

Universidade da Beira Interior

Faculdade de Ciências da Saúde

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina



**Estudo imunohistoquímico do Ki-67 em
adenocarcinomas do cólon:**

**Correlação entre a expressão do Ki-67 e a
diferenciação tumoral**

Catarina Sofia Freire Agostinho

Maio de 2010

Covilhã | Portugal

Universidade da Beira Interior

Faculdade de Ciências da Saúde

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina



**Estudo imunohistoquímico do Ki-67 em
adenocarcinomas do cólon:**

**Correlação entre a expressão do Ki-67 e a
diferenciação tumoral**

Orientador: Professor Doutor Javier Muñoz Moreno

Catarina Sofia Freire Agostinho

Maio de 2010

Covilhã | Portugal

*Aos meus pais e à minha irmã,
por serem o pilar da minha vida
e a razão de eu Ser quem sou hoje.*

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Javier Muñoz Moreno, pela sua orientação e compreensão;

À Dr.^a Catarina Ferreira, por toda a disponibilidade e partilha de conhecimentos;

Aos meus pais e à minha irmã, pelo apoio incondicional;

À Joana Jesus, amiga de todas as horas, pelo espírito crítico;

Aos meus amigos, por terem tornado esta etapa da minha vida tão bonita e interessante.

Índice

Agradecimentos	iv
Índice.....	v
Índice de Gráficos	vii
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas	viii
Abreviaturas e Siglas Utilizadas	viii
Resumo.....	1
Introdução:	1
Objectivos:	1
Materiais e métodos:.....	1
Resultados:.....	2
Conclusão:	2
Palavras-chave.....	3
Abstract.....	3
Introduction:	3
Objectives:	3
Methods and Materials:.....	4
Results:	4
Conclusions:	5

Key-words:	5
Introdução	6
Materiais e Métodos	9
Resultados	123
Discussão.....	21
Limitações:.....	25
Implicações:	26
Conclusão:	27
Referências Bibliográficas.....	28
Anexos	32
Anexo 1: Protocolo usado no Autostainer da TechMateMT Horizon (versão 3.0) para o tratamento de tecidos com Ki-67 (MIB-1) no CHCB	323
Anexo 2: Estudio de correlación de p-53 y Ki-67 en 32 casos de tumores colorectales: Análisis de resultados	336
Anexo 3: Certificado de Participação no “X Congresso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica”	41

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Intensidade com que são marcadas as células dos tumores moderadamente diferenciados.....	20
Gráfico 2 - Quantidade de células marcadas com Ki-67.....	20

Índice de Figuras

Figura 1 – Autostainer da TechMate ^{MT} Horizon (versão 3.0) onde foi realizado o tratamento imunohistoquímico.....	12
Figura 2 – Adenocarcinoma do cólon moderadamente diferenciado (100x).....	13
Figura 3 – Adenocarcinoma do cólon bem diferenciado (400x).....	14
Figura 4 – Adenocarcinoma do cólon moderadamente diferenciado com áreas pouco diferenciadas (100x).....	14
Figura 5 – Adenocarcinoma do cólon com marcação negativa para o Ki-67 (400x).....	15
Figura 6 – Adenocarcinoma do cólon com intensidade “+” de marcação para o Ki-67 (400x).....	16
Figura 7 – Adenocarcinoma do cólon com intensidade “++” de marcação para o Ki-67 (400x).....	16
Figura 8 – Adenocarcinoma do cólon com intensidade “+++” de marcação para o Ki-67 (400x).....	17

Figura 9 – Adenocarcinoma do cólon com menos de 25% das células marcadas com o Ki-67 (400x).....18

Figura 10 – Adenocarcinoma do cólon com 50% das células marcadas com o Ki-67 (400x).....18

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Frequências absolutas dos dados relativos à intensidade e à quantidade de células marcadas com Ki-6719

Abreviaturas e Siglas Utilizadas

CHCB – Centro Hospitalar Cova da Beira

OMS – Organização Mundial de Saúde

MIB-1 – Molecular Immunology Burstel 1

pKi-67 – Proteína Ki-67

Resumo

Introdução:

O estudo do comportamento dos tumores constitui actualmente uma área de grande interesse, pela sua importância no estabelecimento de prognósticos e tratamentos adequados a cada doente. A diferenciação e a proliferação tumoral constituem factores que podem ser úteis na caracterização dos adenocarcinomas do cólon. O facto de o Ki-67 ser uma proteína que está presente exclusivamente na fase activa da célula faz dele um bom marcador de proliferação celular. A sua utilização nos adenocarcinomas do cólon foi ainda pouco estudada, sendo os resultados pouco consensuais no que toca à relação entre a proliferação tumoral, determinada pelo Ki-67, e a diferenciação. Este estudo constitui um contributo para esse esclarecimento.

Objectivos:

Observar e descrever a possível correlação entre a expressão imunohistoquímica do marcador de proliferação tumoral Ki-67 e o grau de diferenciação histológica de adenocarcinomas do cólon.

Materiais e métodos:

Foram estudados 62 casos de adenocarcinomas do cólon que foram excisados cirurgicamente entre 2001 e 2003 no Centro Hospitalar Cova da Beira.

O processamento histológico decorreu segundo procedimento de rotina com hematoxilina-eosina, e a classificação histológica dos tumores foi feita segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde.

A avaliação da expressão imunohistoquímica do Ki-67 foi realizada utilizando-se o anticorpo monoclonal dirigido ao antigénio Ki-67 humano, MIB-1. Com base na detecção do anticorpo primário com o método de estreptavidina-biotina marcada, e através da diaminobenzidina como cromogéneo, os locais reconhecidos pelo anticorpo primário foram assim marcados e visualizados em cor castanha. A classificação da marcação foi realizada segundo a intensidade e a quantidade de células marcadas.

Resultados:

Dos 62 adenocarcinomas, 5 (8,06%) eram bem diferenciados, 55 (88,70%) moderadamente diferenciados e 2 (3,23%) pouco diferenciados, não tendo existido nenhum caso classificado como indiferenciado. Os adenocarcinomas pouco diferenciados apresentavam ambos 50 a 75% das células coradas com intensidade “++”. Dos bem diferenciados, um foi Ki-67 negativo, sendo os restantes quatro positivos com diferentes quantidades e intensidades. Os adenocarcinomas moderadamente diferenciados foram em 61,82% dos casos negativos para o Ki-67. Existiu coincidência entre a intensidade “+++” e a quantidade de células imunomarcadas máxima observada (50 a 75%) em 38,09% dos adenocarcinomas moderadamente diferenciados.

Conclusão:

Não foi possível estabelecer uma correlação entre a diferenciação histológica e a proliferação do tumor determinada pela presença da proteína Ki-67.

Palavras-chave

Ki-67; Adenocarcinomas do cólon; MIB-1; Diferenciação tumoral; Proliferação tumoral; Grau histológico; Imunohistoquímica.

Abstract

Introduction:

The tumours behaviour is currently an area of great interest for its importance in establishing prognostics and appropriate treatment for each patient. The tumour differentiation and proliferation are factors that may be useful in the characterization of colon adenocarcinomas. Ki-67 is a protein that presents exclusively at the active phase of cells, what makes it a good marker of cellular proliferation. Its use in colon and the results were not consensual regarding the relationship between tumour proliferation and its differentiation. This study is a contribution to that clarification.

Objectives:

To observe and describe the possible correlation between the expression of proliferation tumour marker Ki-67, determined by immunohistochemistry techniques, and histologic differentiation of adenocarcinomas of the colon.

Methods and Materials:

We studied 62 cases of colon adenocarcinoma which were surgically excised between 2001 and 2003 in Centro Hospitalar Cova da Beira (Covilhã, Portugal). Histologic processing ran according routine procedure with hematoxylin-eosin, and histologic classification of tumours was made according to criteria of the World Health Organization.

The evaluation of the tumour proliferation marker Ki-67 expression was performed using the monoclonal antibody directed to human antigen Ki-67, MIB-1. Based on primary antibody detection with labeled streptavidin-biotin, and using the chromogen-diaminobenzidine, sites recognized by the primary antibody were marked and visualized with a brownish colour. The immunostaining classification was performed according to the intensity and amount of marked cells.

Results:

Of the 62 carcinomas, 5 (8.06%) were well differentiated, 55 (88.70%) moderately differentiated and 2 (3.23%) poorly differentiated, with none undifferentiated case. The poorly differentiated adenocarcinomas had both 50-75% immunostained cells with intensity “++”. Of the 5 well differentiated cases, 1 was Ki-67 negative and the remaining 4 were positive with different amounts and intensities. The moderately differentiated adenocarcinomas were Ki-67 negative in 61.82% of cases. There was coincidence in 38.09% of moderately differentiated adenocarcinomas between intensity “+++” and the existence of an amount of 50-75% immunostained cells.

Conclusions:

It was impossible to establish the relation between histologic differentiation and tumour proliferation determined by immunostaining techniques with Ki-67.

Key-words:

Ki-67; Colon adenocarcinoma; MIB-1; Tumour differentiation; Tumour proliferation; Histologic grade; Immunohistochemistry.

Introdução

Segundo o último estudo estatístico mundial de cancro, realizado em 2002, existiram nesse ano cerca de 1 milhão de novos casos de cancro colo-rectal e 529 mil mortes a ele atribuídas, constituindo o segundo cancro mais prevalente no mundo. Esta neoplasia constitui o quarto cancro com maior incidência no homem e o terceiro na mulher. ⁽¹⁾

Em Portugal, o cancro colo-rectal é responsável por 31,2% das mortes. Na Cova da Beira responde por 34,8% das mortes, sendo a faixa etária que regista maior mortalidade a dos 75 anos ou mais. ⁽²⁾ Entre 2001 e 2003 foram excisados 62 adenocarcinomas no Centro Hospitalar Cova da Beira (CHCB).

A carcinogénese colo-rectal pode resultar de duas vias patogénicas distintas: a via adenoma/carcinoma (80% dos carcinomas esporádicos) por mutações em oncogenes e genes supressores tumorais, e a via associada à instabilidade microssatélite (10 a 15% dos carcinomas esporádicos) por lesões nos genes de reparação do DNA. ^(3, 4)

A predisposição genética e a exposição ambiental são factores determinantes do risco de carcinoma colo-rectal.

A proteína Ki-67 (pKi-67) foi descrita pela primeira vez em 1983 por Gerdes e a sua equipa, na cidade alemã Kiel. ⁽⁵⁾ É sintetizada por um gene de 30000 pares de bases no braço longo do cromossoma 10. ⁽⁶⁾ Pode apresentar duas isoformas de 395 e 345 kDa que resultam de splicing alternativo do mRNA. O exão 13 codifica grande parte da pKi-67, contendo os epítopes

reconhecidos pelo anticorpo Ki-67 e o MIB-1. ⁽⁷⁾ A sua expressão é regulada por proteossomas, sendo o tempo de semi-vida de cerca de 60 a 90 minutos. ⁽⁸⁾

A pKi-67 é encontrada em todas as fases do ciclo celular com excepção de G0 (característica que permite o seu uso enquanto marcador de proliferação celular). Durante G1, S e G2, a pKi-67 encontra-se dentro do nucléolo, estando associada ao componente fibrilar denso (uma das 3 regiões nucleolares identificadas por microscopia electrónica). Durante a mitose a pKi-67 desloca-se para a camada pericromossomal. ⁽⁸⁾

A função da pKi-67 mantém-se ainda desconhecida, pois não manifesta homologia com outras proteínas celulares, apesar de se reconhecer que é vital para a proliferação celular. Especula-se que, dada a sua localização nucleolar, poderá ter um papel na produção de ribossomas. ⁽⁹⁾

Para a identificação do pKi67 era inicialmente usado o anticorpo original Ki-67, que tinha como desvantagem a utilização exclusiva em tecido fresco ou congelado. Actualmente, o anticorpo mais utilizado para uso imunohistoquímico é o MIB-1 (Molecular Immunology Burstel). A característica que tornou o seu uso tão difundido foi a capacidade de poder ser usado em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina, permitindo a realização de grandes estudos retrospectivos com recurso a arquivos histológicos. ^(8, 10)

O MIB-1 marca positivamente tecidos normais, nomeadamente células mucosas do colo, células do fundo das criptas e células centrais germinais das placas de Payer, no intestino delgado e cólon. Não marca células epiteliais, células de Paneth, células do tecido conjuntivo da submucosa, nem restantes células mucosas. ⁽¹¹⁾

Os estudos realizados até à data permitiram verificar que o Ki-67 constitui um bom marcador de prognóstico no cancro da mama, sarcoma dos tecidos moles, tumor do pulmão, entre outros. Relativamente ao cancro colorrectal, poucos estudos mostram a existência de correlação entre a expressão de pKi-67 e o curso clínico da doença. A heterogeneidade da expressão do Ki-67 e a existência de mecanismos ainda por explicar poderão justificar os resultados dos vários estudos, por vezes contraditórios. ⁽⁸⁾

A descrição da diferenciação tumoral e da sua correlação com a imunoexpressão de Ki-67 em adenocarcinomas do cólon, é o objectivo deste estudo, constituindo uma contribuição para o esclarecimento da dinâmica e da utilidade deste marcador de proliferação tumoral neste tipo de tumores.

Materiais e Métodos

Para este estudo foram utilizadas 62 peças cirúrgicas de adenocarcinomas do cólon, correspondentes ao mesmo número de doentes do Centro Hospitalar da Cova da Beira (CHCB), recolhidas entre 2001 e 2003.

As peças excisadas foram fixadas em formaldeído a 10%, tendo-se posteriormente colhido amostras de 3 a 4 mm de espessura das seguintes zonas: lesão tumoral, margem cirúrgica, zona de transição entre tecido normal e tumoral e mucosa normal. As amostras de tecido foram colocadas em cassetes, tendo sido etiquetadas com o n.º de registo de análise e n.º sequencial referente à zona da colheita. Estes procedimentos decorreram segundo uma rotina estandardizada.

De seguida procedeu-se ao processamento das amostras para impregnação em parafina num processador de tecidos durante 16h, segundo protocolo estandardizado. Posteriormente os tecidos foram incluídos em blocos de parafina, e de seguida arrefecidos em placa fria (aproximadamente a 20°C) e sujeitos a cortes de micrótomo com 2 µm de espessura.

Estes cortes foram colocados em lâmina de vidro. As lâminas que iriam ser sujeitas a coloração histológica de rotina permaneceram 1h na estufa a 60°C. As lâminas que iriam ser sujeitas a processamento imunohistoquímico com o antigénio Ki-67 permaneceram na estufa a 60°C *overnight*.

A coloração histológica de rotina com hematoxilina-eosina, foi realizada, segundo protocolo estandardizado do CHCB.

As lâminas destinadas a processamento imunohistoquímico sofreram primeiramente desparafinação e hidratação (Varistain XY, Shandon) e de seguida, recuperação antigénica em panela de pressão durante 6 minutos com solução de tampão citrato a 0,1M e pH=6,0.

O tratamento imunohistoquímico para o antígeno Ki-67 foi realizado no Autostainer da TechMate^{MT} Horizon (versão 3.0, Figura 1). Utilizou-se como anticorpo primário o clone MIB-1 (Dako Denmark, M7240) em diluição de 1:300 e, como anticorpo secundário biotilado, uma imunoglobulina de cabra anti-rato e anti-coelho. Para diluição dos anticorpos foi utilizada solução diluente (Dako Denmark, S2022). A seguir à incubação foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com a solução Dako RealTM Peroxidase-Blocking Solution (Dako Denmark, S2023), seguindo-se a incubação em estreptavidina peroxidase. Por fim, para a demonstração da actividade da peroxidase utilizou-se uma solução de diaminobenzidina como cromogénio. O anticorpo secundário, a estreptavidina peroxidase e a diaminobenzidina com cromogénio utilizados fazem parte do kit Dako RealTM Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Dako Denmark, K5001). A coloração nuclear foi feita com Hematoxilina de Mayer (Merck Denmark, MERC1 1.09249.0500). Para solução de lavagem foi utilizado o Buffer Kit da Dako (Dako Denmark, K5006) e esta decorreu entre todas as etapas do processamento imunohistoquímico. Como controlo positivo foi usado tecido amigdalino humano. Este processamento decorreu segundo o protocolo do CHCB (Anexo 1).

De seguida, foi efectuada a montagem das lâminas em meio sintético.

As lâminas foram observadas ao microscópio óptico (Olympus BX41), tendo sido fotografadas com câmara fotográfica (Olympus C-5050). A observação das lâminas foi feita por um Anatomopatologista que, a uma ampliação de 400x, fez 50 observações para cada lâmina. A classificação da diferenciação foi feita em quatro grupos segundo a extensão do padrão glandular. Os adenocarcinomas bem diferenciados apresentam mais de 95% de padrão glandular, os moderadamente diferenciados apresentam 50 a 95%, os pouco diferenciados apresentam 5 a 50%, e por fim, os indiferenciados apresentam menos de 5% de padrão glandular. Os primeiros dois grupos (bem e moderadamente diferenciados) são também designados adenocarcinomas de baixo grau, e os restantes dois (pouco diferenciados e indiferenciados) designados de elevado grau. Estes critérios de classificação são os indicados pela OMS. ⁽⁴⁾

Após a realização da técnica imunohistoquímica, o tecido tumoral positivo para o Ki-67 passa a apresentar os núcleos celulares marcados de castanho (cromogéneo), sendo a classificação feita segundo a intensidade e a quantidade de células coradas por campo. Relativamente à intensidade, a classificação foi feita em “-” (coloração nula), “+”, “++” e “+++” (intensidade crescente). Quanto à quantidade de células coradas por campo, a classificação foi feita em 0%, 0 a 25%, 25 a 50%, 50 a 75% e 75 a 100%.

Os dados recolhidos foram tratados estatisticamente utilizando os programas informáticos Microsoft Office Excel 2007 ® e SPSS 17.0 ®, tendo sido realizada uma análise estatística descritiva.



Figura 2 – Autostainer da TechMate^{MT} Horizon (versão 3.0) onde foi realizado o tratamento imunohistoquímico

Resultados

Foram estudadas 62 peças cirúrgicas de adenocarcinomas do cólon. Estes casos foram classificados quanto à diferenciação, da seguinte forma: 55 (88,70%) moderadamente diferenciados (Figura 2), 5 (8,06%) bem diferenciados (Figura 3) e 2 (3,23%) pouco diferenciados (Figura 4).

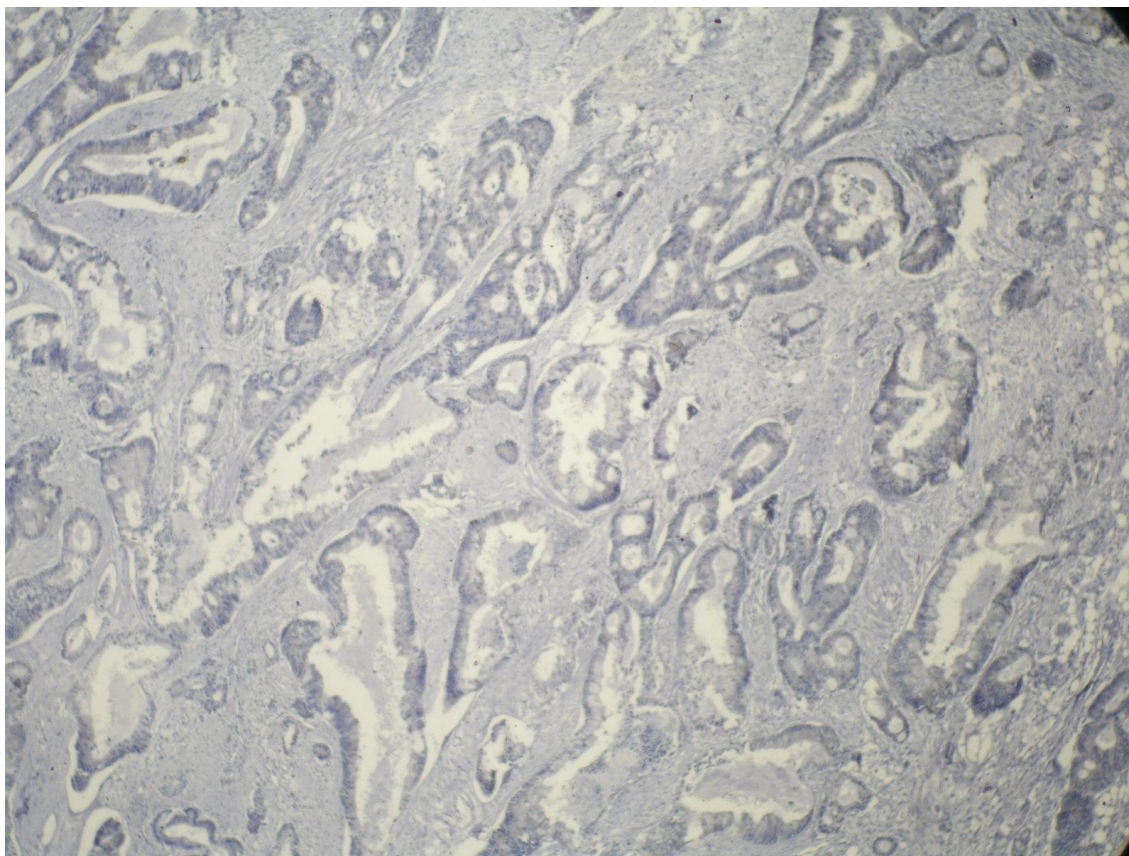


Figura 2 – Adenocarcinoma do cólon moderadamente diferenciado (100x)

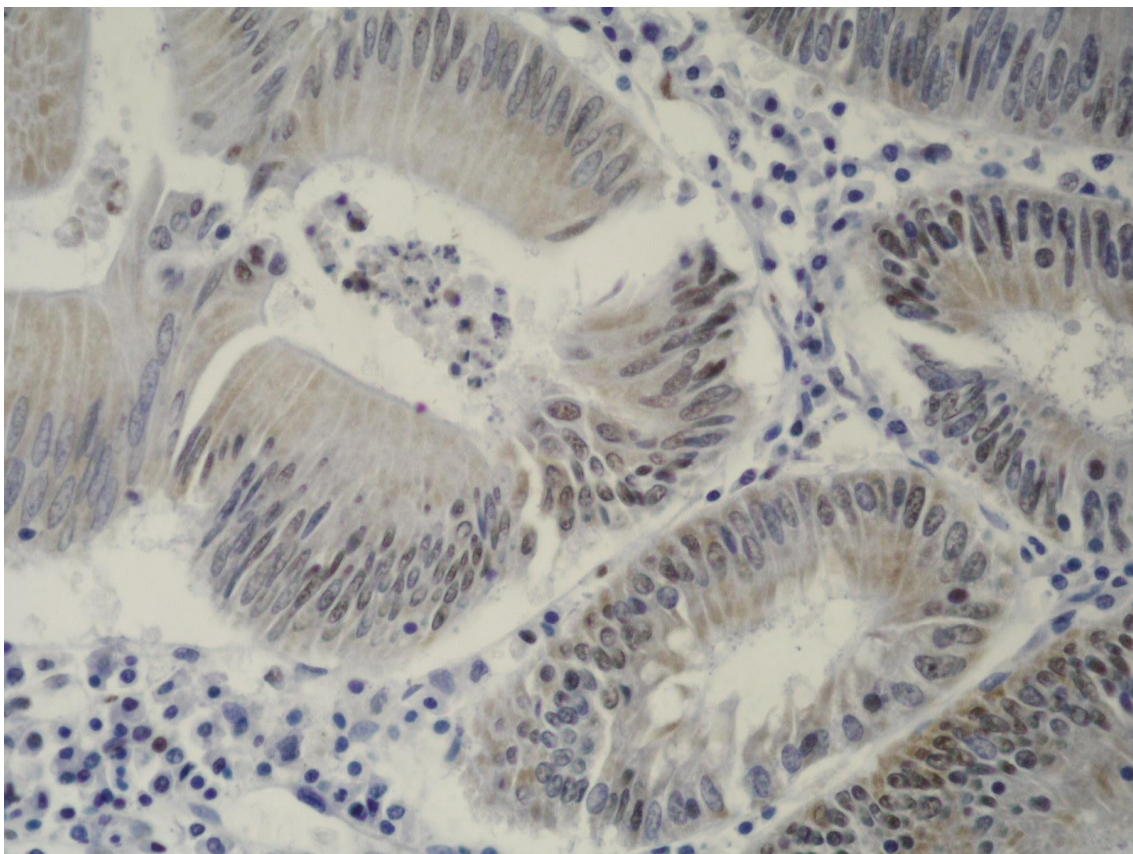


Figura 3- Adenocarcinoma bem diferenciado (400x)

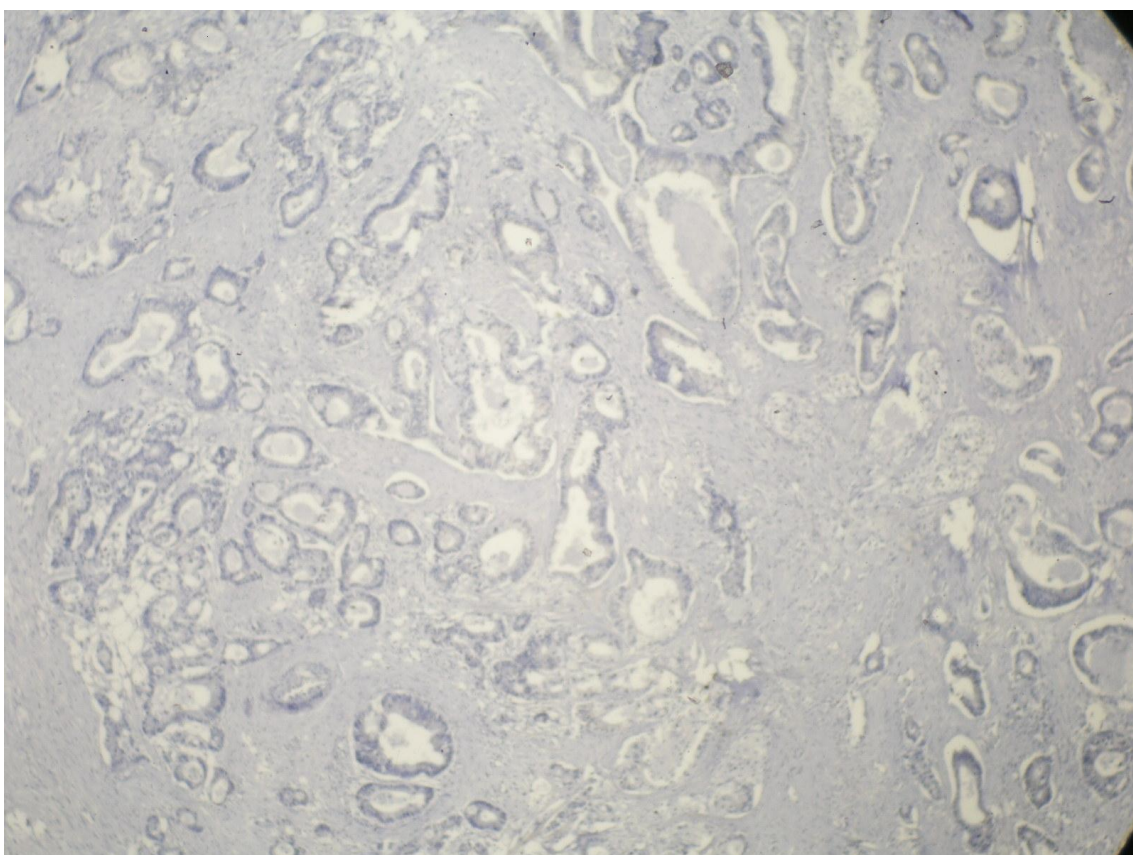


Figura 4- Adenocarcinoma do cólon moderadamente diferenciado com áreas pouco diferenciadas (100x)

Relativamente à intensidade com que os núcleos são marcados, verificou-se que 36 (58,10%) não apresentaram marcação (“-“) (Figura 5), 8 (12,90%) apresentaram intensidade “+” (Figura 6), 9 (14,52%) intensidade “++” (Figura 7), e o mesmo número foi corado com intensidade “+++” (Figura 8), ou seja, 9 casos (14,52%) (Tabela 1).

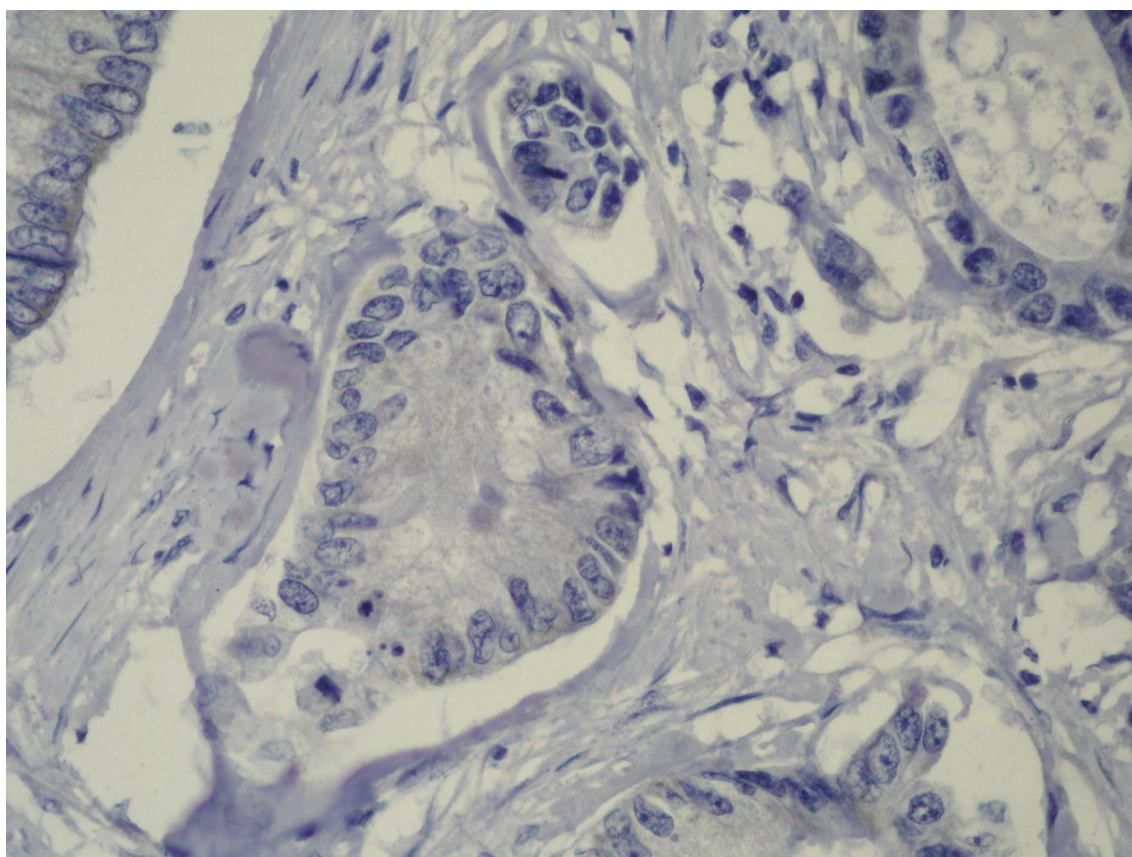


Figura 5- Adenocarcinoma do cólon com marcação negativa para o Ki-67 (400x)

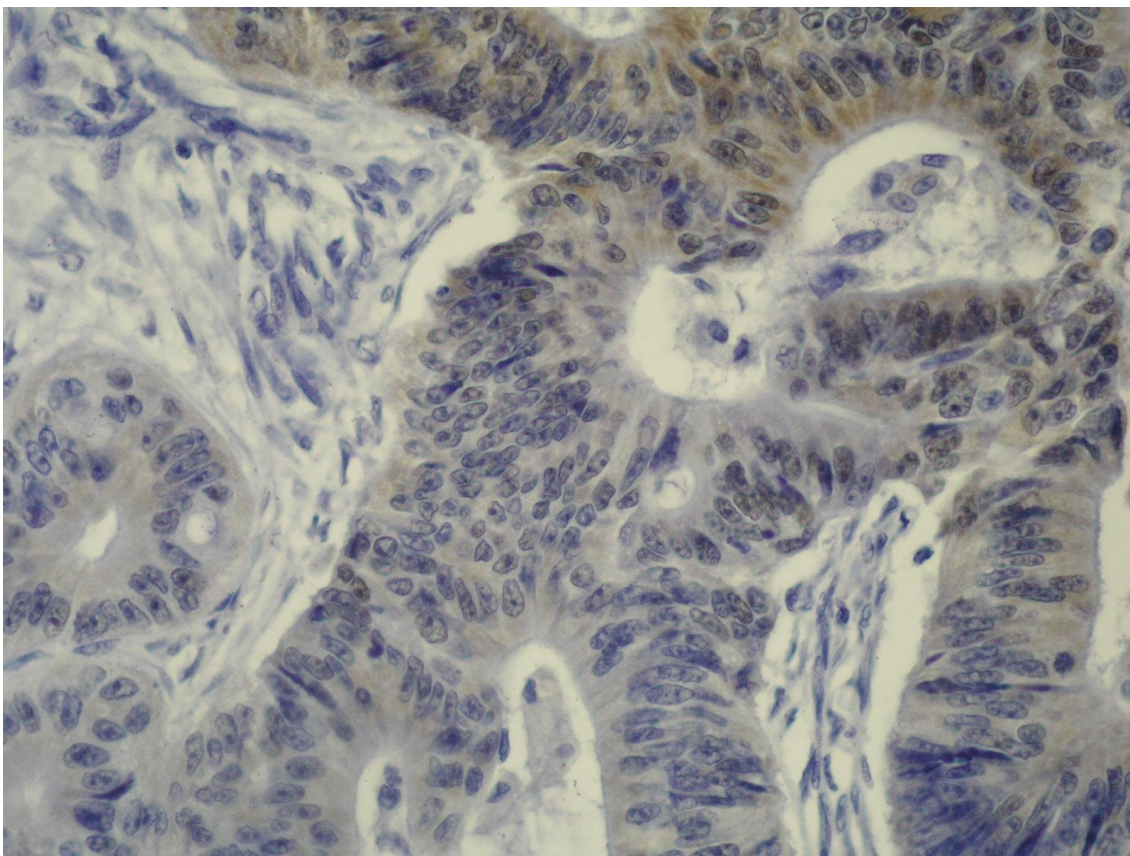


Figura 6- Adenocarcinoma do cólon com intensidade “+” de marcação com o Ki-67 (400x)

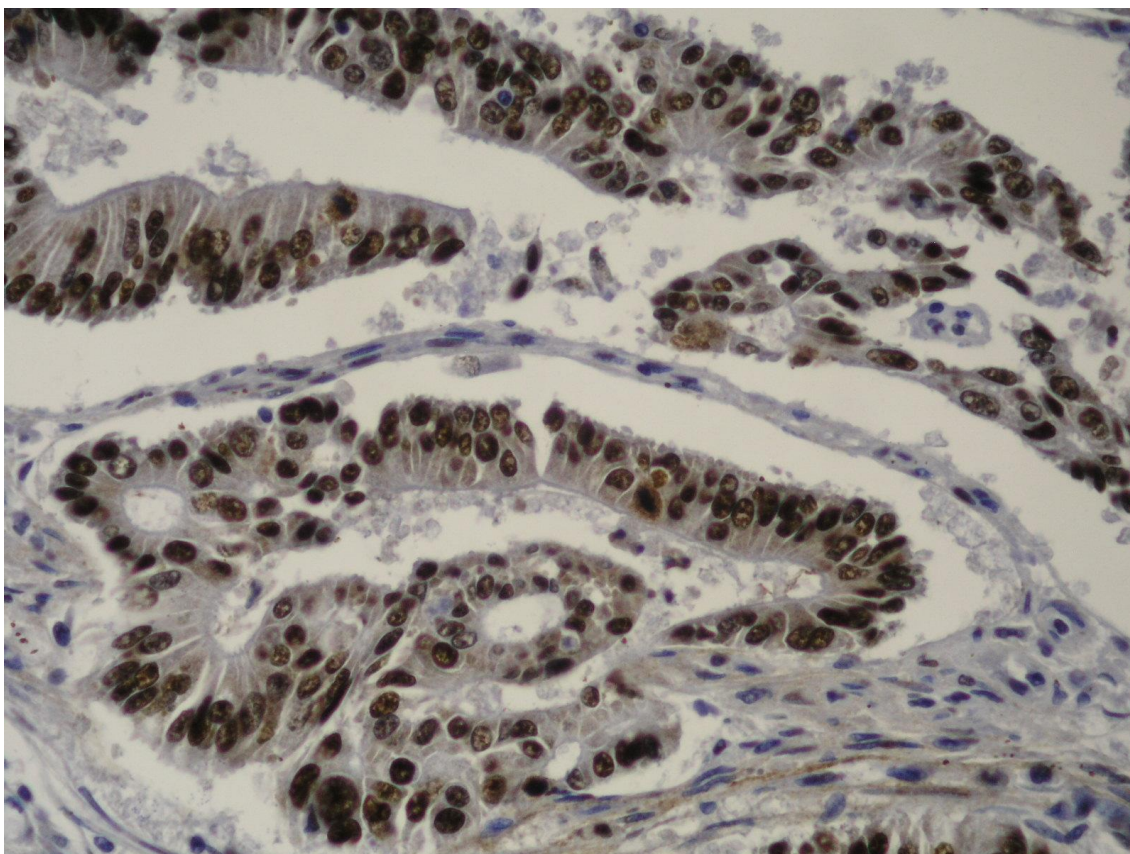


Figura 7- Adenocarcinoma do cólon com intensidade “++” de marcação com o Ki-67 (400x)

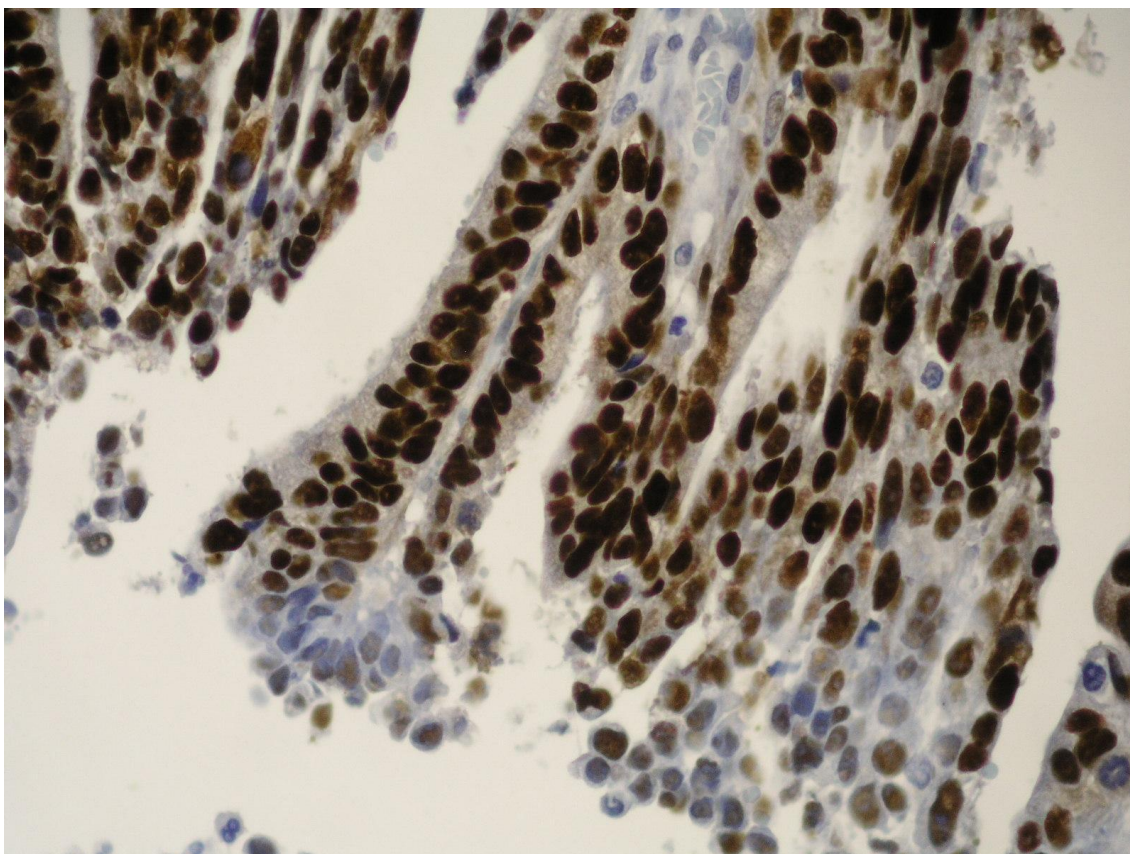


Figura 8- Adenocarcinoma do cólon com intensidade “+++” de marcação com o Ki-67 (400x)

Quanto à quantidade de células marcadas, observaram-se em 36 casos (58,06%) 0% das células marcadas (Figura 5), em 5 casos (8,06%) entre 0 a 25% (Figura 9), em 7 casos (11,29%) 25 a 50 % (Figura 10) e em 14 casos (22,58%) 50 a 75%. Não houve nenhum caso com 75 a 100% das células marcadas. (Tabela 1)

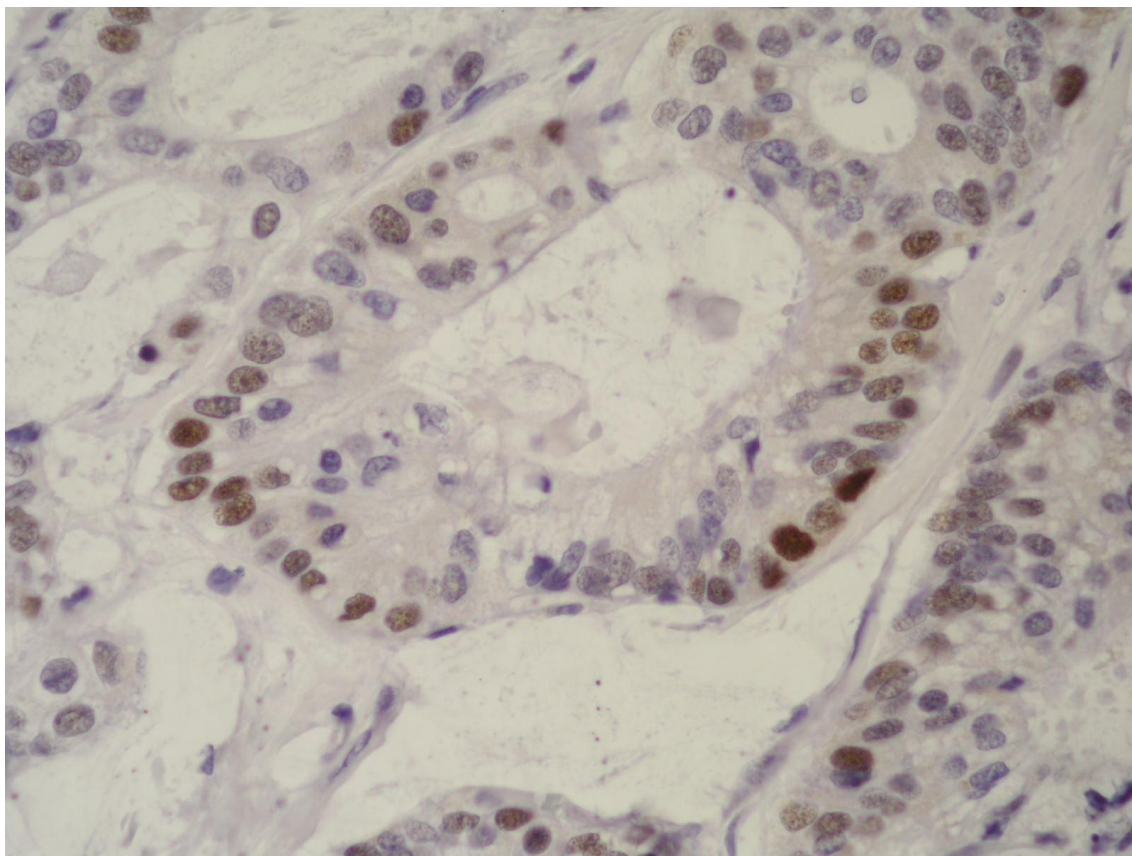


Figura 9- Adenocarcinoma do cólon com menos de 25% das células imunomarcadas com Ki-67 (400x)

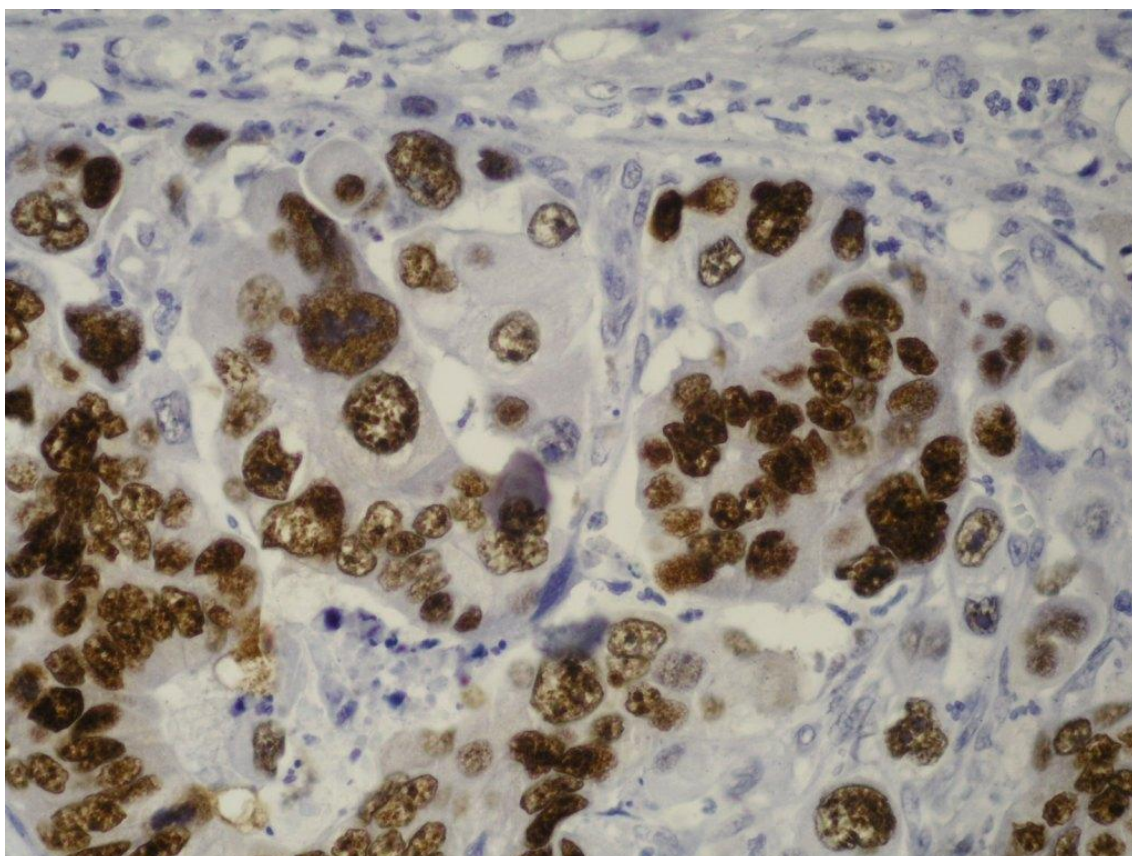


Figura 10 - Adenocarcinoma do cólon com 50% das células imunomarcadas com Ki-67 (400x)

Classificação	-	+	++	+++	Total
0%	36	0	0	0	36
0-25%	0	5	0	0	5
25-50%	0	2	4	1	7
50-75%	0	1	4	9	14
75-100%	0	0	0	0	0
Total	36	8	8	10	62

Tabela 1- Frequências absolutas dos dados relativos à intensidade e à quantidade de células marcadas com Ki-67

Analisando a correspondência entre a diferenciação e a expressão, verificou-se que os dois casos pouco diferenciados apresentavam 50 a 75% das células marcadas com intensidade “++”.

Dos 5 casos bem diferenciados, 2 não apresentavam células marcadas (0%, "-"), 1 caso apresentava 0 a 25% das células marcadas com intensidade "+", 1 caso apresentava 25 a 50% das células marcadas com intensidade "++", e por fim, o último caso apresenta 75% das células marcadas com intensidade máxima ("+++").

Tendo em conta apenas os moderadamente diferenciados (n=55), não se observou marcação para o Ki-67 em 34 (63,64%) dos casos. Nos restantes, a intensidade “+++” de marcação foi a mais observada, em 9 casos (16,34%), seguindo-se a intensidade “+” em 7 casos (12,73%) e por fim a intensidade “++” em 5 casos (9,09%) (Gráfico 1). No que toca à quantidade de células marcadas com o Ki-67, 11 casos (20,00%) apresentaram 50 a 75% das células marcadas, 6 (10,91%) apresentaram 25 a 50% e 4 (7,27%) apresentaram 0 a 25% (Gráfico 2).

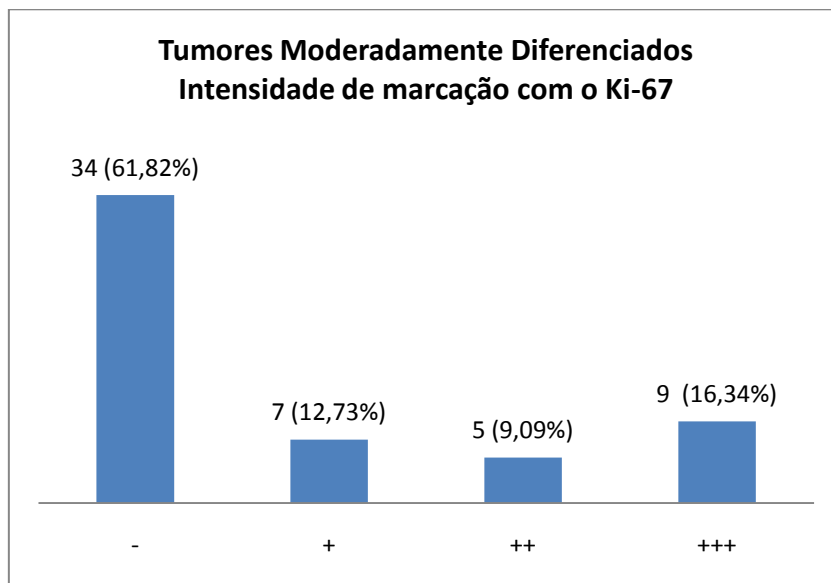


Gráfico 1 - Intensidade com que são marcadas as células dos tumores moderadamente diferenciados

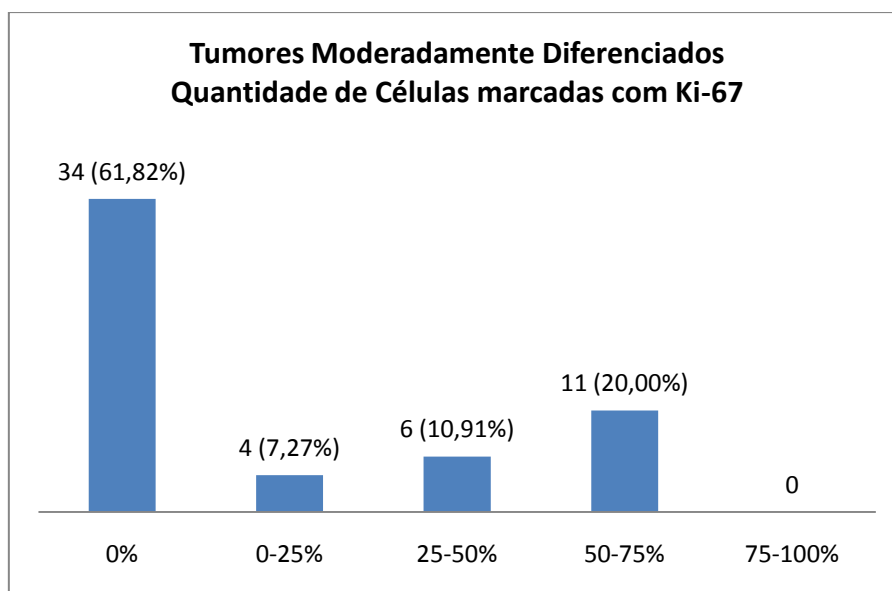


Gráfico 2- Número de células marcadas com Ki-67

Discussão

Desde a sua descoberta que o Ki-67, dado a sua presença exclusiva na fase activa do ciclo celular, tem sido utilizado em investigações que estudam a relação entre a diferenciação tumoral, estadio tumoral, tamanho do tumor, prognóstico, sexo e idade do doente, e a proliferação celular determinada pelo índice de imunomarcacção com o Ki-67. A determinação da proliferação tumoral pode ser feita por marcadores celulares endógenos de proliferação, como o antigénio nuclear de proliferação celular (PCNA) e o Ki-67, pela medição do tempo de duplicação após incorporação de H-Timidina ou Bromodeoxiuridina, pelo índice mitótico (contagem das figuras mitóticas), pelo uso da citometria de fluxo para determinação das células em fase S e por técnicas de inibição da mitose.^(12, 13) Este último método avalia a taxa de acumulação de células após paragem em metafase, por substâncias como a colchicina, sendo o processo bastante trabalhoso e pouco prático. Das técnicas referidas, só as técnicas de inibição da mitose permitem obter a taxa de proliferação celular. O Ki-67 apesar de não permitir determinar a taxa de proliferação celular, constitui um marcador de proliferação celular, indicando a fracção de crescimento, ou seja, o potencial de divisão celular que um determinado grupo de células tem num determinado momento.⁽¹⁴⁾

A utilização do Ki-67 nos adenocarcinomas do cólon tem sido objecto de muitas expectativas pouco correspondidas.

Neste estudo, ao avaliar a relação entre a diferenciação e a marcação com Ki-67, verificou-se que os casos pouco diferenciados (n=2) apresentaram

marcação de 50 a 75% das células com intensidade “++”. Por outro lado, os casos moderadamente diferenciados (n=55) apresentaram-se em 61,82% Ki-67 negativos. Quando marcados, os adenocarcinomas moderadamente diferenciados, apresentaram-se em 20,00% dos casos com 50 a 75% das células Ki-67 positivas e em 16,34% com intensidade “+++”. Estes resultados poderão sugerir uma relação entre a diferenciação e a imunomarcação com Ki-67 e, conseqüentemente com a proliferação tumoral. Os tumores pouco diferenciados parecem apresentar positividade para o Ki-67, logo uma elevada proliferação tumoral, ao passo que os moderadamente diferenciados parecem apresentar-se Ki-67 negativos na maior parte dos casos, e assim sendo com baixa proliferação tumoral.

Esta relação entre a diferenciação do tumor e a expressão do Ki-67 não é consensual na literatura disponível. Porschen, num estudo de 1989, verificou que os carcinomas bem diferenciados e moderadamente diferenciados não apresentam diferenças na sua actividade proliferativa medida usando o índice de Ki-67 (razão entre o número de células com núcleos celulares Ki-67 positivos e o número total de células tumorais num determinado campo).⁽¹⁵⁾ Kubota, em 1992, diz não ter detectado diferenças para o índice de Ki-67 entre os vários graus histológicos.⁽¹⁶⁾ Ribeiro, em 2000, obtém uma relação não estatisticamente significativa entre o grau de diferenciação histológica e a expressão do Ki-67.⁽¹⁷⁾ Duchrow, em 2003, verificou existir correlação estatisticamente significativa entre o índice de marcação com MIB-1 e o grau de diferenciação tumoral, verificando que nos carcinomas de grau 3 (pouco diferenciados) o índice de marcação seria menor que nos carcinomas de grau 2 (bem diferenciados). Já Uzma Nabi, num estudo relativamente recente (2008)

vem dizer que o índice de marcação com Ki67 em carcinomas colo-rectais está relacionado com o grau de diferenciação, tipo histológico e estadio tumoral. Além disso, vem dizer que os carcinomas que apresentaram um maior índice de marcação foram os bem e moderadamente diferenciados, por comparação aos pouco diferenciados. ⁽¹⁸⁾ À excepção destes últimos estudos, não é possível verificar a existência de uma relação entre a diferenciação histológica e a expressão do antigénio Ki-67.

Relativamente aos casos moderadamente diferenciados é possível ainda referir que, dos 21 casos positivamente marcados com Ki-67, 42,86% foram marcados com intensidade “+++” e 52,38% apresentaram 50 a 75% das células positivas para o Ki-67. A concordância entre a intensidade “+++” e a existência de 50-75% das células marcadas ocorreu em 38,09% dos casos moderadamente diferenciados positivos para o Ki-67. Assim é possível concluir que, apesar dos casos moderadamente diferenciados se apresentarem maioritariamente negativos para o Ki-67, quando apresentam positividade esta ocorre com elevada intensidade e quantidade de células marcadas.

Os casos bem diferenciados (n=5) apresentaram marcação em 3 casos, apresentando estes diferentes intensidades e quantidades de células imunomarcadas. Os restantes 2 casos são negativos para o Ki-67. Estes resultados não permitem inferir qualquer tipo de conclusão.

A incongruência entre a marcação com o Ki-67 e a diferenciação nos casos bem diferenciados, assim como nos moderadamente diferenciados, podem ser explicados pela heterogeneidade de imunomarcação com Ki-67, decorrente da heterogeneidade de proliferação celular que os carcinomas colo-

rectais apresentam. Já em 1985, Quirke estudava, recorrendo a técnicas de citometria de fluxo, a potencial diferença histológica entre as camadas mais profundas e as mais superficiais dos tumores colo-rectais, mas sem resultados demonstrativos de diferença significativa. ⁽¹⁹⁾ Em 1998, Palmqvist veio evidenciar a necessidade de avaliar áreas tumorais bem definidas relativamente à diferenciação tumoral, em tumores polarizados, como os carcinomas colo-rectais. Utilizando o anticorpo monoclonal Ki-67, verificou que o índice de marcação era maior na margem luminal do que na margem invasiva do tumor, independentemente da sua localização no cólon. Verificou também que a proliferação na margem invasiva não estava correlacionada com a profundidade de invasão na parede tumoral. ⁽²⁰⁾ A explicação para uma maior taxa de proliferação tumoral pode ser atribuída ao conteúdo luminal, nomeadamente aos ácidos biliares quenodesoxicólico e litocólico, a outros derivados de esteróides, a conteúdo bacteriano, a enemas e a laxantes de preparação cólica para cirurgias. ^(21, 22) Relativamente ao facto da proliferação celular se ter mostrado mais acentuada na margem tumoral invasiva, sabe-se actualmente que esta margem é geralmente pouco diferenciada em todos os adenocarcinomas, não sendo, por isso, tida em conta aquando da classificação histológica do adenocarcinomas do cólon. ⁽⁴⁾ A relação entre a pouca diferenciação histológica e a proliferação celular avaliada pela expressão do Ki-67 é aqui sugerida, apesar de poucas vezes demonstrada.

Outra causa de heterogeneidade e de incongruência de resultados a ter em conta, é a existência de células não tumorais que poderão estar incluídas no estroma tumoral, nomeadamente células do sistema imune, como linfócitos, que são marcados positivamente com o Ki-67.

Limitações:

Tal como referido, a utilização de marcadores de proliferação celular, como a expressão da proteína Ki-67, avaliada por métodos imunohistoquímicos, implica algumas limitações. O uso do Ki-67 é limitado na avaliação da taxa de proliferação, pois ao fornecer informação sobre a fracção de crescimento tumoral descreve apenas o número de células em ciclo celular activo, não tendo em conta o tempo necessário para que o ciclo celular se complete, logo fornecendo apenas a informação acerca de um estado de proliferação e não sobre a taxa de proliferação.⁽¹²⁾ Outro problema que se coloca é a existência de variações na quantidade Ki-67 expressa no núcleo durante o ciclo celular. Verificou-se que na Anáfase e Telófase a quantidade de Ki-67 decresce, e que durante a passagem de G1 para S os valores se encontram muito pouco elevados.⁽²³⁾ A determinação imunohistoquímica de Ki-67 pode classificar erroneamente estas células como não estando no ciclo celular activo. Além disso, células que ficaram retidas entre G1 e S, e G2 e M poderão apresentar níveis estáveis e detectáveis de Ki-67. Duchrow num estudo de 2001 referiu ter demonstrado que o excesso de expressão dos elementos repetitivos da proteína Ki-67 derivados do exão 13 causa retenção das células.⁽²⁴⁾ Tendo em conta estes dados, é colocada a hipótese por Duchrow (2003) de que doentes com adenocarcinomas do cólon poderão apresentar um número significativo de células retidas em determinada fase celular que exprimem a proteína Ki-67. A quantidade de Ki-67 estável nestas células dever-se-ia, não à nova sintetização, mas à inibição da degradação e a modificações pós-translacionais. A quantidade de mRNA do Ki-67 apresentada por estas células seria muito baixa. Assim, adenocarcinomas com

índices de Ki-67 elevados mas quantidades baixas de mRNA, determinado por hibridação in-situ, teriam hipoteticamente melhor prognóstico pois as suas células teriam a capacidade de ficar retidas, por essa razão apresentariam menor capacidade degenerativa e, talvez, maior capacidade de resposta a terapias adjuvantes e ao próprio sistema imune do doente.⁽¹²⁾ Surge então a necessidade de complementar a determinação da expressão do Ki-67 com outras medidas, nomeadamente com a determinação do seu mRNA, de modo a diminuir as deficiências que o uso deste marcador apresenta na determinação da proliferação tumoral.

Implicações:

A relação entre a proliferação tumoral averiguada pelo Ki-67 e o resultado obtido com outros possíveis indicadores de prognóstico, como a expressão de p53, a classificação TMN, a idade e sexo dos doentes, entre outros, não estão integradas no âmbito deste trabalho, mas são de extrema relevância.

Num estudo de Moreno e colaboradores (2009) realizado em adenocarcinomas do cólon moderadamente diferenciados de classificação T3 N0 M0, verificou-se que estes eram Ki-67 positivos na sua maioria (74%), e que nestes existiria uma marcada hiperexpressão de p53. Estes resultados vêm destacar a importância de estabelecer relações entre a expressão de Ki-67 e a diferenciação, assim como de outros possíveis indicadores de prognóstico, como a mutação de p53, que constitui uma mutação relevante no processo de carcinogénese dos adenocarcinomas do cólon.⁽²⁵⁾

Assim o interesse deste estudo e de outros semelhantes, prende-se sobretudo com a importância de encontrar um conjunto de indicadores prognósticos que prevejam, o mais fielmente possível, a evolução clínica, permitindo a criação de uma ferramenta que auxilie os clínicos na escolha da opção terapêutica mais adequada a determinado doente.

Conclusão:

Conclui-se que o Ki-67 é um marcador de proliferação celular, pois encontra-se presente no núcleo da célula nas fases activas da célula, estando ausente na fase G0.

A determinação da correlação entre a expressão do Ki-67 com a diferenciação histológica nos adenocarcinomas do cólon tem-se mostrado, na maior parte dos estudos, não estatisticamente significativa, levando a pensar que tal relação não é possível ser estabelecida.

Este estudo contribui para reforçar os resultados obtidos por outros estudos, visto que a hipótese de correlação entre a diferenciação tumoral e a proliferação celular, determinada pelo Ki-67, não leva resultados conclusivos.

A integração da expressão do Ki-67 com outros indicadores de prognóstico é de extrema importância na criação de uma ferramenta que auxilie os clínicos na escolha da opção terapêutica mais adequada a determinado doente.

Referências Bibliográficas

1. D. Max Parkin FB, J. Ferley, Paola Pisani. Global Cancer Statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005;55:74-108.
2. Risco de Morrer em Portugal. Lisboa: Direcção-Geral da Saúde 2006.
3. Hardy RB, Meltzer SJ, Jankowski JA. ABC Of colorectal cancer: Molecular basis for risk factors. BMJ. 2000 Oct 7;321:886-9.
4. Hamilton SR, Lauri LA, editors. Pathology and Genetis of Tumours of the Digestive System. Lyon: IARC Press; 2000.
5. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer 1983;31:13–20.
6. Duchrow M, Schluter C, Wohlenberg C, Flad H-D, Gerdes J. Molecular characterization of the gene locus of the humancell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. Cell Prolif. 1996;29:1-12.
7. Kubbutat MHG, Key G, Duchrow M, Schluiter C, Flad H-D, Gerdes J. Epitope analysis of antibodies recognising the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody Ki-67 (Ki-67 protein). J Clin Pathol. 1994;47:524-8.
8. Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? Histopathology. 2002;40:2-11.

9. MacCallum DE, Hall PA. The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. *J Pathol.* 2000;190:537-44.
10. Rose DSC, Maddox PH, Brown DC. Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparison of five antibodies. *J Clin Pathol.* 1994;47:1010-4.
11. Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen. In: DakoCytomation, editor. 2002.
12. M Duchrow M, Ziemann T, Windhovel U, Bruch H-P, Broll R. Colorectal carcinomas with high MIB-1 labelling indices but low pKi67 mRNA levels correlate with better prognostic outcome. *Histopathology.* 2003;42:566–74.
13. Rew DA. Cell proliferation, tumour growth and clinical outcome: gains and losses in intestinal cancer. *Annals of The Royal College of Surgeons of England.* 1993;75:397-404.
14. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *Journal of Cellular Physiology.* 2000;182:311–22.
15. Porschen R, Lohe B, Hengels K-J, Borchard F. Assessment of Cell Proliferation in Colorectal Carcinomas Using the Monoclonal Antibody KI-67: Correlation With Pathohistologic Criteria and Influence of Irradiation. *Cancer.* 1989; 64:2501-5.

16. Kubofa Y, Petras RE, Easley KA, Bauer TW, Tubbs RR, Fazio VW. Ki-67-Determined Growth Fraction versus Standard Staging and Grading Parameters in Colorectal Carcinoma: A Multivariate Analysis. *Cancer*. 1992;70::2602-9.
17. Ribeiro JU, Alves VA, Souza PM, Ribeiro AVS, RAWET V, NONOGAKI S, et al. Correlação das Proteínas p53 e Ki67 com o prognóstico de pacientes com Adenocarcinoma do Reto Distal. *Rev bras Coloproct*. 2000;20(4):248-58.
18. Nabi U, Nagi AH, Sami W. KI-67 Proliferating Index and histological grade, type and stage of colorectal carcinoma. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2008;20(4).
19. Quirke P, Dyson JED, Dixon MF, Bird CC, Joslin CAF. Heterogeneity of colorectal adenocarcinomas evaluated by flow cytometry and histopathology. *Br J Cancer*. 1985;51(99-106).
20. Palmqvist R, Oberg A, Bergstrom C, Rutegfrd JN, Zackrisson B, Stenling R. Systematic heterogeneity and prognostic significance of cell proliferation in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 1998;77(6):917-25.
21. Mullan FJ, Wilson HK, Majury CW, Mills JO, Cromie AJ, Campbell GR, et al. Bile acids and the increased risk of colorectal tumours after truncal vagotomy. *Br J Surg*. 1990 Oct;77(10):1085-90.
22. Lehy T, Abitbol JL, Mignon M. Influence of rectal preparation by enema on cell proliferation in the normal rectal mucosa in man. *Gastroenterol Clin Biol*. 1984 Mar;8(3):216-21.

23. Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.* 1992 Jan;25(1):31-40.
24. Duchrow M, Schmidt M, Zingler M, Anemüller S, Bruch H-P, Broll R. Suppression of Cell Division by pKi-67 Antisense-RNA and Recombinant Protein. *Cell Physiol Biochem* 2001;11:331-8.
25. Moreno JM, Agostinho C, Merino T, Faria MC. Estudio de correlación de p-53 y Ki-67 en 32 casos de tumores colorectales: Análisis de resultados. ISBN: 978-84-692-76778 ed: X Congresso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica; 2009.

Anexos

Em anexo apresento o protocolo de processamento imunohistoquímico para o Ki-67, utilizado no CHCB, e o estudo publicado pelo Professor Doutor Javier Muñoz Moreno e seus colaboradores, publicado no “X Congreso Hispanoamericano de Anatomía Patológica” e referido neste trabalho. Tendo sido uma das colaboradoras envolvidas neste trabalho e tendo participado neste congresso, em anexo apresento também o certificado de participação.

Anexo 1

Protocolo usado no Autostainer da TechMateMT Horizon (versão 3.0) para o tratamento de tecidos com Ki-67 (MIB-1) no CHCB.....33

Anexo 2

Estudio de correlación de p-53 y Ki-67 en 32 casos de tumores colorectales:
Análisis de resultados.....36

Anexo 3

Certificado de participação no “X Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica”41

Anexo 1**Protocolo do Autostainer da TechMate^{MT} Horizon (versão 3.0) para o tratamento de tecidos com Ki-67 (MIB-1)**

Etapas	Procedimento realizado	Tempo em minutos (') e segundos (")
1	BUF1	10"
2	PAD1	29"
3	BUF1	10"
4	PAD1	29"
5	BUF1	10"
6	PAD1	29"
7	BUF1	10"
8	PAD1	45"
9	AB1	25'
10	PAD1	29"
11	BUFF1	10"
12	PAD1	29"
13	BUF1	10"
14	PAD1	29"
15	BUF1	10"
16	PAD1	29"
17	BUF1	10"
18	PAD1	29"
19	BUF1	10"
20	PAD2	45"
21	AB2	25'
22	PAD2	29"
23	BUF1	10"
24	PAD2	29"
25	BUF2	10"
26	PAD2	29"
27	HPBK	2'30"
28	PAD2	29"

29	HPBK	2'30"
30	PAD2	29"
31	HPBK	2'30"
32	PAD2	29"
33	BUF2	10"
34	PAD2	29"
35	BUF2	10"
36	PAD2	29"
37	BUF2	10"
38	PAD2	45"
39	HRP	25'
40	PAD3	29"
41	BUF2	10"
42	PAD3	29"
43	BUF2	10"
44	PAD3	29"
45	BUF3	10"
46	PAD3	29"
47	BUF3	10"
48	PAD3	29"
49	BUF3	10"
50	PAD3	45"
51	CHRO - DAB	5'
52	PAD3	29"
53	BUF3	10"
54	PAD3	45"
55	CHRO - DAB	5'
56	PAD3	29"
57	BUF3	10"
58	PAD3	45"
59	CHRO - DAB	5'
60	PAD3	29"
61	BUF3	10"
62	PAD4	29"
63	BUF3	10"

64	PAD4	29"
65	HEMA	1'
66	PAD4	29"
67	BUF3	10"
68	PAD4	29"
69	BUF3	1'
70	PAD4	29"
71	BUF2	1'
72	PAD4	29"
73	BUF2	10"
74	PAD4	29"
75	H2O	10"
76	PAD4	29"
77	H2O	10"
78	PAD4	29"
79	H2O	10"

Legenda:

BUF – Solução de lavagem

PAD – Esponjas;

AB1 – Anticorpo primário;

AB2 – Anticorpo secundário;

HPBK – Bloqueio da peroxidase endógena;

HRP – Estreptavidina peroxidase;

CHRO-DAB –Diaminobenzidina + Cromogéneo

HEMA – Hematoxilina de Mayer

Anexo 2



ISBN: 978-84-692-76778



Nº 1528.

COMUNICACIONES

Estudio de correlación de p-53 y Ki-67 en 32 casos de tumores colorectales: Análisis de resultados.

Javier Muñoz Moreno^[1], Catarina Agostinho^[2], Teresa Merino^[3], Maria Conceição Faria^[3]

(1) Faculdade de Ciências da Saúde e Centro Hospitalar "Cova da Beira". Covilhã. PORTUGAL

(2) Faculdade de Ciências da Saúde. Covilhã. PORTUGAL PORTUGAL

(3) Centro Hospitalar "Cova da Beira". Covilhã. PORTUGAL PORTUGAL

Introducción: Fueron seleccionados 32 casos de tumores colorectales de un total de 64 teniendo en cuenta el grado de diferenciación y la infiltración tumoral. Dado que un porcentaje elevado de los 64 casos eran tumores moderadamente diferenciados, fueron seleccionados los 32 casos con este grado de diferenciación tumoral.

Teniendo en cuenta igualmente la infiltración en la pared fueron seleccionados los 32 casos en estadio T3 N0. Todos los casos fueron diagnosticados en el Centro Hospitalar "Cova da Beira" en los años 2001 a 2003.

Material y métodos: Estudio de material obtenido en parafina y aplicación de las técnicas de inmunohistoquímica correspondientes de los marcadores p-53 (Clon Do-7 de Dako) y ki-67 (Clon MIB-1 de Dako) en los 32 casos. Fueron analizados en todos los casos 50 campos de gran ampliación (x400)

Resultados: Se apreció una sobreexpresión de p53 en un 80% de los casos para la proteína p-53 y en un 74% de los casos para el marcador Ki-67. En el 100% de los casos de inmunopositividad marcada para el marcador Ki 67 se apreció igualmente una marcada sobreexpresión para la proteína p-53.

Conclusión: Existe una marcada correlación en la expresión de los marcadores p-53 y ki-67 en los tumores colorectales. El estudio fue estadísticamente significativo (Chi-cuadrado) con $p < 0,05$ y $OR < 1$. Para dicho estudio fueron analizados estadísticamente los 32 casos mediante el programa SPSS (Versión 14.0). No hemos encontrado estudios de correlación de estos dos marcadores en tumores colorectales en la literatura mundial.

Bibliografía:

1. Ti: P53 and EGFR expression in colorectal cancer: a reappraisal of `old` tissue markers

in patients with long follow-up. Au: Lin MX, Wen ZF, Feng ZY, He D. So: Anticancer Res. 2009 Feb;29(2):785-91.
2. Ti: Expression and significance of bmi-1 and ki67 in colorectal carcinoma tissues. Au: Lin MX, Wen ZF, Feng ZY, He D. So: Ai Zheng. 2008 Dec;27(12):1321-6.

Introducción

Hemos efectuado un estudio de correlación de dos marcadores de proliferación nuclear (p-53 y Ki-67) en tumores colorectales. Todos los casos fueron diagnosticados en el Centro Hospitalar "Cova da Beira" durante los años 2001 a 2003. De un total de 64 casos fueron seleccionados la mitad de ellos (32) y para ello se tuvo en cuenta el grado de diferenciación y la infiltración tumoral. Dado que un porcentaje elevado de los 64 casos eran tumores moderadamente diferenciados, fueron seleccionados los 32 casos con este grado de diferenciación tumoral. Teniendo en cuenta igualmente la infiltración en la pared fueron seleccionados los 32 casos en estadio T3 N0. Ninguno de estos casos presentaba metastasis a distancia que tengamos documentado hasta el momento. No hemos encontrado en la literatura mundial este tipo de estudios de correlación.

Material y Métodos

Estudio de material obtenido en bloques de parafina archivados de estos casos y aplicación posterior de las técnicas de inmunohistoquímica correspondiente de los marcadores p-53 (Clon Do-7 de Dako) y ki-67 (Clon MIB-1 de Dako) en los 32 casos. Fueron analizados en todos los casos 50 campos de gran ampliación (x400)

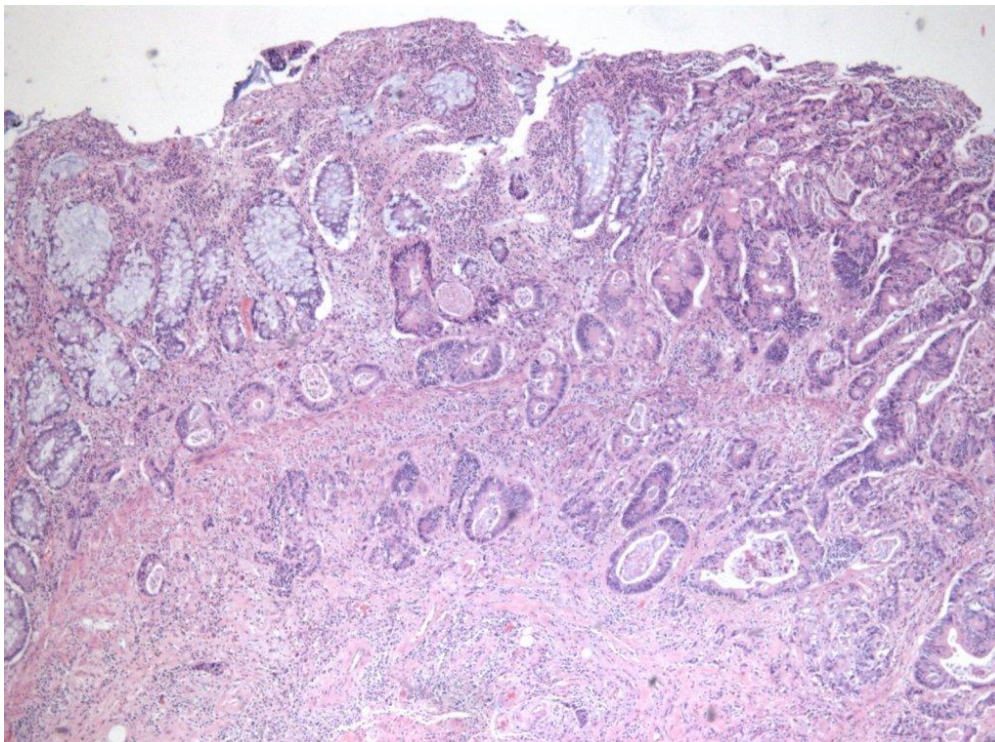
Resultados

En este estudio observamos una sobreexpresión de p53 en un 80% de los casos para la proteína p-53. En el caso del marcador Ki-67 fue en un 74% de los casos. Llamó la atención que en todos los casos de inmunopositividad marcada para el marcador Ki 67 se apreció igualmente una marcada sobreexpresión para la proteína p-53.

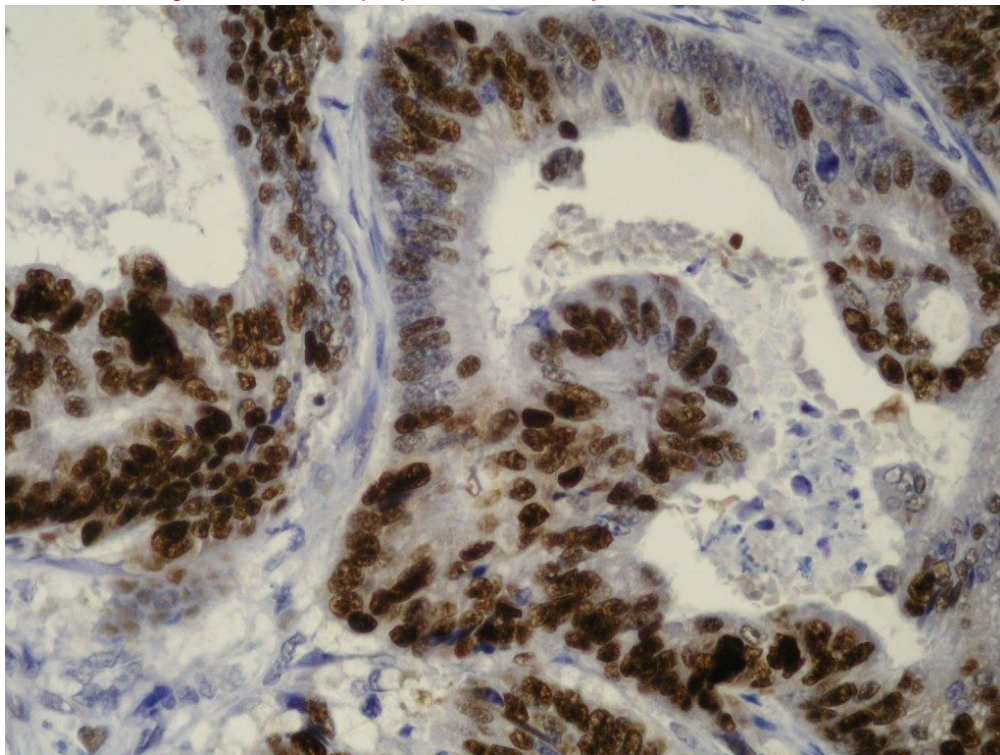
Conclusiones

Existe una marcada correlación en la expresión de los marcadores p-53 y ki-67 en los tumores colorectales. Para ello introducimos estos parámetros (p-53 y Ki-67) en una base de datos donde las variables incluían positividad versus negatividad y también tuvimos en cuenta la intensidad de coloración (+, ++, +++). El estudio fue estadísticamente significativo (Chi-cuadrado) con $p < 0,05$ y $OR < 1$. Para este estudio estadístico fueron analizados los 32 casos usando el programa SPSS (Versión 14.0).

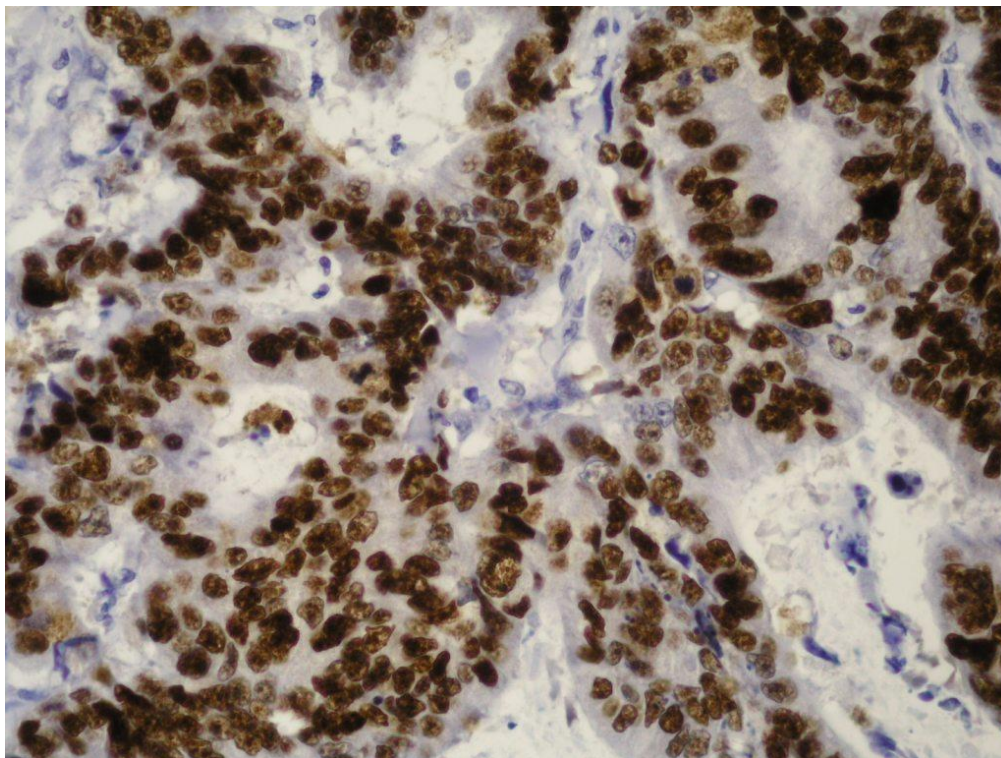
Iconografía



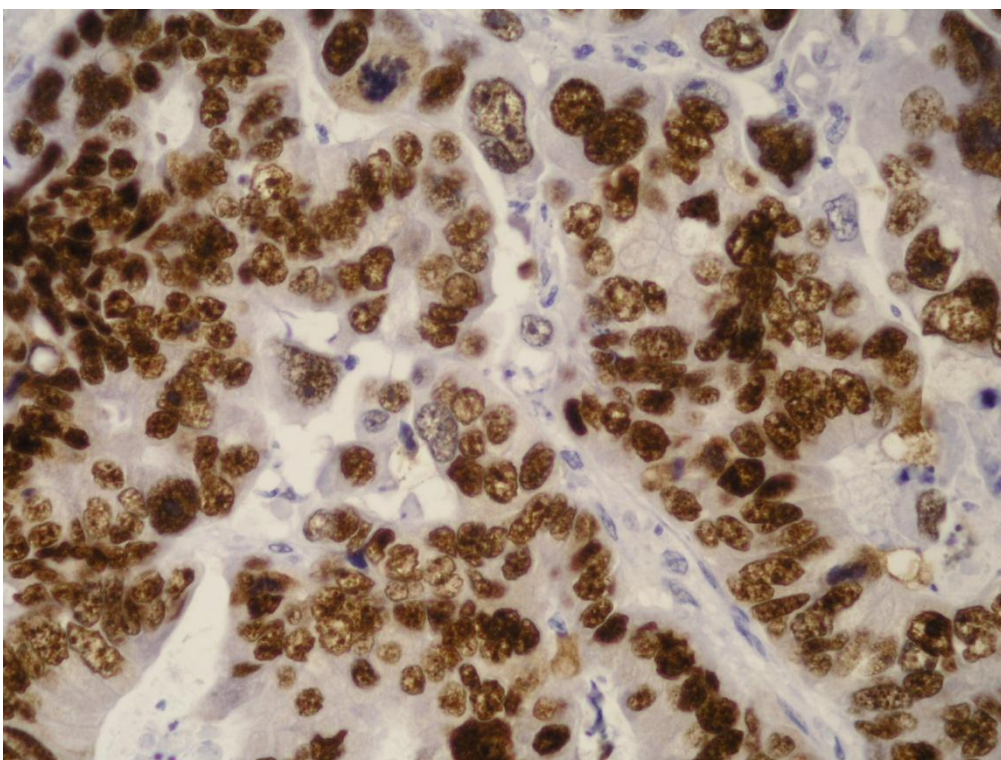
Adenocarcinoma de colon. HEx100 - Una imagen de HE de los 32 casos estudiados donde observamos alguna áreas con pequeños macizos y reacción desmoplásica abundante



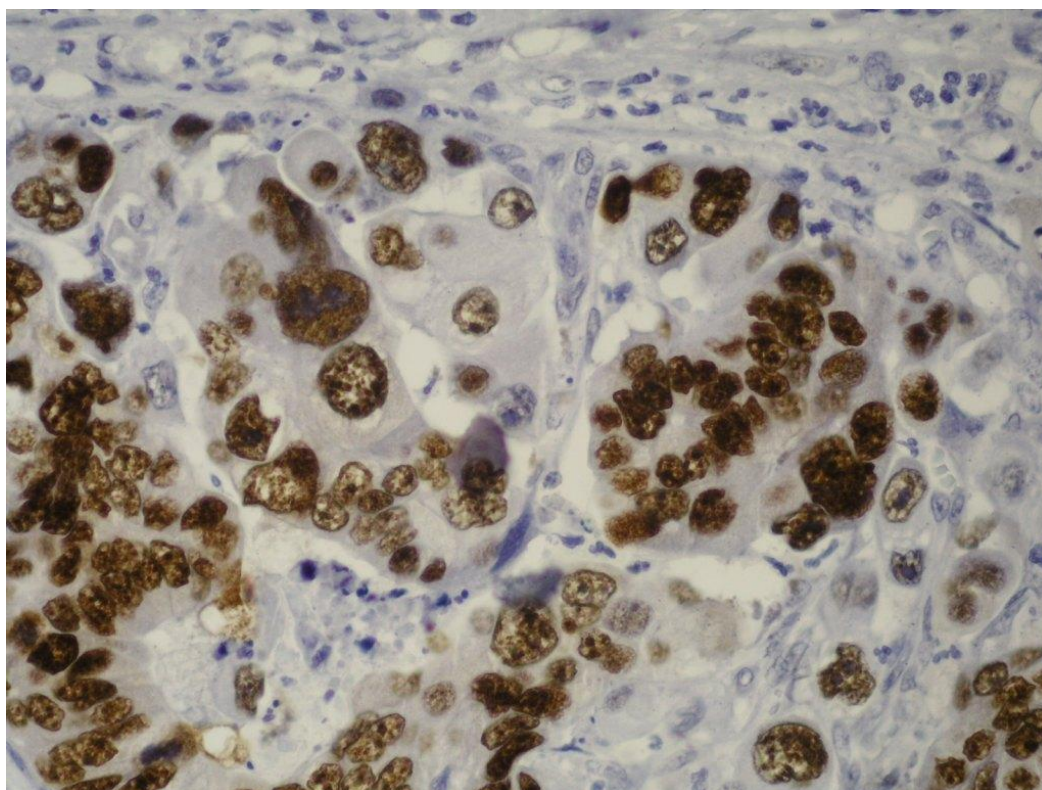
p-53. - Observamos la expresión del marcador p-53 con una intensidad de +++ en más del 75% de los núcleos de las células. La imagen corresponde al caso de la imagen anterior



Ki-67 - Observamos la expresión del marcador p-53 con una intensidad de +++ en más del 75% de los núcleos de las células. La imagen corresponde al caso de la imagen anterior tomada en otro campo diferente



- Observamos la sobreexpresión de Ki-67 con una intensidad de +++ en más del 75% de los núcleos de las células.



Ki-67 - Observamos la expresión del marcador p-53 con una intensidad de +++ en más del 75% de los núcleos de las células. Realzar que la sobreexpresión se observa exclusivamente en los núcleos de las células.

Agradecimientos

A mi siempre fiel y colaboradora Teresa.

Bibliografía

1. Ti: P53 and EGFR expression in colorectal cancer: a reappraisal of `old` tissue markers in patients with long follow-up. Au: Lin MX, Wen ZF, Feng ZY, He D. So: Anticancer Res. 2009 Feb;29(2):785-91.
2. Ti: Expression and significance of bmi-1 and ki67 in colorectal carcinoma tissues. Au: Lin MX, Wen ZF, Feng ZY, He D. So: Ai Zheng. 2008 Dec;27(12):1321-6.

Web mantenido y actualizado por el **Servicio de informática** uclm.
Modificado: 23/12/2009 10:42:04

Anexo 3



X Congreso Virtual Hispano-Americano de Anatomía Patológica

1 de noviembre de 2009 a 1 de febrero de 2010

<http://www.conganat.org/10congreso/>
ISBN: 978-84-692-76778



Certificado de Acreditación de Formación Médica Continuada

CATARINA SOFIA FREIRE AGOSTINHO ha asistido y participado activamente en el 10º Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica, celebrado del 1 de noviembre de 2009 al 1 de febrero de 2010.



Actividad acreditada en base a la encomienda de gestión concedida por los Ministerios de Sanidad y Política Social y Ministerio de Educación al Consejo General de Colegios Oficiales de Médicos (Resolución de 22 de marzo de 2002, BOE Núm. 81 de 4 de abril de 2002) con 11,2 CRÉDITOS, equivalentes a 60 horas lectivas.



Créditos reconocidos por la European Accreditation Council for Continuing Medical Education (EACCME) de la European Union of Medical Specialists (UEMS)

Santander (España), 1 de febrero de 2010.




Prof. Fidel Fernández Fernández

Prof. Luis Buelta Carrillo

Coordinadores Generales X CONGANAT