

## ANTIGENUL Ki67 FACTOR DE PROGNOSTIC IN CARCINOAMELE GASTRICE

Luminița Ivan

Laboratorul de Anatomie-Patologică și Prosectură,  
Spitalul Militar de Urgențe, Iași

**Ki67 PROGNOSTIC FACTOR IN GASTRIC CARCINOMAS (Abstract):** Aims: Despite their importance, prognostic factors in gastric cancer are not well known. Material and methods: The study included surgical specimens from 40 patients with gastric carcinoma. All specimens were fixed in 10% buffered neutral pH formaldehyde and paraffin embedded. Histological sections were stained using current techniques: haematoxylin-eosin, trichromic van Gieson, and Alcian blue. Laurén histological classification with two main types of gastric carcinoma: intestinal and diffuse was used to classify the specimens. We assessed the proliferative activity by determining the percentage of immunoreactive cells for Ki67 antigen (AM297 antibody Biogenex) and comparing the Ki67 index with histological type. Results: Immunoreactivity was positive for ki-67 in all cases: 12 cases of gastric carcinoma intestinal type – low to moderate index, 26 cases of gastric carcinoma diffuse type – moderate to high index and 2 cases of mixed gastric carcinomas – low to moderate index. Conclusions: The positive rates for Ki67 along with histologic differentiation give us useful information regarding the evolution and the prognosis of gastric cancer. These observations prove that a high proliferative activity is a prognostic factor for a highly malignant phenotype of the tumor.

KEY WORDS: GASTRIC CANCER, Ki67

Correspondența: Dr. Luminița Ivan, Laboratorul de Anatomie-Patologică și Prosectură, Spitalul Militar de Urgențe, Iași, Str. Gen Berthlot nr. 6, Iași.\*

### INTRODUCERE

Adenocarcinoamele gastrice reprezintă 90-95% din toate tumorile maligne ale stomacului [1]. Corelațiile endoscopice cu aspectele histopatologice au dus la apariția formelor incipiente de adenocarcinom cu prognostic favorabil, complet diferit de carcinomul gastric avansat. De asemenea, datele epidemiologice, imunohistochimice (IHC) și evolutive confirmă cele două variante histologice frecvente, carcinomul gastric de tip intestinal și tip difuz (Lauren 1965 citat de [1]).

Numeroase studii au prezentat IHC în vederea aprecierii prognosticului corelat cu produsele proteice ale genelor. Antigenul Ki67 este un marker al ciclului celular și al proliferării celulare utilizat pentru estimarea coeficientului de proliferare într-o populație celulară [2]. Antigenul Ki67 este un antigen nuclear exprimat în toate fazele ciclului celular mai puțin în faza G0. Procentajul celulelor tumorale Ki67+ poate fi corelat cu parametrii de agresivitate sau de progresie tumorală.

Datele din literatură referitoare la valoarea prognostică a indicelui de proliferare Ki67 în carcinomul gastric sunt reduse, de aceea, acest studiu își propune analiza IHC a activității proliferative exprimate prin procentul de celule imunoreactive pentru antigenul Ki67 corelat cu tipul histologic.

---

\* received date: 10.09.2008

accepted date: 25.09.2008

## MATERIAL ȘI METODĂ

Materialul de studiu este reprezentat de 40 piese de rezecție chirurgicală provenite de la pacienți diagnosticați cu neoplasm gastric. Întregul material a fost fixat în formol 10% și inclus la parafină. Investigațiile morfologice de rutină s-au efectuat pe secțiuni colorate prin metode uzuale: hematoxin-eozină, van Gieson, albastru Alcian, PAS care au permis încadrarea leziunilor și stabilirea gradului de diferențiere. Am folosit clasificarea Lauren și OMS – 2000 pentru aprecierea tipurilor histologice [3].

Colorațiile imunohistochimice prin metoda Avidin-Biotin Complex s-au efectuat cu ajutorul autostainerului Optimax produs de Biogenex. Pretratamentul s-a efectuat prin fierbere 12-15min. în soluție citrat după care a urmat incubarea 20min. cu antigen Ki67 (AM 297 Biogenex – Ready to use). Vizualizarea cu DAB urmată de colorarea ușoară (1min) cu hematoxină a permis evidențierea Ki67 sub forma unui produs de reacție de culoare brună cu localizare nucleară [4-6].

Pentru cuantificare s-au evitat focarele de necroză, hemoragie precum și zonele de inflamație și s-au efectuat pe 3 grupe de scor, astfel:

- *scor redus (malignitate joasă)* s-au colorat între 5-20% dintre nucleii celulelor tumorale;
- *scor mediu (malignitate intermediară)* s-au colorat între 20-70% dintre nucleii celulelor tumorale;
- *scor mare (malignitate înaltă)* s-au colorat peste 70% dintre nucleii celulelor tumorale [7].

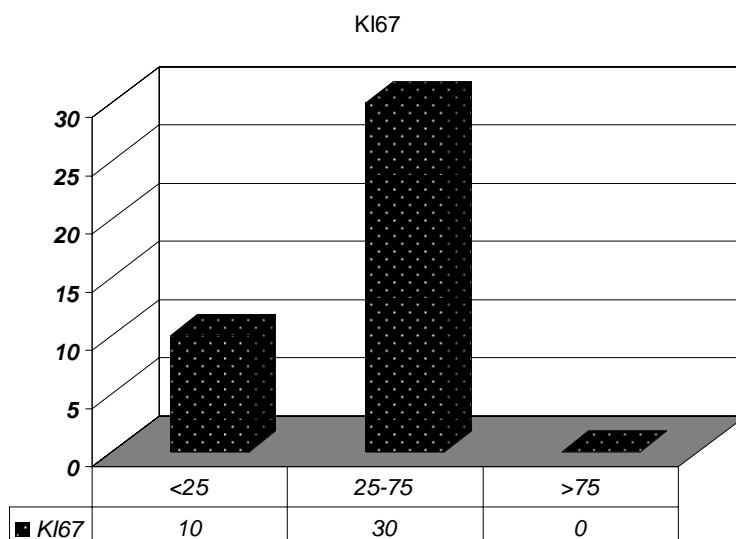


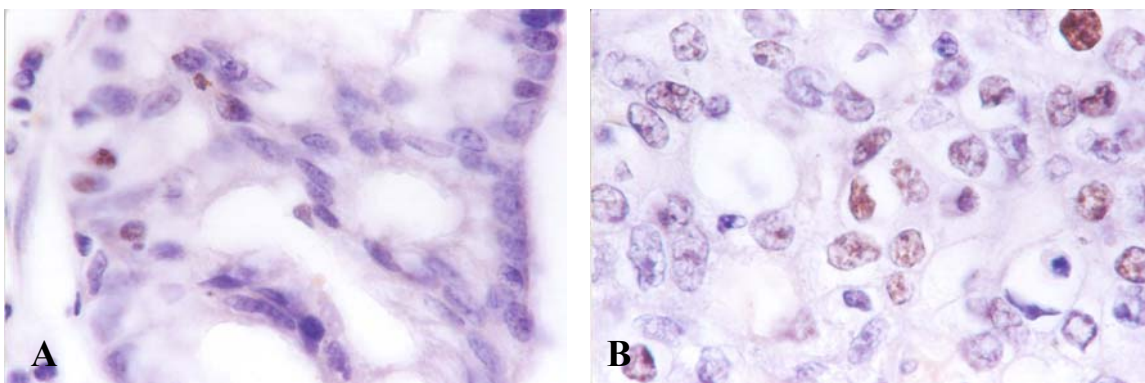
Fig. 1. Repartiția nucleilor reactivi Ki67 în lotul studiat

## REZULTATE

Marcarea cu antigenul Ki67 a evidențiat un tablou de colorare nuclear atât punctiform cât și intens și difuz al întregului nucleu. Imunoreactivitatea Ki67 a fost identificată în 40 din cele 40 de carcinoame gastrice, procentul nucleilor reactivi fiind exprimat după cum urmează (Fig. 1).

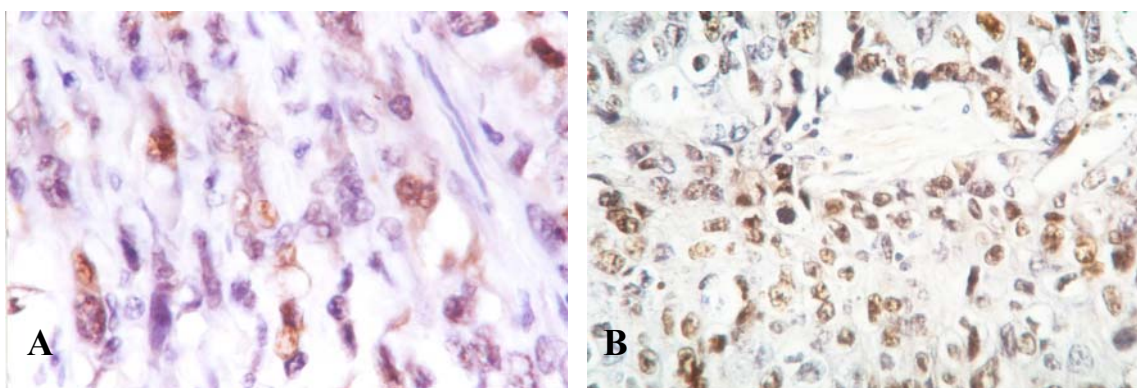
S-au identificat rari nuclei pozitivi dispersați în epiteliul gastric normal și glandele subjacente. S-au remarcat nuclei Ki67 pozitivi între 1-5% în zonele de mucoasă gastrică cu metaplazie intestinală în special cu metaplazie colonică de tip incomplet precum și în zone cu neoplazie intraepitelială.

Procentajul nucleilor reactivi a variat în limite largi, fiind diferit în funcție de tipul histologic. Folosind clasificarea Lauren am constatat că din cele 12 cazuri de ADK de tip intestinal toate 12 au fost pozitive prezentând un procent de nuclei reactivi ce a variat între 10 și 25%, ceea ce ne-a permis să încadrăm această grupă în grupă cu scor jos de malignitate. Tipul reacției a fost predominant punctiform (Fig. 2).



**Fig. 2 Imunhistochimie**

A. Colorare nucleară punctiformă pentru Ki67 (10%) într-un ADK de tip intestinal bine diferențiat (IHC, ob 40x); B. Colorare nucleară punctiformă și omogenă pentru Ki67 (30%) într-un ADK de tip intestinal moderat diferențiat (IHC, ob 100x).



**Fig. 3 Imunhistochimie**

A. Colorare nucleară punctiformă și omogenă pentru Ki67 (60%) într-un carcinom gastric difuz cu celule în inel cu pecete (IHC, ob 100x); B. Colorare nucleară punctiformă și omogenă pentru Ki67 (50%) într-un carcinom gastric difuz (IHC, ob 40x).

De asemenea, din cele 26 de cazuri de carcinoame gastrice difuze toate au fost pozitive prezentând un procent de nuclei reactivi ce a variat între 30% și 60% ceea ce ne-a permis să încadrăm această grupă într-o grupă cu scor intermediar de malignitate. Tipul reacției IHC a fost predominant intens și difuz al întregului nucleu (Fig. 3). Cele 2 cazuri de carcinom gastric mixt au fost pozitive pentru Ki67 cu un scor de 25% respectiv 30%. Astfel, un caz s-a încadrat în grupa cu scor jos de malignitate și una cu

scor intermediar. Tipul reacției IHC a fost predominant intens și difuz al întregului nucleu.

## DISCUȚII

În numeroase tumori maligne procentajul celulelor Ki-67 pozitive poate fi corelat cu parametrii de agresivitate sau de progresie tumorală; de aici rezultă interesul său practic în histopatologia tumorilor deși natura biochimică și funcția sa sunt încă puțin cunoscute.

Datorită faptului că în cancerul gastric datele referitoare la valoarea prognostică a indicelui de proliferare Ki-67 sunt reduse, iar relația dintre rata de pozitivare Ki-67 și prognostic rămâne neclară, ne-a determinat să analizăm activitatea proliferativă pe un lot de 40 carcinoame gastrice. Studiind expresia antigenului Ki67 pe cele 40 de cazuri studiate am observat o heterogenitate a expresiei și o imunoreacție pozitivă în toate cele 40 de cazuri (100%) supuse imunocolorării cu AM.

Detecția IHC a expresiei antigenului Ki67 în combinație cu alți parametri clinico-morfologici și biologici s-a dovedit de o reală valoare în aprecierea prognosticului pacienților cu cancer gastric. În literatura de specialitate, datele referitoare la valoarea prognostică a indicelui de marcarea Ki67 sunt reduse, iar relația dintre rata de pozitivare Ki67 și prognostic rămâne neclară. Bouzubar et al susțin că tumorile cu marcarea Ki67 peste 20% au un risc crescut de recădere [8], Wintzer et al au raportat un prognostic mai sever la pacienții cu tumori având valori ale Ki67 >16% [9], în timp ce alți autori notează o probabilitate mai mică de supraviețuire la 5 ani a pacienților cu valori ale Ki67 > 13% [4].

Poate fi sesizată o relație semnificativă între colorarea Ki67 și alte indicii prognostice, procentul de celule Ki67 pozitive (respectiv scorul Ki67) apare astfel diferit pe subtipuri histologice de cancer gastric, în funcție de stadiul și gradul de diferențiere al tumorii, ceea ce confirmă validitatea sa prognostică.

Corelând grupele de scor Ki67 cu tipurile histologice din clasificarea Lauren am observat că 12 cazuri de ADK de tip intestinal prezintă <25% nucleu reactivi Ki67 cu un scor jos de malignitate, în timp ce 26 cazuri de carcinoame gastrice difuze prezintă >25% nucleu reactivi Ki67 cu un scor intermediar de malignitate. Cele 2 cazuri de carcinoame gastrice mixte s-au situat la limita dintre scor jos și intermediar de malignitate.

În studiul lui Thaler detecția antigenului Ki67 s-a dovedit superioară metodei de determinare a gradului histologic de diferențiere sau a indexului mitotic și consideră că indiferent de tipul histologic, toate tumorile cu peste 5% celule Ki67 pozitive au un curs clinic nefavorabil (citată de [10]). Rezultatele lui Nakano și Oka susțin că activitatea proliferativă înaltă se corelează cu malignitatea crescută a tumorii, cu recidivele și rata crescută de metastazare (citată de [10]). Cu cât activitatea proliferativă a unei tumori este mai mare, cu atât este mai mare potențialul său malign, iar supraviețuirea (din momentul diagnosticului) mai redusă.

Date despre evoluția ulterioară a pacienților din lotul de studiu am avut în 5 situații (cazuri). Toți au decedat sub 5 ani, procentul nucleilor reactivi Ki67 variind în aceste situații între 10-50%.

## CONCLUZII

Adenocarcinoamele gastrice bine diferențiate sau moderat diferențiate de tip intestinal au prezentat valori reduse spre medii ale activității proliferative (Ki67 cu o

pondere de 25-30%), în timp ce, carcinoamele gastrice difuze au demonstrat imunoreactivitate medie spre mare cu un Ki67 situat între 25-75%.

Rezultatele obținute ne permit să afirmăm că scăderea gradului de diferențiere tumorală se asociază cu un procent ridicat de pozitivitate pentru Ki67 și deci cu un prognostic nefavorabil.

Aceasta ne determină să afirmăm că detecția antigenului Ki67 poate fi superioară metodei de determinare a gradului histologic de diferențiere sau a indexului mitotic.

#### BIBLIOGRAFIE

1. Mills AS, Cantos MJ. The stomach. In: Silverberg SG, editors, *Principles and practice of surgical pathology and cytopathology*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1997. p. 1669-1728.
2. Seigneurin DG. L'antigen Ki67 marquer du cycle cellulaire et de la prolifération tumorale, *Path Biol* 1991, 39(10):1020-1029.
3. Fenoglio-Preiser C, Carneiro F, Correa P, Guilford P, Lambert R, Megrand F. Gastric carcinoma. In: Hamilton, Aaltonen, editors, *Pathology and Genetics Tumours of the Digestive System. The OMS Classification*. Lyon: IARC Press; 2000. p. 39-52.
4. Nakano T, Oka K. Differential values of Ki67 index and mitotic index of proliferating cell population. *Cancer*. 1993; 72: 2401-2408.
5. Goldstein NS, Silverman JF. Immunohistochemistry of the gastrointestinal tract, pancreas, bile ducts, gallbladder and liver. In: Dabbs DJ, editor, *Diagnostic Immunohistochemistry*. Edinburgh, London: Churchill Livingstone; 2002. p. 333-352.
6. Josain B, Schmid KW. Markers of cell proliferative activity. In: Josain B, Schmid KW, editors, *Immunocytochemistry in diagnostic histopathology*. Edinburgh, London: Churchill Livingstone; 1993. p. 127-129.
7. Cornianu M, Tudose N, Potencz E. Expresia antigenului Ki67 în cancerul pulmonar și relația acestuia cu alți factori de pronostic. *Romanian J Path*. 2000; 3-4(4-6): 336-349.
8. Bouzubar N, Walker KJ, Griffiths K, Ellis IO, Elston CW, Robertson JF, Blamey RW, Nicholson RI. Ki67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. *Br J Cancer*. 1989; 59(6): 943-947.
9. Wintzer HO, Zipfel I, Schulte-Monting J, Hellerich U, von Kleist S. Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer*. 1991; 67: 421-428.
10. Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lampertico P. Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer*. 1993; 71: 3926-3931.