

# O PAPEL DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CK-18, MMP-9 E TIMP-1 NA PREDIÇÃO DA RESSECÇÃO R0 EM PACIENTES COM CÂNCER GÁSTRICO

*The role of serum Ck-18, MMP-9 and TIMP-1 levels in predicting R0 resection in patients with gastric cancer*

Sevki PEDUK<sup>1</sup>, Mursit DINCER<sup>1</sup>, Cihad TATAR<sup>2</sup>, Bahri OZER<sup>1</sup>, Ahmet KOCAKUSAK<sup>1</sup>, Gamze CITLAK<sup>1</sup>, Muzafer AKINCI<sup>1</sup>

Como citar este artigo: Peduk S, Dincer M, Tatar C, Ozer B, Kocakusak A, Citlak G, Akinci M. O papel dos níveis séricos de CK-18, MMP-9 e TIMP-1 na predição da ressecção R0 em pacientes com câncer gástrico. ABCD Arq Bras Cir Dig. 2018;31(4):e1401. DOI: /10.1590/0102-672020180001e1401

Trabalho realizado no <sup>1</sup>Haseki Training and Research Hospital, Department of General Surgery, e <sup>2</sup>Istanbul Training and Research Hospital, Department of General Surgery, Istanbul, Turkey.

**DESCRIPTORIOS** - Adenocarcinoma. CK-18. MMP-9. TIMP-1. Gastrectomia.

#### Correspondência:

Cihad Tatar  
E-mail: tatarcihad@gmail.com

Fonte de financiamento: Comitê de Assessoria e Acompanhamento da Tese e Estudos Acadêmicos, Turquia  
Conflito de interesse: não há

Recebido para publicação: 22/06/2018  
Aceito para publicação: 31/08/2018

**HEADINGS** - Adenocarcinoma. CK-18. MMP-9. TIMP-1. Gastrectomy.

**RESUMO - Racional:** Câncer gástrico é a terceira causa mais comum de morte em homens e a quinta em mulheres em todo o mundo. Atualmente a cirurgia é a única terapia curativa. As modalidades de imagem avançadas atualmente disponíveis podem prever a ressecção R0 na maioria dos pacientes, mas ela só pode ser detectada durante o perioperatório. **Objetivo:** Determinar o papel dos níveis séricos de CK18, MMP9 e TIMP1 na predição da ressecção R0 em pacientes com câncer gástrico. **Métodos:** Foram incluídos no estudo pacientes consecutivos agendados para operação curativa entre 2013-2015. Foi retirado 1 ml de sangue dos pacientes incluídos para estudar CK18, MMP9 e TIMP1. **Resultados:** Os níveis de CK18, MMP9 e TIMP1 foram positivamente correlacionados com o N patológico e o estadiamento ( $p < 0,05$ ). As médias CK-18, MMP-9 e TIMP-1 das pessoas com linfonodos positivos e aqueles em estágio clínico 3 foram superiores às médias das pessoas com linfonodos negativos e estágio clínico 2 ( $p < 0,05$ ). **Conclusão:** Embora as dosagens séricas de CK-18, MMP-9 e TIMP-1 em pacientes agendados para operação curativa por adenocarcinoma gástrico não ajudem a ter ideia de ressecabilidade tumoral, ela foi útil na predição de estadiamento N3.

**ABSTRACT - Background:** Gastric cancer is the 3<sup>rd</sup> most common cause of death in men and the 5<sup>th</sup> common in women worldwide. Today, surgery is the only curative therapy. Currently available advanced imaging modalities can predict R0 resection in most patients, but it can only be detected with certainty in the perioperative period. **Aim:** To determine the role of serum CK18, MMP9, TIMP1 levels in predicting R0 resection in patients with gastric cancer. **Methods:** Fifty consecutive patients scheduled for curative surgery with gastric adenocarcinoma diagnosed between 2013-2015 were included. One ml of blood was taken from the patients to analyze CK18, MMP9 and TIMP1. **Results:** CK18, MMP9 and TIMP1 levels were positively correlated with pathological N and the stage ( $p < 0,05$ ). CK-18, MMP-9 and TIMP-1 averages in positive clinical lymph nodes and in clinical stage 3, were found to be higher than the averages of those with negative clinical lymph nodes and in clinical stage 2 ( $p < 0,05$ ). **Conclusion:** Although serum CK-18, MMP-9 and TIMP-1 preoperatively measured in patients scheduled for curative surgery did not help to evaluate gastric tumor resectability, they were useful in predicting N3-stage.

## INTRODUÇÃO

As citoqueratinas são proteínas contendo queratina da família de filamentos intermediários, encontradas no citoesqueleto intracitoplasmático do tecido epitelial. CK18 está envolvido em importantes caminhos de sinalização, como apoptose, ciclo celular e progressão do câncer que regulam o comportamento das células. Especialmente com a morte celular mediada por caspase, o nível sérico é elevado. Metaloproteinase 9 da matriz (MMP-9) interrompe a matriz extracelular e afeta quase todos os aspectos da biologia celular. MMP-9 é uma das metaloproteinases de matriz mais complexas. O inibidor de tecido da metaloproteinase-1 (TIMP 1) desempenha papel negativo na invasão e metástase de células tumorais formando um complexo 1:1 com MMP-9 e inibindo sua atividade enzimática<sup>1,5,10,16-18</sup>.

O câncer gástrico é a terceira causa mais comum de morte em homens e a 5<sup>a</sup> em mulheres em todo o mundo<sup>15</sup>. Hoje, a cirurgia é a única terapia curativa para câncer de estômago. Um dos principais determinantes da sobrevivência é o tipo de dissecação cirúrgica realizada. As modalidades de imagem avançada disponíveis atualmente podem prever a ressecção R0 na maioria dos pacientes, mas só pode ser detectada no período perioperatório.

O objetivo deste estudo foi determinar o papel dos níveis séricos de CK18, MMP9 e TIMP1 na predição da ressecção R0 em pacientes com câncer gástrico.

## MÉTODOS

Este estudo foi realizado com a aprovação do Comitê de Ética para Pesquisas Clínicas não Farmacêuticas datado de 01.01.2016 e numerado em 302 no Departamento de Cirurgia Geral, Haseki Training and Research Hospital, em Istambul, na Turquia. Cinquenta pacientes consecutivos agendados para operação curativa para câncer gástrico diagnosticados entre 2013 e 2015 foram incluídos no estudo. Esofagogastroduodenoscopia foi realizada pré-operatória e os resultados da biópsia endoscópica foram determinados como adenocarcinoma. O estadiamento clínico dos pacientes foi realizado com TC de tórax com contraste IV e abdominal integral. Os pacientes inoperáveis e/ou não ressecáveis em estadiamento clínico, com tratamento neoadjuvante e com diagnóstico patológico fora do adenocarcinoma foram excluídos. Um dia antes da operação, foi retirado 1 ml de sangue para analisar CK18, MMP9 e TIMP1, que foi colhido para investigações de rotina e colocados em tubos bioquímicos contendo gel separador. O sangue foi centrifugado a 10 000 rpm durante 5 min e armazenado a -50° C.

O custo da compra do kit para CK18, MMP9 e TIMP1 foi atendido pelo Comitê de Assessoria e Acompanhamento da Tese e Estudos Acadêmicos. Todos os pacientes foram informados sobre o estudo e os seus consentimentos escritos foram obtidos.

### Análise estatística

SPSS 15.0 para Windows, teste U de Mann-Whitney, teste de Kruskal-Wallis, correção de Bonferroni foram utilizados para análise estatística. O nível de significância de alfa foi aceito como  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Dos 50 pacientes estudados, 31 (68%) eram homens e 19 (32%) mulheres e a idade média era de 64 (min-max: 42-88). Vinte (40%) foram ASA 1 e 30 (60%) ASA 3. O tamanho médio do tumor gástrico foi de  $34,1 \pm 6,7$  mm (min-max: 21-47 mm). Seis (12%) foram submetidos à operação paliativa e 44 (88%) ressecção R0. A gastrectomia subtotal + D2 foi realizada em 24 (48%) pacientes e gastrectomia total + D2 em 20 (40%). A faixa de dissecação dos linfonodos D2 variou entre 14-24 linfonodos. Dez (20%) pacientes foram submetidos à ressecção de órgãos adicionais, dois dos quais (4%) tiveram ressecção do cólon, três (6%) colecistectomia e cinco (10%) esplenectomia. Sete (14%) estavam no estágio 2B, seis (12%) estágio 4 e 37 (74%) estágio 3. Tempo médio de seguimento foi de 21,28 (Min-max: 1-40) meses.

Os níveis de CK18, MMP9 e TIMP1 foram positivamente correlacionados com N patológico e o estágio ( $p < 0,05$ , Tabelas 1 e 2).

TABELA 1 - Médias CK18, MMP9 e TIMP-1 do grupo de pacientes

	Média ± SD (Min-Max)
CK18 (ng/ml)	6,0±6,4 (2-29)
MMP9 (ng/l)	1542,1±2347,7 (129-8237)
TIMP1 (pg/ml)	511,2±452,4 (183-1923)

TABELA 2 - Relação entre níveis de biomarcadores e tamanho do tumor, número de linfonodos patológicos e estágio patológico

	CK-18		MMP-9		TIMP-1	
	Rho	p	Rho	p	Rho	p
Tamanho do tumor	-0.093	0.521	-0.052	0.718	-0.019	0.897
N patológico	0.491	0.001	0.396	0.008	0.497	0.001
Estádio patológico	0.278	0.050	0.346	0.014	0.359	0.011

As médias CK-18, MMP-9 e TIMP-1 das pessoas com linfonodos clínicos positivos (gânglios linfáticos patológicos na tomografia pré-operatória) e as do estágio clínico 3 foram encontradas maiores que as médias das com linfonodos clínicos negativos e aqueles no estágio clínico 2 ( $p < 0,05$ , Tabela 3)

TABELA 3 - Relações de médias de biomarcadores com T clínico, N clínico e, conseqüentemente, com estágio clínico

		CK-18	MMP-9	TIMP-1
		Média ± SD	Média ± SD	Média ± SD
T clínico	3	5,8±6,0	1619,0±2427,7	503,5±453,3
	4	6,5±8,0	1234,2±2082,5	542,1±471,7
	p	0,942	0,416	0,482
N clínico	Disponível	9,8±9,1	2587,2±2879,9	765,8±615,3
	N/A	3,6±1,3	901,5±1706,0	355,2±202,2
	p	0,045	0,008	0,022
Estádio clínico	2	3,6±1,3	655,8±1045,9	351,1±204,3
	3	9,5±8,9	2871,5±3073,1	751,4±602,3
	p	0,016	0,002	0,014

As médias no soro no grupo de operação paliativa foram superiores às curativas para os três marcadores, mas como resultado da análise estatística desses marcadores, nenhum ponto de corte poderia ser previsto, o que sugeriria que o caso era inoperável. Como resultado da análise da curva de ajuste, o efeito máximo dos marcadores foi determinado para mais de 7,7 o número de linfonodos metastáticos ressecados na operação (Tabela 4). Quando CK-18  $> 5,6$  ng/ml, a probabilidade de o número de linfonodos metastáticos serem oito e superiores aumentou 18 vezes no intervalo de confiança de 95%. Quando MMP-9  $> 1528$  ng/l, a probabilidade de o número de linfonodos metastáticos estarem oito e mais aumentados era sete vezes no intervalo de confiança de 95%; da mesma forma, quando foi encontrada TIMP-1  $> 495,7$  pg/ml, a probabilidade de o número de linfonodos metastáticos terem oito e mais vezes era de sete vezes (Tabela 5). Embora essas análises não estivessem relacionadas à fase T e não previam inoperabilidade, elas mostraram que o estágio N tinha mais de três anos.

TABELA 4 - Análise de ajuste de curva

Ajuste para	Média	SD	Mediana
N patológico com CK18 de CURVEFIT	7.7	3.5	6.3
N patológico com MMP9 da CURVEFIT	7.6	2.3	6.4
N patológico com TIMP1 de CURVEFIT	7.7	3.1	6.1
Ajuste para	Média	SD	Mediana
CK18 com N patológico de CURVEFIT	5.6	3.4	4.3
MMP9 com N patológico de CURVEFIT	1528.1	1002.2	1146.5
TIMP1 com N patológico de CURVEFIT	495.7	246.5	401.8

TABELA 5 - Análise de regressão logística da probabilidade de o número de linfonodos metastáticos terem oito ou mais

	p	OR	95.0% C.I. for EXP(B)	
CK18 $> 5.6$	0,010	18,200	1,979	167,337
MMP9 $> 1528$	0,012	7,111	1,536	32,912
TIMP1 $> 495.7$	0,012	7,111	1,536	32,912

## DISCUSSÃO

Já foi relatado que CK18 pode exibir uma expressão anormal em vários tipos de câncer e pode fornecer informações sobre o prognóstico. Makino et al.<sup>7</sup>, relataram que um aumento na expressão de CK18 no carcinoma de células escamosas esofágicas está associado com mau prognóstico. Messai et al.<sup>8</sup> relataram sobre essa associação no carcinoma de células renais e Fillies et al.<sup>4</sup> mostraram que aumento na expressão de C18 na cavidade oral está correlacionado com aumento no estágio

e na classe. No entanto, Knosel et al.<sup>6</sup> relataram que a baixa expressão de CK18 no câncer colorretal foi associada com mau prognóstico. Buhler et al.<sup>3</sup> enfatizaram que a transfecção do gene CK18 em células de câncer de mama humano levou à indução de proteínas de adesão e retração dramática de neoplasias malignas in vitro e in vivo. No câncer de pulmão, Zhang et al.<sup>18</sup> relataram que a alta expressão de CK18 foi determinada em 101 (78,3%) de 129 pacientes. Expressão de CK18, correlacionou-se significativamente com o estágio clínico, metástase dos linfonodos, número de linfonodos patologicamente positivos, recorrência e metástase. Scott et al.<sup>13</sup> relataram que os níveis pré-operatórios de CK-18 em pacientes com adenocarcinoma gástrico e que queda significativa nesses níveis após o tratamento permitiram a avaliação da resposta do tumor ao tratamento. Oyama K et al.<sup>12</sup>, mencionaram a importância dos níveis de frações dependentes da caspase (M30) e total (M65) no soro de CK-18 na predição do fator prognóstico no adenocarcinoma gástrico. Bilici et al.<sup>2</sup>, relataram que os fragmentos CK-18 (M30 e M65) poderiam ser usados na avaliação da resposta tumoral quimioterapêutica nesses pacientes.

A matriz metaloproteinase-9 (MMP-9) pode interromper os principais componentes, matriz extracelular (ECM), colágeno tipo IV e V e gelatina, de modo que sua atividade está intimamente relacionada à invasão e capacidade metastática das células tumorais. A expressão aumentada de metaloproteinases de matriz (MMPs) constitui a capacidade de digerir as células tumorais, em particular as membranas basais cobrindo vasos sanguíneos, barreiras básicas do tecido, promovendo assim a mobilidade celular. O inibidor de tecido da metaloproteinase-1 (TIMP 1) desempenha papel negativo na invasão e metástase de células tumorais formando um complexo 1:1 com MMP-9 e inibindo sua atividade enzimática<sup>1,5,10,16-18</sup>.

Zhang et al.<sup>20</sup> relataram que os níveis séricos de MMP-9 correlacionaram-se com invasão tumoral em pacientes com adenocarcinoma gástrico. Shan et al.<sup>19</sup> examinaram a associação do sinal do gene HER-2 com a atividade da MMP-9 em células da mucosa gástrica e relataram que ele aumentou via HER2 na patogênese do câncer gástrico. Zhang et al.<sup>19</sup> em seu estudo em pacientes com adenocarcinoma gástrico, relataram que os níveis de muitas proteínas da família da metaloproteinase, incluindo MMP-9 e TIMP-1, eram significativamente maiores que os humanos saudáveis, independentemente do tipo histológico.

O objetivo principal deste estudo foi determinar diferenças significativas entre os grupos em que a operação curativa poderia ser realizada e não poderia ser realizada (estágio patológico >3), medindo os níveis séricos pré-operatórios de CK-18, MMP-9 e TIP-1 no gástrico adenocarcinoma considerado operável (estádio clínico <4). Nos casos de câncer gástrico, os métodos de diagnóstico pré-operatório determinam consideravelmente a operabilidade em pacientes; no entanto, as laparotomias feitas com a esperança de ressecção não podem atingir seu objetivo em um número considerável de pacientes. Em alguns estudos, esta taxa é superior a 30%<sup>21</sup>. Operação paliativa neste estudo foi de 12%.

## CONCLUSÃO

Embora as medições sorológicas de CK-18, MMP-9 e TIMP-1 em pacientes agendados para operação curativa por adenocarcinoma gástrico não ajudaram a ter qualquer idéia da ressecabilidade tumoral, elas foram válidas para prever o estágio N3.

1. Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* 1993;71:1368-1383.
2. Bilici A. Cytokeratin 18 for chemotherapy efficacy in gastric cancer. *Transl Gastrointest Cancer* 2015;4:200-206.
3. Buhler H, Schaller G. Transfection of keratin 18 gene in human breast cancer cells causes induction of adhesion proteins and dramatic regression of malignancy in vitro and in vivo. *Mol Cancer Res* 2005;3:365-371.
4. Fillies T, Werkmeister R, Packeisen J, Brandt B, Morin P, Weingart D, et al. Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *BMC Cancer* 2006;6:10-15.
5. Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem* 1992;267:4583-4591.
6. Knosel T, Emde V, Schluns K, Schlag PM, Dietel M, Petersen I. Cytokeratin profiles identify diagnostic signatures in colorectal cancer using multiplex analysis of tissue microarrays. *Cell Oncol* 2006;28:167-175.
7. Makino T, Yamasaki M, Takeno A, Shirakawa M, Miyata H, Takiguchi S, et al. Cytokeratins 18 and 8 are poor prognostic markers in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Br J Cancer* 2009;101:1298-306.
8. Messai Y, Noman MZ, Derouiche A, Kourda N, Akalay I, Hasmim M, et al. Cytokeratin 18 expression pattern correlates with renal cell carcinoma progression: relationship with Snail. *Int J Oncol* 2010;36:1145-1154.
9. Muntean V. Staging laparoscopy in gastric cancer. Accuracy and impact on therapy. *J Gastrointest Liver Dis* 2009;18:189-195.
10. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491-21494.
11. Olson MW, Gervasi DC, Mobashery S, Fridman R. Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem* 1997;272:29975-29983.
12. Oyama K, Fushida S, Kinoshita J, Okamoto K, Makino I, Nakamura K, et al. Serum cytokeratin 18 as a biomarker for gastric cancer. *Clin Exp Med* 2013;13:289-295.
13. Scott LC, Evans TRJ, Cassidy J, Harden S, Paul J, Ullah R, et al. Cytokeratin 18 in plasma of patients with gastrointestinal adenocarcinoma as a biomarker of tumour response. *Bt J Cancer* 2009;4:101:410-441.
14. Shan YQ, Ying RC, Zhou CH, Zhu AK, Ye J, Zhu W, et al. MMP-9 is increased in the pathogenesis of gastric cancer by the mediation of HER2. *Cancer Gene Ther* 2015;22:101-107.
15. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015;65:87-108.
16. Watanabe M, Takahashi Y, Ohta T, Mai M, Sasaki T, Seiki M. Inhibition of metastasis in human gastric cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 1 gene in nude mice. *Cancer* 1996;77:1676-1680.
17. Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999;13:781-792.
18. Zhang B, Wang J, Liu W, Yin Y, Qian D, Zhang H, et al. Cytokeratin 18 knockdown decreases cell migration and increases chemosensitivity in nonsmall cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016;142:2479-2487.
19. Zhang M, Zhu GY, Gao HY, Zhao SP, Xue Y. Expression of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gastric adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2011;103:243-247.
20. Zhang S, Li L, Lin JY, Lin H. Imbalance between expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;15:899-904.