

MARCAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE CDX2 E Ki67 NO ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.

CDX2 AND Ki67 IMMUNOHISTOCHEMISTRY MARKING IN GASTRIC ADENOCARCINOMA.

Luiza do Prado **ESCUCIATTO**¹, Ana Cristina Lira **SOBRAL**².

Rev. Méd. Paraná/1584

Escuciatto LP, Sobral ACL. Marcação Imunoistoquímica de CDX2 e Ki67 no Adenocarcinoma Gástrico. Rev. Méd. Paraná, Curitiba, 2021;79(1):35-39.

RESUMO - Introdução: A proteína CDX2 é um fator de transcrição específico do intestino, que está presente no tecido gástrico apenas quando há uma metaplasia intestinal. A metaplasia intestinal é uma lesão precursora do adenocarcinoma gástrico. O Ki67 é um biomarcador de proliferação celular. Objetivo: Verificar a presença da proteína CDX2 no adenocarcinoma gástrico. Comparar a expressão da CDX2 entre os diferentes graus de diferenciação e entre os níveis de proliferação celular. Método: A partir de 62 blocos histológicos contendo amostras de adenocarcinoma gástricos (4 bem diferenciados, 30 moderadamente diferenciados e 28 pouco diferenciados), foi feita a construção de blocos multiamostrais (TMA). Procedeu-se a marcação imunoistoquímica com os anticorpos escolhidos e realizou-se a leitura da área positiva imunocoradas. Resultados: 31 amostras foram positivas para a CDX2 e 31 negativas, sem diferença significativa entre os graus de diferenciação ($p = 0,576$). 38 amostras foram classificadas como de baixo grau de proliferação celular e 24 como de alto grau. Não houve diferença estatística de grau de proliferação celular entre os graus de diferenciação ($p = 0,676$). O grau de proliferação celular variou dependendo da expressão da CDX2 ($p = 0,036$). Conclusão: A expressão da proteína CDX2 esteve presente em 50% dos adenocarcinomas gástricos. Não houve diferença estatística da expressão do CDX2 entre os graus de diferenciação do adenocarcinoma gástrico. A proliferação celular variou dependendo da expressão da CDX2, havendo um maior nível de proliferação celular nas amostras que apresentaram expressão positiva para CDX2.

DESCRITORES - Adenocarcinoma gástrico, CDX2, Ki67, Imunoistoquímica.

INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma gástrico é uma das neoplasias que atinge o tecido gástrico. Este é o principal tipo de câncer que se desenvolve nesse órgão. O carcinoma gástrico tem apresentado uma queda gradual em sua incidência, fato explicado principalmente pela diminuição na incidência da infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*⁽¹⁾. Apesar disso, ainda é a terceira causa de óbito relacionada com o câncer em todo o mundo⁽²⁾.

O adenocarcinoma gástrico apresenta uma classificação de Lauren e uma classificação segundo a OMS. A classificação de Lauren leva em conta a histologia do tumor, dividindo-o em tipos intestinal, que apresenta uma estrutura glandular definida, e difuso, que possui células ou emaranhados de

células distribuído pelo tecido gástrico⁽³⁾. Já a classificação segundo a OMS considera características morfológicas do tumor, separando em tipos papilar, tubular, mucinoso e carcinoma em anel de sinete⁽⁴⁾.

A infecção crônica pelo *H. pylori* pode gerar metaplasia intestinal, que é uma alteração patológica frequentemente precursora do adenocarcinoma gástrico. A metaplasia intestinal é causada em parte pela indução da expressão da proteína *caudal-related homeobox 2* (CDX2), que é uma proteína fator de transcrição específica do tecido intestinal⁽⁵⁾.

O mecanismo que gera a expressão do CDX2 no estômago e a consequente diferenciação intestinal ainda não está elucidado. Contudo, foi demonstrado que a expressão do CDX2 em células gástricas é suficiente para gerar uma extensa metaplasia intestinal da mucosa gástrica⁽⁶⁾. A metaplasia intes-

Trabalho realizado no Hospital Universitário Evangélico Mackenzie.

1 - Médica pela Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná.

2 - Mestre em Ciência da Saúde pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Especialista em Anatomia Patológica e Citologia pela Sociedade Brasileira de Patologia. Médica pela Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná.

tinal, associada com gastrite crônica, tem sido referida como a principal precursora do desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico. Dessa forma, a proteína CDX2 tem um papel importante como um marcador sensível para predizer o desenvolvimento do adenocarcinoma⁽⁷⁾. Porém, no adenocarcinoma intestinal a CDX2 parece apresentar um papel protetivo⁽⁸⁾.

A Ki67 é um biomarcador de proliferação celular. É produzida no início do processo de proliferação celular e é expressa em todas as fases do ciclo celular, com exceção da fase G0. A correlação entre a Ki67 e o prognóstico do adenocarcinoma gástrico ainda é contraditória a literatura⁽⁹⁾.

O objetivo do nosso estudo foi observar se existe uma correlação entre o nível de diferenciação tumoral do adenocarcinoma gástrico e a expressão tumoral das proteínas CDX2 e Ki67.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para realizar a imunoistoquímica, foram utilizados blocos de parafina contendo amostras coletadas por meio de biópsias gástricas feitas durante gastrectomias por adenocarcinoma gástrico ou durante endoscopia digestiva alta em pacientes do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. Foram selecionadas amostras de todos os graus de diferenciação do adenocarcinoma gástrico tanto do tipo intestinal como do tipo difuso, segundo a classificação de Lauren.

Os critérios de inclusão foram anatomopatológicos de gastrectomias e de biópsias de endoscopia digestiva alta que apresentavam o diagnóstico de adenocarcinoma gástrico. Foram excluídas da pesquisa amostras histopatológicas que possuíam áreas de necrose ou de hemorragia que impediram a realização da imunoistoquímica.

Cada amostra teve sua lâmina analisada e foi selecionada uma região de área amostral para a confecção de blocos teciduais multiamostrais ou TMAs (*tissue microarrays*). As áreas selecionadas foram extraídas do bloco-doador em cilindros e posteriormente foram incluídas em um novo bloco de parafina, permitindo que várias amostras estivessem presentes em uma mesma lâmina. As amostras foram identificadas segundo as suas ordens de inclusão, conforme um mapa tipo cartesiano.

Foram selecionadas 73 amostras de biópsias de adenocarcinoma gástrico. Contudo, 11 foram excluídas por não possuir informações necessárias ou por atenderem aos critérios de exclusão, restando 62 amostras. Dessas amostras, 4 foram classificados pelo patologista quanto ao grau de diferenciação como adenocarcinoma gástrico bem diferenciado, 30 como moderadamente diferenciado e 28 como pouco diferenciado,

As expressões da CDX2 e da Ki67 foram avaliadas pelo método de imunoistoquímica. As lâminas histológicas contendo as amostras de biópsias feitas pelo método TMA foram desparafinadas e reidratadas. Pri-

meiramente elas foram bloqueadas pela lavagem e incubação com bloqueador de peroxidase. Posteriormente foram incubadas com uma solução contendo o anticorpo anti-CDX2 ou o anti-Ki67. Após isso, as lâminas foram incubadas em uma solução com o anticorpo secundário, que apresentou uma coloração ao reagir com um produtor ativador. Essas lâminas foram posteriormente analisadas e a expressão do CDX2 e do Ki67 foram comparadas entre os diversos níveis de diferenciação do adenocarcinoma gástrico.

A expressão da CDX2 foi classificada como positiva, quando havia coloração nuclear ou citoplasmática após a imunoistoquímica, ou como negativa, quando não havia nenhuma coloração pela imunoistoquímica no tecido tumoral.

O grau proliferação celular foi dado pela expressão do Ki67. As amostras foram classificadas como de baixo grau de proliferação celular, quando a porcentagem de células expressando o Ki67 foi menor que 10%, ou como de alto grau de proliferação celular, quando a porcentagem foi maior ou igual à 10%.

Os dados obtidos pela análise da imunoistoquímica foram organizados e planilhados com a ajuda do programa Excel (Microsoft - Office). Foi utilizado o software Minitab 18 para auxiliar na análise estatística. O teste qui-quadrado foi utilizado para verificar a existência de significância estatística na comparação entre grupos com fatores descritivos. Para analisar a variação de idade, que é uma variável contínua com distribuição normal, foi utilizado o teste ANOVA com um fator e foi utilizado o teste de comparações emparelhadas de Turkey para identificar quais grupos apresentavam diferença estatística. Foi adotado um valor-p de 0,05 para indicar significância estatística.

O projeto foi aprovado pela comissão de ética em pesquisa humana CEP/SEB sob o número do parecer 2.270.585.

O material com as informações permaneceu guardado sob a responsabilidade dos próprios pesquisadores, com a garantia de manutenção do sigilo e confidencialidade.

RESULTADOS

21 amostras (33,8%) eram de pacientes femininos e 41 (66,2%) de pacientes masculinos. Entre os adenocarcinomas bem diferenciados, houve uma distribuição igual com relação ao gênero (2 masculinos e 2 femininos). Nos moderadamente diferenciados, tiveram 10 amostras de pacientes femininos para 20 de pacientes masculinos. Seguindo uma proporção semelhante, no grupo dos adenocarcinomas pouco diferenciados, 9 eram de pacientes femininos e 19 de pacientes masculinos. Não havendo diferença significativa entre os grupos (valor-p = 0,777).

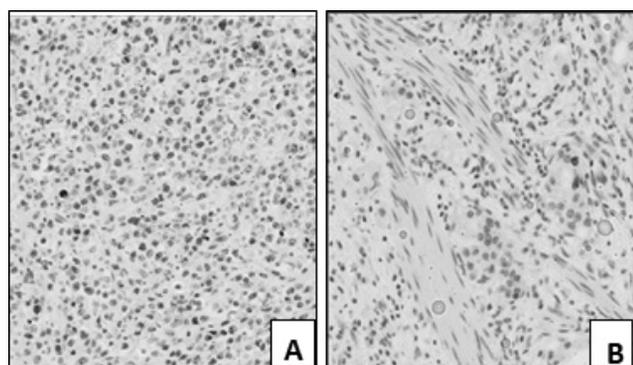
A média de idade apresentada pelos pacientes foi de 67,39 anos com um desvio padrão de 13,54 anos. Quando comparada as médias de idade entre os di-

ferentes graus de diferenciação, foi constatado que a média de idade do grupo moderadamente diferenciado (72,47) foi significativamente superior à média de idade do grupo pouco diferenciado (62,54), com um valor-p de 0,01.

Com relação ao nível de expressão da CDX2, 31 amostras foram positivas e 31 foram negativas. Quando cruzadas com o grau de diferenciação das amostras, a expressão da CDX2 foi positiva em 2 amostras bem diferenciadas, em 17 amostras moderadamente diferenciadas e em 12 amostras pouco diferenciadas. Não houve diferença estatística da expressão do CDX2 entre os três grupos de grau de diferenciação (valor-p = 0,576).

A figura 1 mostra exemplo de tecidos de adenocarcinoma gástrico que sofreram a marcação pela Ki67. Na figura 1A está presente um tecido que apresenta grande grau de proliferação celular, possuindo uma grande quantidade de células marcadas pela Ki67. Já na figura 1B, é demonstrado um tecido que apresenta pouca expressão da Ki67, tendo um baixo grau de proliferação celular.

FIGURA 1 – TECIDO DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO MARCADO PELA KI67



FONTE: O AUTOR (2018).

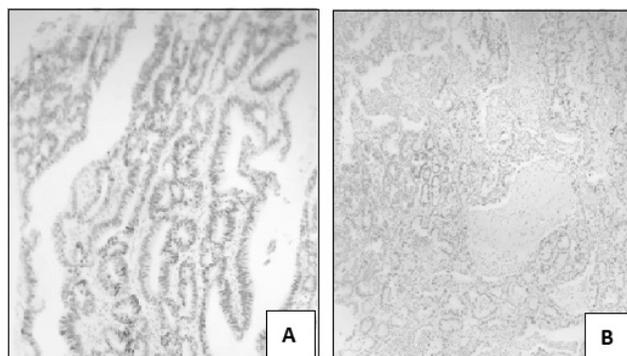
LEGENDA: 1A: TECIDO DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO COM ALTO GRAU DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

1B: TECIDO DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO COM BAIXO GRAU DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Na avaliação da proliferação celular, dada pela expressão do Ki67, 38 amostras foram classificadas como de baixo grau, e 24 como de alto grau. Quando relacionada com os graus de diferenciação, apresentaram alto grau de proliferação 2 amostras bem diferenciadas, 10 moderadamente diferenciadas e 12 pouco diferenciadas. Não houve diferença estatística do grau de proliferação celular entre os três graus de diferenciação (valor-p = 0,676).

Na figura 2 estão presentes dois exemplos de tecidos de adenocarcinoma gástrico após a marcação da CDX2. Na figura 2A está exemplificado um adenocarcinoma gástrico que apresentou positividade para a expressão da CDX2. Já na figura 2B está presente um tecido que foi negativo para a expressão da CDX2.

FIGURA 2 – TECIDO DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO MARCADO PELA CDX2



FONTE: O AUTOR (2018).

LEGENDA: 1A: TECIDO DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO COM EXPRESSÃO POSITIVA PARA A PROTEÍNA CDX2 / 1B: TECIDO DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO COM EXPRESSÃO NEGATIVA PARA A PROTEÍNA CDX2

Foi comparado também a expressão da CDX2 com o grau de proliferação celular. Dos 31 casos em que a expressão da CDX2 era negativa, 23 apresentavam um nível de proliferação celular baixo, e 8 um nível de proliferação alto. Dos 31 casos que possuíam uma expressão da CDX2 positiva, 15 tinham alto nível de proliferação celular e 16, baixo nível. Houve um maior nível de proliferação celular nas amostras que apresentaram expressão positiva para CDX2 (valor-p = 0,036).

DISCUSSÃO

Foram analisadas 62 amostras de adenocarcinomas gástricos, sendo que a maioria das biopsias eram de pacientes com adenocarcinoma gástrico moderadamente diferenciado (48%) ou pouco diferenciado (45%). O adenocarcinoma gástrico inicialmente não apresenta nenhum sintoma específico, o que pode fazer com que haja um retardo no diagnóstico desse tumor, sendo encontrado apenas quando já está em um estágio mais avançado⁽¹⁰⁾.

A proporção entre homens e mulheres dos pacientes selecionados no presente estudo (66,2% homens e 33,8% mulheres) foi semelhante ao relatado na literatura. Na publicação “Cancer Statistics, 2019” publicado no CA: A Cancer Journal for Clinicians, a estimativa de novos casos de câncer gástrico para 2019 nos Estados Unidos era de 17,230 (62.6%) novos caso em homens e de 10,280 (37.4%) em mulheres⁽¹⁾. Em 2008, a taxa de casos de câncer gástrico em homens no mundo foi de duas a três vezes superior do que a das mulheres⁽¹¹⁾.

A incidência de adenocarcinoma gástrico aumenta progressivamente conforme a idade. Durante o período entre 2011 e 2015, a média de idade de diagnóstico do câncer gástrico nos Estados Unidos foi de 68 anos⁽¹²⁾. O que é compatível com os achados desse estudo, que obteve uma média de idade dos pacientes de 67,39 anos.

Os resultados obtidos no presente estudo com relação à expressão da proteína CDX2 entre os diferentes graus de diferenciação foram diferentes dos resultados apresentados na literatura. Em artigos publicados anteriormente, a expressão da proteína CDX2 diminui conforme a indiferenciação do adenocarcinoma gástrico, sinalizando um fator de proteção para a malignização desse tipo de câncer^(13, 14, 15, 16). Contudo, no nosso estudo não houve diferença estatística da expressão da CDX2 entre os grupos de diferenciação.

Em relação ao grau de proliferação celular, dado pela expressão da Ki67, nesse estudo não foi obtido diferença estatística quando comparado aos diferentes graus de diferenciação. Esse dado não difere do estudo feito por Li e colaboradores (2015), que obteve como resultado que o grau de proliferação celular não possui diferença significativa conforme o grau de diferenciação de adenocarcinoma gástricos, apenas com relação ao tamanho do tumor⁽⁹⁾.

Quando o grau de proliferação celular das amostras foi comparado entre os grupos de expressão da CDX2, nosso estudo obteve resultados opostos ao apresentado na literatura. Seno e colaboradores (2002) constataram que amostras que possuíam adenocarcino-

mas gástricos positivos para a CDX2, apresentavam uma taxa de expressão da proteína Ki67 significativamente mais baixa⁽¹⁵⁾. Contudo, nesse presente estudo houve um maior nível de proliferação celular nas amostras que apresentaram expressão positiva para CDX2. Essa divergência talvez seja explicada pelo fato de o presente estudo ter apresentado uma escassez de amostras do grau de diferenciação bem diferenciado, podendo ter gerado um viés na comparação da expressão das proteínas estudadas.

CONCLUSÃO

No presente estudo a expressão da proteína CDX2 esteve presente em 50% dos adenocarcinomas gástricos. Não houve diferença estatística da expressão do CDX2 entre os três graus de diferenciação do adenocarcinoma gástrico. O grau de proliferação celular variou dependendo da expressão da CDX2, havendo um maior nível de proliferação celular nas amostras que apresentaram expressão positiva para CDX2. A escassez de amostras bem diferenciadas pode ter influenciado nesses resultados, necessitando-se de novos estudos sobre esse tema.

Escuciatto LP, Sobral ACL. CDX2 And Ki67 Immunohistochemistry Marking in Gastric Adenocarcinoma. Rev. Méd. Paraná, Curitiba, 2021;79(1):26-30.

ABSTRACT - Background: CDX2 protein is an intestinal specific transcription factor that is present in the gastric tissue only when there is intestinal metaplasia. Intestinal metaplasia is a gastric adenocarcinoma precursor injury. Ki67 is a cell proliferation biomarker. Objective: Verify the presence of CDX2 protein in gastric adenocarcinoma. Compare the CDX2 expression between the differentiation degree groups and between the cell proliferation degrees. Methods: It was collected 62 paraffin blocks containing the gastric adenocarcinoma samples (4 well differentiated adenocarcinoma, 30 moderately differentiated and 28 poorly differentiated). It was made the tissue microarrays blocks (TMA), so it was proceeded to immunohistochemical staining with the anti-CDX2 and the anti-Ki67 antibodies and it was accomplished the read of the positive immune-stained area. Results: 31 samples were positive for CDX2 expression, and 31 were negative. There was no statistical difference of the CDX2 expression between the differentiation degree groups ($p = 0.576$). 38 samples were classified as low degree of cell proliferation and 24 as high degree. There was no statistical difference of the cell proliferation degree between the differentiation degree groups ($p = 0.676$). The degree of cell proliferation ranged depending on the CDX2 expression ($p = 0.036$). Conclusion: Protein CDX2 expression was observed in 50% of gastric adenocarcinoma samples. There was no statistical difference of the CDX2 expression between the differentiation degree groups. The cell proliferation ranged depending of CDX2 expression, with a higher index of cell proliferation in the positive CDX2 expression samples.

KEYWORDS - Gastric adenocarcinoma, CDX2, Ki67, Immunohistochemical.

REFERÊNCIAS

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2019. *Ca Cancer J Clin.* 2019; 69(1):7–34. PubMed PMID: 30620402
2. Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F. Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014; 23(5): 700–13. PubMed PMID: 24618998
3. Flucke U, Mönig SP, Baldus SE, et al. Differences between Biopsy- or Specimen-related Laurén and World Health Organization Classification in Gastric Cancer. *World J. Surg.* 2002; 26 : 137–140. PubMed PMID: 11865338
4. Bosman FT. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. WHO classification of tumours of the digestive system. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2010; 417
5. Asano N, Imatani A, Watanabe T, et al. Cdx2 Expression and Intestinal Metaplasia Induced by H. pylori Infection of Gastric Cells Is Regulated by NOD1-Mediated Innate Immune Responses. *Cancer Res.* 2016; 76(5): 1135 – 1145. PubMed PMID: 26759244
6. Mutoh H, Hakamata Y, Sato K, et al. Conversion of gastric mucosa to intestinal metaplasia in Cdx2-expressing transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 294, 470–479. PubMed PMID: 12051735

7. Sandhya S, Mathew SF, Jisha KT. Expression of CDX2 protein in gastric mucosa with intestinal metaplasia and gastric carcinoma. *Indian Journal of Pathology and Oncology*. 2015; 2(3): 150-157. DOI: 10.5958/2394-6792.2015.00008.3
 8. Li N, Deng W, Ma J, et al. Prognostic evaluation of Nanog, Oct4, Sox2, PCNA, Ki67 and E-cadherin expression in gastric cancer. *Med Oncol*. 2015; 32: 433. PubMed PMID: 25491144
 9. Dicken B J, Bigam DL, Cass C, Mackey JR, Joy AA, Hamilton SM. Gastric Adenocarcinoma: Review and Considerations for Future Directions. *Annals of Surgery*. 2005; 241(1): 27-39. PubMed PMID: 15621988
 10. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010; 127: 2893-917. PubMed PMID: 21351269
 11. Noone AM, Howlader N, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015, National Cancer Institute. Bethesda, MD. 2018 Access in https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/, based on November 2017 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2018
 12. Liu Q, Teh M, Ito K, Shah N, Ito Y, Yeoh KG. CDX2 expression is progressively decreased in human gastric intestinal metaplasia, dysplasia and cancer. *Modern Pathology*. 2007; 20: 1286-1297. PubMed PMID: 17906616
 13. Bai Y, Akiyama Y, Nagasaki H, et al. Distinct Expression of CDX2 and GATA4/5, Development-Related Genes, in Human Gastric Cancer Cell Lines. *Mol. Carcinog*. 2000; 28: 184-188. PubMed PMID: 10942535
 14. Seno H, Oshima M, Taniguchi MA, et al. CDX2 expression in the stomach with intestinal metaplasia and intestinal-type cancer: Prognostic implications. *International Journal of Oncology*. 2002; 21(4): 769-774. PubMed PMID: 12239615
 15. Mizoshita T, Tsukamoto T, Nakanishi H, et al. Expression of Cdx2 and the phenotype of advanced gastric cancers: relationship with prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003; 129(12): 727-734. PubMed PMID: 14557879
-