

## ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA *KI67* EM LESÕES DE CERATOSE ACTÍNICA, CARCINOMA BASOCELULAR E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE PELE

ANALYSIS OF *KI67* PROTEIN EXPRESSION IN ACTINIC KERATOSIS LESIONS, BASAL CELL CARCINOMA AND SQUAMOUS SKIN CELLS CARCINOMA

Valéria Couto Quintão<sup>1</sup>  
Andréia Brito de Souza<sup>1</sup>  
Marcos Vinícius Macedo de Oliveira<sup>2</sup>  
Alfredo Maurício Batista de Paula<sup>3</sup>  
Camila Santos Pereira<sup>4</sup>

### RESUMO

Dentre os cânceres de pele não-melanomas, podemos encontrar o carcinoma basocelular e o carcinoma de células escamosas de pele, sendo que este se origina de lesões não invasivas, tais como a ceratose actínica. Os cânceres são resultantes de alterações genéticas, fatores ambientais e do estilo de vida do indivíduo. A alta taxa de proliferação celular desses tumores está ligada com o crescimento e desenvolvimento das células neoplásicas, o que pode fornecer informações sobre o prognóstico e a agressividade dos cânceres. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão da proteína *Ki67* nas lesões de ceratose actínica, carcinoma basocelular e carcinoma de células escamosas de pele. Em suma, não foi encontrada nenhuma diferença estatística entre os grupos de lesões analisadas nesse estudo. No entanto, foi observada diferença estatística da expressão do *Ki67* nos controles quando comparada com as demais lesões estudadas ( $p < 0,001$ ), que pode ser explicada pela heterogeneidade quanto ao perfil de expressão da proteína *Ki67* nas células normais ou neoplásicas. O baixo número de casos nesse estudo pode explicar a falta de uma associação estatística significativa entre os grupos de lesão e a expressão da proteína *Ki67*.

**Palavras-Chave:** Índice de proliferação. *Ki67*. Não-melanoma.

### ABSTRACT

Among the non-melanoma skin cancers, we can find the basal cell carcinoma and the squamous skin cells carcinoma, which comes from non-invasive lesions such as actinic keratosis. The Cancers are caused by genetic, environmental factors and person's lifestyle. The high rate of cell proliferation of these tumors is linked to the growth and development of cancer cells, which may provide information about prognosis and the aggressiveness of cancers. Thus, the aim of this study was to evaluate the expression of *Ki67* protein in lesions of actinic keratosis, basal cell carcinoma and squamous skin cells carcinoma. In short, it wasn't found any statistical difference between the groups of lesions analyzed in this study. However, a statistical difference of *Ki67* expression in controls was observed when compared with other studied lesions ( $p < 0,001$ ), which can be explained by heterogeneity regarding the expression profile of *Ki67* protein in normal and neoplastic cells. The low number of cases in this study may explain the lack of a statistically significant association between injury groups and the expression of *Ki67* protein.

**Keywords:** Proliferation index. *Ki67*. Non-melanoma.

<sup>1</sup> Graduação em Biomedicina. Faculdades Unidas do Norte de Minas. Instituto Ciências da Saúde.

<sup>2</sup> Doutor (Dr.), graduação em Ciências Biológicas, vínculo institucional (Departamento de Biomedicina. Instituto de Ciências da Saúde. Faculdades Unidas do Norte de Minas).

<sup>3</sup> Doutor (Dr.), graduação em Odontologia, vínculo institucional (Universidade Estadual de Montes Claros - UNIMONTES).

<sup>4</sup> Mestre (Ms.), graduação em Ciências Biológicas.

Autor para correspondência: Dr. Marcos Vinícius Macedo de Oliveira, endereço: Avenida Osmane Barbosa, 11111 - Universitário, Montes Claros, telefone: (38) 2101-9292 E-mail: mvmoliv@gmail.com.

## INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença de etiologia multifatorial, resultante, principalmente, de alterações genéticas, fatores ambientais e do estilo de vida (MADAN *et al.*, 2010). Dentre os diferentes tipos de câncer destaca-se o câncer de pele, que se apresenta como câncer da pele melanoma (CPM) e câncer da pele não melanoma (CPNM), que inclui o carcinoma basocelular e o carcinoma de células escamosas de pele (KIM; ARMSTRONG, 2012). Dados epidemiológicos nacionais mostram que o CPNM é a neoplasia maligna de maior incidência no Brasil, apesar da subnotificação reconhecida pelo próprio Ministério da Saúde, constituindo um grave problema de saúde pública, uma vez que, apesar da baixa letalidade, em alguns casos pode levar a deformidades físicas e ulcerações graves, consequentemente, onerando os serviços de saúde (MUTTI *et al.*, 2004).

No Brasil, observa-se um aumento no número de câncer de pele não melanoma, especialmente no estado de São Paulo e na região Sul, em decorrência de múltiplos fatores epidemiológicos: franca exposição solar, predominância da raça branca e grande quantidade de imigrantes caucasianos (KIM; ARMSTRONG, 2012).

Os carcinomas basocelulares (CBC) constituem aproximadamente 80% das neoplasias malignas de pele, excluindo-se os melanomas, sendo sua origem fortemente associada à exposição excessiva à radiação ultravioleta. Apesar de raramente metastáticos, são localmente agressivos em decorrência de seu fenótipo notadamente invasivo. Já os carcinomas de células escamosas de pele (CCEP) representam 20% das neoplasias malignas cutâneas, originam-se, a partir da proliferação de células escamosas atípicas, e apresentam caráter invasor que podem resultar em metástases. Em geral, o CCE's de pele originam-se, em regiões expostas ao sol, e podem surgir, a partir de lesões não-invasivas, como por exemplo, ceratose actínicas (CA), queilites actínicas e leucoplasias orais (MARTINEZ *et al.*, 2006).

A identificação da expressão da proteína *Ki67* pode ser usada como forma de estimar a taxa de proliferação das neoplasias malignas humanas, uma vez que participa de todas as fases ativas do ciclo celular (KOOHDANI *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2012). O aumento da proliferação celular pode resultar em elevada taxa de recidiva, diminuição da sobrevida e aumento da mortalidade (BERESFORD *et al.*, 2006; HAFEEZ *et al.*, 2013). O conhecimento sobre a expressão de proteínas envolvidas com a proliferação celular é fundamental para a identificação de indivíduos geneticamente predispostos, além de auxiliar na detecção precoce da neoplasia possibilitando um melhor prognóstico. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão da proteína *Ki67* nas lesões de ceratose actínia, carcinoma basocelular, carcinoma de células escamosas de pele e pele normal (controles).

## METODOLOGIA

### *PACIENTES E AMOSTRAS*

O trabalho envolveu a coleta de dados clínico-epidemiológicos e de materiais de biópsia de 59 pacientes atendidos na cidade de Montes Claros – Minas Gerais, no período de 2000 a 2008, tanto na rede pública quanto na rede privada que prestam o serviço de oncologia. As informações clínicas foram obtidas a partir dos arquivos médicos dos pacientes. O estudo compreendeu 13 casos de carcinomas de células escamosas de pele, 19 casos de carcinoma basocelular, 10 casos de ceratose actínica e 17 casos de pele normal (controle) provenientes de tecidos excedentes de cirurgia plástica de mama. As lesões foram fixadas em formalina e coradas com hematoxilina e eosina para análises morfológicas. As análises foram realizadas por um patologista para confirmação do diagnóstico sob microscópio de luz.

As amostras de carcinoma basocelular foram gradadas de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) que permite a identificação de grupos de baixo e alto risco para esse tipo lesão. O grupo de baixo risco representa as lesões do tipo superficial e nodular, já o grupo de alto risco compreende as lesões mais infiltrativas de acordo com o comportamento agressivo da lesão (LEBOIT, 2006). As amostras de carcinomas de células escamosas de pele foram gradadas de acordo com os critérios seguidos por Broder's(1921) e Bryne(1998). Nas lesões de ceratose actínica utilizou-se como critério de avaliação histopatológica os queratinócitos da neoplasia intra-epitelial(RAMOS-CEBALLOS *et al.*, 2008). Todos os preceitos éticos foram estabelecidos para a realização da pesquisa que possui aprovação pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Estadual de Montes Claros sob parecer: 1367/2009.

### *IMUNOHISTOQUÍMICA*

Cortes histológicos de 5 um de espessura das amostras em estudo foram desparafinizados em xilol e reidratados com soluções de álcool. A recuperação antigênica foi realizada em autoclave a 121°C por 5 minutos em tampão *Trilogy*. A peroxidase endógena foi bloqueada com dois banhos de peróxido de hidrogênio durante 15 min. Houve incubação com anticorpo primário *Ki67*(1:100, clone MIB1), por 18 horas. Posteriormente as seções foram cuidadosamente lavadas e recém-incubadas com o anticorpo secundário biotilado polivalente (Kit LSAB) e streptavidina-peroxidase (kit LSAB), ambos durante 30 min a temperatura ambiente. Após lavagem, as amostras foram reveladas com *diaminobenzidinetetrahydrochloride* (DAB). Em seguida, realizou-se a contracoloração com hematoxilina de *Mayer*, e posteriormente foram montadas com meio *EVER-*

*mout*. Os controles negativos foram obtidos através da substituição do anticorpo primário pela incubação das lâminas com tampão PBS (1X). Apenas as células neoplásicas que apresentaram coloração nuclear amarronzada foram consideradas positivas.

### **CONTAGEM E DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR**

Os procedimentos de contagem foram realizados por um único investigador. Foram tiradas fotografias no aumento de 400X e a contagem foi realizada através do programa *ImageJ*<sup>®</sup>, versão 1.44, para Windows<sup>®</sup>. A contagem de células ocorreu em 10 campos de cada lâmina onde a imunexpressão de *Ki67* foi mais acentuada. Nas amostras de pele normal e ceratose actínica, as contagens aconteceram no tecido epitelial. Já no carcinoma basocelular e carcinoma de células escamosas de pele as contagens ocorreram no fronte invasivo da lesão. O índice de proliferação celular foi determinado pela média de proporção de células marcadas sobre o total de células neoplásicas ou epiteliais (em casos de pele normal) presentes no campo de imagem fotografada.

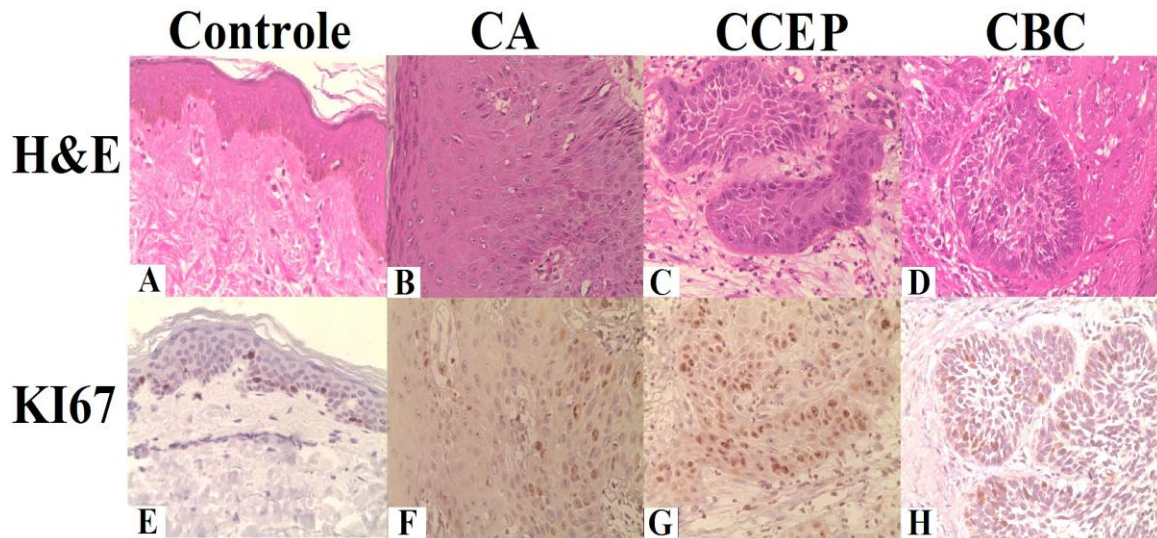
### **ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS**

Os dados foram digitalizados no *software* de estatística *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS<sup>®</sup>), versão 22.0, para Windows<sup>®</sup>. As médias dos índices de proliferação celular dos grupos investigados foram avaliadas pela análise de variância (Anova) para identificação de alterações entre os grupos, com posterior correção de Bonferroni para comparar as médias entre os grupos de lesões. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  ao teste Anova e  $p < 0,005$ , após as correções de Bonferroni.

### **RESULTADOS**

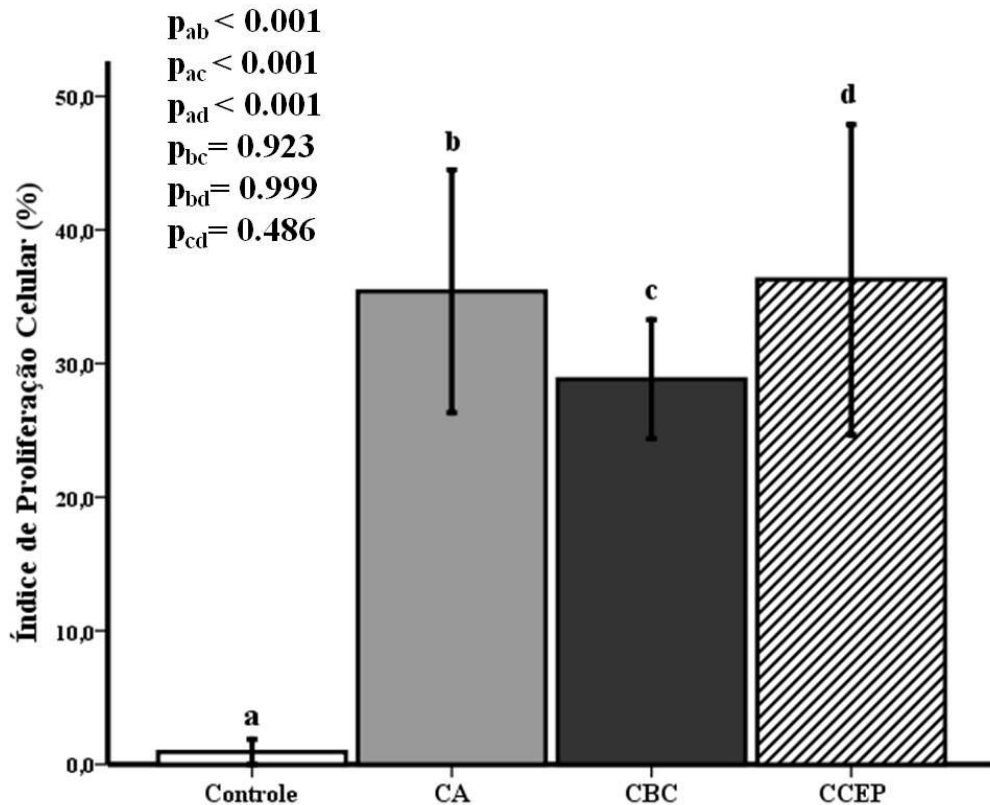
Não houve diferenças estatísticas quanto à expressão do *Ki67* (Figura1) entre as lesões de ceratose actínica, carcinoma de células escamosas de pele e carcinoma basocelular, ou seja, não ocorreram diferenças em relação à proliferação celular entre as diferentes lesões ( $p > 0,05$ ). No entanto, observou-se diferença estatística na expressão do *Ki67* (Figura2) entre os controles de pele normal quando comparada com as demais lesões do estudo ( $p < 0,001$ ).

**Figura 1** - Coloração de Hematoxilina e eosina (H & E) em A, B, C e D. Imunolocalização do *Ki67*(E, F, G, H) no epitélio normal (controle), epitélio da ceratose actínica (CA) e no parênquima da lesão no carcinoma de células escamosas de pele (CCEP) e carcinoma basocelular (CBC). Coloração: DAB. Contra-coloração: hematoxilina de Mayers. Aumento de 400x.



Fonte: Próprios autores (2015)

**Figura 2** - Gráfico representando as médias do índice de proliferação celular dos grupos de amostras investigados. Teste estatístico: análise de variância com correções de Bonferroni. Valores estatisticamente significativos:  $p < 0,001$ .



Fonte: Próprios autores(2015)

## DISCUSSÃO

Neste estudo, comparou-se a expressão do marcador *Ki67* em indivíduos portadores de CBC, CCEP e CA, com controles representados por amostras de pele normal. Não foi encontrada nenhuma diferença estatística entre os grupos de lesões analisadas nesse estudo. Em outras pesquisas foram encontrados resultados semelhantes, onde não observaram nenhuma diferença estatística na expressão de *Ki67* em tumores de pele (LI *et al.*, 2002).

No entanto, alguns estudos apontaram uma diferença de expressão de *Ki67* em lesões de carcinomas de células escamosas de pele quando comparadas com CA's. A expressão de *Ki67* também esteve associada a um comportamento mais agressivo de lesões (BATINAC *et al.*, 2004). Já em outra pesquisa foi observado que a presença do *Ki67* foi associada a um comportamento mais agressivo em relação ao CBC quando comparado com CA e CCEP (ZDUNIAK *et al.*, 2014).

Por fim, outros estudos constataram que a expressão do *Ki67* em câncer de pele tem associação com a metástase e com o fator de prognóstico (GIMOTTY *et al.*, 2005; ROYCHOWDHURY *et al.*, 1996; STOLL *et al.*, 2000). Sendo assim, a baixa quantidade de amostras obtidas pode ter sido conivente para que não houvesse diferenças estatísticas entre as lesões.

Análises do ciclo celular revelaram que a proteína *Ki67* é um antígeno associado à proliferação, que é expresso em todas as partes ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M), mas é ausente no descanso celular (MATSUO *et al.*, 2004). O crescimento e desenvolvimento dos cânceres estão ligados com taxas elevadas de proliferação celular, sendo assim, determinar esse índice de proliferação é de suma importância por fornecer informações essenciais sobre o prognóstico e a agressividade dos tumores. Além disso, a avaliação do índice de proliferação celular em determinadas neoplasias pode ser útil para direcionar alguns protocolos de tratamentos cujas drogas atuam em pontos específicos nas vias de divisão celular (BERESFORD *et al.*, 2006).

Uma importante via de sinalização intracelular, a *hedgehog* está relacionada à patogênese do CBC, desempenhando funções na regulação da proliferação e diferenciação das células estaminais dos queratinócitos. Em sua função de gene supressor de tumor o *patch 1 (PTCH1)* inibe a atividade do protooncogene de *smoothed (SMO)*. A sinalização de *SMO* resulta na ativação da transcrição de genes alvo do *hedgehog*, que por sua vez responde aumentando a proliferação de células estaminais de queratinócitos. A ocorrência de mutação do gene *PTCH1*, que faz com que ele perca sua função, liberando a atividade regulada de *SMO* e propiciando a expansão clonal de células desreguladas dentro dos queratinócitos. O que resulta na disseminação de células precursoras do cancro do nicho em busca de novas células na pele, originando assim um CBC. A capacidade proliferativa dos queratinócitos tem sido relacionada à desregulação da via de sinalização *hedgehog* por não realizar

paragem do ciclo celular em resposta ao inibidor de ciclo celular *p21*(FELLER *et al.*, 2016; TANG *et al.*, 2012).

Outro gene supressor de tumor o *p53* também desempenha funções importantes no carcinoma basocelular, porém está relacionado a eventos finais na tumorigênese relacionado à sua progressão. A mutação de *p53* está frequentemente relacionada à assinatura típica de UV, este tipo de mutação no DNA é um fator causador de melanoma e outros tipos de cancros de pele(D'ORAZIO *et al.*, 2013). Tem sido relatado (KOSEOGLU *et al.*, 2009) que, casos positivos de *p53* têm apresentado uma média significativamente alta no índice de *Ki67*(KOSEOGLU *et al.*, 2009).

## CONCLUSÃO

Em nosso estudo a expressão de *Ki67* não diferiu entre os diferentes tipos de lesões investigadas nesse estudo. No entanto, alguns estudos têm apontado a ocorrência de diferença de expressão entre marcadores de proliferação celular entre lesões de pele. Muitos tumores apresentam grande quantidade de alterações em proteínas importantes do controle do ciclo celular, o que pode explicar essas diferenças quanto à expressão da proteína *Ki67*. A pequena quantidade de lesões em cada grupo investigado pode ter colaborado para que não achássemos diferenças quanto à expressão de *Ki67*, o que sugere que novos estudos devem ser explorados para esclarecer mais a respeito do comportamento clínico dessas lesões.

## Agradecimento

Autores agradecem à Faculdades Unidas do Norte de Minas - FUNORTE pela instigação e oportunidade concedida à Valéria Couto Quintão e Andréia Brito de Souza no programa de iniciação científica institucional.

## REFERÊNCIAS

- BATINAC, T.; ZAMOLO, G.; JONJIC, N.; GRUBER, F.; PETROVECKI, M. *p53* protein expression and cell proliferation in non-neoplastic and neoplastic proliferative skin diseases. **Tumori**, v. 90, n. 1, p. 120-127, 2004.
- BERESFORD, M. J.; WILSON, G. D.; MAKRIS, A. Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications. **Breast Cancer Res.**, v. 8, n. 6, 2006.
- BRODERS, A. C. Squamous-Cell Epithelioma of the Skin: A Study of 256 Cases. **Ann Surg.**, v. 73, n. 2, p. 141-160, 1921.

- BRYNE, M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? **Oral diseases**, v. 4, n. 2, p. 70-77, 1998.
- D'ORAZIO, J.; JARRETT, S.; AMARO-ORTIZ, A.; SCOTT, T. UV radiation and the skin. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 6, p. 12222-12248, 2013.
- FELLER, L.; KHAMMISSA, R. A.; KRAMER, B.; ALTINI, M.; LEMMER, J. Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the head and face. **Head Face Med**, v. 12, n. 1, 2016.
- GIMOTTY, P. A.; VAN BELLE, P.; ELDER, D. E.; MURRY, T.; MONTONE, K. T.; XU, X.; HOTZ, S.; RAINES, S.; MING, M. E.; WAHL, P.; GUERRY, D. Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 31, p. 8048-8056, 2005.
- HAFEEZ, F.; NEBOORI, H. J.; HARIGOPAL, M.; WU, H.; HAFETY, B. G.; YANG, Q.; SCHIFF, D.; MORAN, M. S. Is Ki-67 expression prognostic for local relapse in early-stage breast cancer patients treated with breast conservation therapy (BCT)? **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 87, n. 2, p. 344-348, 2013.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Câncer na criança e no adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade**. INCA, 2008.
- KIM, R. H.; ARMSTRONG, A. W. Nonmelanoma skin cancer. **Dermatol Clin**, v. 30, n. 1, p. 125-139, 2012.
- KOOHDANI, F.; SASANI, F.; MOHAMMAD, K.; MEHDIPOUR, P. Comparison of Ki-67 antigen expression and K-ras mutation in lung tumours induced by urethane in mice. **Singapore Med J**, v. 50, n. 7, p. 729-733, 2009.
- KOSEOGLU, R. D.; SEZER, E.; EYIBILEN, A.; ALADAG, I.; ETIKAN, I. Expressions of p53, cyclinD1 and histopathological features in basal cell carcinomas. **J Cutan Pathol**, v. 36, n. 9, p. 958-965, 2009.
- LeBOIT, P. E. **Pathology and genetics of skin tumours**. IARC, 2006.
- LI, N.; MANGINI, J.; BHAWAN, J. New prognostic factors of cutaneous melanoma: a review of the literature. **Journal of cutaneous pathology**, v. 29, n. 6, p. 324-340, 2002.
- MADAN, V.; LEAR, J. T.; SZEIMIES, R. M. Non-melanoma skin cancer. **Lancet**, v. 375, n. 9715, p. 673-685, 2010.
- MARTINEZ, M. A. R.; FRANCISCO, G.; CABRAL, L. S.; RUIZ, I. R. G.; FESTA NETO, C. Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, 2006.
- MATSUO, S. E.; MARTINS, L.; LEONI, S. G.; HAJJAR, D.; RICARTE-FILHO, J. C. M.; EBINA, K. N.; KIMURA, E. T. Marcadores biológicos de tumores tireoidianos. **Arq. bras. endocrinol. metab.**, v. 48, n. 1, p. 114-125, 2004.
- MUTTI, A. E. C.; MENEZES, A.; MAGALHÃES, T. D. N.; LOPES, M. D. L. Distribuição da procedência de pacientes operados de câncer de pele não-melanoma no Hospital Aristides Maltez e



sua relação com mapeamento populacional no estado da Bahia. **Revista Baiana Saúde Pública**, v. 8, n. 2, p. 227-241, 2004.

PEREIRA, C. S.; OLIVEIRA, M. V.; FRAGA, C. A.; BARROS, L. O.; DOMINGOS, P. L.; ROY, A.; PAULA, A. M.; GUIMARAES, A. L. Impact of the epithelial dysplasia grading and Ki67 proliferation index in the adjacent non-malignant mucosa on recurrence and survival in head and neck squamous cell carcinoma. **Pathol Res Pract.**,v. 208, n. 11, p. 651-656, 2012.

RAMOS-CEBALLOS, F. I.; OUNPRASEUTH, S. T.; HORN, T. D. Diagnostic concordance among dermatopathologists using a three-tiered keratinocytic intraepithelial neoplasia grading scheme. **J Cutan Pathol.**,v. 35, n. 4, p. 386-391, 2008.

ROYCHOWDHURY, D. F.; TSENG JUNIOR, A.; FU, K. K.; WEINBURG, V.; WEIDNER, N. New prognostic factors in nasopharyngeal carcinoma. Tumor angiogenesis and C-erbB2 expression. **Cancer**, v. 77, n. 8, p. 1419-1426, 1996.

STOLL, C.; BARETTON, G.; AHRENS, C.; LOHRS, U. Prognostic significance of apoptosis and associated factors in oral squamous cell carcinoma. **Virchows Arch.**,v. 436, n. 2, p. 102-108, 2000.

TANG, J. Y.; MACKAY-WIGGAN, J. M.; ASZTERBAUM, M.; YAUCH, R. L.; LINDGREN, J.; CHANG, K.; COPPOLA, C.; CHANANA, A. M.; MARJI, J.; BICKERS, D. R.; EPSTEIN JUNIOR, E. H. Inhibiting the hedgehog pathway in patients with the basal-cell nevus syndrome. **N Engl J Med.**,v. 366, n. 23, p. 2180-2188, 2012.

ZDUNIAK, K.; AGRAWAL, S.; SYMONOWICZ, K.; JURCZYSZYN, K.; ZIOLKOWSKI, P. The comparison of nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate (NUCKS) with Ki67 proliferation marker expression in common skin tumors. **Pol J Pathol.**,v. 65, n. 1, p. 48-54, 2014.