

ESTUDO DA EXPRESSÃO CITOFOTOMÉTRICA DO MARCADOR TUMORAL CASPASE-3 NO ADENOCARCINOMA DE CÓLON

Citophotometric expression study of tumoral marker Caspase-3 on colon adenocarcinoma

João Batista Monteiro **TAJRA**¹, Osvaldo **MALAFIA**², Nicolau Gregori **CZECZKO**²,
Eduardo Antonio Andrade dos **SANTOS**², Carmen Aurlia Paredes Marcondes **RIBAS**²,
Ana Maria **WAGAA-GASSER**³, Carlos Roberto **NAUFEL Jr**², Cristiano Machado **INÁCIO**²

ABCDDV/569

Tajra JBM, Malafaia O, Czezko NG, Santos EAA, Ribas CAPM, Wagaa-Gasser AM, Naufel Jr CR, Inácio CM. Estudo da expressão citofotométrica do marcador tumoral Caspase-3 no adenocarcinoma de cólon. ABCD Arq Bras Cir Dig 2007;20(4):250-3

RESUMO - Racional - O adenocarcinoma de cólon é a segunda causa mais comum de morte por câncer em homens e mulheres, sendo responsável por mais de cinco milhões de mortes por ano. No momento do diagnóstico apenas 70% dos tumores são ressecáveis, 75% são curáveis e 25% poderão ter recorrência da doença. A apoptose é uma das responsáveis pelo equilíbrio homeostático entre as células. Durante o desenvolvimento do processo de degeneração maligna celular o desequilíbrio na apoptose é considerado um dos principais marcos neoplásicos. A caspase-3 é uma das mais importantes moléculas na apoptose, sendo sua efetora principal. Sua expressão e prognóstico têm sido relatados em vários estudos e revisões com seu papel valorizado desde o surgimento do pólipo até a sua transformação maligna, com a taxa de apoptose diminuindo progressivamente. **Objetivos** - Avaliar a expressão citofotométrica computadorizada do marcador Caspase-3 no adenocarcinoma de cólon; avaliá-lo nas fases evolutivas na classificação modificada de Dukes e comparar sua expressão nos tumores do lado direito e esquerdo do cólon. **Métodos** - Utilizaram-se 19 casos de câncer recuperados de blocos de parafina confirmados por hematoxilina-eosina e submetidos à técnica imunistoquímica da estreptavidina-biotina com anticorpo policlonal anti-caspase-3. Após este processo as lâminas marcadas foram submetidas à leitura pelo sistema SAMBA com o software IMUNNO 4.00. Foram analisados três índices: marcação (Label index), heterogeneidade e densidade óptica. Utilizaram-se a marcação individual, avaliação da expressão do marcador e grupos definidos de tumores com classificação Dukes e pelo lado do tumor. **Resultados** - A média do índice de marcação da caspase-3 foi de 85,24 e da densidade óptica de 39,55. Na classificação Dukes de 12 tipos B tiveram índice de marcação de 86,20 e a densidade óptica de 37,72 e para os 7 tipos C a área de marcação foi de 85,66 e a densidade óptica foi de 42,71 não sendo possível identificar diferença em relação a classificação de Dukes. Quanto ao lado do tumor os 11 tumores à esquerda tiveram índice de marcação de 86,65 e densidade óptica de 43,29 e os 8 à direita índice de marcação de 83,29 e densidade óptica de 39,44 não sendo possível observar diferença estatística significativa. **Conclusões** - A caspase-3 possui alta expressão individual revelando-se marcador de boa utilidade no estudo do adenocarcinoma de cólon e da fase pró-apoptótica da sua tumorigênese pelo seu alto grau de índice de marcação e densidade óptica. Em relação à classificação Dukes não houve diferença entre os tipos B e C, como também em relação ao lado direito e esquerdo do cólon.

DESCRIPTORIOS - Adenocarcinoma de cólon. Marcador tumoral Caspase-3. Imunistoquímica.

INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma do cólon é a segunda causa mais comum de morte por câncer em homens e mulheres, sendo responsável por mais de cinco milhões de mortes por ano. Na época do aparecimento apenas 70% dos tumores são ressecáveis e 75% curáveis. Contudo, 25% destes pacientes terão recorrência da doença⁹.

Os pólipos colorretais podem dar origem à neoplasia, o que determina a necessidade de vigilância destas lesões através de estudos genéticos de padrões de crescimento e degeneração da mucosa colorretal. O reconhecimento dos mecanismos de desenvolvimento das neoplasias transcorre por alteração entre a taxa proliferativa nas criptas e sua taxa de morte por apoptose. É necessária modificação genética em ambas para o crescimento tumoral, com a

inabilidade da célula neoplásica para submeter-se a morte celular programada, e é este um importante marcador da sua propensão à malignidade.

As alterações cromossômicas de cada tumor tornaram-se passos decisivos para o correto entendimento de seu aparecimento, sendo o acúmulo destas modificações genéticas o fator decisivo para o surgimento neoplásico. Várias alterações nos genes e seus produtos centrais afetam as fases do desenvolvimento celular, demonstrando o fenótipo molecular da célula tumoral⁶.

O prognóstico e o tratamento desta doença estão ligados à época do diagnóstico, invasão linfonodal, comprometimento local e disseminação a distância. O avanço na eficácia do tratamento nos últimos cinco anos se deve aos conhecimentos sobre a tumorigênese dos tumores de cólon e reto⁷.

A apoptose, termo introduzido por Kerr em 1972, é uma das responsáveis pelo equilíbrio homeostático entre as células. No desenvolvimento do processo de degeneração maligna celular o desequilíbrio na apoptose é considerado um dos marcos neoplásicos das principais etapas. O controle da apoptose é executado por um conjunto de cisteino-

Trabalho realizado na ¹União Educacional do Planalto Central – UNIPLAC – Brasília, DF e ²Hospital Universitário Evangélico de Curitiba – HUEC – Curitiba, PR, Brasil. ³Professora da Universidade de Wurzburg.

Endereço para correspondência: Ronaldo Mafia Cuenca, e-mail: rmcuenca@uol.com.br

proteases denominadas caspases¹². A caspase-3 é uma das mais importantes moléculas na apoptose, sendo sua efetora principal. Sua expressão e prognóstico têm sido relatados em vários estudos e revisões com seu papel valorizado desde o surgimento do pólipo até a transformação maligna, com a taxa de apoptose diminuindo progressivamente.

Pode-se utilizar para esta finalidade, o método padrão manual de coloração e leitura imunoistoquímica. Apesar de amplamente utilizado, a subjetividade, erros de coloração e dificuldade de comparação dos dados a partir deste método, suscitaram na literatura dúvidas metodológicas. O desenvolvimento de softwares de forma progressiva facilitou as análises comparativas dos diversos biomarcadores em relação às neoplasias estudadas. O sistema de múltiplos parâmetros de análise computadorizada de imagens, na atualidade, revelou em vários estudos ser mais rápido, confiável e menos passível de vieses tornando as pesquisas realizadas por este método de maior confiabilidade⁵.

Os objetivos deste estudo são avaliar: 1. a expressão citofotométrica computadorizada do marcador Caspase-3 no adenocarcinoma de cólon; 2. como ele se comporta nas fases evolutivas na classificação modificada de Dukes; 3. compará-lo nas neoplasias do lado direito e esquerdo do cólon.

MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Instituto de Pesquisas Médicas (IPEM) do Programa de Pós-Graduação em Princípios da Cirurgia do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba / Faculdade Evangélica do Paraná e no Laboratório de Citologia e Histopatologia Ltda, de Curitiba. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba.

O material de estudo foi constituído por amostras da peça cirúrgica de 19 casos de tumores de adenocarcinoma de cólon nos quais foram realizadas colectomias, fixados em formol e conservados em blocos de parafina. Este material foi proveniente do arquivo do Serviço de Patologia do Hospital das Forças Armadas de Brasília. Foi também registrado a classificação de Dukes (B ou C), o lado do cólon (direito ou esquerdo).

Os 19 blocos de parafina contendo adenocarcinoma de cólon foram re-examinados após cortes e coloração hematoxilina-eosina por dois patologistas para confirmação do laudo e avaliação da viabilidade do material que foi submetido à imunoistoquímica. As etapas principais para a realização do processo imunoistoquímico foram: desparafinização, recuperação dos antígenos com solução tampão de citrato, bloqueio de peroxidase endógena, incubação com o anticorpo primário policlonal anti-caspase-3 humana de coelho na concentração de proteína 1 mg / ml código N°. A 3537 (BIOGEN®), lavagem das lâminas com água destilada, banho em solução tampão de PBS, incubação com o anticorpo secundário biotilado (Biotinylated link universal), banho em solução tampão de PBS, incubação com Streptavidin, banho em solução tampão de PBS, preparação e colocação do cromógeno DAB (Diaminobenzidina),

coloração de fundo com hematoxilina e etiquetagem das lâminas. Terminada a confecção das lâminas foi realizada a análise quantitativa da imunoistoquímica, utilizando o software chamado IMMUNO®, sendo possível a leitura das 19 lâminas. Foram estudados o índice de marcagem e a densidade óptica para determinar a expressão do marcador (Figura 1).

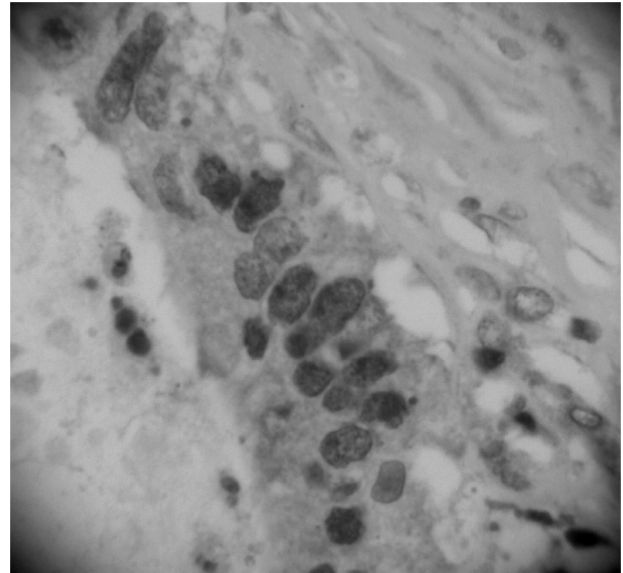


FIGURA 1 - Marcação imunoistoquímica para Caspase-3

Os resultados obtidos no estudo foram descritos por médias, valores mínimos, valores máximos e desvios-padrão. A comparação entre grupos definidos pelo lado do cólon e pela classificação de Dukes, foi feita usando-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. A condição de normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Valores de $P < 0,05$ indicaram significância estatística.

RESULTADOS

Os resultados encontrados foram baseados na amostra constituída por 19 adenocarcinomas de cólon, dos quais 13 eram moderadamente diferenciados, 4 bem diferenciados e 2 mucinosos. Dez tumores eram localizados no cólon esquerdo, 8 no direito e 1 no reto. Para o estudo da expressão citofotométrica do marcador Caspase -3 foram analisados dois parâmetros: índice de marcagem e densidade óptica. Na Tabela 1 são apresentados os valores de média, mínimo, máximo e desvios-padrão obtidos.

TABELA 1 - Valores estatísticos do índice de marcagem e densidade óptica do marcador caspase-3

Marcador	n	Média	Mínimo	Máximo	Desvio-padrão
Caspase-3					
Índice de marcagem	19	85,24	71,41	99,14	8,71
Densidade óptica	19	39,55	28,96	65,12	10,28

Para o índice de marcagem e a densidade óptica, testou-se a hipótese nula de que tumores com classificação tipo B de Dukes têm resultados iguais a tumores com classificação tipo C, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na Tabela 2 são apresentados os valores de média, mínimo, máximo e desvio-padrão obtidos para tumores na classificação de Dukes.

TABELA 2 - Valores estatísticos dos tumores na classificação Dukes x marcador caspase-3

Variável	Dukes	n	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Valor de P
Índice de marcagem	B	12	86,20	71,41	97,04	9,90	0,837
	C	7	85,66	71,31	99,14	6,56	
Densidade óptica	B	12	37,72	26,32	75,27	13,26	0,536
	C	7	42,71	33,49	47,78	5,18	

Para o índice de marcagem e a densidade óptica, testou-se a hipótese nula de que tumores de cólon direito têm resultados iguais a tumores de cólon esquerdo, versus a alternativa de resultados diferentes. Na Tabela 3 são apresentados os valores de média, mínimo, máximo e desvios-padrão obtidos para tumores de cólon direito e esquerdo.

TABELA 3 - Valores estatísticos do marcador Caspase-3 x lado do tumor

Variável	Lado do tumor	n	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Valor de P
Índice de marcagem	Direito	8	83,29	71,73	95,92	8,83	0,442
	Esquerdo	11	86,65	71,41	99,14	9,16	
Densidade óptica	Direito	8	39,44	32,66	47,78	6,29	0,657
	Esquerdo	11	43,29	26,32	75,27	13,24	

DISCUSSÃO

Durante a análise histopatológica realizada após a coleta do material, houve a necessidade de desprezar alguns blocos por apresentar defeitos como: tipo e tempo de fixação, ponto de fusão da parafina, desidratação defeituosa e quebra dos blocos por envelhecimento. Todo tecido que após a desparafinização, ou etapa anterior, era considerado de baixa qualidade foi excluído do estudo.

O trabalho com blocos armazenados para o uso em imunistoquímica necessita de bom preparo na unidade de processamento, sendo este o ponto mais importante para evitar grandes perdas. Neste caso, o objetivo principal ao se trabalhar com este tipo de material, é preservar a arquitetura tecidual e a morfologia celular para adequada exposição dos antígenos a serem marcados. Os fixadores são os responsáveis diretos para a formação de um bloco de bom estado para estudo. Atualmente, são universalmente aceitas as soluções de formaldeído em concentrações variadas na forma tamponada.

Neste trabalho utilizou-se a técnica imunistoquímica indireta da streptavidina-biotina. Este método é considerado 5 a 10 vezes mais sensível que o básico de imunistoquímica da avidina-biotina⁴.

Análise da imunistoquímica

Neste estudo utilizou-se os sistemas computadorizados de imagem que são modelos complexos de análise, desenvolvidos com o intuito de minimizar e tornar mais objetiva a análise dos fenômenos biológicos, através da quantificação e ampliação das variáveis, fato inexistente ou de difícil avaliação da imunistoquímica isolada disponível na literatura.

As pesquisas iniciais por este método foram desenvolvidas por KISS em 1989¹⁰ com versão inicial representada pelo SAMBA 200 e atualmente SAMBA 4000, versão utilizada neste trabalho. O desenvolvimento deste equipamento permitiu a ampliação das pesquisas desta área, inclusive às quantificações histoquímicas dos estudos de marcadores tumorais³.

O SAMBA utilizado na leitura das lâminas neste estudo pertence ao Instituto de Pesquisas Médicas - IPem do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. O software escolhido para este trabalho foi o Imunno 4.00, versão 2.0 que utiliza apenas dois parâmetros, considerando os valores mínimos de mensuração citofotométrica para a análise dos marcadores tumorais: índice de marcagem e densidade óptica. O fato decisivo na sua utilização é a facilidade de manuseio que é apresentado por inserção dos dados pelo sistema Windows da Microsoft[®].

Neste estudo foi mensurada a taxa de expressão da Caspase-3 pelo sistema SAMBA nos tecidos de adenocarcinoma de cólon. A vantagem deste método, quando comparado com os que determinam a taxa global de apoptose, como a determinação microscópica de apoptose por demonstração citológica⁸ ou o método TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling)^{1,2} ou até mesmo a citometria de fluxo é que, com a quantificação do marcador, se determina a seqüência das etapas da apoptose, marcando individualmente seu mecanismo celular mesmo antes das modificações fenotípicas, sendo portanto, mais precoce para a detecção do fenômeno.

A taxa de apoptose se torna progressiva na histologia das criptas colônicas normais com o epitélio se constituindo de células diferenciadas, pouca produção de muco, sem atividade mitótica, com presença de apoptose na parte distal terminando com descamação para a região intra-luminal. Este fato é reconhecido como fisiológico, representando inversão entre a atividade proliferativa e a apoptose¹³.

Neste estudo onde a média de expressão quantitativa de Caspase-3 foi 85,66%, tendo a amostra demonstrado homogeneidade, boa qualidade e revelando confiabilidade, não se pode relacionar este resultado com o índice de apoptose, mesmo sendo a efetora principal desta fase. Este fato pode ser atribuído à existência de vários mecanismos envolvidos na morte celular, sem fator isolado responsável pela operação, ocorrendo no câncer de cólon predomínio de fatores anti-apoptóticos em relação aos pró-apoptóticos, sendo neste estudo analisado apenas uma via. Torna-se claro que o marcador Caspase-3 possui marcagem de boa qualidade para os fatores de promoção da apoptose.

Na análise comparativa dos marcadores de apoptose

no adenocarcinoma de cólon, este trabalho confirma a alta expressão quantitativa de Caspase-3, demonstrando uma importância fundamental deste marcador no processo de morte celular que deve permanecer em estudo.

A frequência de apoptose e os tipos da classificação Dukes A, B, C e D se encontram na literatura com implicações diretas, embora algumas vezes não conclusivas. Em estudo similar que analisou 158 adenocarcinomas de cólon com o estudo de apoptose pelo sistema TUNEL, demonstraram índice apoptótico elevando-se de acordo com os tipos da classificação². Outros autores demonstraram o mesmo índice em elevação de Dukes A para B ou C, porém, sem relação com o D¹¹.

A amostra aqui estudada foi de 12 tumores Dukes B e 7 Dukes C, não sendo possível detectar alterações em relação à expressão da Caspase-3. Este fato pode ser atribuído ao

número pequeno de tumores da amostra, devendo ser reavaliado com amostra superior e tipos variados, englobando toda a classificação Dukes.

CONCLUSÕES

1. A caspase-3 possui alta expressão individual revelando-se marcador de boa utilidade no estudo do adenocarcinoma de cólon e da fase pró-apoptótica da sua tumorigênese pelo seu alto grau de índice de marcagem e densidade óptica.

2. Em relação à classificação Dukes não houve diferença entre os tipos B e C.

3. Não houve diferença entre o lado direito e esquerdo do cólon.

Tajra JBM, Malafaia O, Czezko NG, Santos EAA, Ribas CAPM, Wagaa-Gasser AM, Naufel Jr CR, Inácio CM. Citophotometric expression study of tumoral marker Caspase-3 on colon adenocarcinoma. ABCD Arq Bras Cir Dig 2007;20(4):250-3

ABSTRACT – Background – Colon adenocarcinoma is the second cause of cancer death in men and women, responsible for more than five million deaths each year. At the diagnosis, only 70% of tumors are resectable, 75% curative and 25% might have disease recurrence. Apoptosis is responsible for homeostatic equilibrium among cells. During the development of the cellular malignant degeneration, an abnormal apoptosis plays an important role in the neoplasm transformation. Caspase-3 is one of the most important molecules in apoptosis, considered as the principal executioner. Caspase-3 expression and its prognosis have been mentioned in a variety of study and revision as its role being emphasized since the onset of polyp formation until the malignant transformation, as apoptosis declines progressively. **Aim** – To evaluate the computerized image cytophotometric expression of Caspase-3 in colon adenocarcinoma; to evaluate in the respective phases of Dukes-modified Classification and to compare its expression on right-sided and left-sided colon tumors. **Methods** – Nineteen recovery of sampled-tissue in paraffin blocks confirmed by hematoxylin-eosin and submitted to immunohistochemistry streptavidin-biotin method using antibody polyclonal anti-caspase-3. Following this process, marked slides were submitted SAMBA reading using software IMUNNO 4.00. Three indexes were analyzed: label index, heterogeneity and optical density. Individual labeling, marker expression evaluation and predefined tumors groups under Dukes Classification and side of tumor occurrence were considered. **Results** – The average labeling index for caspase-3 was 85,24, where as for optical density was 39,55 pixels. According to Dukes Classification, 12 type B presented labeling index of 86,20 and optical density of 37,72 and for 7 samples type C labeling index corresponded to 85,66 and optical density equals to 42,71, unable to identify the difference regarding to Dukes Classification. Regarding to the side of tumor occurrence, 11 left-sided tumors had labeling index of 86,65 and optical density of 43,29 and the 8 right-sided tumors had labeling index of 83,29 and optical density of 39,44, unable to observe significant statistical difference. **Conclusion** – Caspase-3 presents a distinct value expression, revealing as useful marker in colon adenocarcinoma study and its proapoptotic phase at the tumorigenesis due to its high labeling index and optical density. Regarding to Dukes Classification there was no difference between types B and C, as well as right and left sided-related colon tumor occurrence.

HEADINGS – Colon adenocarcinoma. Tumoral marker Caspase-3. Immunohistochemistry.

REFERÊNCIAS

- Dowsett M, Archer C, Assersohn L, Gregory RK, Ellis PA, Salter J, Chang J, Mainwaring P, Boddington I, Johnston SRD, Powles TJ, Smith JE. Clinical studies of apoptosis and proliferation in breast cancer. *Endocrine-related cancer*, n. 6, p. 25-28, 1999.
- Evertsson SBZ, Zhang H, Jansson A, Sun XF. Apoptosis in relation to proliferating cell nuclear antigen and Dukes' stage in colorectal Adenocarcinoma. *Intestinal journal of Oncology*, v.15, p.53-58. 1999.
- gasparin Jr. P, Budel V, Petein M, Pasteels J, Kiss R. DNA histogram typing and DNA index measurements in 508 invasive breast carcinomas from fine-needle aspirates and imprint smears as opposed to formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Int. J. Oncology*, v.5, p.589 -595,1994.
- Giorno RA. A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagnosy Immunology*, v.2, p.161-166. 1984.
- Goddard JC, Sutton CD, Furness PN, Kockelbergh RC, O'Byrne KJ. A computer system analysis system for microvessel density measurement in solid tumours. *Angiogenesis*, v.5, p.15-20. 2002.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, v.100, p.57- 70. 2000.
- Huerta S, Goulet EJ, Livingston EJ. Colon cancer and apoptosis. *The American Journal of Surgery*, Dallas, v.191, p.517-526. 2006.
- 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*, v. 15 p. 1455-62. 1999.
- Jemal AMT, Ward E. Cancer statistics. *Cancer Journal Clinics*, v.55, p.10-30. 2005.
- Kiss R, de Launoit Y, Danguy A, Paridaens R, Pasteels J. Influence of pituitary grafts or prolactin administration on the hormone sensitivity of ovarian-hormone-independent mouse mammary MXT tumors. *Cancer Res.*, Baltimore, v.49, p.1945-2951, 1989.
- Mohamed A, Elkablawy PM, Williamso NK, Anderson N, Hamilton PW. Apoptosis and cell-cycle regulatory proteins in colorectal: relationship to tumor stage and patient survival. *The Journal of Pathology*, v.194, p.435-442. 2001.
- Nicholson DW, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin TT, Yu VL, Miller DK. Identification and inhibition of ICE / CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, v.376, p.37-43. 1995.
- Pinho MSL. A Historia Biomolecular do pólipo adenomatoso. *Revista Brasileira de Coloproctologia*, v.26, p.197-203. 2005.

Conflito de interesse: não há

Fonte financiadora: não há

Recebido para publicação em: 12/05/2007

Aceito para publicação em: 24/08/2007