

CLÁUDIO SADDY RODRIGUES [COY n 839

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas, para obtenção do título de Mestre em Cirurgia pelo aluno Claudio Saddy Rodrigues Coy. Campinas, 24 de agosto de 1993.

Prof. Dr. Raul Raposo de Medeiros
Orientador

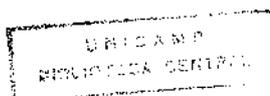
ANÁLISE DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLEOLO (NORS) NA
AVALIAÇÃO DO PROGNÓSTICO DO ADENOCARCINOMA RETAL

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIRURGIA

ORIENTADOR:
PROF. DR. RAUL RAPOSO DE [MEDEIROS]

CO-ORIENTADORA:
PROFA. DRA. MÍRIAM APARECIDA DA SILVA [TREVISAN]

CAMPINAS
1993



UNIVERSIDADE	BC
MUNICÍPIO	
DATA	1995
Nº	264/93
VALOR	R\$ 800,00
DATA	29/10/93
Nº CDD	

CM-00047984-3

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Coy, Claudio Saddy Rodrigues

C839a Análise das Regiões Organizadoras de Nucléolo (NORs) na avaliação do prognóstico do adenocarcinoma retal / Claudio Saddy Rodrigues Coy. -- Campinas, SP : [s.n.], 1993.

Orientadores: Raul Raposo de Medeiros, Miriam Aparecida da Silva Trevisan.

Tese (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Regiões organizadoras do nucléolo. 2. Adenocarcinoma do reto. I. Medeiros, Raul Raposo de. II. Trevisan, Miriam Aparecida da Silva. III. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas

20.CDD - 616.34
- 616.35

Índices para Catálogo Sistemático:

1. Região organizadora do nucléolo	616.34
2. Adenocarcinoma do reto	616.35

A Constantina, Gustavo, Victor e ao nosso próximo filho que vai nascer em novembro, pelo amor e compreensão durante a realização deste trabalho

A meu pai, Santos, com quem entrei pela primeira vez em uma sala de cirurgia e cujos passos sempre procurarei seguir na busca da medicina de boa qualidade

A minha mãe, Jeanette, e irmãos, Diana, Angela e Paulo

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Raul Raposo de Medeiros, pela orientação e estímulo durante a elaboração desta tese e demonstração de confiança presente desde a época de minha residência médica. A minha gratidão por sempre manter abertas as portas do Serviço de Colo-Proctologia desta Faculdade.

A Professora Doutora Miriam Aparecida da Silva Trevisan, exemplo de seriedade profissional, pela análise histopatológica realizada neste trabalho e por dedicar valiosas horas de seu escasso tempo com críticas, sugestões e explicações para a realização do mesmo.

Ao Professor Doutor Juvenal Ricardo Navarro Góes, o timoneiro de vários trabalhos em nossa escola, pelas valiosíssimas sugestões desde as fases iniciais desta tese. Com sua amizade e incentivo pude concluir essa etapa, e mais importante, adquirir valiosos conhecimentos que procurarei utilizar na vida acadêmica.

Ao Professor Doutor João José Fagundes, a quem sempre admirei como médico e Professor, e ensinou-me, entre tantas coisas, os segredos das cirurgias de abaixamento; pela amizade e estímulo presentes desde a graduação.

Ao Professor Doutor Luis Sérgio Leonardi, Titular da Disciplina de Moléstias do Aparelho Digestivo, onde pude aprender os fundamentos da cirurgia.

Ao Doutor Carlos Augusto do Amaral e ao Doutor Celso de Oliveira amigos e contemporâneos da residência, pelo apoio e amizade.

Ao Professor Doutor Luis Alberto Magna pela realização dos estudos estatísticos.

A Sra. Patricia Magalhães Coy pela versão em inglês do resumo.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Dados de literatura.....	03
1.1.1 Considerações gerais.....	03
1.1.2 Fatores prognósticos.....	08
1.1.2.1 Proliferação celular.....	19
2 CASUÍSTICA E MÉTODOS	30
2.1 CASUÍSTICA.....	30
2.1.1 Idade.....	31
2.1.2 Sexo.....	31
2.1.3 Grupo étnico.....	31
2.1.4 Tempo de seguimento pós-operatório.....	31
2.1.5 Caracterização da amostra.....	32
2.1.5.1 Diferenciação histopatológica.....	32
2.1.5.2 Disseminação tumoral.....	32
2.1.5.3 Cirurgias realizadas.....	32
2.1.5.4 Localização das neoplasias.....	33
2.1.5.5 Evolução pós-operatória com e sem doença....	33
2.1.5.6 Presença de metástases à distância ou carcinomatose.....	33
2.1.6 Critérios de inclusão.....	34

2.2 MÉTODOS.....	35
2.2.1 Diagnóstico das neoplasias.....	35
2.2.2 Técnica Ag-NOR.....	36
2.2.3 Contagem dos pontos corados pela prata.....	36
2.2.4 Aspectos morfológicos das NORs.....	37
2.2.5 Definição dos grupos de estudo.....	37
2.2.6 Análise dos resultados.....	38
2.2.7 Metodologia.....	39
2.2.7.1 Contagens e análise morfológica das NORs em função da evolução clínica e presença de metástases ou carcinomatose.....	39
2.2.7.2 Contagem e análise morfológica das NORs em função de fatores prognósticos.....	39
2.2.7.2.1 Contagem e análise morfológica das NORs em função da idade.....	40
2.2.7.2.2 Contagem e análise morfológica das NORs em função da diferenciação histopatológica.....	40
2.2.7.2.3 Contagem e análise morfológica das NORs em função da disseminação tumoral.....	40
2.2.7.2.4 Contagem e análise morfológica das NORs em função da localização do tumor.....	41
2.8 Análise estatística.....	41

3 RESULTADOS	45
3.1 Contagem e análise morfológica das NORs em função da evolução clínica e presença de metástases ou carcinomatose.....	45
3.2 Contagem e análise morfológica das NORs em função da idade.....	45
3.3 Contagem e análise morfológica das NORs em função da diferenciação histopatológica.....	46
3.4 Contagem e análise morfológica das NORs em função da disseminação tumoral.....	46
3.5 Contagem e análise morfológica das NORs em função da localização do tumor.....	47
4 DISCUSSÃO	58
5 CONCLUSÕES	71
6.RELAÇÃO GERAL DA CASUÍSTICA	73
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ABSTRACT	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - NORs do tipo M1
Pontos pequenos médios ou grandes,
agrupados ou não.....42

Figura 2 - NORs do tipo M2
Pontos grandes arredondados ou
disformes, com centro claro e
contornos variados.....43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Contagem de NORs em função de aspectos morfológicos, evolução clínica e presença de metástases ou carcinomatose.....48
- Tabela 2 - Análise morfológica de NORs associada à evolução clínica, presença de metástases ou carcinomatose em função da idade média por grupo.....49
- Tabela 3 - Contagem média de NORs em função da faixa etária.....50
- Tabela 4 - Análise morfológica de NORs em função da diferenciação histopatológica.....51
- Tabela 5 - Contagem média de NORs em função da diferenciação histopatológica.....52
- Tabela 6 - Análise morfológica de NORs em função da classificação de DUKES.....53
- Tabela 7 - Contagem média de NORs em função da classificação de DUKES.....54
- Tabela 8 - Análise morfológica de NORs em função da localização do tumor.....55

Tabela 9 - Contagem média de NORs em função da localização do tumor.....	56
---	----

RESUMO

As taxas de sobrevida do câncer de reto não vêm apresentando alterações nas últimas décadas e a busca de informações prognósticas, com o intuito de se melhorarem os resultados do tratamento, tem levado ao estudo do comportamento biológico do tumor em seus vários aspectos. A proliferação celular, está relacionada à agressividade tumoral, e pode ser estudada através das regiões organizadoras de nucléolo ("nucleolar organizer regions" - NORs). As NORs são alças de rDNA presentes em cinco cromossomos (13, 14, 15, 21 e 22), sendo responsáveis pela produção de ribossomas, e conseqüentemente de proteínas. Podem ser avaliadas em seus aspectos quantitativos e morfológicos, uma vez que variam de acordo com o ciclo celular e o estado funcional do nucléolo.

A análise morfológica e contagem das NORs foram realizadas em 46 doentes portadores de lesões malignas do reto, sendo comparadas com a evolução clínica e fatores prognósticos conhecidos (idade, invasão tissular tumoral, diferenciação histopatológica e localização do tumor).

Com relação aos aspectos morfológicos, as NORs foram divididas em dois grupos denominados M1 (pontos pequenos médios ou grandes, agrupados ou não) e M2 (estruturas grandes arredondadas ou disformes, com centro claro e contornos variados). A contagem foi realizada em fotografias de lâminas coradas pela prata, obtendo-se a média de pontos por cada caso. Não se observou diferença estatística dos aspectos estudados em relação à evolução clínica, invasão tissular tumoral e localização da lesão ($p > 0,05$) e da comparação dos aspectos morfológicos com a diferenciação histopatológica das neoplasias e idade dos doentes. Apesar da contagem de NORs ter sido significativamente maior nas lesões bem diferenciadas (H1) em relação aos tumores moderadamente ou pouco diferenciados (H2) ($p < 0,01$), e nos pacientes de idade menor ou igual a 40 anos em relação aos com mais de 40 anos ($p < 0,01$), esses dados não tiveram o respectivo significado clínico e não puderam ser utilizados como informações prognósticas ou diagnósticas.

Conclui-se ser a técnica de coloração pela prata de NORs um método acessível e de fácil realização. As contagens e análises morfológicas empregadas não permitiram estabelecer informações a respeito do prognóstico do adenocarcinoma de reto.

1 - INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

O comportamento biológico dos tumores pode estar diretamente relacionado à velocidade de seu crescimento. A intensidade de proliferação de células neoplásicas pode corresponder ao seu potencial de causar metástases ou de recidivar, conseqüentemente influenciando na taxa de sobrevivida. Nos últimos anos muito se tem estudado quanto à proliferação celular nas neoplasias, com o intuito de se avaliar o prognóstico do paciente. Assim, vários métodos existem, sendo entretanto, alguns de custo elevado ou de baixa reprodutibilidade.

O estudo das regiões organizadoras de nucléolo ("nucleolar organizer regions" - NORs), no câncer colorretal, apresenta-se atualmente como metodologia acessível e confiável. As NORs são alças de ácido desoxirribonucleico ribossômico (rDNA) existentes no nucléolo, encontradas em cinco cromossomos humanos acrocêntricos (13, 14, 15, 21 e 22) e são responsáveis pela produção de ribossomas. As proteínas associadas às NORs podem ser coradas pela prata e examinadas à microscopia óptica e eletrônica, onde aparecem como

pontos ou grupamentos de pontos de forma e tamanho variados, e assim, possibilitar uma análise quantitativa e morfológica das mesmas.

As NORs têm sido correlacionadas à proliferação celular, uma vez que são mais numerosas em células em processo de divisão mais rápido. Considerando ser essa a condição das células tumorais, através do estudo das NORs, poder-se-ia prever o comportamento tumoral e estabelecer a estratégia terapêutica mais adequada a cada caso.

Levando-se em conta a exeqüibilidade do método, seu baixo custo e a possibilidade de estudo em material previamente fixado em formol e incluído em parafina, decidiu-se pela realização de estudo prospectivo em uma série de pacientes portadores de carcinoma de reto, visando aos seguintes objetivos:

- estudar a importância da análise quantitativa e aspectos morfológicos das NORs no núcleo da célula neoplásica, como um dos parâmetros de comportamento biológico do carcinoma do reto, observando suas relações com fatores prognósticos conhecidos.

- Avaliar se as NORs apresentam-se como variável prognóstica independente no câncer de reto.

1 . 1 - Dados de literatura

1 . 1. 1 - Considerações gerais

O carcinoma colorretal é freqüente em países da Europa Ocidental, Estados Unidos da América, Austrália e Nova Zelândia, segundo WYNDER & REDDY (1980).

Segundo WEISBURGER (1991) é raro nos países africanos, e também na Índia, China e Japão. A casuística mundial apresenta grandes variações nos coeficientes de incidência, entre 3,5 casos por 100.000 habitantes na Índia, a 32,3 casos por 100.000 habitantes em Connecticut, Estados Unidos da América.

BORING et al. (1992) mostraram que nos Estados Unidos da América é o terceiro tumor mais freqüente em ambos os sexos, com incidência de 14%. Em 1991, foram diagnosticados naquele país cerca de 157.500 novos casos, 112.000 localizados no cólon e 45.500 no reto.

Dados do Registro Nacional de Patologia Tumoral(1986), em levantamento realizado no Brasil, no período compreendido entre 1981 a 1985, permitiram

contabilizar 5837 casos de carcinoma de reto diagnosticados por exame histopatológico, correspondendo a 2,3% de todos os casos de neoplasia no país.

Segundo SCHWARSMANN et al. (1991), dentre os tumores do trato gastrintestinal, o carcinoma de reto corresponde a 17% das lesões, sendo precedido pelos tumores do estômago (42,6%) e do esôfago (19,7%).

Os Registros de Base Populacional do Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde(1991) demonstram que o coeficiente de incidência dessa forma de câncer no sexo masculino é de 5,8 casos por 100.000 habitantes e de 7,3 casos por 100.000 habitantes no sexo feminino. A menor incidência ocorre em Belém (8,2 casos/100.000 habitantes) e a maior em Porto Alegre (24 casos/100.000 habitantes). Constitui-se na quarta localização de câncer mais freqüente em ambos os sexos nas cidades de Belém, Fortaleza, São Paulo e Porto Alegre, sendo superado apenas pelos tumores de estômago, próstata e pulmão. Na cidade de São Paulo, a incidência no sexo masculino em 1978 foi de 5,8 casos/100.000, e no sexo feminino 7,3 casos/100.000.

SCHWARSMANN et al. (1991), em levantamento realizado no Brasil, observaram que as taxas de

mortalidade foram, respectivamente, de 1,9/100.000 em homens e de 2,8/100.000 em mulheres

Acredita-se que os tumores colorretais sejam oriundos da interação de fatores ambientais e genéticos, sendo dada grande importância à dieta. Esta, quando pobre em fibras e com grande quantidade de gordura de origem animal é considerada como importante fator na carcinogênese colorretal (NIGRO et al., 1975). Alterações nas taxas de incidência e mortalidade em populações migrantes do Japão para os Estados Unidos da América, são atribuídas a alterações de hábitos alimentares (SCHOTTENFELD & FRAUMENI, 1991). Da mesma forma, migrantes oriundos de áreas de alto risco para neoplasia de cólon e reto, como a Escócia, apresentaram redução do mesmo quando de sua transferência para a Austrália (McMICHAEL et al., 1980).

Porém, HILL et al. (1983) atribuíram aos fatores alimentares papel secundário na gênese tumoral. Esses fatores causariam alterações no metabolismo biliar e na flora bacteriana do cólon, promovendo assim, de alguma forma, alterações na luz intestinal, o que desencadearia proliferação celular anômala.

Na patogênese do carcinoma colorretal é dada grande importância à seqüência adenoma-carcinoma. MORSON (1974)

demonstrou que a maioria dos carcinomas colorretais são oriundos de adenomas, e o risco de transformação maligna aumenta com o tamanho do pólipo, padrão de crescimento e atipia epitelial.

São conhecidos também fatores hereditários para o desenvolvimento das neoplasias colorretais, como a polipose múltipla familiar (GOLIGHER, 1984) e a síndrome do câncer colorretal hereditário (LYNCH & KRUSCH, 1967). Sendo assim, as alterações genéticas despertam interesse e seu estudo visa a correlacionar tais alterações ao desenvolvimento dos tumores. VOLGESTEIN et al. (1988) observaram que as alterações no cromossomo 18 ocorreram em 73% das neoplasias malignas e ocasionalmente nos adenomas menores e com baixo grau de displasia (11% a 13%), enquanto que anormalidades no cromossomo 17 foram observadas apenas em carcinomas (75%).

Os melhores índices de cura são obtidos com a cirurgia. O tratamento radical pode implicar a remoção de estruturas vizinhas e de metástases à distância, além da remoção do segmento afetado, do mesocólon correspondente e das áreas de drenagem linfática potencialmente acometidas.

Os resultados com o emprego de tratamentos adjuvantes encontrados na literatura são controversos.

BUYSE et al. (1988) revisaram os protocolos de tratamento de câncer colorretal publicados na literatura inglesa antes de 1986 e observaram que a utilização de 5-fluorouracil após a cirurgia promoveu um aumento de apenas 3,4% nas taxas de sobrevida em cinco anos.

LAURIE et al. (1989) associaram 5-fluorouracil e levamisole em estudo prospectivo em 401 doentes portadores de carcinoma do cólon nos estágios B2, B3 e C de DUKES e obtiveram com o tratamento quimioterápico aumento estatisticamente significante da sobrevida livre de doença em cinco anos para os doentes do estágio C, quando comparado ao tratamento cirúrgico isolado, de 48% e 37%, respectivamente.

Da mesma forma, MOERTEL et al. (1990), utilizando protocolo idêntico em 929 doentes com lesões classificadas como estágio C de DUKES, obtiveram taxas de sobrevida de 71% em três anos, significativamente maior que o tratamento cirúrgico isolado, que foi de 55%.

CUNHA et al. (1992), associando 5-fluorouracil, interferom alfa-2a-recombinante e ácido folínico em 19 doentes com adenocarcinoma colorretal avançado, obtiveram remissão completa ou parcial em sete doentes (36%) e sobrevida livre de progressão de doença projetada a 21 meses de 27%.

Com o uso de radioterapia pré-operatória em carcinoma retal, ROSWIT et al.(1975) obtiveram melhores taxas de sobrevida em cinco anos (40,8%), quando comparadas ao grupo de pacientes submetidos apenas à cirurgia (28,4%).

Ao contrário, HIGGINS et al (1986), utilizando a dose pré-operatória de 3150 cGy, obtiveram os mesmos níveis de sobrevida em cinco anos (50%), quando comparados ao grupo de doentes submetidos ao tratamento cirúrgico isolado.

1 . 1 . 2 - Fatores prognósticos

As classificações de DUKES (1932), de ASTLER & COLER (1954), JASS et al. (1986) e o estudo da diferenciação celular proposto por BRODERS (1925), são parâmetros utilizados até os dias atuais como indicadores prognósticos.

DUKES (1932) propôs a classificação dos tumores colorretais baseada no grau de invasão do carcinoma através da parede intestinal e na presença ou não de linfonodos acometidos pela neoplasia. Dessa forma, o estágio A corresponde aos tumores confinados à parede, no estágio B a lesão neoplásica estende-se além da parede, acometendo a gordura perirretal, e no estágio C ocorre o acometimento de linfonodos regionais por células neoplásicas. DUKES, em seu trabalho original, demonstrou taxas de sobrevivência de 80%, 73%, e 7% para os estágios A, B, e C, respectivamente, em cinco anos.

GABRIEL et al.(1935) modificaram a classificação, subdividindo o estágio C em C1 e C2. Os tumores com metástases para linfonodos regionais seriam classificados como C1 e aqueles com acometimento no nível da ligadura dos vasos mesentéricos como C2.

TURNBULL et al.(1967), aumentando a abrangência da classificação de DUKES, denominaram como estágio D os casos de carcinoma retal com metástases em órgãos à distância.

ASTLER & COLLER (1954) propuseram subdivisões na classificação de DUKES. Assim, o estágio A corresponde aos tumores confinados à mucosa, o estágio B1 à invasão tumoral até a muscularis própria; o estágio B2 com a

disseminação tumoral além da muscularis própria até os tecidos perirretais. O acometimento de linfonodos nas lesões confinadas à parede retal é classificado como C1 e em lesões tumorais, atingindo toda a espessura intestinal e estruturas vizinhas, como C2. Originalmente, a sobrevida de cinco anos descrita para os estágios A, B1, B2, C1 e C2 foi, respectivamente, de: 100%, 67%, 54%, 43% e 22%.

JASS et al. (1986) desenvolveram um sistema de classificação em que valores numéricos são atribuídos à quantidade de linfonodos acometidos (nenhum = zero; 1 a 4 = 4, e 5 ou mais linfonodos = 8) , à infiltração linfocítica na margem distal da lesão (acentuada = zero; moderada = 3; pouca = 6) e à extensão da neoplasia através da parede intestinal (nenhuma = zero; leve a moderada = 3; extensa = 6). Com a soma dos valores obtidos, de zero a vinte, classificaram as lesões em estágios I (zero), II (1 a 6), III (7 a 11), IV (12 a 16) e V (17 a 20), com níveis de sobrevida de cinco anos, respectivamente, de 100%, 88%, 72%, 32%, e 6%.

BRODERS (1925) classificou as neoplasias baseando-se na quantidade de células diferenciadas. Dessa forma, o tipo I corresponderia a neoplasias com 75% ou mais de células diferenciadas; o tipo II com 75% a 50% de células

diferenciadas; o tipo III com 25% a 50% e o tipo IV com até 25% de células diferenciadas.

Entretanto, até 30% dos pacientes portadores de lesões classificadas como estágio C de DUKES apresentam sobrevida longa. Por outro lado, cerca de um terço dos pacientes com lesões classificadas como estágio B apresentam recidivas. Dessas observações pode-se depreender que outros fatores poderiam estar associados na ocorrência de comportamento tão diverso. Por exemplo, a presença de metástases ocultas, não diagnosticadas no ato cirúrgico, poderia ser um fator importante na má evolução tardia desses pacientes.

No sentido de se obter um conhecimento abrangente das características biológicas do tumor e uma avaliação prognóstica mais segura, vários fatores têm sido estudados nas últimas décadas, para completar o estadiamento do paciente: ultra-sonografia, dosagem sérica dos antígenos carcinoembrionário (CEA) e carboidrato 19.9 (CA 19.9), análise do conteúdo de DNA celular e determinação da proliferação celular.

A proliferação celular pode ser avaliada através da contagem de mitoses nas células tumorais; da detecção de antígenos presentes apenas em células que estão ciclando (Ki-67 e PCNA); pela quantificação de células na fase

"S" do ciclo celular através da incorporação de timidina radioativa ou de bromodeoxiuridina ou, ainda, pela avaliação das regiões organizadoras de nucléolos (NORs). Alguns desses métodos, por serem muito caros, não são reprodutíveis na maioria dos laboratórios de anatomia patológica. O ideal seria dispor de todos para a elaboração de um "painel de proliferação" de cada paciente. Esse seria associado às classificações de DUKES (1932) ou de ASTLER & COLLER (1954) e a de JASS et al. (1986), resultando em um índice prognóstico específico para o paciente em estudo.

FINLAY & McARDLE(1986) demonstraram a ocorrência de metástases hepáticas, não detectadas pelo cirurgião em 24% dos pacientes portadores de carcinoma colorretal, utilizando-se de aparelhos de ultra-som e de tomografia computadorizada, no período de pós-operatório imediato. Nessa casuística, apenas um dos pacientes com metástases hepáticas ocultas apresentou sobrevida de cinco anos . Dentre os pacientes em que não foram diagnosticadas metástases hepáticas, 9,2% evoluíram para óbito com doença disseminada. Os pacientes portadores de neoplasia de reto, estágio C da classificação de DUKES, sem a presença de metástases hepáticas, apresentaram taxas de sobrevida de cinco anos em até 80%.

O antígeno carcinoembrionário (CEA) é uma glicoproteína encontrada no intestino do embrião e pode ser produzida por células neoplásicas, tendo sido descoberta GOLD & FREEDMAN(1965).

HERRERA (1976) evidenciou recidiva tumoral em 82% dos pacientes nos primeiros 18 meses de pós-operatório que apresentaram níveis de antígeno elevados no pré-operatório, e em 35% quando os níveis pré-operatórios encontravam-se dentre os valores normais.

Da mesma forma, WANEBO et al. (1978) demonstraram maiores taxas de recidiva em pacientes portadores de neoplasia ressecável com estágios B e C de Dukes e níveis séricos mais altos de antígeno, acima de 5 ng./ml.

O National Institutes of Health (1981) preconizou o uso rotineiro do CEA como fator prognóstico no período pré-operatório.

NORTHOVER (1985) observou que nas lesões pouco diferenciadas, o CEA é detectado em 30% dos pacientes, enquanto que em carcinomas bem diferenciados, encontra-se com níveis séricos elevados em até 95% das vezes.

SENER et al. (1989) demonstraram a correlação existente entre os níveis séricos altos de antígeno

carcinoembrionário no período pré-operatório com estágios mais avançados do câncer colorretal. As taxas de sobrevida para os doentes com níveis séricos dentro dos valores normais, moderadamente elevados e muito elevados foram, respectivamente, de 61%, 50% e 32%.

BEHBEHANI et al.(1990), em estudo prospectivo com 157 doentes portadores de câncer colorretal, encontraram níveis elevados de CEA em pacientes com recidiva tumoral.

Segundo CHU et al.(1991), os níveis pré-operatórios do CEA são preditivos de recidiva tumoral em neoplasias colorretais, independente do estágio da classificação TNM.

WOOLFSON (1991) apontou o provável uso do CEA acoplado a anticorpos tumorais na identificação do local das recidivas, melhorando assim o seu tratamento e o prognóstico dos pacientes.

Ao contrário, FLETCHER & HILL (1986) o consideraram apenas como rastreador de recidivas, mas sem correlação entre seu níveis e o prognóstico das neoplasias colorretais, fato também verificado por LEWI et al. (1984), LUNDE & HAVIG (1982) e MOERTEL et al. (1986).

Outro marcador tumoral, o antígeno carbohidrato 19.9 (CA 19.9), também tem sido utilizado como fator de acompanhamento e indicador de prognóstico.

SZYMENDERA et al. (1985) apresentaram resultados semelhantes para fins prognósticos entre os valores séricos de CEA e CA 19.9.

FILELLA et al. (1992) mostraram que o risco relativo para a recidiva do câncer colorretal é 2,95 vezes maior em pacientes com níveis de CA 19.9 elevados no pré-operatório, quando comparado a pacientes que apresentavam valores dentro da normalidade.

A citometria de fluxo e estática permite a análise do conteúdo de DNA e de seu padrão de distribuição na célula tumoral. Apresenta como desvantagens o elevado custo do equipamento necessário e a possível inclusão de células não neoplásicas na análise. Porém, o resultado obtido é objetivo e representa a análise de um grande número de células, o que não ocorre com os métodos de investigação da proliferação celular.

FRIEDLANDER et al. (1984), em revisão da literatura, demonstraram a importância da ploidia da célula tumoral no comportamento biológico de vários tipos de neoplasias. Segundo esses autores, os tumores

diplóides apresentam melhor prognóstico, quando comparados aos aneuplóides ou multiplóides nas neoplasias hematológicas, do trato genital feminino, mama, pulmão, cólon e tumores ósseos.

Alguns estudos correlacionaram pior prognóstico a tumores aneuplóides, quando comparados a tumores diplóides do cólon e reto.

WOLLEY et al. (1982) atribuíram importância prognóstica ao conteúdo de DNA no núcleo da célula tumoral colorretal demonstrado à citometria de fluxo. Segundo os autores, no período de seguimento de três a cinco anos, 12 dos 13 pacientes com tumores não diplóides evoluíram para o óbito entre quatro e 34 meses. No grupo de pacientes portadores de tumores diplóides, apenas seis pacientes em um grupo de 20 morreram.

ARMITAGE et al. (1985), em estudo retrospectivo com 134 casos de neoplasia colorretal, demonstraram que a sobrevida de cinco anos foi de 19% nos pacientes com tumor aneuplóide e de 43% em tumores diplóides.

De forma semelhante, SCOTT et al. (1987) observaram níveis de sobrevida de 64% em cinco anos para tumores colorretais diplóides e de 50% para os carcinomas não-diplóides, em um grupo de 264 pacientes.

JONES et al. (1989) estudaram o conteúdo do DNA em 123 pacientes portadores de carcinoma colorretal evidenciando que o prognóstico é inversamente proporcional à quantidade de células aneuplóides. Pacientes com populações celulares aneuplóides menores apresentaram taxas de sobrevida de três anos de 48%, 30% com populações aneuplóides intermediárias e zero por cento com quantidades de células aneuplóides maiores.

VERHEST et al. (1990) propuseram, com material colhido durante a colonoscopia no período pré-operatório, o estudo do potencial de agressividade do carcinoma colorretal através da análise da morfologia nuclear, conteúdo de DNA e padrão de cromatina. Seus resultados mostraram em 58 amostras colhidas através de biópsias ou espécimes cirúrgicos de mucosa normal, adenomas e adenocarcinomas, que a maior proliferação celular corresponde a um aumento na proporção de células aneuplóides.

HEIMANN et al. (1990), estudando 39 pacientes portadores de adenocarcinoma de reto com tumores menores do que três centímetros, evidenciaram pior prognóstico nos casos em que a neoplasia apresentava padrão aneuplóide. As taxas de sobrevida de cinco anos nos doentes com os tumores diplóides foi de 84% e de 49% para os doentes com lesões aneuplóides.

Entretanto, outros autores apresentaram resultados contrários na correlação entre a evolução clínica da doença e a análise do conteúdo nuclear de DNA.

MELAMED (1986), em seu estudo, observou taxas de sobrevida e distribuição na classificação de DUKES semelhantes nos grupos de tumores diplóides e aneuplóides.

FINAM et al. (1986) também não verificaram associação entre o conteúdo de DNA e o estadiamento do tumor avançado colorretal.

ROGNUN et al. (1987) não evidenciaram diferença estatisticamente significativa na sobrevida dos pacientes com neoplasia do cólon, quando compararam os tumores diplóides e aneuplóides.

JASS et al. (1989) demonstraram que o conteúdo de DNA no carcinoma colorretal estava relacionado aos estágios pela classificação de DUKES, não conferindo caráter prognóstico independente. Evidenciaram também que dois terços dos tumores apresentam padrão aneuplóide.

1.1.2.1 - Proliferação celular

A fase de mitose do ciclo celular é a única que pode ser identificada por exame simples morfológico e fornece informações prognósticas em vários tipos de tumores como linfomas, melanoma e sarcomas, sendo utilizado em câncer de mama para o estadiamento tumoral. Porém, a utilização da contagem de mitoses como fator de proliferação celular apresenta alguns inconvenientes. Sua identificação pode ser muito difícil e o processo de mitose em material fixado de forma inadequada pode se completar, sendo, portanto, subestimado (QUINN & WRIGHT, 1990).

GERDES et al. (1983) desenvolveram o anticorpo monoclonal Ki-67 que detecta antígenos presentes apenas em células que se encontram em proliferação, podendo ser detectado em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G₀. A maior limitação a seu uso é que os antígenos podem se deteriorar em material fixado, sendo necessária a aplicação da técnica em material congelado e cortado em criostato (HALL & LEVINSON, 1990).

MULDER et al. (1992), em estudo com carcinoma de bexiga, observaram correlação estatisticamente

significante entre o número de células em que foi positiva a reação com o anticorpo Ki-67 e o estagiamento tumoral.

Ao contrário, SHEPHERD et al. (1988), em estudo com 108 pacientes portadores de carcinoma colorretal, não observaram qualquer correlação entre Ki-67 e outros fatores prognósticos, inclusive a classificação de Dukes.

As ciclinas são proteínas celulares responsáveis direta ou indiretamente pela proliferação celular, sendo denominadas PCNA ("proliferating cell nuclear antigens"). Anticorpos podem ser usados para a detecção dessas proteínas sendo úteis para a semi-quantificação histológica da proliferação celular (HALL & LEVISON, 1990).

A célula somática normal apresenta um genoma diplóide e durante a fase "S" do ciclo celular ocorre a duplicação da informação genética, tornando-se assim temporariamente tetraplóide. A incorporação de timidina radioativa pelo DNA durante a fase "S" pode ser medida, mas ocorre apenas em células viáveis, dificultando desse modo seu uso rotineiro na prática clínica. (QUINN & WRIGHT, 1990).

A síntese de DNA pelo tecido normal e pelo neoplásico também pode ser medida através da incorporação da bromodeoxiuridina, sendo detectada através de anticorpos específicos. Dessa forma, o estudo da cinética celular pode ser obtido sem o uso de substâncias radioativas (QUINN & WRIGHT, 1990).

O estudo das NORs em material histopatológico e sua relação com o prognóstico foi difundido por CROCKER & NAR (1987) em linfomas não Hodgkin.

PLOTON et al. (1986) modificaram a técnica de coloração pela prata, diminuindo sua precipitação quando a realizaram à temperatura de 20° C, com conseqüente melhor visualização dos pontos.

CROCKER et al. (1989) propuseram a padronização da técnica de contagem dos NORs, em que todos os pontos corados, intra ou extra-nucleolares, deveriam ser considerados.

Sendo essas estruturas passíveis de serem contadas, foi possível a demonstração, em alguns órgãos, de variação estatisticamente significativa entre as células reacionais e neoplásicas de um mesmo tecido .

RÜSCHOFF et al.(1990a), analisando 52 lesões malignas e 30 benignas da mama, não evidenciaram alterações estatisticamente significantes com relação à contagem de NORs. Houve, porém, significância estatística com relação à área medida das NORs na diferenciação entre lesões benignas e malignas, estas apresentando área total de NORs menor.

YANG et al. (1990), observaram diferentes contagens de NORs em adenomas tubulares, adenomas vilosos e adenocarcinomas do cólon. Segundo os autores, as células de tumores malignos apresentaram maior quantidade de NORs e de menor tamanho, quando comparadas às células dos adenomas.

DERENZINI & TRERÉ (1991) revisaram a importância das NORs para o diagnóstico diferencial entre células hiperplásicas e neoplásicas e a evidência existente entre a quantidade de NORs e o pior prognóstico de tumores malignos.

LEEK et al.(1991), através de modelos experimentais, compararam a proliferação de células de vilosidades e criptas de intestino delgado, hepáticas, prostáticas e de glândula salivar com bromodeoxiuridina e NOR. O aumento do tamanho observado nas NORs foi

significativamente maior nos tecidos em proliferação, quando comparado a tecidos normais.

MUSCARA et al. (1991) compararam a contagem de NORs em células de adenocarcinoma do cólon, adenomas tubulares com baixo grau de displasia e em adenomas vilosos com alto grau de displasia e obtiveram valores mais altos nas células de adenocarcinoma. Com relação aos adenomas vilosos com alto grau de displasia estes apresentaram valores maiores do que a contagem de NORs nos adenomas tubulares. Considerando o potencial maligno maior dos tumores vilosos em relação aos tubulares, os autores concluíram ser a contagem de NORs um fator indicador de malignidade.

TRERÉ et al. (1991), observaram a correlação existente entre a soma da área de NORs e índices de proliferação celular obtidos pela incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) e do uso do antígeno Ki-67 de células neoplásicas de tumores de mama, tireóide, fígado pulmão e cólon.

WEEKS et al (1992) em estudo comparando a razão entre a área de NORs com a do núcleo em adenomas tubulares e vilosos, observaram que a mesma é maior nos adenomas vilosos.

CHIDA et al. (1992), através da medida da área de NORs em adenocarcinoma e em adenomas tubulares do cólon, obtiveram valores significativamente mais altos nos tumores malignos.

BUFO et al. (1992), observaram que a contagem de NORs mais alta em adenomas com alto grau de displasia é de valor diagnóstico quando comparada à menor contagem em pólipos hiperplásicos.

Porém, TREVISAN* et al. (1993) não obtiveram diferenças estatisticamente significantes entre a contagem média de NORs por célula de mucosa colorretal normal, mucosa com intensa reação inflamatória crônica, mucosa com displasia de baixo grau e adenocarcinoma colorretal.

SHIRO et al. (1993) correlacionaram aspectos morfológicos das NORs em carcinoma hepatocelular com seu

*TREVISAN, M.A.S. (Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas). Aplicação da técnica Ag-NOR na mucosa colorretal: interpretações e limitações [Apresentado ao XIX Congresso Brasileiro de Patologia, Santos, 1993]

estagiamento tumoral. As NORs foram divididas em dois tipos: tipo 1 - pontos grandes com margens bem definidas e tipo 2 - pontos menores, agrupados e com bordos irregulares. Os autores evidenciaram maior número de NORs do tipo 2 em tumores de pior prognóstico.

TREVISAN* et al.(1993), em estudo das variações morfológicas de NORs em 11 esfregaços de mucosa colorretal normal e em 11 de adenocarcinomas, observaram que as NORs apresentavam-se com padrão morfológico homogêneo e tamanhos menores no tecido normal, enquanto que no carcinoma havia grande variação morfológica intercelular, sendo que os pontos eram maiores e de aspectos bizarros.

Outros autores demonstraram uma relação direta entre as contagens elevadas de NORs e prognóstico pior de alguns tumores.

*TREVISAN, M.A.S. (Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas).Aplicação da técnica Ag-NOR em esfregaços de mucosa colorretal.Correlação com os respectivos histopatológicos.[Apresentado ao XIX Congresso Brasileiro de Patologia, Santos, 1993]

A comparação do conteúdo de DNA e o número de NORs em células de câncer colorretal de 51 pacientes feita por MORAN et al. (1989) com fatores prognósticos evidenciou que a contagem de NORs é a variável independente mais importante em relação ao prognóstico.

O estudo de 70 pacientes com adenocarcinoma do cólon sigmóide e reto por RÜSCHOFF et al. (1990b), evidenciaram que o número de NORs contados na célula tumoral tem importância como fator prognóstico independente. A sobrevida em cinco anos foi de 63,8% com contagem menor ou igual a sete e de 23,5% quando maior do que sete.

ÖFNER et al. (1990), usando a técnica em 49 espécimes de carcinoma de cólon previamente fixados, evidenciaram um número médio de NORs mais baixo (3,04) e estatisticamente significante nos pacientes que apresentaram boa evolução em um período de acompanhamento de pelo menos 48 meses, quando comparados aos pacientes que evoluíram com o aparecimento de metástases (5,40) ou que foram submetidos a cirurgia paliativa (4,48).

JOYCE et al. (1992) realizaram o método em 164 casos de adenocarcinoma de cólon e verificaram que os valores de contagem de NORs eram mais altos nos doentes que evoluíram para o óbito, concluindo ser a contagem de

NORs a variável mais importante para o prognóstico quando comparada à classificação de DUKES, diferenciação histopatológica do tumor e invasão vascular pela neoplasia.

Por outro lado, ARENDS & KATE (1984) demonstraram que a simples contagem não se modificava significativamente nos tecidos neoplásicos e na mucosa colônica normal, observando apenas diferenças morfológicas.

KRAM et al. (1989) não observaram diferenças significativas entre a contagem de NORs, o conteúdo de DNA obtido através da citometria de fluxo e diferenciação histopatológica de 44 casos de adenocarcinoma de cólon

Da mesma forma, a contagem de NORs em 100 casos de adenocarcinoma de reto realizada por GRIFFITHS et al. (1989) em material previamente fixado em formol não permitiu que se obtivessem informações prognósticas e não apresentou correlação com a ploidia das células tumorais.

RAYTER et al. (1992), em estudo com 95 doentes portadores de adenocarcinoma de cólon, verificaram que a contagem é semelhante nos vários estágios da classificação de DUKES e sem diferença estatisticamente significativa nos tumores de doentes vivos e nos tumores

dos que evoluíram para o óbito. As contagens de NORs obtidas pelos autores em células neoplásicas foi ligeiramente maior do que a observada na mucosa normal, porém sem significância estatística.

As alterações existentes nas NORs de células malignas poderiam ser explicadas através do maior conteúdo que as células aneuplóides têm de cromossomos, que, por sua vez, conteriam uma maior quantidade de NORs (SCHWARZACHER et al.1988). As alterações em genes presentes nas células neoplásicas poderiam causar um aumento de proteínas argirofílicas das NORs (ROBERTS et al 1987) e as variações observadas no tamanho e número das NORs seriam resultado de diferentes estados de ativação do DNA ribossômico secundário ao aumento da proliferação celular (ZATSEPINA et al. 1988).

2 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

2 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

2.1 - Casuística

No período compreendido entre 1969 a 1990, dentre os doentes que realizaram biópsias para o diagnóstico de carcinoma colorretal no Ambulatório de Colo-Proctologia da Disciplina de Moléstias do Aparelho Digestivo da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas foram inicialmente selecionados 135 doentes portadores de tumores localizados apenas no reto.

Para se homogeneizar melhor a amostra, foram incluídos apenas os doentes com seguimento mínimo de dois anos ou aqueles que evoluíram a óbito causado pela neoplasia, independentemente do tempo de pós-operatório, totalizando, respectivamente, 38 e 8 doentes. Dessa forma, fazem parte do presente trabalho 46 doentes, sendo que todos foram submetidos a tratamento cirúrgico. A contagem e análise das NORs foram todas realizadas pelo autor em conjunto com a Professora Doutora Míriam Aparecida da Silva Trevisan do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

2.1.1 - Idade

A idade dos doentes variou entre 36 e 81 anos, com média de 59,78 anos.

2.1.2 - Sexo

Dos 46 doentes, 26 (56,5%) eram do sexo feminino e 20 (43,5%) do masculino.

2.1.3 - Grupo étnico

Quanto ao grupo étnico, 43 (93,4%) eram da raça branca, 2 (4,4%) da negra e um (2,2%) da amarela.

2.1.4 - Tempo de seguimento pós-operatório

O tempo de seguimento pós-operatório foi considerado neste estudo, tendo sido inferior a dois anos em três doentes (6,6%) que evoluíram para o óbito devido à neoplasia. Em 33 doentes (71,7%) o tempo de seguimento ficou entre dois e quatro anos e três doentes (6,6%) foram seguidos entre mais do que quatro e cinco anos, e sete (15,1%) em um período maior do que cinco anos.

2.1.5 - Caracterização da amostra

2.1.5.1 - Diferenciação histopatológica

As neoplasias foram classificadas em dois grupos quanto à diferenciação tumoral: adenocarcinoma bem diferenciado (H1) e adenocarcinoma moderadamente ou pouco diferenciado (H2). Nessa casuística, em dez doentes (21,7%) os tumores foram classificados como H1 e em 36 (78,3%) como H2.

2.1.5.2 - Disseminação tumoral

Os doentes foram considerados quanto à disseminação tumoral baseando-se na classificação de DUKES (1932). Dezenove doentes (41,3%) foram considerados como pertencentes ao estágio A, 14 (30,4%) ao estágio B e 13 (28,3%) ao estágio C.

2.1.5.3 - Cirurgias realizadas

Os doentes foram submetidos aos seguintes procedimentos cirúrgicos: retossigmoidectomia anterior em 16 pacientes (34,8%), retossigmoidectomia

abdominoperineal com reconstrução de trânsito intestinal tipos colo-anal ou colo-retal baixa em dez (21,7%) e amputação abdominoperineal do reto em 20 (43,5%).

2.1.5.4 - Localização das neoplasias

Para fins de localização tumoral, o reto foi dividido em três partes, a saber: inferior até 5 cm da margem anal, médio de 6 até 10 cm da margem anal e superior de 11 a 18 cm. As lesões encontravam-se no reto inferior em 14 (30,4%) doentes, no reto médio em 14 (30,4%) e no reto superior em 18 (39,2%) doentes.

2.1.5.5 - Evolução pós-operatória com e sem doença

Vinte e cinco doentes (54,3%) não apresentaram reaparecimento da neoplasia, que ocorreu em 14 (30,4%), no período de acompanhamento. Destes, cinco evoluíram para o óbito em decorrência da doença neoplásica.

2.1.5.6 - Presença de metástases à distância ou carcinomatose

Foram consideradas metástases à distância todas as que afetavam órgãos, excluindo-se os linfonodos.

Sete doentes (15,2%) apresentavam metástases ou carcinomatose peritoneal, que foram detectadas ou na avaliação pré-operatória ou durante o ato cirúrgico. Destes, três evoluíram para o óbito em decorrência da evolução da doença.

2.1.6 - Critérios de inclusão

Foram incluídos neste estudo doentes portadores de adenocarcinoma de reto, com tempo mínimo de seguimento de dois anos de pós-operatório. Os doentes que evoluíram para o óbito devido à neoplasia foram incluídos independentemente do tempo de seguimento, uma vez que o óbito precoce está relacionado à maior agressividade tumoral. Todos foram submetidos à cirurgia, com ou sem radioterapia prévia. Não foram incluídos os doentes submetidos apenas a procedimentos de derivação, sem ressecção tumoral.

2.2 - Métodos

2.2.1 - Diagnóstico das neoplasias

O diagnóstico dos tumores retais foi realizado através de colheita de biópsias e estudo histopatológico em nível ambulatorial. A confirmação do diagnóstico histopatológico e o estagiamento quanto à diferenciação e disseminação tumoral foram feitos na peça cirúrgica. A coloração utilizada no preparo das lâminas foi a hematoxilina-eosina.

O estudo das regiões organizadoras de nucléolo ("nucleolar organizer regions"- NORs), foi realizado a partir da coloração pela prata de espécime cirúrgico ou de biópsia de lesões neoplásicas de reto, com diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma, previamente fixados em formol e incluídos em parafina. O estudo quantitativo e morfológico das NORs foi realizado tanto no material de biópsia como na peça cirúrgica e desenvolvido no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

2.2.2 - Técnica Ag-NOR

É aplicada em cortes de material fixado em formol e incluído em parafina. A solução corante é preparada no momento do uso e consta de um volume de gelatina a 2% em ácido fórmico a 1% e dois volumes de nitrato de prata a 50%. A solução é colocada diretamente sobre o corte, que é recoberto por lamínula. A reação se processa no escuro, à temperatura ambiente durante trinta minutos. A seguir, o corte é generosamente lavado com água destilada e submetido ao procedimento habitual para montagem com resina sintética e lamínula.

2.2.3 - Contagem dos pontos corados pela prata

As lâminas coradas foram fotografadas em objetiva com aumento de 40 vezes, e cada estrutura individualizável corada pela prata, independentemente de seu tamanho, foi considerada como um ponto. A contagem dos pontos levou ao cálculo da média de pontos por núcleo em cada caso.

2.2.4 - Aspectos morfológicos das NORs

A análise morfológica das NORs permitiu a separação em dois tipos de estruturas coradas pela prata, denominados M1 e M2. No tipo M1 (Fig.1), os pontos são pequenos, médios ou grandes, agrupados ou não e no tipo M2 (Fig.2), as estruturas são grandes, arredondadas ou disformes, com centro claro e contornos variados. Cada caso foi rotulado como M1 ou M2 de acordo com o tipo predominante, porque não raramente os dois tipos estavam presentes em um mesmo núcleo.

2.2.5 - Definição dos grupos de estudo

Os doentes foram divididos, conforme o estagiamento pré, intra e acompanhamento pós-operatório, em três grupos denominados I, II e III.

Grupo I - Constituído por 25 doentes que foram submetidos à cirurgia com intuito curativo, livres de metástases à distância e sem recidiva durante o período de seguimento.

Grupo II - Constituído por 14 doentes que foram submetidos à cirurgia com intuito curativo livres de

metástases na avaliação pré e intra-operatória, mas que a apresentaram no período de seguimento.

Grupo III - Constituído por sete doentes que apresentavam carcinomatose ou metástases à distância detectadas no pré ou intra-operatório, mas que se submeteram a ressecções paliativas.

2.2.6 - Análise dos resultados

As contagens e aspectos morfológicos das NORs foram comparadas com a evolução clínica (com e sem doença), presença de metástases à distância ou carcinomatose, idade, diferenciação histopatológica, disseminação tumoral, segundo a classificação de DUKES e localização do tumor.

2.2.7 - Metodologia

2.2.7.1 - Contagem e análise morfológica das NORs em função da evolução clínica e presença de metástases ou carcinomatose

As contagens das NORs foram comparadas entre os pacientes pertencentes aos grupos estudados (I, II e III) associados aos aspectos morfológicos (tipos M1 e M2), para eventuais demonstrações de variações significativas entre eles, no sentido de se obterem informações válidas quanto ao prognóstico tumoral.

2.2.7.2 - Contagem e análise morfológica das NORs em função de fatores prognósticos.

Com relação aos fatores prognósticos, idade, diferenciação histopatológica, disseminação tumoral e localização do tumor, a análise estatística foi realizada com a contagem e morfologia das NORs quanto a seus dois tipos, M1 e M2.

2.2.7.2.1 - Contagem e análise morfológica das NORs em função da idade

A contagem média de NORs por célula foi comparada nos pacientes com idade menor ou igual a 40 anos com aqueles de idade superior a esta. A análise morfológica foi analisada considerando-se a média de idade em cada grupo estudado (I, II, III).

2.2.7.2.2 - Contagem e análise morfológica das NORs em função da diferenciação histopatológica

De acordo com a diferenciação celular em cada grupo (I, II e III) foi realizada a análise estatística da contagem e análise morfológica das NORs.

2.2.7.2.3 - Contagem e análise morfológica das NORs em função da disseminação tumoral

A comparação entre a contagem e análise morfológica das NORs com o grau de disseminação tumoral, segundo os critérios de invasão tissular de DUKES, foi realizada em cada um dos grupos estudados (I, II e III).

2.2.7.2.4 - Contagem e análise morfológica das NORs em função da localização do tumor

A contagem e análise morfológica das NORs foi realizada considerando-se a localização do tumor.

2.2.8 - Análise estatística

No presente trabalho, foram utilizados o teste do qui-quadrado para a comparação de proporções, o teste t de Student e análise de variância segundo o modelo fatorial no estudo comparativo das médias (BEIGUELMAN, 1991).

Os dados coletados foram tabulados em programa Microsoft Excel versão 4.0 (1992), em computador tipo PC de 16 bits.

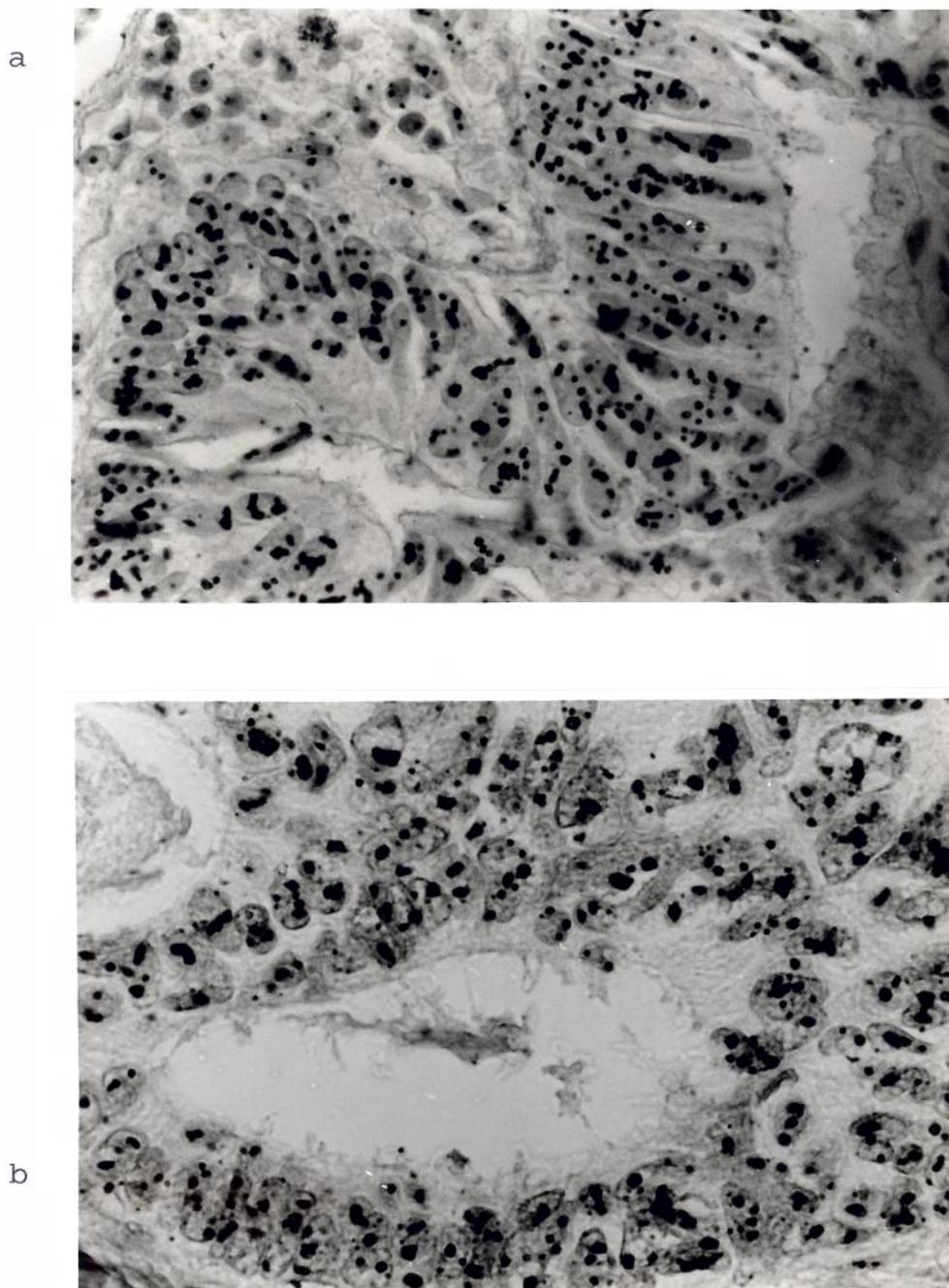


Figura 1 - NORs do tipo M1

Pontos pequenos, médios ou grandes,
agrupados ou não

a) média de NORs = 3,08

b) média de NORs = 3,24

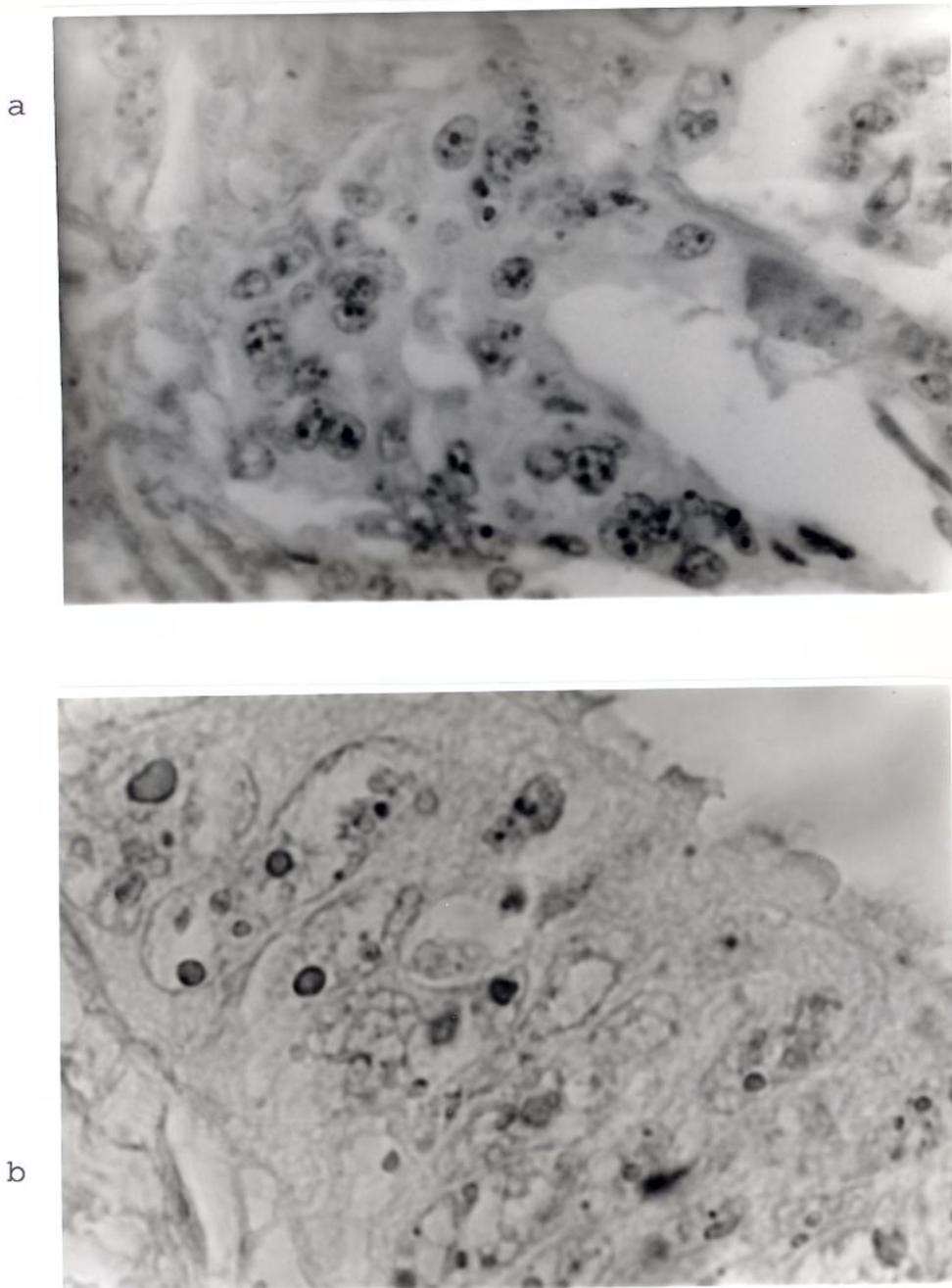


Figura 2 - NORs do tipo M2

Pontos grandes, arredondados ou disformes, com centro claro e contornos variados

a) média de NORs = 2,78

b) média de NORs = 2,57

3 - RESULTADOS

3 - RESULTADOS

3.1 - Contagem e análise morfológica das NORs em função da evolução clínica e presença de metástases ou carcinomatose

A contagem de NORs nos três grupos (I, II e III), comparados aos tipos morfológicos M1 e M2, não evidenciou diferenças estatisticamente significantes entre os mesmos ($p > 0,05$) e os resultados observados encontram-se na tabela 1.

3.2 - Contagem e análise morfológica das NORs em função da idade

O tipo morfológico M1 ocorreu em um paciente com menos de 40 anos e em outros 24 com idades mais avançadas. Com relação ao tipo M2, este ocorreu em dois tumores de pacientes com idades menores de 40 anos e em 19 com idade superior a essa. O estudo estatístico entre os tipos morfológicos e a média de idade em cada grupo encontra-se na tabela 2. A comparação entre a contagem média de NORs por célula nos doentes com 40 anos ou menos, que foi de 2,36, e naqueles com idades superiores

a essa, média de 3,11, evidenciou variação estatisticamente significativa ($p < 0,01$), e os resultados encontram-se na tabela 3.

3.3 - Contagem e análise morfológica das NORs em função da diferenciação histopatológica

O tipo histopatológico H1 (neoplasias bem diferenciadas) esteve presente em dez lesões neoplásicas, sendo que em oito o tipo morfológico observado foi o M1, e em dois foi o M2. Com relação às neoplasias classificadas como H2 (tumores moderadamente ou pouco diferenciados) o tipo M1 ocorreu em 19 lesões e o M2 em 17 ($p > 0,05$). Os resultados encontram-se na tabela 4. Com relação às contagens de NORs, a média de pontos corados por célula no tipo H1 foi de 3,71 e no H2 foi de 2,89 ($P < 0,01$) e os resultados encontram-se na tabela 5. O valor de intersecção para as contagens dos tipos H1 e H2 foi de 3,96 (tabela 5).

3.4 - Contagem e análise morfológica das NORs em função da disseminação tumoral

Dentre as lesões pertencentes ao estágio A da classificação de Dukes, em 13 o aspecto morfológico

predominante foi o tipo M1 e do tipo M2 em seis. Nos tumores do estágio B de Dukes, seis foram classificados como tipo M1 e oito como sendo do tipo M2, e as neoplasias do estágio C totalizaram em relação aos tipos morfológicos M1 e M2 seis e sete, respectivamente ($p > 0,05$; tabela 6). Os valores médios de contagens de NORs por célula para os tumores dos estágios A, B e C foram, respectivamente, de 3,12; 2,89 e 3,15, sem significância estatística entre os mesmos ($p > 0,05$; tabela 7).

3.5 - Contagem e análise morfológica das NORs em função da localização do tumor

Os resultados verificados após a comparação da localização tumoral com aspectos morfológicos não permitiu que se obtivessem resultados com significância estatística (tabela 8). As contagens médias de NORs por célula foram de 2,99 para as lesões localizadas no reto superior, de 2,95 para as localizadas no reto médio e no inferior de 3,26, não ocorrendo diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$; tabela 9).

TABELA 1
CONTAGEM DE NORs EM FUNÇÃO DE
ASPECTOS MORFOLÓGICOS, EVOLUÇÃO CLÍNICA
E PRESENÇA DE METÁSTASES OU CARCINOMATOSE

GRUPO*	n	média	Dp
I M1	13	3,11	0,84
I M2	12	2,83	0,73
II M1	8	3,47	1,02
II M2	6	3,15	0,66
III M1	4	3,4	0,69
III M2	3	2,4	0,66
TOTAL	46	3,09	0,82

fonte de variação	SQ	GL	QM	f	p
prognóstico	183.97	2	91.985	0.7254	> 0,05
morfologia	0.5992	1	0.0599	0.0047	> 0,05
interação	20.523	2	10.261	0.0809	> 0,05
resíduo	5199	40	126.8		
total	5382.9	45			

Dp= desvio padrão; SQ=soma de quadrados

GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio; f= frequência

Grupo I = cirurgia curativa, sem recidiva

Grupo II= cirurgia curativa, com recidiva

Grupo III = cirurgia paliativa, metástases ou carcinomatose

M1 = pontos grandes, médios ou pequenos, agrupados ou não

M2= estruturas grandes arredondadas ou disformes, com centro claro e contornos variados

* associado ao tipo morfológico

TABELA 2
ANÁLISE MORFOLÓGICA DE NORS ASSOCIADA À
EVOLUÇÃO CLÍNICA, PRESENÇA DE METÁSTASES OU
CARCINOMATOSE EM FUNÇÃO DA IDADE MÉDIA POR GRUPO

GRUPO*	n	idade**
I M1	13	61.62
I M2	12	60.08
II M1	8	59.56
II M2	6	60.33
III M1	4	54.75
III M2	3	56.33
TOTAL	46	

fonte de variação	SQ	GL	QM	f	p
prognóstico	183.9704	2	91.985	0.7254	> 0,05
morfologia	0.5992	1	0.0599	0.0047	> 0,05
interação	20.5226	2	10.261	0.0809	> 0,05
resíduo	5198.9658	40	126.8		
total	5382.9362	45			

Dp= desvio padrão; SQ= soma de quadrados

GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio; f= frequência

Grupo I = cirurgia curativa, sem recidiva

Grupo II= cirurgia curativa, com recidiva

Grupo III = cirurgia paliativa, metástases ou carcinomatose

M1 = pontos grandes, médios ou pequenos, agrupados ou não

M2 = estruturas grandes, arredondadas ou disformes, com centro claro e contornos variados

* associado ao tipo morfológico

** idade média por grupo

TABELA 3
CONTAGEM MÉDIA DE NORs
EM FUNÇÃO DA FAIXA ETÁRIA

FAIXA ETÁRIA	n	média	Dp
menor ou igual a 40 anos	3	2,36	0,29
maior do que 40 anos	43	3,11	0,82

$t = 3,59$; $GL = 45$; $p < 0,01$

Dp = desvio padrão

GL = graus de liberdade

**TABELA 4 - ANÁLISE MORFOLÓGICA DE NORs
EM FUNÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA**

DIFERENCIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	TIPO MORFOLÓGICO		TOTAL
	M1	M2	
H1	8	2	10
H2	19	17	36
TOTAL	27	19	46

. 2

$X = 0,235$; $GL = 2$; $p > 0,05$

GL = graus de liberdade

H1 = adenocarcinoma bem diferenciado

H2 = adenocarcinoma moderadamente ou pouco diferenciado

M1 = pontos grandes, médios ou pequenos; agrupados ou não

M2 = estruturas grandes, arredondadas ou disformes com centro claro e contornos variados

TABELA 5
CONTAGEM MÉDIA DE NORs EM FUNÇÃO
DA DIFERENCIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

DIFERENCIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	MÉDIA	Dp	TOTAL
H1	3,71	0,68	10
H2	2,89	0,76	36

$t = 3,15$; $GL = 44$; $p < 0,01$

Valor de intersecção H1/H2 = 3,96

$P(H2) = 3,25\%$ (valores $> 3,96$)

$P(H1) = 64,22\%$ (valores $< 3,96$)

Dp = desvio padrão

gl = graus de liberdade

H1 = adenocarcinoma bem diferenciado

H2 = adenocarcinoma moderadamente ou pouco diferenciado

TABELA 6
ANÁLISE MORFOLÓGICA DE NORs
EM FUNÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO DE DUKES

DUKES	TIPO MORFOLÓGICO		TOTAL
	M1	M2	
A	13	6	19
B	6	8	14
C	6	7	13
TOTAL	25	21	46

2

$$X = 2,614; GL=2; p > 0,05$$

GL= graus de liberdade

M1 = pontos grandes, médios ou pequenos, agrupados ou não

M2 = estruturas grandes arredondadas ou disformes

TABELA 7
CONTAGEM MÉDIA DE NORs
EM FUNÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO DE DUKES

DUKES	n	média	Dp
A	19	3,12	0,89
B	14	2,90	0,53
C	13	3,16	0,99
TOTAL	46	3,09	0,82

fonte de variação	SQ	GL	QM	f	p
entre	0,55	2	0,28	0,404	> 0,05
dentro	29,70	43	0,70		
total	30,25	45			

Dp= desvio padrão; SQ=soma de quadrados

GL= graus de liberdade; QM = quadrado médio; f= frequência

TABELA 8
ANÁLISE MORFOLÓGICA DE NORs
EM FUNÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DO TUMOR

LOCALIZAÇÃO	TIPO MORFOLÓGICO		TOTAL
	M1	M2	
SUPERIOR	9	9	18
MÉDIO	7	7	14
INFERIOR	9	5	14
TOTAL	25	21	46

2

$X = 0,801$; GL = 2; p. 0,05

GL = graus de liberdade

M1 = pontos grandes, médios ou pequenos, agrupados ou não

M2 = estruturas grandes arredondadas ou disformes

TABELA 9
CONTAGEM MÉDIA DE NORs
EM FUNÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DO TUMOR

LOCALIZAÇÃO	n	média	Dp
SUPERIOR	18	3,00	0,70
MÉDIO	14	2,95	0,78
INFERIOR	14	3,26	1,01
TOTAL	46	3,09	0,82

fonte de variação	SQ	GL	QM	f	p
entre	0,81	2	0,41	0,59	> 0,05
dentro	29,44	43	0,68		
total	30,25	45			

Dp= desvio padrão; SQ= soma de quadrados

GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio; f= frequência

4 - DISCUSSÃO

4 - DISCUSSÃO

O estudo da proliferação celular tem representado um importante tópico da pesquisa em câncer, uma vez que está diretamente relacionado à agressividade da neoplasia, sendo, portanto, alternativa para se compreender a cinética tumoral e tentar estabelecer parâmetros para a terapêutica. Dessa forma, vários métodos foram propostos, e, dentre estes, destaca-se a análise quantitativa e morfológica das regiões organizadoras de nucléolo coradas pela prata(NORs).

As variações morfológicas observadas nos nucléolos de células tumorais, em que estes se apresentam como estruturas maiores e irregulares, são freqüentes e bastante conhecidos (BOLOGNARI & CONTINI, 1981). Porém, devido às dificuldades para sua quantificação, essas alterações têm sido de pouca utilidade, quando usadas para fins diagnósticos. Contudo, com a utilização de métodos recentes de análise de imagem computadorizada, foi possível a MULDER et al.(1992) relacionarem aspectos morfológicos, assim como a medida da área de núcleos de células de neoplasias colorretais ao comportamento

biológico desses tumores. Entretanto, a importância do nucléolo tem sido reavaliada a partir do uso de um novo parâmetro, as NORs, que permitem avaliar de forma objetiva a atividade celular e também seu emprego rotineiro.

O estudo de NORs como variável prognóstica vem sendo desenvolvido a partir das observações de CROCKER & NAR (1987) com linfomas não-Hodgkin, em que aspectos morfológicos de NORs, assim como sua contagem, foram relacionados a tumores de alto e baixo grau de malignidade. Vários trabalhos têm procurado comparar esses valores obtidos com outros parâmetros, para se avaliar a população celular em proliferação. Observou-se a correlação linear dos valores obtidos com os métodos de incorporação da bromodeoxiuridina e detecção do anticorpo monoclonal Ki-67 (LEEK et al., 1991; TRERÈ et al., 1991)

A contagem dos pontos pode ser influenciada por fatores técnicos no momento da coloração pela prata e, assim, alterar os resultados. RÜSCHOFF e cols (1990a) observaram que tempos maiores de coloração diminuem as diferenças de contagens entre as lesões benignas e malignas, uma vez que levariam à coloração excessiva de todo o nucléolo, e este apresentar-se-ia como ponto único e grande. Dessa forma, propuseram que o tempo de coloração com a prata, de um determinado tecido

préviamente fixado, seja individualizado e padronizado de acordo com a coloração de células não-neoplásicas presentes no tecido fixado, por exemplo, linfócitos. Nas neoplasias do sigmóide e reto, os autores referidos observaram que o tempo ótimo para a adequada coloração encontra-se ao redor de 27 minutos.

PLOTON et al. (1986), para a melhor visualização dos pontos, propuseram que a coloração fosse realizada a 20° C, o que diminuiria a precipitação da prata. CROCKER et al.(1989) utilizaram filtros verdes para a contagem que reduziram as alterações cromáticas, tornando mais nítida a borda dos pontos.

Outro dado a ser considerado na análise dos resultados neste trabalho diz respeito à metodologia de contagem empregada. A opção pela realização da mesma, através de fotografias, tornou-a menos cansativa, de fácil execução e, portanto, sujeita a erros menores. Também facilitou a correlação de vários casos simultaneamente e o estudo detalhado dos aspectos morfológicos.

CROCKER et al.(1989) estabeleceram que todas as estruturas coradas pela prata fossem contadas. Porém, quando agrupadas na forma de pontos agregados ("clusters"), estas deveriam ser consideradas como

estrutura única. Também, quando os pontos fossem individualizados dentro do nucléolo, cada NOR poderia ser considerada como unidade de contagem.

Com técnicas computadorizadas de análise de imagem, foi possível a padronização da contagem e obtenção de informações a respeito da somatória das áreas (RÜSCHOFF et al., 1990a; WEEKS et al., 1992). Essa medida poderia ser mais confiável do que a simples contagem, pois não raramente os pontos apresentam-se agrupados, dificultando assim, sua individualização. De fato, RÜSCHOFF et al. (1990a), observaram valores de contagens semelhantes em tumores benignos e malignos da mama, que no entanto se mostraram distintos quando se considerou a soma das áreas das NORs. Entretanto, pode-se dizer que os dados existentes na literatura ainda são conflitantes, talvez por ser o método de aplicação recente e pelo limitado conhecimento ainda do papel das NORs na proliferação celular.

Nesse estudo, procurou-se correlacionar a contagem média de pontos por célula e a variação morfológica das NORs com alguns fatores prognósticos que mais freqüentemente vêm sendo analisados e, dessa forma, estabelecer o tipo de comportamento das NORs em face desses fatores de influência no comportamento tumoral.

A contagem de NORs e suas variações morfológicas desta casuística foram comparadas ao tipo de evolução clínica dos doentes. Estes foram classificados em três grupos em função da evolução livre de doença (grupo I), diagnóstico de recidiva tumoral (grupo II) e os que apresentavam metástases ou carcinomatose por ocasião da cirurgia (grupo III). As contagens médias de NORs por célula nos três grupos foram então comparados com os aspectos morfológicos e não revelaram correlação com significado estatístico quanto ao prognóstico. GRIFTHS et al. (1989) também não observaram valores que permitissem informações a respeito do prognóstico, quando utilizaram a contagem de NORs em 100 doentes portadores de adenocarcinoma de reto. Da mesma forma, RAYTER et al. (1992) e também TREVISAN* et al. (1993) obtiveram valores semelhantes de contagens nos doentes vivos e naqueles que evoluíram para o óbito. Ao contrário, MORAN et al. (1989), em trabalho com 51 doentes portadores de carcinoma colorretal, todos classificados no estágio C de DUKES e com tempo mínimo de seguimento pós-operatório de cinco anos, notaram que os pacientes vivos apresentavam

*TREVISAN, M.A.S. (Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas). Aplicação da técnica Ag-NOR na avaliação do prognóstico do adenocarcinoma retal [Apresentado ao XIX Congresso Brasileiro de Patologia, Santos, 1993]

valores significativamente mais baixos do que os que evoluíram para óbito.

Da mesma forma, RÜSCHOFF et al. (1990b) observaram nítida correlação de contagem de NORs por célula e a área ocupada pelos pontos corados com a sobrevida. Notaram que as contagens mais altas ocorreram nos casos de pior evolução, assim como os valores de medida de área mais baixos, concluindo que as NORs comportavam-se como variável prognóstica independente. Também JOYCE et al. (1992) obtiveram contagens menores de NORs nos pacientes que permaneciam vivos após cinco anos na sua casuística. ÔFNER et al. (1990), analisando aspectos morfológicos das NORs, correlacionaram-nos à evolução clínica, concluindo por sua utilidade na avaliação prognóstica.

Para a comparação da variação morfológica das NORs com a idade dos doentes, associaram-se os grupos estudados (I, II, III) aos tipos morfológicos e fez-se a correlação estatística com a média de idade em cada grupo. Nos seis grupos assim estabelecidos, não se encontraram diferenças significativas. Com relação à contagem, apesar da comparação entre as médias de NORs nos pacientes com 40 anos ou menos, em relação àqueles de idades mais avançadas ter sido estatisticamente significativa, o tamanho amostral reduzido nos pacientes mais jovens, não permitiu que esse dado se

correlacionasse com o prognóstico dos doentes e tivesse a devida aplicação clínica.

Uma vez que o fator idade tem sido relacionado a tumores de pior prognóstico nos doentes com menos de 40 anos (METTLIN et al., 1982; MALCOLM et al., 1981), seria possível esperar um comportamento diferente da contagem ou morfologia das NORs. No entanto, dentro das características dessa amostra, não se verificou tal relação, assim como foi referido por MORAN et al. (1989) que estudaram 51 pacientes do ponto de vista da contagem de NORs. Talvez em um maior número de doentes com características mais homogêneas e com maior tempo de seguimento, fosse possível demonstrar diferenças nas contagens ou análise morfológica das NORs, em doentes portadores de carcinoma retal com idades menores do que 40 anos.

Vários autores têm relatado pior prognóstico para tumores retais pouco diferenciados (DUKES et al, 1958; METTLIN et al., 1982; MCDERMOTT et al., 1985). Considerando a maior atividade celular e conseqüente maior agressividade dessas lesões, os valores mais altos de contagens em lesões menos diferenciadas evidenciarão sua relação com a proliferação. Analisando-se a diferenciação histopatológica dos tumores retais, estudou-se o comportamento do aspecto morfológico e

contagem das NORs nos dois grupos propostos: aqueles bem diferenciados (H1) e os moderadamente ou pouco diferenciados (H2). Nos dois grupos estudados, o aspecto morfológico não possibilitou conclusões nessa casuística. Ao contrário, analisando-se a contagem das NORs foi possível observar que os valores mais altos para o tipo histopatológico H1 foram significativos, quando comparados às contagens do tipo H2 ($p < 0,01$). Porém, sob o ponto de vista biológico, essa interpretação pode ficar prejudicada, uma vez que a certeza quanto ao correto diagnóstico da diferenciação celular em relação ao tipo H2 ser possível para valores de contagem média por célula maiores do que 3,96, o que ocorreu nessa casuística em 3,25% dos casos (tabela 5). MORAN et al. (1989) observaram a média de 19 pontos de NORs para tumores pouco diferenciados, mais elevada que a contagem média de 15 pontos por célula nos tumores bem diferenciados, porém sem significância estatística. Também KRAMN et al. (1989) em análise de 44 doentes, não obtiveram dados que permitissem correlacionar estatisticamente a contagem de NORs ao tipo histopatológico dos tumores.

Nessa série estudada, a contagem e o estudo do padrão morfológico das NORs em função da invasão tissular tumoral, segundo a classificação de DUKES, também não evidenciou resultados com significância estatística. Dados semelhantes foram observados por RAYTER et al.

(1992) em estudo com 95 doentes, onde a contagem de NORs foi realizada em portadores de adenocarcinoma de cólon, com valores semelhantes obtidos nos estágios A, B e C de DUKES. Ao contrário, JOYCE et al. (1992), em análise de 164 doentes portadores de carcinoma colorretal, observaram ser a contagem de NORs variável prognóstica mais importante do que a disseminação tumoral, em que os pacientes com má evolução apresentaram contagens de NORs mais elevadas. De forma semelhante, ÖFNER et al. (1990) também atribuíram à contagem de NORs dados mais indicativos da evolução clínica quando comparados à disseminação tumoral em trabalho realizado com 49 doentes portadores de adenocarcinoma de cólon.

Apesar de o nível de acometimento do reto pela neoplasia ser considerado fator prognóstico, sabendo-se que a recidiva ocorre com maior frequência nas lesões do reto inferior (MORSON et al., 1963; ANDERSON, 1974; MOOSSA et al., 1975), a comparação da localização tumoral com a contagem e aspectos morfológicos das NORs não mostrou resultados significativos nessa série. Novamente os dados dessa amostra são concordantes com o trabalho de MORAN et al. (1989), em que a contagem de NORs não variou significativamente nos diversos segmentos do reto. Na presente série, em que o tempo de seguimento pós-operatório da maioria dos pacientes foi inferior a cinco anos, período em que as taxas de recidiva ainda se situam

abaixo do esperado, inviabilizou-se uma correlação mais significativa com os aspectos morfológicos das NORs.

Neste estudo, não foi possível fazer a correlação dos resultados observados com relação aos aspectos morfológicos e contagens com fatores prognósticos conhecidos. A tentativa de homogeneizar a amostra mostrou-se insuficiente, não permitindo a análise estatística com níveis de significância, uma vez que o pareamento entre os três grupos estudados não foi adequado. Talvez, estudando-se o comportamento das NORs em um grupo específico de pacientes, em que seriam incluídas apenas as neoplasias do estágio C da classificação de DUKES e com tempo de seguimento mínimo de cinco anos, como realizado por MORAN et al. (1989) poder-se-ia obter valores mais significantes.

No presente trabalho, os pacientes com tempo de seguimento menor do que cinco anos totalizaram 67,4% da casuística e certamente vários deles ainda deverão apresentar recidivas. Além disso, os três grupos estudados (I, II e III) são heterogêneos no que diz respeito ao número de pacientes. Isso impossibilitou, por exemplo, a comparação dos pacientes com sobrevida que totalizaram 38 com os que evoluíram para o óbito. Também a análise morfológica foi prejudicada com o baixo número de pacientes de cada grupo. Inicialmente as NORs foram

classificadas em 11 tipos morfológicos, porém foi necessário que fossem agrupadas em dois tipos, uma vez que a análise com um maior número de tipos não seria possível na presente casuística de 46 pacientes.

A importância da análise morfológica e sua relação com prognóstico foi observada por SHIRO et al. (1993) em carcinoma hepatocelular. Em tumores epiteliais colorretais a morfologia tem importância prognóstica em trabalho de ÖFNER et al. (1990) em que os pontos, quando se apresentam de forma espalhada no núcleo ("scattered" NORs), são mais freqüentes nos tumores de pior prognóstico. Esses autores observaram que os cinco doentes portadores de adenocarcinoma de cólon classificados no estágio C2 de DUKES apresentaram recidivas após o tratamento cirúrgico radical e em nenhum desses tumores a contagem de NORs, em seu aspecto espalhado por célula, foi menor do que quatro. Dentre os pacientes do estágio B, os dois que evoluíram com recidiva também apresentavam mais do que quatro formas espalhadas de NORs por célula neoplásica. O conhecimento atual não fornece ainda explicações para que se possa melhor compreender a relação existente entre as variações morfológicas observadas das NORs e a agressividade biológica de certos tumores.

A possibilidade de termos acesso a um novo método, que forneça dados prognósticos quanto à evolução da neoplasia colorretal, permitiu aos que estão envolvidos no estudo e tratamento desse tipo de doença, o acesso a novas informações e uma melhor compreensão da gênese e comportamento tumoral visando a melhores taxas de sobrevida. A falta de significância estatística observada neste trabalho, quando se correlacionaram fatores prognósticos do câncer retal às NORs, ainda não invalida o método, pois as alterações morfológicas existem e com indícios de que podem se correlacionar com o comportamento tumoral.

5 - CONCLUSÕES

5- CONCLUSÕES

1- A análise dos resultados desta casuística confirmam ser a técnica de coloração pela prata das NORs método exeqüível e de fácil realização, assim como a respectiva contagem e as interpretações morfológicas

2 - As contagens e análise morfológica empregadas para o estudo das NORs não permitiu estabelecer informações a respeito do prognóstico do adenocarcinoma de reto.

6 - RELAÇÃO GERAL DA CASUÍSTICA

6 RELAÇÃO GERAL DA CASUÍSTICA

GRUPO	TIPO MORF.	DOENTE	ID*	SEXO	DUKES	TEMPO SEG**	LOCAL. TUMOR	ÓBITO	DIF. HIST.	MÉDIA DE PONTOS
I	M1	D.B.N.	42	F	A	38	superior	não	H1	3.68
I	M1	S.A.C.	46	M	A	48	médio	não	H1	4.24
I	M1	A.P.	50	M	A	47	superior	não	H2	2.87
I	M1	M.E.A.R.	55	F	C	26	médio	não	H2	1.59
I	M1	S.O.	59	M	A	33	superior	não	H2	4.96
I	M1	G.M.	62	M	B	45	superior	não	H2	3.02
I	M1	J.B.C.	62	M	A	32	médio	não	H1	2.94
I	M1	D.V.	64	F	C	39	inferior	não	H2	3.08
I	M1	C.J.	67	F	C	40	superior	não	H2	2.35
I	M1	E.Z	70	M	A	32	superior	não	H2	2.67
I	M1	M.A.C.	71	F	A	24	superior	não	H2	3.03
I	M1	G.L.S.	72	F	B	110	médio	não	H2	2.64
I	M1	M.A.R.	81	F	A	93	médio	não	H1	3.31
I	M2	R.U.	39	F	A	61	médio	não	H2	2.17
I	M2	R.C.	50	M	B	39	inferior	não	H2	2.59
I	M2	A.L.	54	M	A	53	superior	não	H2	3.19
I	M2	M.X.D.	59	F	C	47	médio	não	H2	3.86
I	M2	M.J.D.Q.	59	F	B	39	superior	não	H2	3.06
I	M2	G.B.G.	59	M	A	24	inferior	não	H2	1.1
I	M2	M.V.	60	F	B	29	superior	não	H2	3.15
I	M2	M.J.O.	65	F	A	44	médio	não	H2	2.72
I	M2	M.A.F.	65	F	A	89	superior	não	H2	2.6
I	M2	E.R.F.	66	F	B	286	inferior	não	H2	2.5
I	M2	C.L.	68	M	C	84	superior	não	H1	3.62
I	M2	A.E.	77	F	A	61	médio	não	H2	3.27
II	M1	O.S.L.	47	M	A	30	inferior	sim	H1	2.88
II	M1	P.A.C.	48	M	B	15	médio	sim	H2	4.27
II	M1	G.S.C.	50	F	A	50	superior	não	H2	2.74
II	M1	J.G.	56	M	A	46	inferior	não	H1	3.98
II	M1	C.L.C.	62	F	B	25	médio	sim	H2	2.46
II	M1	M.M.	70	M	C	8	inferior	sim	H2	3.78
II	M1	G.B.	72	F	A	23	superior	sim	H2	2.4
II	M1	J.J.S.	73	M	A	27	inferior	não	H1	4.54
II	M2	C.O.M.	37	F	B	37	médio	não	H2	2.22
II	M2	A.L.	61	M	C	34	inferior	não	H1	5.01
II	M2	I.M.J.M.	64	F	C	30	inferior	não	H2	2.65
II	M2	H.C.	65	M	B	27	superior	não	H2	2.57
II	M2	A.D.L.	65	M	C	34	médio	não	H2	2.8
II	M2	I.L.B.	70	F	B	32	superior	não	H2	3.62
III	M1	C.C.P.	36	F	B	24	inferior	não	H2	2.7
III	M1	A.P.	48	M	B	32	inferior	sim	H1	2.96
III	M1	M.G.	58	F	C	30	inferior	sim	H2	3.76
III	M1	J.A.G.	77	M	C	25	inferior	não	H2	4.13
III	M2	A.O.M.	45	F	C	49	superior	não	H2	2.78
III	M2	M.L.T.	57	F	B	41	médio	sim	H2	2.81
III	M2	M.V.S.	67	F	C	26	superior	não	H2	1.62

* (em anos); ** (em meses)

Abreviaturas utilizadas

TIPO MORF. = tipo morfológico; ID = idade; TEMPO SEG = tempo de seguimento

LOCAL. TUMOR = localização do tumor; DIF. HIST. = diferenciação histopatológica

M1 = pontos pequenos, médios ou grandes, agrupados ou não

M2 = estruturas grandes arredondadas ou disformes, centro claro e contornos variados

H1 = adenocarcinoma bem diferenciado

H2 = adenocarcinoma moderadamente ou pouco diferenciado

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, W.A.D. Stage classification and end results reporting for carcinoma of the colon and rectum Cancer, 34:909-11, 1974.
- ARENDS, J.W.; KATE, J. AgNORS in colonic mucosal lesions. [letter] Histopathology, 13:707, 1988.
- ARMITAGE, N.C.; ROBIN, R.A.; EVANS, D.F.; TURNER, D.R.; BALDWIN, R.W.; HARDCASTLE, J.D. The influence of tumour cell DNA abnormalities on survival in colorectal cancer. British Journal of Surgery, 72:828-30, 1985.
- ASTLER, V.A.; COLLER, F.A. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. Annals of Surgery, 139:846-52, 1954.
- BEHBEHANI, A.I.; AL-NAQEEB, N.; OMAR, Y.T.; EL-NAS, S.A.; AL-DEEN, A.S.; AWAD, A.; AL-JAZZAF, H.; NASRALLA, M.Y.; SZYMENDERA, J.J. Serial determinations of serum CEA in monitoring management of patients with colorectal carcinoma, Oncology, 47:303-7, 1990.
- BEIGUELMAN, B. Curso Prático de Bioestatística. 2. ed. Ribeirão Preto, Revista Brasileira de Genética, 1991.
- BOLOGNARI, A.; CONTINI, A. The role of nucleolus in carcinogenesis. Rivista di Biologia, 7:43-68, 1981.
- BORING, C.C.; SQUIRES, T.S.; TONG, T. Cancer statistics, 1992, CA- A Cancer Journal for the Clinician, 42:19-38, 1992
- BRODERS, A.C. The grading of carcinoma. Minnesota Medicine, 8:726- 30, 1925.
- BUFO, P.; FRASSANITO, F.; MAIORANO, E. Colorectal carcinoma and its precursors: role of argyrophilic nucleolar regions (Ag-NORS), Bolletino Societa Italiana Biologia Sperimentali, 68:129-36, 1992.
- BUYSE, M.; ZELENIUCH-JACQUOTTE, A.; CHALMERS, T.C. Adjuvant Therapy of Colorectal Cancer: Why we still don't know? JAMA, 259:3571-8, 1988.
- CHIDA, T.; AJIOKA, Y. ; WATANABE, H. Use of nucleolar organiser regions with histopatological diagnoses of colorectal epithelial neoplasia, Journal of Clinical Oncology, 22:73-8, 1992.

- CHU, D.Z.J.; ERICKSON, C.A.; RUSSELL, P.; THOMPSON, C.; LANG, N.P.; BROADWATER, R.J.; WESTBROOK, K.C. Prognostic significance of carcinoembrionyc antigen in colorectal carcinoma, Archives of Surgery, 126:314-6, 1991.
- CROCKER, J.; NAR, P. Nucleolar Regions in Lymphomas, Journal of Pathology, 151:111-8, 1987.
- CROCKER, J.; BOLDY, D.A.R.; EGAN, M.J. How should we count AgNORS ? Proposals for a standardized approach, Journal of Pathology, 158:185-8, 1989.
- CUNHA, F.M.; MEDINA, L.S.; MORAES, A.A.J.G.; TEREZA, M.S.; MARTINHO, R.A.; FAGUNDES, J.J.; GÓES, J.R.N.; COY, C.; MEDEIROS, R.R. Fase II de 5-flourouracil, interferon alfa-2a-recombinante e ácido folínico em pacientes com adenocarcinoma colorretal avançado, Oncologia Atual, 2:128-34, 1992.
- Dados dos registros de base populacional. Câncer no Brasil Ministério da Saúde & Instituto Nacional do Câncer, 1991.
- DERENZINI, M.; TRERÉ, D. Importance of interphase nucleolar organizer regions in tumour pathology, Virchows Archives of B Cells Pathology, 61:1-8, 1991.
- DUKES, C.E. The classification of cancer of the rectum, Journal of Pathology and Bacteriology, 35:323-32, 1932.
- DUKES, C.E.; BUSSEY, H.J.R. The spread of rectal cancer and its effect on prognosis British Journal of Surgery, 12:309-20, 1958.
- FINAN, P.J.; QUIRKE, P.; DIXON, M.F.; DYSON, J.E.D.; GILES, G.R.; BIRD, C.C. Is DNA aneuploidy a good prognostic indicator in patients with advanced colorectal cancer ?, British Journal Cancer, 54:327-30, 1986.
- FILELLA, X.; MOLINA, R.; GRAU, J.J.; PIQUÉ, J.M.; GARCIA-VALDECASAS, J.C.; ASTUDILLO, E.; BIETE, A.; BORDAS, J.M.; NOVELL, A.; CAMPO, E.; BALLESTA, A.M. Prognostic value of CA 19-9 levels in colorectal cancer, Annals of Surgery, 216:55-9, 1992.
- FINLAY, I.G.; MCARDLE, C.S. Occult hepatic metastases in colorectal carcinoma, British Journal of Surgery, 73:732-5, 1986.
- FLETCHER, R.H.; HILL, C. Carcinoembryonic antigen, Annals of Internal Medicine, 104:66-73, 1986.

- FRIEDLANDER, M.C.; HEDLEY, D.H.; TAYLOR, I.A. Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumours, Journal of Clinical Pathology, 37:61-74, 1984.
- GABRIEL, W.B.; DUKES, C.; BUSSEY, H.J.R. Lymphatic spread in cancer of the rectum, British Journal of Surgery, 23:395-413, 1935.
- GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; STEIN, H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated cell proliferation, International Journal of Cancer, 31:13-21, 1983.
- GOLD, P.; FREEDMAN, S.O. Demonstration of tumor specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and adsorption techniques, Journal of Experimental Medicine, 121:439-62, 1965.
- GOLIGHER, J. Surgery of the Anus Rectum and Colon. 5th ed Baillière Tindall, London, 1984.
- GRIFFITHS, A.P.; BUTLER, C.W.; ROBERTS, P.; DIXON, M.F.; QUIRKE, P. Silver stained structures (Ag-NORs), their dependence on tissue fixation and absence of prognostic relevance in rectal adenocarcinoma, Journal of Pathology, 159:121-7, 1989.
- HALL, P.A.; LEVINSON, D.A. Review: Assessment of cell proliferation in histological material, Journal of Clinical Pathology, 43:184-92, 1990.
- HEIMANN, T.M.; MILLER, F.; MARTINELLI, G.; MESTER, J.; KURTZ, R.J.; SZPORN, A.; FASY, T. Significance of DNA content abnormalities in small rectal cancers, The American Journal of Surgery, 159:199-203, 1990.
- HERRERA, M.A.; CHU, T.M.; HOLYOKE, E.D. Carcinoembryonic antigen as a prognostic and monitoring test in clinically complete resection of colorectal carcinoma, Annals of Surgery, 183:5-7, 1976.
- HIGGINS, G.A.; HUMPHREY, E.W.; DWIGHT, R.W. Pre-operative radiation and surgery for cancer of the rectum. Veterans Administration Surgical Oncology Group - Trial II, Cancer, 58:352-9, 1986.
- HILL, M.J.; MORSON, B.C.; THOMPSON, M.H. The role of faecal bile acids in large bowel carcinogenesis, British Journal of Cancer, 48:143, 1983.
- JASS, J.R.; ATKIN, W.S.; CUZICK, J.; BUSSEY, H.J.R.; MORSON, B.C.; NORTHOVER, J.M.A.; TODD, I.P. The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases, Histopathology, 10:437-59, 1986.

- JASS, J.R.; MUKAWA, K.; GOGH, H.S.; LOVE, H.S.; CAPELLARO, D. Clinical importance of DNA content in rectal cancer measured by flow cytometry, Journal of Clinical Pathology, 42:254-9, 1989.
- JONES, D.J.; MOORE, M.; SCHOFIELD, P.F. Refining the prognostic significance of DNA ploidy status in colorectal cancer: a prospective flow cytometric study, Internal Journal of Cancer, 41:206-10, 1988.
- JOYCE, W.P.; FYNES, M.; MORAN, K.T.; GOUGH, D.B.; DERVAN, P.; GOREY, T.F.; FITZPATRICK, J.M. The prognostic value of nucleolar organiser regions in colorectal cancer - 5 year follow-up period, Annals of the Royal College of Surgeons of England, 74:172-6, 1992.
- KRAM, N.; RESSIN, S.; GELLER, S.A. A Study of colonic carcinoma with comparison of histopathology, DNA flow cytometric data and numbers of NORs, Modern Pathology, 2:468-72, 1989.
- LAURIE, J.A.; MOERTEL, C.G.; FLEMING, T.R. Surgical adjuvant therapy of large-bowel carcinoma: An evaluation of levamisole and the combination of levamisole and fluorouracil, Journal of Clinical Oncology, 7: 1447-56, 1989.
- LEEK, R.D.; ALISON, M.R.; SARRAF, C.E. Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar regions (AgNORS) in non-proliferating and proliferating tissues, Journal of Pathology, 165:43-51, 1991.
- LEWI, H.; BLUMGART, L.H.; CARTER, D.C.; GILLIS, C.R.; HOLE, D.; RATCLIFFE, J.G.; WOOD, C.B.; McARDLE, C.S. Pre-operative carcino-embryonic antigen and survival in patients with colorectal cancer, British Journal of Surgery, 71:206-8, 1984.
- LUNDE, O.C.H.; HAVIG, O. Clinical significance of carcinoembryonic antigen (CEA) in patients with adenocarcinoma in colon and rectum, Acta Chirurgica of Scandinavia, 148:189-93, 1982.
- LYNCH, H.T.; KRUSH, A.J. Hereditary and adenocarcinoma of the colon, Gastroenterology, 53:517-27, 1967.
- LYNCH, H.T.; SMYRK, T.; WATSON, P.; LANSPA, S.J.; BOMAN, B.M.; LYNCH, P.M.; LYNCH, J.F.; CAVALIERI, J. Hereditary colorrectal cancer, Seminars in Oncology, 18:337-66, 1991.

- MALCOM, A.N.; PERENCEVICH, N.P.; OLSON, R.M.; HANLEY, J.A.; CHAFFEY, J.T.; WILSON, R.E. Analysis of recurrence patterns following curative resection for carcinoma of the colon and rectum. Surgery, Gynecology and Obstetrics, 152: 131-6, 1981.
- MCDERMOTT, F.T.; HUGHES, E.S.R.; PIHL, E; JOHNSON, W.R.; PRICE, A.B. Local recurrence after potentially curative resection for rectal cancer in a series of 1008 patients. British Journal Of Surgery, 72:34-7, 1985.
- McMICHAEL, A.J.; McCALL, M.G.; HARTSHORNE, J.M. Patterns of gastrointestinal cancer in European imigrants to Australia: The role of dietary change, International Journal of Cancer 25:431-7, 1980.
- MELAMED, M.R.; ENKER, W.E.; BANNER, P.; JANOV, A.J.; KESSLER, G.; DARYZNKIEWICS, Z. Flow cytometry of colorrectal cancer with three year follow-up. Diseases of Colon and Rectum, 29:184-6, 1986.
- METTLIN, C.; NATARAJAN, N.; MITTELMAN, A.; SMART, C.R. Management and survival of adenocarcinoma of the rectum in the United States: results of a national survey by the American College of Surgeons. Oncology, 39:265-73, 1982.
- MOERTEL, G.C.; O'FALLON, J.R.; GO, V.L.W.; O'CONNELL, M.J.; THYNNE, G.S. The preoperative carcinoembryonic antigen test in the diagnosis, staging and prognosis of colorectal cancer, Cancer, 58:603-10, 1986.
- MOERTEL, C.G.; FLEMING, T.R.; MacDONALD J.S. Levamisole and 5-flourouracil for adjuvant therapy for resected colon carcinoma, New England Journal of Medicine 322:352-8, 1990.
- MOOSSA, A.R.; REEP, P.C.; MARKS, J.E.; LEVIN, B.; PLATZ, C.E.; SKINNER, D.B. Factors influencing local recurrence after abdominoperineal resection for cancer of the rectum and rectosigmoid British Journal of Surgery, 62: 727-30, 1975.
- MORAN, K.; COOKE, T.; FORSTER, G.; GILLEN, P.; SHEEHAN, S.; DERVAN, P.; FITZPATRICK, J.M. Prognostic value of nucleolar regions and ploidy values in advanced colorectal cancer, British Journal of Surgery, 76:1152-5, 1989.
- MORSON, B.C.; VAUGHAN, E.G.; BUSSEY, H.J.R. Pelvic recurrence after excision of rectum for carcinoma British Medical Journal, 2:13-8, 1963.

- MORSON, B.C. The polyp cancer sequence in the large bowel. Proceedings of the Royal Society of Medicine, 67:451-7, 1974.
- MULDER, A.H.; VAN HOOTTEGEM, J.C.S.P.; SYLVESTER, R.; KATE, F.J.W.; KURTH, K.H.; OOMS, E.C.M.; KWAST, H.V.D. Prognostic factors in bladder carcinoma: histologic parameters and expression of a cell cycle-related nuclear antigen (Ki-67), Journal of Pathology, 166:37-43, 1992.
- MUSCARA, M.; GRIFFIN, G.; TUCCARI, G.; BARESI, G. Nucleolar organizer regions in dysplastic and neoplastic lesions of the large bowel, European Journal of Basic Applied Histochemistry, 35:401-8, 1991.
- National Institute of Health Consensus Statement: Carcinoembryonic antigen: Its role as a marker in the management of cancer, British Medical Journal, 282:373-5, 1981.
- NIGRO, N.D., SNIGH, D.V.; CAMPBELL, R.L.; PAK, M.S. Effect of dietary on intestinal tumor formation. Journal of the National Cancer Institute, 54:439-42, 1975.
- NORTHOVER, J.M.A. Carcinoembryonic antigen and recurrent colorectal cancer, British Journal of Surgery, September, 42-6, 1985. Supplement.
- ÖFNER, D.; TÖTSCH, M.; SANDBICHLER, P.; HALLBRUCKER, C.; MARGREITER, R.; MIKUZ, G.; SCHMID, K.W. Silver stained nucleolar organizer region proteins (Ag-NORS) as a predictor of prognosis in colonic cancer, Journal of Pathology, 162:43-9, 1990.
- PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; PIGEON, F.; ADNET, J.J. Improvement in the staining and visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level, Histochemical Journal, 18:5-14, 1986.
- QUINN, C.M.; WRIGHT, N.A. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables, Journal of Pathology, 160:93-102, 1990.
- RAYTER, Z.; SURTEES, P.; TILDESLEY, G. CORBISHLEY, C. The prognostic values of NORS in colorectal cancer, European Journal of Surgical Oncology, 18:37-40, 1992.
- Registro Nacional de Patologia tumoral: dados histopatológicos 1981-1985, Câncer no Brasil. Ministério da Saúde Rio de Janeiro,, 1986.

- ROBERTS, C.; BRASCH, J.; TATTERZALE, M.H.V. Ribosomal gene amplification: a selective advantage in tissue culture. Cancer Genetics and Cytogenetics, 29:119-27.
- ROGNUM, T.O.; THORUD, E.; LUND, E. Survival of large bowel carcinoma patients with different DNA ploidy, British Journal of Cancer, 56:633-6, 1987.
- ROSWIT, B.; HIGGINS, G.A.; KEEHN, R. Pre-operative irradiation for carcinoma of the rectum and sigmoid colon: Report of a national Veterans Administration randomized study, Cancer, 35:1597-602, 1975.
- RÜSCHOFF, J.; NEUMANN, K.; CONTRACTOR, H.; PLATE, K.; THOMAS, C. Nucleolar Organizer Regions (NORs). Basic Concepts and Practical application in tumour Pathology Journal of Cancer Research Clinical Oncology, 116: 480-485, 1990a.
- RÜSCHOFF, J.; BITTINGER, A.; NEUMAN, K. SCHMITZ-MOORMANN, P. Prognostic significance of nucleolar organizing regions (NORs) in carcinomas of the sigmoid colon and rectum, Pathology Research Practice, 186:85-91, 1990b.
- SCHOTTENFELD, D.; FRAUMENI, J.F. Cancer epidemiology and prevention. (1991) apud WEISBURGER, J.H. Causes, relevant mechanisms, and prevention of large bowel cancer, Seminars in Oncology, 18:316-36, 1991.
- SCHWARSMANN, G.; KATZ, A.; CUNHA, F.M.; VINHOLES, J.; GANSC, R.C.; SIMON, S.D. Oncologia Clínica - Princípios e prática, Artes Médicas, Porto Alegre, 1991.
- SCHWARZACHER, R.T.; KRAEMER, P.M.; CRAM, L.S. Spontaneous in vitro neoplastic evolution of cultured chinese hamster cells nucleolus organizing region activity. Cancer Genetics and Cytogenetics, 35:119-28, 1988.
- SCOTT, N.A.; WIEAND, H.S.; MOERTEL, C.G.; CHA, S.S.; BEART, R.W.; LIEBER, M.M. Colorectal cancer, Archives of Surgery, 122:1375-9, 1987.
- SENER, S.F.; IMPERATO, J.P.; CHMIEL, J.; FREMGEM, A.; SYLVESTER, J. The use of cancer registry data to study preoperative carcinoembryonic antigen levels as an indicator of survival in colorectal cancer, CA - A Cancer Journal for Clinicians, 39:51-7, 1989.
- SHEPHERD, N.A.; RICHMAN, P.I.; ENGLAND, J. Ki-67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations, Journal of Pathology, 155:213-219, 1988.

- SHIRO, T.; SEKI, T.; NAITOH, Y.; INOUE, K.; OKAMURA, A.
A Correlation of argyrophilic organizer regions with stages of hepatocellular carcinoma, Cancer, 71:44-9 1993.
- SZYMENDERA, J.J.; NOWACKI, M.P.; KOZLOWICKZ-GUDZINSKA, I.; KOWALSKA, M. Value of serum levels of carcinoembryonic antigen, CEA, and gastrointestinal cancer antigen, GICA or CA-19.9, for preoperative staging and postoperative monitoring of patients with colorectal carcinoma, Diseases of Colon and Rectum, 28:895-99, 1985.
- TRERÉ, D.; FARABEGOLI, F.; CANCELLIERI, A.; CECCARELLI, C.; EUSEBI, V. DERENZINI, M. AgNOR area in interphase nuclei of human tumours correlates with the proliferative activity evaluated by bromodeoxiuridine labelling and Ki-67 immunostaining, Journal of Pathology, 165:53-9, 1991.
- TURNBULL, R.B.; KYLE, K.; WATSON, F.R. Cancer of the colon: The influence of the no-touch isolation technique on survival rates, Annals of Surgery, 166:420-7, 1967.
- VERHEST, A.; KISS, R.; d'OLNE, D.; LARSIMONT, D.; SALMON, I.; LAUNOITE, Y.; FOURNEAU, C.; PASTEELS, J.; PECTOR, J.C. Characterization of human colorectal mucosa, polyps and cancers by means of computerized morphonuclear image analyses, Cancer, 65:2047-54, 1990.
- VOLGESTEIN, B.; FEARON, R.E.; HAMILTON, S.R.; KERN, S.E.; PREISINGER, A.N.; LEPPERT, M.; NAKAMURA, Y.; WHITE, R.; SMITS, A.M.M.; BOS, J.L. Genetic alterations during colorectal-tumor development, The New England Journal of Medicine, 319: 525-32, 1988.
- WANEBO, J.H.; RAO, B.; PINSKY, C.M.; HOFFMAN, R.G.; STEARNS, M.; SCHWARTZ, M.K.; OETTGEN, F.H. Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer, The New England Journal of Medicine, 299: 448-51, 1978.
- WEEKS, J.C.; BEROUKAS, D.; JARVIS, L.R.; WHITEHEAD, R. Video image analysis of Ag-NOR in the normal and adenomatous colorectum, Journal of Pathology, 166:139-45, 1992.
- WEISBURGER, J.H. Causes, relevant mechanisms, and prevention of large bowel cancer, Seminars in Oncology, 18:316-36, 1991.

- WOLLEY, R.C.; SCHREIBER, K.; KOSS, L.G.; KARAS, M.; SHERMAN, A. DNA distribution in human colon carcinomas and its relationship to clinical behavior, Journal of the National Cancer Institute, 69:15-22, 1982.
- WOOLFSON, K. Tumor markers in cancer of the colon and rectum, Diseases of colon and rectum, 34:506-11, 1991.
- WYNDER, E.L.; REDDY, B.S. Epidemiology of cancer of the colon. In Cancer Epidemiology in the USA and USSR, D.L. Levin, editor, Maryland, National Institutes of Health Publication, 20-2044: 81-6, 1980.
- YANG, P; HUANG, G.S.; ZHU, X.S. Role of nucleolar organiser region in differentiating from benign tumours of the colon, Journal of Clinical Pathology, 43:235-8, 1990.
- ZATSEPINA, O.; HOZAK, P.; BAHADJANYAN, D.; CHENTSOV, Y. Quantitative ultrastructural study of nucleolus-organizing regions at some stages of the cell cycle (G0 period, G2 period, mitosis). Biology of the Cell, 62:211-18, 1988.

ABSTRACT

ABSTRACT

The rectum cancer survival rate has not presented alterations in the last decades and the search for prognostic information, with the aim of improving the results of treatment, has led to the study of the tumor's biological behaviour in its many aspects. The cellular proliferation related to tumoral aggressiveness may be an accessible method to this study and may be done through the nucleolar organizer regions (NORs). The NORs are rDNA loops present in five chromosomes (13, 14, 15, 21 and 22) responsible for the production of ribosome and proteins. They may be evaluated in its quantitative and morphological aspects as they vary according to the cellular cycle and nucleolus functional state.

Forty-six patients that presented malignant lesion of the rectum were submitted to morphological analysis and NORs count. These analysis were compared to the clinical evolution and known prognostic factors (age, tumoral tissue invasion, histopathological differentiation and tumour location). Regarding morphological aspects, the NORs were divided into two groups: M1 (small, medium or large specks, grouped or not) and M2 (large, roundish or deformed structures, clear centre and varied outline). The counting of specks was done by photographs of silver-stained laminae. There

was no statistical difference of the aspects studied in regard to clinical evolution, tumoral tissue invasion, lesion location and the comparison of morphological aspects with histopathological differentiation and age of patients ($p > 0.05$). Although the NORs count was significantly higher in well differentiated lesions (H1) when compared to slightly differentiated tumors (H2) ($p < 0,01$) and in the patients 40 years old or less with regard to the older patients ($p < 0.01$), these data were not clinically significant and were not used as prognostic or diagnostic data.

In conclusion, silver-staining technique of NORs is an easily done and accesible method. The count and morphological analysis used did not permit the stablishment of information regarding rectum adenocarcinoma prognosis.