

ESTUDO CITOFOTOMÉTRICO DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES TUMORAIS CASPASE-3 E KI- 67 NO ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

Cytophotometric study of the expression of tumoral markers Caspase-3 and Ki-67 in gastric adenocarcinoma

Pedro Manuel Gonzales CUELLAR, Erickson José Blun LIMA, Ronaldo Mafia CUENCA, João Batista Monteiro TAJRA, Jorge Luiz de Mattos ZEVE, Monres José GOMES, Fábio Santana dos PASSOS, Tereza Cristina Santos CAVALCANTI

ABCDDV/539

Cuellar PMG, Lima EJB, Cuenca RM, Tajra JBM, Zeve JLM, Gomes MJ, Passos FS, Cavalcanti TCS. Estudo citofotométrico da expressão dos marcadores tumorais Caspase-3 e Ki-67 no adenocarcinoma gástrico. ABCD Arq Bras Cir Dig 2007; 20(2):111-5.

RESUMO - Racional - A carcinogênese gástrica é processo complexo e depende de fatores genéticos, ambientais e infecciosos. Nos últimos anos, houve grandes avanços nos campos da genética e da biologia molecular, sobre o desenvolvimento dos tumores. Os marcadores tumorais são substâncias ausentes nos tecidos normais e que podem ser identificadas em tecidos com câncer. Através de procedimentos imunoistoquímicos eles podem ser estudados. **Objetivos** - Descrever a expressão citofotométrica do marcador tumoral Ki-67 analisando a densidade óptica e o índice de marcação no adenocarcinoma de estômago. Descrever a expressão citofotométrica do marcador tumoral Caspase-3 analisando a densidade óptica e o índice de marcação no adenocarcinoma de estômago. Comparar o índice de marcação e densidade óptica dos marcadores tumorais Ki-67 e Caspase-3 no adenocarcinoma de estômago. **Método** - Foram selecionados, inicialmente, 58 blocos com espécime de adenocarcinoma gástrico coletados nos Serviços de Anátomo-Patologia do Hospital do Gama – Brasília (DF) e Hospital Dom Orione – Araguaina (TO), e analisados no Laboratório de Citologia e Histopatologia Ltda – CITOLAB, Curitiba (PR). Foram aproveitados 31 blocos para o estudo histológico e imunoistoquímico realizado pelo sistema de análise computadorizado SAMBA 4000. **Resultados** - Das 31 lâminas estudadas, 15 (48%) foram marcadas pelo marcador Ki-67, 22 (71%) foram marcadas pelo marcador Caspase-3 e 14 (45%) marcaram com os dois marcadores. **Conclusões** - A expressão citofotométrica do marcador Ki-67 foi observada em 15 lâminas da amostra estudada e apresentaram média do índice de marcação de 36,85%, enquanto a densidade óptica apresentou média de 29,33 pixels. A expressão citofotométrica do marcador Caspase-3 foi observada em 22 lâminas da amostra estudada e apresentaram média do índice de marcação de 87,71% e 60,74 pixels de média para a densidade óptica. Na comparação do índice de marcação dos marcadores Ki-67 e Caspase-3 com a leitura de 14 lâminas, observamos que existe diferença significativa ($P < 0,001$) em favor do marcador Caspase-3, o mesmo aconteceu para a densidade óptica também com diferença significativa ($P < 0,001$).

DESCRITORES - Adenocarcinoma. Estômago. Neoplasias gástricas. Caspase-3. Imunoistoquímica.

INTRODUÇÃO

O câncer gástrico é doença altamente prevalente ocupando o terceiro lugar entre os tumores malignos mais freqüentes do mundo e por isso transformou-se em importante problema de saúde pública mundial¹¹. Estima-se aproximadamente 870 mil novos casos por ano¹⁷. Em algumas regiões, como oriente, leste europeu e países da América do Sul, o câncer gástrico é a primeira causa de morte⁶. No Brasil ele está entre os cinco tumores malignos de maior taxa de mortalidade e para 2006 foram estimados 23.290, com a proporcionalidade de 16 novos casos a cada 100 mil homens e 9 para cada 100 mil mulheres².

O tipo histológico mais freqüente é o adenocarcinoma, que corresponde a 95% de todos os tumores. A classificação histológica foi proposta por Lauren, em 1965, e relaciona o padrão de crescimento do tumor ao aspecto histológico em tipo intestinal, difuso e não-classificável. Adenocarcinomas com padrão intestinal, são tumores com grau de

metaplasia intestinal alto e crescimento tipo expansivo; os com padrão difuso apresentam grau de metaplasia intestinal baixo e crescimento tipo infiltrativo; os não-classificáveis são os que não possuem as características anteriormente citadas.

A carcinogênese gástrica é processo complexo e lento, e assim como em outros tumores malignos, depende de fatores genéticos e a exposição a fatores ambientais e até mesmo infecciosos como no caso do *H. Pylori*¹⁵.

Nos últimos anos, houve grandes avanços nos campos da genética e da biologia molecular, sobre o desenvolvimento dos tumores. Como exemplos, têm-se os marcadores tumorais que são substâncias ausentes nos tecidos normais e que podem ser identificadas em tecidos com câncer, assim como apresentam modificações conforme a evolução tumoral. Através de procedimentos imunoistoquímicos, eles podem ser estudados e fornecem importantes resultados²⁴. Através do estudo imunoistoquímico pode ser formulada a identidade clínico-patológica dos tumores malignos centrada na morfologia. No entanto, os estudos ainda não esclarecem de forma definitiva a histogênese dos tumores malignos do estômago⁷.

Para a realização deste trabalho foram escolhidos

Trabalho realizado no Hospital Regional Francisco Aires da Silva, Porto Nacional, Tocantins, Brasil.

Endereço para correspondência: Pedro Manuel Gonzales Cuellar, e-mail: pmgcuellar.com.br

dois marcadores tumorais, o Ki-67 - que é a expressão de uma proteína humana estreitamente associada com a proliferação celular e a Caspase-3 - chave executora da apoptose, a autodestruição celular programada - que requer energia e síntese protéica. O fato de estar presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose) e não estar nas células em repouso (G0), faz do Ki-67 um excelente marcador tumoral para determinar a fração estimulante do crescimento de uma conhecida população celular¹⁹. A Caspase-3 é responsável tanto parcial como totalmente pela clivagem proteolítica de muitas proteínas, tais como as enzimas nucleares ADP-ribose e polimerase, que são clivadas em diferentes sistemas durante o processo de apoptose⁴.

Os objetivos deste estudo foram quantificar no adenocarcinoma de estômago: a) a expressão citofotométrica do marcador tumoral Ki-67 analisando a densidade óptica e o índice de marcagem ; b) a expressão citofotométrica do marcador tumoral Caspase-3 analisando a densidade óptica e o índice de marcagem; c) comparação do índice de marcagem e densidade óptica nos dois marcadores.

MÉTODOS

Este estudo retrospectivo foi feito analisando inicialmente 58 blocos de parafina contendo espécies de tumores malignos de estômago de pacientes operados em vários hospitais do Estado de Tocantins e Distrito Federal. Os blocos eram provenientes do arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Dom Orione em Araguaína, TO e do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Regional do Gama em Brasília, DF. Após a separação dos blocos estes foram encaminhados ao Laboratório CITOLAB em Curitiba onde foram submetidos à seleção dos melhores blocos para estudo imunohistoquímico, confirmação diagnóstica e confecção das lâminas para o estudo imunohistoquímico dos marcadores tumorais Ki-67 e Caspase-3. No final desta avaliação restaram 31 blocos que formam a amostra deste estudo.

Os blocos de parafina foram resfriados e cortados em cortes histológicos. Para cada bloco foram confeccionadas três lâminas: uma corada pela técnica de hematoxilina-eosina e uma para cada marcador tumoral. As fitas de parafina obtidas pela microtomia foram colocadas em banho-maria e os cortes depositados nas lâminas e levadas para estufa a 60°C, produzindo melhor adesão dos tecidos.

A lâmina corada pela técnica de hematoxilina-eosina seguiu os passos já conhecidos e as utilizadas para a análise imunohistoquímica, o padrão para esta técnica (Figuras 1 e 2).

Terminada a confecção das lâminas, foi realizada a análise quantitativa da imunohistoquímica, utilizando o software IMMUNO®, sendo possível a leitura de 15 lâminas com marcador Ki-67 e de 22 com a Caspase-3. Foi estudado o índice de marcagem e a densidade óptica para ambos os marcadores.

A análise estatística foi realizada com o teste de Shapiro-Wilks, para testar a normalidade das variáveis quantitativas. A comparação dos marcadores foi feita usando-se o teste *t* de Student para amostras pareadas. Valores de $P < 0,05$ indicaram significância estatística.

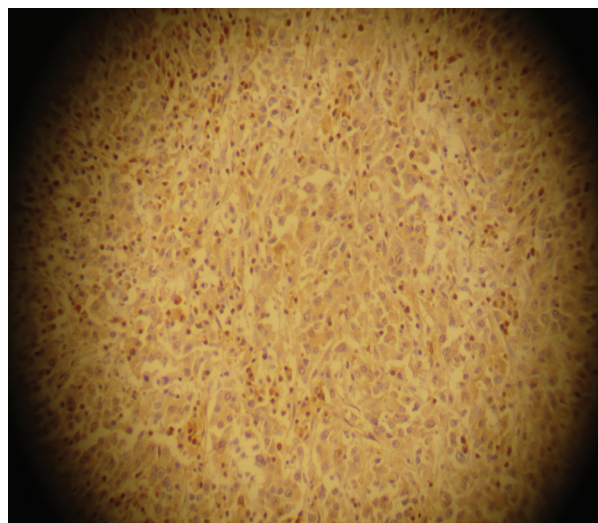


FIGURA 1 – Lâmina de adenocarcinoma do estômago marcada pela Caspase-3.

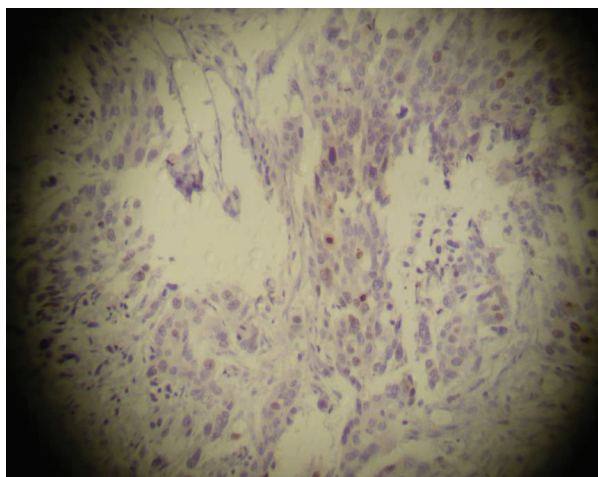


FIGURA 2 - Lâmina de adenocarcinoma de estômago marcada pelo Ki-67.

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra o resultado das leituras das 15 lâminas para o marcador Ki-67 que apresentou média do índice de marcagem de 36,85%, enquanto que a densidade óptica média foi de 29,33 pixels entre as mesmas lâminas.

TABELA 1 - Índice de marcagem e densidade óptica do marcador Ki-67

Variável	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
Índice de marcagem Ki-67	15	36,85	31,92	5,43	77,22	21,17
Densidade optica Ki-67	15	29,33	26,81	12,12	57,24	10,74

O número de lâminas lidas para o marcador Caspase-3 foram de 22 e apresentaram média do índice de marcagem

de 87,71% e 60,74 pixels de média para a densidade óptica (Tabela 2).

TABELA 2 - Índice de marcagem e densidade óptica do marcador Caspase-3

Variável	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
Índice de marcagem Caspase-3	22	87,71	88,10	62,07	98,41	7,89
Densidade óptica Caspase-3	22	60,74	61,09	45,11	76,14	7,46

Quando se compara o índice de marcagem entre os marcadores Ki-67 e Caspase-3, cuja leitura foi coincidente em 14 lâminas, observa-se que existe diferença significativa ($P < 0,001$) em favor da Caspase-3 (Tabela 3).

TABELA 3 - Comparação dos valores do índice de marcagem do Ki-67 e Caspase-3

Variável	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
Índice de marcagem Caspase-3	14	88,42	88,66	76,98	98,41	
Índice de marcagem Ki-67	14	38,91	32,56	5,43	77,22	
Índice de marcagem do Ki-67/Caspase-3	14	49,51	55,09	8,25	84,47	$P < 0,001$

Quando se compara a densidade óptica entre os marcadores Ki-67 e Caspase-3, cuja leitura foi coincidente em 14 lâminas, observa-se que existe diferença significativa ($P < 0,001$) em favor da Caspase-3 (Tabela 4).

TABELA 4 - Comparação dos valores da densidade óptica do Ki-67 e Caspase-3

Variável	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
Densidade óptica do Caspase-3	14	61,30	61,32	76,14	8,36	
Densidade óptica do marcagem Ki-67	14	28,27	26,56	57,24	10,31	
Densidade óptica do Ki-67/Caspase-3	14	33,01	45,11	64,02	12,61	$P < 0,001$

DISCUSSÃO

Na carcinogênese do câncer de estômago, um dos fatores preponderantes é a desregulação do ciclo celular e o desarranjo no balanço apoptótico. A diferença entre os tipos de câncer reside não apenas no nível tecidual, mas também no molecular. Os tumores são objeto de investigação da biologia molecular e celular nos últimos anos. Os objetivos dos estudos são detectar o câncer em sua etapa inicial e avaliar prognósticos e condutas terapêuticas. A aplicação de técnicas de imunistoquímica na rotina diagnóstica já é uma realidade no Brasil, o que justifica a realização deste estudo.

A literatura sobre esses marcadores é escassa, e a

maioria deles com câncer de estômago mencionados neste trabalho são de origem asiática. Provavelmente as substâncias envolvidas na tumorigênese gástrica sejam diferentes nos vários continentes. Faz-se necessário mais estudos sobre o assunto em nosso país.

Alberts et al.¹ afirmaram que a renovação constante do epitélio gastrintestinal envolve proliferação, diferenciação e apoptose, morte celular programada, regulados pelos proto-oncogenes e genes supressores tumorais, provocando aumento da proliferação celular e alterando a apoptose. Neste trabalho, analisou-se a expressão citofotométrica do Ki-67 e Caspase-3, visualizando a correlação entre proliferação celular e apoptose por meio da expressão da densidade óptica e índice de marcagem.

Sidransky⁸ relatou que as alterações que ocorrem exclusivamente ou mais comumente nas células neoplásicas podem ser detectadas através dos marcadores tumorais, que podem ser úteis para determinar o câncer em estádios precoces, para acessar tumores in situ, monitorar a progressão e, ainda, determinar respostas aos tratamentos. Neste estudo pesquisaram-se dois marcadores de diferentes vias de atuação e expressão e percebeu-se que eles devem ser utilizados de forma conjunta para que as diferentes vias de ativação possam ser acessadas e novos alvos descobertos.

O anticorpo monoclonal Ki-67 que foi descoberto por Gerdes em 1983, identifica um antígeno nuclear expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0 e início de G1. A expressão desse anticorpo vem sendo investigada como marcador em diferentes tipos de tumores sólidos. Essa abordagem, no entanto, é muito controversa, principalmente nos tumores gástricos¹². Alguns autores^{3,5,13,21,22,25} afirmaram que o antígeno Ki-67 não se apresenta como fator relevante no prognóstico do câncer gástrico. Mas outros autores relatam correlação entre metástases à distância e o comprometimento de linfonodos com a atividade proliferativa marcada pelo Ki-67^{20,25}. No presente estudo, o marcador Ki-67 mostrou expressão média baixa (36,85%). Quanto ao índice de marcagem e densidade óptica, atingiu a média de 29,33%. O Ki-67 apresentou expressão média baixa (36,85%). Quanto ao índice de marcagem e densidade óptica, atingiu a média de 29,33%.

Este estudo mostra relação com o expressado por Kania et al.¹⁰, quando analisou a expressão da proteína MRNA, ativadora da Caspase-3, que expressava aumento no índice de marcação no câncer gástrico. Aqui esse fato se repetiu em nível de 88,42%, tendo significância estatística, como os estudos de outros autores^{14,16}.

A significância estatística no índice de marcagem e densidade óptica da Caspase-3 que foi encontrada neste trabalho, faz pensar na possibilidade de inibição ou indução farmacológica da apoptose, que foi estudada por Itaya et al.⁹, que poderá abrir grandes perspectivas no tratamento do adenocarcinoma de estômago.

Quando se avalia os dois marcadores no adenocarcinoma de estômago, observa-se que eles apresentam diferenças de expressão, confirmando afirmação de

outro autor²³. Comprovou-se neste estudo, que o Ki-67 tem expressão mais restrita durante o processo de desenvolvimento do ciclo celular, no qual a média do índice de marcagem do Ki-67 foi menor do que a média da Caspase-3.

A associação entre Ki-67 e Caspase-3 mostra que, apesar do Ki-67 não ter índice de marcagem alto, os tumores do estômago continuam proliferando e reafirmando a hipóteses de que realmente existe via alternativa de proliferação desses tumores⁸.

Outros estudos serão desenvolvidos para confirmar as observações deste trabalho. O aumento do número de análises pela citometria de imagem e o sistema SAMBA, com diferentes marcadores tumorais, pode levar à iden-

tificação de marcadores de maior expressão e acurácia na sinalização dos adenocarcinomas gástricos.

CONCLUSÕES

a) A expressão citofotométrica do marcador Ki-67 no índice de marcagem foi de 36,85%, enquanto a densidade óptica na média foi de 29,33 pixels; b) a expressão citofotométrica do marcador Caspase-3 do índice de marcagem foi de 87,71% e 60,74 pixels de média para a densidade óptica; c) na comparação do índice de marcagem e densidade óptica dos dois marcadores, mostra-se que existe diferença significativa a favor do marcador Caspase-3.

Cuellar PMG, Lima EJB, Cuenca RM, Tajra JBM, Zeve JLM, Gomes MJ, Passos FS, Cavalcanti TCS. Cytophotometric study of the expression of tumoral markers Caspase-3 and Ki-67 in gastric adenocarcinoma. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 2007; 20(2):111-5.

ABSTRACT – Background - Gastric tumorigenesis is a complex mechanism where genetic, environmental and infectious interferences may occur. In the last few years, advances in molecular biology brought a new way in the research of the malignancies using tumoral markers and immunohistochemistry. **Aim** – To describe the cytophotometric expression of tumoral markers Ki-67 and caspase-3, analyzing optical density and labeling index as parameters in gastric adenocarcinoma. To compare the labeling index and optical density of Ki-67 and Caspase-3 in gastric adenocarcinoma. **Methods** – Fifty eight paraffin blocks containing gastric adenocarcinomas specimens were collected in the Serviços de Anátomo-Patologia do Hospital do Gama – Brasília (DF) and Hospital Dom Orione – Araguaína (TO), being analyzed at CITOLAB – Cytology and Hystopathology Laboratory Ltda, in Curitiba (PR). A total of 31 of the blocks were used for hystological studies. Immunohistochemistry was performed utilizing the SAMBA 4000 computerized analysis system. **Results** - Of the 31 slides studies, 15 (48%) were marked by Ki-67, 22 (71%) were marked by Caspase-3 and 14 (45%) were marked by both of the tumoral markers. **Conclusions** – Cytophotometric expression of Ki-67 was observed in 15 of the slides studied, presenting an average labeling index of 36,85%, where as the optical density showed an average of 29,33 pixels. Cytophotometric expression of Caspase-3 was observed in a total of 22 slides, presenting an average labeling index of 87,71% and optical density of 60,74 pixels. When comparing the labeling indexes of both of the tumoral markers Ki-67 and Caspase-3 concerning the 14 slides analyzed, a significant difference ($P < 0,001$)

REFERÊNCIAS

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Roberts K, Watson J D. Molecular biology of the cell. 3rd ed. New York: Garland; 1994.
- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil - 2006. Rio de Janeiro: INCA; 2006.
- Broell H, Stuhlmeier KM, Kao JJ, Wallbrandt P, Lindberg M, Hammarstrom B, Paigen B. Antioxidant protein 2 prevents methemoglobin formation in erythrocyte hemolysates. *Eur J Biochem*. 2003;270:334-41.
- Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997;15:1-16.
- Elpek GO, Gelen T, Aksoy NH, Karpuzoglu T, Keles N. Microvessel count, proliferating cell nuclear antigen and Ki-67. Indices in gastric adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2000;6:59-64.
- Flamme I Frölich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol*. 1997;173:206-10.
- Hout Y, Wang J, Zhu X, Du X, Sum M, Zheng A. A clinicopathologic and immunohistochemical study on 76 cases of gastrointestinal stromal tumors. *Chin J Pathol*. 2002;31:20-5.
- Ikeguchi M, Saito H, Maeta M, Oka S, Kondo A, Tsujitani S, Kaibara N. The expression of transforming growth factor-beta1 is significantly correlated with the expression of vascular endothelial growth factor and poor prognosis of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer*. 1999;86:1455-62.
- Itaya M, Yoshimoto J, Kojima K, Kawasaki S. Immunohistochemistry of p53, Bcl-2 and Ki-67 as predictors of chemosensitivity. *Methods Mol Med*. 2005;110:213-27.
- Kania J, Konturek SJ, Marlicz K, Hahn EG, Konturek PC. Expression of survivin and caspase-3 in gastric cancer. *Dig Dis Sci*. 2003;48:266-71.
- Karpeh MS, Kelsen DP, Jepper JE. Cancer of the stomach. In: De Vita V Jr, Helman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer. principles and practice of oncology*. 6th ed. Philadelphia: Lippicott/Williams and Wilkins; 2001. p.1092-126.
- Konno H, Baba M, Tanaka T, Kamiya K, Baba S, Sugimura H, Nakamura S. Relationship of p53 and Helicobacter pylori to clinicopathological features of human remnant stomach cancer after gastric surgery for primary gastric cancer. *Oncol Rep*. 2001;8:831-4.
- Muller W, Schneiders A, Meier S, Hommel G, Gabbert HE. Immunohistochemical study on the prognostic value of MIB-1 in gastric carcinoma. *Br J Cancer*. 1996;74:759-65.
- Quinn FM, Brown S, O'Hara D. Hemangiopericytoma of the stomach in a neonate. *J Pediatr Surg*. 1991;26:101-2.
- Riva S, Muñoz-Navaz M, Sola JJ. Gastric carcinogenesis. *Rev Esp Enferm Dig* 2004;96:265-76.
- Rodrigues FC, Malheiros CA. Stomach neoplasm and metastasis. To operate? *Rev Assoc Med Bras*. 2001;47:95-6.
- Roukos DH. Current status and future perspectives in gastric cancer management. *Cancer Treat Rev*. 2000;26:243-55.
- Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:210-9.
- Scholz T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182:311-22.
- Shima M, Iwashita T, Suehara N, Anan K, Abe Y, Tamae K. Two cases of gastric cancers with lung metastases responding to weekly administration of paclitaxel. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2004;31:2179-81.

21. Sundblad A, Ricci L. MMP-2 expression (type IV collagenase) in gastric cancer. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 1998;28:311.
22. Tenderenda M, Rutkowski P, Jesionek-Kupnica D, Kubiak R. Expression of CD34 in gastric cancer and its correlation with histology, stage, proliferation activity, p53 expression and apoptotic index. *Pathol Oncol Res*. 2001;7:129-34.
23. Villaseca M, Araya JC, Roa I, Roa JC. Cáncer gástrico y regulación del crecimiento tumoral. Estudio de marcadores de proliferación celular y del complejo de proteínas. *Rev Med Chil*. 2000;128:127-36.
24. Ward SM, Kim TW, Beckett EA, Hanna R, Koh SD, Ordog T, Sanders KM. Regulation of pacemaker frequency in the murine gastric antrum. *J Physiol*. 2002;1:145-57.
25. Xu A, Yang G, Du W, Su Y, Zhang H, Wu J, Wang D. Ultrastructural cytochemistry of human gastric cancer: electron microscopic observations of five organelle marker enzymes. *Chin Med J (Engl)*. 1995;108:859-63.

Conflito de interesse: não há

Fonte financiadora: não há

Recebido para publicação em: 20/12/2006

Aceito para publicação em: 04/03/2007