

VALOR PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SURVIVINA EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRATAMENTO CIRURGICO NO CÂNCER COLORRETAL

¹MAURO DE SOUZA LEITE PINHO, ²LIZ R. GHISLANDI, ³HERCÍLIO FRONZA JR., ⁴ANNELISE WENGERKIEWICZ, ⁴ANTONIO PEREIRA FILHO, ⁵LUÍS CARLOS FERREIRA, ⁵HARRY KLEINUBING JR., ⁶LESLIE ECKER FERREIRA

¹Departamento de Cirurgia do Hospital Municipal São José, ²Universidade do Contestado e Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente, ³Serviços Integrados de Patologia, ⁴Departamento de Medicina, ⁵Departamento de Cirurgia do Hospital Municipal São José e Departamento de Medicina, ⁶Laboratório de Pesquisas Biomoleculares da UNIVILLE, Joinville, SC, Brasil

PINHO MSL, GHISLANDI LR, FRONZA JR. H, WENGERKIEWICZ A, PEREIRA FILHO A, FERREIRA LC, KLEINUBING JR. H, FERREIRA LE. Valor Prognóstico da Expressão da Proteína Survivina em Pacientes Submetidos à Tratamento Cirurgico no Cancer Colorretal. *Rev bras Coloproct*, 2005;25(2):121-127.

RESUMO: Estudos recentes apontam existência de uma proteína com importante função inibidora da apoptose, denominada survivina, a qual apresenta aparentemente um valor prognóstico no câncer colorretal. **OBJETIVOS:** Avaliar a incidência e valor prognóstico da expressão tecidual da proteína survivina no câncer colorretal, além da hipótese de que a imunohistoquímica é um método adequado para sua análise na prática clínica. **MÉTODOS:** Foi realizada uma análise retrospectiva da expressão da proteína survivina através de imunohistoquímica em espécimes tumorais referentes a 45 pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico do câncer colorretal. A imunorreatividade encontrada em cada espécime foi relacionada ao estadiamento e recidivas tumorais, além de uma análise qualitativa da adequação da imunohistoquímica para esta finalidade. **RESULTADOS:** Observou-se a expressão da proteína survivina em 40 casos (88,8%). Não foi evidenciada associação significativa entre a expressão da survivina e o estadiamento ($p= 0,85$) ou a presença de recidiva tumoral ($p= 0,23$). Em relação à imunohistoquímica, observamos que o posicionamento a nível citoplasmático desta proteína e sua reatividade em tecidos normais, ainda que em menor intensidade, representaram importantes obstáculos à sua quantificação em decorrência dos limites imprecisos observados à microscopia ótica. **CONCLUSÕES:** Embora apresentando uma elevada incidência de sua expressão nos casos de câncer colorretal examinados, não foi possível relacionar a expressão da survivina com o estadiamento ou prognóstico do câncer colorretal. Além disto, seu padrão de expressão citoplasmático associado à sua presença em tecidos normais mostrou-se em nossa experiência pouco adequado ao estudo quantitativo pela técnica de imunohistoquímica.

Descritores: câncer colorretal, survivina.

INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos, obteve-se importante avanço na compreensão da etiopatogenia das doenças neoplásicas através do desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, as quais possibilitam a identificação de mecanismos intra e extracelulares de

controle do ciclo celular e o conseqüente comportamento biológico dos tumores, os quais estão relacionados à expressão e atuação de um grande número de moléculas, em sua maior parte composta por proteínas.

A utilização crescente de técnicas como o sequenciamento genético e a imunohistoquímica expandiu em muito nossos conhecimentos a respeito

Trabalho realizado pelo Departamento de Cirurgia do Hospital Municipal São José, Disciplina de Clínica Cirúrgica e Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE, Joinville, SC.

Recebido em 05/04/2005

Aceito para publicação em 16/05/2005

do grande número de genes e funções de suas respectivas proteínas. Diversos métodos têm sido desenvolvidos para sua detecção e quantificação por técnicas de DNA recombinante (PCR), porém a imunohistoquímica permanece como o método mais disponível para a análise em bases clínicas, devido ao seu custo reduzido e à possibilidade de sua realização em laboratórios convencionais de anatomia patológica.

Estudos recentes apontam existência de uma proteína com importante função inibidora da apoptose, denominada survivina, a qual apresenta aparentemente um importante valor prognóstico no câncer colorretal, entre outros¹⁻³. Existem evidências de que a ação da survivina seja relevante na transição de adenoma com baixa displasia para carcinoma, o qual está associado a uma redução da apoptose e aumento na proliferação celular.

Assim sendo, o objetivo do presente trabalho é avaliar a incidência e valor prognóstico da expressão tecidual da proteína survivina no câncer colorretal, assim como a hipótese de que a imunohistoquímica é um método adequado para sua análise, visando uma maior aplicabilidade clínica.

MÉTODOS

Casuística

Foi realizada uma análise retrospectiva da expressão da proteína survivina através de imunohistoquímica em espécimes tumorais referentes a 45 pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico do câncer colorretal no Departamento de Cirurgia do Hospital Municipal São José, em Joinville, SC, sendo estes casos selecionados de acordo com a qualidade dos blocos de tecidos em parafina adequados para realização da imunohistoquímica. Dentre estes foram incluídos 20 casos de pacientes do sexo feminino e 25 do masculino, totalizando respectivamente 44% e 56% da amostra. Em relação à localização do tumor, esta mostrou-se compatível com a distribuição usual observada na literatura, conforme observado na Tabela-1.

Estadiamento Tumoral

Foram incluídos no presente estudo apenas pacientes Dukes B e C. Pacientes Dukes A foram

Tabela 1 – Distribuição dos pacientes segundo o sítio.

SÍTIO	Nº de Pacientes	%
Colon Direito	9	20
Colon Esquerdo	2	9
Colon Sigmóide	11	24
Colon Transverso	4	9
Reto	19	43
Total	45	100

excluídos da presente casuística devido a possível viés, decorrente às baixas incidência e possibilidade de recidiva.

Recidiva tumoral

Foi considerada recidiva da doença, a presença de recorrência local ou metastática da doença diagnosticada através de biopsias ou exames de imagens. Dentro da amostra selecionada, esta foi observada em 17 (37,7%) dos casos em um seguimento médio de 57 meses.

Método Imunohistoquímico

Todas as lâminas foram submetidas à técnica de imunohistoquímica para a pesquisa da expressão da proteína survivina, sendo utilizado o anticorpo específico monoclonal Survivin Ab- 3 (clone 5E8), produzido pela Neo Markers (MS-1203-P1), para detecção da expressão da proteína survivina.

Para avaliação de resultado do exame de imunohistoquímica foram utilizadas duas variáveis, sendo estas a extensão e a intensidade da coloração da proteína survivina pelo anticorpo. Para avaliação destas, foram determinados cinco campos com aumento de 400 vezes, sendo utilizada a análise por graus, segundo Altieri e cols. Visando aumentar a reprodutibilidade desta análise subjetiva, estes graus foram agrupados, segundo demonstrado nas Tabelas-2 e 3, para classificação como positivos ou negativos.

Análise Estatística

Para a análise estatística, utilizaram-se os testes qui-quadrado para demonstrar a associação entre

Tabela 2 – Análise da extensão.

Extensão	Grau	Classificação
0 – 5 %	0	Negativo
5 – 25%	1	
25 – 50%	2	
50 – 75%	3	Positivo
75% – 100%	4	

as variáveis estudadas, enquanto que o estudo da correlação indicará a existência de relação entre as variáveis.

RESULTADOS

Incidência de expressão de survivina

Observou-se a expressão da proteína survivina em 40 casos entre o total de 45 casos estudados (88,8%).

Extensão X Estadiamento

Conforme demonstrado na Tabela-4, não foi evidenciada associação significativa entre a extensão da survivina no tecido e o estadiamento tumoral ($p=0,85$).

Tabela 3 – Análise da intensidade.

Intensidade	Grau	Classificação
0	Negativo	Negativo
1	Fraco	
2	Moderado	Positivo
3	Intenso	

Tabela 4 – Análise da extensão de acordo com a classificação de Dukes.

Estadiamento (Dukes)	n	Positividade na extensão	p
B	24	20 (83,3%)	0,85
C	21	17 (81,0%)	

Tabela 5 – Análise da extensão de acordo com a recidiva.

Recidiva Tumoral	n	Positividade na Extensão	p
Sim	17	12 (70,6%)	0,23
Não	28	25 (89,3%)	

Extensão X Recidiva

Conforme demonstrado na Tabela-5 não foi encontrada associação significativa entre a extensão da coloração tecidual pela survivina e a presença de recidiva tumoral ($p=0,2347$).

Intensidade X Estadiamento

Conforme demonstrado na Tabela- 6, não foi evidenciada associação entre intensidade da coloração tecidual pela proteína survivina e o estadiamento pela classificação de Dukes. ($p=0,9828$).

Intensidade X Recidiva

Conforme demonstrado na Tabela-7, não foi evidenciada associação entre intensidade da coloração tecidual pela proteína survivina e presença de recidiva tumoral .

Tabela 6 – Análise da intensidade de acordo com estadiamento.

Estadiamento (Dukes)	n	Positividade na intensidade	p
B	24	17 (70,8%)	0,98
C	21	14 (66,7%)	

Tabela 7 – Análise da relação entre intensidade e recidiva.

Recidiva Tumoral	n	Positividade na intensidade	p
Sim	17	11 (64,7%)	0,88
Não	28	20 (71,4%)	

Intensidade X Extensão

A análise da correlação entre a intensidade e a extensão da expressão de proteína survivina, observadas pela imunohistoquímica na presente série, mostrou-se altamente significativa com $r = 0,69$ e $p < 0,0001$.

DISCUSSÃO

Tendo sido descrita pela primeira vez em 1997 por Ambrosini¹ como integrante de uma família de proteínas inibidoras de apoptose (IAP), muitos dos aspectos referentes à expressão da survivina permanecem ainda bastante controversos. Dentre estes, podemos destacar os resultados bastante conflitantes ainda observados na literatura a respeito da presença ou não desta proteína em tecidos normais. Reed e cols (2001)⁴ afirmam que “enquanto os tecidos fetais contém abundante survivina em mRNA e proteínas, a maior parte dos tecidos normais não a apresentam”. Esta afirmação pode ser confirmada pelo relato de diversos autores como Knutsen e cols (2004)⁵, os quais foram incapazes de detectar a presença de survivina através do método de imunohistoquímica na mucosa normal de 74 pacientes portadores de câncer de reto. Também utilizando a imunohistoquímica, Lin e cols (2003)⁶ falharam em encontrar qualquer reatividade para survivina em 30 fragmentos de mucosa intestinal normal. Por outro lado, diversos autores têm relatado resultados absolutamente opostos a estes, através da demonstração de proteína survivina em tecidos normais. Utilizando a imunohistoquímica, Gianani e cols (2001)⁷ demonstraram a presença de proteína survivina em todos os 20 casos de mucosa colônica normal observada. Zhang e cols (2001)⁸ encontraram também uma positividade de 100% para a presença de survivina em 28 fragmentos de mucosa colônica, utilizando a técnica de RT-PCR.

A função fisiológica da proteína survivina no epitélio intestinal

Um dos mais interessantes achados referentes à possível função da proteína survivina tem emergido a partir de estudos que demonstram sua expressão preferencial na base das criptas intestinais. Zhang e cols (2001)⁸ associaram este achado à redução da expressão da proteína APC nesta região e seu progressivo aumento na direção ascendente da cripta

em direção ao lúmen intestinal, onde a expressão de survivina é ausente, e sugeriram a hipótese de que a proteína APC inibe a ação da survivina. De acordo com esta hipótese, tal arranjo seria adequado para justificar o elevado índice proliferativo das células na base da cripta e a maior incidência de apoptoses nas células situadas junto à abertura luminal das criptas intestinais, facilitada pela ausência de expressão de survivina nesta região. Esta hipótese foi reforçada a partir dos estudos de Boman e cols (2004)⁹, os quais demonstraram um perfil de expressão semelhante em criptas colônicas em pacientes portadores de polipose familiar e controles. Gianani e cols (2001)⁷ adicionaram a esta hipótese uma importante informação ao relatarem uma diferença no padrão de expressão de survivina na cripta intestinal, ao comparar mucosas normais e neoplásicas. De acordo com este estudo, foi possível observar um gradiente decrescente de expressão de survivina a partir da base da cripta em direção à luz intestinal em epitélio intestinal normal, enquanto tal padrão tornou-se progressivamente alterado quando comparado ao aspecto heterogêneo observado nos adenomas e adenocarcinomas colônicos, respectivamente.

Embora não tenha sido considerada como uma variável pré-definida para este estudo, a análise do padrão de imunocoloração observado nos espécimes incluídos no presente trabalho revelou um aspecto correspondente àquele relatado pelos autores acima, com predomínio de expressão de survivina na base das criptas em segmentos de mucosa colônica normal, sendo este padrão alterado progressivamente nos tecidos tumorais.

Incidência de expressão em tumores colorretais

Assim como a expressão em tecidos normais, existe ainda grande controvérsia quanto à real incidência da observação de expressão da survivina no câncer colorretal, ocorrendo, como podemos notar na Tabela-8, uma variação que oscila entre 54 e 100%.

No presente estudo, encontramos uma positividade de 88,8% nos espécimes tumorais analisados, situando-se esta em um nível elevado em relação à mediana de 65% entre os resultados demonstrados na Tabela-8.

Valor prognóstico da expressão de survivina

Este é um dos principais objetivos nos estudos referentes à expressão de survivina no câncer colorretal. Sarela e cols (2001)² observaram nos casos positivos

uma sobrevida de 5 anos significativamente menor (94% X 52%), enquanto Rodel e cols (2002) ³ avaliaram a expressão de survivina em adenocarcinomas de reto e encontraram uma correlação inversa bastante significativa referente não apenas à sobrevida (77% X 18%), mas também no que diz respeito à recidiva local (37% X 6%) e metástases à distância (78% X 18%). Resultados semelhantes foram observados por Yang e cols ¹¹, os quais analisaram 91 casos de câncer colorretal e encontraram uma positividade significativamente maior em casos com metástases (56% x 45%), além de uma pior sobrevida em casos de tumores positivos para a expressão de survivina (88,9% x 65,2%; p <0,01).

No presente estudo não foi possível demonstrar valor prognóstico significativo entre a expressão tumoral de survivina e o estadiamento ou índice de recidiva tumoral, tanto na análise pela extensão de coloração desta proteína quanto por sua intensidade, contrariando os estudos acima citados. Embora possamos considerar a possibilidade de ocorrência de uma insuficiência de amostragem para alcançar a significância estatística (erro tipo I), nossa principal suspeita recai, no entanto, sobre a natureza bastante subjetiva da avaliação quantitativa inerente ao método de análise da expressão tumoral através de imunohistoquímica, a qual discutiremos a seguir.

A imunohistoquímica como método de avaliação da survivina

Embora represente uma das principais ferramentas no estudo da biologia molecular através da possibilidade de identificação da presença de determinada proteína mediante sua coloração após sua ligação ao anticorpo específico, a imunohistoquímica apresenta uma importante desvantagem devido à dificuldade de obter-se uma quantificação objetiva. Para minimizar este problema, diversas formas de

classificação têm sido utilizadas, baseando-se em supostos graus de imunorreatividade, os quais poderiam de alguma forma ser utilizados como elementos comparativos entre amostras distintas. Além disto, a própria natureza do método apresenta outros sérios obstáculos a esta reprodutibilidade, incluindo a presença de um grande número de variáveis como anticorpos de diferentes origens, utilização de um ou mais corantes, variações referentes a diluições, tempo e temperatura de incubação, além da eventual necessidade de realização de mais de uma bateria de exames em momentos diferentes.

Em alguns centros, a utilização da tecnologia destinada à análise destas lâminas de imunohistoquímica, através da chamada citometria digital, tem logrado oferecer um melhor controle destas variáveis, permanecendo no entanto relevantes questões referentes à reprodutibilidade entre diferentes centros, observadores e métodos de coloração.

No caso da análise da expressão de survivina, observa-se uma variabilidade entre os diferentes autores na forma de quantificação da imunorreatividade. Yao e cols (2004) ¹², ao analisar uma série de 126 casos de câncer colorretal consideraram como presente a imunorreatividade em todos os espécimes, a qual foi, no entanto, classificada como alta ou baixa. Por outro lado, Sarela e cols (2001) ² analisaram uma série de 49 casos de câncer colorretal e relataram uma positividade de apenas 61,2%. Considerando-se a natureza subjetiva desta avaliação, torna-se difícil comparar estes dois estudos, não podendo ser excluída a hipótese de que espécimes cuja imunorreatividade foi considerada como ausente por estes últimos autores, poderia talvez ser classificada como de baixa reatividade pelos critérios de Yao e cols ¹².

Em nossa experiência, pudemos observar a presença de um fator complicador adicional ao estudo

Tabela 8 – Expressão de survivina no câncer colorretal.

Autor	Método	n	Positividade Survivina
Chen e cols, 2004 ¹⁰	RT-PCR	52	67,3%
Yang e cols, 2004 ¹¹	RT-PCR	42	54,8%
Lin e cols, 2003 ⁶	Imunohistoquímica	87	63,2%
Sarela e cols, 2001 ²	Imunohistoquímica	49	61,2%
Gianani e cols, 2001 ⁷	Imunohistoquímica	20	100%
Presente estudo	Imunohistoquímica	45	88,8%

da survivina pela técnica de imunohistoquímica. Apesar da boa reatividade obtida e da qualidade adequada dos métodos de coloração realizados, o posicionamento intracelular disseminado a nível citoplasmático desta proteína e sua reatividade em tecidos normais, ainda que em menor intensidade, representou um sério obstáculo adicional à sua quantificação em decorrência do aspecto disseminado e de limites imprecisos dentro dos tecidos. Neste sentido, embora seja nossa intenção prosseguir nestes estudos após possíveis tentativas de melhor padronização de leitura dos padrões de imunoreatividade, pareceu-nos importante registrar estas dificuldades encontradas com o objetivo de que

nossa experiência possa servir como elemento de auxílio para outros autores interessados na análise da expressão tecidual de survivina.

Como conclusão, observamos então que, apesar de uma positividade de 88,8% de positividade para a expressão da survivina nos casos estudados, não foi possível relacionar a expressão da survivina com o estadiamento ou o prognóstico do câncer colorretal. A partir de experiência inicial, pudemos ainda concluir que o padrão de expressão citoplasmático de survivina associado à sua presença em tecidos normais, ainda que em menor intensidade, mostrou-se pouco adequado ao estudo quantitativo pela técnica de imunohistoquímica.

SUMMARY: Estudos recentes apontam existência de uma proteína com importante função inibidora da apoptose, denominada survivina, a qual apresenta aparentemente um valor prognóstico no câncer colorretal. **OBJETIVOS:** Avaliar a incidência e valor prognóstico da expressão tecidual da proteína survivina no câncer colorretal, além da hipótese de que a imunohistoquímica é um método adequado para sua análise na prática clínica. **MÉTODOS:** Foi realizada uma análise retrospectiva da expressão da proteína survivina através de imunohistoquímica em espécimes tumorais referentes a 45 pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico do câncer colorretal. A imunoreatividade encontrada em cada espécime foi relacionada ao estadiamento e recidivas tumorais, além de uma análise qualitativa da adequação da imunohistoquímica para esta finalidade. **RESULTADOS:** Observou-se a expressão da proteína survivina em 40 casos (88,8%). Não foi evidenciada associação significativa entre a expressão da survivina e o estadiamento ($p=0,85$) ou a presença de recidiva tumoral ($p=0,23$). Em relação à imunohistoquímica, observamos que o posicionamento a nível citoplasmático desta proteína e sua reatividade em tecidos normais, ainda que em menor intensidade, representaram importantes obstáculos à sua quantificação em decorrência dos limites imprecisos observados à microscopia ótica. **CONCLUSÕES:** Embora apresentando uma elevada incidência de sua expressão nos casos de câncer colorretal examinados, não foi possível relacionar a expressão da survivina com o estadiamento ou prognóstico do câncer colorretal. Além disto, seu padrão de expressão citoplasmático associado à sua presença em tecidos normais mostrou-se em nossa experiência pouco adequado ao estudo quantitativo pela técnica de imunohistoquímica.

Key words: Câncer colorretal, survivina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC: A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.* 1997; 3: 917-21.
2. Sarela AI, Scott N, Ramsdale J, Markham AF, Guillou PJ: Immunohistochemical detection of the anti-apoptosis protein, survivin, predicts survival after curative resection of stage II colorectal carcinomas. *Ann Surg Oncol.* 2001; 8: 305-10.
3. Rodel F, Hoffmann J, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, Weiss C, Gunther K, et al.: High survivin expression is associated with reduced apoptosis in rectal cancer and may predict disease-free survival after preoperative radiochemotherapy and surgical resection. *Strahlenther Onkol.* 2002; 178: 426-35.
4. Reed JC: The Survivin saga goes in vivo. *J Clin Invest.* 2001; 108: 965-9.
5. Knutsen A, Adell G, Sun XF: Survivin expression is an independent prognostic factor in rectal cancer patients with and without preoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004; 60: 149-55.
6. Lin LJ, Zheng CQ, Jin Y, Ma Y, Jiang WG, Ma T: Expression of survivin protein in human colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 2003; 9: 974-7.

7. Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, Frost M, Bobak J, Lehner R, et al.: Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. *Hum Pathol.* 2001; 32: 119-25.
8. Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ: Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 8664-7. Erratum in: *Cancer Res* 2002; 62: 7379.
9. Boman BM, Walters R, Fields JZ, Kovatich AJ, Zhang T, Isenberg GA, et al.: Colonic crypt changes during adenoma development in familial adenomatous polyposis: immunohistochemical evidence for expansion of the crypt base cell population. *Am J Pathol.* 2004; 165: 1489-98.
10. Chen WC, Liu Q, Fu JX, Kang SY: Expression of survivin and its significance in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2004; 10: 2886-9.
11. Yang D, Zhu YQ, Qi J: Expression and clinical significance of survivin gene and PTEN protein in colorectal adenocarcinoma. *Ai Zheng.* 2004; 23: 306-9.
12. Yao HB, Wu AG, Huang ZH: Expression of survivin and its clinical significance in colorectal carcinoma. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 2004; 24: 1412-5.

Endereço para correspondência:

Mauro de Souza Leite Pinho
Rua Palmares, 380 - Atiradores
89203-230 - Joinville (SC)