

**A ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE c-erbB-2, EGFR,
VEGF E CICLINAS EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE
DO ESÔFAGO.**

YUKIE SATO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do título de Mestre em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

São Paulo

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo**

Sato, Yukie

A análise da expressão de c-erbB-2, EGFR, VEGF e ciclinas em carcinoma epidermóide do esôfago / Yukie Sato - São Paulo, 2005.
106p.

Dissertação (mestrado) - Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. CÂNCER DO ESÔFAGO/genética/patologia. 2. CARCINOMA EPIDERMÓIDE. 3. RECEPTORES DE FATORES DE CRESCIMENTO. 4. RECEPTORES ERBb-2. 5. CICLINAS.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Eiko e Minoru (in memorian), por sempre me
mostrarem o caminho correto.*

*À minha irmã Akemi e minha tia Sueka, simplesmente
por existirem em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, por sua orientação, dedicação, confiança e paciência. Por ser um orientador sempre prestativo, oferecendo todo o suporte necessário para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Eduardo Fumio Kuwabara, pela compreensão e paciência nos meus momentos de desânimo, angústia e crises de mau humor, mas especialmente, pelo seu amor e amizade incondicionais, sem os quais tudo se tornaria muito mais difícil.

Às minhas “eternas amigas de laboratório” Carolina Elena Viña Bertoloto, Kátia Cristina Pellegrino, Maria José de Jesus Silva, Renata Cecília Amaro-Ghilardi e Taís Machado, por me ensinarem o que é trabalhar em equipe, com ética e respeito, e acima de tudo, pela amizade que eu cultivo com muito carinho.

Às queridas amigas Viviane Miranda Dias e Rika Kashiwagi, pelos momentos de descontração, apoio, desabafos e incentivo nessa minha jornada e, principalmente, pela amizade sincera cultivada durante todos esses anos.

Aos amigos Alexandra Cardozo Longo, Edáíse Maria da Silva, Gilmara Santos da Silva e André Abreu Silva, pelo companheirismo, apoio, risos,

desabafos e os “lanchinhos de fim de tarde”, que tornaram todos esses dias menos árduos e mais prazerosos.

Aos colegas Fabiana Facco Casarotti, Severino da Silva Ferreira, Carlos Ferreira Nascimento e Sueli Nonogaki, pela competência e excelência na preparação do material e realização das reações de imunoistoquímica.

As funcionárias da Pós-Graduação Ana Maria Alves Kuninari e Marcia Miwa Hiratani, pela paciência, atenção e auxílio oferecidos durante o desenvolvimento desse estudo.

Aos membros da Banca de Qualificação Dr. Antônio A. Hartmann, Dr. Clóvis Antônio Lopes Pinto e Dr. Rubens Aissar Sallum, pelas críticas e sugestões que ajudaram no desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Imunoistoquímica José Ivanildo Neves, Maria Nazaré de Fatima Ferreira e Ozires Pereira Santos, pelo auxílio durante a realização das reações de imunoistoquímica.

À Inês N. Nishimoto e José Humberto Fregnani, pela paciência e presteza nas análises estatísticas realizadas nesse trabalho.

À toda equipe da Biblioteca, pela presteza durante as pesquisas bibliográficas e pela formatação desse trabalho.

À Sra. Hirde Cortesini e demais funcionários do Serviço de Arquivo Médico do Hospital do Câncer, pelo auxílio e paciência durante levantamento dos dados nos prontuários médicos.

Aos colegas de Pós-Graduação do Departamento de Anatomia Patológica, principalmente ao Antônio Hugo J. F. M. Campos, Maria Betânia Mahler Araújo e Victor Piana Andrade, que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

À todos do Departamento de Anatomia Patológica, funcionários e residentes, que de alguma forma, colaboraram para a conclusão desse estudo.

À CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro indispensável para o desenvolvimento desse projeto.

RESUMO

Sato Y. **Análise da expressão de c-erbB-2, EGFR, VEGF e ciclinas em Carcinoma Epidermóide de Esôfago**. São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado – Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O carcinoma epidermóide do esôfago (CEE) é o tipo histológico mais comum de câncer do órgão, sendo a sexta neoplasia em frequência em nosso país. Geralmente, o CEE está associado a um prognóstico ruim, por se tratar de um tumor em estadio avançado no momento do diagnóstico, apresentando alta taxa de mortalidade. As alterações moleculares do CEE são pouco estudadas e os trabalhos existentes na literatura mostram resultados controversos e casuística reduzida. O objetivo desse estudo foi analisar expressão de proteínas envolvidas na regulação da proliferação celular em CEE e sua correlação com variáveis clínico-patológicas e sobrevida dos pacientes. **Métodos:** Foi realizada imunoistoquímica para análise de expressão de c-erbB-2, EGFR, VEGF e ciclinas A, B1 e D1 em 613 casos de CEE. Os casos representados por peças cirúrgicas foram distribuídos em três blocos de parafina de Tissue Microarray, em duplicata; os casos com biópsias foram analisados em corte convencional. Os casos foram classificados de acordo com a frequência, intensidade e padrão de marcação das células, dependendo do anticorpo avaliado. As análises estatísticas de correlação entre as variáveis consideradas foram realizadas pelos métodos de χ^2 ou teste exato de Fisher. Para as análises de sobrevida global, o cálculo da estimativa de sobrevida cumulativa foi realizado pela técnica de Kaplan-Meier e as comparações entre as curvas de sobrevida, em relação as variáveis estudadas, pelo teste de Log-rank. A análise

multivariada foi feita pelo modelo de riscos proporcionais de Cox. Foi considerado o nível de significância de 5%. **Resultados:** Nossos resultados mostraram correlação estatisticamente significativa entre a expressão de c-erbB-2 ($p=0,04$) e EGFR ($p=0,01$) e grau histológico. Ambos os marcadores foram significativamente mais expressos em casos bem/moderadamente diferenciados do que nos pouco diferenciados/ indiferenciados. Embora não tenha sido significativo, houve uma tendência de associação entre a superexpressão de c-erbB-2 e sítio do tumor, em que casos positivos ocorreram com mais frequência no terço médio do esôfago. Nenhuma associação significativa foi verificada entre a expressão dessas proteínas e sobrevida global. Em relação a ciclina D1, foi observada correlação significativa entre a superexpressão dessa proteína e cor ($p=0,026$), sendo mais expressa em pacientes de cor branca. Foi observada também uma tendência à significância para correlação entre a superexpressão dessa proteína e grau de diferenciação ($p=0,070$), em que a ciclina D1 esteve mais expressa em casos bem/moderadamente diferenciados. Quanto a ciclina B1, foi verificado que casos negativos para essa proteína foram significativamente mais frequentes em tumores que atingiram níveis mais profundos de infiltração ($p=0,033$) e com presença de invasão linfática ($p=0,006$). Não foi observada nenhuma correlação significativa entre a superexpressão de VEGF e ciclina A e aspectos clínico-patológicos. As análises de sobrevida global mostraram a existência de associação estatisticamente significativa entre a superexpressão de ciclinas A ($p<0,0001$), B1 ($p=0,014$) e D1 ($p<0,0001$) e VEGF ($p=0,002$) e menores estimativas de sobrevida cumulativa. Foi observada correlação significativa entre a coexpressão da maioria das proteínas estudadas, exceto entre as expressões de c-erbB-2/ciclina A, c-erbB-2/ciclina B1, c-erbB-2/VEGF, EGFR/ciclina A e EGFR/VEGF. Em relação as variáveis clínico-patológicas, gênero ($p=0,044$), cor ($p=0,0005$) e pT ($p=0,021$) mostraram-se como indicadores de pior prognóstico. Pela análise multivariada, pT ($p=0,030$) e gênero ($p=0,004$) permaneceram como fatores prognósticos independentes. No entanto, quando desconsideramos pT da análise multivariada, ciclina D1

($p < 0,0001$), cor ($p = 0,003$) e ciclina A ($p = 0,023$) persistiram como marcadores prognósticos independentes. **Conclusão:** No presente trabalho, verificamos correlação significativa entre a superexpressão de c-erbB-2, de EGFR e de ciclina D1 e grau histológico, conferindo um comportamento menos agressivo aos tumores, sugerindo que esses marcadores podem estar envolvidos na indução de outra via de sinalização, como diferenciação celular. Casos negativos para expressão de ciclina B1 foram mais frequentes entre os tumores com invasão linfática e níveis mais profundos de infiltração, não permitindo esclarecer sua relação com a progressão tumoral nesse tumor. Não foi constatada nenhuma correlação com significância estatística entre a superexpressão de VEGF e de ciclina A e as variáveis clínico-patológicas avaliadas. As variáveis gênero, cor, pT e expressão de VEGF, ciclinas A, B1 e D1 foram consideradas indicadores de pior prognóstico pela análise univariada. No entanto, na análise multivariada, apenas pT e gênero permaneceram como marcadores prognósticos, mas quando pT foi desconsiderado dessa análises, ciclina D1, cor e ciclina A permaneceram como fatores prognósticos independentes em CEE.

SUMMARY

Sato Y. [Study of c-erbB-2, EGFR, VEGF and cyclins expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma]. São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado – Fundação Antônio Prudente].

Background: Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is the most common histologic type of cancer in this organ, being the sixth most common tumor in Brazil. ESCC is associated with poor prognosis, because it is usually an advanced stage disease at the moment of diagnosis, showing high mortality rates. There are few studies involving molecular alterations in ESCC and the reports show controversial results and small number of cases. The aim of this study was to analyze expression of proteins involved in cellular proliferation regulation in ESCC and the correlation with clinicopathological variables and patient survival. **Methods:** Immunohistochemistry was performed to analyze the c-erbB-2, EGFR, VEGF and cyclins A, B1 and D1 expression in 613 cases of ESCC. Cases represented by surgical resections were performed in three tissue microarray paraffin blocks spotted in duplicate and cases with small biopsies were performed in conventional slides. The cases were scored according to the frequency, intensity and staining pattern of tumoral cells, depending on the antibody evaluated. Statistical analysis between the variables considered in this study were performed using chi-square or Fisher's exact tests. For the overall survival analysis, the cumulative survival rates were calculated by Kaplan-Meier method and the comparison between the survival curves, according to the variables studied, by the Log-rank test. Multivariate analysis was performed using Cox regression method. A p value <0,05 was

considered statistically significant. **Results:** Our results showed significant correlation between c-erbB-2 ($p=0,04$) and EGFR ($p=0,01$) expression and histological grade. Both markers were significantly more expressed in well/moderately differentiated than in poorly differentiated/undifferentiated cases. Despite it were not statistically significant, there was a tendency to association between c-erbB-2 overexpression and tumor site, which positive cases were more frequently in the middle third of the esophagus. No significant association was verified between these proteins expression and overall survival. It was observed a tendency to significance for the correlation between cyclin D1 overexpression and histological grade ($p=0,070$), in which this protein was more expressed in well/moderately differentiated cases. Regarding cyclin B1, it was verified that negative cases for this protein was significantly more frequent in deeper infiltration lesions ($p=0,033$) and in cases with lymphatic invasion ($p=0,006$). It was not observed any significant correlation between VEGF and cyclin A overexpression and clinicopathological aspects. Overall survival analysis showed statistically significant association between cyclins A ($p<0,0001$), B1 ($p=0,014$), D1 ($p<0,0001$) and VEGF ($p=0,002$) and lower cumulative survival rates. It was verified significant correlation between the majority of proteins studied, except c-erbB-2/cyclin A, c-erbB-2/cyclin B1, c-erbB-2/VEGF, EGFR/cyclin A and EGFR/VEGF. Regarding the clinicopathological features, gender ($p=0,044$), ethnica ($p=0,0005$) and pT ($p=0,021$) were considered worse prognostic factors. Multivariate analysis showed that pT ($p=0,030$) and gender ($p=0,004$) persisted as independent prognostic factors. However, when T is not considered in the multivariate analysis, cyclin D1 ($p<0,0001$), ethnica ($p=0,003$) and cyclin A ($p=0,023$) remain as independent prognostic markers. **Conclusion:** In the present work, we verified significant correlation between c-erbB-2, EGFR and cyclin D1 overexpression and histological grade, giving a less aggressive behaviour to the tumors, suggesting that these markers can be involved in induction of other signaling pathway, as cellular differentiation. Negative cases for cyclin B1 expression occurred more frequent in cases with lymphatic invasion and deeper infiltration, not being possible elucidate

cyclin B1 relation with tumoral progression in ESCC. It was not verified any correlation with statistical significance between VEGF and cyclin A overexpression and the clinicopathological features considered. The variables gender, ethnicity, pT and VEGF, cyclins A, B1 and D1 expression were considered worse prognostic factors by univariate analysis. However, in multivariate analysis only pT and gender remained as prognostic markers, but when pT was not considered in this analysis, cyclin D1, ethnicity and cyclin A persisted as independent prognostic factors in ESCC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exemplar de lâmina para análise em corte convencional	21
Figura 2	Esquema de Tissue Microarray	22
Figura 3	Imunoistoquímica demonstrando marcação de membrana de c-erbB-2 em CEE	37
Figura 4	Imunoistoquímica mostrando marcação de EGFR em membrana, em CEE	38
Figura 5	Expressão imunoistoquímica de c-erbB-2 e EGFR em casos de CEE	39
Figura 6	Padrão de marcação imunoistoquímica de ciclina A em CEE	44
Figura 7	Expressão imunoistoquímica de ciclina B1 em CEE	45
Figura 8	Expressão imunoistoquímica de ciclina D1 em CEE	46
Figura 9	Expressão das ciclinas A, B1 e D1 em casos de pacientes com CEE	47
Figura 10	Expressão imunoistoquímica de VEGF em casos de CEE	53
Figura 11	Imunoistoquímica de VEGF em CEE	54
Figura 12	Curva de Sobrevida Global dos casos de CEE estudados	57
Figura 13	Curvas de Sobrevida Global em CEE, em relação as variáveis clínico-patológicas	59

Figura 14	Influência da superexpressão de marcadores nas curvas de Sobrevida Global	61
Figura 15	Análises de Sobrevida Global em “end point” de 12 meses, de acordo com os marcadores	65
Figura 16	Influência da expressão de marcadores nas curvas de sobrevida global, em “end-point” de 24 meses	66
Figura 17	Curvas de Sobrevida Global em “end-point” de 36 meses, em relação aos marcadores	67
Figura 18	Curvas de Sobrevida Global, em “end-point” de 12 meses, de acordo com fatores clínico-patológicos	68
Figura 19	Análises de Sobrevida Global, baseadas nos aspectos clínico-patológicos, em “end-point” de 24 meses	69
Figura 20	Curvas de Sobrevida Global em 36 meses e sua associação com variáveis clínico-patológicas	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos utilizados nesse estudo	26
Tabela 2	Classificação para expressão imunoistoquímica de c-erbB-2 e EGFR, de acordo com intensidade e padrão de marcação	27
Tabela 3	Critérios para classificação dos casos, baseados na expressão de c-erbB-2 e EGFR	28
Tabela 4	Critérios para gradação da expressão de ciclinas, baseados na frequência de células coradas e intensidade de marcação	29
Tabela 5	Critério para classificação dos casos, de acordo com a expressão de ciclinas	29
Tabela 6	Sumário dos dados clínico-patológicos dos 613 casos de CEE analisados nesse estudo	35
Tabela 7	Análise da correlação entre a expressão de c-erbB-2 e fatores clínico-patológicos em CEE	41
Tabela 8	Correlação entre a expressão protéica de EGFR e fatores clínico-patológicos em CEE	42
Tabela 9	Expressão de ciclina A e sua correlação com fatores clínico-patológicos	50
Tabela 10	Expressão de ciclina B1 e associação com características clínico-patológicas	51
Tabela 11	Relação entre a expressão de ciclina D1 e aspectos clínico-patológicos	52

Tabela 12	Correlação entre a imunoexpressão de VEGF e fatores clínico-patológicos em CEE	55
Tabela 13	Correlação entre os marcadores estudados nesse trabalho	56
Tabela 14	Análises de sobrevida global em casos de CEE	64
Tabela 15	Análise multivariada, pelo modelo de regressão de Cox	72
Tabela 16	Análise multivariada, pelo modelo de regressão de Cox, desconsiderando a variável pT das análises	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
CDK	Cyclin-dependent kinase
CEE	Carcinoma Epidermóide de Esôfago
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FDA	Food and Drug Administration
HE	hematoxilina-eosina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IUCC	International Union Against Cancer
PIGF	Placenta Growth Factor
TMA	Tissue Microarray
TNM	Tumor Nódulo Metástase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	
1.1	Carcinoma Epidermóide de Esôfago	2
1.2	Ciclinas	5
1.2.1	Ciclina D1	5
1.2.2	Ciclina A	7
1.2.3	Ciclina B1	8
1.3	Receptores de Fatores de Crescimento	9
1.4	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular	12
1.5	Técnica de Tissue Microarray	14
2	OBJETIVOS	17
3	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	
3.1	Casuística	19
3.2	Amostras Tumoriais	20
3.3	Construção do Tissue Microarray (TMA)	21
3.4	Imunoistoquímica	22
3.5	Análise Imunoistoquímica	26
3.5.1	c-erbB-2 e EGFR	26
3.5.2	Ciclinas A, B1 e D1	28
3.5.3	VEGF	30
3.6.	Análise Estatística	30
4	RESULTADOS	
4.1	Dados Clínico-Patológicos	33
4.2	Expressão Imunoistoquímica	36
4.2.1	Expressão protéica de c-erbB-2 e EGFR	36

4.2.2	c-erbB-2 e EGFR: Correlação com dados clínico-patológicos	40
4.2.3	Expressão de Ciclinas	43
4.2.4	Ciclinas: Associação com variáveis clínico-patológicas	48
4.2.5	Expressão de VEGF	53
4.2.6	VEGF e fatores clínico-patológicos	55
4.2.7	Correlação entre os marcadores	56
4.3	Análise de Sobrevida Global	57
4.3.3	Sobrevida Global e fatores clínico-patológicos	58
4.3.4	Sobrevida Global e Expressão de Marcadores	60
4.3.5	Análise de Sobrevida Global em “end-point” de 12, 24 e 36 meses	62
4.3.6	Análise Multivariada	71
5	DISCUSSÃO	75
6	CONCLUSÃO	95
7	BIBLIOGRAFIA	98

ANEXOS

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO

O carcinoma epidermóide do esôfago (CEE) é o tipo histológico mais comum de câncer do órgão, representando cerca de 96% dos casos. Ocorre predominantemente em países em desenvolvimento, sendo a sexta neoplasia em frequência em nosso país, com estimativa de cerca de 10600 casos novos/ano e causando mais do que 5300 óbitos por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2005). O CEE ocorre predominantemente em homens, em uma taxa de incidência bruta de 11,35/100000 em homens e de 2,39/100000 em mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2005). Os dados do Instituto Nacional do Câncer mostram uma grande diferença regional em nosso País, sendo que as taxas brutas de incidência, em homens por região geográfica do país são muito diferenciadas, sendo na região Norte de 1,81/100000, no Nordeste de 3,52/100000, no Centro-Oeste de 6,46/100000, no Sudeste de 11,15/100000 e na região Sul de 18,30/100000 (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2005). O Rio Grande do Sul é o estado de maior incidência da doença, com taxa bruta de 22,57/100000 e taxa de mortalidade de 12,53/100000 (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2005).

Essa diferença regional sugere o envolvimento de fatores ambientais em sua etiologia, como dieta e alto consumo de tabaco e álcool (SAGAR

1989; DIETZ et al. 1998; ENGEL et al. 2003). Os agentes infecciosos também têm sido implicados na carcinogênese desse tumor, com ênfase no papilomavírus humano (CHANG et al. 1993; ZHOU et al. 2003). Há indícios de que outros fatores também estejam envolvidos na gênese de CEE, citando algumas síndromes como acalasia e tilose (MARGER e MARGER 1993; CHINO et al. 2000).

Geralmente, o CEE está associado a um prognóstico ruim, por se tratar de um tumor em estadio avançado no momento do diagnóstico e apresentar alta frequência de metástases linfonodais. O comprometimento linfonodal é freqüentemente observado em casos de CEE, por apresentar uma rica drenagem linfática no tecido esofageano, e este fator tem sido considerado como uma importante causa para o fracasso das terapias nesses tumores (KUWANO et al. 2003; ROSAI 2004). Assim, embora as várias modalidades de terapia, adicionalmente a ressecção cirúrgica, tenham sofrido melhora ao longo dos anos, ainda observa-se uma alta taxa de mortalidade após cirurgia entre os pacientes com CEE (FUJITA et al. 1995; NAKAGAWA et al. 2004; TACHIBANA et al. 2005). Desse modo, é importante conhecer quais são os fatores prognósticos que podem auxiliar na escolha da terapia mais apropriada, e assim, melhorar a sobrevida desses pacientes após tratamento.

O modelo de progressão carcinogênica segue o observado em outras mucosas revestidas por epitélio pluri-estratificado, apresentando lesões displásicas, neoplasia intraepitelial e carcinoma invasor. De modo geral, a displasia epitelial tem sido definida como um crescimento desordenado do

epitélio, caracterizada por atipia celular, diferenciação anormal e arquitetura desorganizada, sendo essas características mais acentuadas em displasias mais severas (ou de alto grau), sendo equivalente ao carcinoma *in situ* ou carcinoma intraepitelial (LEWIN e APPELMAN 1995; CAMPBELL et al. 2000; KUWANO et al. 2003).

A classificação TNM (do inglês, tumor, node, metastases) do International Union Against Cancer (IUCC), que é idêntico ao do American Joint Committee on Cancer (AJCC), é o método mais utilizado para estadiamento tumoral e prognóstico em CEE. De acordo com essa classificação, a caracterização do carcinoma baseia-se no nível de invasão do tumor primário, na presença de metástases linfonodais regionais e na presença de metástases à distância. Adicionalmente a esse sistema, outros dois critérios são aceitos: a presença de carcinoma residual após o tratamento e o grau histológico (LEWIN e APPELMAN 1995; SOBIN e WITTEKIND 2004). No entanto, ainda não existe um consenso em relação ao método de classificação mais apropriado em CEE.

Em comparação com outros tumores originados em epitélio pluri-estratificado, as alterações moleculares do CEE são pouco estudadas e os trabalhos existentes na literatura mostram resultados controversos e casuística reduzida. Na gênese do CEE, tem sido relatado o envolvimento de vários eventos moleculares importantes, tais como a mutação do gene PT53, ativação de oncogenes, inativação de genes supressores de tumor e descontrole da fase G1 do ciclo celular (MANDARD et al. 2000; LIN e BEERM 2004).

1.2 CICLINAS

A desregulação do ciclo celular é uma constante nas neoplasias malignas, devido a alterações relacionadas às proteínas associadas à regulação do ciclo celular, como as ciclinas e CDKs (do inglês, cyclin-dependent kinase). As CDKs são proteínas quinase serina/treonina ativadas em pontos específicos do ciclo celular, induzindo a fosforilação de proteínas específicas (COQUERET 2002; VERMEULEN et al. 2003; MURRAY 2004). Os níveis de CDK permanecem estáveis durante o ciclo celular, ao contrário das ciclinas, que variam de acordo com o ciclo, sendo degradadas em pontos específicos, através de proteólise mediada por ubiquitinação. As ciclinas ativam periodicamente as moléculas de CDKs, formando complexos ciclina/CDK. Dessa maneira, diferentes ciclinas atuam em diferentes fases do ciclo celular. A ciclina D liga-se a CDK4 e CDK6 e os complexos formados são necessários para início da fase G1. A ciclina A ativa a molécula de CDK2 e juntas atuam durante a fase S; no fim da fase G2 e no início da fase mitótica, a ciclina A forma ainda complexo com CDK1, induzindo a progressão da mitose, fase que é regulada principalmente pelo complexo ciclina B/CDK1 (VERMEULEN et al. 2003; MURRAY 2004).

1.2.1 Ciclina D1

Diferente das demais ciclinas, que são reguladas em nível transcricional ou pós-transcricional, a expressão de ciclina D1 é dependente

de sinais extracelulares induzidas por fatores de crescimento através de receptores como EGFR e c-erbB-2 (COQUERET 2002; MURRAY 2004; FU et al. 2004). Acredita-se que a ciclina D1 esteja envolvida na fosforilação e inativação de pRb (proteína retinoblastoma), o que causa a liberação de fatores de transcrição da família E2F do complexo com pRb, permitindo a transcrição de genes necessários para a fase S, como a ciclina E e A (FU et al. 2004; DESHPANDE et al. 2005). Desse modo, alterações nesse mecanismo envolvendo a ciclina D1 podem levar à proliferação descontrolada das células (MURRAY 2004; DESHPANDE et al. 2005).

Há evidências, tanto de estudos *in vitro* como *in vivo*, de que a ciclina D1 esteja envolvida no processo carcinogênico em CEE (ZHANG et al. 2003; LEHRBACH et al. 2003). Alguns autores têm verificado a presença de amplificação gênica e superexpressão protéica de ciclina D1 em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de esôfago (KANDA et al. 1994; NAKAGAWA et al. 1995), e sua importância prognóstica em CEE (SHINOZAKI et al. 1996; MORGAN et al. 1999; WU et al. 2004).

Vários trabalhos têm mostrado associação da superexpressão de ciclina D1 com características clínico-patológicas em casos de CEE, não havendo ainda concordância sobre o valor prognóstico dessa proteína. Alguns autores mostraram a importância da superexpressão de ciclina D1 como fator de pior prognóstico em CEE (TAKEUCHI et al. 1997; ANAYAMA et al. 1998; SARBIA et al. 1999; 2001; GÜNER et al. 2003). TAKEUCHI et al. (1997) e Anonymus (2001) verificaram correlação significativa entre a superexpressão desse marcador e grau de diferenciação e sobrevida global.

Outro estudo também verificou tal correlação, além de associação com atividade mitótica e metástase linfonodal (SARBIA et al. 1999). A associação entre superexpressão de ciclina D1 e menor sobrevida global também tem sido relatada por outros trabalhos, que mostraram que a expressão dessa proteína é fator prognóstico por análises uni e multivariada.

No entanto, em discordância com tais trabalhos, existem estudos que não encontraram importância prognóstica para ciclina D1, mostrando que essa proteína não influencia na sobrevida global (IKEDA et al. 1999; LIN et al. 2004; SUNPAWERAVONG et al. 2005). IKEGUCHI et al. (2001) verificaram que a expressão de ciclina D1 influencia desfavoravelmente o prognóstico e está associada à alta taxa de recorrência, quando analisada concomitantemente com expressão de pRb. Há ainda dados sugerindo a importância dessa proteína como fator de predição de micrometástases linfonodais em casos pN0 em CEE (MATSUMOTO et al. 2000).

1.2.2 Ciclina A

Os mecanismos de ação da ciclina A durante a fase S ainda não são bem conhecidos, mas acredita-se que essa proteína, através do complexo formado com CDK2, esteja atuando no controle da atividade de componentes da maquinaria de replicação de DNA (YAM et al. 2002) assim como regulando a atividade do complexo E2F/DP, inibindo sua atividade e assim, induzindo a progressão para a fase G2 (COQUERET 2002). A ciclina A atua também na transição para a fase mitótica do ciclo celular, formando

complexo com a molécula CDK1, porém, pouco se sabe a respeito dessa proteína durante essa etapa do ciclo, existindo indícios de que uma de suas funções seja o controle de ciclina B1 (YAM et al. 2002).

Poucos estudos têm mostrado que a expressão de ciclina A pode ser um indicador do potencial maligno em CEE, como observado em dois trabalhos que mostraram que a expressão positiva em 49/124 e de 13/78 casos é mais freqüente em casos mais avançados e está correlacionada a baixa taxa de sobrevida (FURIHATA et al. 1996; YASUNAGA et al. 2000). Já HUANG et al. (2005) verificaram correlação significativa entre a expressão de ciclina A e grau de diferenciação (HUANG et al. 2005). Outros dois trabalhos verificaram a expressão de ciclina A em 94% e em 55% dos pacientes, e em ambos os casos não mostraram diferenças nas características clinicopatológicas, quando comparados aos sem expressão dessa proteína (CHETTY e SIMELANE 1999; NOZOE et al. 2002a).

1.2.3 Ciclina B1

A ciclina B1 participa na regulação da fase mitótica do ciclo celular através do complexo ciclina B/CDK1, também conhecido como MPF (do inglês, *maturation-promoting factor*). Embora os detalhes a respeito da participação de ciclina B não estejam esclarecidos, tem sido relatado que essa proteína esteja envolvida, entre outras funções, na regulação da degradação de ciclina por proteólise dependente de APC (do inglês,

anaphase-promoting complex), permitindo a progressão do ciclo celular, da fase mitótica em direção à fase G1 (WASCH et al. 2005).

Existem poucos dados relacionados à expressão de ciclina B1 em CEE. Essa proteína foi estudada em 87 casos de CEE, e sua superexpressão mostrou estar associada a um pior prognóstico, sendo encontrada em casos com nível de infiltração avançado e invasão (MURAKAMI et al. 1999). Este aspecto de pior prognóstico da expressão de ciclina B1 foi também confirmado por TAKENO et al. (2002), em 71 pacientes, verificando correlação da expressão dessa proteína com metástase e metástase linfonodal, estadiamento e invasão linfática (TAKENO et al. 2002). Em 120 casos de CEE, a expressão nuclear de ciclina B1 mostrou ser um preditor independente da sobrevida global, quando comparada à expressão citoplasmática dessa proteína (NOZOE et al. 2002b).

1.3 RECEPTORES DE FATORES DE CRESCIMENTO

A família dos receptores dos fatores de crescimento epidérmicos é um grupo composto por 4 moléculas homólogas que incluem o receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR, do inglês *epidermal growth factor receptor*), c-erbB-2, c-erbB-3 e c-erbB-4. Todos os membros dessa família apresentam em comum um domínio extracelular onde se dá o acoplamento ao ligante, um domínio transmembrânico de ancoramento dessa molécula a membrana

e um domínio intracelular, responsável pela atividade tirosina quinase desses receptores (OLAYIOYE et al. 2000). Sua atividade inicia-se com o acoplamento de um ligante ao domínio externo do receptor seguido por sua dimerização, entre dois receptores iguais ou diferentes e específicas ao tecido e tumor. A dimerização irá ativar o domínio tirosina-quinase, com subsequente fosforilação de resíduos de tirosina, que por sua vez, irá ativar uma cascata de proteínas de variadas vias de sinalização como Ras/MAPK, STATs, PLC γ /PKC e PI3/Akt, relacionadas a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (ROWINSKY 2003; MARMOR et al. 2004; HERBST 2004; CASALINI et al. 2004).

Alguns estudos têm sugerido que a ativação aberrante da atividade quinase desses receptores desempenha papel importante no desenvolvimento e progressão tumoral em CEE (ROWINSKY 2003; ANDL et al. 2003), induzindo aumento da migração e agregação celular assim como a hiperproliferação e diferenciação de células epiteliais e hiperplasia (ANDL et al. 2003). A importância destes receptores tem sido amplamente estudada em diversas neoplasias malignas, com ênfase nos carcinomas de mama, inclusive originando terapêuticas específicas do bloqueio de sua atividade (ROSKOSKI 2004).

A expressão dos EGFR é pouco estudada em CEE. Alguns estudos que correlacionaram a superexpressão dessa proteína e variáveis clínico-patológicas verificaram associações com fatores como idade, tipo histológico, nível de invasão e metástase linfonodal, embora não haja um consenso entre tais dados. No entanto, existe uma concordância entre os

autores que a superexpressão de EGFR está significativamente associada a menor taxa de sobrevida global e pior prognóstico (OZAWA et al. 1989; YANO et al. 1991; MUKAIDA et al. 1991; ITAKURA et al. 1994; INADA et al. 1999). INADA et al.(1999) mostraram a existência de correlação significativa entre a expressão de EGFR e idade, nível de invasão e comprometimento linfonodal. Algumas dessas correlações também foram observadas em outro estudo, que constataram além da associação com idade, relação com grau histológico (ITAKURA et al. 1994). Esses autores ainda verificaram correlação com grau de diferenciação, nível de invasão e metástase linfonodal, dependendo da distribuição do padrão de expressão de EGFR nos casos estudados (ITAKURA et al. 1994). A existência de correlação significativa entre comprometimento linfonodal e distribuição do padrão de marcação protéica de EGFR foi relatada também por YANO et al. (1991). Dentre os trabalhos conhecidos, existem ainda alguns estudos que não relataram nenhuma importância prognóstica do EGFR em CEE (TORZEWSKI et al. 1997; FRIESS et al. 1999; WANG et al. 1999).

De nosso conhecimento, dentre os poucos trabalhos existentes na literatura que analisaram a expressão de c-erbB-2, grande parte deles têm relatado que a superexpressão dessa proteína não influencia no prognóstico de CEE (HARDWICK et al. 1997; WANG et al. 1999; FRIESS et al. 1999). No entanto, LAM et al. (1998) verificaram que superexpressão de c-erbB-2 em 10% dos casos está correlacionada com grau histológico (LAM et al. 1998). Há ainda trabalhos em que não foi detectada superexpressão dessa proteína em casos de CEE (SUWANAGOOL et al. 1993; SUO et al. 1995).

1.4 FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF)

A angiogênese é um fator primordial no desenvolvimento das neoplasias malignas. Um dos mais potentes fatores angiogênicos é a família dos chamados fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF, do inglês, *vascular endothelial growth factor*). A família dos VEGF inclui 6 membros (VEGF ou VEGF A, VEGF B-E e PlGF) e 3 receptores tirosina quinase (VEGFR -1, -2 e -3), através dos quais atuam na regulação da angiogênese, mediando processos como sobrevivência, mitogênese, migração e diferenciação de células endoteliais, permeabilidade vascular e mobilização de células progenitoras endoteliais (VEIKKOLA et al. 2000; HICKLIN e ELLIS 2005). Os efeitos do VEGF são mediados por ligamento aos receptores VEGFR1 e VEGFR2, induzindo a dimerização desses e conseqüente transfosforilação. Fosforilados, os receptores irão ativar uma série de enzimas intracelulares e, subseqüentemente, diversas cascatas de sinalização como as vias de sinalização Ras/Raf/MAPK, PI3/Akt e PLC γ /PKC/ERK (CLAUSS 2000; ZACHARY 2003).

A hipóxia parece estar envolvida na regulação de VEGF, induzindo a expressão dessa proteína, através da ação de HIF-1 (do inglês, *hypoxia-inducible factor-1*), que se liga ao promotor de VEGF, aumentando sua transcrição (HICKLIN e ELLIS 2005). Assim, em tecidos tumorais, a hipóxia induz a superexpressão dessas proteínas, proporcionando um mecanismo

compensatório pelo qual os tecidos tumorais podem aumentar a oxigenação através da indução de crescimento de vasos sanguíneos (VEIKKOLA e ALITALO 1999). Há evidências de que alguns fatores de crescimento e citocinas também estejam regulando a expressão de VEGF, induzindo a angiogênese indiretamente, mostrando que altas concentrações de EGFR ou c-erbB-2 induzem a expressão de VEGF-A, tanto *in vitro*, como *in vivo* (PETIT et al. 1997; CHAROENRAT et al. 2002).

A importância da neoformação vascular na progressão dos tumores é assunto bastante conhecido e sua importância levou a várias estratégias de ensaios terapêuticos com agentes anti-angiogênicos, atualmente em curso (CARMELIET e JAIN 2000).

Os estudos de VEGF em CEE aparentemente mostram que a expressão desta molécula se associam a maior microdensidade vascular, metástase linfonodal e invasão vascular (INOUE et al. 1997; KITADAI et al. 1998; SHIH et al. 2000; KOIDE et al. 2001; OGATA et al. 2003). O trabalho de INOUE et al. (1997) relatou que a expressão de VEGF está estatisticamente correlacionada com fatores como microdensidade vascular, grau histológico, nível de invasão, invasão vascular, metástase, além de menor sobrevida global. Outro estudo verificou a existência de associação com nível de invasão, invasão vascular e outras variáveis como estadiamento tumoral e maior número de vasos (KITADAI et al. 1998). Diferindo um pouco de tais dados, outro trabalho mostrou que a superexpressão dessa proteína está correlacionada com invasão, metástases à distância e linfonodais (KOIDE et al. 2001). SHIH et al. (2000)

mostraram que a expressão de VEGF correlaciona-se significativamente apenas com metástase linfonodal e menor taxa de sobrevida global. Essa última correlação com sobrevida global também foi relatada por OGATA et al. (2003), além de associação com maior microdensidade vascular e fator prognóstico independente em casos com comprometimento linfonodal.

1.6 TÉCNICA DE TISSUE MICROARRAY (TMA)

Um dos grandes problemas dos testes de imunoistoquímica é que se trata de técnica trabalhosa e relativamente cara. Isto faz com que os trabalhos sejam realizados com poucos casos e não sejam testados em duplicata e triplicata, fazendo com que os trabalhos sejam pouco reprodutíveis.

Recentemente, com o advento da técnica de “array” em tecido (TMA, do inglês *tissue microarray*) é possível que estes problemas sejam minimizados. Através desse método, centenas de amostras de tecidos podem ser dispostas em uma única lâmina, em cilindros de 0,6-1mm, o que permite a análise simultânea de vários tecidos por métodos de imunoistoquímica e hibridizações *in situ*, para estudos em nível de DNA, RNA e proteínas, minimizando possíveis variações da técnica entre as amostras, com racionalização dos custos e tempo despendido. Além disso, é possível que as reações sejam realizadas de forma repetida, a similaridade de outras técnicas experimentais, e que o resultado seja expresso pela resultante dos

experimentos (RIMM et al. 2001; MOCH et al. 2001; HOOS e CORDON-CARDO 2001; SIMON e SAUTER 2002; MILANES-YEARSLEY et al. 2002; HSU et al. 2002).

Uma das principais críticas a essa metodologia diz respeito ao pequeno tamanho das amostras em array, ou seja, se uma amostra de alguns milímetros de diâmetro pode ser representativo de toda a amostra tumoral devido à existência de heterogeneidade tecidual. No entanto, tal problema pode ser controlado se mais de um cilindro de cada amostra tecidual forem utilizados, com a finalidade de aumentar a representatividade da amostra (HOOS e CORDON-CARDO 2001; RIMM et al. 2001; MOCH et al. 2001; SIMON e SAUTER 2002). Nesse sentido, alguns trabalhos têm relatado uma concordância de cerca de 90% quando comparados os resultados de análise em TMA e em corte inteiro convencional, mostrando que a técnica de Tissue Microarray pode ser um instrumento de confiança para estudos em tecidos tumorais (HOOS e CORDON-CARDO 2001; RIMM et al. 2001; MOCH et al. 2001; MILANES-YEARSLEY et al. 2002; HSU et al. 2002; SIMON e SAUTER 2002).

Pela revisão da literatura aqui apresentada, podemos depreender que os trabalhos que correlacionam a expressão de EGFR, c-erbB-2, VEGF e ciclinas são poucos, realizados com casuística reduzida e com resultados bastante contraditórios. Em nosso meio, não há nenhum trabalho utilizando casos de pacientes brasileiros para testar a expressão de moléculas como EGFR, c-erbB-2, VEGF e ciclinas no CEE.

OBJETIVOS

2 OBJETIVO DO TRABALHO

Diante de tais informações, pretendemos entender a via de proliferação celular no desenvolvimento tumoral de CEE, através de análise da expressão imunoistoquímica de proteínas que regulam esse processo. Neste sentido, estudaremos a expressão das seguintes proteínas e suas interações:

- a. EGFR e c-erbB-2, que compõem a família dos receptores do fator de crescimento epidérmico;
 - b. ciclina D1, ciclina B1 e ciclina A – reguladores do ciclo celular;
 - c. VEGF, ligada à estimulação da angiogênese e regulada entre outros fatores pela família dos EGFR;
 - d. Correlacionar os dados referentes a expressão dessas proteínas com características clínico-patológicas e sobrevida dos pacientes.
-

CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

O presente estudo compreendeu 613 casos de Carcinoma Epidermóide de Esôfago biopsiados ou operados no Centro de Pesquisa e Tratamento Hospital do Câncer A.C. Camargo, a partir do ano de 1980 até 1999, identificados por levantamento no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica.

Todas as respectivas lâminas e blocos de parafina dos casos estudados foram resgatados do Arquivo do Departamento de Anatomia Patológica e os blocos representativos das lesões características de cada grupo deram origem a novos cortes. O primeiro corte obtido de cada bloco foi então corado pela técnica tradicional de hematoxilina-eosina (HE). A revisão da lâmina permitiu o diagnóstico, a análise do grau de diferenciação e tipo histológico da neoplasia.

Os casos também foram revistos em relação aos dados demográficos e clínico-patológicos como tipo de cirurgia, local primário do tumor, tamanho, extensão da invasão, estado linfonodal, metástase à distância, margens cirúrgicas, invasão vascular e/ou linfática e estabelecimento do estadiamento anátomo-patológico, de acordo com a classificação TNM (UICC/AJCC), utilizando-se os registros hospitalares e do Departamento de Anatomia Patológica. Além destes dados, foram coletados também os dados relativos à

evolução da doença e divididos como pacientes vivos sem doença, vivos com doença, mortos pela doença, mortos por outras causas e perdidos de vista, ou seja, que houve perda de seguimento. A revisão dos prontuários médicos e dos registros hospitalares foi feita através do preenchimento de um formulário pré-estabelecido (Anexo 1) e todos os dados obtidos foram sumarizados em uma planilha.

3.2 AMOSTRAS TUMORAIS

Os 613 casos, representados por 863 amostras, foram analisadas de duas formas distintas. As 425 amostras, composta em maioria por peças cirúrgicas, foram submetidas às reações de imunoistoquímica e análises através da técnica de Tissue Microarray (TMA). Em 438 exemplares, sendo biópsias e algumas peças cirúrgicas que não continham material suficiente para a construção do TMA, as reações e análises foram feitas separadamente em corte convencional. Nesse último caso, com o objetivo de viabilizar a manipulação dessas amostras e otimizar o uso do material utilizado para as reações de imunistoquímica, os cortes histológicos dos blocos dessas 438 amostras foram organizados em 87 conjuntos diferentes de lâminas (L01-L87). Assim, cada lâmina de seu respectivo conjunto continha de 3 a 6 cortes de amostras diferentes, dependendo de seu tamanho (Figura 1).

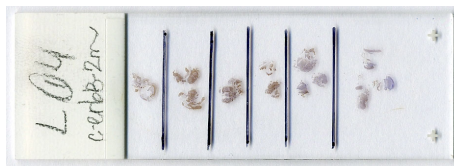


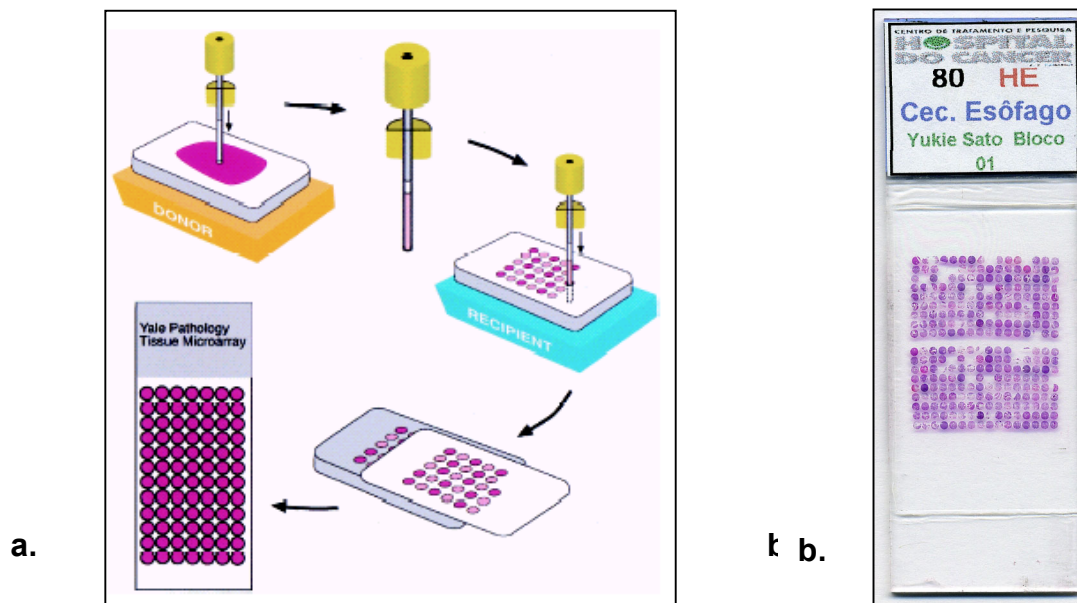
Figura 1 - Exemplar de lâmina utilizada para análise em corte convencional, contendo 6 cortes de amostras diferentes.

3.3 CONSTRUÇÃO DO TISSUE MICROARRAY (TMA)

Para o estudo, foram construídos três blocos de TMA, cada um contendo 288 “cores” de 1mm, sendo o primeiro “core” representado por um fragmento de fígado normal, utilizado como referência. Em cada bloco foram incluídas cerca de 143 amostras de casos distintos de CEE com diferentes graus de diferenciação e comportamentos biológicos, dispostas em duplicata, correspondendo a áreas diferentes da mesma amostra.

As respectivas lâminas de HE dos casos selecionados para a construção do bloco de TMA foram analisadas para delimitação da área que melhor representasse o tumor. Em sequência, cilindros de 1mm de diâmetro contendo amostras de tumor foram retirados dessas áreas pré-delimitadas dos blocos de parafina dos casos a serem estudados (blocos doadores) e foram transferidas para um bloco receptor, em uma posição cuja coordenada foi previamente definida. Com os blocos de TMA prontos, foram obtidos cortes de 3µm de espessura, colhidos em lâminas com adesivos adquiridas junto a

Microsystems Inc. (Figura 2). O TMA foi construído com a máquina fabricada pela Beecham Labs. (Baltimore, MD) e em uso no Departamento de Anatomia Patológica.



Fonte: Rimm et al. (2001)

Figura 2 - Tissue Microarray. (a) Esquema mostrando montagem do bloco de TMA e lâmina para análise e (b) Exemplar de lâmina de TMA utilizada para análise.

3.4 IMUNOISTOQUÍMICA

Duas lâminas de cada bloco de TMA foram submetidas às reações de imunohistoquímica, havendo cerca de 40 cortes de diferença entre elas. Nos casos em que as reações e análises foram feitas em corte convencional, a reação imunohistoquímica foi realizada em apenas uma lâmina. Considerando

que cada caso pode estar representado por mais de uma amostra, tanto em TMA quanto em corte convencional, foram então obtidas de 1 a 16 análises imunoistoquímicas em cada caso.

Em todos os casos, inicialmente, foi feita a desparafinização dos cortes das amostras em três banhos de xilol, por 5 minutos cada, seguido por quatro passagens em etanol 100%, 95%, 80% e 70%, por 30 segundos, em temperatura ambiente. Foram seguidos protocolos distintos para a realização das reações de imunoistoquímica, dependendo do anticorpo utilizado (Tabela 1):

1. Recuperação antigênica:

- a. c-erbB-2, EGFR e VEGF: utilizando panela de pressão elétrica (National SR206) em citrato pH 6.0, por 15 minutos, após início da pressão. Em seguida, deixar as lâminas em temperatura ambiente, por 20 minutos.
- b. Ciclinas: em banho-maria a 96°C por 30 minutos, utilizando tampão EDTA+Tris pH 9.0, seguida pelo resfriamento das lâminas em temperatura ambiente, por 20 minutos.

2. Lavar em água corrente, por 5 minutos.

3. Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 10 vol), com 3 trocas de 5 minutos cada.

4. Lavar em água corrente, por 5 minutos.

5. Bloqueio das proteínas:

- a. c-erbB-2 e EGFR: incubação em leite (Molico, Nestlé) 3%, por 20 minutos.
 - b. Ciclinas: bloqueador de proteína Protein Block Serum-Free (DAKO, X0909, Denmark)
 6. Incubação das lâminas com o anticorpo primário diluído em diluente (DAKO, S3022, Denmark), em título pré-estabelecido conforme tabela 1, por 2 horas, em temperatura ambiente.

Obs: No caso do VEGF, a incubação foi de 18 horas a 4°C, em câmara úmida.
 7. Lavagem individual das lâminas, com tampão PBS, seguida por 3 trocas do mesmo tampão, de 5 minutos cada.
 8. Incubação com o anticorpo secundário biotinilado:
 - a. c-erbB-2 e EGFR: Kit LSAB+ peroxidase (DAKO, K0690, Denmark), em temperatura ambiente, por 20 minutos.
 - b. Ciclinas: reagente C (Biotinylated goat anti-mouse/rabbit Ig) do kit StreptABComplex/HRP Duet (mouse/rabbit) (DAKO, K0492, Denmark), 1:200, diluído em PBS, por 20 minutos, em temperatura ambiente.
 - c. VEGF: incubação de 30 minutos, a 37°C.
 9. Lavagem individual das lâminas, com tampão PBS, seguida por 3 trocas do mesmo tampão, de 5 minutos cada.
 10. Incubação com o complexo streptavidina-biotina peroxidase:
-

- a. c-erbB-2 e EGFR: Kit LSAB+ peroxidase (DAKO, K0690, Denmark), em temperatura ambiente, por 20 minutos.
 - b. Ciclinas e VEGF: Incubação com o complexo – reagente A (Streptavidin) e reagente B (Biotinylated peroxydase) do kit StreptABComplex/HRP Duet (mouse/rabbit) (DAKO, K0492, Denmark), ambos em título 1:200 diluído em PBS, em temperatura ambiente, por 20 minutos. Para VEGF, a incubação foi de 30 minutos, a 37°C.
11. Lavagem individual das lâminas, com tampão PBS, seguida por 3 trocas do mesmo tampão, de 5 minutos cada.
 12. Incubação das lâminas em solução de 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride do kit Liquid DAB + Subtrate (DAKO, K3468, Denmark) diluído 1:50, em temperatura ambiente, por 5 minutos.
 13. Lavagem em água corrente, por 5 minutos.
 14. Coloração com Hematoxilina de Harris, por 2 minutos e diferenciar imergindo 2 vezes em solução contendo água e ácido clorídrico ou água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 9,5%), seguida por lavagem em água corrente, por 5 minutos.
 15. Desidratação das lâminas em etanol 80, 95 e 100% e xilol, em passagens sucessivas.
 16. Montagem das lâminas em Entellan neu (MERCK, 1.07961, Germany).

As reações sempre foram acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado e dois controles negativos. O

primeiro deles foi realizado pelo não uso do anticorpo primário e o segundo, através da retirada do anticorpo secundário durante os passos da reação.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nesse estudo.

ANTÍGENO	DILUIÇÃO	CLONES	CATÁLOGO	ORIGEM
Ciclina A	1:100	Policlonal (H-432)	Sc-751	Santa Cruz
Ciclina B1	1:50	V152	M-3530	DAKO
Ciclina D1	1:80	DCS-6	M-7155	DAKO
c-erbB-2	1:500	Policlonal	A0485	DAKO
EGFR	1:20	EGFR.25	NCL-EGFR-384	Novocastra
VEGF	1:600	c-1 (policlonal)	A-20	Santa Cruz

3.5 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum e os resultados foram classificados em relação à intensidade da reação, número de células positivas e padrão de marcação, dependendo do anticorpo analisado.

3.5.1 c-erbB-2 e EGFR

Os resultados da análise da expressão imunoistoquímica de c-erbB-2 e EGFR foram baseadas na intensidade e padrão da marcação das células neoplásicas marcadas de cada amostra, de acordo com as regras do teste reconhecido pelo FDA, o HercepTest™ (DAKO): nenhuma marcação ou marcação fraca em menos de 10% das células tumorais (0), marcação com

intensidade fraca em parte de sua membrana, em mais de 10% das células (1+), marcação completa de membrana, de intensidade fraca a moderada em mais de 10% das células (2+) e marcação de intensidade forte em mais de 10% (3+). Em seguida, os casos foram categorizados em: Grupo I (negativo), Grupo II (potencialmente positivo) e Grupo III (positivo), de acordo com os critérios das tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Classificação para expressão imunoistoquímica de c-erbB-2 e EGFR, de acordo com intensidade e padrão de marcação.

Característica	Grau	Classificação
Nenhuma marcação/marcação fraca, <10% das células tumorais	0	Negativo
Marcação fraca em parte da membrana, >10% das células tumorais	1+	
Marcação completa de membrana, de intensidade fraca a moderada, >10% das células tumorais	2+	Positivo
Marcação forte, >10% das células tumorais	3+	

Tabela 3 - Critérios para classificação dos casos, baseados na expressão de c-erbB-2 e EGFR.

Categorias	Característica
Grupo I: Negativo	Maioria das amostras com expressão 0 e/ou 1+ Nenhuma das amostras com expressão 2+ e 3+
Grupo II: Potencialmente Positivo	Pelo menos uma amostra com expressão 2+ Nenhuma amostra com expressão 3+
Grupo III: Positivo	Pelo menos uma amostra com expressão 3+

3.5.2 Ciclinas A, B1 e D1

Em relação às ciclinas A, B1 e D1, a classificação dos resultados baseou-se no número de células marcadas e na intensidade da reação em cada amostra (Tabela 4). De acordo com a frequência (F) de células positivas, os casos receberam “score” 1 (<1%), 2 (1-10%), 3 (10-50%), 4 (50-90%) e 5 (>90%) e conforme a intensidade da reação (I) foram graduados em 0 (nenhuma marcação), 1 (marcação fraca), 2 (marcação moderada) e 3 (marcação forte). A categorização dos casos foi feita utilizando a média (M) dos produtos de F x I de cada caso, considerando negativo (N) os casos com $M \leq 5$ (Tabela 5). Os pacientes considerados positivos, ou seja, com $M > 5$, foram divididos ainda em positivo (P), com $M < (M + DP)$ e positivo forte (PF). Para tal divisão, foi calculada a média (M) e o desvio-padrão (DP), de todos os casos. Aquelas amostras cuja média dos resultados foi maior que a $M + DP$ foram consideradas positivos fortes.

Tabela 4 - Critérios para gradação da expressão de ciclinas, baseados na frequência de células coradas e intensidade de marcação.

Categoria	Score	Característica
Frequência	1	<1% de células positivas
	2	1-10% de células positivas
	3	11 – 50% de células positivas
	4	51 – 90% de células positivas
	5	>90% de células positivas
Intensidade da Marcação	1	Marcação fraca
	2	Marcação moderada
	3	Marcação forte

Tabela 5 - Critério para classificação dos casos, de acordo com a expressão de ciclinas.

Classificação	Critério
Negativo	$M \leq 5$
Positivo	$5 < M < [M + DP]$
Positivo Forte	$M \geq [M + DP]$

M: média dos produtos de Frequência x Intensidade

DP: desvio-padrão

3.5.3 VEGF

Para análise de VEGF, foi levada em consideração apenas a frequência de células marcadas, sendo utilizado o mesmo critério usado no estudo das ciclinas. Para a categorização dos casos, foram considerados positivos os casos com frequência > 10%, ou seja, em que a média dos scores fosse ≥ 3 .

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos, decorrentes dos estudos dos diversos marcadores, foram organizados em tabelas e a análise estatística foi realizada utilizando-se os programas de computador Stata Statistical Software, versão 7.0, Stata Corporation e SPSS for Windows, versão 10.0, SPSS Inc. Foi realizada análise de correlação entre os marcadores e as variáveis gênero, cor, sítio tumoral, grau de diferenciação, pT e invasões linfática e venosa, utilizando o teste de χ^2 ou o teste exato de Fisher.

As análises de sobrevida global foram realizadas de duas formas. Primeiramente, foi realizada a análise de sobrevida global para todo o período de seguimento dos casos, considerando a data de admissão neste serviço como o ponto inicial e a data de óbito ou último retorno como ponto final. Adicionalmente, foram feitas análises separadas, considerando três cortes (“end-point”) no período de seguimento em 12, 24 e 36 meses, para verificar a influência de todas as variáveis estudadas nos três primeiros anos após o diagnóstico da doença. O cálculo da estimativa de sobrevida global foi

realizado pela técnica de Kaplan-Meier e as comparações entre as curvas de sobrevida, em relação as variáveis estudadas, pelo teste de Log-rank. A análise multivariada foi feita pelo modelo de riscos proporcionais de Cox.

Para todos os testes estatísticos, foi considerado o nível de significância de 5%.

Para viabilizar alguns cálculos estatísticos, foi necessário agrupar algumas categorias, como ocorreu no caso de c-erbB-2 e EGFR, em que os grupos II e III foram reunidos como Positivos. Os dados relacionados à cor dos pacientes foram divididos apenas em brancos e não-brancos, que incluem os negros, pardos e amarelos. No grau histológico também houve rearranjo dos dados, sendo agrupadas as categorias G1/G2 e G3/G4.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

O tempo de seguimento dos 613 casos selecionados variou de 1 dia a 168,4 meses, com mediana de 6,2 meses e média (dp) de 14 (23,4) meses. A idade dos pacientes mostrou variação de 32 a 94 anos, mediana de 59 anos e média (dp) de 59 (10) anos.

Os dados clínico-patológicos estão sumarizados na Tabela 6. Nessa casuística estão incluídos 504 homens e 109 mulheres, compostos em sua maioria por indivíduos de cor branca (68%). De acordo com o grau de diferenciação, 159 (26,1%) foram considerados bem diferenciados, 300 (49,1%) moderadamente diferenciados, 149 (24,3%) pouco diferenciados, 2 (0,3%) indiferenciados e 3 casos (0,4%) não puderam ser identificados. Baseados no sítio da lesão, 130 (21,2%) casos estão associados ao terço superior do esôfago, 352 (57,4%) ao terço médio, 110 (18%) ao terço inferior e tais dados não foram obtidos em 21 (3,4%) casos. De acordo com a categoria pT, em 9 (4,4%) casos o tumor primário invadiu a lâmina própria (pT1), 46 (22,6%) a muscular própria (pT2), 141 (69,1%) a adventícia (pT3) e 8 (3,9%) invadiram estruturas adjacentes (pT4). A avaliação de pT não foi feita nas biópsias devido ao tamanho reduzido das amostras tumorais, o que

não permitiu uma avaliação precisa da profundidade de invasão. Tal limitação também foi encontrada na avaliação da invasão vascular, sendo considerados somente os casos representados por peças cirúrgicas. Assim, invasão vascular foi vista em 151 (73,3%) casos; a invasão linfática foi observada em 148 (71,8%) casos, sendo que destes, 32 (15,5%) eram em associação com vasos venosos e 116 (56,5%), de forma isolada. A invasão venosa foi constatada em 35 (17%) casos, mas o comprometimento isolado foi observado em apenas 3 (1,5%). Os 613 casos foram separados, de acordo com a evolução da doença, em vivos com doença (0,5%), vivos sem doença (2,3%), morte devido à doença (82,2%), morte devido a outras causas (1%) e perdidos de vista (14,1%).

Tabela 6 - Sumário dos dados clínico-patológicos dos 613 casos de CEE analisados nesse estudo.

Variável	Categoria	Número de casos (%)
Gênero (n=613)	Masculino	504 (82,2%)
	Feminino	109 (17,8%)
Cor (n=613)	Negro	59 (9,6%)
	Pardo	101 (16,5%)
	Amarelo	19 (3%)
	Branco	417 (68%)
	Indeterminada	17 (2,8%)
Grau de Diferenciação (n=613)	Bem Diferenciado (G1)	159 (26,1%)
	Moderadamente Diferenciado (G2)	300 (49,1%)
	Pouco Diferenciado (G3)	149 (24,3%)
	Indiferenciado (G4)	2 (0,3%)
	Não classificado (GX)	3 (0,4%)
Sítio (n=613)	Superior	130 (21,2%)
	Médio	352 (57,4%)
	Inferior	110 (18%)
	Sem dados	21 (3,4%)
Invasão Vascular¹ (n=206)	Venosa	35 (17%)
	Venosa (isolada)	3 (1,5%)
	Linfática	148 (71,8%)
	Linfática (isolada)	116 (56,6%)
	Linfática/Venosa	32 (15,5%)
	Não observado	55 (26,7%)
pT² (n=204)	T1	9 (4,4%)
	T2	46 (22,6%)
	T3	141 (69,1%)
	T4	8 (3,9%)
Evolução da Doença (n=612)	Vivos com a Doença	3 (0,5%)
	Vivos sem a Doença	14 (2,3%)
	Morte devido a Doença	503 (82,2%)
	Morte devido a outras causas	6 (1%)
	Perdidos de Vista	86 (14,1%)

(1) (2) Considerados apenas os casos representados por peças cirúrgicas.

4.2 EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA

Os 613 casos de CEE selecionados para fazerem parte desse projeto foram submetidos às reações de imunoistoquímica para verificar a expressão protéica de c-erbB-2, EGFR, ciclinas A, B1 e D1 e VEGF.

Alguns casos não puderam ser avaliados, devido à ausência de tumor na amostra ou o desprendimento do corte de amostra da lâmina.

4.2.1 Expressão protéica de c-erbB-2 e EGFR

A expressão de c-erbB-2 e EGFR foram avaliadas em 597 e em 585 casos, respectivamente. Vale lembrar que os casos foram divididos em três grupos, de acordo com a expressão de membrana: negativo, potencialmente positivo e positivo. A análise imunoistoquímica de c-erbB-2 mostrou três grupos distintos, de acordo com sua expressão: negativos (Grupo I) em 344 (57,6%) casos, potencialmente positivos (Grupo II) em 206 (34,5%) e positivos (Grupo III) em 47 (7,9%) (Figuras 3 e 5).

Tal classificação também pôde ser observada na expressão de EGFR, sendo que 131 (22,4%) casos se enquadraram no Grupo I; 310 (53%), no Grupo II e 144 (24,6%), no Grupo III (Figuras 4 e 5).

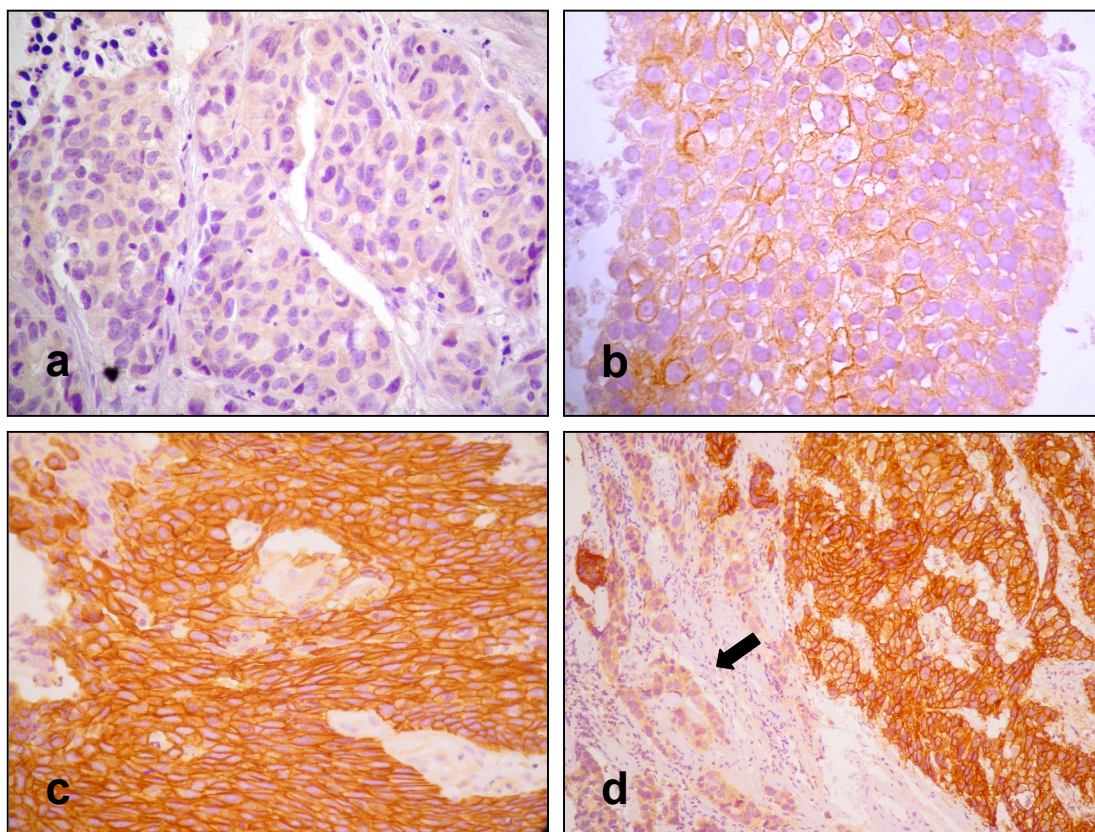


Figura 3 - Imunoistoquímica demonstrando marcação de membrana de c-erbB-2 em CEE. (a) amostra demonstrando negatividade para expressão dessa proteína, aumento original 400x; (b) caso positivo 2+, aumento original 400x; (c) marcação positiva 3+, aumento 400x e (d) caso positivo 3+ e áreas tumorais sem expressão de c-erbB-2 (seta), aumento original 200x.

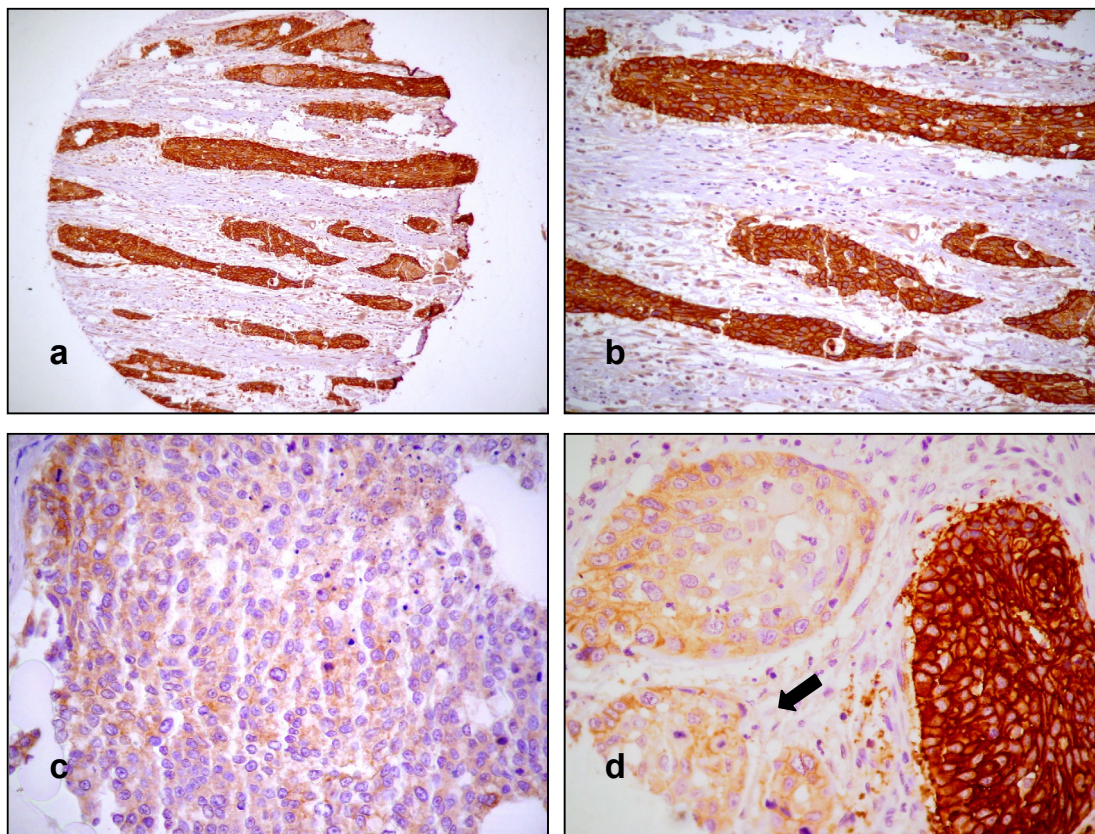


Figura 4 - Imunoistoquímica mostrando marcação de EGFR em membrana, em CEE. (a) “core” do TMA, com marcação positiva 3+, aumento original 100x e (b) em 200x; (c) amostra com marcação negativa para EGFR, aumento 200x e (d) áreas com marcação 2+ (seta) e 3+, aumento original 400x.

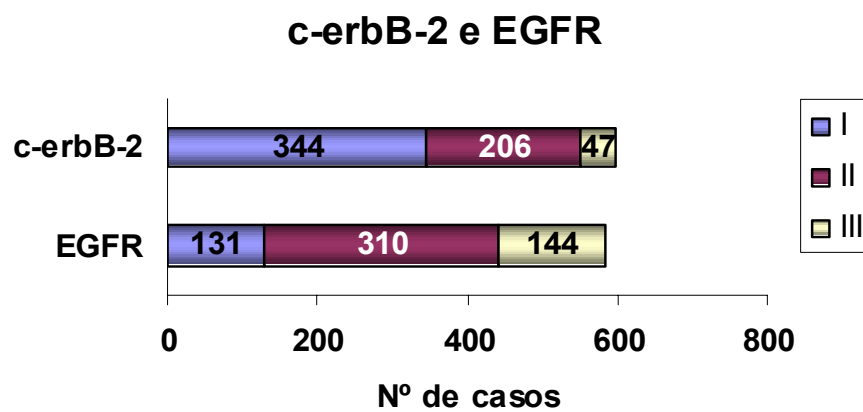


Figura 5 - Expressão imunoistoquímica de c-erbB-2 e EGFR em casos de CEE.

4.2.2 c-erbB-2 e EGFR: Correlação com dados clínico-patológicos

A expressão de c-erbB-2 e de EGFR não apresentaram correlação estatisticamente significativa com gênero, cor, sítio do tumor, invasões linfática e venosa e pT. No entanto, houve correlação significativa entre a expressão de c-erbB-2 ($p=0,04$) e EGFR ($p=0,03$) e o grau histológico. Ambos os marcadores foram significativamente mais expressos em casos bem/moderadamente diferenciados do que nos pouco diferenciados/indiferenciados (Tabelas 7 e 8).

Apesar de não ser estatisticamente significativa ($p=0,067$), foi observada uma tendência a significância na associação entre a expressão de c-erbB-2 e sítio do tumor, em que casos positivos ocorreram com mais frequência no terço médio do esôfago (Tabela 7).

Tabela 7 - Análise da correlação entre a expressão de c-erbB-2 e fatores clínico-patológicos em CEE.

Variável	Categoria	c-erbB-2		
		N (%)	P ¹ (%)	p
Gênero (n=597)	Masculino	281 (81,7)	209 (82,6)	0,771
	Feminino	63 (18,3)	44 (17,4)	
Cor ² (n=581)	Branca	236 (70,7)	170 (68,8)	0,634
	Não-Branca	98 (29,3)	77 (31,2)	
Sítio (n=578)	Superior	67 (20,2)	60 (24,4)	0,067
	Inferior	54 (16,3)	53 (21,5)	
	Médio	211 (63,5)	133 (54,1)	
Grau de Diferenciação ² (n=594)	G1/G2	246 (71,9)	201 (79,8)	0,029
	G3/G4	96 (28,1)	51 (20,2)	
Invasão Linfática ³ (n=201)	Não observada	36 (29,5)	19 (24,1)	0,397
	Presente	86 (70,5)	60 (75,9)	
Invasão Venosa ³ (n=201)	Não observada	101 (82,8)	66 (83,5)	0,889
	Presente	21 (17,2)	13 (16,5)	
pT ^{2,3} (n=199)	1/2	29 (53,7)	25 (46,3)	0,246
	3/4	91 (62,8)	54 (37,2)	

N: negativo; P: positivo; p: p valor

(1) para análises estatísticas, os grupos II e III foram agrupados como positivos.

(2) para cálculos estatísticos, as categorias foram agrupadas.

(3) consideradas apenas as peças cirúrgicas

na: teste estatístico não aplicável.

Tabela 8 - Correlação entre a expressão protéica de EGFR e fatores clínico-patológicos em CEE.

Variável	Categoria	EGFR		
		N (%)	P ¹ (%)	p
Gênero (n=597/585)	Masculino	109 (83,2)	374 (82,4)	0,826
	Feminino	22 (16,8)	80 (17,6)	
Cor (n=581/568)	Branca	84 (67,2)	314 (70,9)	0,427
	Não-Branca	41 (32,8)	129 (29,1)	
Sítio (n=578/565)	Superior	26 (20,8)	96 (21,8)	0,478
	Inferior	18 (14,4)	82 (18,6)	
	Médio	81 (64,8)	262 (59,6)	
Grau de Diferenciação² (n=594/583)	G1/G2	90 (68,7)	351 (77,6)	0,036
	G3/G4	41 (31,3)	101 (22,4)	
Invasão Linfática³ (n=199)	Não observada	13 (25,5)	39 (26,4)	0,904
	Presente	38 (74,5)	109 (73,6)	
Invasão Venosa³ (n=199)	Não observada	42 (82,4)	122 (82,4)	0,990
	Presente	9 (17,6)	26 (17,6)	
pT^{2,3} (n=197)	1/2	15 (30)	37 (25,2)	0,503
	3/4	35 (70)	110 (74,8)	

N: negativo; P: positivo; p: p valor

(1) para análises estatísticas, os grupos II e III foram agrupados como positivos.

(2) para cálculos estatísticos, as categorias foram agrupadas.

(3) consideradas apenas as peças cirúrgicas

na: teste estatístico não aplicável.

4.2.3 Expressão de ciclinas

A análise imunoistoquímica de ciclina A foi realizada em 579 casos e revelou que 64 delas (11,1%) não mostraram expressão de ciclina A, enquanto que 515 (89%) mostraram marcação positiva. Destes, 352 (60,8%) foram considerados positivos e 163 (28,1%), positivos fortes. Todas as células tumorais com expressão positiva apresentaram marcação predominantemente nuclear (Figuras 6 e 9).

Em relação à ciclina B1, foi verificado que 258/551 (46,8%) casos não apresentaram marcação dessa proteína e a expressão positiva foi constatada em 293 (53,2%) pacientes, subdivididos em positivos (23,6%) e positivos fortes (29,6%). Apesar de a marcação positiva ser predominantemente citoplasmática, algumas células apresentaram marcação nuclear em 39 casos (7%) (Figuras 7 e 9).

A expressão protéica de ciclina D1, analisada em 579 casos, foi verificada em 295 (50,9%) pacientes, dos quais 33% foram agrupados como positivos e 17,9%, como positivos fortes. Não foi constatada nenhuma marcação em 49,1% dos casos. Algumas células com expressão citoplasmática foram observadas entre as células tumorais, apesar de a marcação ter sido nuclear em sua grande maioria, de maneira que não foram avaliadas separadamente (Figuras 8 e 9).

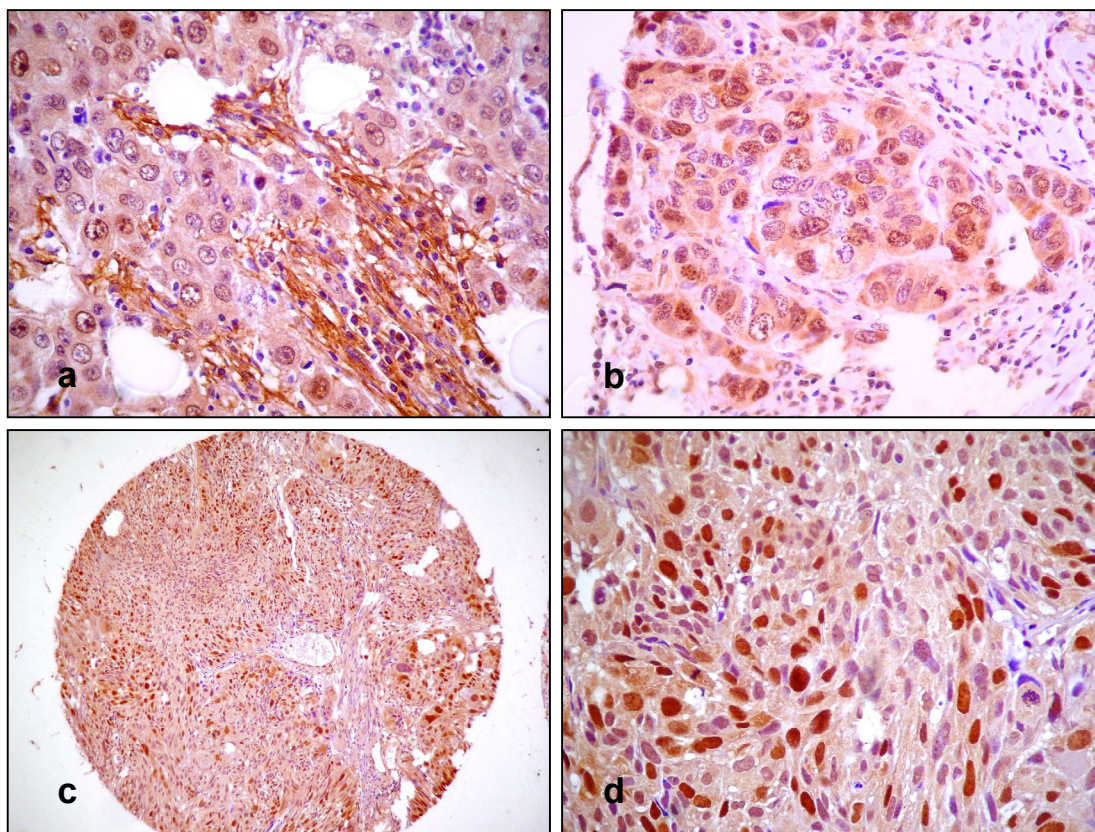


Figura 6 - Padrão de marcação imunoistoquímica de ciclina A em CEE. (a) corte de amostra mostrando expressão negativa com menos de 10% das células com marcação, aumento original 400x; (b) caso em que as células apresentam marcação de intensidade moderada, aumento original 400x; (c) “core” de TMA, mostrando marcação positiva com intensidade forte entre 50-90% das células tumorais, aumento original 100x e (b) 400x.

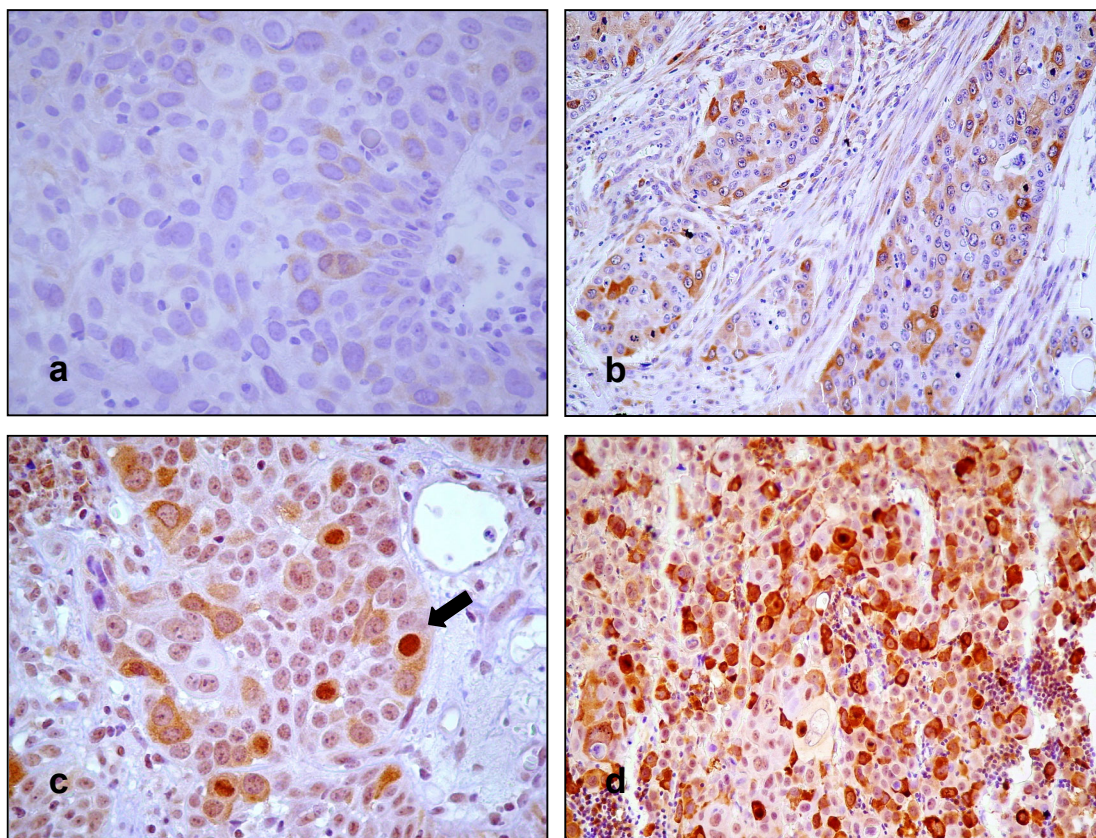


Figura 7 - Expressão imunoistoquímica de ciclina B1 em CEE. (a) amostra considerada negativa, com menos de 10% das células tumorais marcadas, aumento original 400x; (b) caso considerado positivo, com intensidade de marcação citoplasmática moderada, aumento original 200x; (c) corte com marcação citoplasmática de intensidade moderada, em que é possível observar algumas células com marcação nuclear (seta), aumento original 400x e (d) amostra mostrando marcação citoplasmática positiva de intensidade forte na grande maioria das células, aumento original 400x.

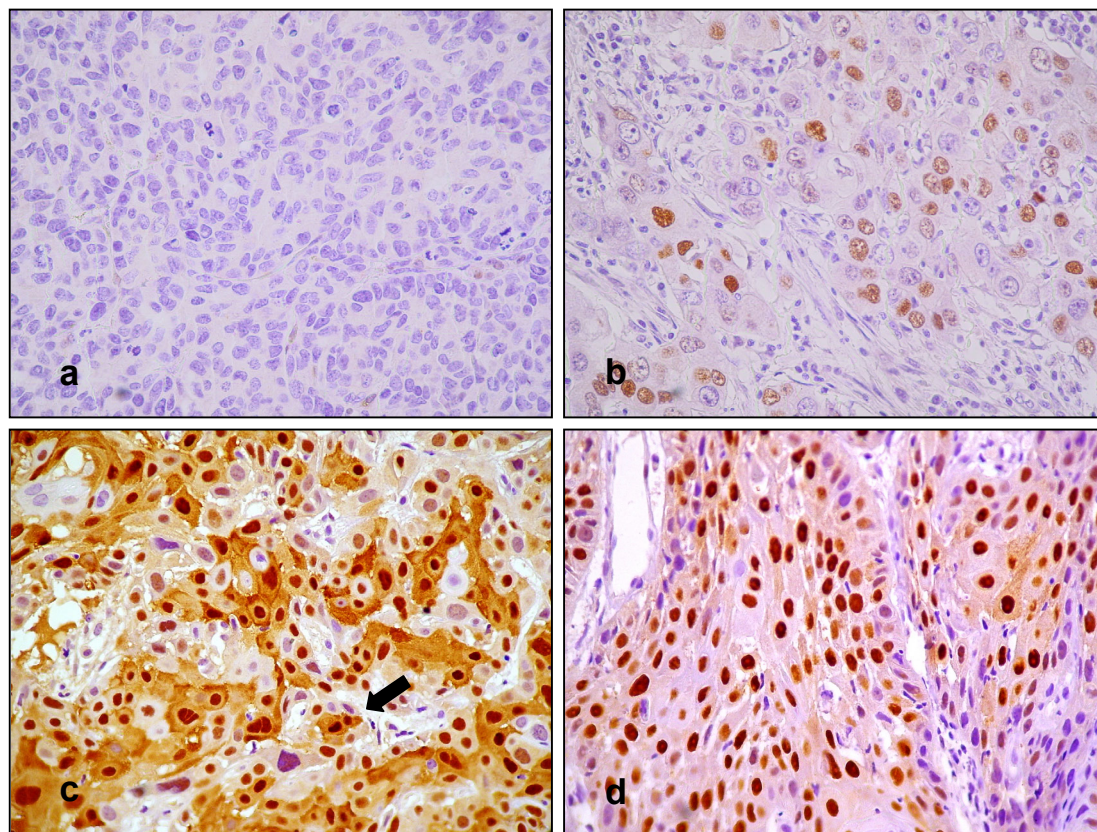


Figura 8 - Expressão imunoistoquímica de ciclina D1 em CEE. (a) amostra considerada negativa, aumento 200x; (b) caso considerado positivo, com marcação nuclear de intensidade moderada em 10-50% das células tumorais, aumento original 400x; (c) corte de amostra mostrando marcação citoplasmática (seta) juntamente com a nuclear, aumento original 400x e (d) marcação nuclear positiva de intensidade forte, aumento original 400x.

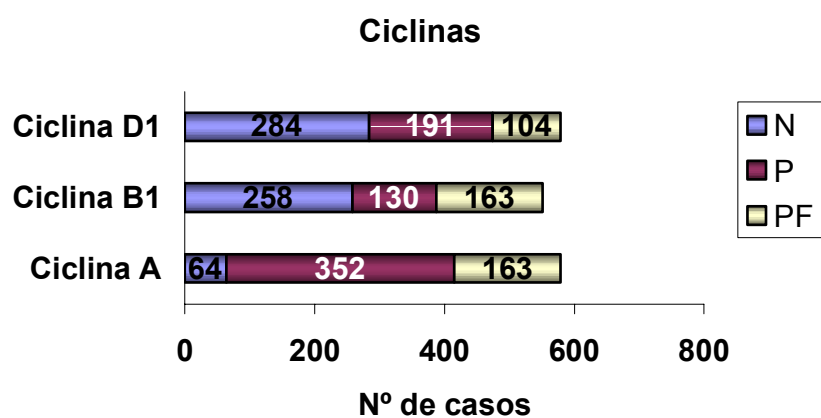


Figura 9 - Expressão das ciclinas A, B1 e D1 em casos de pacientes com CEE.

4.2.4 Ciclinas: Associação com variáveis clínico-patológicas

A expressão de ciclina A não mostrou nenhuma correlação estatística com nenhum dos dados clínico-patológicos analisados, não havendo diferenças significativas entre tais características em casos com e sem expressão dessa proteína (Tabela 9). Devido a distribuição das amostras, não foi possível realizar análise de correlação estatística entre ciclina A e invasões linfática e venosa e pT.

Análises estatísticas mostraram que a superexpressão de ciclina B1 está significativamente associada com pT ($p=0,033$) e inversamente correlacionada com invasão linfática ($p=0,006$). Dentre os casos negativos para essa proteína, há uma maior proporção de invasão linfática presente. Além disso, os casos negativos foram mais frequentes em tumores mais avançados, que apresentam invasão em adventícia ou em estruturas adjacentes (pT3 e pT4). Não foi encontrada nenhuma correlação significativa entre a imunoreatividade de ciclina B1 e os fatores clínico-patológicos gênero, cor, sítio e grau de diferenciação (Tabela 10). Não foi possível verificar a existência de correlação estatística entre a expressão dessa proteína e invasão venosa. Os casos em que foram observadas células com marcação nuclear não puderam ser avaliados separadamente para verificar a existência de correlações com os aspectos clínico-patológicos, sendo então analisados juntamente com os demais casos.

Em relação à ciclina D1, foi observada correlação significativa entre a superexpressão dessa proteína e cor ($p=0,026$). A ciclina D1 está mais

expressa em pacientes de cor branca, em relação aos não-brancos. Foi observada também uma tendência a significância da superexpressão dessa proteína estar associada ao grau de diferenciação, apesar de não ser estatisticamente significativa ($p=0,070$), em que a ciclina D1 está mais expressa em casos bem/moderadamente diferenciados do que nos pouco diferenciados/indiferenciados. Não foram encontradas diferenças significativas em relação a gênero e sítio (Tabela 11). Não foi possível realizar análises estatísticas com invasões linfática e venosa e pT.

Tabela 9 - Expressão de ciclina A e sua correlação com fatores clínico-patológicos.

Variável	Categoria	Ciclina A			
		N (%)	P (%)	PF (%)	p
Gênero (n=579)	Masculino	51 (79,7)	289 (82,1)	132 (81)	0,881
	Feminino	13 (20,3)	63 (17,9)	31 (19)	
Cor¹ (n=563)	Branca	39 (62,9)	246 (72,6)	108 (66,7)	0,184
	Não-Branca	23 (37,1)	93 (27,4)	54 (33,3)	
Sítio (n=561)	Superior	11 (18,3)	75 (22,1)	37 (23)	0,295
	Inferior	6 (10)	68 (20)	28 (17,4)	
	Médio	43 (71,7)	197 (57,9)	96 (59,6)	
G. de Diferenciação¹ (n=577)	G1/G2	46 (71,9)	264 (75,4)	127 (77,9)	0,619
	G3/G4	18 (28,1)	86 (24,6)	36 (22,1)	
Invasão Linfática² (n=201)	Não observada	12 (32,4)	40 (25,2)	2 (40)	na
	Presente	25 (67,6)	119 (74,8)	3 (60)	
Invasão Venosa² (n=201)	Não observada	32 (86,5)	130 (81,8)	4 (80)	na
	Presente	5 (13,5)	29 (18,2)	1 (20)	
pT^{1,2} (n=199)	1/2	10 (27)	41 (26,1)	3 (60)	na
	3/4	27 (73)	116 (73,9)	2 (40)	

N: negativo; P: positivo; PF: positivo forte

(1) para cálculos estatísticos, as categorias foram agrupadas.

(2) consideradas apenas as peças cirúrgicas

na: teste estatístico não aplicável.

Tabela 10 - Expressão de ciclina B1 e associação com características clínico-patológicas.

Variável	Categoria	Ciclina B1			
		N (%)	P (%)	PF (%)	p
Gênero (n=551)	Masculino	219 (84,9)	105 (80,8)	132 (81)	0,464
	Feminino	39 (15,1)	25 (19,2)	31 (19)	
Cor¹ (n=535)	Branca	177 (71,4)	87 (68)	113 (71,1)	0,775
	Não-Branca	71 (28,6)	41 (32)	46 (28,9)	
Sítio (n=533)	Superior	51 (20,6)	28 (22,2)	41 (25,8)	0,580
	Inferior	50 (20,2)	19 (15,1)	27 (17)	
	Médio	147 (59,3)	79 (62,7)	91 (57,2)	
G. de Diferenciação¹ (n=549)	G1/G2	200 (77,5)	97 (75,2)	122 (75,3)	0,824
	G3/G4	58 (22,5)	32 (24,8)	40 (24,7)	
Invasão Linfática² (n=195)	Não observada	25 (19,2)	19 (43,2)	7 (33,3)	0,006
	Presente	105 (80,8)	25 (56,8)	14 (66,7)	
Invasão Venosa² (n=195)	Não observada	106 (81,5)	38 (86,4)	17 (81)	na
	Presente	24 (18,5)	6 (13,6)	4 (19)	
pT^{1,2} (n=193)	1/2	26 (20,2)	17 (38,6)	7 (35)	0,033
	3/4	103 (79,8)	27 (61,4)	13 (65)	

N: negativo; P: positivo; PF: positivo forte

(1) para cálculos estatísticos, as categorias foram agrupadas.

(2) consideradas apenas as peças cirúrgicas

na: teste estatístico não aplicável.

Tabela 11 - Relação entre a expressão de ciclina D1 e aspectos clínico-patológicos.

Variável	Categoria	Ciclina D1			p
		N (%)	P (%)	PF (%)	
Gênero (n=579)	Masculino	236 (83,1)	154 (80,6)	88 (84,6)	0,651
	Feminino	48 (16,9)	37 (19,4)	16 (15,4)	
Cor¹ (n=563)	Branca	198 (73,1)	140 (74,1)	62 (60,2)	0,026
	Não-Branca	73 (26,9)	49 (25,9)	41 (39,8)	
Sítio (n=558)	Superior	61 (22,6)	33 (17,8)	27 (26,2)	0,356
	Inferior	52 (19,3)	38 (20,5)	14 (13,6)	
	Médio	157 (58,1)	114 (61,6)	62 (60,2)	
G. Diferenciação¹ (n= 578)	G1/G2	208 (73,5)	143 (74,9)	88 (84,6)	0,070
	G3/G4	75 (26,5)	48 (25,1)	16 (15,4)	
Invasão Linfática² (n=202)	Não observada	39 (27,1)	14 (26,4)	2 (40)	na
	Presente	105 (72,9)	39 (73,6)	3 (60)	
Invasão Venosa² (n=202)	Não observada	116 (80,6)	46 (86,8)	5 (100)	na
	Presente	28 (19,4)	7 (13,2)	0	
pT^{1,2} (n=200)	1/2	35 (24,5)	16 (30,8)	2 (40)	na
	3/4	108 (75,5)	36 (69,2)	3 (60)	

N: negativo; P: positivo; PF: positivo forte

(1) para cálculos estatísticos, as categorias foram agrupadas.

(2) consideradas apenas as peças cirúrgicas

na: teste estatístico não aplicável.

4.2.5 Expressão de VEGF

Na análise da expressão de VEGF em 566 casos, foi considerada positiva a marcação citoplasmática em mais de 10% das células tumorais. Assim, 420 (74,2%) pacientes mostraram ser positivos para a expressão dessa proteína, enquanto que 146 (25,8%) foram considerados negativos para marcação de VEGF (Figuras 10 e 11).

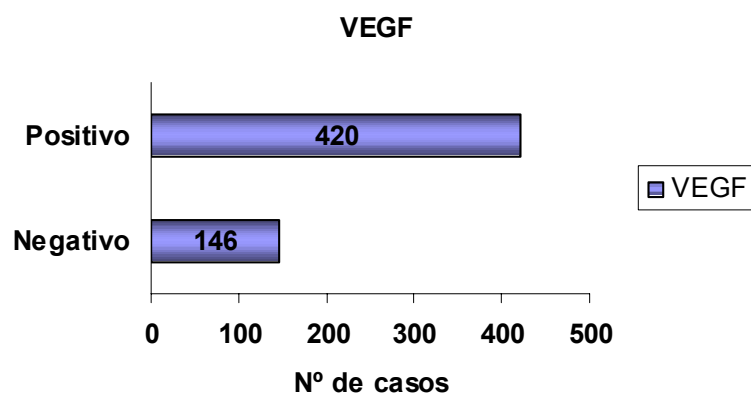


Figura 10 - Expressão imunoistoquímica de VEGF em casos de CEE.

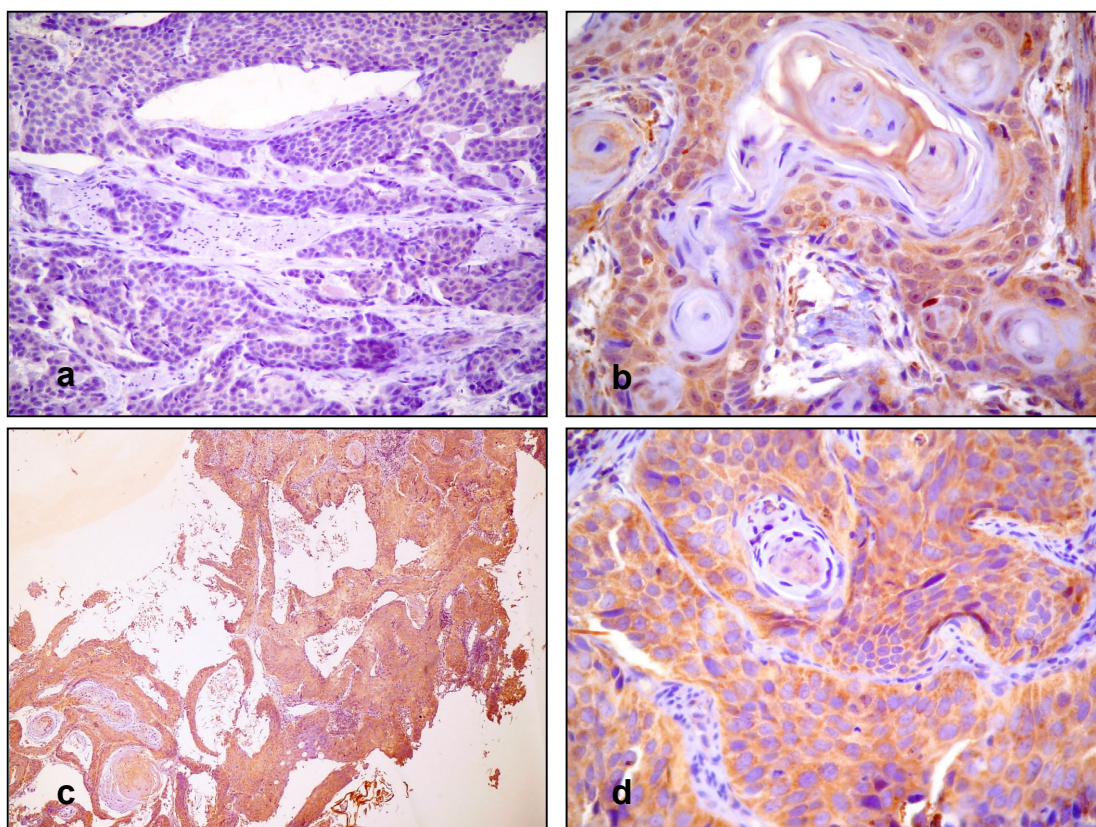


Figura 11 - Imunoistoquímica de VEGF em CEE. (a) amostra mostrando nenhuma expressão de VEGF, aumento original 200x; (b) caso em que 50-90% das células tumorais apresentam expressão de VEGF; aumento original 400x, (c) corte com mais de 90% das células tumorais apresentando marcação citoplasmática positiva para VEGF, aumento original 40x e (d) 400x.

4.2.6 VEGF e fatores clínico-patológicos

Não foi observada nenhuma diferença significativa entre a alta expressão de VEGF e fatores clínico-patológicos, em casos com ausência ou presença de superexpressão dessa proteína (Tabela 12).

Tabela 12 - Correlação entre a imunoexpressão de VEGF e fatores clínico-patológicos em CEE.

Variável	Categoria	VEGF		p
		N (%)	P (%)	
Gênero (n=566)	Masculino	117 (80,1)	351 (83,6)	0,345
	Feminino	29 (19,9)	69 (16,4)	
Cor¹ (n=556)	Branca	101 (69,7)	288 (71,1)	0,741
	Não-Branca	44 (30,3)	117 (28,9)	
Sítio (n=547)	Superior	25 (17,7)	93 (22,9)	0,423
	Inferior	25 (17,7)	71 (17,5)	
	Médio	91 (64,5)	242 (59,6)	
G. Diferenciação¹ (n=565)	G1/G2	118 (80,8)	313 (74,9)	0,145
	G3/G4	28 (19,2)	105 (25,1)	
Invasão Linfática² (n=200)	Não observada	31 (29,8)	23 (24)	0,352
	Presente	73 (70,2)	73 (76)	
Invasão Venosa² (n=200)	Não observada	89 (85,6)	77 (80,2)	0,313
	Presente	15 (14,4)	19 (19,8)	
pT^{1,2} (n=198)	1/2	32 (30,8)	22 (23,4)	0,245
	3/4	72 (69,2)	72 (76,6)	

N: negativo; P: positivo

(1) para cálculos estatísticos, as categorias foram agrupadas.

(2) consideradas apenas as peças cirúrgicas

na: teste estatístico não aplicável.

4.2.7 Correlação entre os marcadores

A análise estatística da correlação entre os marcadores c-erbB-2, EGFR, ciclinas A, B1 e D1 e VEGF mostrou que há associação significativa entre as coexpressões da maioria das proteínas estudadas, conforme demonstrado na tabela 13. Entretanto, não foram verificadas correlações estatisticamente significativas entre expressões de c-erbB-2/ciclina A, c-erbB-2/ciclina B1, c-erbB-2/VEGF, EGFR/ciclina A e EGFR/VEGF.

Assim, EGFR e c-erbB-2 apresentaram coexpressão com significância estatística ($p=0,0001$). Foi verificada correlação significativa entre a coexpressão das três ciclinas estudadas, sendo que ciclina D1 foi a única que mostrou coexpressão com todas as demais proteínas estudadas. Houve uma tendência a significância estatística entre a coexpressão de ciclina B1 e EGFR ($p=0,051$). A expressão de VEGF apenas correlacionou-se com as três ciclinas estudadas (Tabela 13).

Tabela 13 - Correlação entre os marcadores estudados nesse trabalho.

	c-erbB-2					
EGFR	p = 0,0001	EGFR		Ciclina A		
Ciclina A	p = 0,363	p = 0,147	Ciclina A			
Ciclina B1	p = 0,984	<u>p = 0,051</u>	p = 0,0001	Ciclina B1		
Ciclina D1	p = 0,015	p = 0,001	p = 0,0001	p = 0,0001	Ciclina D1	
VEGF	p = 0,279	p = 0,325	p = 0,0001	p = 0,0001	p = 0,0001	VEGF

p: p valor (sublinhado: p marginal; em negrito: p significativo)

4.3 ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL

A análise de sobrevida global nos casos de CEE mostrou estimativas de sobrevida consideravelmente baixas em 2, 5 e 10 anos de 19,3%, 8% e 5,3%, respectivamente (Figura 12).

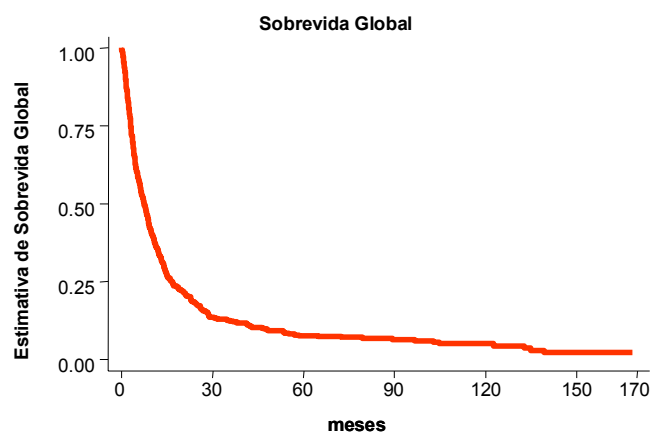


Figura 12 - Curva de Sobrevida Global dos casos de CEE estudados.

4.3.1 Sobrevida Global e fatores clínico-patológicos

Em relação aos fatores clínico-patológicos, foi verificada associação estatisticamente significativa entre sobrevida global dos pacientes e gênero ($p=0,044$), cor ($p=0,005$) e pT ($p=0,021$), conforme pode ser observada nas curvas de sobrevida global na figura 13. De acordo com essas análises, os indivíduos do sexo masculino mostraram estimativa de sobrevida menor em relação aos do gênero feminino. Em relação à raça, os não-brancos apresentaram pior sobrevida global. As estimativas de sobrevida global foram mais baixas em casos de tumores mais avançados (pT3/pT4) do que nos casos mais precoces (pT1/pT2) (Figura 13).

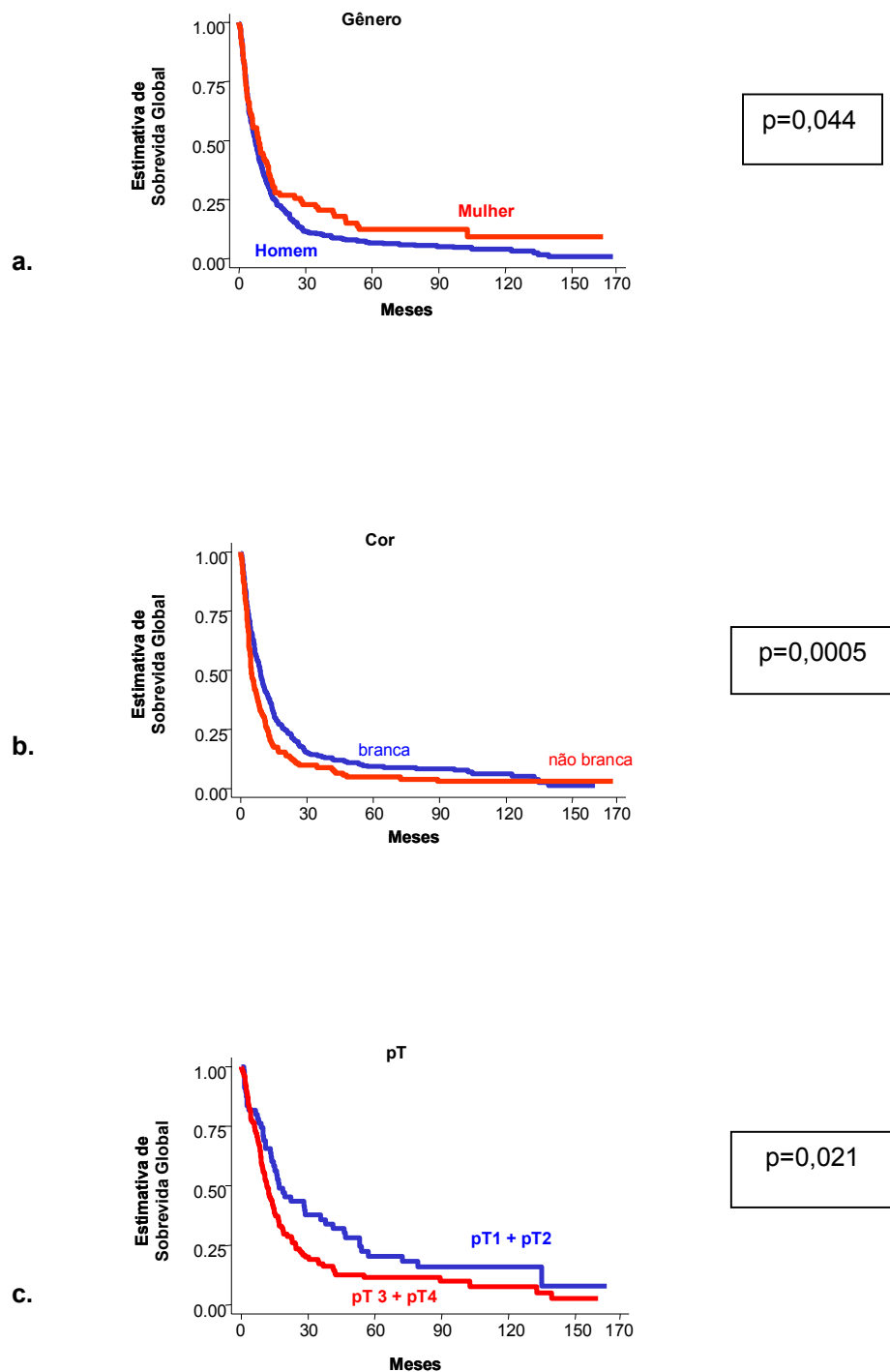


Figura 13 - Curvas de Sobrevida Global em CEE, segundo (a) Gênero; (b) Cor e (c) pT.

4.3.2 Sobrevida Global e Expressão de Marcadores

As análises de sobrevida global demonstraram a existência de diferenças significativas entre sobrevida global e expressão protéica de VEGF ($p=0,002$), em que os casos com marcação positiva mostraram menor taxa de sobrevida global (Figura 14). Foi verificada também associação com a expressão das ciclinas A ($p=0,0001$), B1 ($p=0,014$) e D1 ($p=0,0001$), sendo que os casos considerados positivos para essas proteínas tiveram baixas estimativas de sobrevida em relação aos demais casos, especialmente os positivos fortes, melhor evidenciados nos casos das ciclinas A e D1 (Figura 14).

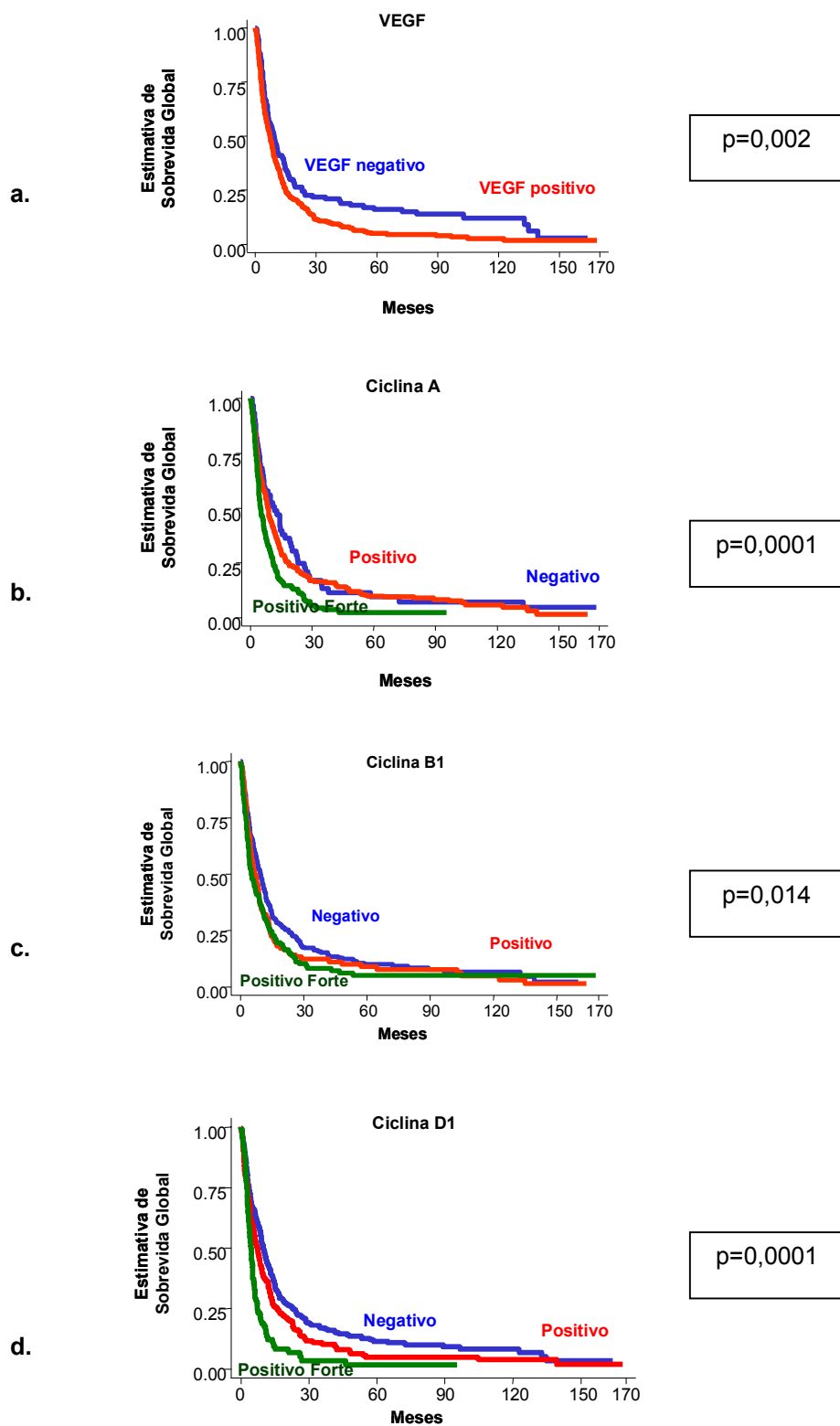


Figura 14 - Influência da superexpressão de marcadores nas curvas de Sobrevida Global. (a) VEGF; (b) Ciclina A; (c) Ciclina B1 e (d) Ciclina D1.

4.3.3 Análise de Sobrevida Global em “end-point” de 12, 24 e 36 meses

Foram realizadas análises de sobrevida global em “end-points” de 12, 24 e 36 meses, separadamente, para verificar a influência de todas as variáveis estudadas nos três primeiros anos após o diagnóstico da doença. Tais dados estão sumarizados na tabela 14.

Nas análises de sobrevida global para os três “end-points” estipulados, foi constatado que as expressões das proteínas VEGF e ciclinas A, B1 e D1 estão influenciando as taxas de sobrevida global em 12, 24 e 36 meses, assim como foi observado nas análises de sobrevida global de todo o período de seguimento dos pacientes. Os casos que apresentaram superexpressão desses marcadores mostraram taxas de sobrevida menores. No caso das ciclinas, foi observado que os casos considerados positivos fortes apresentaram estimativas de sobrevida mais baixas do que os positivos (Figuras 15 a 17).

Em relação as variáveis clínico-patológicas, foi verificado que os fatores cor ($p=0,0002$) e grau histológico ($p=0,048$) influenciam significativamente as taxas de sobrevida global no período de 12 meses, sendo menores entre os casos de indivíduos não brancos e bem/moderadamente diferenciados (Figura 18). Foi verificada que a categoria pT tende a apresentar associação com a sobrevida global ($p=0,059$), em que os casos mais avançados em que o tumor invade a adventícia ou estruturas adjacentes mostram as menores estimativas (Figura 18).

No “end-point” de 24 meses, a cor ($p=0,0002$) e o pT ($p=0,025$) dos casos mostraram associação estatisticamente significativa com a sobrevida global, de modo semelhante ao período de 12 meses (Figura 19). Foi verificada também tendência a significância entre a associação de menor taxa de sobrevida global e presença de invasão linfática ($p=0,062$).

Nos 36 primeiros meses após o diagnóstico, foi observada uma tendência a significância entre a associação de indivíduos do gênero masculino e presença de invasão linfática com piores curvas de sobrevida ($p=0,079$) (Figura 20). As variáveis que mostraram associação significativa com a sobrevida global foram cor ($p=0,0004$) e pT ($p=0,01$) (Figura 20).

Tabela 14 - Análises de sobrevida global em casos de CEE.

Variável	SG p	SG₁₂ p	SG₂₄ p	SG₃₆ p
c-erbB-2	0,759	0,830	0,659	0,876
EGFR	0,229	0,183	0,165	0,117
Ciclina A	0,0001	0,0001	0,0002	< 0,0001
Ciclina B1	0,014	0,009	0,004	0,004
Ciclina D1	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
VEGF	0,002	<u>0,068</u>	0,027	0,007
Gênero	0,044	0,309	0,140	<u>0,079</u>
Cor	0,0005	0,0002	0,0002	0,0004
Sítio	0,425	0,160	0,308	0,386
Grau de Diferenciação	0,252	0,048	0,101	0,121
Invasão linfática	0,156	0,274	<u>0,062</u>	<u>0,053</u>
Invasão venosa	0,699	0,260	0,150	0,46
pT	0,021	<u>0,059</u>	0,025	0,010

SG: sobrevida global; SG₁₂: SG em “end-point” de 12 meses; SG₂₄: SG em 24 meses; SG₃₆: SG em 36 meses.

p: p valor (sublinhado: p marginal; em negrito: p significativo)

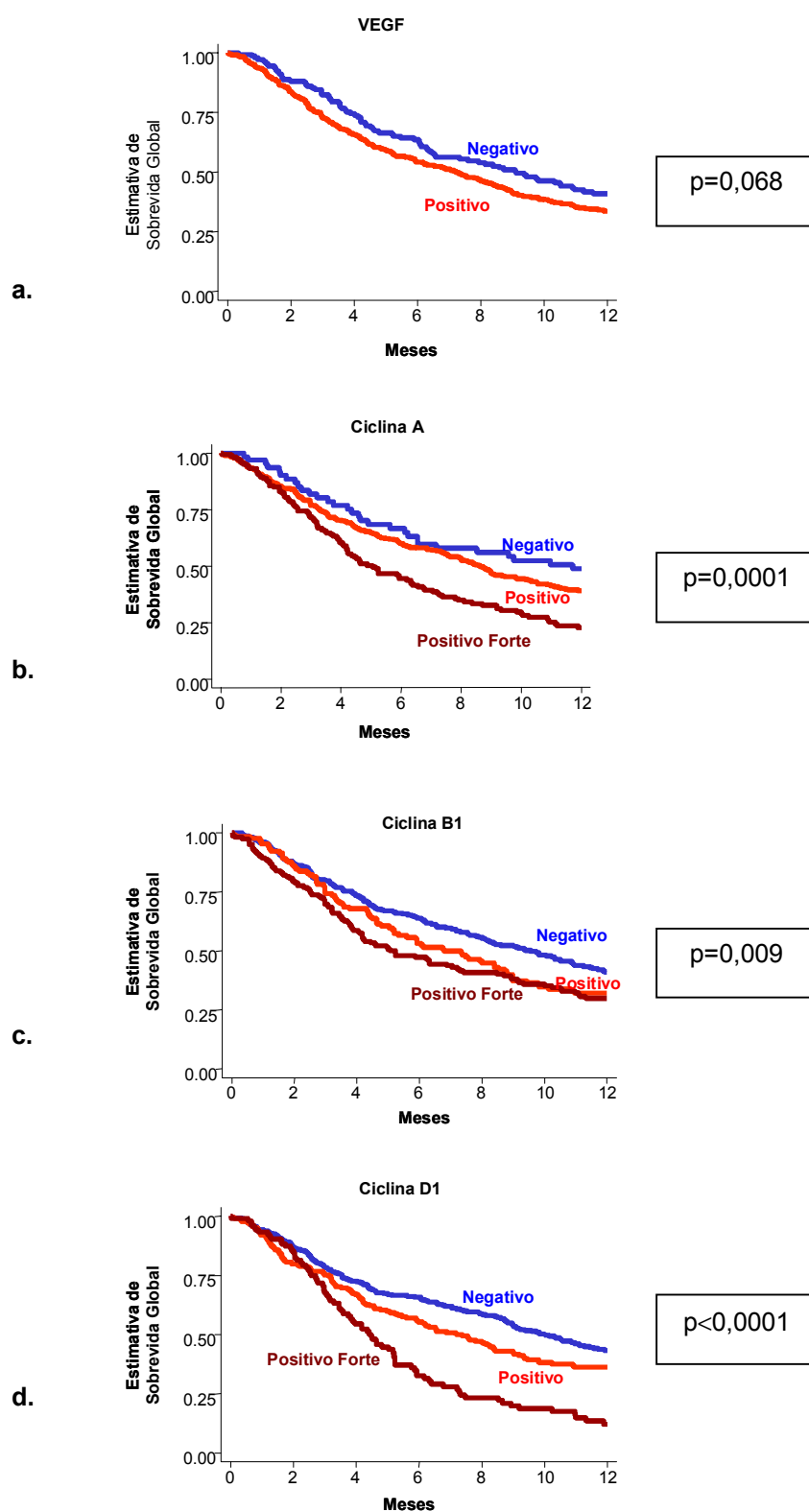


Figura 15 - Análises de Sobrevida Global em “end point” de 12 meses, em relação à expressão de (a) VEGF e Ciclinas (b) A; (c) B1 e (d) D1.

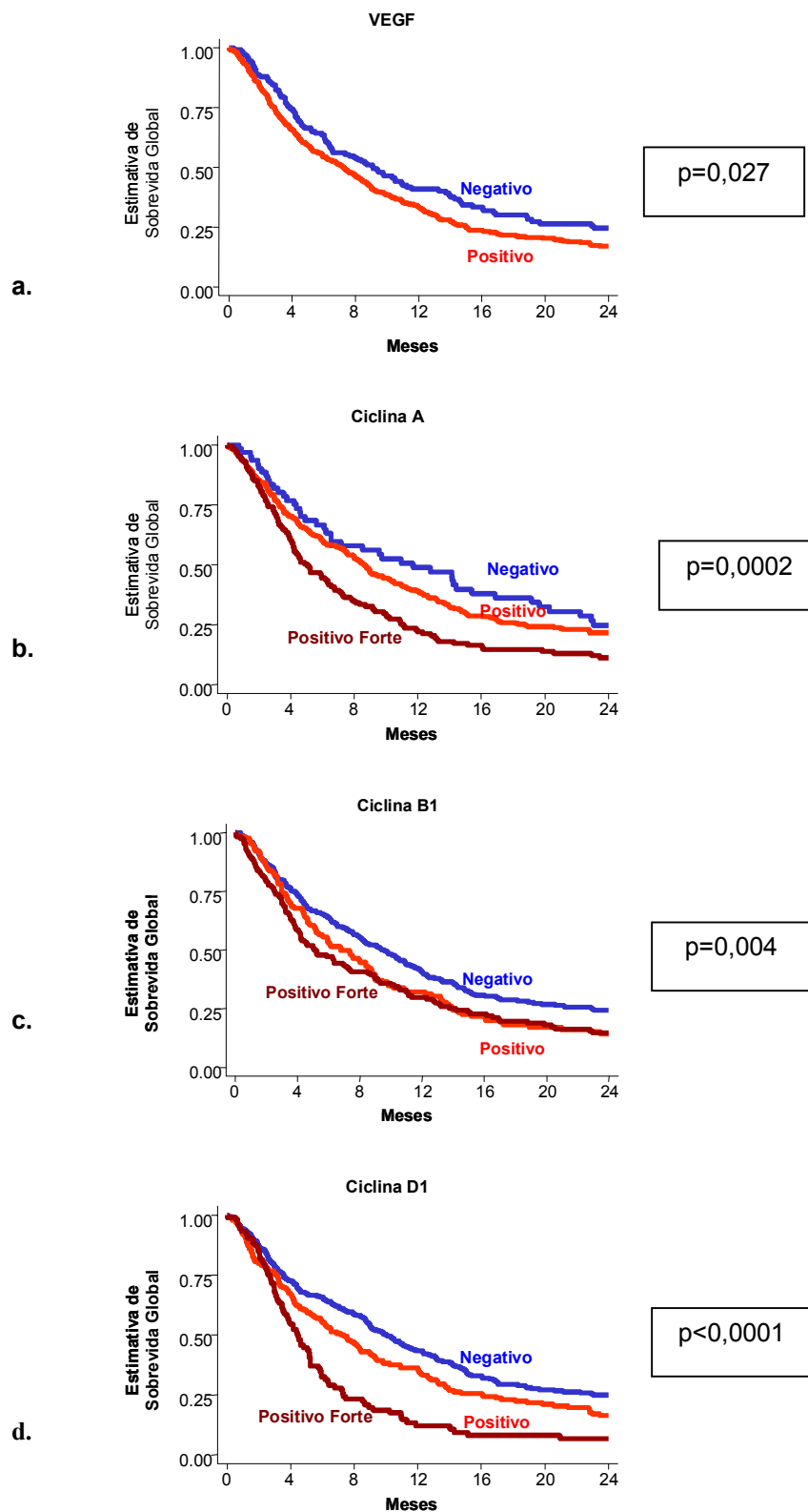


Figura 16 - Influência da expressão de (a) VEGF e ciclinas (b) A, (c) B1 e (d) D1 nas curvas de sobrevida global, em “end-point” de 24 meses.

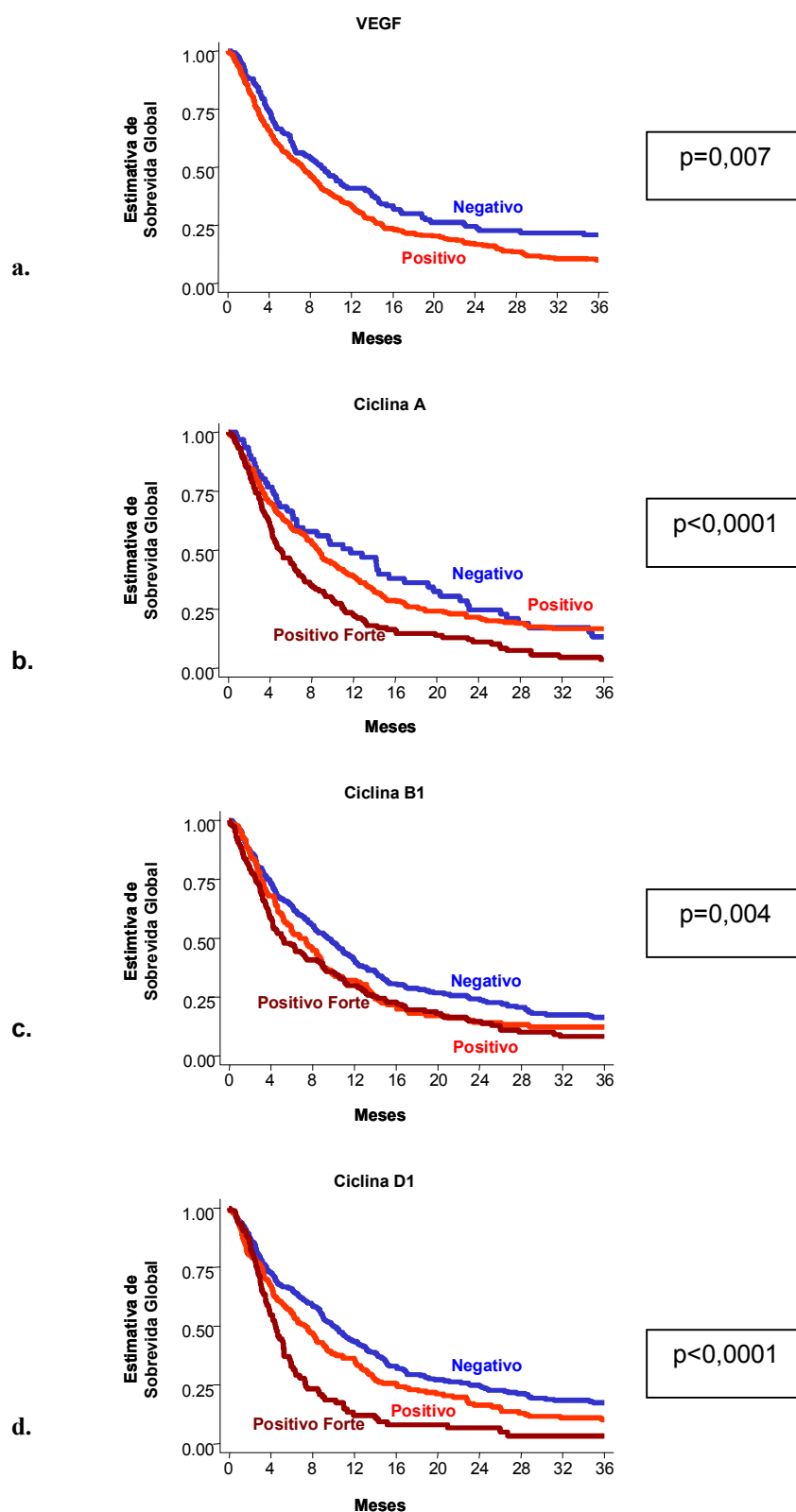


Figura 17 - Curvas de Sobrevida Global em “end-point” de 36 meses, associado com expressão de (a) VEGF e (b-d) ciclinas.

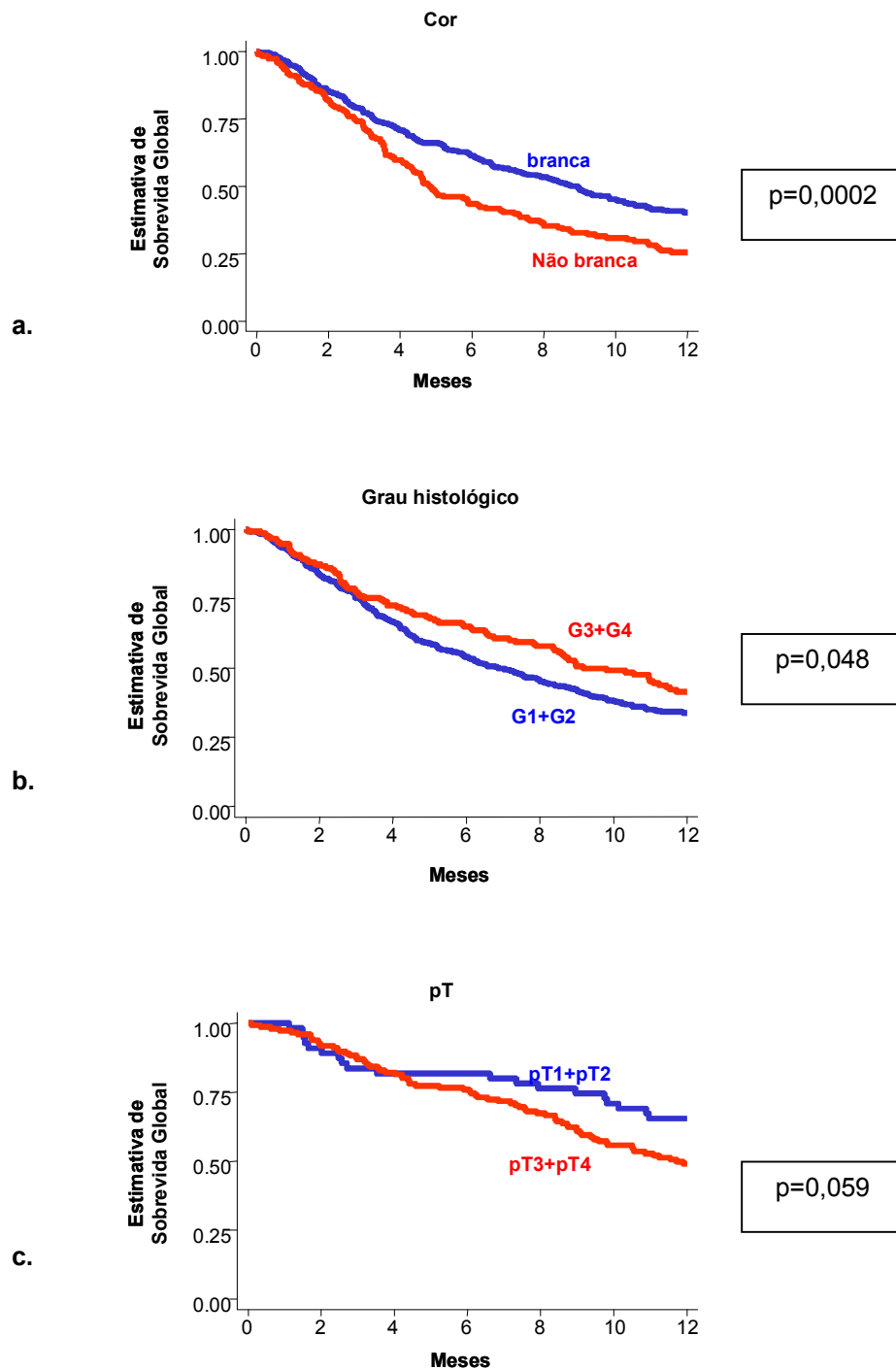


Figura 18 - Curvas de Sobrevida Global, em “end-point” de 12 meses, de acordo com fatores clínico-patológicos. (a) Cor; (b) Grau histológico e (c) pT.

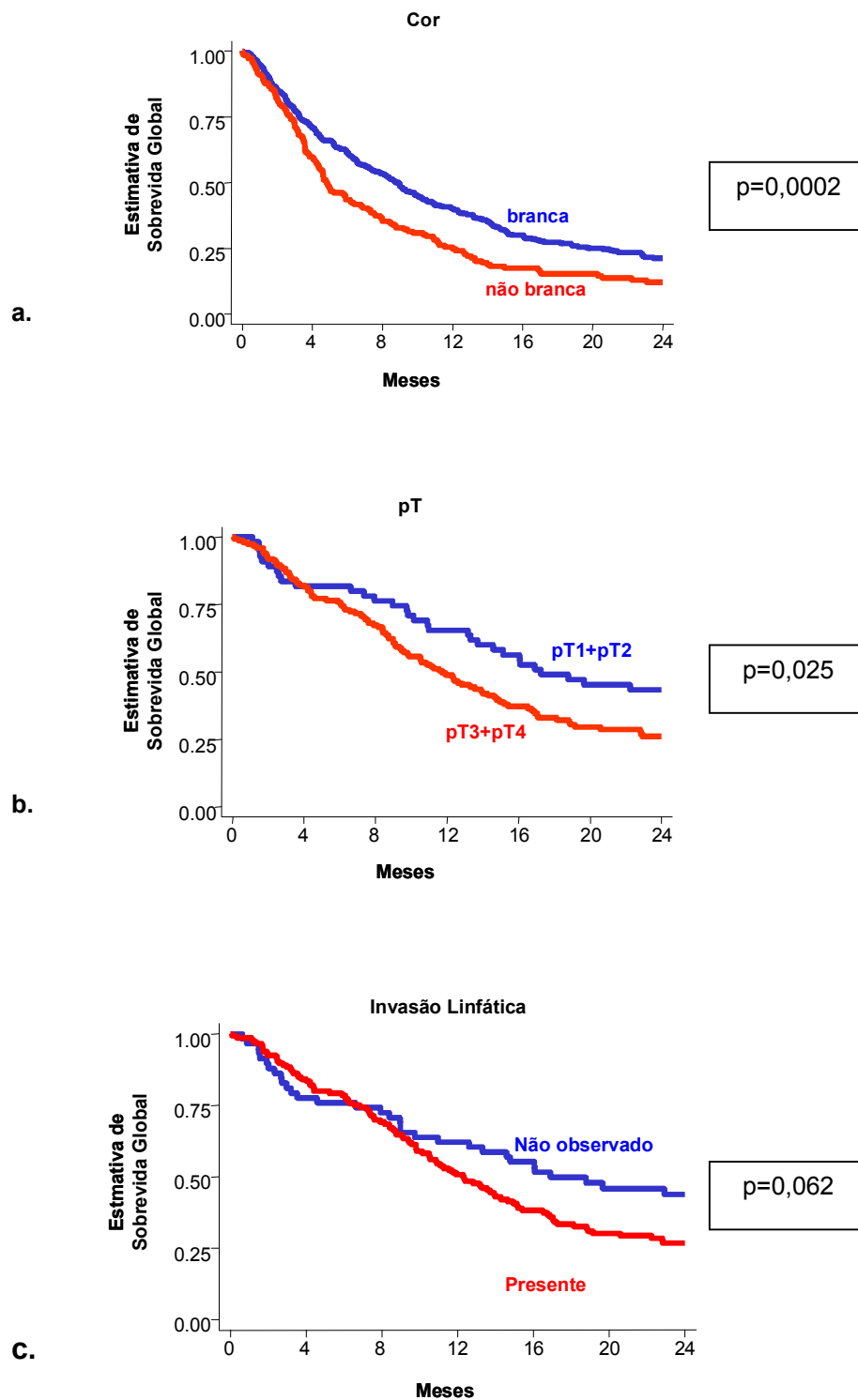


Figura 19 - Análises de Sobrevida Global, baseadas nos aspectos clínico-patológicos, em “end-point” de 24 meses. (a) Cor; (b) pT e (c) Invasão Linfática

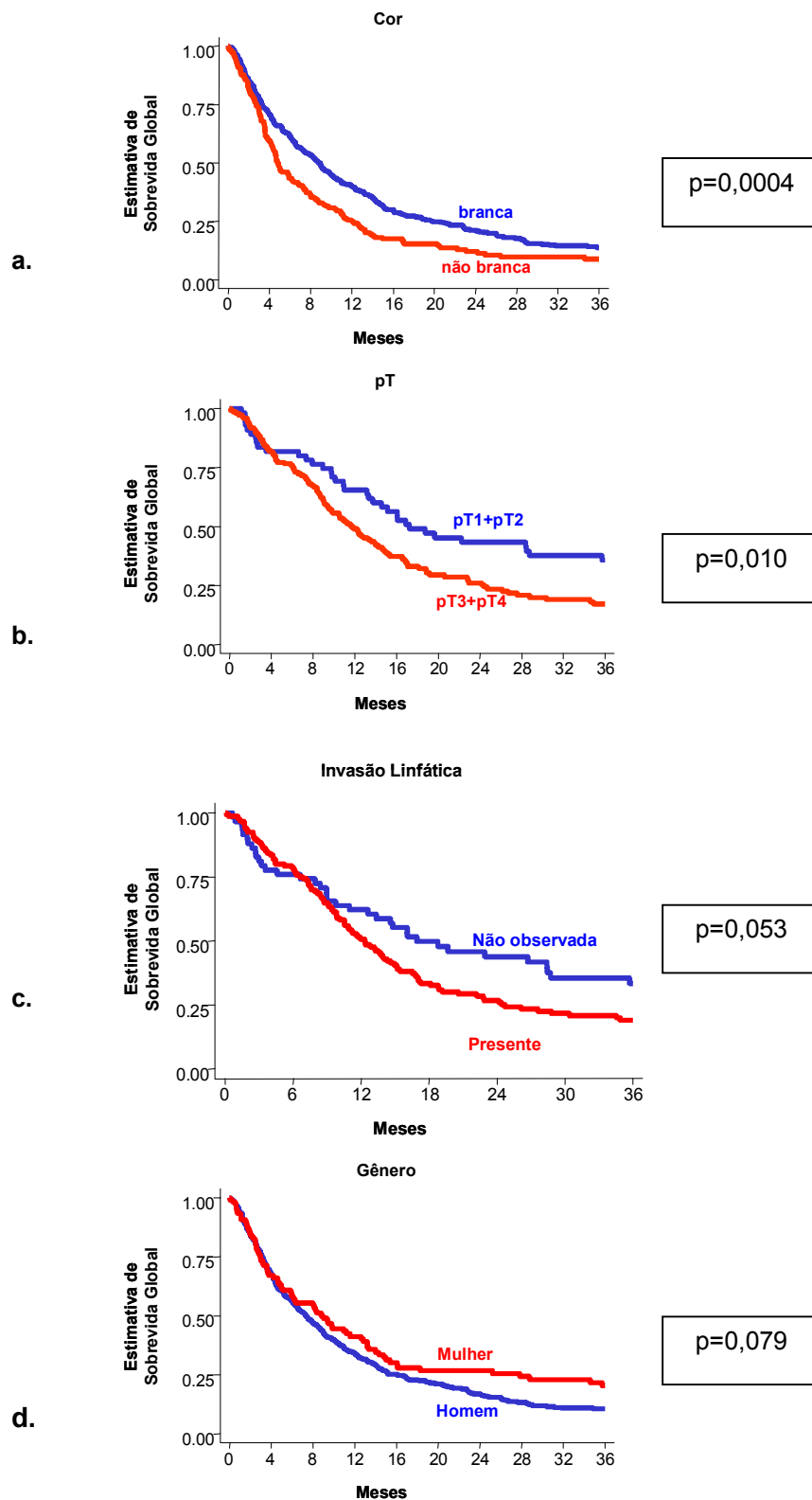


Figura 20 - Curvas de Sobrevida Global em 36 meses e sua associação com variáveis clínico-patológicas. (a) Cor; (b) pT; (c) Invasão Linfática e (d) Gênero.

4.3.4 Análise Multivariada

De acordo com a análise multivariada, apenas as variáveis pT ($p=0,030$) e gênero ($p=0,004$) permaneceram como fatores prognósticos independentes (Tabela 15). Apesar de cor, VEGF e ciclinas A, B1 e D1 tenham mostrado significância na análise univariada, essas variáveis não permaneceram como fatores prognósticos independentes na análise multivariada.

Como o nível de invasão só foi avaliado nos casos representados por peças cirúrgicas, o número de casos avaliados na análise multivariada ficou restrito a apenas um terço da casuística total ($n=204$). Diante disso, foi realizada análise multivariada em que a variável pT foi retirada das análises. Assim, ciclina D1 ($p<0,0001$), cor ($p=0,003$) e ciclina A ($p=0,023$) foram constatados como fatores prognósticos independentes (Tabela 16).

Tabela 15 - Análise multivariada, pelo modelo de regressão de Cox.

Variável	Categoria	HR (95% IC)	p valor
pT	T1+T2	1,0 (ref.)	0,030
	T3+T4	1,466 (1,038 – 2,070)	
Gênero	Feminino	1,0 (ref.)	0,004
	Masculino	1,872 (1,217 – 2,881)	

HR: Risco de óbito

IC: intervalo de confiança

Tabela 16 - Análise multivariada, pelo modelo de regressão de Cox, desconsiderando a variável pT das análises.

Variável	Categoria	HR (95% IC)	P valor
Ciclina D1	Negativo	1,0 (ref.)	0,079
	Positivo	1,214 (0,978- 1,508)	
	Positivo Forte	1,720 (1,305 – 2,266)	
Ciclina A	Negativo	1,0 (ref.)	0,472
	Positivo	1,121 (0,821 – 1,530)	
	Positivo Forte	1,504 (1,057 – 2,141)	
Cor	Branca	1,0 (ref.)	0,003
	Não Branca	1,364 (1,109 – 1,677)	

HR: Risco de óbito

IC: intervalo de confiança

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou a expressão imunoistoquímica de c-erbB-2, EGFR, ciclinas A, B1 e D1 e VEGF e suas correlações com dados clínico-patológicos em 613 casos de CEE.

Em nossa casuística, a maioria dos pacientes foi do sexo masculino, com média de idade de 59 anos. Esse valor mostrou estar um pouco abaixo da média encontrada por outros autores, que apresentaram valores variando de 63 a 67 anos (DALY et al. 2000; KUWANO et al. 2003). Em relação à cor, foi observada uma predominância de indivíduos de cor branca; porém, essa informação deve ser considerada com cautela, uma vez que a grande heterogeneidade étnica existente na população brasileira dificulta a classificação dos pacientes quanto a essa característica, já que não existe um critério bem definido que delimite cada etnia. Por esses motivos, para as análises estatísticas, foram considerados apenas dois grupos: os brancos e os não brancos, que incluem os negros, pardos e amarelos.

Em nosso estudo, a lesão foi mais freqüentemente encontrada no terço médio do esôfago (57,4%), seguido pelo terço superior (21,2%) e inferior (18%). Tais dados foram similares aos de KUWANO et al. (2003), que mostraram uma maior freqüência no terço médio do esôfago. No entanto, um estudo realizado por DALY et al. (2000) em cerca de 5000 casos de CEE, relatou que na maioria dos casos, a lesão encontra-se

geralmente no terço inferior do órgão. Tais discrepâncias entre os dados podem ser devido aos critérios utilizados para delimitação do esôfago, em cada terço do órgão.

Apesar dos avanços nas técnicas diagnósticas para CEE, os critérios para o estabelecimento do estadiamento ainda não estão bem definidos. Os métodos para verificar o status linfonodal (pN), principalmente através de esvaziamento linfonodal, não são totalmente confiáveis, uma vez que não permitem uma avaliação criteriosa e real do comprometimento linfonodal. Assim, muitas vezes ocorre o subestadiamento dos casos, o que não confere confiabilidade na avaliação prognóstica em CEE. No presente trabalho, não foram avaliados os fatores pN e estadiamento (TNM), devido a falta de dados referentes a comprometimento linfonodal, necessários para o estabelecimento de um estadiamento preciso e que represente o real estado prognóstico dos casos. Apenas o nível de infiltração (pT) foi utilizado nesse estudo, considerando somente a avaliação das peças cirúrgicas, que permitiu uma avaliação mais precisa da profundidade de invasão do tumor.

Baseados no grau histológico, grande parte dos casos estudados foram considerados como moderadamente diferenciados (49,1%), caracterizando tumores com comportamento menos agressivo. E, de acordo com o nível de infiltração (pT), a maioria apresentou perfil mais invasivo, atingindo a adventícia em cerca de 70%.

A análise da expressão imunoistoquímica dos receptores de fatores de crescimento epidérmico mostrou que cerca de 42% e 78% dos casos apresentaram expressão positiva para c-erbB-2 e EGFR, respectivamente.

Existem poucos trabalhos relacionando a expressão de c-erbB-2 e EGFR com o carcinoma epidermóide de esôfago, apresentando frequências discrepantes variando de 0 a 64% para c-erbB-2 (FRIESS et al. 1999; HARDWICK et al. 1997; LAM et al. 1998; SUO et al. 1995; SUWANAGOOL et al. 1993), e de 42,5 a 70% para EGFR (YANO et al. 1991; ITAKURA et al. 1994; FRIESS et al. 1999; INADA et al. 1999). Tal discrepância pode ser devido a diferenças na técnica imunoistoquímica, origens distintas dos anticorpos usados pelos diferentes autores ou, até mesmo, ao critério utilizado para classificação da expressão imunoistoquímica dessas proteínas e a categorização dos casos, com diferentes “cut-offs”. Nesse trabalho, nós levamos em consideração as regras do teste reconhecido pelo FDA, o HercepTest™ (DAKO).

Através de análises estatísticas em nossos dados, foi constatada correlação significativa entre a expressão de EGFR e c-erbB-2 e o grau histológico, em que casos considerados bem/moderadamente diferenciados expressaram ambos os marcadores mais freqüentemente do que os casos pouco diferenciados/indiferenciados. Nossos dados mostraram-se similares aos de ITAKURA et al. (1994), que observaram correlação significativa entre superexpressão de EGFR e grau histológico.

Outras correlações entre a expressão de EGFR e variáveis clínico-patológicas, como idade, gênero, sítio tumoral, invasões venosa e linfática, e sua influência na sobrevida global não se mostraram significativas nesse estudo, diferindo de outros autores que mostraram tais associações, embora estes sejam trabalhos abrangendo poucos casos, de constituição étnica

diferente e com resultados controversos (OZAWA et al. 1989; MUKAIDA et al. 1991; YANO et al. 1991; ITAKURA et al. 1994; INADA et al. 1999).

Há trabalhos que têm relatado que o padrão de distribuição da expressão de EGFR, classificados como padrão homogêneo/heterogêneo ou mosaico/difuso, está correlacionado com estadiamento, grau histológico, nível de invasão (ITAKURA et al. 1994), além de pN e sobrevida global (YANO et al. 1991; ITAKURA et al. 1994). Tal análise sobre o padrão de distribuição da expressão imunoistoquímica desse marcador e sua relação com prognóstico em CEE não foi realizada em nosso trabalho, uma vez que optamos pelo método similar ao padronizado para c-erbB-2.

Em relação a c-erbB-2, apenas LAM et al. (1998) verificaram a existência de correlação estatisticamente significativa entre essa proteína e grau de diferenciação, corroborando nossos resultados, apesar da baixa frequência de casos (10%) com superexpressão encontrada por esses autores.

Apesar da diferença não ter sido estatisticamente significativa, foi observado que c-erbB-2 foi mais expressa em casos em que a lesão encontrava-se no terço médio do esôfago. A explicação para tal associação pode estar mais relacionada à mera questão de distribuição do número de casos envolvidos do que a comportamento biológico da doença. Essa relação não foi observada em outros estudos com c-erbB-2, sendo que a maioria deles afirma que essa proteína não correlaciona-se com características clínico-patológicas, não influenciando no prognóstico de CEE (HARDWICK et al. 1997; FRIESS et al. 1999; WANG et al. 1999).

No que diz respeito à expressão de EGFR e c-erbB-2, acredita-se que a atividade descontrolada desses receptores esteja envolvida no desenvolvimento e progressão tumoral em CEE, estimulando a hiperproliferação das células epiteliais. A heterodimerização entre c-erbB-2 e os demais integrantes da família dos receptores de fatores de crescimento epidérmico, principalmente EGFR, proporciona uma indução mais potente para proliferação celular, contribuindo ao desenvolvimento tumoral (OLAYIOYE et al. 2000; ROWINSKY 2003; ROSKOSKI 2004).

Nossas análises mostraram a existência de correlação significativa entre a coexpressão de c-erbB-2 e EGFR ($p=0,0001$), em que casos com alta positividade para EGFR também apresentaram expressão de c-erbB-2, indicando a ação conjunta desses dois receptores como heterodímeros. Nossos dados foram diferentes aos apresentados por FRIESS et al. (1999), que não mostraram essa correlação significativa. Porém, o modo de análise dos resultados da expressão imunoistoquímica desses autores não foi semelhante ao nosso, o que poderia ter causado essa discrepância entre os dados.

Nossos dados mostraram associação entre a superexpressão de c-erbB-2 e EGFR com tumores mais diferenciados e, portanto, menos agressivos, sugerindo que a superexpressão dessas proteínas podem estar relacionadas a uma outra função biológica, que não a proliferação celular, como a indução de diferenciação celular ou a outro evento que possa estar ocorrendo concomitantemente à proliferação celular, mascarando o efeito proliferativo na população de células tumorais. Seriam necessárias análises

adicionais envolvendo outras proteínas, como o indicador de proliferação celular Ki-67 e outras relacionadas a processos que possam estar associadas à expressão desses receptores, além de estudos de amplificação gênica através de hibridização *in situ*, para a melhor compreensão do papel dessas proteínas na carcinogênese de CEE.

Ainda, existem indícios de que a superexpressão de EGFR estaria associada a hiperproliferação em estágios pré-malignos e precoces de CEE (ANDL et al. 2003), não sendo tão relevantes para a avaliação prognóstica em casos mais avançados, como mostram nossos resultados. Entretanto, seria necessária a análise de lesões precursoras de CEE para a verificação de tal associação, o que não foi realizada no presente trabalho.

A regulação do ciclo celular parece ser fator primordial para manutenção da proliferação celular e a alteração de proteínas envolvidas no ciclo celular é freqüente em diferentes tumores. Desse modo, a alteração na atuação de umas das ciclinas pode levar a proliferação descontrolada das células. Em nosso estudo, foi observado que 89% dos pacientes mostraram expressão positiva de ciclina A, subdivididos em positivos (60,8%) e positivos fortes (28,1%). Tais dados diferem de alguns dados da literatura, que mostram freqüências relativamente baixas (23 – 55,6%) (FURIHATA et al. 1996; YASUNAGA et al. 2000; NOZOE et al. 2002a). No entanto, nossos dados mostraram-se próximos aos de CHETTY e SIMELANE (1999), que observaram uma porcentagem de 94% de casos com marcação positiva.

Não foram verificadas diferenças significativas entre os aspectos clínico-patológicos analisados e ciclina A, concordando com os estudos

realizados por CHETTY e SIMELANE (1999) e NOZOE et al. (2002a). Entretanto, existem trabalhos mostrando correlações não constatadas no presente estudo, entre a superexpressão desse marcador, pT (YASUNAGA et al. 2000) e estadiamento (FURIHATA et al. 1996).

Em relação à sobrevida global, nossas análises mostraram associação significativa entre ciclina A e as estimativas de sobrevida cumulativa, em que casos considerados positivos para esse marcador, principalmente os positivos fortes, apresentaram menores taxas de sobrevida global do que os casos negativos. Isso pôde ser observado na análise abrangendo todo o período de seguimento ($p=0,0001$) e melhor evidenciado na análise nos “end-points” de 12 ($p=0,0001$), 24 ($p=0,0002$) e 36 meses ($p<0,0001$), sugerindo que a análise da expressão dessa proteína poderia ser utilizada como indicador de pior prognóstico, auxiliando na escolha de tratamento mais indicado. Essa influência da superexpressão de ciclina A na sobrevida global também foi verificada por FURIHATA et al. (1996), reforçando a idéia de que esse marcador pode ser utilizado como indicador prognóstico em CEE.

Sobre a ciclina B1, o presente estudo verificou que, aproximadamente, 53% dos pacientes mostraram ser positivos para expressão dessa proteína, dos quais 23,6% foram positivos e 29%, positivos fortes. Esse resultado é similar ao observado em outros estudos, que detectaram positividade para essa proteína em 49,3% (TAKENO et al. 2002) e 56,7% dos casos (NOZOE et al. 2002b). Já MURAKAMI et al. (1999) observaram uma freqüência mais elevada de casos positivos para ciclina B1

(72,4%). Isso poderia ser explicado pelos parâmetros utilizados para a classificação da expressão desse marcador, no qual foi considerado um “cut-off” relativamente baixo de 5% de células tumorais marcadas, quando comparado ao “cut-off” de 10% utilizado no presente trabalho.

Embora os resultados relacionados a ciclina B1 aqui apresentados estejam baseados na marcação citoplasmática nas células tumorais, algumas células com marcação nuclear foram observadas durante nossas análises, principalmente entre as células em processo de mitose. Tais dados encontram justificativa na literatura, que relatam que essa proteína encontra-se no citoplasma das células neoplásicas durante a intérfase, sendo transportadas para o núcleo no início da fase mitótica (VERMEULEN et al. 2003; MURRAY et al. 2004). No presente estudo, não foi possível verificar a existência de correlação estatística entre os casos que apresentaram marcação nuclear para ciclina B1, devido ao baixo número de casos. Entretanto, existem dados que indicam que casos com expressão nuclear dessa proteína mostram pior prognóstico em relação aos com marcação citoplasmática (NOZOE et al. 2002b).

Quanto as variáveis clínico-patológicas, nossas análises mostraram correlação estatisticamente significativa entre a ausência de expressão de ciclina B1 e pT ($p=0,033$), em que casos mais invasivos (pT3/pT4) não apresentaram superexpressão dessa proteína. Foi verificado, também, que casos negativos apresentaram invasão linfática com maior frequência ($p=0,006$). Tais achados não encontram reforços na literatura e ainda discordam de outros dois trabalhos, que mostraram o inverso de nossos

resultados, em que a superexpressão de ciclina B1 está associada a tumores mais invasivos e com presença de invasão linfonodal (MURAKAMI et al. 1999; TAKENO et al. 2002).

Embora nossos dados indiquem que a superexpressão de ciclina B1 não estaria conferindo uma maior agressividade ao comportamento tumoral em CEE, foi verificado que a alta positividade para ciclina B1 está associada estatisticamente com pior prognóstico ($p=0,014$), mostrando menores taxas de sobrevida global do que os casos considerados negativos para esse marcador. Tal relação também foi constatada nos “end-points” de 12 ($p=0,009$), 24 ($p=0,004$) e 36 meses ($p=0,004$). Esses dados sugerem um valor prognóstico para ciclina B1, de modo semelhante a ciclina A, indicando pior prognóstico aos pacientes com superexpressão dessa proteína, sendo confirmado por outros trabalhos existentes na literatura (MURAKAMI et al. 1999; NOZOE et al. 2002b; TAKENO et al. 2002).

Vale lembrar que nível de invasão e invasão linfática foram avaliadas somente nos casos representados por peças cirúrgicas, restringindo a nossa amostra durante as análises de correlação envolvendo essas duas variáveis; enquanto que a avaliação de sobrevida global abrangeu toda a casuística envolvida nesse estudo, o que poderia ter gerado tais resultados, aparentemente, contraditórios. Além disso, outro fator que poderia ser levado em consideração é o critério utilizado para análise da expressão imunoistoquímica de ciclina B1 e a avaliação de presença de invasão linfática, que podem não ter sido os mais adequados para esse estudo.

Baseado no que já se conhece a respeito da atividade da ciclina B1 no ciclo celular, acredita-se que níveis elevados dessa proteína poderiam estar descontrolando a progressão da fase mitótica, além de poder desregular a degradação de ciclinas por proteólise dependente de APC, e assim, potencializar a estimulação para proliferação celular. No entanto, nossos resultados não ajudaram a esclarecer o papel da ciclina B1 na carcinogênese em CEE.

Nossas análises verificaram que cerca de 51% dos casos apresentaram superexpressão de ciclina D1, sendo 33% positivos e 17,9% positivos fortes. Tal frequência é similar ao observado em dois trabalhos anteriores, que mostraram 56,5-58% dos casos com superexpressão dessa proteína (LIN et al. 2004; SUNPAWERA VONG et al. 2005). Entretanto, diferentemente de nosso trabalho, frequências relativamente mais baixas, 17-40,5%, têm sido relatadas por outros autores (TAKEUCHI et al. 1997; ANAYAMA et al. 1998; MATSUMOTO et al. 2000; IKEGUCHI et al. 2001; Anonymus 2001; GÜNER et al. 2003), assim como taxas mais elevadas de 66-72,7% (IKEDA et al. 1999; SARBIA et al. 1999). Critérios distintos de avaliação da expressão protéica, uso de diferentes anticorpos e protocolos de imunoistoquímica poderiam justificar essa discordância entre os dados.

Embora a grande maioria dos casos tenha apresentado expressão nuclear para ciclina D1, foram observadas algumas células com marcação citoplasmática. Tais marcações podem estar representando moléculas de ciclina D1 translocadas para o citoplasma, em direção a sua degradação proteossomal (COQUERET 2002).

Análises de correlação entre a superexpressão de ciclina D1 e características clínico-patológicas foram realizadas no presente estudo, sendo verificadas diferenças significativas relacionadas à cor dos pacientes ($p=0,026$). De acordo com esses resultados, indivíduos de cor branca apresentam mais freqüentemente maior imunoreatividade para ciclina D1. Contudo, não existem dados na literatura que tenham relatado a existência dessa correlação e que possam fornecer alguma explicação biológica para esse comportamento.

No presente trabalho, foi observado que casos positivos para expressão de ciclina D1 foram mais freqüentes em tumores considerados bem/moderadamente diferenciados; porém, tal diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,070$). Há dados de outro estudo que mostraram correlação significativa entre a superexpressão dessa proteína e tumores menos diferenciados (SARBIA et al. 1999), enquanto há relatos da existência de correlação com tumores mais diferenciados (Anonymus 2001).

Em relação à sobrevida global, nossas análises mostraram que casos com expressão positiva de ciclina D1, especialmente a positiva forte, influenciam negativamente as curvas de sobrevida global, no período total de seguimento dos casos ($p=0,0001$) e nos períodos de 1, 2 e 3 anos ($p<0,0001$), sugerindo a utilização desse marcador como indicador de pior prognóstico. Tais dados encontram suporte em outros trabalhos da literatura (TAKEUCHI et al. 1997; ANAYAMA et al. 1998; SARBIA et al. 1999; IKEGUCHI et al. 2001; IMAMURA et al. 2001; GÜNER et al. 2003).

Existem trabalhos ainda que não constataram importância prognóstica para a expressão imunistoquímica de ciclina D1; no entanto, deve-se levar em consideração a casuística relativamente baixa utilizada nesses estudos (IKEDA et al. 1999; LIN et al. 2004; SUNPAWERA VONG et al. 2005).

Em nosso trabalho, foi verificada correlação estatisticamente significativa entre a coexpressão das três ciclinas estudadas ($p=0,0001$). Como mencionado anteriormente, a ciclina D1 está envolvida no controle de transcrição de genes necessários para a fase S, como a ciclina A (FU et al. 2004; DESHPANDE et al. 2005), justificando nossos dados, em que cerca de 95% dos casos positivos para a ciclina D1 mostraram coexpressão com a ciclina A. Há indícios de que a ciclina A atue na transição para a fase mitótica, atuando nessa fase, juntamente com a ciclina B1 (YAM et al. 2002; VERMEULEN et al. 2003). Esses dados podem justificar nossos resultados, que mostraram a existência de correlação significativa entre a coexpressão dessas duas proteínas. Além disso, foi constatado que cerca de 64% dos casos com superexpressão de ciclina D1 apresentaram coexpressão de ciclina B1, sendo esta associação significativa, sugerindo que as três ciclinas aqui estudadas estão intimamente relacionadas no processo carcinogênico em CEE. De nosso conhecimento, não existem outros trabalhos na literatura que tenham realizado estudos entre as três ciclinas em CEE.

No presente estudo, foi verificada também correlação significativa entre a coexpressão de EGFR/ciclina D1 ($p=0,001$) e c-erbB-2/ciclina D1 ($p=0,015$). Tais correlações encontram suporte na literatura, que indicam que a expressão de ciclina D1 é dependente de sinais extracelulares

induzidas por fatores de crescimento, através dos receptores como EGFR e c-erbB-2, que também apresentaram superexpressão no presente trabalho (COQUERET 2002; VERMEULEN et al. 2003; FU et al. 2004). SUNPAWERA VONG et al. (2005) mostraram resultados diferentes, sendo que não verificaram significância estatística entre a coexpressão dos três marcadores em 55 casos de CEE, uma casuística relativamente pequena quando comparada ao número de casos aqui analisado.

Foi constatada uma tendência a significância para a correlação entre a coexpressão de ciclina B1 e EGFR ($p=0,051$). De nosso conhecimento, não existem resultados semelhantes na literatura.

A existência de correlação estatisticamente significativa entre a coexpressão de VEGF com as ciclinas A, B1 e D1 foi observada em nossas análises. Entretanto, não foram encontrados resultados semelhantes na literatura.

A ciclina D1 está envolvida, principalmente, na estimulação da proliferação celular através da transcrição de genes necessários na transição da fase G1-S, permitindo a progressão do ciclo celular, sendo que alterações relacionadas a ciclina D1 podem levar a proliferação descontrolada das células (FU et al. 2004; MURRAY 2004; DESHPANDE et al. 2005). No entanto, nossos dados mostram que a superexpressão dessa proteína “tende” a ocorrer mais freqüentemente em casos menos invasivos ($p=0,070$), de modo semelhante ao que ocorre com c-erbB-2 e EGFR. Conforme discutido anteriormente, tais dados podem sugerir que essas proteínas podem estar envolvidas em outros processos celulares, como

diferenciação celular, ao invés de ou que possam estar ocorrendo concomitantemente à proliferação celular, de modo que a população de células tumorais resultante tenham um caráter menos invasivo, dando a falsa idéia de estar ocorrendo baixas taxas de atividade proliferativa. Entretanto, estudos envolvendo outras proteínas relacionadas a esses processos celulares seriam necessários para verificar essa hipótese.

Um ponto a ser discutido em relação à expressão das ciclinas diz respeito aos critérios para classificação da expressão imunoistoquímica, pois ainda não existe um consenso entre os trabalhos existentes relacionados a essas proteínas. De modo semelhante ao nosso trabalho, dois estudos realizaram a análise da expressão das ciclinas A (NOZOE et al. 2002a) e D1 (GÜNER et al. 2003) considerando tanto a frequência de células tumorais marcadas quanto à intensidade do padrão de marcação. No entanto, os critérios utilizados para categorização dos casos foram distintos aos nossos. Diferentemente de nosso trabalho, muitos autores levam em consideração somente a frequência das células tumorais marcadas, com “cut-offs” variando de 1-25% (NAKAGAWA et al. 1995; TAKEUCHI et al. 1997; ANAYAMA et al. 1998; CHETTY e SIMELANE 1999; IKEDA et al. 1999; MORGAN et al. 1999; SARBIA et al. 1999; MATSUMOTO et al. 2000; YASUNAGA et al. 2000; IKEGUCHI et al. 2001; Anonymus 2001; NAKAJIMA et al. 2002; TAKENO et al. 2002; LIN et al. 2004; WU et al. 2004; SUNPAWERAVONG et al. 2005). Baseados ainda na frequência, MURAKAMI et al. (1999) e NOZOE et al. (2002b) classificam o padrão de expressão em homogêneo/heterogêneo e nuclear/citoplasmática,

respectivamente. Diante disso, o uso de critérios distintos para a classificação da expressão imunoistoquímica pelos diferentes autores pode explicar a existência de resultados controversos, dificultando a comparação dos dados existentes na literatura e, conseqüentemente, a compreensão do papel dessas proteínas no desenvolvimento tumoral em CEE.

A angiogênese desempenha importante papel na progressão tumoral por proporcionar nutrientes que mantêm a sobrevivência das células tumorais, permitindo seu crescimento e facilitando sua disseminação (VEIKKOLA et al. 2000).

Os resultados aqui apresentados mostraram que 74% dos casos foram positivos para expressão de VEGF. Esta freqüência se mostrou mais elevada em relação à apresentada na literatura, que varia de 23,9-59,7% (INOUE et al. 1997; KITADAI et al. 1998; SHIH et al. 2000; KOIDE et al. 2001; OGATA et al. 2003). A exemplo dos outros marcadores estudados, essa discrepância pode ser devido à utilização de diferentes anticorpos e protocolos de reação imunoistoquímica. Os critérios utilizados nesse estudo para a análise da expressão imunoistoquímica foram semelhantes aos de KOIDE et al. (2001) e de OGATA et al. (2003), considerando positivos os casos que apresentaram mais de 10% das células tumorais marcadas; enquanto que outros estudos têm levado em consideração valores maiores, como 30% (INOUE et al. 1997; KITADAI et al. 1998) e até 80% (SHIH et al. 2000).

De acordo com nossas análises, não foram verificadas correlações com significância estatística entre a superexpressão de VEGF e as

características clínico-patológicas estudadas. Nesse aspecto, nossos dados mostraram-se diferentes aos já existentes na literatura, que relatam a existência de associações significativas entre VEGF e nível de invasão, grau histológico, invasão vascular, metástases à distância e linfonodal e estadiamento (INOUE et al. 1997; KITADAI et al. 1998; SHIH et al. 2000; KOIDE et al. 2001; OGATA et al. 2003). Com os resultados obtidos, não foi possível avaliar o envolvimento de VEGF nos mecanismos carcinogênicos em CEE.

Em relação à sobrevida global, nossos dados mostraram que casos positivos para VEGF apresentaram taxas de sobrevida cumulativa significativamente menores do que os VEGF-negativos ($p=0,002$), assim como as curvas de sobrevida global nas análises em 24 ($p=0,027$) e 36 meses ($p=0,007$). Houve uma tendência a significância estatística em relação à taxa de sobrevida global no “end-point” de 12 meses ($p=0,068$). Tais dados podem indicar que a expressão de VEGF pode ser considerada um indicador prognóstico em casos de CEE, apesar desse marcador não ter se mantido como fator prognóstico independente na análise multivariada. Outros estudos também têm relatado associação significativa entre VEGF e sobrevida global (INOUE et al. 1997; KITADAI et al. 1998; SHIH et al. 2000; KOIDE et al. 2001; OGATA et al. 2003). Entretanto, alguns desses trabalhos mostram resultados diferentes quanto à análise multivariada, sugerindo um valor prognóstico independente para VEGF (INOUE et al. 1997; SHIH et al. 2000; OGATA et al. 2003).

Como discutido anteriormente, foi verificada significância estatística para a coexpressão de VEGF e ciclinas A, B1 e D1. Nossos resultados mostraram não haver correlação significativa entre a coexpressão de VEGF e os receptores de fatores de crescimento, c-erbB-2 e EGFR, embora haja indícios de que esses receptores estejam envolvidos na regulação da expressão de VEGF (PETIT et al. 1997; CHAROENRAT et al. 2002).

A análise de sobrevida global mostrou taxas consideravelmente baixas. Pode ser observado que em apenas dois anos, a estimativa de sobrevida global é de apenas 19,3%, caindo para 8% no período de cinco anos. Tal resultado pode ser justificado por se tratar de um tumor geralmente em estadio avançado no momento do diagnóstico, sem condições de terapia curativa ou alta incidência de recidivas após o tratamento. Diante de tais dados, realizamos análises de sobrevida global nos “end-points” de 1, 2 e 3 anos com a finalidade de procurar algum indicador prognóstico que possa diferenciar os casos com perspectivas de melhor prognóstico.

A avaliação da influência das variáveis clínico-patológicas na sobrevida global, em todo o período de seguimento, mostrou que gênero masculino ($p=0,044$), cor não branca ($p=0,005$) e pT avançado ($p=0,021$) são indicadores de pior prognóstico. Entretanto, a correlação significativa entre gênero e sobrevida global não se manteve nos “end-points” de 12 e 24 meses, embora tenha apresentado tendência a significância em 36 meses. A associação permaneceu significativa entre cor e sobrevida global nos três “end-points” considerados, enquanto que pT manteve sua associação significativa em 24 e 36 meses, tendendo a significância no período de 12

meses ($p=0,059$). Apesar de não ter apresentado associação significativa na análise de sobrevida global convencional, o fator grau histológico mostrou ser um indicador prognóstico no “end-point” de 12 meses ($p=0,048$) e foi observado que associação entre a presença de invasão linfática e menores estimativas de sobrevida cumulativa tende a significância nos “end-points” de 24 ($p=0,062$) e 36 meses ($p=0,053$).

Conforme citado anteriormente, superexpressão de VEGF ($p=0,002$) e ciclinas A ($p=0,0001$), B1 ($p=0,014$) e D1 ($p=0,0001$) também mostraram menores estimativas de sobrevida cumulativa. E tais associações também foram verificadas nas análises de sobrevida global nos três “end-points”, sugerindo a utilização desses marcadores como indicadores prognósticos em casos de CEE.

Na análise multivariada, apenas as variáveis pT e gênero permaneceram como fatores prognósticos independentes. Porém, ao considerar nível de infiltração nas análises, essa avaliação ficou restrita somente aos casos representados por peças cirúrgicas, que compõem cerca de um terço da amostra total envolvida nesse trabalho, o que poderia comprometer a avaliação de toda a casuística. Desconsiderando pT da análise multivariada, ciclinas D1 e A e cor dos indivíduos se mantiveram como fatores prognósticos independentes.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

No presente estudo, verificamos superexpressão de todos os marcadores analisados em considerável proporção dos casos analisados, mostrando algumas correlações significativas com as variáveis clínico-patológicas avaliadas, que podem auxiliar no entendimento do papel dessas proteínas na carcinogênese de CEE.

- 1) A expressão de c-erbB-2, EGFR e ciclina D1 (tendendo a significância) apresentou correlação com tumores mais diferenciados, conferindo um comportamento menos agressivo, podendo estar associados a outra função biológica, como a diferenciação celular, além da proliferação celular.
 - 2) Não foram verificadas correlações significativas entre a superexpressão de ciclina A e VEGF e as variáveis clínico-patológicas avaliadas, não sendo possível avaliar a colaboração dessas proteínas na progressão tumoral em CEE.
 - 3) A análise da expressão de ciclina B1 mostrou resultados contraditórios aos existentes na literatura, indicando que a negatividade para essa proteína esteve mais associada a casos com invasão mais profunda e com invasão linfática presente, não permitindo esclarecer sua relação com a carcinogênese nesse tumor. Tais dados ainda nos levam a sugerir que os critérios utilizados para análise de expressão dessa proteína precisam ser reavaliados.
-

- 4) Na análise univariada, as variáveis gênero, cor e pT e os marcadores VEGF e ciclinas A, B1 e D1 foram considerados indicadores de pior prognóstico. No entanto, na análise multivariada, apenas pT e gênero permaneceram com valor prognóstico. Quando a categoria pT foi desconsiderada dessas análises, ciclinas D1, ciclina A e cor foram consideradas fatores prognósticos independentes.
 - 5) Nas análises de sobrevida global considerando os “end-points” de 12, 24 e 36 meses, foi verificado que VEGF, ciclinas A, B1 e D1, além de cor e pT, podem ser utilizados como indicadores de pior prognóstico. E, adicionalmente, o grau histológico pode ser considerado para avaliar o prognóstico nos 12 primeiros meses, após o diagnóstico.
-

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

[Anonymus] Prognostic significance of Cyclin D1 and E-Cadherin in patients with esophageal squamous cell carcinoma: multiinstitutional retrospective analysis. Research Committee on Malignancy of Esophageal Cancer, Japanese Society for Esophageal Diseases. **J Am Coll Surg** 2001; 192:708-18.

Anayama T, Furihata M, Ishikawa T, Ohtsuki Y, Ogoshi S. Positive correlation between p27Kip1 expression and progression of human esophageal squamous cell carcinoma. **Int J Cancer** 1998; 79:439-43.

Andl CD, Mizushima T, Nakagawa H, et al. Epidermal growth factor receptor mediates increased cell proliferation, migration, and aggregation in esophageal keratinocytes in vitro and in vivo. **J Biol Chem** 2003; 278:1824-30.

Campbell F, Bogomoletz WV, Williams GT. **Diagnostic histopathology of tumors**. 2nd ed. London: Churchill Livingstone; 2000. Tumor of the esophagus and stomach; p.313-8.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature** 2000; 407:249-57.

Casalini P, Iorio MV, Galmozzi E, Menard S. Role of HER receptors family in development and differentiation. **J Cell Physiol** 2004; 200:343-50.

Chang F, Syrjanen S, Shen Q, Wang L, Syrjanen K. Screening for human papillomavirus infections in esophageal squamous cell carcinomas by in situ hybridization. **Cancer** 1993; 72:2525-30.

Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Archer DJ, Eccles SA. C-erbB receptors in squamous cell carcinomas of the head and neck: clinical significance and correlation with matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factors. **Oral Oncol** 2002; 38:73-80.

Chetty R, Simelane S. p53 and cyclin A protein expression in squamous carcinoma of the oesophagus. **Pathol Oncol Res** 1999; 5:193-6.

Chino O, Kijima H, Shimada H, et al. Clinicopathological studies of esophageal carcinoma in achalasia: analyses of carcinogenesis using histological and immunohistochemical procedures. **Anticancer Res** 2000; 20:3717-22.

Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. **Semin Thromb Hemost** 2000; 26:561-9.

Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. **Gene** 2002; 299:35-55.

Daly JM, Fry WA, Little AG, et al. Esophageal Cancer: results of an American College of Surgeons care evaluation study. **J Am Coll Surg** 2000; 190:562-72.

Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. **Oncogene** 2005; 24:2909-15.

Dietz J, Pardo SH, Furtado CD, Harzheim E, Furtado AD. [Risk factors related to esophageal cancer in Rio Grande do Sul, Brazil]. **Rev Assoc Med Bras** 1998; 44:269-72.

Engel LS, Chow WH, Vaughan TL, et al. Population attributable risks of esophageal and gastric cancers. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:1404-13.

Friess H, Fukuda A, Tang WH, et al. Concomitant analysis of the epidermal growth factor receptor family in esophageal cancer: overexpression of epidermal growth factor receptor mRNA but not of c-erbB-2 and c-erbB-3. **World J Surg** 1999; 23:1010-8.

Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. **Endocrinology** 2004; 145:5439-47.

Fujita H, Kakegawa T, Yamana H, et al. Mortality and Morbidity rates, postoperative course, quality of life and prognosis after extended radical lymphadenectomy for esophageal cancer. **Ann Surg** 1995; 222: 645-62.

Furihata M, Ishikawa T, Inoue A, et al. Determination of the prognostic significance of unscheduled cyclin: a overexpression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 1996; 2:1781-5.

Güner D, Sturm I, Hemmati P, et al. Multigene analysis of Rb pathway and apoptosis control in esophageal squamous cell carcinoma identifies patients with good prognosis. **Int J Cancer** 2003; 103:445-54.

Hardwick RH, Barham CP, Ozua P, et al. Immunohistochemical detection of p53 and c-erbB-2 in oesophageal carcinoma; no correlation with prognosis. **Eur J Surg Oncol** 1997; 23:30-5.

Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2004; 59:21-6.

Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **J Clin Oncol** 2005; 23:1011-27.

Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. **Lab Invest** 2001; 81:1331-8.

Hsu FD, Nielsen TO, Alkushi A, et al. Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry. **Mod Pathol** 2002; 15:1374-80.

Huang JX, Yan W, Song ZX, et al. Relationship between proliferative activity of cancer cells and clinicopathological factors in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **World J Gastroenterol** 2005; 11:2956-9.

Ikedo G, Isaji S, Chandra B, Watanabe M, Kawarada Y. Prognostic significance of biologic factors in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Cancer** 1999; 86:1396-405.

Ikeguchi M, Sakatani T, Ueta T, Kaibara N. Cyclin D1 expression and retinoblastoma gene protein (pRB) expression in esophageal squamous cell carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol** 2001; 127:531-6.

Inada S, Koto T, Futami K, Arima S, Iwashita A. Evaluation of malignancy and the prognosis of esophageal cancer based on an immunohistochemical study (p53, E-cadherin, epidermal growth factor receptor). **Surg Today** 1999; 29:493-503.

Inoue K, Ozeki Y, Suganuma T, Sugiura Y, Tanaka S. Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal squamous cell carcinoma. Association with angiogenesis and tumor progression. **Cancer** 1997; 79:206-13.

Itakura Y, Sasano H, Shiga C, et al. Epidermal growth factor receptor overexpression in esophageal carcinoma: an immunohistochemical study correlated with clinicopathologic findings and DNA amplification. **Cancer** 1994; 74:795-804.

Kanda Y, Nishiyama Y, Shimada Y, et al. Analysis of gene amplification and overexpression in human esophageal-carcinoma cell lines. **Int J Cancer** 1994; 58:291-7.

Kitadai Y, Haruma K, Tokutomi T, et al. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas. **Clin Cancer Res** 1998; 4:2195-200.

Koide N, Nishio A, Hiraguri M, Hanazaki K, Adachi W, Amano J. Coexpression of vascular endothelial growth factor and p53 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Am J Gastroenterol** 2001; 96:1733-40.

Kuwano H, Nakajima M, Miyazaki T, Kato H. Distinctive clinicopathological characteristics in esophageal squamous cell carcinoma. **Ann Thorac Cardiovasc Surg** 2003; 9:6-13.

Lam KY, Tin L, Ma L. C-erbB-2 protein expression in oesophageal squamous epithelium from oesophageal squamous cell carcinomas, with special reference to histological grade of carcinoma and pre-invasive lesions. **Eur J Surg Oncol** 1998; 24:431-5.

Lehrbach DM, Nita ME, Cecconello I. Molecular aspects of esophageal squamous cell carcinoma carcinogenesis. **Arq Gastroenterol** 2003; 40:256-61.

Lewin KJ, Appelman HD. **Atlas of tumor pathology "Tumors of the esophagus and stomach**. Washington DC: AFIP Armed Forces Institute of Pathology; 1995; 5-83.

Lin J, Beerm DG. Molecular biology of upper gastrointestinal malignancies. **Semin Oncol** 2004; 31:476-86.

Lin YC, Wu MY, Li DR, Wu XY, Zheng RM. Prognostic and clinicopathological features of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin,

gamma-catenin and cyclin D1 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. **World J Gastroenterol** 2004; 10:3235-9.

Mandard AM, Hainaut P, Hollstein M. Genetic steps in the development of squamous cell carcinoma of the esophagus. **Mutat Res** 2000; 462:335-42.

Marger RS, Marger D. Carcinoma of the esophagus and tylosis: a lethal genetic combination. **Cancer** 1993; 72:17-9.

Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2004; 58:903-13.

Matsumoto M, Natsugoe S, Nakashima S, et al. Clinical significance of lymph node micrometastasis of pN0 esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Lett** 2000; 153:189-97.

Milanes-Yearsley M, Hammond ME, Pajak TF, et al. Tissue microarray: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups. Mod Pathol 2002; 15:1366-73.

Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2005: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2004.

Moch H, Kononen T, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? **Adv Anat Pathol** 2001; 8:14-20.

Morgan RJ, Newcomb PV, Hardwick RH, Alderson D. Amplification of cyclin D1 and MDM-2 in oesophageal carcinoma. **Eur J Surg Oncol** 1999; 25:364-7.

Mukaida H, Toi M, Hirai T, Yamashita Y, Toge T. Clinical significance of the expression of epidermal growth factor and its receptor in esophageal cancer. **Cancer** 1991; 68:142-8.

Murakami H, Furihata M, Ohtsuki Y, Ogoshi S. Determination of the prognostic significance of cyclin B1 overexpression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Virchows Arch** 1999; 434:153-8.

Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. **Cell** 2004; 116:221-34.

Nakagawa H, Zukerberg L, Togawa K, Meltzer SJ, Nishihara T, Rustgi AK. Human cyclin D1 oncogene and esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer** 1995; 76:541-9.

Nakagawa S, Kanda T, Kosugi S, Ohashi M, Suzuki T, Hatakeyama K. Recurrence pattern of squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus after extended radical esophagectomy with three-field lymphadenectomy. **J Am Coll Surg** 2004; 198:205-11.

Nakajima Y, Nagai K, Miyake S, Ohashi K, Kawano T, Iwai T. Evaluation of an indicator for lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma invading the submucosal layer. **Jpn J Cancer Res** 2002; 93:305-12.

Nozoe T, Korenaga D, Futatsugi M, Saeki H, Ohga T, Sugimachi K. Cyclin A expression in superficial squamous cell carcinoma of the esophagus and coexisting infiltrated lymphocyte follicle. **Cancer Lett** 2002a; 188:221-9.

Nozoe T, Korenaga D, Kabashima A, Ohga T, Saeki H, Sugimachi K. Significance of cyclin B1 expression as an independent prognostic indicator of patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. **Clin Cancer Res** 2002b; 8:817-22.

Ogata Y, Fujita H, Yamana H, Sueyoshi S, Shirouzu K. Expression of vascular endothelial growth factor as a prognostic factor in node-positive

squamous cell carcinoma in the thoracic esophagus: long-term follow-up study. **World J Surg** 2003; 27:584-9.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. **EMBO J** 2000; 19:3159-67.

Ozawa S, Ueda M, Ando N, Shimizu N, Abe O. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in esophageal squamous cell carcinomas. **Cancer** 1989; 63:2169-73.

Petit AM, Rak J, Hung MC, et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. **Am J Pathol** 1997; 151:1523-30.

Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Olsen DA, Provost E. Amplification of tissue by construction of tissue microarrays. **Exp Mol Pathol** 2001; 70:255-64.

Rosai J. **Surgical pathology**. 9th ed. London: Mosby Elsevier; 2004. Gastrointestinal tract; p.615-47.

Roskoski R, Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 2004; 319:1-11.

Rowinsky EK. Signal events: Cell signal transduction and its inhibition in cancer. **Oncologist** 2003; 8 Suppl 3:5-17.

Sagar PM. Aetiology of cancer of the oesophagus: geographical studies in the footsteps of Marco Polo and beyond. **Gut** 1989; 30:561-4.

Sarbia M, Stahl M, Fink U, et al. Prognostic significance of cyclin D1 in esophageal squamous cell carcinoma patients treated with surgery alone or combined therapy modalities. **Int J Cancer** 1999; 84:86-91.

Shih CH, Ozawa S, Ando N, Ueda M, Kitajima M. Vascular endothelial growth factor expression predicts outcome and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Clin Cancer Res** 2000; 6:1161-8.

Shinozaki H, Ozawa S, Ando N, et al. Cyclin D1 amplification as a new predictive classification for squamous cell carcinoma of the esophagus, adding gene information. **Clin Cancer Res** 1996; 2:1155-61.

Simon R, Sauter G. Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors. **Exp Hematol** 2002; 30:1365-72.

Sobin LH, Wittekind Ch. **TNM. Classificação de tumores malignos**. 6 ed Trad. de Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA; 2004. Tumores do aparelho digestivo: esofago; p.64-8.

Sunpaweravong P, Sunpaweravong S, Puttawibul P, et al. Epidermal growth factor receptor and cyclin D1 are independently amplified and overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol** 2005; 131:111-9.

Suo Z, Su W, Holm R, Nesland JM. Lack of expression of c-erbB-2 oncoprotein in human esophageal squamous cell carcinomas. **Anticancer Res** 1995; 15:2797-8.

Suwanagool P, Parichatikanond P, Maeda S. Expression of c-erbB-2 oncoprotein in primary human tumors: an immunohistochemistry study. **Asian Pac J Allergy Immunol** 1993; 11:119-22.

Tachibana M, Kinugasa S, Yoshimura H, et al. Clinical outcomes of extended esophagectomy with three-field lymph node dissection for esophageal squamous cell carcinoma. **Am J Surg** 2005; 189:98-109.

Takeno S, Noguchi T, Kikuchi R, Uchida Y, Yokoyama S, Muller W. Prognostic value of cyclin B1 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer** 2002; 94:2874-81.

Takeuchi H, Ozawa S, Ando N, et al. Altered p16/MTS1/CDKN2 and cyclin D1/PRAD-1 gene expression is associated with the prognosis of squamous cell carcinoma of the esophagus. **Clin Cancer Res** 1997; 3:2229-36.

Torzewski M, Sarbia M, Verreet P, et al. The prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in squamous cell carcinomas of the oesophagus. **Anticancer Res** 1997; 17:3915-9.

Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. **Semin Cancer Biol** 1999; 9:211-20.

Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. **Cancer Res** 2000; 60:203-12.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif** 2003; 36:131-49.

Wang LS, Chow KC, Chi KH, et al. Prognosis of esophageal squamous cell carcinoma: analysis of clinicopathological and biological factors. **Am J Gastroenterol** 1999; 94:1933-40.

Wasch R, Engelbert D. Anaphase-promoting complex-dependent proteolysis of cell cycle regulators and genomic instability of cancer cells. **Oncogene** 2005; 24:1-10.

Wu MY, Zhuang CX, Yang HX, Liang YR. Expression of Egr-1, c-fos and cyclin D1 in esophageal cancer and its precursors: An immunohistochemical and in situ hybridization study. **World J Gastroenterol** 2004; 10:476-80.

Yam CH, Fung TK, Poon RY. Cyclin A in cell cycle control and cancer. **Cell Mol Life Sci** 2002; 59:1317-26.

Yano H, Shiozaki H, Kobayashi K, et al. Immunohistologic detection of the epidermal growth factor receptor in human esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer** 1991; 67:91-8.

Yasunaga M, Tabira Y, Nakano K, et al. Accelerated growth signals and low tumor-infiltrating lymphocyte levels predict poor outcome in T4 esophageal squamous cell carcinoma. **Ann Thorac Surg** 2000; 70:1634-40.

Zachary I. VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. **Biochem Soc Trans** 2003; 31:1171-7.

Zhang J, Li Y, Wang R, et al. Association of cyclin D1 (G870A) polymorphism with susceptibility to esophageal and gastric cardiac carcinoma in a northern Chinese population. **Int J Cancer** 2003; 105:281-4.

Zhou XB, Guo M, Quan LP, et al. Detection of human papillomavirus in Chinese esophageal squamous cell carcinoma and its adjacent normal epithelium. **World J Gastroenterol** 2003; 9:1170-3.

ANEXOS

ANEXO 1: Formulário utilizado para a revisão dos prontuários médicos e dos registros hospitalares do Departamento de Anatomia Patológica - Hospital do Câncer A. C. Camargo, de casos de CEC de esôfago.

Departamento de Anatomia Patológica – ESÔFAGO
Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A. C. Camargo

Nome: _____ RGH: _____

Idade: _____ Gênero: _____ Etnia: _____ Data de Admissão: _____

No. AP (s): _____

TIPO DE ESPÉCIME

___ Biópsia ___ Ressecção esofágica ___ Esôfago-gastrectomia ___ Não especificado

LOCALIZAÇÃO

___ Superior ___ Médio ___ Inferior
___ cm da ADS

___ Não Avaliável

TAMANHO DO TUMOR

Maior Dimensão: _____ cm

Dimensão: _____ x _____ x _____ cm

___ Não Avaliável

TIPO HISTOLÓGICO

___ Carcinoma Epidermóide
___ Carcinoma Adenoescamoso
___ Carcinoma Indiferenciado
___ Carcinoma, tipo não identificado

___ Adenocarcinoma
___ Carcinoma de Pqnas Células
___ Carcinoma Mucoepidermóide
___ Outro: _____

GRAU HISTOLÓGICO

___ Não Aplicável
___ GX: não pode ser determinado
___ G1: Bem Diferenciado

___ G2: Moderadamente Diferenciado
___ G3: Pouco Diferenciado
___ G4: Indiferenciado

EXTENSÃO DA INVASÃO

___ Não Avaliável
___ Lâmina Própria
___ Muscular Própria

___ Intraepitelial
___ Submucosa
___ Adventícia

MITOSES: _____ / _____ hpf

INVASÃO VENOSA

___ Ausente ___ Presente ___ Indeterminada

INVASÃO LINFÁTICA

___ Ausente ___ Presente ___ Indeterminada

MARGENS CIRÚRGICAS

Margem Proximal

___ Livre de Neoplasia Invasora

___ Carcinoma in situ

___ Displasia

___ Não Avaliável

___ Comprometida por Neoplasia Invasora

___ Acantose/Papilomatose

Margem Distal

___ Livre de Neoplasia Invasora

___ Carcinoma in situ

___ Displasia

___ Comprometida por Neoplasia Invasora

___ Acantose/Papilomatose

Margem mais próxima: _____ (_____ mm)

TUMOR PRIMÁRIO (pT)

___ pTx: Não pode ser avaliado

___ pTis: Carcinoma in situ

___ pT0: Sem evidência de tumor primário

___ pT1: Lâmina própria ou submucosa

{ ___ pT1a: Lâmina própria
 ___ pT1b: Submucosa

___ pT2: Muscularis própria

___ pT3: Adventícia

___ pT4: invade estruturas adjacentes

LINFONODOS REGIONAIS (pN)

☐ pNx: Não Avaliável ☐ pN0: Sem metástases linfonodais regionais ☐ pN1: Metástases linfonodais regionais { ☐ pN1a: 1 a 3 LN envolvidos ☐ pN1b: 4 a 7 LN envolvidos ☐ pN1c: mais que 7 LN envolvidos							
LN examinados: _____		LN Envolvidos: _____					
METÁSTASES À DISTÂNCIA (pM)							
☐ pMx: Não Avaliável ☐ pM1: Metástases à distância não classificadas ☐ pM1a: Esôfago torácico baixo: LN celiacos		☐ pM0 médio: Não Aplicável alto: LN cervicais					
☐ pM1b: Esôfago torácico baixo: outras metástases à distância médio: LN não-regionais ou outras Mxt à distância alto: outras metástases à distância Sítio: _____							
ESTÁDIO CLÍNICO: _____							
0:	Tis	N0	M0	III:	T3	N1	M0
I:	T1	N0	M0		T4	Any N	M0
IIA:	T2	N0	M0	IV:	Any T	Any N	M1
	T3	N0	M0	IVA:	Any T	Any N	M1a
IIB:	T1	N1	M0	IVB:	Any T	Any N	M1b
	T2	N1	M0				
TERAPIA							
☐ Rxt exclusiva ☐ Cirurgia exclusiva ☐ Qt exclusiva		☐ Rxt prévia + Cirurgia ☐ Cirurgia + Rxt ☐ Outro: _____		☐ Qt neoadjuvante ☐ Qt adjuvante			
RECIDIVA/ METÁSTASE:				☐ Sim ☐ Não			
Sítio: _____							
Data da Recidiva/ Metástase: _____							
ÚLTIMO RETORNO: _____							
Estado ao último retorno:							
☐ Vivo sem Doença ☐ Vivo com Doença		☐ Morte pelo Câncer ☐ Morte por outras causas		☐ Perdido de Vista			