	2	0	0	1	n	n	não	moderado
AO	13542744f	3	2	0	3	n	n	leve	leve
GC	13548114i	1	0	0	1	n	n	moderada	moderada
JR	13554892f	3	0	0	2	n	n	moderada	não
SP	2831426i	3	3	0	2	p	p	não	não
FJO	13543520h	3	0	0	2	n	p	não	não
TT	13563423h	3	3	1	4	p	p	moderada	moderada
MACF	13440437b	4	3	0	3	p	p	moderada	não
EPS	13565466e	3	0	0	2	n	p	intensa	intensa
JROS	5255777k	3	0	0	2	n	p	leve	leve
NJB	13465664f	3	0	0	2	p	p	leve	leve
MA	13470831g	3	0	0	2	n	n	não	não
SC	13463015j	3	0	0	2	n	n	não	não

APÊNDICE IV

Expressão Quantitativa no Tecido Normal

Expressão Quantitativa no Tecido Normal

Nome	Registro Hospitalar	No. células positivas	No. total contado	No. Positivo / Total	Total (%)
RRCN	3293310j	15	557	15/557	2.6
TMB	3286560k	22	544	22/544	4
MCA	3299194d	263	541	263/541	48.6
JFC	3284581c	219	539	219/539	40.6
AMR	3318466a	61	576	61/576	10.5
MSP	3318471c	377	495	377/495	76.1
OMS	3319590k	288	537	288/537	53.6
DNV	3028308c	189	500	189/500	37.8
SR	3318155f	41	625	41/625	6.5
JGR	13505099a	42	503	42/503	8.3
ABS	5129047i	0	540	0/540	0
LMOI	3308198h	578	599	578/599	96.4
JCF	3118411b	332	638	332/638	52
TAPM	3340053a	98	548	98/548	17.8
EDOP	3330794j	235	585	235/585	40.1
CM	13516122c	272	427	272/427	63.7
LF	13517945a	423	494	423/494	85.6
GN	3332453c	283	473	283/473	59.8
WGG	13520120g	348	525	348/525	66.2
NC	3350954b	198	558	198/558	34.4
MJBP	13514517f	118	396	118/396	29.8
MB	13526390c	148	456	148/456	32.4
LVL	13531028c	137	595	137/595	23
HBC	3114866h	175	628	175/628	27.8
AO	13542744f	317	548	317/548	57.8
GC	13548114i	287	459	287/459	62.5
JR	13554892f	346	486	346/486	71.1
SP	2831426i	314	590	314/590	53.2
FJO	13543520h	230	586	230/586	39.2
TT	13563423h	187	442	187/442	42.3
MACF	13440437b	358	535	358/535	66.9
EPS	13565466e	203	613	203/613	33.1
JROS	5255777k	505	650	505/650	77.6
NJB	13465664f	269	605	269/605	44.4
MA	13470831g	191	547	191/547	34.9
SC	13463015j	113	523	113/523	21

APÊNDICE V

Expressão Quantitativa no Tecido Tumoral

Expressão Quantitativa no Tecido Tumoral

Nome	Registro Hospitalar	Número do Bloco	No. células positivas	No. total contado	No. Positivo / Total	TOTAL (%)
RRCN	3293310j	3997952	791	870	791/870	90.9
TMB	3286560k	4000269	327	440	327/440	74.3
MCA	3299194d	4026403	723	737	723/737	98.1
JFC	3284581c	4061373	643	773	643/773	83.1
AMR	3318466a	4088492	997	1010	997/1010	98.7
MSP	3318471c	4103114	564	601	564/601	93.8
OMS	3319590k	4123506	835	925	835/925	90.2
DNV	3028308c	4211820	0	604	0/604	0.0
SR	3318155f	4222245	695	703	695/703	98.8
JGR	13505099a	4259440	583	592	583/592	98.4
ABS	5129047i	4279530	27	655	27/655	4.1
LMOI	3308198h	4296435	776	813	776/813	95.4
JCF	3118411b	4304438	71	644	71/644	11.0
TAPM	3340053a	4325346	535	592	535/592	90.3
EDOP	3330794j	4343859	659	834	659/834	79.0
CM	13516122c	4496230	304	673	304/673	45.1
LF	13517945a	4620267	562	631	562/631	89.0
GN	3332453c	4628993	392	518	392/518	75.6
WGG	13520120g	4635353	607	666	607/666	91.1
NC	3350954b	4636961	797	817	797/817	97.5
MJBP	13514517f	4643046	369	418	369/418	88.2
MB	13526390c	4652886	138	697	138/697	19.7
LVL	13531028c	4726189	421	658	421/658	63.9
HBC	3114866h	4747798	740	802	740/802	92.2
AO	13542744f	4864255	520	559	520/559	93.0
GC	13548114i	4920929	827	827	827/827	100.0
JR	13554892f	5021960	146	752	146/752	19.4
SP	2831426i	5065372	844	946	844/946	89.2
FJO	13543520h	5075149	739	943	739/943	78.3
TT	13563423h	5144906	652	667	652/667	97.7
MACF	13440437b	5271770	785	836	785/836	93.8
EPS	13565466e	5370680	804	804	804/804	100.0
JROS	5255777k	5559553	325	771	325/771	42.1
NJB	13465664f	5595177	719	746	719/746	96.3
MA	13470831g	5622778	765	862	765/862	88.7
SC	13463015j	5624584	723	798	723/798	90

APÊNDICE VI

Diferença de Expressão Quantitativa
entre o Tecido Normal e Tumoral

Diferença de Expressão Quantitativa entre o Tecido Normal e Tumoral

Nome	Registro Hospitalar	Diferença Tumor X Normal (%)	Valor da diferença de %
RRCN	3293310j	maior	88.3
TMB	3286560k	maior	70.3
MCA	3299194d	maior	49.5
JFC	3284581c	maior	42.5
AMR	3318466a	maior	88.2
MSP	3318471c	maior	17.7
OMS	3319590k	maior	36.6
DNV	3028308c	menor	-37.8
SR	3318155f	maior	92.3
JGR	13505099a	maior	90.1
ABS	5129047i	maior	4.1
LMOI	3308198h	menor	-1
JCF	3118411b	menor	-41
TAPM	3340053a	maior	72.5
EDOP	3330794j	maior	38.9
CM	13516122c	menor	-18.6
LF	13517945a	maior	3.4
GN	3332453c	menor	15.8
WGG	13520120g	maior	24.9
NC	3350954b	maior	63.1
MJBP	13514517f	maior	58.4
MB	13526390c	menor	-12.7
LVL	13531028c	maior	40.9
HBC	3114866h	maior	64.4
AO	13542744f	maior	35.2
GC	13548114i	maior	37.5
JR	13554892f	menor	-51.1
SP	2831426i	maior	36
FJO	13543520h	maior	39.1
TT	13563423h	maior	55.4
MACF	13440437b	maior	26.9
EPS	13565466e	maior	66.9
JROS	5255777k	menor	-35.5
NJB	13465664f	maior	51.9
MA	13470831g	maior	53.8
SC	13463015j	maior	69

APÊNDICE VII

Resultado da Expressão
Semi-quantitativa (cruzes)

Resultado da Expressão Semi-quantitativa (cruzes)

Nome	Registro Hospitalar	Cruzes tumor	Cruzes normal	Tumor X Normal	Diferença (Tumor-Normal)
RRCN	3293310j	3	0	maior	3
TMB	3286560k	3	0	maior	3
MCA	3299194d	4	3	maior	1
JFC	3284581c	3	2	maior	1
AMR	3318466a	4	2	maior	2
MSP	3318471c	3	3	igual	1
OMS	3319590k	3	3	igual	0
DNV	3028308c	0	3	menor	-3
SR	3318155f	4	1	maior	3
JGR	13505099a	4	3	maior	1
ABS	5129047i	0	0	igual	0
LMOI	3308198h	4	3	maior	1
JCF	3118411b	0	0	igual	0
TAPM	3340053a	3	2	maior	1
EDOP	3330794j	3	1	maior	2
CM	13516122c	3	3	igual	0
LF	13517945a	4	2	maior	2
GN	3332453c	4	3	maior	1
WGG	13520120g	4	3	maior	1
NC	3350954b	4	2	maior	2
MJBP	13514517f	4	3	maior	1
MB	13526390c	4	2	maior	2
LVL	13531028c	3	1	maior	2
HBC	3114866h	4	1	maior	3
AO	13542744f	3	3	igual	0
GC	13548114i	4	3	maior	1
JR	13554892f	2	3	menor	-1
SP	2831426i	3	3	igual	0
FJO	13543520h	3	0	maior	3
TT	13563423h	3	1	maior	2
MACF	13440437b	4	1	maior	3
EPS	13565466e	3	2	maior	1
JROS	5255777k	4	3	maior	1
NJB	13465664f	4	3	maior	1
MA	13470831g	4	1	maior	3
SC	13463015j	4	1	maior	3

APÊNDICE VIII

Discordâncias

Discordâncias entre os Examinadores

Nome	Discordância cruzes	Discordância escore	Tipo de Discordância (tumor)	Diferença de cruzes
RRCN	não	não	não	0
TMB	não	não	não	0
MCA	não	não	não	0
JFC	não	não	não	0
AMR	não	não	não	0
MSP	sim	sim	subestimação	1
OMS	sim	não	superestimação	1
DNV	não	não	não	0
SR	não	não	não	0
JGR	sim	não	subestimação	1
ABS	não	não	não	0
LMOI	sim	não	subestimação	1
JCF	sim	não	superestimação	1
TAPM	não	não	não	0
EDOP	não	não	não	0
CM	sim	não	superestimação	1
LF	sim	não	subestimação	1
GN	sim	não	subestimação	1
WGG	sim	não	subestimação	1
NC	não	não	não	0
MJBP	não	não	não	0
MB	sim	não	subestimação	1
LVL	não	não	não	0
HBC	sim	não	subestimação	1
AO	não	não	não	0
GC	não	não	não	0
JR	sim	não	subestimação	2
SP	sim	não	superestimação	1
FJO	não	não	não	0
TT	não	não	não	0
MACF	não	não	não	0
EPS	sim	não	superestimação	1
JROS	não	não	não	0
NJB	não	não	não	0
MA	não	não	não	0
SC	não	não	não	0

APÊNDICE IX

Resultado da Expressão
Semi-quantitativa (escore)

Resultado da Expressão Semi-quantitativa (escore)

Nome	Registro Hospitalar	Escore final tumor [†]	Escore final normal [†]	Tumor X Normal (Escore)
RRCN	3293310j	P	N	maior
TMB	3286560k	P	N	maior
MCA	3299194d	P	P	igual
JFC	3284581c	P	N	maior
AMR	3318466a	P	N	maior
MSP	3318471c	P	P	igual
OMS	3319590k	P	P	igual
DNV	3028308c	N	P	menor
SR	3318155f	P	N	maior
JGR	13505099a	P	P	igual
ABS	5129047i	N	N	igual
LMOI	3308198h	P	P	igual
JCF	3118411b	N	N	igual
TAPM	3340053a	P	N	maior
EDOP	3330794j	P	N	maior
CM	13516122c	P	P	igual
LF	13517945a	P	N	maior
GN	3332453c	P	P	igual
WGG	13520120g	P	P	igual
NC	3350954b	P	N	maior
MJBP	13514517f	P	P	igual
MB	13526390c	P	N	maior
LVL	13531028c	P	N	maior
HBC	3114866h	P	N	maior
AO	13542744f	P	P	igual
GC	13548114i	P	P	igual
JR	13554892f	N	P	menor
SP	2831426i	P	P	igual
FJO	13543520h	P	N	maior
TT	13563423h	P	N	maior
MACF	13440437b	P	N	maior
EPS	13565466e	P	N	maior
JROS	5255777k	P	P	igual
NJB	13465664f	P	P	igual
MA	13470831g	P	N	maior
SC	13463015j	P	N	maior

† P=Positivo; N=Negativo

APÊNDICE X

Resultados das Curvas ROC

Presença de Invasão Angiolinfática

A curva ROC determinada por estas variáveis apresentou área de 0,54 ($p=0,65$), refletindo decréscimo significativo da especificidade para cada incremento da sensibilidade nos valores da diferença do percentual em relação a presença de invasão angiolinfática. Com isto, não se obteve valor crítico de diferença percentual de expressão da ciclina G Tumor-Normal que pudesse corresponder a ocorrência de invasão angiolinfática do tumor com sensibilidade e especificidade apreciáveis. Assim, uma diferença acima de 10% de expressão Tumor-Normal, indica a invasão angiolinfática do tumor com 77% de sensibilidade e 26% de especificidade. Ao contrario, um diferença acima de 80% de expressão Tumor-Normal, indica invasão angiolinfática com 7% de sensibilidade e 87% de especificidade.

Curva ROC com imunoexpressão da Ciclina G (quantitativa) e invasão angiolinfática (área de 0,54 e $p=0,65$).

Ausência de Invasão Perineural

A curva ROC determinada por estas variáveis apresentou área de 0,59 ($p=0,36$), refletindo decréscimo significativo da especificidade para cada incremento da sensibilidade nos valores da diferença do percentual em relação a ausência de invasão perineural. Com isto, não se obteve valor crítico de diferença percentual de expressão da ciclina G Tumor-Normal que pudesse corresponder a ausência de invasão perineural do tumor com sensibilidade e especificidade apreciáveis. Assim, uma diferença acima de 10% de expressão Tumor-Normal, indica a ausência de invasão perineural do tumor com 75% de sensibilidade e 25% de especificidade. Ao contrario, um diferença acima de 71% de expressão Tumor-Normal, indica a ausência de invasão perineural com 16% de sensibilidade e 92% de especificidade.

Curva ROC com imunoexpressão da Ciclina G (quantitativa) e ausência de invasão perineural (área de 0,59 e $p=0,36$).

Ausência de Infiltrado Inflamatório

A curva ROC determinada por estas variáveis apresentou área de 0,58 ($p=0,49$), refletindo decréscimo significativo da especificidade para cada incremento da sensibilidade nos valores da diferença do percentual em relação a ausência de invasão perineural. Com isto, não se obteve valor crítico de diferença percentual de expressão da ciclina G Tumor-Normal que pudesse corresponder a ausência de infiltrado inflamatório peritumoral com sensibilidade e especificidade apreciáveis. Assim, uma diferença acima de 10% de expressão Tumor-Normal, indica a ausência de infiltrado inflamatório peritumoral com 87% de sensibilidade e 29% de especificidade. Ao contrario, um diferença acima de 50% de expressão Tumor-Normal, indica a ausência de infiltrado inflamatório com 50% de sensibilidade e 65% de especificidade.

Curva ROC com imunoexpressão da Ciclina G (quantitativa) e ausência de infiltrado inflamatório peritumoral (área de 0,58 e $p=0,49$).

Desmoplasia

A curva ROC determinada por estas variáveis apresentou área de 0,52 ($p=0,77$), refletindo decréscimo significativo da especificidade para cada incremento da sensibilidade nos valores da diferença do percentual em relação a presença de desmoplasia peritumoral. Com isto, não se obteve valor crítico de diferença percentual de expressão da ciclina G Tumor-Normal que pudesse corresponder a presença desta característica no tumor com sensibilidade e especificidade apreciáveis. Assim, diferença acima de 10% de expressão Tumor-Normal, indica a ausência de desmoplasia com 70% de sensibilidade e 19% de especificidade. Ao contrario, um diferença acima de 57% de expressão Tumor-Normal, indica a ausência de desmoplasia com 35% de sensibilidade e 75% de especificidade.

Curva ROC com imunoexpressão da Ciclina G (quantitativa) e presença de desmoplasia (área de 0,52 e $p=0,77$).

APÊNDICE XI

Correlação entre Imunoexpressão e Variáveis Categóricas

Correlação entre Imunoexpressão e Variáveis Categóricas

Variável	Método de quantificação	Categorias	Tumor > Normal	Normal ≥ Tumor	p
Sexo	Quantitativo	Masculino	15 (71,4%)	6 (28,6%)	0,27
		Feminino	13 (86,7%)	2 (13,3%)	
	Cruzes	Masculino	16 (76,2%)	5 (23,8%)	0,82
		Feminino	11 (73,3%)	4 (26,7%)	
	Escore	Masculino	10 (47,6%)	11 (52,4%)	0,73
		Feminino	8 (56,3%)	7 (42,7%)	
Raça	Quantitativo	Branca	20 (76,9%)	6 (23,1%)	0,84
		Não-Branca	8 (80,0%)	2 (20%)	
	Cruzes	Branca	19 (73,1%)	7 (26,9%)	0,60
		Não-Branca	8 (80,0%)	2 (20,0%)	
	Escore	Branca	12 (46,2%)	14 (53,8%)	0,45
		Não-Branca	6 (60,0%)	4 (40,0%)	
Tipo de Operação	Quantitativo	RA	25 (78,1%)	7 (21,9%)	0,80
		APR	3 (75,0%)	1 (25%)	
	Cruzes	RA	23 (71,9%)	9 (28,1%)	0,40
		APR	4 (100,0%)	0	
	Escore	RA	15 (46,9%)	17 (53,1%)	0,28
		APR	3 (75,0%)	1 (25%)	
pT	Quantitativo	pT1	1 (100,0%)	0	0,33
		pT2	6 (100,0%)	0	
		pT3	19 (70,4%)	8 (29,6%)	
		pT4	2 (100%)	0	
	Cruzes	pT1	1 (100,0%)	0	0,74
		pT2	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
		pT3	20 (74,1%)	7 (25,9%)	
		pT4	2 (100,0%)	0	
	Escore	pT1	0	1 (100,0%)	0,26
		pT2	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
		pT3	12 (44,4%)	15 (53,6%)	
		pT4	2 (100,0%)	0	

Variável	Método de quantificação	Categorias	Tumor > Normal	Normal ≥ Tumor	p
pN	Quantitativo	pN0	16 (80,0%)	4 (20,0%)	0,50
		pN1	4 (100,0%)	0	
		pN2	5 (62,5%)	3 (37,5%)	
		pN3	3 (75,0%)	1 (25,0%)	
	Cruzes	pN0	18 (90,0%)	2 (10,0%)	0,03
		pN1	3 (75,0%)	1 (25,0%)	
		pN2	3 (37,5%)	5 (62,5%)	
		pN3	3 (75,0%)	1 (25,0%)	
	Escore	pN0	13 (65,0%)	7 (35,0%)	0,10
		pN1	1 (25,0%)	3 (75,0%)	
		pN2	2 (25,0%)	6 (75,0%)	
		pN3	2 (50,0%)	2 (50,0%)	
Presença de Acometimento Linfonodal	Quantitativo	pN0	16 (80,0%)	4 (20,0%)	0,72
		pN1-3	12 (75,0%)	4 (25,0%)	
	Cruzes	pN0	18 (90,0%)	2 (10,0%)	0,02
		pN1-3	9 (56,3%)	7 (43,7%)	
	Escore	pN0	13 (65,0%)	7 (35,0%)	0,04
		pN1-3	5 (68,8%)	11 (31,2%)	
Metástases	Quantitativo	M0	25 (78,1%)	7 (21,9%)	0,88
		M1	3 (75,0%)	1 (25,0%)	
	Cruzes	M0	24 (75,0%)	8 (25,0%)	1,00
		M1	3 (75,0%)	1 (25,0%)	
	Escore	M0	16 (50,0%)	16 (50,0%)	1,00
		M1	2 (50,0%)	2 (50,0%)	
Estadio Final	Quantitativo	I	4 (100,0%)	0	0,72
		II	13 (76,5%)	4 (23,5%)	
		III	8 (72,7%)	3 (27,3%)	
		IV	3 (75,0%)	1 (25,0%)	
	Cruzes	I	3 (75,0%)	1 (25,0%)	0,25
		II	15 (88,2%)	2 (11,8%)	
		III	6 (54,5%)	5 (45,5%)	
		IV	3 (75,0%)	1 (25,0%)	
	Escore	I	2 (50,0%)	2 (50,0%)	0,29
		II	11 (64,7%)	6 (35,3%)	
		III	3 (27,3%)	8 (72,7%)	
		IV	2 (50,0%)	2 (50,0%)	

Variável	Método de quantificação	Categorias	Tumor > Normal	Normal ≥ Tumor	p
Diferenciação	Quantitativo	Pouco	0	1 (100%)	0,33
		Moderado	6 (19,4)	25 (80,6%)	
		Bem	2 (50%)	2 (50%)	
	Cruzes	Pouco	0	1 (100%)	0,38
		Moderado	9 (29,0%)	22 (71,0%)	
		Bem	0	4 (100,0%)	
	Escore	Pouco	1 (100%)	0	0,36
		Moderado	16 (51,6%)	15 (48,4%)	
		Bem	1 (25,0%)	3 (75,0%)	
Invasão Perineural	Quantitativo	Presente	9 (75,0%)	3 (25,0%)	0,77
		Ausente	19 (79,2%)	5 (20,8%)	
	Cruzes	Presente	8 (66,7%)	4 (33,3%)	0,41
		Ausente	19 (79,2%)	5 (20,8%)	
	Escore	Presente	5 (41,7%)	7 (58,3%)	0,48
		Ausente	13 (54,2%)	11 (45,8%)	
Invasão Angio-linfática	Quantitativo	Presente	10 (76,9%)	3 (23,1%)	0,92
		Ausente	18 (78,3%)	5 (21,7%)	
	Cruzes	Presente	10 (76,9%)	3 (23,1%)	0,84
		Ausente	17 (73,9%)	6 (26,1%)	
	Escore	Presente	7 (53,8%)	6 (46,2%)	0,72
		Ausente	11 (47,8%)	12 (52,2%)	
Infiltrado Inflamatório	Quantitativo	Presente	20 (71,4%)	8 (28,6%)	0,08
		Ausente	8 (100,0%)	0	
	Cruzes	Presente	21 (75,0%)	7 (25,0%)	1,00
		Ausente	6 (75,0%)	2 (25,0%)	
	Escore	Presente	12(42,8%)	16 (57,2%)	0,10
		Ausente	6 (75,0%)	2 (25,0%)	
Desmoplasia	Quantitativo	Presente	13(65,0%)	7 (35,0%)	0,053
		Ausente	15 (93,8%)	1 (6,2%)	
	Cruzes	Presente	16 (80,0%)	4 (20,0%)	0,43
		Ausente	11 (68,8%)	5 (31,2%)	
	Escore	Presente	9 (45,0%)	11 (55,0%)	0,50
		Ausente	9 (56,3%)	7 (43,7%)	

APÊNDICE XII

Correlação entre Imunoexpressão e Variáveis Contínuas

Correlação entre Imunoexpressão e Variáveis Contínuas

Variável	Método de quantificação	Tumor > Normal	Normal ≥ Tumor	p
Idade (anos)	Quantitativo	63,0±12,8	58,6±12,7	0,40
	Cruzes	62,9±13,5	59,3±10,1	0,47
	Escore	63,9±14,6	60,1±10,6	0,37
Tempo de sintomas (meses)	Quantitativo	8,7±5,6	7,6±4,0	0,59
	Cruzes	8,0±5,8	10,1±2,8	0,30
	Escore	8,6±6,2	8,4±4,2	0,92
Distancia da Borda Anal (cm)	Quantitativo	10,2±3,3	10,6±2,3	0,79
	Cruzes	10,3±3,4	10,4±2,4	0,92
	Escore	9,4±3,3	11,2±2,7	0,08
CEA pré (ng/ml)	Quantitativo	33,6±74,6	12,8±13,3	0,44
	Cruzes	34,2±76,2	13,6±15,1	0,43
	Escore	51,5±96,4	11,4±12,7	0,09
Tamanho (cm)	Quantitativo	5,9±2,5	6,6±1,9	0,47
	Cruzes	6,1±2,7	6,0±1,2	0,87
	Escore	6,3±2,8	5,8±1,9	0,51
Margem distal (cm)	Quantitativo	2,4±1,6	3,0±2,1	0,35
	Cruzes	2,6±1,9	2,2±0,9	0,56
	Escore	2,6±1,9	2,5±1,6	0,92

APÊNDICE XIII

Dados de Seguimento

Dados de Seguimento

Nome	Registro Hospitalar	Recidiva	Local da recidiva	Tempo recidiva (meses)	Sobrevivida geral (meses)	Óbito por neoplasia	Óbito por outra causa
RRCN	32933310j	não	NA	NA	36	não	não
TMB	3286560k	não	NA	NA	47	não	não
MCA	3299194d	não	NA	NA	10	não	não
JFC	3284581c	sim	figado	3	28	não	não
AMR	3318466a	não	NA	NA	0	não	sim
MSP	3318471c	não	NA	NA	28	não	não
OMS	3319590k	não	NA	NA	31	não	não
DNV	3028308c	não	NA	NA	60	não	não
SR	3318155f	sim	anastomose	20	58	não	não
JGR	13505099a	sim	figado e delgado	12	12	não	não
ABS	5129047i	não	NA	NA	36	não	não
LMOI	3308198h	não	NA	NA	0	não	não
JCF	3118411b	sim	pelve	15	15	sim	não
TAPM	3340053a	não	NA	NA	5	não	sim
EDOP	3330794j	sim	figado	24	54	não	não
CM	13516122c	sim	figado	10	52	não	não
LF	13517945a	não	NA	NA	48	não	não
GN	3332453c	não	NA	NA	49	não	não
WGG	13520120g	sim	reto	36	48	não	não
NC	3350954b	não	NA	NA	47	não	não
MJBP	13514517f	não	NA	NA	0	não	não

Nome	Registro Hospitalar	Recidiva	Local da recidiva	Tempo recidiva (meses)	Sobrevida geral (meses)	Óbito por neoplasia	Óbito por outra causa
MB	13526390c	não	NA	NA	13	não	não
LVL	13531028c	não	NA	NA	24	não	não
HBC	3114866h	não	NA	NA	27	não	não
AO	13542744f	sim	pélvica	26	42	não	não
GC	13548114i	não	NA	NA	0	não	não
JR	13554892f	não	NA	NA	37	não	não
SP	2831426i	não	NA	NA	19	não	não
FJO	13543520h	não	NA	NA	38	não	não
TT	13563423h	não	NA	NA	4	não	não
MACF	13440437b	não	NA	NA	0	não	sim
EPS	13565466e	não	NA	NA	12	não	não
JROS	5255777k	não	NA	NA	24	não	não
NJB	13465664f	sim	cólon	NA	26	não	não
MA	13470831g	não	NA	NA	25	não	não
SC	13463015j	não	NA	NA	26	não	não