

# Expressão das proteínas p53, p16 e ki67 no adenocarcinoma da cabeça do pâncreas e sua relação com a sobrevida e diferenciação celular

Expression of p53, p16 and Ki67 proteins in ductal adenocarcinoma of the pancreatic head and their relation with survival and cell differentiation

Mário Benjamin Goitia-Durán<sup>1</sup>, Marcelo Moura Linhares<sup>2</sup>, Ricardo Artigiani Neto<sup>3</sup>, Franz Robert Apodaca-Torrez<sup>4</sup>, Edson José Lobo<sup>5</sup>, Alberto Goldenberg<sup>6</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** Determinar a expressão de p53, p16 e Ki-67 e sua relevância na sobrevida e diferenciação celular. **Métodos:** Foram incluídos 15 pacientes submetidos a duodenopancreatectomia. A expressão imunohistoquímica de p53, p16 e Ki-67 foi determinada em blocos tumorais embebidos em parafina. Foi estudada a relação dessas expressões com as variáveis. **Resultados:** Noventa e três por cento dos tumores apresentaram expressão de p53 e p16. Ki-67 estava expresso em 86,66% dos tumores (índice proliferativo – IP  $11,91 \pm 9,47$ ). A presença de alterações combinadas não estava relacionada a diferenças significativas no tipo tumoral, no estágio ou na sobrevida; resultados semelhantes foram obtidos com a análise de expressões isoladas. Quando foram criados os grupos de expressões de p16 e Ki-67, a sobrevida mediana não era significativa. Entretanto, havia uma sobrevida discretamente melhor nos pacientes com expressão focal do p16 (sobrevida mediana 20,75 *versus* 14,34) em comparação com pacientes com expressão difusa. **Conclusão:** A superexpressão das proteínas p53, p16 e Ki-67 não estava relacionada à sobrevida ou ao grau tumoral quando se compararam as expressões isoladas ou combinadas.

**Descritores:** Proteínas supressoras de tumor/análise; Proteínas de ciclo celular/análise; Antígeno Ki-67/análise; Proteína supressora de tumor p53; Neoplasias pancreáticas; Sobrevida

## ABSTRACT

**Objective:** To determine the expression of p53, p16 and Ki-67 and its relevance in survival and cell differentiation. **Methods:** Fifteen duodenopancreatectomized patients were included.

Immunohistochemical expression of p53, p16 and Ki-67 was determined in paraffin embedded tumor blocks. The relation of these expressions with different variables was studied. **Results:** Ninety-three per cent of tumors showed expression of p53 and p16. Ki-67 was expressed in 86.66% of tumors (labeling index – LI  $11.91 \pm 9.47$ ). The presence of combined alterations was not related to significant differences in tumor type, stage or survival; similar results were obtained analyzing isolated expressions. When groups of p16 and Ki-67 expressions were created, the median survival was not significant. However, there was a slightly better survival in patients with focal expression of p16 (median survival 20.75 *versus* 14.34), when compared to patients with diffuse expression. **Conclusion:** The overexpression of p53, p16 and Ki-67 was not related to survival or tumor grade, when comparing isolated or combined expressions.

**Keywords:** Tumor suppressor proteins/analysis; Cell cycle proteins/analysis; Ki-67 antigen/analysis; Tumor suppressor protein p53; Pancreatic neoplasms; Survivorship

## INTRODUÇÃO

O câncer pancreático (CP) é uma das doenças mais fatais. Sua incidência e mortalidade são bastante semelhantes e representa um problema de Saúde Pública nos países ocidentais<sup>(1-3)</sup>. Na maioria das vezes, o diagnóstico tardio contribui para o prognóstico ruim e impede o tratamento cirúrgico adequado<sup>(4)</sup>. Compreender a carcinogênese e sua relação com o comportamento clínico-

Trabalho realizado na Disciplina de Cirurgia Gastroenterológica da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>1</sup> Médico; Mestre em Ciências pela Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>2</sup> Doutor em Ciências pela Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>3</sup> Doutor pela Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>4</sup> Doutor em Ciências pela Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>5</sup> Professor; Chefe do Grupo de Vias Biliares e Pâncreas da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>6</sup> Doutor; Professor Adjunto da Disciplina de Gastroenterologia Cirúrgica da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo (SP), Brasil.

Autor correspondente: Mário Benjamin Goitia-Durán – E-mail: mg.duran@globo.com

Data de submissão: 30/3/2010 Data de aceite: 11/10/2010

patológico e possível valor prognóstico representa um desafio para muitos pesquisadores<sup>(5-8)</sup>.

Foi descrita uma associação entre a mutação de K-ras<sup>(9,11)</sup>, p53<sup>(12,13)</sup> e p16<sup>(14-16)</sup> (os genes que apresentam mais mutação no câncer pancreático) e a sobrevida dos pacientes. Os genes supressores tumorais, tais como p53 e p16, desempenham um papel na regulação do ciclo celular e na progressão do tumor. O primeiro, localizado na 17p13, codifica uma proteína 53 KDa e 393 a.a., que se acumula na célula quando o gene sofre mutação, em razão da estabilização. Essa proteína estável é facilmente detectada por imunohistoquímica (IH)<sup>(17)</sup>. De maneira semelhante, o gene p16, localizado em 9p21, quando inativado pela deleção ou hipermetilação impede a regulação do ciclo celular, inibindo os complexos ciclina-cdk que regulam negativamente a proteína Rb1<sup>(16)</sup>. A proteína p16, de maneira semelhante à p53, é facilmente detectada por IH<sup>(18,19)</sup>. Essa detecção da expressão reflete a mutação ou alteração gênica em aproximadamente 85% das amostras<sup>(20)</sup>.

Além dos genes supressores, alguns outros marcadores foram usados para determinar a agressividade e a diferenciação do tumor<sup>(21,22)</sup>. Um marcador comumente usado é o Ki-67, que foi descoberto na Universidade de Kiev, Ucrânia. Essa proteína de 345-395 KDa é expressa em todo tecido em proliferação e em todas as fases celulares, exceto G0, devido a processos de fosforilação. Desde sua descoberta em 1979, tem sido amplamente usada para determinar os padrões de crescimento tumoral e a diferenciação celular. Isso possibilitou aos pesquisadores o uso desse marcador como um fator prognóstico em vez de apenas preditivo<sup>(21,23)</sup>.

## OBJETIVO

Determinar a expressão de p53, p16 e Ki-67 e sua relevância na sobrevida e diferenciação celular e comparar os resultados de imunocoloração isolada e combinada para cada marcador.

## MÉTODOS

### Pacientes e amostras

Foram estudados 15 casos de CP, sendo todos adenocarcinomas ductais da cabeça pancreática. Todos os pacientes foram atendidos e operados na Disciplina de Gastroenterologia Cirúrgica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-EPM), entre 1993 e 2003. A amostra consistiu de 45 blocos fixados rotineiramente em formalina neutral e embebidos em parafina contendo estritamente tecido tumoral, sendo três de cada paciente. Havia 11 homens (73,33%) e 4 mulheres (26,66%), com idade mediana de 56 anos (variação de 45 a 66 anos). De acordo com a União Internacional de Controle do Câncer (UICC, do

inglês *Union for International Cancer Control*), 40% (6 pacientes) tinham estágio IIB, 33,33% (5 pacientes) tinham estágio IIA e 13,33% (2 pacientes) tinham estágios IB e III cada um. Os tumores foram ranqueados, sendo 6 bem diferenciados e 9 moderadamente diferenciados. Até o final da pesquisa, 2 pacientes ainda estavam vivos com 34 e 119 meses de sobrevida cada um.

### Anticorpos e coloração imunohistoquímica

Os anticorpos primários foram: anti-p53 DO-7 (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) contra p53 humana, anti-p16 clone Ab7 16PO7 (Neomarkers, Fremont, CA, EUA) contra p16 e anti-Ki67 clone MIB-1 (Immunotech, Marselha, França) contra o antígeno Ki-67. A HI foi realizada de acordo com Hsu et al.<sup>(24)</sup>. Resumidamente, cortes com espessura de 4 µm foram desparafinados e incubados com anticorpos primários contra proteínas humanas e o antígeno diluído para 1:20 no caso da p53, 1:100 para p16 e 1:80 para Ki-67, a 4°C, de um dia para outro. O procedimento de irradiação por micro-ondas foi aplicado para a recuperação do antígeno. A imunolocalização foi realizada com o uso do kit Streptavidin Biotin Complex IHRP; Duet, Mouse/Rabbit (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). A cor das reações foi desenvolvida com o uso de 3-3'diaminobenzidina (DAB) (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e a contracoloração, com hematoxilina de Harris. Nos controles positivos foram incluídos cortes de adenocarcinoma do colon para p53, cortes de câncer cervical para p16 e cortes de olidendroglioma para Ki-67. Nos controles negativos foram incluídos cortes de tecido pancreático normal. A coloração positiva incluiu a coloração nuclear e citoplasmática para p53 de mais de 10% das células-alvo; para p16, mais de 5% e quaisquer núcleos imunocorados, independentemente da intensidade, para Ki-67 e expresso para o índice proliferativo (IP).

### Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o teste exato de Fisher ( $\chi^2$ ) para comparar as proporções de coloração isolada e combinada. Foi usado um ponto de corte na imunocoloração para p16 e Ki-67 de 25 e 15% das células coradas, respectivamente. As estimativas da sobrevida global foram obtidas de acordo com o método atuarial de Kaplan-Meier<sup>(25)</sup>. As curvas de sobrevida abaixo e acima do ponto de corte escolhido foram apresentadas mensalmente em gráficos e comparadas por *log-rank*. Finalmente, para determinar a significância do fator de risco, utilizou-se a análise univariada proporcional de Cox<sup>(26)</sup>. Os testes estatísticos foram pareados e determinou-se um valor de  $p > 0,05$ . Foi utilizado o *software* estatístico SAS versão 8.02 (SAS Institute, Cary, NC, EUA).

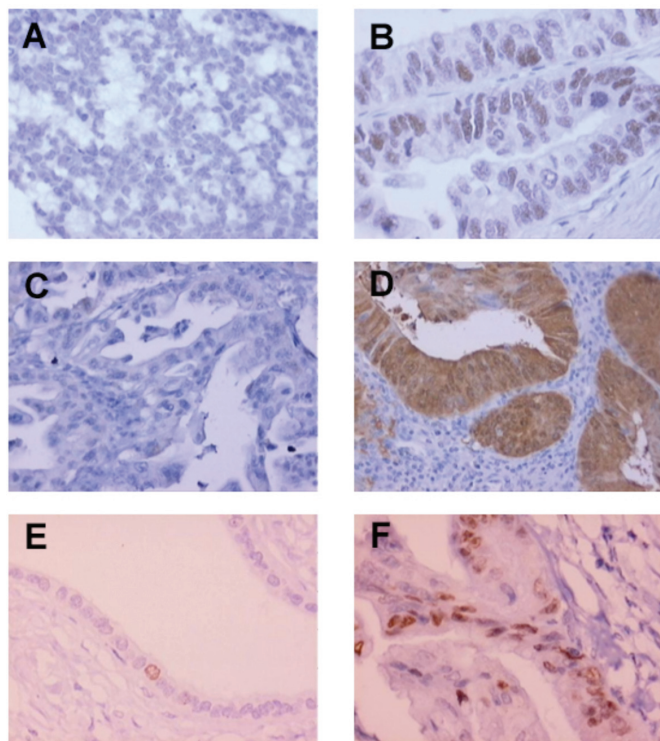
## RESULTADOS

Os resultados totais da imunocoloração de proteínas estão resumidos na tabela 1 e exemplos típicos dos grupos positivos e negativos para p53 e p16 são mostrados na figura 1.

**Tabela 1.** Imunocoloração geral

Marcador	n	%
p53	14	93,33
p16	14	93,33
Ki-67	13	86,66 (IP 11,91 ± 9,47)

IP: índice proliferativo.



**Figura 1.** Fotomicrografias representativas de imunocoloração. (A) coloração negativa para DO-7; (B) coloração positiva para DO-7, 400x; (C) coloração negativa para Ab7 16P07; (D) coloração positiva para Ab7 16P07, 200x; (E) coloração negativa para MIB-1; (F) coloração positiva for MIB-1, 400x.

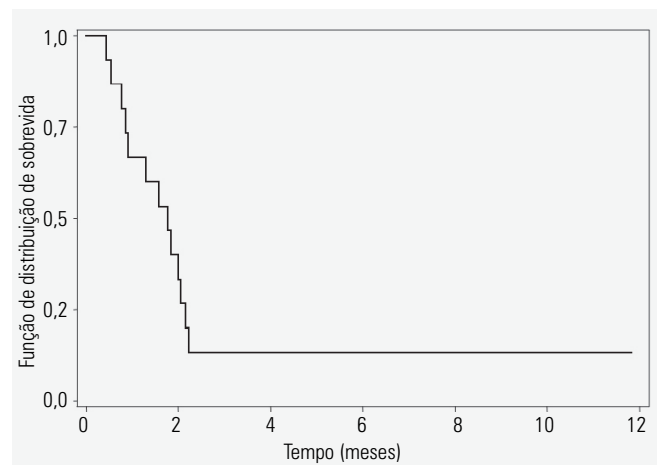
De acordo com a classificação TNM e ponto de corte, os dados de expressão são mostrados na tabela 2.

**Tabela 2.** Imunocoloração e estágio TNM

Estágio	Total (%)	p53ç	p16		Ki-67	
			< 25%	> 25%	< 15%	> 15%
IB	2 (13,3)	2	1	1	2	0
IIA	5 (33,3)	5	1	4	2	3
IIB	6 (40,0)	5	2	3	2	2
III	2 (13,3)	2	2	0	1	1
Total	15 (100)	14 (93,3)	6 (42,9)	8 (57,1)	7 (53,8)	6 (46,2)

A associação da imunocoloração de p53 com mortalidade não mostrou significância ( $p = 0,667$ ), mesmo considerando-se coloração com diferenciação celular.

Achados semelhantes foram obtidos comparando-se p16 ( $p \geq 0,05$ ) e Ki-67 ( $p > 0,05$ ). A mediana da sobrevida global foi de 17,71 meses (IC95%: 9,07-20,47) (Figura 2). A sobrevida dos pacientes positivos para p53 foi de 15,7 meses. Usando-se o valor do ponto de corte, a sobrevida dos pacientes com expressão de p16 em mais de 25% das células foi de 14,34 (IC95%: 5,39-18,46) em comparação com a expressão abaixo de 25%, que foi de 20,75 (IC95%: 9,07-24,45), *log rank*  $p = 0,088$  e *Hazard Ratio* (HR) 2,821 (IC95%: 0,817-9,740) (Tabela 3).



**Figura 2.** Sobrevida geral.

**Tabela 3.** Imunocoloração e sobrevida usando-se o ponto de corte

Marcador	Sobrevida (meses)	Valor p <i>log rank</i>	Hazard <i>Ratio</i> (HR)
p53	15,7 (4-34)	NS	–
p16 > 25%	14,34 (IC95%: 5,39-18,46)	$p = 0,088$	2,821 (IC95%: 0,817-9,740)
p16 < 25%	20,75 (IC95%: 9,07-24,45)		
Ki-67 > 15%	17,46 (IC95%: 5,39-27,56)	$p = 0,1955$	0,419 (IC95%: 0,108-1,618)
Ki-67 < 15%	17,71 (IC95%: 9,07-19,94)		

NS: não significante.

Os pacientes com coloração para MIB-1 em mais de 15% das células apresentaram sobrevida de 17,46 meses (IC95%: 5,39-27,56) em comparação com aqueles com menos de 15% que sobreviveram 17,71 meses (IC95%: 9,07-19,94), *log rank*  $p = 1,955$  e HR 0,419 (IC95%: 0,108-1,618) (Tabela 3).

Finalmente, foram calculadas as associações das imunoexpressões, mostrando que 53% dos pacientes compartilhavam p53 e p16 (> 25%); 33,3% dos pacientes apresentavam p53 e Ki-67 (> 15%), 26,7% apresentando associação de p16 (> 25%) e Ki-67 (> 15%), e aqueles que acumulavam a expressão de p53, p16 (> 25%) e Ki-67 (> 15%) totalizaram 26,7%. Nenhuma das expressões combinadas parece estar relacionada à sobrevida ( $p \geq 0,05$ ).



## DISCUSSÃO

A identificação de genes mutados no CP aumentou a compreensão sobre essa doença. Na literatura mais antiga, os pesquisadores aceitavam que o conteúdo de DNA nas células tumorais pudesse influenciar no prognóstico. Entretanto, observou-se pouco efeito na prática clínica; na maior parte do tempo, porque algumas mutações eram relativamente específicas e raras, e a tecnologia envolvida na detecção e identificação dessas alterações era cara e nem sempre disponível. A carcinogênese pelo CP é um processo de múltiplas etapas e certamente seria mais bem compreendido se estudássemos mais de um gene ou marcador envolvido de cada vez. A possibilidade de detecção imunohistoquímica das expressões proteicas é uma ferramenta importante na pesquisa genética. Isso é especialmente considerado no gene p53, uma vez que a mutação ou alteração em sua função confere estabilidade e aumenta a meia-vida da proteína nuclear. De maneira semelhante, a expressão de p16 seria facilmente determinada por IH<sup>(19,27-29)</sup>. Desde a sua primeira descrição, a proteína Ki-67 tem sido empregada para medir precisamente a proliferação da fração celular, que seria um marcador da diferenciação celular. Isso criaria vários usos possíveis como um excelente marcador para prognóstico e não apenas para previsão<sup>(23)</sup>.

Neste estudo, todas as amostras tiveram reação positiva para DO-7 em mais de 50% das células, exceto o paciente 14, que foi negativo e o único que sobreviveu mais de 5 anos (119 meses). Noventa e três por cento das amostras foram positivas para Ab7 16PO7. Essas proporções não foram significativas e os resultados influenciaram a tomada de decisão para a criação de grupos usando-se um ponto de corte de expressões positivas. Duas publicações mostram achados interessantes. Uma delas publicou a falta de expressão da p16 relacionada à melhor sobrevida<sup>(14)</sup> e a outra revelou que a mutação da p16 estava relacionada a taxas de sobrevida nitidamente maiores<sup>(16)</sup>. O IP foi bastante heterogêneo (11,91 ± 9,47) e não significativo. Alguns autores<sup>(16,30)</sup> publicaram resultados semelhantes em pacientes com CP e outros tumores gastrintestinais em razão da expressão heterogênea de Ki-67. Por outro lado, isso não foi observado em alguns tumores neurológicos, nos quais o IP seria facilmente utilizado como preditor e também como fator prognóstico<sup>(23,31)</sup>.

A correlação entre a classificação TNM e a expressão proteica também foi descrita<sup>(32,33)</sup>, mas essa associação não foi suficientemente clara e requer mais estudos. Nosso grupo não foi capaz de encontrar essa associação, assim como com um valor de  $p > 0,05$ . Neste estudo, usando-se o método de Kaplan-Meier, as estimativas de sobrevida global foram realizadas em amostras com

expressões abaixo e acima do ponto de corte. Embora não tenha sido possível usar um ponto de corte das expressões da p53, foram realizadas observações interessantes nos grupos da p16. A sobrevida dos pacientes com expressões focalmente positivas para Ab7 16PO7 ( $< 25\%$ ) foi melhor do que aquela com expressões positivas difusas ( $> 25\%$ ). Em primeiro lugar, não foi possível encontrar uma diferença estatisticamente significativa entre esses grupos e os grupos Ki-67/IP; além disso, é possível que esses achados tenham refletido o pequeno número de indivíduos estudados.

Há diversos trabalhos que analisam as mutações genéticas e expressões alteradas de vários genes como responsáveis pelas diferenças na sobrevida<sup>(10,21)</sup>. Entretanto, como em nosso estudo, os resultados negativos estão relacionados à pequena amostra de pacientes<sup>(10,16)</sup>. Esse viés poderia explicar nossos achados sobre a associação das expressões e a falta de diferenças na sobrevida.

## CONCLUSÃO

Neste estudo, a superexpressão das proteínas p53, p16 e Ki-67 não estava relacionada à sobrevida ou ao grau tumoral quando se compararam as expressões isoladas ou combinadas.

De modo geral, estes resultados nos estimulam a criar um grupo de cooperação para estudar não apenas essas mutações, mas também um conjunto delas em uma série expressiva, por meio de outras tecnologias específicas, como microarranjos e sequenciamento genético.

## REFERÊNCIAS

1. Ahlgren JD. Epidemiology and risk factors in pancreatic cancer. *Semin Oncol*. 1996;23(2):241-50.
2. Sarmiento JM, Nagomey DM, Sarr MG, Farnell MB. Periampullary cancers: are there differences? *Surg Clin North Am*. 2001;81(3):543-55.
3. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin*. 2001;51(1):15-36. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2001;51(2):144.
4. Rivera JA, Fernández-del Castillo C, Warshaw AL. The preoperative staging of pancreatic adenocarcinoma. *Adv Surg*. 1997;30:97-122.
5. Yokota J, Sugimura T. Multiple Steps in Carcinogenesis Involving Alterations of Multiple Tumor Suppressor Genes. *FASEB J*. 1993;7(10):920-5.
6. Seymour AB, Hruban RH, Redston M, Caldas C, Powell SM, Kinzler KW, et al. Allelotype of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1994;54(10):2761-4.
7. Ueki T, Toyota M, Sohn T, Yeo CJ, Issa JPJ, Hruban RH, et al. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2000;60(7):1835-9.
8. Yeo TP, Hruban RH, Leach SD, Wilentz RE, Sohn TA, Kern SE, et al. Pancreatic cancer. *Curr Probl Cancer*. 2002;26(4):176-275.
9. Rall CJ, Yan YX, Graeme-Cook F, Beauchamp R, Yamdel DW, Pivoski SP, et al. Ki-ras and p53 mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas*. 1996;12(1):10-7.

10. Dergham ST, Dugan MC, Kucway R, Du W, Kamarauskiene DS, Vaitkevicius VK, et al. Prevalence and clinical significance of combined K-ras mutation and p53 aberration in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol.* 1997;21(2):127-43.
11. Esteller M, González S, Risques RA, Marcuello E, Mangues R, Germà Ret al. K-ras and p16 Aberrations Confer Poor Prognosis in Human Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2001;19(2):299-304.
12. Redston MS, Caldas C, Seymour AB, Hruban RH, da Costa L, Yeo CJ, et al. p53 Mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res.* 1994;54(11):3025-33.
13. Havrilesky LJ, Alvarez AA, Whitaker RS, Marks JR, Berchuck A. Loss of expression of the p16 tumor suppressor gene is more frequent in advanced ovarian cancer lacking p53 mutations. *Gynecol Oncol.* 2001;83(3):491-500.
14. Hu YX, Watanabe H, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Ha A, Okai T, et al. Frequent loss of p16 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 1997;3(9):1473-7.
15. Biankin AV, Biankin SA, Kench JG, Morey AL, Lee CS, Head DR, et al. Aberrant p16(INK4A) and DPC4/Smad4 expression in intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas is associated with invasive ductal adenocarcinoma. *Gut.* 2002;50(6):861-8.
16. Gerdes B, Ramaswamy A, Ziegler A, Lang SA, Kersting M, Bartsch DK, et al. p16INK4a is a prognostic marker in resected ductal pancreatic cancer: an analysis of p16INK4a, p53, MDM2, and Rb. *Ann Surg.* 2002;235(1):51-9.
17. Levine AJ. p53, the cellular gate-keeper for growth and division. *Cell.* 1997;88(3):323-31.
18. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol.* 1991;138(4):867-73.
19. Lebe B, Sa ol O, Ulukus C, Coker A, Karademir S, Astarcioglu H, et al. The importance of cyclin D1 and Ki67 expression on the biological behavior of pancreatic adenocarcinomas. *Pathol Res Pract.* 2004;200(5):389-96.
20. Kaino M. Alterations in the tumor suppressor genes p53, RB, p16/MTS1, and p15/MTS2 in human pancreatic cancer and hepatoma cell lines. *J Gastroenterol.* 1997;32(1):40-6.
21. Balcom JH 4th, Keck T, Warshaw AL, Antoniu B, Graeme-Cook F, Fernández-del Castillo C. Telomerase activity in periampullary tumors correlates with aggressive malignancy. *Ann Surg.* 2001;234(3):344-51.
22. Hiyama E, Kodama T, Shinbara K, Iwao T, Itoh M, Hiyama K, et al. Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors. *Cancer Res.* 1997;57(2):326-31.
23. Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology.* 2002;40(1):2-11.
24. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981;29(4):577-80.
25. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observation. *J Am Stat Assoc.* 1958;53(282):457-81.
26. Cox DR. Regression models and life tables. *J Roy Stat Soc.* 1972;34:187-220.
27. Guan RJ, Fu Y, Holt PR, Pardee AB. Association of K-ras mutations with p16 methylation in human colon cancer. *Gastroenterology.* 1999;116(5):1063-71.
28. Savitskaia N, Lumma A, Eilert C, Naumann M, Schmiegel W. Genetic alterations in cell-cycle inhibitors p16/MTS1 and p15/MTS2 and growth control in pancreatic tumors. *Gastroenterology.* 1996;110:A428.
29. Al-Aynati MM, Radulovich N, Ho J, Tsao MS. Overexpression of G1-S cyclins and cyclin-dependent kinases during multistage human pancreatic duct cell carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 2004;10(19):6598-605.
30. Forones NM, Carvalho AP, Gianotti-Filho O, Lourenço LG, Oshima CTF. Cell Proliferation and Apoptosis in Gastric Cancer and Intestinal Metaplasia. *Arq Gastroenterol* 2005;42(1):30-4.
31. Kyzer S, Gordon PH. Determination of proliferative activity in colorectal carcinoma using monoclonal antibody Ki67. *Dis Colon Rectum.* 1997;40(3):322-5.
32. Sagol O, Yavuzsen T, Oztop I, Ulukus C, Yilmaz U, Alakavuklar M, et al. The effect of apoptotic activity, survivin, Ki-67, and P-glycoprotein expression on prognosis in pancreatic carcinoma. *Pancreas.* 2005;30(4):343-8.
33. Ruggeri BA, Huang L, Berger D, Chang H, Klein-Szanto AJ, Goodrow T, et al. Molecular Pathology of Primary and Metastatic Ductal Pancreatic Lesions: Analyses of Mutations and Expression of the p53, mdm-2, and p21/WAF-1 genes in Sporadic and Familial Lesions. *Cancer.* 1997;79(4):700-16.