

Expresia Ki-67 în evoluția limfomului Hodgkin

Ki-67 expression in Hodgkin's lymphoma progression

Corina Flangea^{1*}, S. Gîju², Elena Potencz³, Rodica Mihăescu⁴, A. Anghel¹,
Marilena Motoc¹, C. Dogaru¹

¹ UMF "Victor Babeș" Timișoara, Catedra de Biochimie

² Spitalul Clinic Nr 1 Județean, Laboratorul Central de Analize Medicale

³ UMF "Victor Babeș" Timișoara, Catedra de Morfopatologie

⁴ UMF "Victor Babeș" Timișoara, Disciplina de Hematologie

Rezumat

Studiul limfomului Hodgkin prin expresia imunohistochimică a Ki-67 în celulele Hodgkin și Sternberg-Reed poate preciza modalitatea evolutivă a acestor cazuri.

Scopul studiului este acela de a identifica categoria de bolnavi cu evoluție nefavorabilă înainte de începerea vreunui protocol terapeutic.

Am studiat 63 de cazuri de limfom Hodgkin clasic internate la Clinica de Hematologie a Spitalului Municipal Timișoara în perioada ianuarie 2000 - iunie 2004. Diagnosticul histopatologic a fost efectuat utilizând colorația Hematoxilină-Eozină iar pentru aprecierea proliferării tumorale am efectuat colorația imunohistochimică pentru Ki-67 (clona MIB1).

Rezultatele noastre au evidențiat o relație directă între creșterea expresiei indicelui de proliferare tumorală Ki-67 și progresia bolii ($p < 0.001$). Astfel, pentru stadiile I și II, expresia Ki-67 nu depășește 49% în timp ce pentru stadiul III și IV majoritatea cazurilor au o expresie a Ki-67 superioară procentului de 50%. Nu am observat nici o asocieră între tipul histologic și expresia Ki-67 ($p < 1$).

Considerăm extrem de utilă folosirea acestei colorații, rar utilizată în România, deoarece acești bolnavi evoluează nefavorabil datorită stadializării necorespunzătoare, independent de experiența medicului clinician. Fără utilizarea acesteia, posibilitatea de încadrare eronată a unui limfom agresiv crește semnificativ.

În studiul nostru, creșterea scorului Ki-67 are loc în paralel cu evoluția bolii. Nu am putut stabili vreo corelație între tipul histologic și scorul Ki-67. Dacă apare un scor înalt al expresiei Ki-67 în stadiile incipiente recomandăm reinvestigarea și restadializarea cazului deoarece cu mare probabilitate există ganglioni trecuți cu vederea.

Cuvinte cheie: limfom Hodgkin, Ki-67, stadiu avansat.

*Adresa pentru corespondență: Corina Flangea, Str. Pan Halipa Bl A20 Sc. B, Et. III, Ap. 14, Timișoara, cod 300358, Jud. Timiș, Romania.

Tel: 0256/227321, Mobil: 0722/934471, E-mail: flangeacorina@yahoo.com

Abstract

Hodgkin lymphoma study by immunohistochemical expression of Ki-67 in Hodgkin and Sternberg-Reed cells can precise these cases evolutive way.

The aim of the study is identifying the worse evolution patients' category before the therapy starting 63 hospitalized in Hematology Department of City Hospital Timișoara cases of Classical Hodgkin's disease were studied from January 2000 – June 2004. Histopathological diagnostic was performed using Hematoxyline – Eosin staining and for revealing the tumoral developments Ki-67 (clone MIB1) immunohistochemical staining were performed.

In our study, the results were noticed a direct relation between the rise of tumoral proliferation index expressions of Ki-67 and progression of the disease ($p < 0.001$). However, for the I and II stages of the disease Ki-67 expression doesn't overcome 49% while for the III and IV stages the most of the cases show Ki-67 expression values of over 50%. No connection we can be noticed between the histological type and Ki-67 expression ($p < 1$).

This staining is very important, although less used in Romania, because these patients have bad prognosis due to inadequate staging independent by clinical hematologist experience. Without this expression rises the erroneous possibility of missing an aggressive lymphoma.

In our study, the increasing Ki-67 expression occurs in the same time with disease progression. We couldn't establish a correlation between histological type and Ki-67 index. If it meets with a high Ki-67 index in incipient stages, we recommend reinvestigation and restaging case because some lymph nodes could be overlooked.

Keywords: Hodgkin's lymphoma, Ki-67, advanced stage

Introducere:

Analiza profilului proliferativ al limfomului Hodgkin studiind expresia imunohistochimică a Ki-67 la nivelul celulelor Hodgkin și Sternberg-Reed, va delimita cazurile cu o proliferare tumorală intensă de cele cu o proliferare tumorală mai puțin intensă la care vor permite adaptarea unor regimuri terapeutice individualizate fiecărui caz în parte^{2,9}.

Ki-67 este o proteină nucleară care suferă fosforilări și defosforilări în cursul mitozei, având un rol reglator al ciclului celular^{4,11}. Ki-67 joacă un rol important în menținerea proliferării celulare, fiind exprimat în toate fazele ciclului celular, cu excepția fazei G0 și este folosit ca marker de proliferare tumorală în majoritatea tumorilor maligne^{1,8}.

În lucrarea de față ne-am propus să identificăm acea categorie de bolnavi cu limfom Hodgkin agresiv înainte de începerea vreunui protocol terapeutic.

Material și metodă

Lotul de studiu cuprinde 63 de cazuri internate în Clinica de Hematologie a Spitalului Municipal Timișoara în perioada ianuarie 2000 – iunie 2004. Diagnosticul de limfom Hodgkin clasic a fost stabilit în urma examenului histopatologic. Biopsia ganglionară s-a prelucrat în cadrul laboratorului de Anatomie Patologică al aceluiași spital. Toți ganglionii au fost fixați în formol 10% și apoi incluși la parafină și secționați la 4μ. S-au efectuat colorațiile uzuale cu Hematoxilină-Eozină și reacția PAS.

Am utilizat anticorpus monoclonal Ki-67 (clona MIB1) înainte de începerea vreunui protocol terapeutic. Pentru reacțiile imunohistochimice am utilizat reactivi Dako, iar pentru demascarea antigenului am utilizat Target Retrieval Solution (Dako). Diluția folosită de noi pentru anticorpus primar monoclonal Ki67 (clona MIB1) a fost de 1/50 în soluție tampon Tris-HCl, pH 7,6.

Vizualizarea am efectuat-o cu sistemul LSAB-HRP Peroxidase/DAB iar contracolora-

Tabelul 1. Expresia Ki-67 în funcție de stadiul bolii și de tipul histologic.

Stadiu clinic	Expresia Ki-67											
	Număr cazuri Scor înalt (75-100%)			Număr cazuri Scor mediu (50-74%)			Număr cazuri Scor mediu (25-49%)			Număr cazuri Scor jos (0-24%)		
	LHC- CM	LHC- DL	LHC- SN	LHC- CM	LHC- DL	LHC- SN	LHC- CM	LHC- DL	LHC- SN	LHC- CM	LHC- DL	LHC- SN
Stadiul I	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	1
Stadiul II	-	-	-	1	-	-	5	2	2	1	1	-
Stadiul III	6	1	1	7	6	2	4	5	4	-	-	-
Stadiul IV	3	1	-	1	1	-	2	2	2	-	-	-

rea cu Hematoxină. Produsul final de reacție are culoare maro și localizare nucleară. Componentele cu o reacție negativă au o culoare albastră.

Imunocolorarea a fost apreciată semicantitativ³:

- Scor jos: 0-24% nucleu pozitiv;
- Scor mediu cu două trepte:
 - 25-49%;
 - 50-74%;
- Scor înalt: 75-100%.

Rezultate

Majoritatea pacienților luați în studiu sunt persoane tinere, 43% dintre ei având sub 30 ani: 11-20 ani = 15 cazuri (23%); 21-30 ani = 13 cazuri (20%); 31-40 ani = 9 cazuri (14%); 41-50 ani = 11 cazuri (19%); 51-60 ani = 7 cazuri (11%); peste 60 ani = 8 cazuri (13%).

Din punct de vedere clinic, stadializarea a fost făcută conform clasificării Costwolds: 36 cazuri (56%) au fost diagnosticați cu stadiul III, 12 cazuri (19%) în stadiul II, 12 cazuri (19%) în stadiul IV și doar 3 (6%) în stadiul I (Tabelul 1).

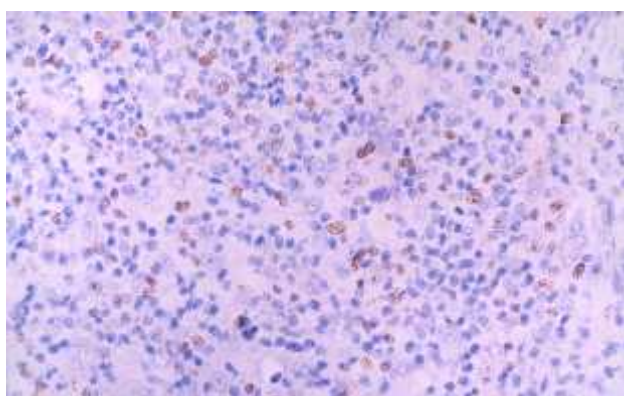


Figura 1. Limfom Hodgkin clasic cu celularitate mixtă, scor jos. Colorație Ki-67 – LSAB2/DAB x 400 (Colecție personală)

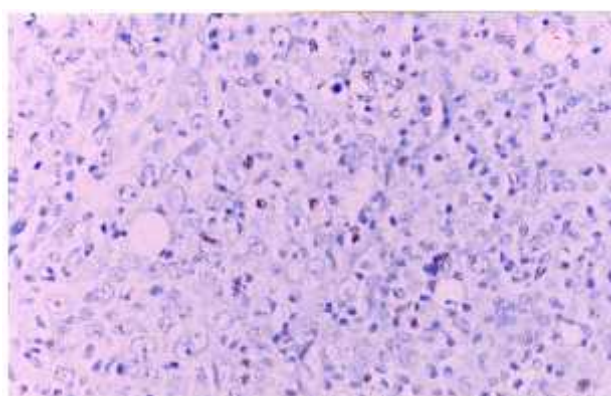


Figura 2. Zonă cu o expresie a Ki-67 cu scor jos într-un limfom Hodgkin cu depleție limfocitară. Colorație Ki-67 – LSAB2/DAB x 400 (Colecție personală)

Diagnosticul histopatologic a fost efectuat utilizând clasificarea REAL/WHO. Folosind colorațiile uzuale am studiat arhitectura ganglionilor, morfologia celulelor maligne precum și caracteristicile fondului celular reactiv. Din totalul pacienților 32 cazuri (50%) au fost cu celularitate mixtă (LHC-CM), 12 cazuri (19%) au fost cu scleroză nodulară (LHC-SN), 19 cazuri (29%) au fost cu depleție limfocitară (LHC-DL); nu am întâlnit nici un caz de limfom Hodgkin clasic forma bogat limfocitară

(LHC-BL) (Tabelul I).

În studiul nostru, expresia Ki-67 crește o dată cu progresia bolii. Pentru stadiile I și II, expresia Ki-67 nu depășește 49% cu excepție unui singur caz, în timp ce pentru stadiile III și IV majoritatea cazurilor au o expresie a Ki-67 superioară procentului de 50%. Distribuția este semnificativă din punct de vedere statistic (9 grade de libertate; $\chi^2 = 35.0201149425287$; $p \leq 0,001$).

Nu am observat nici o asocierie între ti-

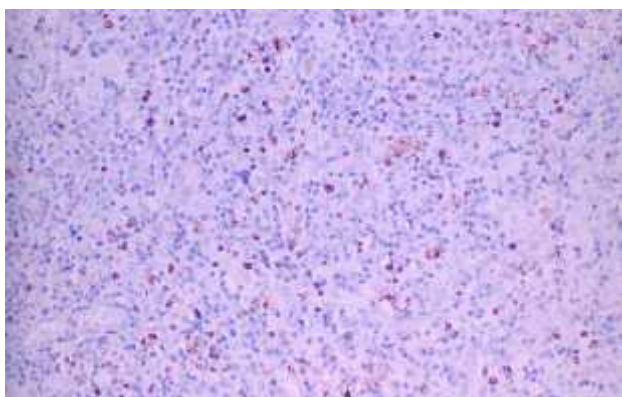


Figura 3. Expresia Ki-67 scor mediu în nucleii diferitelor tipuri de celule. Colorație Ki-67 – LSAB2/DAB x 200 (Colecție personală)

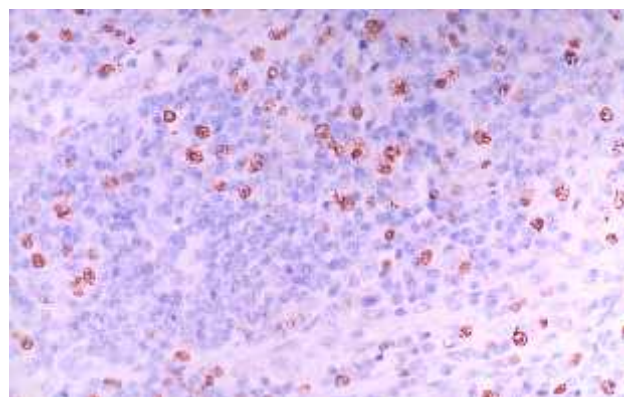


Figura 4. Limfom Hodgkin clasic cu celularitate mixtă, expresie a Ki-67 scor mediu prezentă la un bolnav cu stadiul III. Colorație Ki-67 – LSAB2/DAB x 400 (Colecție personală)

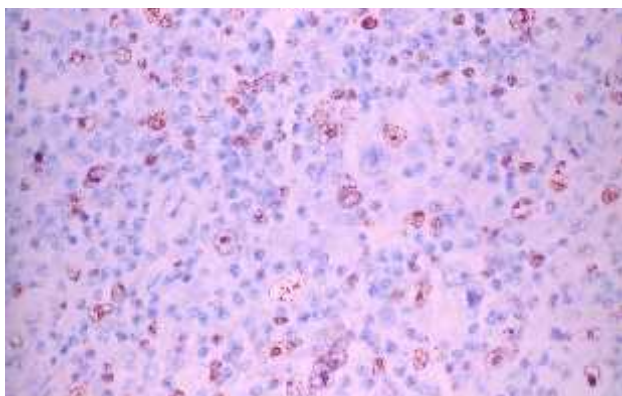


Figura 5. Nucleii celulelor Sternberg-Reed cu expresia Ki-67 intens pozitivă într-un limfom Hodgkin clasic cu depleție limfocitară. Colorație Ki-67 – LSAB2/DAB x 400 (Colecție personală)

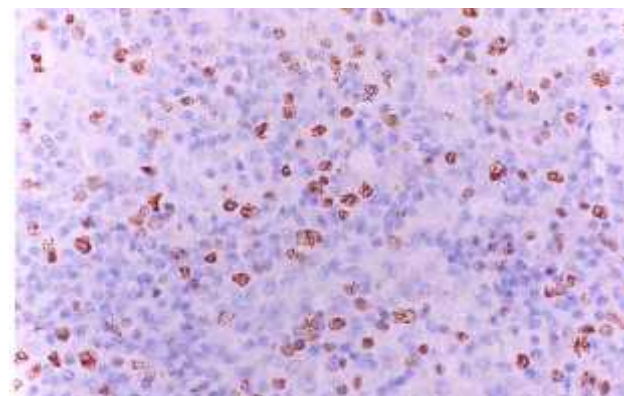


Figura 6. Expresia Ki-67 cu scor înalt în nucleii histiocitelor la un bolnav cu stadiul IV. Colorație Ki-67 – LSAB2/DAB x 400 (Colecție personală)

pul histologic și expresia Ki-67 chiar dacă subtipul cu depleție limfocitară este considerat cel mai agresiv. Toate tipurile de limfom Hodgkin clasic au o repartitie relativ uniformă în toate intervalele de expresie, păstrând aceleași proporții, indiferent de forma histologică. Distribuția este statistic nesemnificativă (6 grade de libertate; $\chi^2 = 5.61779246067756$; $p \leq 1$)

Expresia Ki-67 este exemplificată în *Figurile 1, 2, 3, 4, 5 și 6*.

Discuții

Studiile clinico-patologice au identificat o importanță prognostică a acestui anticorp în diferitele tipuri de neoplasme, inclusiv în limfoamele Hodgkin și non-Hodgkin¹¹. În literatură, expresia Ki-67 la nivelul celulelor Hodgkin și Sternberg-Reed se corelează cu un prognostic nefavorabil⁶. Totuși, unii autori nu au identificat nici o corelație între expresia Ki-67 și prognosticul limfomului Hodgkin^{5,10,12}.

În studiul nostru, am observat creșterea expresiei Ki-67 o dată cu avansarea stadiului bolii, deci o dată cu progresia limfomului Hodgkin. Din acest motiv, am considerat ca fiind extrem de utilă folosirea Ki-67 ca marker de proliferare tumorală mai ales acolo unde stadializarea bolii nu s-a făcut corespunzător. Subliniem acest fapt deoarece fără acest marker posibilitatea de încadrare eronată a limfoamelor agresive crește semnificativ independent de experiența medicului clinician.

Această expresie am utilizat-o ca ajutor în stadializarea bolii, neexistând însă nici o corelație a acestei expresii cu tipul histologic. Deoarece în România nu există studii referitoare la utilizarea expresiei Ki-67, toate referințele noastre s-au făcut în acord cu ADASP (Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology)⁷.

Concluzii:

Studiind expresia Ki-67 am observat o creștere a acestei expresii o dată cu stadiul clinic, deci o dată cu progresia limfomului Hodgkin, dar fără a exista o corelație cu tipul histologic. Subliniem importanța utilizării expresiei Ki-67 ca marker de proliferare tumorală datorită prezenței unui scor înalt în limfoamele agresive cu un stadiu avansat. În plus, recomandăm reinvestigarea și restadializarea cazurilor cu un scor înalt, dar care sunt încadrate ca stadii incipiente, deoarece, cu mare probabilitate, există ganglioni trecuți cu vederea, încadrarea lor fiind eronată.

Mulțumiri

Mulțumim D-nei Prof Dr. Hortensia Ioniță pentru că ne-a pus la dispoziție foile de observație ale bolnavilor internați în secția de Hematologie și D-nei Prof Dr. Elena Lazăr pentru că ne-a furnizat materialul histologic.

Abrevieri

LH-PL - Limfom Hodgkin cu predominanță limfocitară;
 LHC-SN - Limfom Hodgkin clasic cu scleroză nodulară;
 LHC-CM - Limfom Hodgkin clasic cu celularitate mixtă;
 LHC-DL - Limfom Hodgkin clasic cu depleție limfocitară;
 LHC-BL - Limfom Hodgkin clasic forma bogat limfocitară;
 HE - Hematoxilină-Eozină.

Bibliografie

1. Assem M. M., El-Sayed M. M., Mansour O. M., et al. The prognostic Value of International Prognostic Index and MIB-1 Immunostaining of Peripheral Lymphoid Tissues and Bone Marrow in Patients with High-Grade Non-Hodgkin's

- Lymphoma. Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst. 2001; 13 (3): 175-183.
2. Backus H. H. J., Van Groeningen C. J., Vos W., et al. Differential expression of cell cycle and apoptosis related proteins in colorectal mucosa, primary colon tumours, and liver metastases. J Clin Pathol 2002; 55:206-211
 3. Bai M., Tsanou E., Agnantis N. J., et al. Proliferation profile of classical Hodgkin's Lymphomas. Increased expression of the protein cyclin D2 in Hodgkin's and Sternberg-Reed cells. Modern Pathology 2004; 17:1338-1345.
 4. Brown D. C., Gatter K. C. Ki-67 protein: the immaculate deception? Histopathology 2002; 40:2-11.
 5. Ferme C. Maladie de Hodgkin în Solal-Celigny P., Brousse N., Ferme C., Reyes F., Coiffier B., Gisselbrecht C. Lymphomes, Troisième édition; Editions Frison-Roche 1999: 442-511.
 6. Garcia J. F., Camacho F. I., Morente M., et al. Hodgkin's and Reed Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue-microarrays. Blood 2003; 101 (2): 681-689.
 7. Jaffe E. S., Banks P. M., Nathwani B., et al. Recommendations for reporting of lymphoid neoplasms: A report from the Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. Modern Pathology 2004; 17: 131-135.
 8. Martin A. R., Weisenburger D. D., Chan W. C., et al. Prognostic Value of Cell Proliferation and Histologic Grade in Follicular Lymphoma. Blood 1996 85 (12): 3671-3678
 9. Nicolaides C., Dimou S., Pavlidis N. Prognostic Factors in Aggressive Non-Hodgkin's Lymphomas. The Oncologist 1998; 3:189-197.
 10. Pileri S. A., Ascani S., Leoncini L., et al. Hodgkin's lymphoma: the pathologist's viewpoint. J Clin Pathol 2002; 55:162-176.
 11. Sabatini E., Gerdes J., Gherlinzoni F., et al. Comparison between the monoclonal antibodies Ki-67 and PC10 in 125 malignant lymphomas. Journal of Pathology 1993; 169:397-403.
 12. Tzankov A., Zimpfer A., Went P., Maurea R., Pileri S. A., Geley S., Dirnhofer S. Aberrant expression of cell cycle regulators in Hodgkin and Sternberg-Reed cells of classical Hodgkin's Lymphoma. Modern Pathology 2004;1-7