

Larissa Comparini da Silva Nascimento

Departamento de Patologia, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo

Paolo Ruggero Errante

Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo, Brasil

Artigo recebido em agosto de 2016 e

aprovado em setembro de 2016.

IMUNOEXPRESSION DE KI-67 NO ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

RESUMO

Introdução: O câncer gástrico é um dos tumores malignos mais comuns e a segunda causa de morte associada ao câncer no mundo. **Objetivo:** Avaliar a imunopressão de Ki-67 em adenocarcinomas gástricos. **Metodologia:** Arranjo tecidual de matriz foi construído a partir de blocos parafinados utilizando amostras teciduais de adenocarcinoma gástrico e mucosa gástrica adjacente não tumoral de 87 pacientes. Imuno-histoquímica foi utilizada para avaliar a expressão de Ki-67. Estes resultados foram correlacionados com os parâmetros clínicos e histológicos dos pacientes. **Resultados:** Foi observada uma maior frequência de carcinomas gástricos em homens com idade superior a 51 anos de idade, e linfonodos comprometidos por células tumorais em 72.4% dos casos. O carcinoma gástrico do tipo intestinal foi mais frequente em homens, com localização no antro. Foi verificada uma associação entre a expressão de Ki-67 com tumores menores que 3 cm ($p=0.048$). **Conclusão:** Foi observada uma maior frequência de carcinomas gástricos do tipo intestinal com localização no antro em homens, maior número de linfonodos comprometidos por células tumorais e associação entre a expressão de Ki-67 com o menor tamanho do tumor, indicando seu potencial agressivo.

Palavras-Chave: Câncer; Apoptose; Imuno-Histoquímica; Adenocarcinoma Gástrico.

IMMUNOEXPRESSION OF KI67 IN GASTRIC ADENOCARCINOMA

ABSTRACT

Gastric cancer is one of the most common malignant tumors and the second leading cause of cancer-related deaths in world. **Objective:** To analyze the immunoppression of Ki-67 in gastric adenocarcinoma. **Methods:** A tissue microarray paraffin block was constructed using gastric adenocarcinoma tissue and adjacent normal adjacent mucosa from 87. Immunohistochemistry was used to evaluate the levels of Ki-67. These results are associated with clinical and histological parameters. **Results:** An increase frequency of gastric cancer in men over the age of 51 years old, and lymph nodes compromised by tumor cells in 72.4% of cases was observed. Gastric carcinoma of intestinal type was more common in men, localize in antrum. Association was found between the expression of Ki-67 with tumors smaller than 3 cm ($p = 0.048$). **Conclusion:** We observe a higher frequency of intestinal type gastric carcinomas with localization in the antrum in men, higher number of lymph nodes compromised by tumor cells and association with Ki-67 and smaller tumor size, indicating its malignant potential.

Keywords: Cancer; Apoptosis; Immuno-Histochemical; Gastric Adenocarcinoma.

Revista UNILUS Ensino e Pesquisa

Rua Dr. Armando de Salles Oliveira, 150

Boqueirão, Santos - São Paulo

11050-071

<http://revista.lusiada.br/portal/index.php/ruep>

revista.unilus@lusiada.br

Fone: +55 (13) 3202-4100

INTRODUÇÃO

O carcinoma gástrico é a segunda maior causa de óbitos relacionados ao câncer no mundo, com prevalência na Ásia, leste Europeu e América Latina ^{1,2}, onde a sobrevivência em 5 anos é de 30% nos países desenvolvidos e de 20% nos países em desenvolvimento ³.

O carcinoma gástrico pode ser classificado em adenocarcinoma do tipo intestinal e do tipo difuso. O adenocarcinoma do tipo intestinal é acompanhado de formação papilar ou componente sólido ⁴ e o do tipo difuso é constituído por células em anel de sinete ⁵.

Um das formas de se avaliar a proliferação celular é através da expressão de Ki-67, um fator de mau prognóstico em tumores malignos ⁶. O antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear utilizada como marcador da proliferação celular, presente em células que estão em divisão celular (fases G1, S, G2 e M do ciclo celular), mas ausente em células em repouso (G0) ⁷.

Tumores que apresentam menos de 10% de células positivas têm um baixo índice proliferativo; entre 10 e 25%, um moderado índice proliferativo; e mais de 25% de células positivas, um alto índice proliferativo ⁸. Em contraste com muitas outras proteínas associadas ao ciclo celular o antígeno Ki-67 está ausente em células quiescentes e não é detectável durante processos de reparo de DNA ⁹.

Avaliamos por imuno-histoquímica a expressão de Ki-67 em tecidos de adenocarcinoma gástrico em arranjo tecidual em matriz. Estes parâmetros foram correlacionados com as variáveis clínicas e morfológicas do tumor e dos pacientes.

METODOLOGIA

Pacientes

Foram preparadas lâminas de arranjo tecidual em matriz (ATM) a partir de 87 amostras teciduais em blocos de parafina obtidos do Departamento de Patologia da UNIFESP/EPM de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico atendidos no ambulatório de Gastro-Oncologia, da Disciplina de Gastroenterologia da UNIFESP/EPM, no período de janeiro/2000 a maio/2005. Como controle foram avaliadas 87 amostras de mucosas gástricas morfológicamente normais, provenientes da margem adjacente dos adenocarcinomas dos mesmos pacientes. Os dados clínicos, linfonodos comprometidos, margem cirúrgica, tipo de cirurgia, tamanho do tumor, localização do tumor, classificação do tumor e data do óbito foram obtidos a partir da consulta dos prontuários médicos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP-EPM.

Construção do Arranjo Tecidual em Matriz (ATM)

Blocos com material embebido em parafina foram cortados e corados por hematoxilina e eosina (H/E) para a seleção da área representativa do tumor. Os blocos foram puncionados e removidos fragmentos com 1.0 mm de diâmetro para a confecção de dois blocos receptores. No primeiro foram incluídos 49 cilindros (adenocarcinoma gástrico + mucosa normal) e no segundo bloco foram incluídos 38 cilindros (adenocarcinoma gástrico + mucosa normal). Os blocos foram colocados na estufa a 35°C por 15 minutos para permitir a aderência entre a parafina do bloco e os cilindros. Após a aderência os blocos receptores foram retirados da estufa e cortados com espessura de 4 micrometros. Para manter a aderência, a lâmina foi submetida à luz ultravioleta por 15 minutos, depois colocadas em solução solvente TPC por 15 minutos e as lâminas estocadas em freezer.

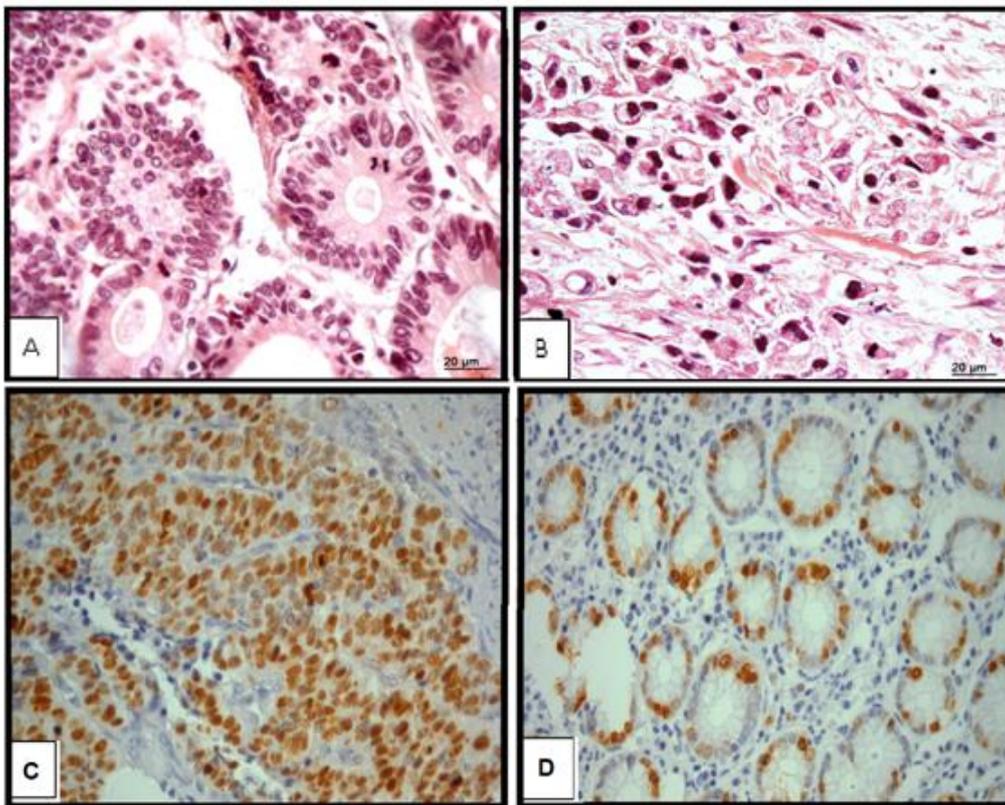
Imuno-histoquímica

Para a imuno-histoquímica foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. O anticorpo primário específico se liga ao antígeno no tecido tumoral, e o anticorpo conjugado à biotina liga-se especificamente ao anticorpo primário. O complexo peroxidase conjugado à biotina associada à estreptavidina é ligado pelo agente cromogênico que leva a formação de um precipitado marrom na região correspondente ao antígeno. Foi utilizado o anticorpo primário anti-Ki-67 (anticorpo anti-Ki-67, diluição 1:100, Dako) (Figura 1). A positividade da reação foi considerada na presença de cor marrom-acastanhada na área nuclear para Ki-67 através do número total de células coradas positivas por 200

células analisadas, sendo considerado positivo quando presentes no mínimo 10% de células marcadas. Foram utilizados como controle positivo lâminas contendo cortes histológicos de adenocarcinomas de cólon com marcação nuclear para Ki-67. Como controle negativo foi omitindo o anticorpo primário, substituído por solução salina tamponada (PBS).

Figura 1. Imuno-histoquímica.

Fotomicrografia de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal (A) e do tipo difuso (B) corado pela hematoxilina-eosina (H/E). Imuno-histoquímica de Ki-67 em adenocarcinoma gástrico (C); Ki-67 em mucosa gástrica não tumoral (D). Aumento de 400x.



Análise estatística

As comparações entre o tecido tumoral e mucosa gástrica não tumoral, número de células positivas e negativas para as variáveis quantitativas foram realizadas pelo teste T-Student. A associação entre os achados imuno-histoquímicos para Ki-67 no tecido tumoral e de mucosa gástrica não tumoral foi avaliada pela correlação de Pearson. Os achados imuno-histoquímicos foram associados às variáveis clínicas dos pacientes e morfológicas do tumor pela Análise de Variância (ANOVA). A curva de sobrevida e os achados imuno-histoquímicos foram calculados pelo método de Kaplan-Meier. As diferenças foram consideradas positivas quando $p < 0.05$.

RESULTADOS

Verificamos que as amostras teciduais de adenocarcinoma gástrico foram provenientes de 51 pacientes do sexo masculino e 36 do sexo feminino. Em 78.1% dos pacientes a idade de diagnóstico foi superior a 50 anos. Margem cirúrgica comprometida por células tumorais foi encontrada em 10.3% das amostras, e linfonodos infiltrados por células tumorais em 72.4% dos casos.

Em relação ao tipo histológico, o adenocarcinoma do tipo intestinal foi mais freqüente entre os homens com idade entre 50 e 69 anos, e o tipo difuso em mulheres entre 40 e 49 anos. Adenocarcinoma do tipo intestinal foi

observado em 67.8% dos casos, e deles apresentaram localização na região do antro. Houve predomínio de tumores com tamanho maior que 3 centímetros em 75.9% dos casos (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis morfológicas do adenocarcinoma gástrico e tempo de seguimento dos pacientes.

Parâmetros Morfológicos		n (%)
Adenocarcinoma gástrico	Intestinal	59 (67.8%)
	Difuso	28 (32.2%)
Localização	Cárdia	29 (33.3%)
	Antro	38 (43.7%)
	Corpo	20 (23%)
Tamanho	≤3 cm	21 (24.1%)
	>3 cm	66 (75.9%)
Tempo de Seguimento		n (%)
0,1 – 6 meses		21 (26.9%)
6,1 – 12 meses		10 (12.8 %)
12,1 – 24 meses		22 (28.2%)
24,1 – 48 meses		12 (15.4%)
> 48 meses		13 (16.7%)

n=número de casos.

A Tabela 2 apresenta a marcação imuno-histoquímica para Ki-67 nas amostras teciduais de adenocarcinoma gástrico. Foi verificado que 72.4% das amostras foram positivas para Ki-67.

Tabela 2. Frequência de expressão de Ki-67 em amostras teciduais de adenocarcinoma gástrico e mucosa gástrica não tumoral.

	n	Negativo n (%)	Positivo n (%)
Adenocarcinoma gástrico			
Ki-67	87	24 (27.6%)	63 (72.4%)

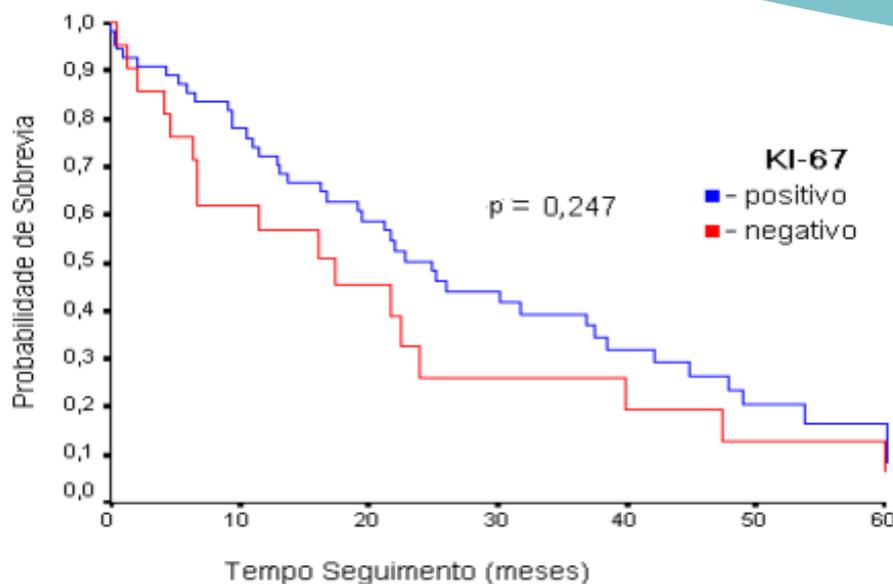
A Tabela 3 apresenta a expressão de Ki-67 nas amostras teciduais de adenocarcinoma gástrico e de mucosa gástrica não tumoral associada aos dados clínicos dos pacientes e morfológicos dos tumores. Tumores com tamanho menor que 3 cm apresentaram maiores contagens de células Ki-67 positivas.

Tabela 3. Expressão de Ki-67 em amostras teciduais de adenocarcinomas gástrico associada aos dados clínicos dos pacientes e morfológicos do tumor.

	Média (dp)	n	p
Sexo			
Masculino	73.0 (57.64)	51	0.155
Feminino	52.3 (42.39)	36	
Estágio clínico			
I	75.0 (61.08)	13	0.787
II	63.8 (47.76)	15	
III	60.7 (51.46)	58	
IV		1	
Adenocarcinoma			
Difuso	55.6 (57.76)	28	0.368
Intestinal	68.7 (49.96)	59	
Localização			
Cárdia	62.5 (50.05)	29	0.526
Antro	62.6 (51.88)	38	
Corpo	70.9 (59.51)	20	
Tamanho do Tumor			
>3 cm	59.0 (47.11)	21	0.048*
<3 cm	81.7 (65.41)	66	
Cirurgia			
Total	68.2 (56.01)	40	0.483
Parcial	61.3 (49.95)	47	
Margem Cirúrgica			
Livre	65.0 (53.64)	78	0.887
Comprometida	59.6 (45.11)	9	
Linfonodos			
Livre	63.2 (53.77)	63	0.969
Comprometidos	67.7 (50.42)	24	

A figura 2 apresenta a curva de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes com adenocarcinoma gástrico, onde não foi verificada nenhuma associação entre a sobrevida dos pacientes e a expressão de Ki-67.

Figura 2. Sobrevida de pacientes com adenocarcinoma gástrico em relação a marcação imuno-histoquímica para Ki-67.



DISCUSSÃO

Neste estudo foi observada uma maior frequência de carcinomas gástricos em homens com idade superior a 51 anos de idade e linfonodos comprometidos por células tumorais em 72,4% dos casos. O adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal foi mais comum em homens, localizados principalmente no antro, sendo verificada uma associação entre a expressão de Ki-67 com o tamanho do tumor.

As lâminas de ATM de adenocarcinoma gástrico foram mais comuns em pacientes do sexo masculino, com idade média de acometimento de 62 anos, idade correspondente ao descrito pela literatura ¹. Foi verificado que 46% dos pacientes foram submetidos a gastrectomia total, 54% a gastrectomia parcial e 90% apresentaram margem livre de células tumorais. Setenta e cinco por cento (75%) dos pacientes apresentaram linfonodos comprometidos, valor reportado em pacientes com linfonodos comprometidos por células tumorais e que sofreram gastrectomia total ¹⁰.

Oitenta e cinco por cento (85%) apresentaram estágio clínico avançado, e no final do estudo três quartos dos pacientes morreu pela evolução da doença. A presença de metástase linfonodal diminui significativamente a sobrevida após 5 anos de acompanhamento ¹¹.

Verificamos em nosso estudo um predomínio de adenocarcinomas gástricos do tipo intestinal. Uma maior frequência de carcinomas gástricos do tipo intestinal em homens é reportado em estudos realizados no Brasil ^{12,13,14}, Espanha ¹⁵, Chile ¹⁶, EUA ¹⁷, Japão, Hong Kong e Cingapura ¹⁸, Reino Unido, França e Coréia ¹⁹.

Um das formas de se avaliar a proliferação celular por imuno-histoquímica é através da expressão de Ki-67, um fator de mau prognóstico para tumores malignos ²⁰. Em nosso estudo, Ki-67 foi expressa em 72,4% dos casos de adenocarcinoma gástrico, e tumores menores que 3 centímetros apresentaram um maior número de células Ki-67 positivas. Em relação a curva Kaplan-Meier, a expressão aumentada de Ki-67 não esteve associada com menor tempo de sobrevida.

A literatura não reporta uma associação entre o tamanho tumoral e expressão de Ki-67, como descrito em nosso estudo, mas apenas sua associação com outros marcadores tumorais como p53 ^{21,22}. O aumento da expressão de Ki-67 está correlacionado com o grau de diferenciação tumoral ²³, estágio clínico ²⁴, comprometimento linfonodal ²⁵ e metástase a distância ²⁶ e, isoladamente é considerado um mau fator prognóstico ²⁷. O aumento da expressão de Ki-67 pode ser considerado um potencial indicador de heterogeneidade intratumoral em carcinomas gástricos ²⁸, ou para o tratamento adjuvante com imatinib mesilato ²⁹.

CONCLUSÃO

Foi observada uma maior frequência de carcinomas gástricos do tipo intestinal na região do antro em homens, maior número de linfonodos comprometidos por células tumorais e uma associação entre a expressão de Ki-67 com o menor tamanho do tumor, indicando seu potencial agressivo.

REFERÊNCIAS

1. Corral JE, Delgado hurtado JJ, Dominguez RL, Valdez de Cuellar M, Balmore Cruz C, Morgan DR. The descriptive epidemiology of gastric cancer in Central America and comparison with United States Hispanic populations. *J Gastrointest Cancer.*, v. 46, n. 1, p. 21-28, 2015.
2. Wu CY, Lin JT. The changing epidemiology of Asian digestive cancers: from etiologies and incidences to preventive strategies. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.*, v. 29, n. 6, p. 843-853, 2015.
3. Ryun Park S. Management of gastric cancer: East vs West. *Curr Probl Cancer.*, v. 39, n. 6, p. 315-341, 2015.
4. Susman S, Barnoud R, Bibeau F, Borini F, Pocard M, Tomuleasa C, Sabourin JC. The Lauren classification highlights the role of epithelial to mesenchymal transition in gastric carcinogenesis: an immunohistochemistry study of the STAT3 and adhesion molecules expression. *J Gastrointestin Liver Dis.*, v. 24, n. 1, p. 77-83, 2015.
5. Aditi R, Aarathi R, Pradeep R, Hemalatha L, Akshatta C, Amar K. HER2 expression in gastric adenocarcinoma. A study in a tertiary care center in South India. *Indian J Surg Oncol.*, v. 7, n. 1, p. 18-24, 2016.
6. Huang G, Chen S, Wang D, Lin L, Chen S, Wang L, Huang Q. High Ki-67 expression has prognostic value in surgically-resected T3 gastric adenocarcinoma. *Clin Lab.*, v. 62, n. 1-2, p. 141-153, 2016.
7. Purba TS, Brunken L, Hawkshaw NJ, Peake M, Hardman J, Paus R. A primer for studying cell cycle dynamics of the human hair follicle. *Exp Dermatol.*, 2016 Apr 20. doi: 10.1111/exd.13046. [Epub ahead of print].
8. Pezzilli R, Partelli S, Cannizzaro R, Pagano N, Crippa S, Pagnanelli M, Falconi M. Ki-67 prognostic and therapeutic decision driven marker for pancreatic neuroendocrine neoplasms (PNEs): a systematic review. *Adv Med Sci.*, v. 61, n. 1, p. 147-153, 2016.
9. Li T, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki-67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep.*, v. 11, n. 3, p. 1566-1572, 2015.
10. Ma J, Shen H, Kapesa L, Zeng S. Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer. *Oncol Lett.*, v. 11, n. 5, p. 2959-2964, 2016.
11. Lazar D, Taban S, Sporea I, Dema A, Comianu M, Lazar E, Goldis A, Vernic C. Gastric cancer: correlation between clinic pathological factors and survival of patients. *Rom J Morphol Embryol.*, v. 50, n. 2, p. 185-194, 2009.
12. Lemes LAO, Neunschwander LC, Matta LAC, Filho JO, Soares PCM, Cabral MMDA, Nogueira AMMF, Rodrigues MAG. Gastric carcinoma: analysis of 289 consecutive gastrectomy specimens in Belo Horizonte. Brazil. *J Bras Patol Med Lab.*, v.39, n. 1, 57-65, 2003.
13. Meine GC, Souza AR, Sommer JW, Franke LA, Tovo CV, Galperim B, Almeida PRL. Gastric cancer: experience of a general hospital. *Revista AMRIGS, Porto Alegre.* v. 48, n. 2, p. 86-89, 2004.
14. Arregi MMU, Ferrer DPC, Assis ECV, Paiva FDS, Sobral LBG, André NF, Silva TC. Perfil clínico epidemiológico das neoplasias de estômago atendidas no hospital do câncer do Instituto do Câncer do Ceará, no período de 2000-2004. *Rev Bras Cancerol.*, v. 55, n. 2, p. 121-128, 2009.
15. Aragonés N, Pérez-Gómez B, Pollán M, Ramis R, Vidal E, Lope E, García-Pérez J, Boldo E, López-Abente G. The striking geographical pattern of gastric cancer mortality in Spain: environmental hypotheses revisited. *BMC Cancer.* 2009; 9:316, doi: 10.1186/1471-2407-9-316.
16. Bertuccio P, Chatenoud L, Levi F, Praud D, Ferlay J, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia C. Recent patterns in gastric cancer: a global overview. *Int J Cancer.* v. 125, n. 3, p. 666-673, 2009.
17. Anderson WF, Camargo MC, Fraumeni JF Jr, Correa P, Rosenberg PS, Rabkin CS. Age-specific trends in incidence of noncardia gastric cancer in US adults. *JAMA.* v. 303, n.17, p. 1723-1728, 2010.
18. Tanaka M, Ma E, Tanaka H, Ioka A, Nakahara T, Takahashi H. Trends of stomach cancer mortality in Eastern Asia in 1950-2004: comparative study of Japan, Hong Kong and Singapore using age, period and cohort analysis. *Int J Cancer.* v. 130, n. 4, p. 930-936, 2012.

19. Matsuda A, Machii R. Trends in stomach cancer mortality rates in Japan, USA, UK, France and Korea based on the WHO mortality database. *Jpn J Clin Oncol.*, v. 42, n. 2, p. 154, 2012. doi: 10.1093/jjco/hys004.
20. Pathamanathan N, Balleine RL. Ki-67 and proliferation in breast cancer. *J Clin Pathol.*, v. 66, n. 6, p. 512-516, 2013.
21. Silva-Filho A, Bruno BN, Silva LB, Traiman P, Silva JGC, Triginelli LB. Association between p53 and Ki-67 expression and clinicopathologic features in patients with carcinoma of the cervix. *Rev Bras Ginecol Obstet.*, v. 27, n. 5, p. 243-247, 2005.
22. Motta RR, Zettler CG, Cambuzzi E, Jotz GP, Berni RB. Valor prognóstico da correlação do Ki-67 e p53 em carcinomas epidermóides da cavidade oral e língua. *Braz J Otorhinolaryngol.*, v. 75, n. 4, p. 544-549, 2009.
23. Alrashidy M, Atef A, Baky TA. Immunohistochemical differentiation between urothelial papillomas and papillary neoplasms of low malignant potential of the urinary bladder. *Asian Pac J Cancer Prev.*, v. 17, n. 4, p. 1769-1772, 2016.
24. Lee HE, Mounajjed T, Erickson LA, WU TT. Sporadic gastric well-differentiated neuroendocrine tumors have a higher Ki-67 proliferative index. *Endocr Pathol.*, v. 27, n. 3, p. 259-267, 2016.
25. Yang L, Zhu J, Huang H, Yang Q, Cai J, Wang Q, Zhu J, Shao M, Xiao J, Cao J, Gu X, Zhang S, Wang Y. PFTK1 promotes gastric cancer progression by regulating proliferation, migration and invasion. *PloS One.* v. 10, n. 10: e0140451, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0140451. eCollection 2015.
26. Liu F, Yan WL, Liu H, Zhang M, Sang H. Cutaneous metastases from gastric adenocarcinoma 15 years after curative gastrectomy. *Rev Bras Dermatol.*, v. 90, n. 3 Suppl 1, p. 46-50, 2015.
27. Zhou Y, Li Y, Zheng J, Liu K, Zhang H. Detection of gastric cancer by Bcl-2 and Ki-67. *Int J Clin Exp Pathol.*, v. 1, n. 6, p. 7287-7290, 2015.
28. Boger C, Behrens HM, Rocken C. Ki-67 an unsuitable marker of gastric cancer prognosis unmasks intratumoral heterogeneity. *J Surg Oncol.*, v. 113, n. 1, p. 45-54, 2016.
29. Miki Y, Kawamura T, Sugisawa N, Makuuchi R, Nakajima T, Tokunaga M, Tanizawa Y, Bando E, Terashima M. Risk classification using the Ki-67 labeling index for surgically treated gastric gastrointestinal stromal tumors. *Hepatogastroenterol.*, v. 62, n. 140, p. 919-923, 2015.