

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE E-CADERINA NA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA E SUA RELAÇÃO COM PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO

JULIANO JAMPIETRO

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

Área de Concentração: Oncologia

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares
Co-Orientadora: Dra. Yukie Sato-Kuwabara**

**São Paulo
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Jampietro, Juliano

Avaliação da expressão de e-caderina na transição epitélio-mesênquima e sua relação com proliferação celular em carcinoma epidermóide de esôfago / Juliano Jampietro – São Paulo, 2013.

72p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. CADERINAS. 2. PROLIFERAÇÃO CELULAR. 3. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS. 5. NEOPLASIAS ESOFÁGICAS. 6. TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Edson e Deizi, minha irmã Luana e minhas sobrinhas queridas Luara e Lorena.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais Edson e Deizi pela compreensão, paciência e incentivo incondicional. Mesmo sem entender os meus estudos exatamente, nunca faltaram palavras de apoio e um “Estamos com você, sempre”, principalmente em épocas de grande pressão. Sou grato por ter a minha família como um alicerce forte e sólido.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Augusto Soares pela oportunidade de desenvolver esse estudo, pelos ensinamentos, paciência e compreensão e acima de tudo pela segurança de que tudo vai dar certo, e deu. “*Take your time*”, frase dita no momento certo e que serei sempre grato.

A minha co-orientadora Dra. Yukie Sato-Kuwabara pela ajuda, paciência e por ser prestativa em todos os momentos e situações. Agradeço aos preciosos ensinamentos, aqueles que não estão nos livros e que levarei sempre comigo e certamente compartilhar com quem precisar. Não vou esquecer o pânico de receber as três piscadas, o que significava que eu tinha feito algo muito errado. Mas como a mesma exigência e rigor de ter bons resultados foram os momentos de descontração, risos, conselhos e o apoio que jamais vou esquecer. Posso dizer que tenho uma grande amiga e que posso contar com sua ajuda sempre e isso é recíproco. Obrigado!

Aos amigos que fiz neste tempo no laboratório, que não ficaram restritos somente ao ambiente de trabalho, mas sim para além dos artigos científicos. Bruna Roz, Felipe Fidalgo, Iara Rodrigues, Marcos Salles,

Luciane “Nescau” Kagohara, Ligia Petrolini, Tonielli Lacerda, Andrew Thomas, Juliana Laino, Deborah Mundin, Cecilia Feio, Hellen Kuasne, Bia Nunes, Bia Maia, André Lavorato, Julio Cirullo, Renatinha Fraga, Alice Muglia, Adriana Bulgarelli, Claudia Camilo, Sandra Viola, Giovana de Brito, Arthur Alvarenga, Mariana Rezende, Samantha Omae, Marina Resende, Julia Mello, Aderbal Ruy, Rogério Nazario, Eloisa Olivieri, Nair Muto, Anderson Dias e tantos outros que de uma forma ou de outra contribuíram para a minha formação. Um agradecimento especial ao meu grande amigo Fabio A. Marchi que me apresentou a Instituição AC Camargo e que sempre esteve presente desde os tempos faculdade. Um amigo para chamar de irmão. Aos amigos de Duartina, que estão comigo desde a minha infância e que preservo com carinho por saber que neles encontro um porto estável e acolhedor. Aos amigos de Botucatu que sempre me acolheram nas minhas fugas para o interior na busca por descontração e ouviram pacientemente minhas lamentações. Renan Gonçalves Bertholini Vericondo (Miss), Eduardo Gabriel Domingues (Frut), Tiago Eugênio (Kutako), Ana carolina Pontes Maciel (Pivete), Claudia M. Lima (Koco), Fernando N. Silva (Tenesmo).

Um agradecimento especial para a Liliane Cilento Afonso, que sempre me apoiou e me deu dicas valiosas das quais nunca vou me esquecer. Agradeço por compartilhar bons e maus momentos, mas que no final de tudo acabava em risadas. Um almoço com ela, Fernanda Machado de Melo e com o Fábio Lourenço Vieira sempre será agradável e necessário para relaxar e voltar com energias renovadas para outra jornada de estudos e

trabalho. Agradeço também pelos inúmeros cafés doados e prometo que um dia vou retribuir.

Ao Dr Rafael Malagoli Rocha, por ser sempre solícito comigo, que mesmo estando muito ocupado cedia um tempo para me ajudar. Sua ajuda e conselhos sempre vieram em boa hora.

A Gilmar Silva, Carla Furlani Pereira e Kelly Cristina do escritório de Projetos do CIPE, que sempre me ajudaram com as compras e assuntos financeiros do nosso estudo. Sempre de bom humor e dispostas a ajudar em todas as situações.

Aos amigos e colegas de trabalho Ivanildo Neves (Ivan), Maria Nazare de Fatima Ferreira, Simone Cristiane Pagoti e Aurinete Bandeira Nogueira do Laboratório de Imunoistoquímica do Hospital AC Camargo pela ajuda e paciência. Espero sempre retribuir essa gentileza.

Ao Departamento de Anatomia Patológica e todos os funcionários e residentes que de uma forma ou de outra sempre contribuíram para meu aprendizado. Em especial ao Severino da Silva Ferreira, Carlos Ferreira Nascimento e a Suely Nonogaki pelos valiosos ensinamentos, pela paciência e pela atenção, gestos que nunca vou esquecer. A Suely, eu dedico um agradecimento especial por ter compartilhado comigo um pouco da sua experiência profissional da qual foi essencial para este estudo e para os meus futuros trabalhos.

Aos funcionários da Pós-Graduação Ana M. A. Kuninari, Luciana Costa Pitombeira, Vanuza B. R de Oliveira pela ajuda e paciência durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos membros da Banca de Qualificação Dr. Clóvis Antônio Lopes Pinto e a Dra Glaucia Noeli Maroso Hajj pelas criticas e sugestões pertinentes que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca pela eficiência e ajuda durante as pesquisas bibliográficas desse estudo.

A todos da equipe de Limpeza, de Manutenção, de Engenharia Clinica e Hospitalar e TI pelo constante suporte e eficiência.

A CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro imprescindível para o desenvolvimento desse projeto.

RESUMO

Jampietro J. **Avaliação da expressão de e-caderina na transição epitélio-mesênquima e sua relação com proliferação celular em carcinoma epidermóide de esôfago.** São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O câncer de esôfago é o oitavo tipo mais comum no mundo e a sexta causa de morte com estimativa de 406 mil casos de mortes por ano. Apresenta dois tipos histológicos principais, carcinoma epidermóide e o adenocarcinoma, sendo o carcinoma epidermóide o tipo histológico mais comum. A transição epitélio-mesênquima (EMT, do inglês *Epithelial-Mesenchymal Transition*) é o principal evento da progressão tumoral e metástase. EMT é o processo em que células epiteliais perdem suas características originais e adquirem fenótipo tipicamente mesenquimal conferindo uma maior mobilidade e capacidade invasiva a célula tumoral. O primeiro indicador de uma EMT é a perda da expressão da E-caderina, uma glicoproteína cálcio dependente mediador na formação de junções aderentes e a polarização apico-basolateral. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de E-caderina no fronte de invasão e na parte central do tumor e sua relação com a proliferação celular, avaliado pela expressão da proteína Ki-67. Foram avaliados 58 casos de CEE por imunoistoquímica de dupla marcação e marcação simples automatizada e analisados pelo sistema automatizado Aperio utilizando o algoritmo de decomposição de imagem *ColorDeconvolution*. A análise das reações imunoistoquímica de dupla marcação a E-caderina mostrou que 51 (87,9%) casos tiveram maior expressão no centro tumoral quando comparado com o fronte de invasão e em apenas 7 (12,1%) casos a expressão no fronte de invasão foi maior que no centro tumoral. O valor do score da análise da E-caderina nas reações de dupla marcação teve valores medianos de 184,2 e 163,0 na parte central do tumor e no fronte de invasão respectivamente ($p < 0,001$). Para a análise do

Ki-67, 19 (32,7%) casos tinham uma expressão maior no centro do tumor quando comparado com o frente de invasão. Em 39 (67,3%) houve uma maior expressão no frente de invasão do que o centro tumoral. A análise da taxa de proliferação, representada pela análise da expressão do Ki-67 mostrou valores medianos de 6,8 e 8,1 para a parte central do tumor e para o frente de invasão respectivamente ($p=0,052$). Os escores da análise das reações de marcação simples para E-caderina foram 202,9 na parte central e 187,4 no frente de invasão. A correlação de Spearman entre as reações de dupla marcação e marcação simples foi moderadamente positiva e estatisticamente positiva ($p<0,001$). Os resultados no nosso estudo corroboram com a literatura onde é observada uma menor expressão de E-caderina no frente de invasão quando comparado com a parte central do tumor e que há uma maior expressão de Ki-67 no frente quando comparado com o centro tumoral em CEE.

SUMMARY

Jampietro J. **[Evaluation of the relationship between E-cadherin expression and proliferative activity at the invasive front of esophageal squamous cell carcinoma]**. São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) has a poor prognosis mainly because it is usually in an advanced stage at the time of diagnosis. The epithelium-mesenchyme transition (EMT) is the main event in tumor progression and metastasis, when epithelial cells loss their original characteristics and acquire mesenchymal phenotype, indicated first by the loss of E-cadherin expression. This study aimed to elucidate whether tumor cells that have undergone EMT at the invasive front are in proliferative state.

Material and Method: Samples of 58 ESCC cases were double and single stained by immunohistochemistry (IHQ) for E-cadherin (BD Bioscience) and Ki-67 (ROCHE) antibodies using the Automated System Ventana BenchMark XT (ROCHE). Immunohistochemistry analysis was performed using Aperio ScanScope XT (APERIO) with Algorithm ColorDeconvolution. In each case E-cadherin and Ki-67 expression were evaluated in the tumor core and at the invasive front, separately. Positivity was divided into strong, moderate and weak positive according to intensity staining. For each case a Score (range 0-300) was given based on the formula of the percentages of each positivity group (Score= 1x(% Weak)+ 2x(% Moderate)+3x(% Strong)).

Results and Discussion: Analysis of IHQ double stain for E-cadherin showed 51 (87,9%) cases had an increase expression at the tumor core when compared with invasive front. In 7 (12,1%) cases showed the higher expression at the invasion front. The score median values for E-cadherin double-stain were 184.2 and 163.0 at the invasive front and tumor core respectively ($p<0,001$). Analyses of Ki-67 double-stain showed 19 (32,7%) cases with increase expression at tumor core and 39 (67,3%) cases with a higher expression at

the invasive front. The proliferation rates, represented by Ki-67 expression, showed median values 6.8 and 8.1 at the tumor core and invasive front respectively ($p=0,052$). The analyses of single-stain showed score median values for E-cadherin 202.9 at tumor core and 187.4 at invasive front. Analysis of Ki-67, score median values was 3.7 and 9.4 at tumor core and invasive front. Spearman correlation between the IHQ double and single stain was moderately positive and statistically significant ($p < 0.001$).

Conclusion: According to our findings, tumor cell at the invasive front show an increased proliferation rates as it loses the E-cadherin expression and an increased expression of E-cadherin and a lower expression of Ki-67 at the tumor core. However, some cases showed an opposite mean behavior with a higher expression of E-cadherin at the invasive front and a increased expression of Ki-67 at tumor core. A more complex mechanism in the dynamics of E-cadherin and Ki-67 expression could be acting during EMT. Further studies are necessary to the better understanding the complexity of this mechanism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Células epiteliais possuem uma morfologia altamente polarizada com domínios apico-basolateral na membrana plasmática, formam extensos complexos juncionais, expressam diferentes marcadores moleculares e têm uma organização do citoesqueleto única.....	11
Figura 2	Representação esquemática da decomposição de cores do algoritmo ColorDeconvolution.....	27
Figura 3	Representação de áreas centrais de uma amostra de CEE com dupla marcação para E-caderina na membrana e Ki-67 no núcleo.....	28
Figura 4	Representação do fronte de invasão de um CEE com dupla marcação para E-caderina na membrana e Ki-67 no núcleo.....	29
Figura 5	Representação da forma de análise e dos resultados gerados pelo algoritmo ColorDeconvolution.....	30
Figura 6	Representação das reações de imunoistoquímica de dupla marcação para E-caderina e Ki-67 em amostra de CEE.....	38
Figura 7	Frequência da expressão de E-caderina na parte central do tumor e no fronte de invasão em amostras de CEE mostrando onde a expressão de cada proteína foi maior.....	39
Figura 8	Boxplot comparando os resultados das reações de dupla marcação em CEE para E-caderina na parte central do tumor e no fronte de invasão.....	39

Figura 9	Frequência da expressão de Ki-67 na parte central do tumor e no fronte de invasão em amostras de CEE mostrando onde a expressão de cada proteína foi maior.....	40
Figura 10	Boxplot comparando os resultados das reações de dupla marcação em CEE para Ki-67 na parte central do tumor e no fronte de invasão.....	40
Figura 11	Representação das reações de imunistoquímica de marcação simples para E-caderina em amostras de CEE.....	43
Figura 12	Frequência da expressão de E-caderina na parte central do tumor e no fronte de invasão em amostras de CEE mostrando onde a expressão de cada proteína foi maior.....	43
Figura 13	Representação das reações de imunistoquímica de marcação simples para Ki-67 em amostras de CEE.....	44
Figura 14	Frequência da expressão de Ki-67 na parte central do tumor e no fronte de invasão em amostras de CEE mostrando onde a expressão de cada proteína foi maior.....	44
Figura 15	Boxplot comparando os resultados das reações de marcação simples em CEE para E-caderina na parte central do tumor e no fronte de invasão.....	45
Figura 16	Boxplot comparando os resultados das reações de marcação simples em CEE para Ki-67 na parte central do tumor e no fronte de invasão.....	46

Figura 17	Representação do caso de CEE número 56 com expressão de E-caderina e Ki-67 atípicas quando comparados com os valores médios das análises.....	48
Figura 18	Capturas das reações de imunofluorescencia indireta representando a expressão de E-caderina na membrana e Ki-67 no núcleo em CEE.....	53

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1	Sumário dos dados clínico-patológicos dos 58 casos de CEE analisados nesse estudo.....	35
Tabela 2	Valores medianos e interquartis das reações de imunoistoquímica de dupla marcação e marcação simples na parte central do tumor e no fronte de invasão.....	47
Tabela 3	Correlação entre as reações de imunoistoquímica de dupla marcação e marcação simples.....	50
Quadro 1	Anticorpos e Sistema de visualização.....	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CBD	<i>Catenin Binding Domain</i>
CEE	Carcinoma Epidermóide de Esôfago
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
EMT	<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>
IHQ	Imunoistoquímica
IMC	Índice de Massa corpórea
JMD	<i>Juxtamembrane Domain</i>
TEMTIA	<i>The Epithelial-Mesenchymal Transition International Association</i>
TGFβ1	<i>Transforming Growth Factor Beta1</i>
TMA	Tissue Microarray

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Carcinoma epidermóide de esôfago	3
1.2	Transição epitélio-mesenquima	7
1.3	E-caderina	12
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivos específicos.....	19
3	METODOLOGIA	20
3.1	Casuística	20
3.2	Imunoistoquímica	21
3.3	Análise imunoistoquímica	23
3.4	Imunofluorescência	31
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5	RESULTADOS.....	34
5.1	Casuística	34
5.2	Expressão imunoistoquímica	35
5.2.1	Imunoistoquímica - Dupla marcação.....	35
5.2.2	Imunoistoquímica – Marcação simples	41
5.3	Correlação entre as reações de dupla marcação e marcação simples.	49
5.4	Imunofluorescência	51
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÕES	64

8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
----------	---	-----------

ANEXOS

Anexo 1	Resultados das análises das reações de imunoistoquímica de dupla marcação e marcação simples em 58 casos de CEE
----------------	---

1 INTRODUÇÃO

A história do câncer esofágico começa com as primeiras evidências de uma cirurgia esofágica descritas em papiros que datam de 3000-2500 A.C. e que foram traduzidos pelo egiptologista americano Edwin Smith, em 1862 no documento conhecido como “*Smith Surgical Papyrus*”. No documento há uma passagem descrevendo uma “ferida aberta na garganta penetrando o esôfago”, embora o termo esôfago tenha sido descrito por gregos apenas em 950 a.C. na literatura Homérica. O câncer de esôfago é reconhecido por chineses há mais de 2000 anos como a causa de disfagias (GAVAGHAN 1999; ESLICK et al. 2009).

Ao longo da história do câncer esofágico houve grandes contribuições de médicos alemães e austríacos como Adolf Kussmaul, Friedrich Trendelenburg, Theodor Billroth, Vincenz Czerny, dentre outras personalidades que deram a mesma significativa contribuição. A maioria das descobertas aconteceu entre os séculos 19 e 20. No entanto, entre os séculos 16 e 19 houve avanços significativos na visualização e na remoção dessas lesões. Já no século 20, essas técnicas foram aprimoradas, mas mesmo assim não conferiram um aumento realmente significativo nas taxas de sobrevivência. Atualmente, a tecnologia dos instrumentos e opções de tratamentos obviamente são surpreendentes quando comparados com as opções disponíveis nos anos 50. Mas mesmo com todo esse avanço, na maioria dos casos a doença é diagnosticada em um estado avançado e não

houve uma melhora substancial nos resultados globais da incidência da doença (GAVAGHAN 1999; ESLICK et al. 2009).

De acordo com os dados do *International Agency for Research on Cancer*, o câncer de esôfago está classificado como o oitavo tipo de neoplasia mais comum, com estimativa de 481 mil casos novos, correspondendo a 3,8% do total de casos de câncer no mundo todo. É a sexta causa de morte por câncer, com estimativa de 406 mil mortes/ano, o que equivale a 5,4% do total de mortes por câncer no mundo inteiro (FERLAY et al. 2010).

No âmbito mundial, existe uma grande variabilidade regional nas taxas de incidência e mortalidade por câncer de esôfago, sendo as mais altas encontradas em países do sul e leste da África e leste da Ásia, como Irã, Madagascar, Moçambique, China e Japão, no chamado cinturão asiático do câncer de esôfago, onde a incidência fica em torno de 100 casos por 100.000 habitantes por ano. Na América Latina, países como Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai apresentam as maiores taxas de incidência para essa doença (FERLAY et al. 2010).

O câncer de esôfago ocorre predominantemente em países em desenvolvimento, sendo a sexta neoplasia mais frequente em nosso país, com estimativa de cerca de 10.420 casos novos/ano. Ocorre, predominantemente, em homens, com estimativa de 7.770 casos/ano e que correspondem a risco estimado de 8 casos novos a cada 100 mil homens e 3 a cada 100 mil mulheres. 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 2:100.000, no Nordeste de 4:100.000, no Centro-Oeste de 7:100.000, no Sudeste de 10:100.000 e na região Sul de 15:100.000. O Rio Grande do Sul é o estado de maior incidência da doença, com taxa bruta de 18,50:100000 para homens e 7,18:100000 para mulheres (Ministério da Saúde 2011).

1.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO

O câncer de esôfago apresenta dois tipos histológicos principais, o carcinoma epidermóide (CEE) e o adenocarcinoma, sendo o primeiro mais comum, embora a frequência relativa dos adenocarcinomas venha crescendo drasticamente (LAMBERT e HAINAUT 2007; UMAR e FLEISCHER 2008). Além dos citados acima, outros tipos histológicos raros podem também ocorrer, como os carcinomas adenoides císticos, mucoepidermoide, carcinoma de pequenas células e sarcomas, entre outros (BIRD-LIEBERMAN e FITZGERALD 2009).

O modelo de progressão carcinogênica segue o observado em outras mucosas revestidas por epitélio pluri-estratificado, com progressão de 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 graves (ou de alto grau), e equivalente ao carcinoma *in situ* ou

intraepitelial (BIRD-LIEBERMAN et al. 2009). Uma vez desenvolvido o câncer de esôfago, o tumor tem a capacidade de se espalhar rapidamente. Aproximadamente 14 – 21% dos tumores na submucosa e 38 – 60% dos tumores na camada muscular estão associados com a disseminação para os linfonodos. No momento do diagnóstico, mais de 50% dos pacientes tem uma lesão não ressecável (ENZINGER e MAYER 2003).

Acredita-se que a inflamação crônica do tecido que reveste o trato esofágico, causadas por toxinas provenientes do cigarro e álcool, pode ser um fator desencadeador do desenvolvimento tumoral em CEE (VOULGARI e PINTZAS 2009). O tabaco é considerado um carcinogênico bem consolidado e descrito na literatura, considerado um fator de risco para diversos tipos de tumores assim como CEE e adenocarcinomas de esôfago (ENZINGER e MAYER 2003; UMAR e FLEISCHER 2008). No trabalho de FREEDMAN et al. (2007), analisando a relação entre exposição ao tabaco e o desenvolvimento de CEE em 474.606 participantes, os indivíduos fumantes apresentavam um risco mais alto de desenvolver a doença quando comparados aos não fumantes. Também foi estatisticamente significativa o aumento do risco em desenvolver a doença nos pacientes ex-fumantes quando comparados aos pacientes que nunca fumaram.

Assim como o tabaco, o álcool é outro fator de risco importante no desenvolvimento de CEE. Indivíduos que consomem mais que três doses diárias mostram um aumento no risco de desenvolver o tumor quase cinco vezes maior do que aqueles que consomem uma dose por dia (FREEDMAN et al. 2007).

É documentado também que a exposição ao tabaco concomitantemente com a ingestão de álcool, tem efeito sinérgico no desenvolvimento de CE. LEE et al. (2007), utilizando 652 casos confirmados de CEE e 1127 casos controle, demonstraram que o consumo moderado de álcool não tem um grande efeito na carcinogênese das células epiteliais esofágicas, mas quando associadas ao tabagismo exerce um efeito multiplicativo no desenvolvimento da neoplasia.

A obesidade também é descrita como um fator de risco, já que 14-20% de todas as mortes por câncer estão atribuídas a um excesso de peso e/ou obesidade, como registrado no estudo de Calle e colaboradores nos Estados Unidos (CALLE et al. 2003; CALLE 2007). No entanto, a obesidade e o alto Índice de Massa Corpórea (IMC) parecem estar mais associados com o desenvolvimento de adenocarcinomas de esôfago do que com CEE, como demonstrado na meta-análise de SMITH et al. (2007) que encontrou uma relação inversamente proporcional entre a incidência de CEE e o valor de IMC. Uma suposta explicação para essa relação seria que indivíduos com IMC baixo estariam propensos a desnutrição e assim uma deficiência nutricional. O estudo de JESSRI et al. (2011) sugere que a ingestão de determinados macronutrientes como, por exemplo, carboidratos, fibras e ácidos graxo e micronutrientes como folato, vitamina E e selênio tem um efeito protetor contra o desenvolvimento de CEE.

De modo geral, a fase precoce de CEE é assintomática, o que faz com que o diagnóstico desse tumor ocorra em estágios mais avançados. Na fase avançada da doença, é comum a presença de lesões ulceradas e

hemorragias gastrointestinais (CHARLES e LIGHTDALE 1999). Um dos principais sintomas é a disfagia, ou seja, a dificuldade para deglutição, que ocorre quando há considerável invasão do lúmen esofágico pelo tecido tumoral. Outro sintoma comum nesse tipo tumoral é a dor e a sensação de sufocamento ao ingerir alimentos, geralmente, desencadeada quando há invasão em órgãos adjacentes ao esôfago (FUJITA et al. 1995). Por esse motivo, na grande maioria dos casos, o CEE está associado a um prognóstico ruim, por se tratar de um tumor em estágio avançado ao diagnóstico. O melhor procedimento para o diagnóstico do câncer de esôfago é a endoscopia juntamente com a biópsia, que é inclusive capaz de detectar pequenas áreas anormais e coletar amostras para análise histológica (CHARLES e LIGHTDALE 1999).

Embora as várias modalidades de terapia, adicionalmente à ressecção cirúrgica, tenham sofrido melhora ao longo dos anos, ainda observa-se uma alta taxa de mortalidade após a cirurgia (TACHIBANA et al. 2005; LIU et al. 2008). Em casos de CEE localmente avançados, a ressecção cirúrgica continua sendo a principal opção de tratamento com potencial intenção curativa e as modalidades cirúrgicas concentram-se em sua maioria por acesso transtorácico ou transhiatal. Esse tipo de esofagectomia é geralmente acompanhado por uma alta taxa de morbidade e mortalidade pós-operatória (VERHAGE et al. 2009). Há relatos da utilização de terapias adjuvantes e neoadjuvantes como quimioterapia e radioterapia em casos de CEE, na tentativa de aumentar as taxas de cura e diminuir o risco de recorrência da doença. No entanto, a eficácia de tais

procedimentos terapêuticos ainda não está bem definida (KU e ILSOON 2009). Os avanços na compreensão das características moleculares dos tumores permitiram o desenvolvimento de terapias-alvo moleculares, e conseqüentemente, de tratamentos mais efetivos e com menor toxicidade que poderiam ser aplicados em casos de CEE (KU e ILSOON 2009).

1.2 TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMA

Dentre os aspectos que confirmam a malignidade de um tumor está a disseminação metastática de um tumor primário para os tecidos a distância. Inicialmente, os tumores não têm a capacidade de invadir outros tecidos, mas no decorrer da progressão da doença as células tumorais continuam acumulando alterações genéticas e mudam o comportamento biológico normal adotando mecanismos que permitem se desprender do tumor inicial, invadir tecidos adjacentes e ter acesso a vasos linfáticos e a corrente sanguínea. Esse acesso permite a disseminação e restabelecimento de tumores secundários em locais distantes do tumor primário (VOULGARI e PINTZAS 2009; YILMAZ e CHRISTOFORI 2009).

Numerosos estudos têm em comum afirmar que uma mudança profunda no fenótipo e no comportamento de uma célula para outra fenotipicamente diferenciada é fundamental para que aconteça a metástase, a invasão e a progressão tumoral. Essa mudança atualmente é bem estudada e conhecida como Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT do inglês *Epithelial Mesenchymal Transition*) (BATES e MERCURIO 2005; MAEDA et

al. 2007; USAMI et al. 2008; MANDAL et al. 2008; VOULGARI e PINTZAS 2009; THIERY et al. 2009; YILMAZ e CHRISTOFORI 2009; ZEISBERG e NEILSON 2009; SASAKI et al. 2009). O trabalho pioneiro de GABBERT et al. (1985) já apontava a importância dessa mudança fenotípica das células tumorais no fronte de invasão em câncer de cólon e a necessidade de mais estudos sobre o tema (GABBERT et al. 1985). Somente em 1987 a expressão “transição epitélio-mesenquimal” foi usada para se referir a mudanças celulares eliciadas pela matriz extracelular, e não antes de 1995 o fenômeno EMT foi bem caracterizado (HUGO et al. 2007).

A EMT é o processo em que células epiteliais perdem suas características iniciais e assumem propriedades tipicamente de células mesenquimais. Para essa mudança, as células passam por complexas alterações estruturais e comportamentais que vão desde mudanças na propriedade de adesão, na capacidade migratória e na expressão de diferentes moléculas ausentes no estado inicial de epitélio (CHRISTIANSEN e RAJASEKARAN 2006; MANDAL et al. 2008; VOULGARI e PINTZAS 2009; THIERY et al. 2009; YILMAZ e CHRISTOFORI 2009; ZEISBERG e NEILSON 2009; SASAKI et al. 2009).

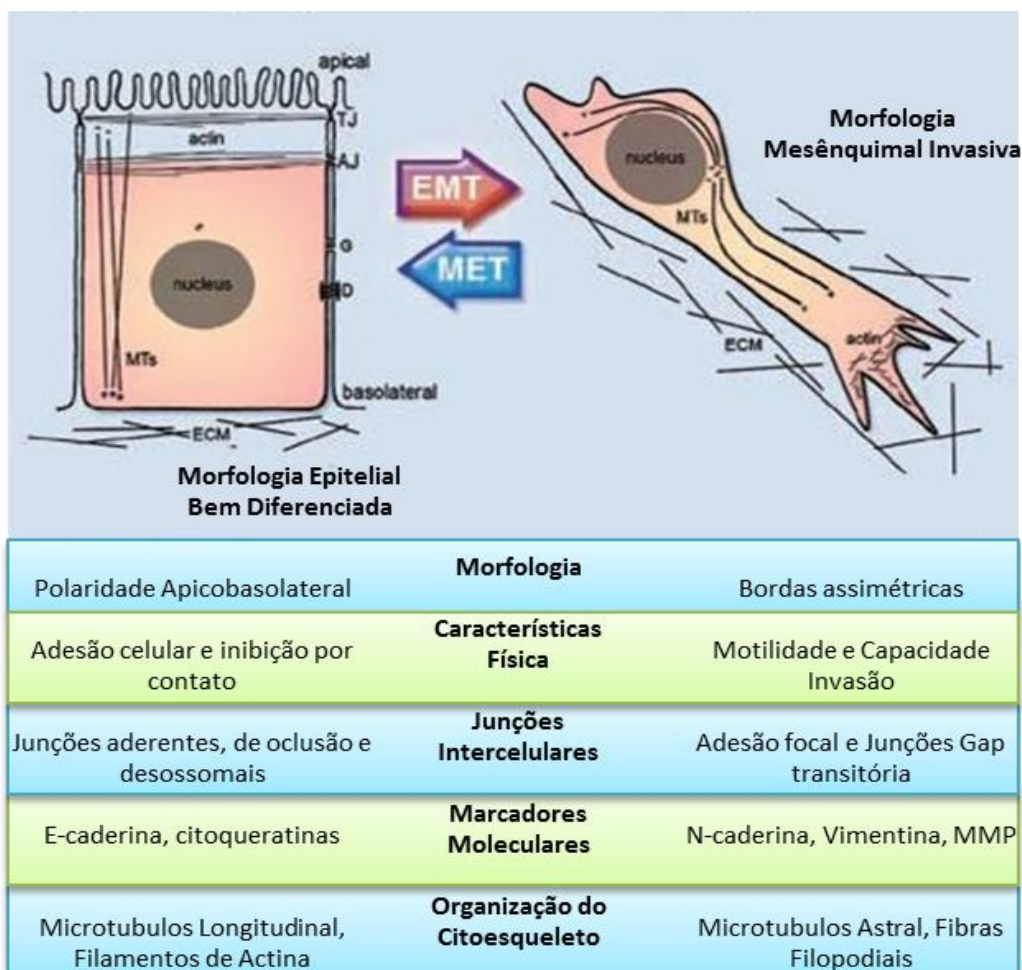
As principais diferenças entre as células epiteliais e mesenquimais podem ser observadas na Figura 1. As células epiteliais têm como característica formar uma camada celular altamente unida por estruturas especializadas localizadas na membrana como as junções ocludentes, junções aderentes, desmossomos e junções GAP. Existe também uma polarização apico-basolateral que organiza a localização das moléculas de

adesão de modo que formam um cinturão lateral e uma lâmina basal. As células epiteliais podem se mover entre elas e dentro da camada basal, mas raramente se afastam ou desprendem da camada epitelial em condições normais. As células mesenquimais não possuem uma camada organizada e nem uma polarização apico-basolateral como observado nas células epiteliais. O contato entre elas é apenas focal e não associadas a uma lâmina basal. Possuem uma maior mobilidade, grande plasticidade e facilidade para a migração (CHRISTIANSEN e RAJASEKARAN 2006; THIERY e SLEEMAN 2006; VOULGARI e PINTZAS 2009; YILMAZ e CHRISTOFORI 2009).

Em 2007 na *International Conference on Epithelial-Mesenchymal Transition* organizada pela TEMTIA (*The Epithelial-Mesenchymal Transition International Association*) e depois em 2008 no encontro *Could Spring Harbor Laboratories* foi discutida a proposta de classificar a EMT em três subtipos, baseados no contexto biológico no qual ocorrem. A EMT Tipo 1 está relacionada com processos de implantação, formação do embrião e desenvolvimento de órgãos que compartilham o mesmo fenótipo mesenquimal. Esse tipo de transição não causa fibrose nem induz fenótipos invasivos e podem gerar células mesenquimais (mesênquima primário) que tem potencial de reversão da transição, ou seja, passar por uma transição mesenquima-epitelial. A EMT classificada como do Tipo 2 está relacionada com processos de cicatrização, regeneração tecidual e fibrose em órgãos. A EMT Tipo 3 é a que ocorrem em células neoplásicas e que passaram previamente por mudanças genéticas e epigenéticas gerando produtos

diferentes dos encontrados nos outros tipos. As células tumorais que apresentam EMT Tipo 3 têm maior capacidade de invasão e metástase (KALLURI e WEINBERG 2009).

A transição epitélio-mesenquima é um processo natural da embriogênese como mencionado anteriormente, quando classificada como Tipo 1. Ocorre em movimentos morfogênicos básicos como a gastrulação e na formação de órgãos como a crista neural, coração, sistema muscular, estruturas craniofaciais e sistema nervoso periférico (THIERY e SLEEMAN 2006; VOULGARI e PINTZAS 2009; SASAKI et al. 2009). Durante um dos passos da gastrulação, células individuais destacam-se do ectoderma e migram na direção interna do centro do embrião para formar o mesoderma, precursor dos tecidos mesenquimais. Essa conversão de células ectodermais, que nesse estágio são ordenadas em camadas de células epiteliais, para células com fenótipo mesodermal envolve EMT e, ao mesmo tempo, adquirem habilidade de se translocarem de um ponto a outro dentro do embrião (WEINBERG 2008). Um bom exemplo de como ocorre a EMT nos estágios iniciais da embriogênese pode ser observado no desenvolvimento de *Drosophilas*, onde a transição está presente durante a internalização e migração de futuras células mesodérmica ao longo da ectoderme até chegar à posição correta no embrião (VOULGARI e PINTZAS 2009).



Fonte: CHRISTIANSEN e RAJASEKARAN (2006)

Figura 1 - Células epiteliais possuem uma morfologia altamente polarizada com domínios apico-basolateral na membrana plasmática, formam extensos complexos juncionais, expressam diferentes marcadores moleculares e têm uma organização do citoesqueleto única. Durante a EMT, as células epiteliais adquirem uma morfologia invasiva tipicamente mesenquimais. As células mesenquimais não formam junções intercelulares, possuem diferentes arranjos do citoesqueleto e expressam um perfil diferente de genes, em relação às células epiteliais. As células mesenquimais podem reverter para um fenótipo epitelial por um processo de transição mesenquimal-epitelial

1.3 E-CADERINA

A perda da adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, e as mudanças moleculares ligadas a este fenômeno, são fundamentais no processo de invasão e metastase. Somente com a perda dessas adesões, as células tumorais poderão se dissociar do tumor primário e adquirir a capacidade de se infiltrarem em outros tecidos levando a subseqüentes eventos metastáticos (YILMAZ e CHRISTOFORI 2009).

Concordando com a maioria dos estudos sobre EMT em diferentes tipos de tumores, a perda da adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, da polaridade apico-basolateral e da expressão protéica e de genes nas células epiteliais, concomitantemente com a aquisição de características tipicamente de células mesenquimais está diretamente relacionada com a perda da atividade da E-caderina. A perda da expressão da E-caderina é o evento essencial na EMT e é usada frequentemente em diferentes estudos como um marcador confiável da transição bem como de um indicador de mau prognóstico e de ocorrência da metástase (BATES e MERCURIO 2005; CHRISTIANSEN e RAJASEKARAN 2006; MAEDA et al. 2007; MANDAL et al. 2008; VOULGARI e PINTZAS 2009; YILMAZ e CHRISTOFORI 2009; SASAKI et al. 2009; ZEISBERG e NEILSON 2009).

A E-caderina pertence a uma superfamília com cerca de 80 membros, divididos em seis subfamílias: caderinas clássicas do tipo I e do tipo II, caderinas desmossomais, caderinas transmembrana de sete passagens, grandes caderinas e protocaderinas. A E-caderina integra a subfamília das

caderinas clássicas do tipo I (PEINADO et al. 2004; MANDAL et al. 2008; HARTSOCK e NELSON 2008; SASAKI et al. 2009). A E-caderina é um receptor glicoprotéico transmembrânico, cálcio-dependente, composto de domínios extracelulares e intracelulares. O domínio citoplasmático é composto por um domínio próximo a membrana (conhecido como JMD, do inglês *juxtamembrane domain*) e um domínio de ligação a catenina (conhecido como CBD do inglês *catenin binding domain*) que interage de forma heterotípica com moléculas citoplasmáticas denominadas cateninas. As cateninas compreendem uma superfamília protéica composta de três membros principais: α -cateninas, β -cateninas e p120-catenina que interagem com outras proteínas atuando no ancoramento do complexo caderina-catenina ao citoesqueleto de actina (STEMMLER 2008). O domínio extracelular é o maior e subdividido em mais cinco domínios, sendo importantes no processo de adesão célula-célula porque se ligam, através de ligações homofílicas dependentes de cálcio, ao domínio extracelular de uma molécula de E-caderina da célula vizinha.

Muitos estudos são encontrados associando a EMT e a regulação negativa da E-caderina em diferentes tumores. O estudo realizado por HIROHASHI (1998) mostrou que perda da expressão da E-caderina é o principal evento da EMT e que múltiplos mecanismos podem contribuir para essa inativação como os promotores de metilação, fosforilação e repressores transcricionais (HIROHASHI 1998). O estudo de MAEDA et al. (2007) afirma que EMT está associado ao câncer oral e a perda da expressão da E-caderina é o principal fator do desenvolvimento e

progressão tumoral (MAEDA et al. 2007). O trabalho de MANDAL et al. (2008) também relaciona a EMT e a perda da expressão da E-caderina no câncer de cabeça e pescoço e mostra os diferentes eventos que podem silenciar a E-caderina, como as modificações e repressões transcricionais e mutações somáticas reafirmando assim a importância da EMT e E-caderina na progressão tumoral e metástase (MANDAL et al. 2008). No trabalho de CHEN et al. (2012), usando linhagens celulares de câncer colorretal humano e técnicas de RNA de interferência, os autores avaliaram os efeitos da depleção de E-caderina no crescimento celular, capacidade de invasão e resistência a drogas. Os resultados do estudo demonstraram que quando a expressão de E-caderina é diminuída, há um aumento significativo nos níveis de B-catenina nuclear, resultando no aumento do crescimento celular e na habilidade de invasão nas linhagens celulares (CHEN et al. 2012).

Na literatura houve um aumento no número de publicações de estudos que envolvem a expressão de E-caderina e EMT em CEE, mas por vezes discordam em alguns resultados. No estudo realizado por REES et al. (2006), utilizando técnicas de imunoistoquímica, os autores sugerem que o fator de crescimento $TGF\beta 1$ pode influenciar a EMT e a perda da expressão da E-caderina por diferentes mecanismos e vias de sinalização (REES et al. 2006). O estudo de NATSUGOE et al. (2007) avaliou a significância clínica da expressão de SNAIL em CEE e sua relação com a expressão de E-caderina. SNAIL é um fator de transcrição que participa do desencadeamento da EMT por reprimir diretamente a expressão de E-caderina. Usando técnicas de imunoistoquímica não houve correlação

significativa entre a expressão de SNAIL e E-caderina, mas que a ausência ou diminuição da E-caderina está diretamente envolvida na EMT. No mesmo estudo, foi relatado também que os casos que perdiam a expressão de E-caderina apresentavam um prognóstico ruim quando comparados com os indivíduos que a mantinham (NATSUGOE et al. 2007). USAMI et al. (2008), usando diferentes linhagens celulares de carcinoma epidermoide de esôfago, mostraram que a expressão endógena do fator de transcrição SNAIL promove a redução da expressão de E-caderina e Claudinas. Já em linhagens celulares que não apresentavam expressão de SNAIL endógeno, a super expressão exógeno de SNAIL diminui a expressão de E-caderina e de Claudinas e aumenta a expressão de Vimentina e a capacidade de migração/invasão da linhagem celular. Ao analisar os ensaios de invasão, foi possível observar um aumento que expressão nuclear de SNAIL e uma significativa diminuição da E-caderina, com consequente aumento na capacidade de invasão tumoral, migração e taxa de proliferação celular (USAMI et al. 2008). SASAKI et al. (2009), relataram que o fator de transcrição TWIST (Helix-loop-Helix, bHLH) pode ser considerado um repressor da expressão de E-caderina em CEE. De acordo com os resultados houve uma alta taxa de expressão de TWIST juntamente com uma baixa expressão de E-caderina e tiveram uma associação com profundidade da invasão tumoral, metástase linfonodal e invasão linfática. Indivíduos que apresentavam aumento da expressão de TWIST com baixa expressão de E-caderina apresentavam um prognóstico ruim e que quando o resultado era inverso, apresentavam um prognóstico melhor. Entretanto,

eles observaram que alguns pacientes com a expressão de E-caderina preservada tinham um prognóstico ruim e no grupo de indivíduos que tinham a expressão de E-caderina preservada e altos níveis de expressão de TWIST apresentavam mais invasão linfática e um pior prognóstico (SASAKI et al. 2009).

Alguns estudos tem avaliado a relação entre a expressão de E-caderina e a atividade proliferativa em outros tipos tumorais. O estudo realizado em câncer de cólon por BRABLETZ et al. (2001), avaliando a expressão de β -catenina e E-caderina na progressão tumoral, também avaliou a capacidade proliferativa das células localizadas no fronte de invasão e nas partes centrais do tumor primário e metastático. O resultado observado foi que um elevado número de células marcadas com Ki-67, estava presente nas áreas centrais e metastáticas do tumor, apresentavam um padrão fenotípico de crescimento epitelial e a expressão de E-caderina e β -catenina eram preservada. Já as células isoladas presentes no fronte de invasão perderam a expressão do Ki-67. Com esses resultados, os autores inferiram que as células com aquisição de habilidades mesenquimais, durante a disseminação tumoral, não mostraram atividade proliferativa. Além disso, só as células tumorais disseminadas que mostraram um fenótipo epitelial parecem proliferar novamente (BRABLETZ et al. 2001). No trabalho de STOCKINGER et al. (2001), utilizando cultura de células epiteliais mamárias de camundongos, foi demonstrado que a perda da E-caderina concomitantemente com o aumento da B-catenina durante a carcinogênese contribui para o aumento na proliferação celular (STOCKINGER et al. 2001).

O uso do marcador de proliferação celular Ki-67 em estudos das neoplasias humanas têm sido amplamente empregado. O antígeno Ki-67 pertence a um grupo de proteínas nucleares não-histônicas localizadas na região 10q25 e está presente em células que estão dentro do ciclo celular, G1, S, G2 e mitose e ausente no estágio G0. A fosforilação da proteína Ki-67 ocorre durante a mitose e está associada com a condensação dos cromossomos e a separação das cromátides irmãs (KAUSCH et al. 2003; SCHOLZEN e GERDES 2000). O antígeno Ki-67 acumula-se na fase G1 do ciclo celular, onde ocorre com maior frequência. Durante a mitose, exibe uma associação com os cromossomos, demonstrando que o antígeno está presente no núcleo de células em proliferação (G1, S, G2 e Mitose) (BROWN e GATTER 1990; SCHOLZEN e GERDES 2000). A vantagem da utilização do Ki-67 como marcador de atividade proliferativa é a sua meia-vida de curta duração, com o antígeno sendo degradado uma hora ou menos após a mitose, garantindo que células que já tenham saído do ciclo celular não o apresentem (BROWN e GATTER 1990; SCHOLZEN e GERDES 2000; KAUSCH et al. 2003).

Os estudos publicados embora concordando em alguns pontos, como que a perda da expressão de E-caderina tem um papel fundamental na progressão, invasão, migração celular tumoral e esta diretamente relacionada com a EMT ainda assim se mostram confusos quando são relacionados com a proliferação celular. Poucos trabalhos tem avaliado a expressão da E-caderina com a atividade proliferativa em CEE. Outro ponto pouco explorado é se há diferença entre a expressão de E-caderina na parte

central do tumor e no fronte de invasão e como é essa relação com a proliferação celular. Embora tenha sido avaliada por alguns autores a expressão da E-caderina e a proliferação celular a ponto central do estudo não era exatamente essa relação entre fronte de invasão e a massa tumoral. A maioria dos estudos tem em comum o uso de modelos experimentais *in vitro* sempre utilizando linhagens celulares que nem sempre refletem o comportamento biologicamente correto embora se aproximando muito do real.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Diante do exposto, nosso trabalho tem como proposta avaliar a expressão da E-caderina no fronte de invasão de carcinomas epidermóides de esôfago e sua relação com a taxa de proliferação celular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a expressão de E-caderina e Ki-67 em células do fronte de invasão e da parte central do tumor em CEE, avaliando se existem diferenças na expressão desses marcadores entre as células do fronte de invasão e da parte central do tumor em CEE;

- Verificar a relação entre a expressão de E-caderina e atividade proliferativa em CEE;

- Avaliar a eficiência de métodos automatizados de imunoistoquímica e a viabilidade de reações com dupla marcação.

3 METODOLOGIA

3.1 CASUÍSTICA

O estudo compreende 58 casos de carcinoma epidermóide de esôfago operados no Centro de Pesquisa e Tratamento do Hospital A.C. Camargo, a partir do ano de 1980 até 2006, identificados por levantamento no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica. Todas as respectivas lâminas e blocos de parafina dos casos selecionados 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 corte original de todos os casos foi revisto antes de iniciar as reações de imunoistoquímica a fim de classificar a lesão e coletar os dados grau de diferenciação e tipo histológico da neoplasia. Além disso, foi feita a revisão dos prontuários médicos para a coleta e atualização dos dados clínicos e de evolução dos pacientes (SATO-KUWABARA 2010).

O projeto é retrospectivo e foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Instituição (nº. 1463/10), com a solicitação de dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido já que todas as amostras têm mais de cinco anos de coleta, o que desobriga a manutenção do bloco pela Instituição. Além disso, não foi permitido que o bloco de parafina se esgotasse e material residual sempre estará disponível para eventuais questões clínicas.

3.2 IMUNOISTOQUÍMICA

Todas as reações de imunoistoquímica foram realizadas de forma automatizada utilizando o equipamento Ventana BenchMark XT (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Os cortes convencionais de 3µm de espessura de cada caso foram obtidos por microtomia mecânica (Leica RN2255, LEICA) do bloco de parafina. Para as reações de dupla marcação e marcação simples foram utilizados os anticorpos anti-E-caderina 34/E-cadherin (BD Bioscience, CA) e anti-KI-67 *CONFIRM Ki-67* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) (Quadro 1). O sistemas de visualização utilizado nas reações de imunoistoquímica para os marcadores avaliados foi o *iVIEW DAB Detection*. Para as reações de dupla marcação, Ki-67 e E-caderina foram visualizadas com *Enhanced Alkaline Phosphatase Red Detection* e *iVIEW DAB Detection*, respectivamente. A marcação do Ki-67 exibe uma coloração vermelho-rosada e para E-caderina, uma coloração marrom-castanha. As reações sempre foram acompanhadas de controle positivo utilizando cortes de tonsila para Ki-67 e carcinoma ductal de mama para E-caderina, como sugerido pelos fabricantes dos anticorpos. Os controles negativos foram realizados pelo não uso do anticorpo primário com substituição por imunoglobulina não imune.

As reações de imunoistoquímica automatizada seguiram um protocolo estabelecido de acordo com os resultados obtidos da padronização. A desparafinização das lâminas foi feita aplicando *EZPrep*

(ROCHE) e aquecidas a 75°C por 8 minutos. Para a recuperação antigênica foi aplicado *Cell Conditioner* (ROCHE) por 8 minutos a 95°C e depois 64 minutos a 100°C. As lâminas são lavadas com *Reaction Buffer* (ROCHE) e incubadas por 4 minutos nessa solução. Em seguida foi aplicado *UV INHIBITOR* (ROCHE) nas lâminas por 4 minutos e depois lavadas com *Reaction Buffer*. Foi aplicada cerca de 100 µL do anticorpo E-caderina previamente diluído e transferido para um *Prep Kit*, que é um dispensador capaz de ser preenchido com anticorpos diluídos. As lâminas então foram incubadas por 32 minutos, depois uma nova lavagem com *Reaction Buffer*. *UV HRP UNIV MULT* (ROCHE) foi aplicada nas lâminas e incubada por 8 minutos. Foi realizada outra lavagem com *Reaction Buffer* e as lâminas foram incubadas por 8 minutos com *UV DAB* (ROCHE) e *UV DAB H₂O₂* (ROCHE), lavadas com *Reaction Buffer* e aplicado *UV COPPER* (ROCHE) por 4 minutos e novamente lavada com *Reaction Buffer*. As lâminas foram retiradas do equipamento e submetidas a processos de desidratação e montagem automatizada no equipamento *Tissue-Tek® Prisma®/Film®* (SAKURA).

Para a dupla marcação, a reação continuou depois da aplicação de *UV COPPER*. As lâminas foram novamente aquecidas a 90°C por 4 minutos e a 37°C por mais 4 minutos. Foi aplicado cerca de 100 µL do anticorpo pronto para uso de *CONFIRM KI-67* e incubado por 32 minutos. Após o tempo de incubação as lâminas foram lavadas com *Reaction Buffer* e foi aplicado *UV Red UNIV MULT* (ROCHE) e incubado por 12 minutos. As lâminas foram lavadas com *Reaction Buffer* e aplicado *UV*

Red Enhancer (ROCHE) e incubado por 4 minutos, depois aplicado *UV Fast Red A* (ROCHE) e *UV Red Naphthol* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) e incubado por 8 minutos. Então *UV Fast Red B* (ROCHE) foi aplicada e incubada por 8 minutos. Após a incubação foi feita uma lavagem com *Reaction Buffer* e aplicado *HEMATOXYLIN II* (ROCHE) e incubado por 8 minutos. As lâminas foram lavadas com *Reaction Buffer* e foi aplicado *BLUING REAGENT* (ROCHE) e incubadas por 4 minutos e, então a ultima lavagem com *Reaction Buffer*. Normalmente uma reação de imunoistoquímica que utiliza fosfatase alcalina não é recomendado passar por uma sequencia graduada de álcool por diminuir a eficiência da reação e consequentemente interferir na interpretação do resultado. No entanto, o sistema de visualização utilizado nas reações permite essa etapa da desidratação pela sequencia de álcool sem comprometer a reação.

3.3 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

A leitura das lâminas foi realizada no aparelho *Aperio Scancope XT*, da Aperio (Vista, CA, EUA), que é um sistema composto por um microscópio automatizado com lentes objetivas de 20x, com capacidade de reconhecer o tecido e dar foco automaticamente, acoplado a uma câmera com resolução de 50.000 *pixels* por polegada (0,5 μm *per pixel*) e a um software de computador que analisa as lâminas de acordo com parâmetros pré-estabelecidos. O algoritmo utilizado para analisar a dupla marcação foi o

ColorDeconvolution, que tem como principal função decompor as imagens em até 3 canais diferentes de acordo com uma calibração prévia (Figura 2). O algoritmo trabalha com o sistema RGB (*Red, Green, Blue*) conhecido também como sistema cor-luz ou sistema aditivo.

Antes de iniciar a análise das imagens, foi necessário fazer uma calibração do algoritmo ditando as cores bases e suas leituras intermediárias que devem ser identificadas por cada canal. Para isso, fizemos uma reação de imunoistoquímica para cada sistema de visualização e sem contra-coloração usando o mesmo anticorpo que poderia ser contra qualquer proteína desde que seja sabido ser positivo no tecido usado como calibração. No nosso caso foi usado o anticorpo contra E-caderina, o mesmo usado nas reações de dupla marcação. Desta forma tínhamos uma lâmina apresentando apenas a marcação revelada com o *iVIEW DAB Detection* e outra por *Enhanced Alkaline Phosphatase Red Detection*. As regiões que apresentavam positividade foram selecionadas no software e os valores obtidos de cada lâmina usados para a calibração do algoritmo.

Após calibrar o algoritmo, a análise das lâminas foi feita em duas etapas. A primeira etapa foi selecionar as áreas correspondentes ao fronte de invasão. Feita a seleção, no algoritmo foi feita a escolha dos canais correspondentes para E-caderina, ou seja, o canal que reconhece o padrão de cor do DAB e correspondente para Ki-67, canal que reconhece o padrão de cor da fosfatase alcalina. Na segunda etapa, foi feita a seleção das regiões correspondentes ao centro do tumor e em seguida a escolhas dos canais, como procedido no fronte de invasão.

A parte central do tumor foi definida como as áreas tumorais de grande extensão e de preferência mais próximos da camada epitelial superficial (Figura 3). Na definição de frente de invasão, admitimos blocos de células tumorais, no máximo de 20 células, e no limite profundo do tumor (Figura 4).

A análise feita pelo algoritmo *ColorDeconvolution* é baseada na intensidade e numero de pixels positivos de acordo com o espectro de cor previamente determinado. O resultado da análise é automaticamente dividido em três categorias principais e pré-determinadas pelo software: fraco positivo, médio positivo e forte positivo (Figura 5) e um escore que é determinado por uma equação que agrupa todos as categorias. A equação é representada pela formula: $1 \times (\text{porcentagem de fraco positivo}) + 2 \times (\text{porcentagem de médio positivo}) + 3 \times (\text{porcentagem de forte positivo})$.

Para cada caso analisado pelo *ColorDeconvolution* foi gerado 4 valores de escore, um do frente de invasão para Ki-67, outro do frente de invasão para e-caderina, outro da parte central do tumor para Ki-67 e um da parte central do tumor para e-caderina. Esses resultados então foram submetidos à análise estatística.

Para analisar as reações de imunoistoquímica simples foram usados dois algoritmos distintos. Para avaliar a E-caderina, proteína com padrão de marcação em membrana, foi utilizado o algoritmo *MembraneV1*. A análise precedeu de forma semelhante ao descrito para o *ColorDeconvolution*, ou seja, selecionando áreas da parte central do tumor e depois nos frentes de

invasão, gerando 2 resultados. Os resultados gerados pelo software são baseados na intensidade da marcação e delineação da membrana. Os resultados são dispostos em 1+ (fraco), 2+ (moderado) e 3+ (forte) representando a intensidade e porcentagem de pixels positivos. Células tumorais são classificadas como 1+ uma marcação parcial na membrana ou marcação fraca, para 2+ são classificadas as células tumorais que apresentam uma marcação moderada na membrana e para 3+ células tumorais com marcação forte na membrana. De acordo com a porcentagem, é classificado como um escore 3+ quando 10% ou mais das células tumorais são marcadas com uma intensidade 3+. Para um escore 2+ é necessário que 10% ou mais das células estão marcadas com intensidade 2+ ou mais. Para ser considerado um escore 1+ é necessário que mais de 10% das células tenham uma marcação 1+ ou mais e para um escore 0, menos de 10% das células devem ter uma marcação 1+ ou mais. Para normalizar os resultados nós aplicamos a mesma regra do escore usado para o *ColorDeconvolution*, atribuindo pesos e somando os resultados.

Já o Ki-67, que tem sua expressão no núcleo, foi usado o algoritmo *NuclearV1*. Sua análise é similar ao *MembraneV1* inclusive o resultado gerado também é categorizado em 1+, 2+ e 3+. Para essa análise também normalizamos os resultados aplicando a regra do escore.

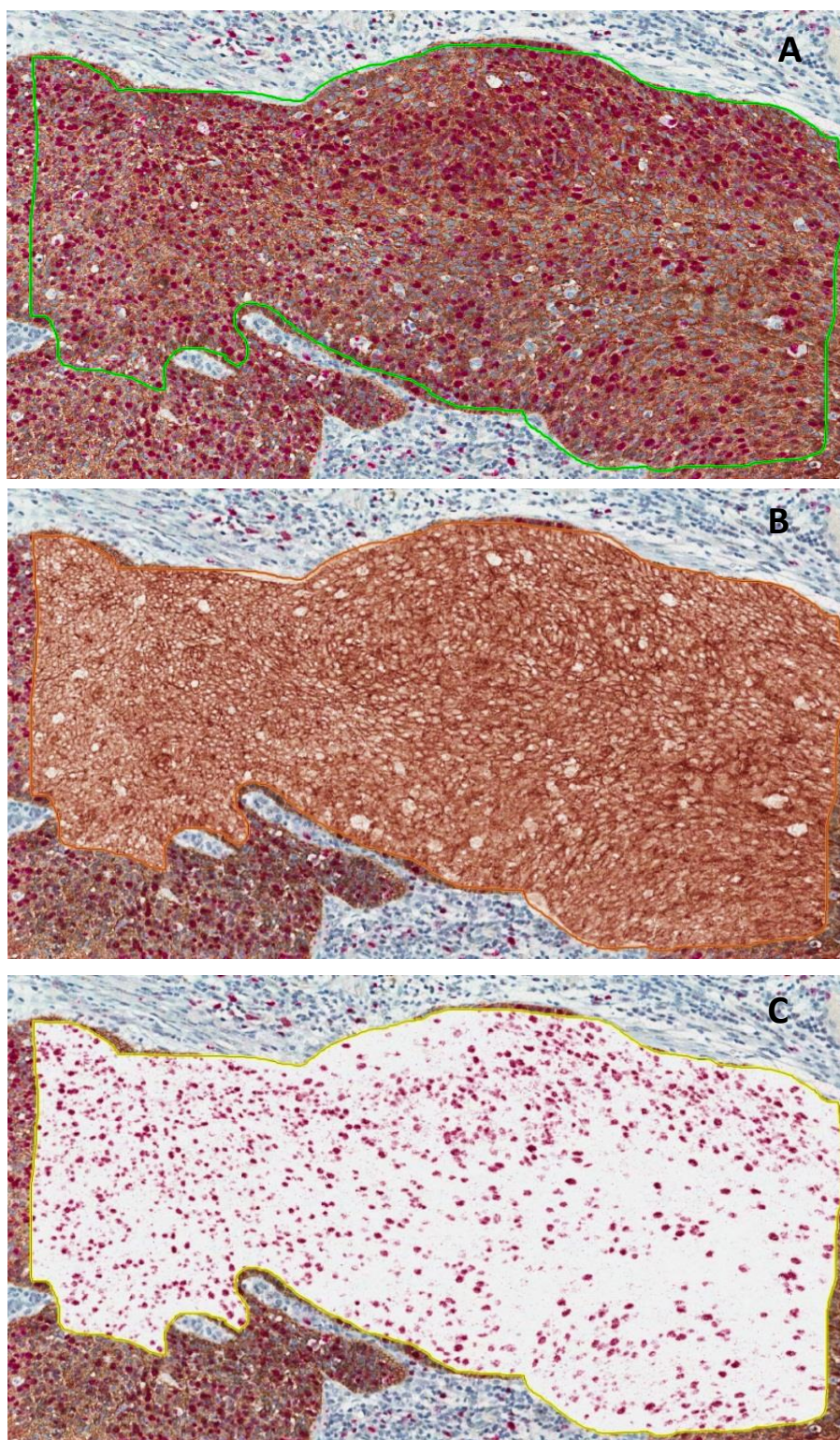


Figura 2 - Representação esquemática da decomposição de cores do algoritmo *ColorDeconvolution*. A) Seleção da área de interesse que será analisada. B) Decomposição da imagem para exibir apenas as cores do espectro do DAB. C) Decomposição da imagem para exibir apenas as cores do espectro da fosfatase alcalina.

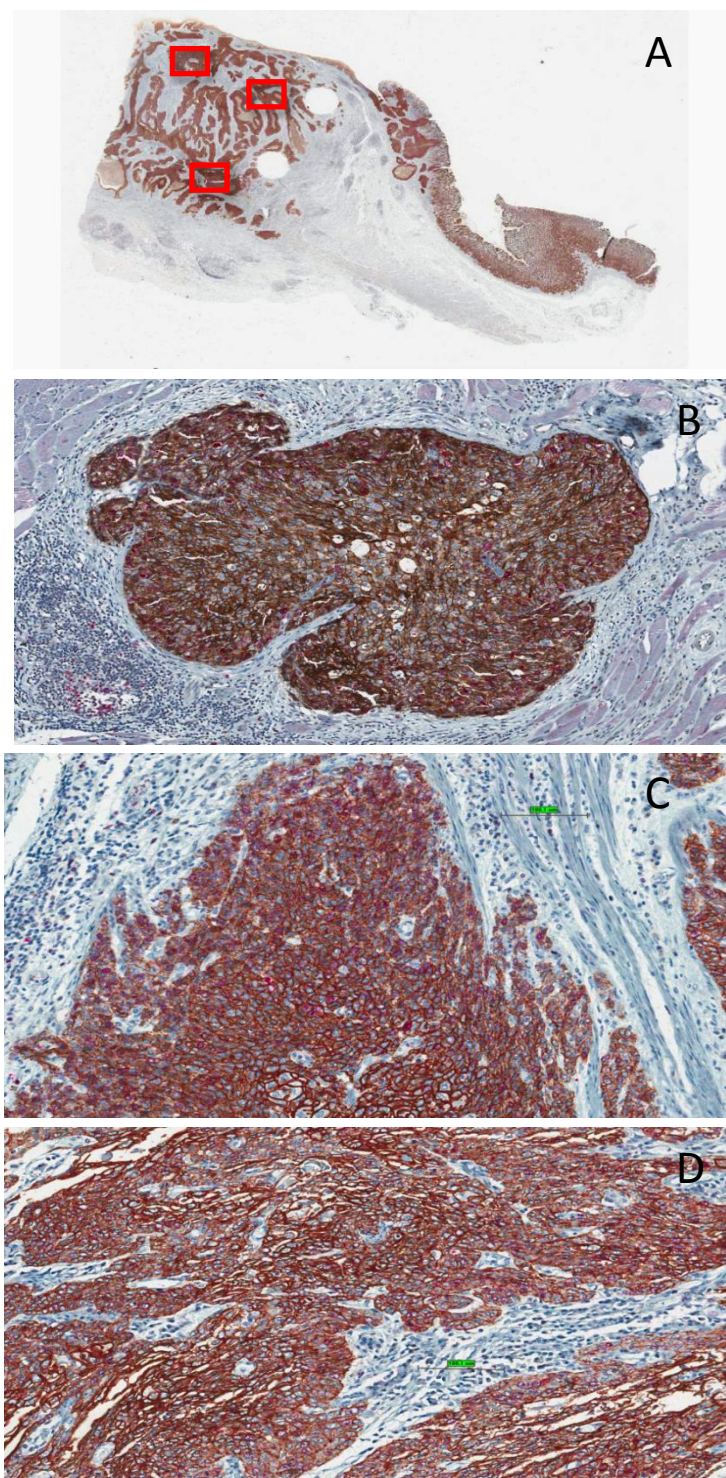


Figura 3 - Representação de áreas centrais de uma amostra de CEE com dupla marcação para E-caderina na membrana e Ki-67 no núcleo. A E-caderina foi visualizada com DAB, coloração marrom-castanha e o Ki-67 com fosfatase alcalina, coloração avermelhada. Os retângulos vermelhos exemplificam as áreas consideradas como partes centrais do tumor. A) Representação do corte total do caso. B-D) Representação de partes centrais do tumor analisadas no estudo.

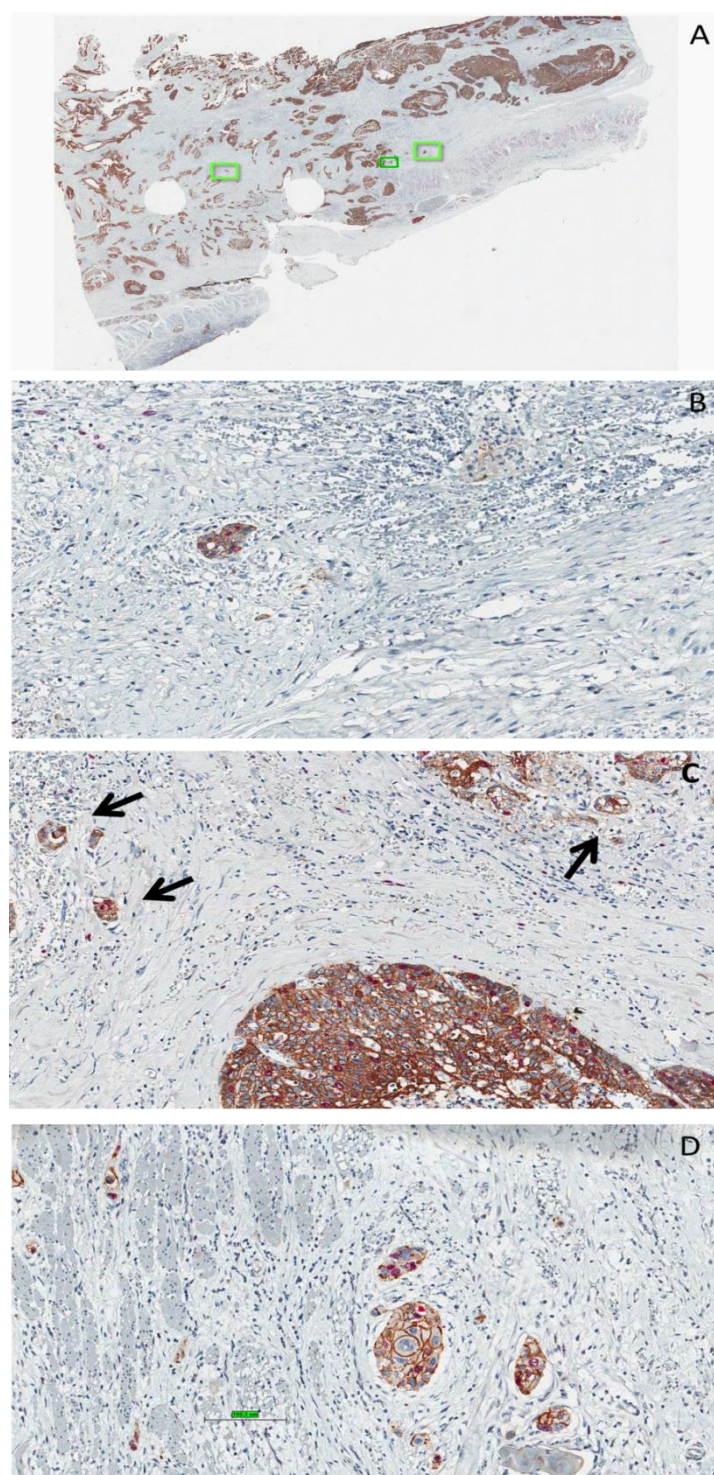


Figura 4 - Representação do fronte de invasão de um CEE com dupla marcação para E-caderina na membrana e Ki-67 no núcleo. A E-caderina foi visualizada com DAB, coloração marrom-castanha e o Ki-67 com fosfatase alcalina, coloração avermelhada. Os retângulos verdes exemplificam as áreas consideradas frentes de invasão do tumor. A) Representação do corte total do caso. B-D) Representação dos frentes de invasão do tumor. C) As setas indicam os frentes de invasão tumoral.

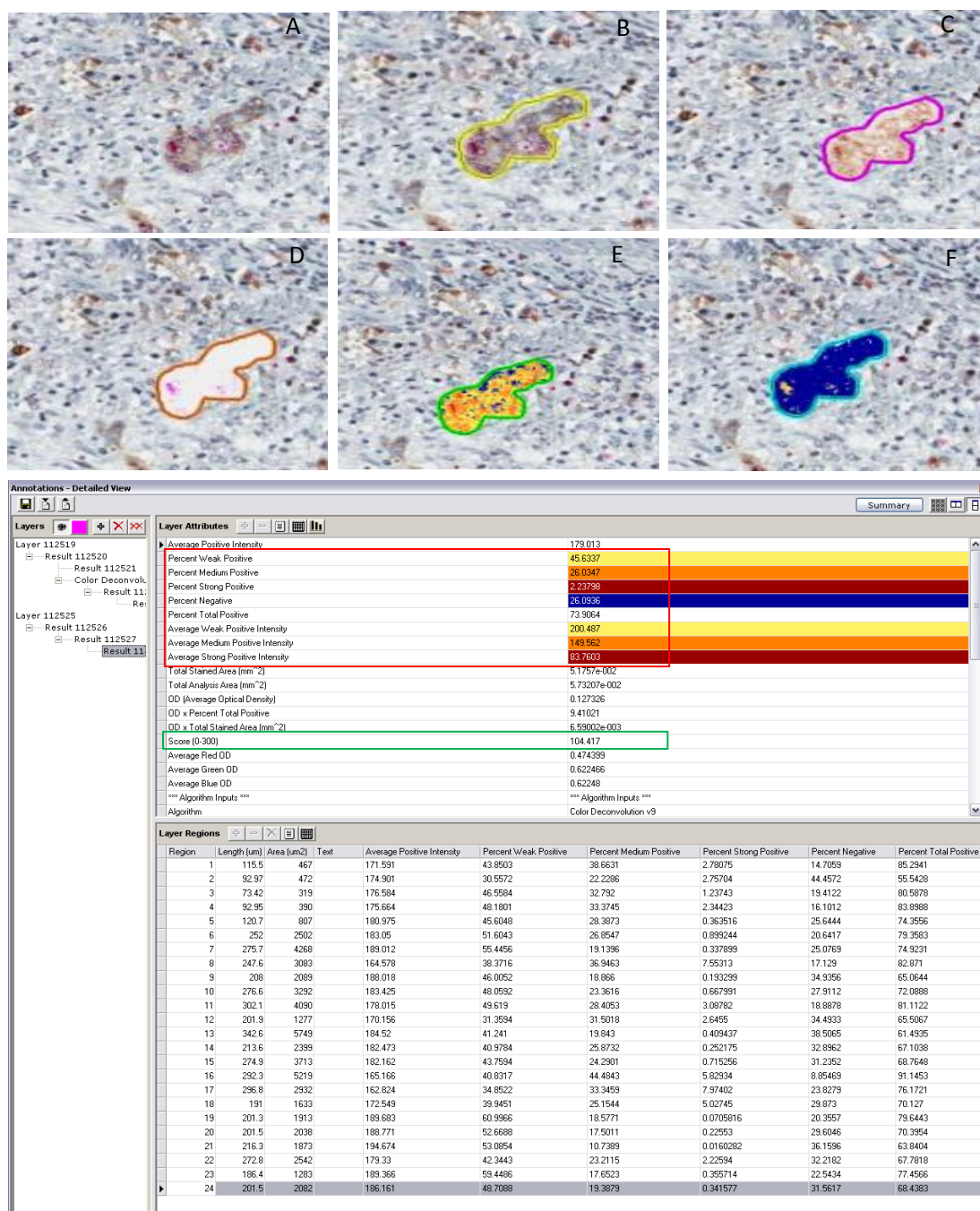


Figura 5 - Representação da forma de análise e dos resultados gerados pelo algoritmo *ColorDeconvolution*. A) Representa a nossa definição para frente de invasão. B) Seleção da área que será analisada. C) Decomposição da imagem em DAB, ou seja, somente E-caderina. D) Decomposição da imagem em fosfatase alcalina, ou seja, somente Ki-67. E) Análise da intensidade e positividade de pixels para E-caderina. F) Representação da intensidade e positividade de pixels para Ki-67. G) Representação dos resultados gerados pelo algoritmo. Em destaque no retângulo vermelho estão os resultados da intensidade de pixels positivos, representados em diferentes cores (amarelo, alaranjado, vermelho e azul) que correspondem a área analisada. No retângulo verde está o Score, resultado usado no estudo.

3.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA

As reações de imunofluorescência com marcação dupla foram realizadas de forma manual. Para uma reação de imunofluorescência eficiente, foi necessário um processo de desparafinização mais rigoroso passando por três banhos de xilol a 60°C, por 30 minutos cada, três banhos de xilol a temperatura ambiente por 5 minutos cada e, em seguida, uma passagem rápida por uma sequência de álcool 100%, 90%, 70% e 50%. Em seguida, as lâminas passaram por um banho em hidróxido de amônio a 10% diluído em álcool 95% por 20 min a temperatura ambiente para retirar possíveis pigmentos fenólicos da amostra.

O passo seguinte foi a recuperação antigênica usando panela de pressão com o tampão de recuperação TRIS + EDTA pH9,0 por 40 minutos. Após o processo de recuperação antigênica, foi feito o passo de bloqueio de proteínas inespecíficas usando o reagente *Protein Block (DAKO)* por 20 minutos. Para a incubação com anticorpo primário, foi feita uma preparação com um anticorpo contra E-caderina produzido em coelho e anticorpo contra Ki-67 produzido em camundongo, diluídos no reagente *Diluent (DAKO)*(Quadro 1). A escolha por usar anticorpos produzidos em animais diferentes permite uma incubação simultânea e assim as condições de tempo e temperatura permanecem as mesmas para os dois anticorpos. A incubação dos anticorpos foi de 1 hora em câmara úmida e em ambiente escuro.

Após a incubação, as lâminas passaram por sucessivos banhos com tampão *Wash Buffer 1x* (DAKO). Em seguida foi feita a incubação com os fluoróforos por 1 hora em câmara úmida e em ambiente escuro. O fluoróforo *Alexa 488* (Life Tech) usado reagiu com anticorpos produzidos em coelho, reconhecendo o anticorpo contra E-caderina. Já o *Alexa 555* (Life Tech) reconhece anticorpos produzidos em camundongos, ou seja, reagiu com o anticorpo contra Ki-67. Em seguida, foi feita uma nova sucessão de banhos em *Wash Buffer* e água destilada. O próximo passo foi a montagem das lâminas em meio aquoso usando o reagente *VectaShield* que um dos componentes da sua formula é o DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), que é um composto que se liga fortemente a regiões do DNA ricas em A e T, largamente utilizado e bem estabelecido para evidenciar núcleos em reações de imunofluorescencia. As reações de imunofluorescencia foram visualizadas utilizando o microscópio confocal Fluoview v10i (OLIMPUS).

4 ANALISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos das análises das reações de imunoistoquímica de dupla marcação e marcação simples foram organizados em tabelas e a análise estatística foi realizada utilizando o programa de computador *IBM SPSS Statistics Desktop* versão 17.0 (IBM). Foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Wilcoxon para analisar separadamente os resultados gerados pelos algoritmos *ColorDeconvolution*, *membranev1* e *nucleov1* das análises das reações de dupla marcação e marcação simples. Para a correlação entre os resultados das reações de imunoistoquímica de dupla marcação e de marcação simples foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman.

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

5 RESULTADOS

5.1 CASUÍSTICA

O levantamento dos dados obtidos dos prontuários mostrou que das 58 amostras, 8 (14%) eram mulheres e 50 (86%) homens e a idade variou de 30 a 70 anos, com a média de 56,90 anos.

De acordo com o grau histológico, 17 (29%) casos foram classificados como bem diferenciados (G1), 26 (45%) como moderadamente diferenciado (G2), 15 (26%) como pouco diferenciado (G3).

A análise do nível de infiltração mostrou que 3 casos (5%) atingiram o corium da mucosa, 15 casos (26%) a camada muscular e 40 casos (69%) a camada adventícia. Em 14 casos (24%) teve invasão venosa presente e em 44 casos (76%) não pode ser observado. A presença de invasão linfática esteve presente em 35 casos (60%) e não pode ser observado em 23 casos (40%) das amostras. Os resultados dos dados clinico-patológicos estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Sumário dos dados clinico-patológicos dos 58 casos de CEE

Variável	Categoria	Numero de casos (%)
Gênero (n=58)	Masculino	50 (86%)
	Feminino	8 (14%)
Grau Histológico (n=58)	Bem diferenciado (G1)	17 (29%)
	Moderadamente diferenciado (G2)	26 (45%)
	Pouco diferenciado (G3)	15 (26%)
Nível de Infiltração (n=58)	Lamina Basal	3 (5%)
	Camada muscular	15 (26%)
	Camada adventícia	40 (69%)
Invasão Venosa (n=58)	Presente	14 (24%)
	Não observado	44 (76%)
Invasão Linfática (n=58)	Presente	35 (60%)
	Não Observado	23 (40%)

analisados nesse estudo.

5.2 EXPRESSÃO IMUNOISTOQUIMICA

5.2.1 Imunoistoquímica - dupla marcação

Para as reações de dupla marcação avaliadas com o algoritmo *ColorDeconvolution* foi aferido a porcentagem e intensidade de pixels positivos e usado o resultado do Escore. Para cada caso 4 resultados são gerados: Ki-67 no fronte de invasão, Ki-67 na parte central do tumor, E-caderina no fronte de invasão e E-caderina na parte central do tumor. Os resultados de todos os casos estão dispostos no Anexo 1.

Dos 58 casos analisados, com relação a E-caderina, 51 (87,9%) casos mostraram uma maior expressão no centro tumoral quando comparado com o frente de invasão. E, em apenas 7 (12,1%) casos a expressão no frente de invasão foi maior que no centro tumoral (Figura 6 e 7). De acordo com nossas análises, foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre a expressão de E-caderina na parte central do tumor e no frente de invasão, apresentando escores com valores medianos de 184,2 e 163,0, respectivamente (Tabela 2, Figura 8).

Para a análise da expressão de Ki-67, 19 (32,7%) casos apresentaram uma expressão maior no centro do tumor quando comparado com o frente de invasão. Em 39 (67,3%) casos, houve uma maior expressão no frente de invasão do que no centro tumoral (Figura 6 e 9). No entanto, mostrando tendência a significância estatística ($p = 0,052$), a análise da taxa de proliferação, representada pela análise da expressão do Ki-67 mostrou escores com valores medianos de 6,8 e 8,1 para a parte central do tumor e para o frente de invasão, respectivamente (Tabela 2, Figura 10).

Ao analisar as reações de imunoistoquímica, alguns casos chamaram nossa atenção por terem resultados discrepantes das médias. Isso pode ser observado na Figura 10, que mostra a comparação entre a expressão do Ki-67 no frente de invasão com a expressão na parte central do tumor por imunoistoquímica de dupla marcação. Ao comparar a expressão da E-caderina no frente de invasão e na parte central do tumor pela imunoistoquímica de dupla marcação, também foi possível observar uma

discrepância com relação aos valores médios em alguns casos de CEE (Figura 8).

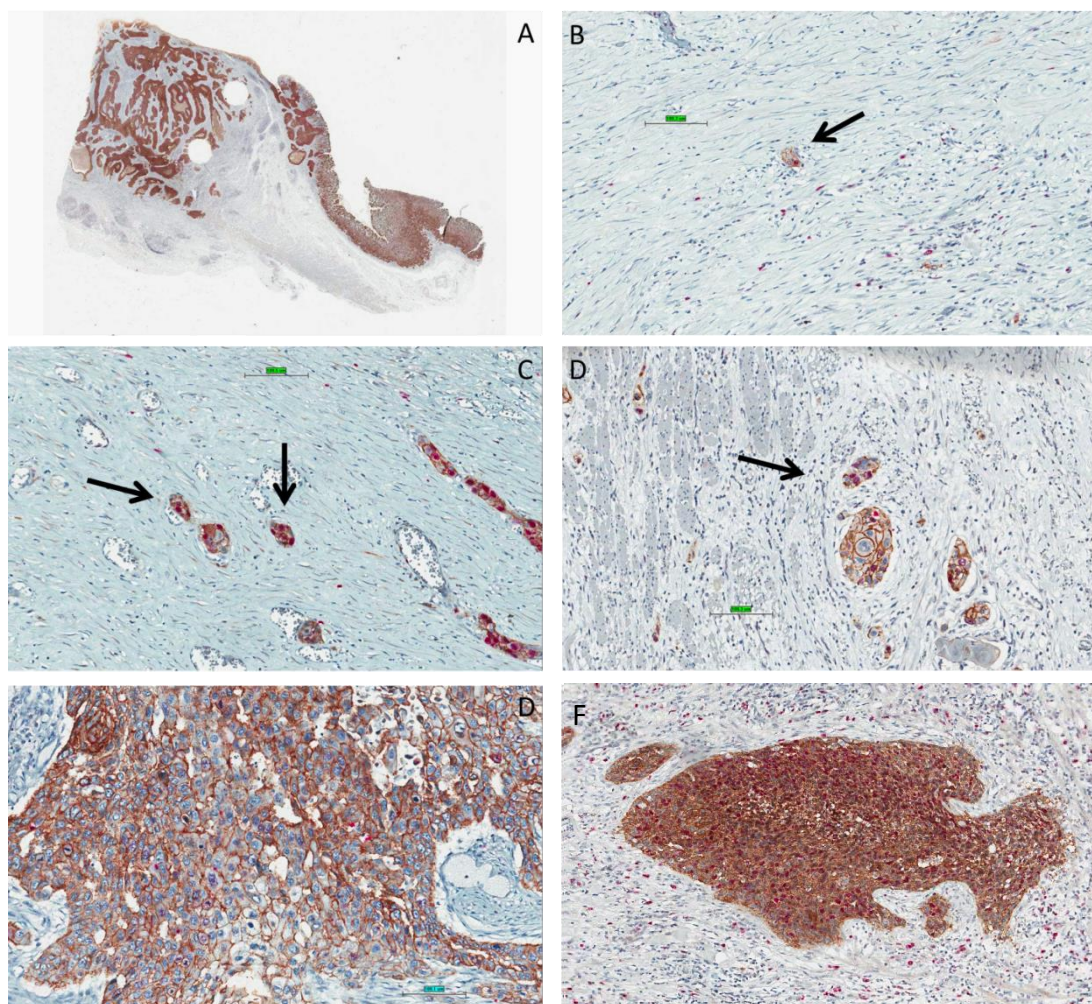


Figura 6 - Representação das reações de imunoistoquímica de dupla marcação para E-caderina e Ki-67 em amostra de CEE. A) Corte inteiro do caso. B-D) Representação do fronte de invasão do tumor indicados pelas setas. E e F) Representação da parte central do tumor.

Frequência de casos que apresentaram Expressão de E-caderina em IHQ Dupla Marcação

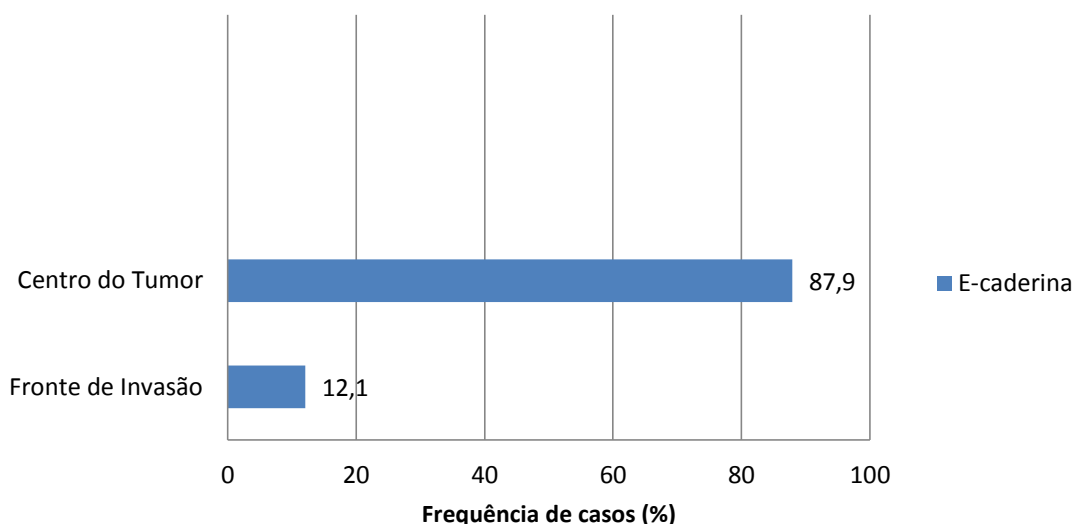


Figura 7 - Frequência da expressão de E-caderina na parte central do tumor e no frente de invasão em amostras de CEE mostrando onde a expressão de cada proteína foi maior.

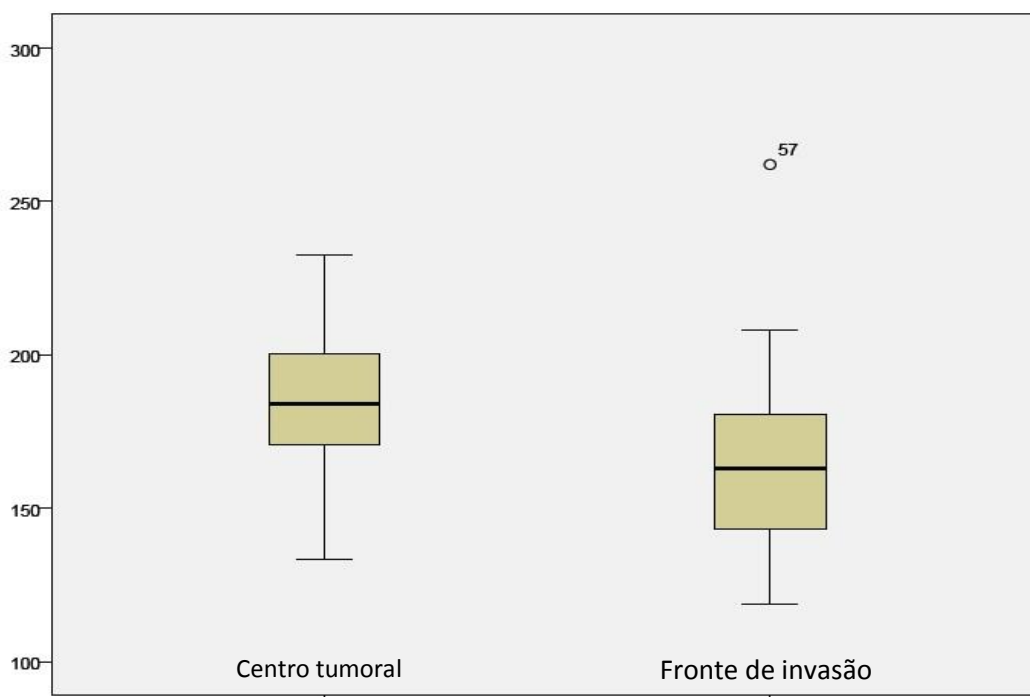
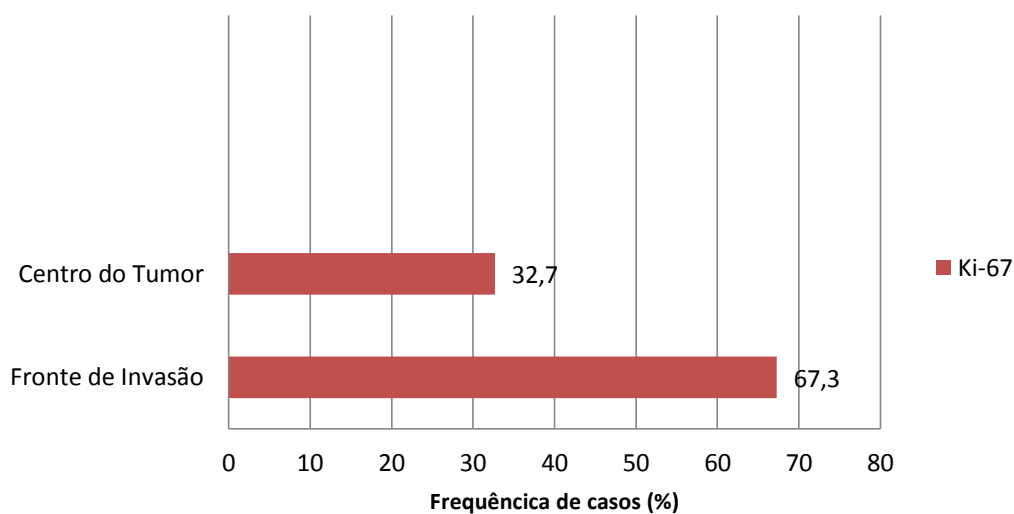


Figura 8 - Boxplot comparando os resultados das reações de dupla marcação em CEE para E-caderina na parte central do tumor e no frente de invasão. Os números seguidos dos “outliers” corresponde ao caso analisado; o eixo y corresponde ao valor do escore.

Frequencia de casos que apresentaram Expressão de Ki-67 em IHQ Dupla Marcação



no
fronte de invasão em amostras de CEE mostrando onde a expressão de
cada proteína foi maior.

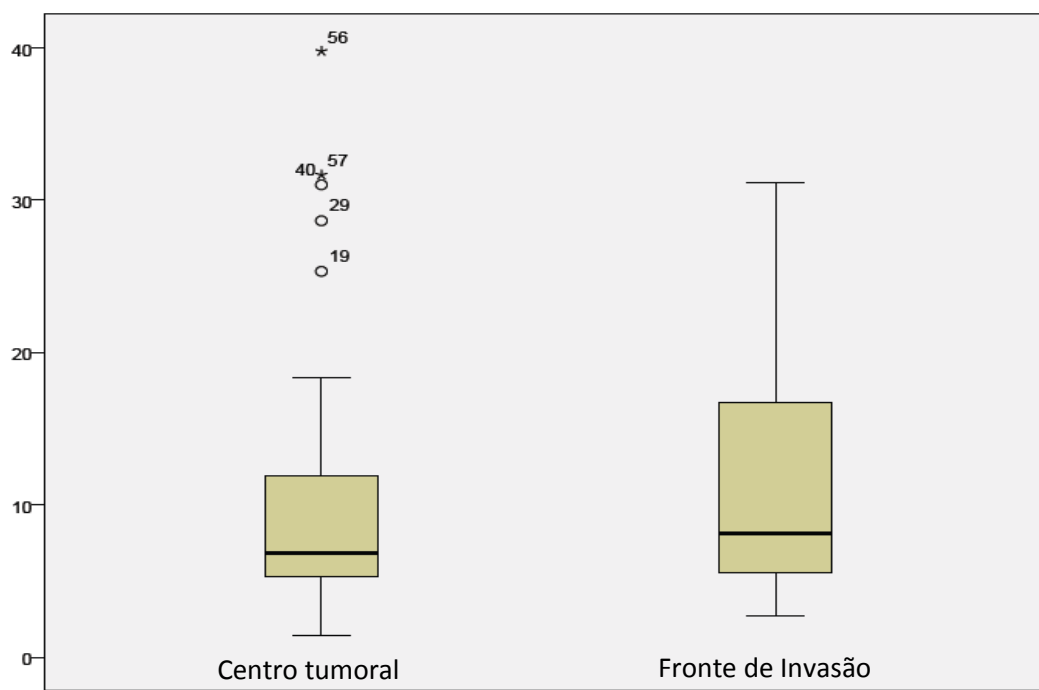


Figura 10 - Boxplot comparando os resultados das reações de dupla marcação em CEE para Ki-67 na parte central do tumor e no frente de invasão. Os números seguidos dos “outliers” corresponde ao caso analisado; o eixo y corresponde ao valor do escore.

5.2.2 Imunoistoquímica – marcação simples

Durante as análises das reações de dupla marcação com o algoritmo *ColorDeconvolution* surgiram algumas dúvidas. Foi levantada a hipótese do algoritmo não distinguir totalmente uma coloração da outra já que a coloração marrom-castanho do DAB ter um espectro de cor próximo do vermelho, coloração exibida pela fosfatase alcalina. Essa possível falha no reconhecimento das cores poderia interferir nos resultados dos escores. Para isso decidimos proceder com reações de marcação simples utilizando os mesmo anticorpos e sistemas de visualização usados nas reações de dupla marcação.

A análise das reações de imunoistoquímica de marcação simples foi feita utilizando algoritmos diferentes para cada tipo de marcador, devido ao padrão de marcação. Para a análise da E-caderina, que tem sua expressão preferencialmente na membrana, utilizamos o algoritmo *MembraneV1*. Dos 58 casos analisados, 41 (70,7%) casos apresentavam uma maior expressão de E-caderina na parte central do tumor, quando comparado com o fronte de invasão. E, em apenas 17 (29,3%) casos foi registrado uma maior expressão no fronte de invasão quando comparado com a parte central do tumor (Figuras 11 e 12).

Para a análise do Ki-67, utilizando o algoritmo específico para análise de núcleo, o *NuclearV1*, 14 (24,2%) dos 58 casos apresentavam uma maior expressão da proteína na parte central do tumor quando comparado com o fronte de invasão. Por outro lado, em 41 (70,7%) casos a maior expressão foi confirmada no fronte de invasão e, em 3 (5,2%) casos a expressão da

proteína foi semelhante tanto no fronte de invasão quanto na parte central do tumor (Figuras 13 e 14).

Os valores medianos do escore resultantes da análise das reações de imunohistoquímica simples para E-caderina para a parte central do tumor e o fronte de invasão foram 202,9 e 187,4 respectivamente (Figura 15). Já os resultados da análise do Ki-67 foram 3,7 e 9,4 para a parte central do tumor e para o fronte de invasão, respectivamente (Figura 16). Tanto para a análise da E-caderina quanto para a análise do Ki-67, a diferença entre a expressão na parte central do tumor e no fronte de invasão foi estatisticamente significativos ($p < 0,001$). Tais resultados estão sumarizados na Tabela 2.

A análise das reações de marcação simples também apresentaram resultados do escore discrepantes das médias, como pode ser observado na Figura 16, que mostra a comparação dos valores do escore da análise do Ki-67 na parte central do tumor e no fronte de invasão. A Figura 15, mostra a comparação dos valores do escore gerados pela análise da E-caderina na parte central do tumor e no fronte de invasão. A Figura 17 é uma representação do caso número 56 de nossa casuística, um dos casos que nos chamou a atenção por apresentar uma maior expressão de E-caderina no fronte de invasão quando comparado ao centro do tumor e uma expressão de Ki-67 maior no centro do tumor do que no fronte de invasão.

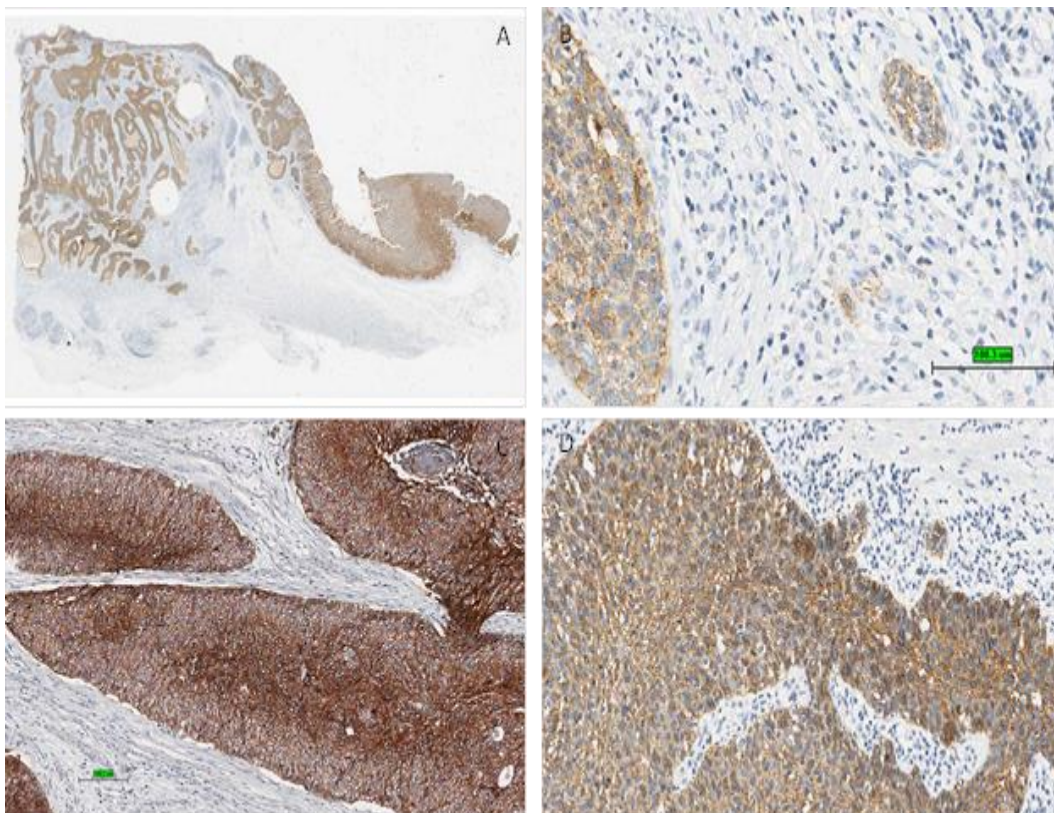


Figura 11 - Representação das reações de imunoistoquímica de marcação simples para E-caderina em amostras de CEE A) Corte inteiro do caso. B) Representação do fronte de invasão do tumor (seta). C e D) Representação da parte central do tumor.

Frequencia de casos que apresentaram Expressão de E-caderina em IHQ Marcação Simples

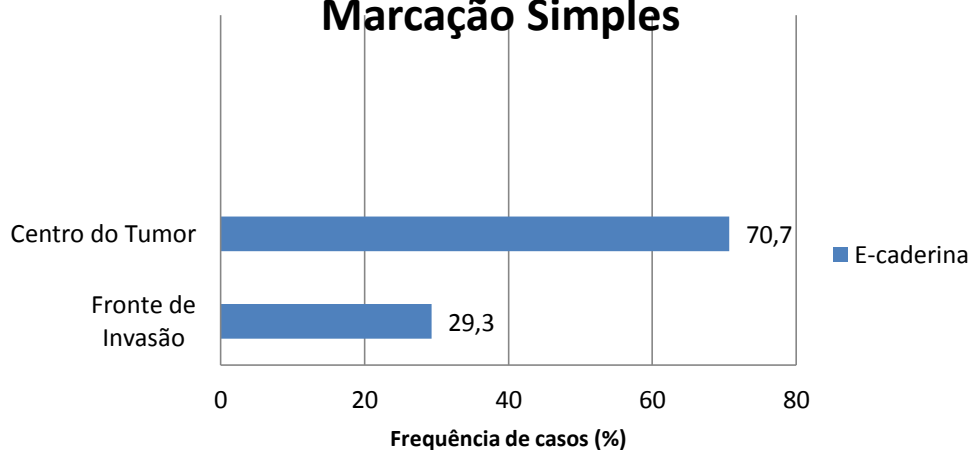


Figura 12 - Frequência da expressão de E-caderina na parte central do tumor e no fronte de invasão em amostras de CEE mostrando onde a expressão de cada proteína foi maior.

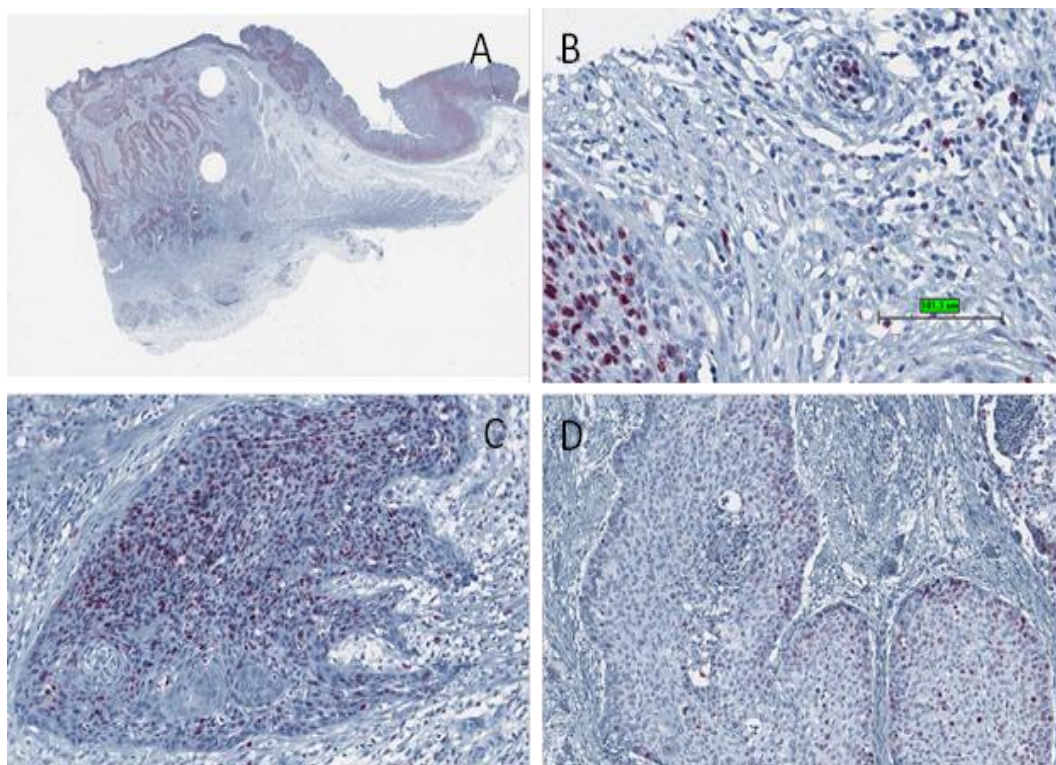


Figura 13 - Representação das reações de imunoistoquímica de marcação simples para Ki-67 em amostras de CEE. A) Corte inteiro do caso. B) Representação do fronte de invasão do tumor (seta). C e D) Representação da parte central do tumor.

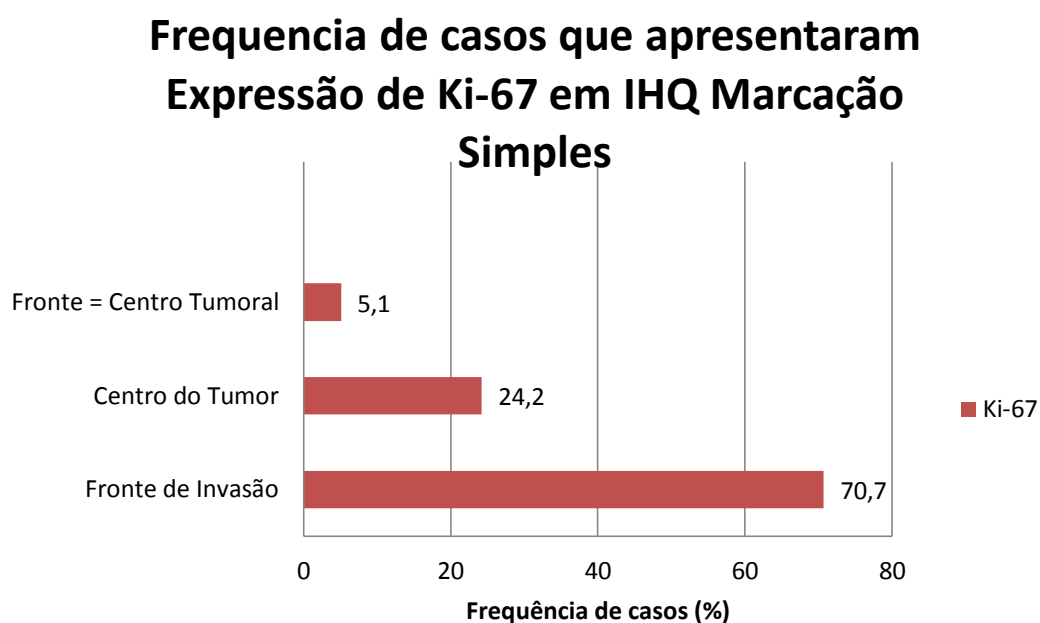


Figura 14 - Frequência da expressão de Ki-67 na parte central do tumor e no fronte de invasão em amostras de CEE mostrando onde a expressão de cada proteína foi maior.

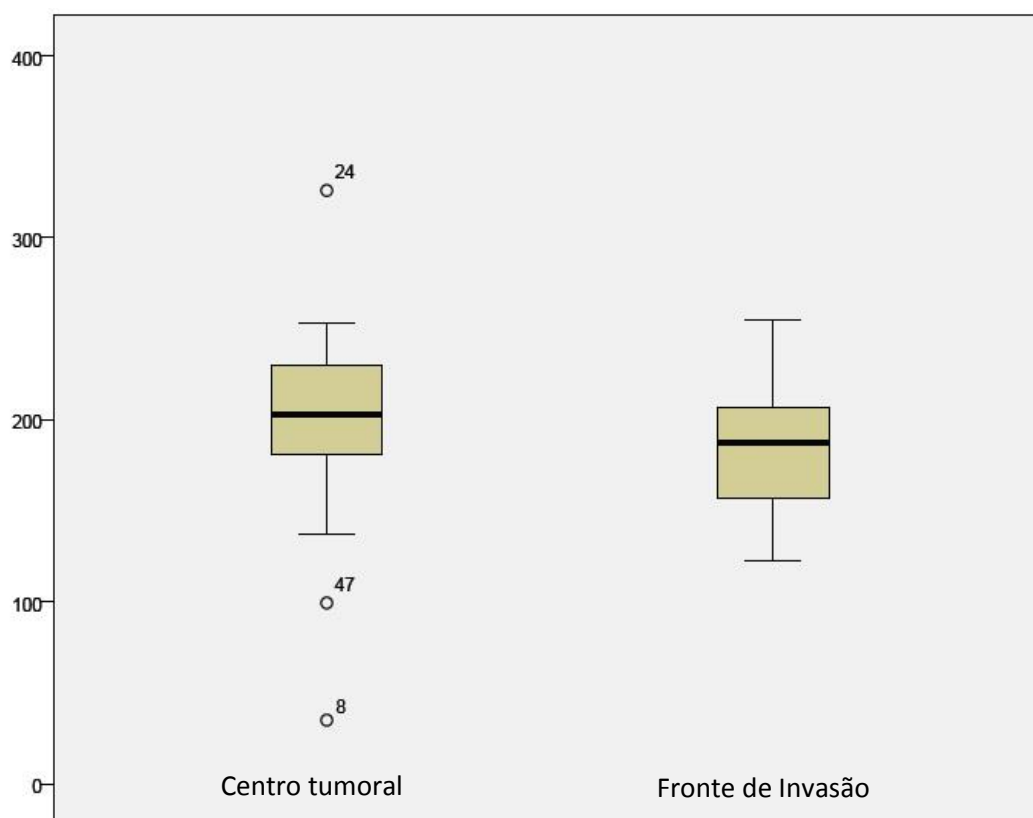


Figura 15 - Boxplot comparando os resultados das reações de marcação simples em CEE para E-caderina na parte central do tumor e no frente de invasão. Os números seguidos dos “outliers” corresponde ao caso analisado; o eixo y corresponde ao valor do escore.

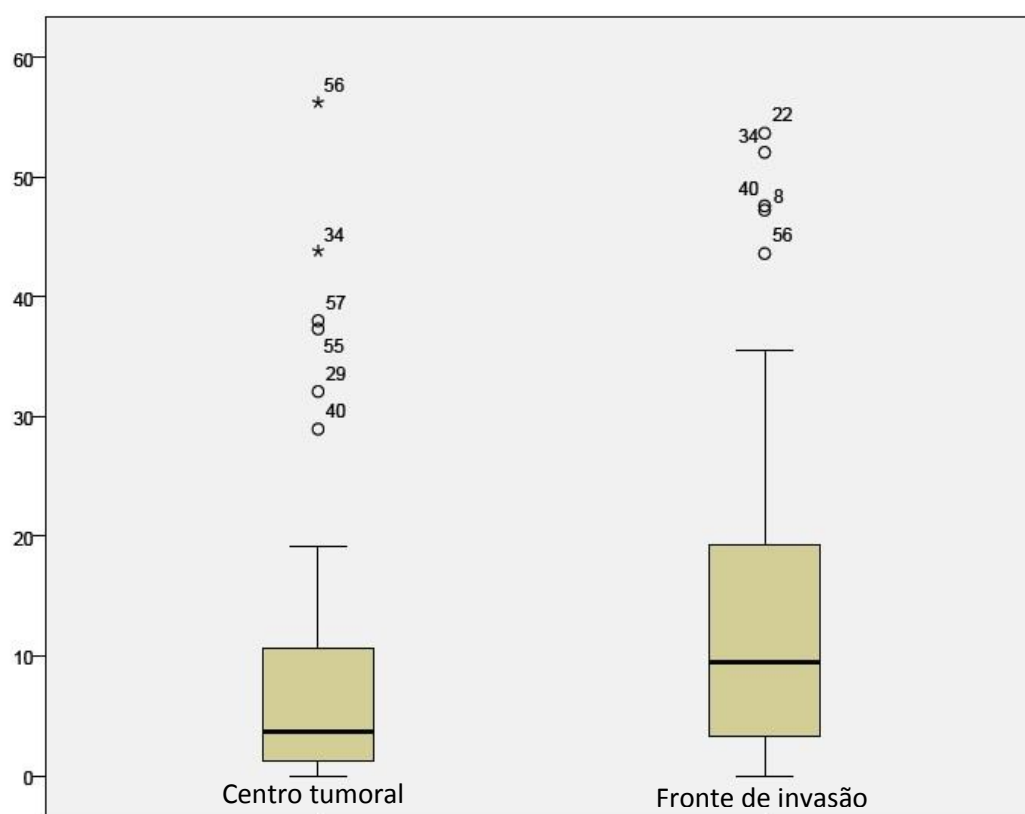


Figura 16 - Boxplot comparando os resultados das reações de marcação simples em CEE para Ki-67 na parte central do tumor e no frente de invasão. Os números seguidos dos “outliers” corresponde ao caso analisado; o eixo y corresponde ao valor do escore.

Tabela 2 – Valores medianos e interquartis das reações de imunoistoquímica de dupla marcação e marcação simples na parte central do tumor e no frente de invasão.

	Centro do tumor	Fronte de invasão	P (*)
	Média (P25-P75)	Média (P25-P75)	
Dupla Marcação			
Ki-67	6.8 (5.3 – 12.0)	8.1 (5.5 – 16.8)	0.052
E-caderina	184.2 (170.2 – 200.6)	163.0 (143.1 – 180.7)	< 0.001
Marcação Simples			
Ki-67	3.7 (1.2 – 10.9)	9.4 (3.1 – 19.9)	< 0.001
E-caderina	202.9 (181.2 – 230.4)	187.4 (156.2 – 207.5)	< 0.001

(*) Wilcoxon signed ranks test.

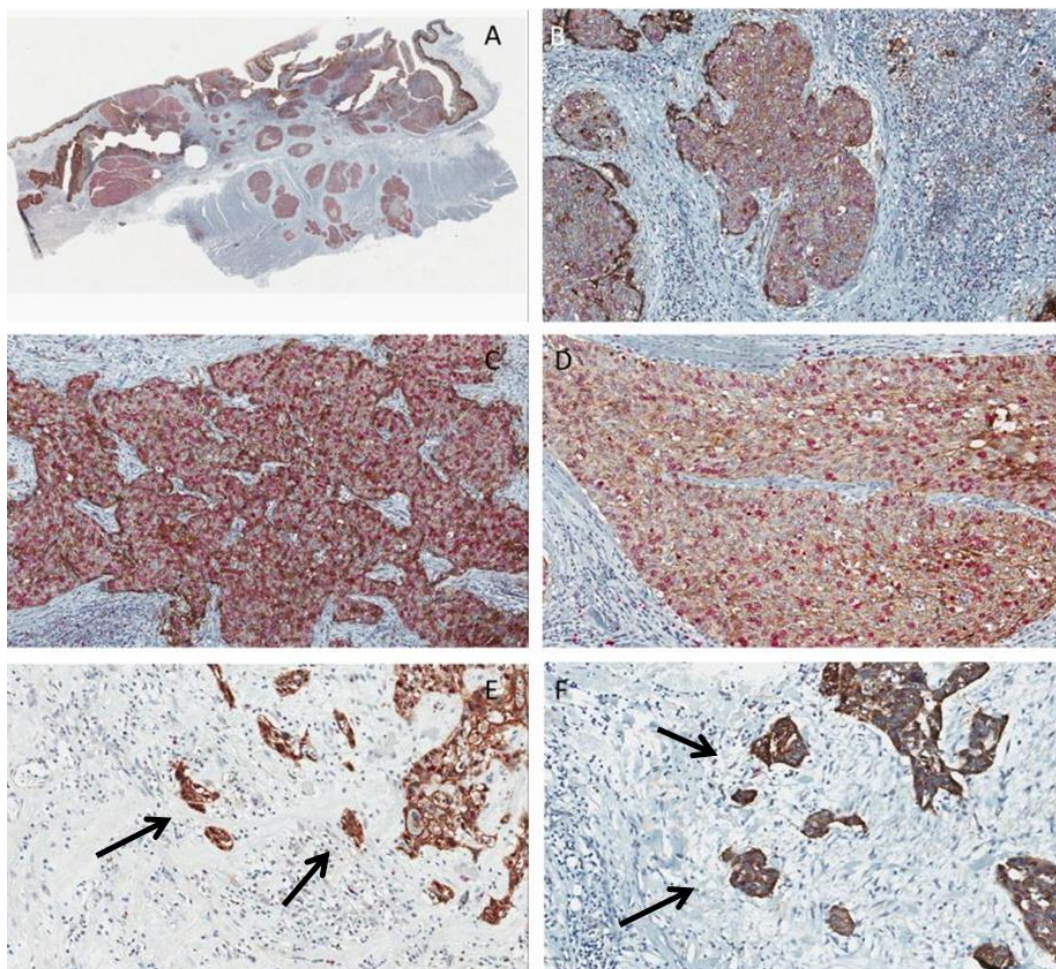


Figura 17 - Representação do caso de CEE número 56 com expressão de E-caderina e Ki-67 atípicas quando comparados com os valores médios das análises. A) Foto do corte inteiro do caso 56. B-D) Diferentes áreas do centro do tumor exemplificando a alta expressão de Ki-67 e baixa expressão de E-caderina. E e F) Representação de áreas do fronte de invasão (setas) com uma maior expressão de E-caderina e baixa expressão de Ki-67. Magnificência de 20x

5.3 - CORRELAÇÃO ENTRE AS REAÇÕES DE DUPLA MARCAÇÃO E MARCAÇÃO SIMPLES

Foi feita também uma análise de correlação de Spearman entre as reações de imunoistoquímica de dupla marcação com reações de marcação simples. Essa correlação está disposta na Tabela 3.

A análise de expressão de Ki-67 no centro do tumor mostrou um coeficiente de correlação moderadamente positiva ($r=0,63$; $p<0,01$), quando os dois tipos de marcação imunoistoquímica foram comparados. Considerando a expressão de Ki-67 no fronte de invasão, essa comparação também mostrou um coeficiente de correlação moderadamente positiva ($r=0,58$; $p<0,01$) entre a marcação imunoistoquímica dupla e simples.

Para a E-caderina, a correlação entre os resultados da dupla marcação e marcação simples para a parte central do tumor foi considerada moderadamente positiva ($r=0,48$; $p<0,01$) assim como no fronte de invasão ($r=0,60$; $p<0,01$).

Tabela 3 – Correlação entre as reações de imunoistoquímica de dupla marcação e marcação simples.

Dupla Marcação	Marcação Simples			
	Ki-67 (centro do tumor)	ECAD (centro tumor)	Ki-67 (Frente Invasão)	ECAD (Frente de invasão)
Ki-67 (Centro tumor)	0.63 (*)	-	-	-
ECAD (Centro tumor)	-	0.48 (*)	-	-
Ki-67 (Frente invasão)	-	-	0.58 (*)	-
ECAD (Frente invasão)	-	-	-	0.60 (*)

(*) Coeficiente de correlação Spearman. Todos os valores de p foram <0,001.

5.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para complementar os resultados gerados pelas reações de imunoistoquímica, foram realizadas reações de imunofluorescência. As imagens das reações de imunofluorescência foram capturadas utilizando microscopia confocal. As reações de não foram analisadas por nenhum software específico. Os resultados foram avaliados por patologistas do nosso grupo de forma qualitativamente apenas avaliando a colocação da expressão de E-caderina e Ki-67 nas amostras de CEE.

Nas reações de imunofluorescência indireta a E-caderina foi evidenciada com o fluorocromo Alexa 488 (Life Tech) que emite uma cor verde. O Ki-67 foi evidenciado usando o fluorocromo Alexa 555 (Life Tech) que emite uma cor vermelha (Figura 18).

Foi possível avaliar, assim como foi mostrado nas reações de IHQ de dupla marcação e marcação simples, ou seja, foi possível observar uma maior expressão de E-caderina na parte central do tumor quando comparado com o frente de invasão e que há uma maior expressão de Ki-67 no frente de invasão quando comparado com a parte central do tumor. A Figura 18 é uma representação das reações de imunofluorescência e nela é possível observar uma maior expressão da E-caderina na parte central do tumor, ou seja, o sinal de cor verde emitido pelo fluoróforo correspondente para a proteína E-caderina foi maior na parte central do tumor do que no frente de invasão. Já para o Ki-67, é possível observar uma maior expressão no frente de invasão evidenciado pela maior emissão de sinal vermelho emitido pelo

fluoróforo correspondente para a proteína Ki-67. A natureza dos dados é apenas qualitativa por isso não foi aplicado nenhum teste estatístico.

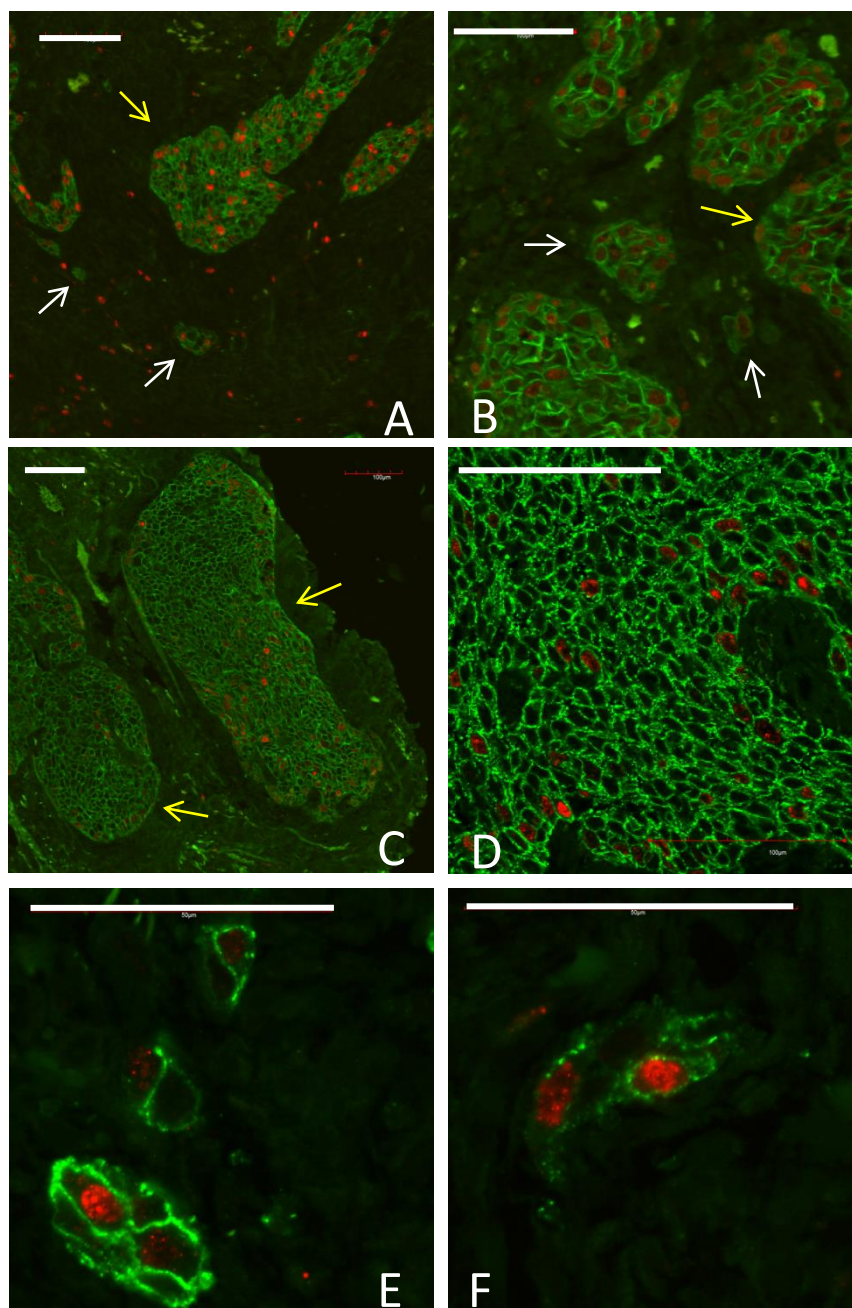


Figura 18 - Capturas das reações de imunofluorescência indireta representando a expressão de E-caderina na membrana e Ki-67 no núcleo em CEE. Para a E-caderina foi usado o fluorocromo Alexa 488 (cor verde). Já para o Ki-67 foi usado o fluorocromo Alexa 555 (cor vermelha). A e B) Representação de áreas centrais do tumor apontadas com setas amarelas e frentes de invasão com setas brancas. C e D) Representação das áreas centrais do tumor (setas amarelas). E e F) Detalhe dos blocos de células tumorais do fronte de invasão. É possível observar uma diminuição da expressão de E-caderina e aumento da expressão de Ki-67 no fronte de invasão quando comparado com a parte central do tumor. Na parte central do tumor, é possível observar um aumento da expressão de E-caderina e a diminuição do Ki-67. A-D) Barra de 100µm. E e F) Barra de 50µm.

Quadro 1 - Anticorpos e Sistema de visualização

	Marcador	Clone Anticorpo Primário	Diluição	Sistema de Visualização	Fabricante
IHQ	E-caderina	34/E-cadherin	1:1500	<i>ultraView Universal DAB</i> (ROCHE)	BD Bioscience, CA, EUA
	Ki-67	CONFIRM KI-67	Pronto para uso	<i>Enhanced Alkaline Phosphatase Red Detection</i> (ROCHE)	ROCHE Diagnostics, Mannheim, Alemanha
IFL	E-caderina	EP700Y	1:1000	<i>Alexa Fluor® 488 dye</i> (Life Tech.)	Epitomics, Burlingame, CA, EUA
	Ki-67	MIB-1	1:200	<i>Alexa Fluor® 555 dye</i> (Life Tech)	DAKO, Gdansk, Polônia

6 DISCUSSÃO

Foram avaliados 58 casos de CEE por reações de imunoistoquímica de dupla marcação, marcação simples e imunofluorescência, técnicas consolidadas como ferramentas importantes nos mais diferentes estudos e abordagens científicas e amplamente descritas na literatura.

Para a avaliação das reações de imunoistoquímica, foram analisados cortes histológicos convencionais sendo que em alguns casos para a análise do fronte de invasão, por exemplo, foram selecionadas mais de 30 áreas de interesse. Essa abrangência de áreas selecionadas só foi possível pela utilização do analisador digital *Aperio ScanScope XT* (APERIO). O equipamento composto por um microscópio e uma câmera de alta resolução gera imagens que são analisadas pelo software em um computador e, com o auxílio de um monitor de 20 polegadas a visualização das imagens das reações de IHQ se tornam mais cômodas e o campo de visão é maior quando comparado ao campo de visão de um microscópio óptico convencional além de ferramentas que auxiliam durante a análise como a possibilidade de medição de estruturas morfológicas, captura de imagens e inserir comentários em diferentes pontos da lâmina digitalizada. As ferramentas de telepatologia e patologia digital vêm ganhando um espaço considerado na pesquisa e na prática clínica. Prova disso foi a aprovação do uso do sistema de escaneamento e software de análise da Aperio pelo FDA

(*US Food and Drug Administration*) para avaliação de HER2 e receptores hormonais (ROCHA et al. 2009).

A reação imunoistoquímica para detecção de dois ou mais antígenos no mesmo corte histológico tem sido estabelecido como uma importante técnica, tanto na pesquisa básica como no diagnóstico patológico (PIRICI et al 2009). Reações de dupla marcação apresentam uma série de vantagens qualitativas quando comparada a reação imunoistoquímica de marcação simples. Na reação de dupla marcação é possível avaliar a expressão de duas proteínas ao mesmo tempo bem como sua colocalização em uma mesma célula. O mesmo pode não acontecer quando cada marcador imunoistoquímico é avaliado individualmente, uma vez que durante a confecção das lâminas histológicas, o segundo corte consecutivo do mesmo bloco pode conter células diferentes do primeiro corte. Além disso, as reações de dupla marcação diminuem o desgaste dos blocos de parafina, prolongando o uso do material biológico para estudos futuros ou caso haja a necessidade de uma nova avaliação do caso.

Todas as reações de imunoistoquímica foram realizadas de forma automatizada, o que apresenta diversas vantagens como, por exemplo, a uniformidade das condições em todas as reações (CHARPIN et al. 1997). Reações de imunoistoquímica realizadas manualmente tem uma alta reprodutibilidade, mas não há como negar que pode haver fatores que influenciam no resultado final. Logicamente, as reações automatizadas podem variar de uma reação para outra, mas essa variação é bem menor quando comparadas com as reações manuais. Outra vantagem na escolha

por reações automatizadas foi o tempo dispendido. O equipamento leva em torno de 5 horas e comporta até 30 lâminas por vez. Todos os reagentes são de uso exclusivo do equipamento e os anticorpos usados são preparados antes de iniciar as reações. Isso faz com que a interferência humana seja minimizada durante as reações.

Durante a análise das reações de dupla marcação utilizando o algoritmo *ColorDeconvolution* surgiram algumas dúvidas com relação a decomposição das cores. A primeira delas foi a de uma possível interferência de uma cor sobre a outra já que a coloração castanho do DAB e o vermelho da fosfatase alcalina são cores de espectro muito próximas. Desta forma, o algoritmo poderia super ou subestimar o resultado da análise de marcação de um dos marcadores. Embora a E-caderina seja uma proteína transmembranica e o anticorpo utilizado foi contra a porção intracelular mais próxima da membrana e o Ki-67 tem sua expressão exclusivamente nuclear, ou seja, mesmo com sítios de expressão diferentes poderia ocorrer essa interferência entre a E-caderina e o Ki-67. Para eliminar essa dúvida, optamos por analisar separadamente a expressão de cada marcador, em que novos cortes teciduais foram submetidos a reações de imunohistoquímica simples para E-caderina e outra para Ki-67. Essas novas reações foram analisadas com algoritmos diferentes para cada marcador. Para a análise da E-caderina, que apresenta padrão de marcação na membrana, foi usado o algoritmo *MembraneV1*. Para analisar a expressão do Ki-67, foi usado o algoritmo *NuclearV1*, que detecta a expressão de marcadores com padrão de marcação nuclear. Assim, o resultado das

reações imunoistoquímicas de dupla marcação e marcação simples poderiam ser comparadas e avaliar a veracidade dos resultados obtidos com o algoritmo *ColorDeconvolution*.

Não há trabalhos suficientes na literatura analisando reações de imunoistoquímica de dupla marcação com o algoritmo *ColorDeconvolution* e isso representou para nosso estudo uma dificuldade por não ter um suporte adequado. Dos resultados gerados pelo algoritmo, como mencionado, julgamos o escore como sendo o mais adequado por atribuir um peso para cada valor da intensidade de pixels positivos que é determinado pela fórmula $1 \times (\text{porcentagem de fraco positivo}) + 2 \times (\text{porcentagem de médio positivo}) + 3 \times (\text{porcentagem de forte positivo})$. Fórmula semelhante conhecida como HSCORE já foi usada em outros estudos (MCCARTY et al. 1986; KIRMAZ et al. 2004; BRIANEZI et al. 2012), que da mesma maneira, é obtido um escore através da somatória das porcentagens de células marcadas de acordo com a intensidade da marcação e é atribuído um peso para cada intensidade.

De acordo com o resultado da análise estatística de correlação de Spearman entre as reações de imunoistoquímica de dupla marcação e de marcação simples tanto a E-caderina quanto para o Ki-67 tiveram uma correlação moderadamente positiva e estatisticamente significativa, mostrando que certamente as duas técnicas apontam para o mesmo resultado. Apesar dos dados resultantes da análise imunoistoquímica de dupla marcação para Ki-67 não tenham atingido significância estatística, a correlação entre as técnicas suporta a veracidade das análises e viabiliza o

uso do algoritmo *ColorDeconvolution* em análises de expressão de proteínas em reações de dupla marcação, substituindo a análise de dois marcadores separadamente pela marcação simples.

A perda da expressão da E-caderina está associada não só aos processos de invasão, diferenciação e metástase, é também um dos principais eventos da EMT (VOULGARI e PINTZAS 2009; YILMAZ e CHRISTOFORI 2009).

Os nossos resultados mostram que há uma evidente diferença de expressão da E-caderina no fronte de invasão e na parte central do tumor. A expressão da proteína na parte central do tumor é mais elevada quando comparada com o fronte de invasão. Esse resultado concorda com outros estudos que mostram que a diminuição ou ausência da expressão da E-caderina está intimamente ligada a um comportamento invasivo, diferenciação e metástase tumoral (NAIR et al. 2005; BOSCH et al. 2005; FAN et al. 2012). Diz ainda na literatura que tumores que perdem a expressão de E-caderina tem uma maior capacidade de invasão e metástase em vários tipos tumorais (GU e CHOI 2012; SCHMALHOFER et al. 2009). Quando a expressão de E-caderina é reestabelecida o tumor tende a ser menos invasivo e diminui a capacidade de migração celular (HERZIG et al. 2007). O fronte de invasão é caracterizado como blocos de células tumorais que se desprenderam de uma massa tumoral. Relatos mostram que o fronte de invasão apresenta uma menor expressão de E-caderina quando comparado com a parte central do tumor, como o estudo realizado por MAO et al. (2012) em câncer de mama, mostrando que no fronte de

invasão, que possivelmente estão num processo de EMT por apresentarem uma morfologia semelhante a um fibroblasto, há uma perda da expressão de E-caderina mais evidente do que na parte central do tumor. É necessário uma maior mobilidade, migração celular e capacidade de invasão dos blocos de células tumorais do fronte de invasão para que possam ganhar outros sítios de tecidos adjacentes e possivelmente se reestabelecer em tumores secundários (MAO et al 2012).

Com relação a expressão do Ki-67, foi notável a diferença de expressão quando comparados fronte de invasão e parte central do tumor. Houve uma maior expressão do Ki-67 no fronte de invasão do que na parte central do tumor.

A expressão aumentada de Ki-67 no fronte de invasão foi reportado em outros estudos com diferentes modelos tumorais como no trabalho de DRAGOMIR et al. (2012), que avaliando 34 casos de carcinomas epidermóides orais mostrou que em 62,3% dos casos a expressão do Ki-67 foi alta no fronte de invasão e que existia uma associação entre altos níveis de expressão da proteína com baixo grau de diferenciação e displasia (DRAGOMIR et al. 2012). De acordo com a literatura, nosso estudo foi concordante com tais dados já que a maior expressão do Ki-67 estava presente no fronte de invasão quando comparado com o centro do tumor. Hipoteticamente, essa maior atividade proliferativa no fronte de invasão está associada com o baixo grau de diferenciação também necessário para aumentar a capacidade dos blocos de células tumorais de migrarem e invadirem o tecido adjacente.

No estudo de CHINO et al. (2007), analisando a atividade proliferativa de células tumorais em carcinoma de esôfago, foram apresentados resultados semelhantes ao do nosso estudo, com um aumento significativo nas taxas de proliferação na porção invasiva quando comparado com a parte central do tumor. Adicionalmente, em tumores bem a moderadamente diferenciados foi encontrada uma maior atividade proliferativa na porção invasiva do que na parte central do tumor. O mesmo não pode ser observado em tumores pouco diferenciados onde a atividade proliferativa não teve uma diferença significativa entre a parte central do tumor e na porção invasiva (CHINO et al. 2007).

Entretanto, em nosso estudo alguns casos comportaram-se de forma inversa, ou seja, foi possível verificar uma maior expressão do Ki-67 na parte central do tumor do que no frente de invasão e também uma maior expressão da E-caderina no frente de invasão quando comparado com a parte central do tumor, como mencionado no caso 56. Analisando os dados patológicos de tais casos, não foi observado nenhuma característica que os diferenciem das demais amostras de CEE, o que poderia explicar essa discrepância. Essa constatação abre novas hipóteses que devem ser exploradas futuramente. Esse comportamento atípico de alguns casos, destoando das médias dos escores do nosso estudo sugere que outros mecanismos podem influenciar a dinâmica da expressão de E-caderina em CEE. Recentemente, MAO et al. (2012) mostraram que, em determinado momento, células do frente de invasão poderiam passar por um por um processo inverso a EMT, ou seja, passando por um processo de transição

mesenquima-epitelial. Quando células tumorais se deslocam para áreas diferentes do tumor do qual se desprenderam, há uma re-expressão de proteínas como o Twist e E-caderina revertendo essas células para um estado não invasivo (MAO et al. 2012). Considerando tais dados, é possível que as células do fronte de invasão dos casos que apresentaram resultados discrepantes em nosso estudo possam ter atingido esse estágio não invasivo e estejam expressando mais E-caderina, necessária para o estabelecimento dessa massa tumoral e, conseqüentemente, levando ao crescimento tumoral.

A maioria dos estudos que envolvem a expressão de E-caderina e atividade de proliferação celular são desenvolvidos em modelos experimentais usando cultura de células, linhagens celulares comerciais e estudos *in vivo* (CHEN et al. 2012; USAMI et al. 2008, STOCKINGER et al. 2001). Há poucos estudos que avaliam a expressão de E-caderina e Ki-67 na parte central do tumor e no fronte de invasão, principalmente em amostras de tumor primário em CEE. Embora os resultados do nosso estudo concorde com alguns descritos da literatura, há uma necessidade de mais estudos em amostras teciduais de carcinomas epidermóides de esôfago e em outros modelos tumorais

Nosso estudo mostrou dados interessantes e abre caminhos para estudos adicionais com diferentes abordagens, abrangendo uma maior casuística e modelos *in vitro* para avaliar o comportamento e expressão de outras proteínas envolvidos relevantes para o processo de EMT.

Futuramente mais estudos envolvendo comportamentos como diferenciação, migração e invasão tumoral serão discutidos.

7 CONCLUSÕES

- 1- As células tumorais do fronte de invasão apresentam perda relativa de E-caderina quando comparadas com as células da porção central do tumor;
- 2- O índice proliferativo medido pelo Ki-67 é maior no fronte de invasão do que na porção central do tumor;
- 3- A perda de expressão de E-caderina se correlaciona positivamente com o aumento da proliferação celular;
- 4- Há um ganho de informações em reações de dupla marcação bem como preservação do material biológico. A análise automatizada das reações de imunistoquímica de dupla marcação e de marcação simples confere agilidade e reprodutibilidade.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bates RC, Mercurio AM. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. **Cancer Biol Ther** 2005; 4:365-70.

Bird-Lieberman EL, Fitzgerald RC. Early diagnosis of oesophageal cancer. **Br J Cancer** 2009; 101:1-6.

Bird-Lieberman EL, Lao-Sirieix P, Saeed I, Khoo D, Burnham R, Fitzgerald R. The definition and management of Barrett's oesophagus: a case report, review of the literature and a suggestion for the future. **BMJ Case Rep** 2009; 2009. pii:bcr07.2008.0450.

Bosch FX, Andl C, Abel U, Kartenbeck J. E-cadherin is a selective and strongly dominant prognostic factor in squamous cell carcinoma: a comparison of E-cadherin with desmosomal components. **Int J Cancer** 2005; 114:779-90.

Brabletz T, Jung A, Reu S, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:10356-6.

Brianezi G, Minicucci EM, Marques ME, Miot HA. Evaluation epidermal p53 immunostaining by digital image analysis. **Skin Res Technol**. 2012 Jun 5.

Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. **Histopathology** 1990; 17:489-503.

Calle EE. Obesity and cancer. **BMJ** 2007; 335:1107-8.

Charles J, Lightdale MD. Esophageal cancer. **Am J Gastroent** 1999; 94(1):20-9.

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. **N Engl J Med** 2003; 348:1625-38.

Charpin C, Garcia S, Bouvier C, et al. Automated and quantitative immunocytochemical assays of Bcl-2 protein in breast carcinomas. **Br J Cancer** 1997; 76:340-6.

Chen X, Wang Y, Xia H, et al. Loss of E-cadherin promotes the growth, invasion and drug resistance of colorectal cancer cells and is associated with liver metastasis. **Mol Biol Rep** 2012; 39:6707-14.

Chino O, Osamura Y, Kise Y, et al. Acceleration of the proliferative activity of esophageal carcinoma with invasion beyond the muscularis mucosae; immunohistochemical analysis using MIB-1 for the Ki-67 antigen. **Tokai J Exp Clin Med** 2007; 32:115-20.

Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. **Cancer Res** 2006; 66:8319-26.

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.

Dragomir LP, Simionescu C, Mărgăritescu C, Stepan A, Dragomir IM, Popescu MR. P53, p16 and Ki-67 immunoexpression in oral squamous carcinomas. **Rom J Morphol Embryol** 2012; 53:89-93.

Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. **N Engl J Med** 2003; 349:2241-52.

Eslick GD. Esophageal cancer: a historical perspective. **Gastroenterol Clin North Am** 2009; 38:1-15.

Fan L, Wang H, Xia X, et al. Loss of E-cadherin promotes prostate cancer metastasis via upregulation of metastasis-associated gene 1 expression. **Oncol Lett** 2012; 4:1225-33.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer** 2010; 127:2893-917.

Freedman ND, Abnet CC, Leitzmann MF, et al. A prospective study of tobacco, alcohol, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes. **Am J Epidemiol** 2007; 165:1424-33.

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: comparison of three-field lymphadenectomy with two-field lymphadenectomy. **Ann Surg** 1995; 222:654-62.

Gabbert H, Wagner R, Moll R, Gerharz CD. Tumor dedifferentiation: an important step in tumor invasion. **Clin Exp Metastasis** 1985; 3:257-79.

Gavaghan M. Anatomy and physiology of the esophagus. **AORN J** 1999; 69:372-86; quiz 387-9, 392, 393-4.

Gu MJ, Choi JH. Clinicopathological significance of E-cadherin, β -catenin and epidermal growth factor receptor expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. **Hepatogastroenterology** 2012; 59:1241-4.

Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. **Biochim Biophys Acta** 2008; 1778:660-9.

Herzig M, Savarese F, Novatchkova M, Semb H, Christofori G. Tumor progression induced by the loss of E-cadherin independent of beta-catenin/Tcf-mediated Wnt signaling. **Oncogene** 2007; 26:2290-8.

Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. **Am J Pathol** 1998; 153:333-9.

Hugo H, Ackland ML, Blick T, et al. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. **J Cell Physiol** 2007; 213:374-83.

Jessri M, Rashidkhani B, Hajizadeh B, Jessri M, Gotay C. Macronutrients, vitamins and minerals intake and risk of esophageal squamous cell carcinoma: a case-control study in Iran. **Nutr J** 2011; 10:137.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest** 2009; 119:1420-8. Erratum in: **J Clin Invest** 2010; 120:1786.

Kausch I, Lingnau A, Endl E, et al. Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo. **Int J Cancer** 2003; 105:710-6.

Kirmaz C, Ozbilgin K, Yuksel H, et al. Increased expression of angiogenic markers in patients with seasonal allergic rhinitis. **Eur Cytokine Netw** 2004; 15:317-22.

Ku GY, Ilson DH. Preoperative therapy for esophageal cancer. **Gastroenterol Clin North Am** 2009; 38:135-52.

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

Lambert R, Hainaut P. Esophageal cancer: cases and causes (part I). **Endoscopy** 2007; 39:550-5.

Lee C-H, Wu D-C, Lee J-M, et al. Carcinogenetic impact of alcohol intake on squamous cell carcinoma risk of the oesophagus in relation to tobacco smoking. **Eur J Cancer** 2007; 43:1188–99.

Liu W, Zhang X, Sun W. Developments in treatment of esophageal/gastric cancer. **Curr Treat Options Oncol** 2008; 9:375-87.

Maeda G, Chiba T, Aoba T, Imai K. Epigenetic inactivation of E-cadherin by promoter hypermethylation in oral carcinoma cells. **Odontology** 2007; 95:24-9.

Mandal M, Myers JN, Lippman SM, et al. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. **Cancer** 2008; 112:2088-100.

Mao Y, Zhang N, Xu J, Ding Z, Zong R, Liu Z. Significance of heterogeneous

twist2 expression in human breast cancers. **PLoS One** 2012; 7:e48178.

McCarty KS Jr, Szabo E, Flowers JL, et al. Use of a monoclonal anti-estrogen receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human tumors. **Cancer Res** 1986; 46(8 Suppl):4244s-8s.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2012 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Nair KS, Naidoo R, Chetty R. Expression of cell adhesion molecules in oesophageal carcinoma and its prognostic value. **J Clin Pathol** 2005; 58:343-51.

Natsugoe S, Uchikado Y, Okumura H, et al. Snail plays a key role in E-cadherin-preserved esophageal squamous cell carcinoma. **Oncol Rep** 2007; 17:517-23.

Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. **Int J Dev Biol** 2004; 48:365-75.

Rees JR, Onwuegbusi BA, Save VE, Alderson D, Fitzgerald RC. In vivo and in vitro evidence for transforming growth factor-beta1-mediated epithelial to mesenchymal transition in esophageal adenocarcinoma. **Cancer Res** 2006; 66:9583-90.

Rocha R, Vassallo J, Soares F, Miller K, Gobbi H. Digital slides: present status of a tool for consultation, teaching, and quality control in pathology. **Pathol Res Pract** 2009; 205:735-41.

Sasaki K, Natsugoe S, Ishigami S, et al. Significance of Twist expression and its association with E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma. **J Exp Clin Cancer Res** 2009; 28:158.

Sato-Kuwabara Y. **Análise de alterações cromossômicas por hibridação genômica comparativa e a sua relação com a patogênese em carcinoma epidermóide de esôfago**. São Paulo; 2010. [Tese Doutorado]. Fundação Antônio Prudente.

Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. **Cancer Metastasis Rev** 2009; 28:151-66.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J Cell Physiol** 2000; 182:311-22.

Smith M, Zhou M, Whitlock G, et al. Esophageal cancer and body mass index: Results from a prospective study of 220,000 men in China and a meta analysis of published studies. **Int J Cancer** 2007; 122:1604-10.

Stemmler MP. Cadherins in development and cancer. **Mol Biosyst** 2008; 4:835-50.

Stockinger A, Eger A, Wolf J, Beug H, Foisner R. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. **J Cell Biol** 2001; 154:1185-96.

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.

Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2006; 7:131-42.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal

transitions in development and disease. **Cell** 2009; 139:871-90.

Umar SB, Fleischer DE. Esophageal cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. **Nat Clin Practice Gastroenterol Hepatol** 2008; 5:517-26

Usami Y, Satake S, Nakayama F, et al. Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression. **J Pathol** 2008; 215:330-9.

Verhage RJ, Hazebroek EJ, Boone J, Van Hillegersberg R. Minimally invasive surgery compared to open procedures in esophagectomy for cancer: a systematic review of the literature. **Minerva Chir** 2009; 64:135-46.

Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. **Biochim Biophys Acta** 2009; 1796:75-90.

Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. **Cancer Metastasis Rev** 2009; 28:15-33.

Weinberg RA. **A biologia do cancer**. Porto Alegre: Artmed; 2008. Expandindo-s: invasão e metastase; p.588-654.

Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. **J Clin Invest** 2009; 119:1429-37.

Anexo 1 - Resultados das análises das reações de imunoistoquímica de dupla marcação e marcação simples em 58 casos de CEE

Número Caso	Dupla Marcação				Marcação Simples			
	Score (0-300)		Score (0-300)		Score (0-300)		Score (0-300)	
	Fronte KI67	Fronte ECAD	Centro KI67	Centro ECAD	Membrana fronte ECAD	Membrana centro ECAD	Nucleo Fronte KI67	Nucleo Centro KI67
1	2,681	200,767	6,744	195,374	210,52	209,52	1,16	6,46
2	14,983	180,781	15,001	188,388	196,91	194,17	7,71	7,71
3	16,875	208,04	7,978	232,738	254,582	253,34	19,24	1,75
4	3,126	152,696	7,357	185,098	181,34	199,84	22,52	14,29
5	4,364	173,422	4,323	178,836	170,734	172,14	7,07	0,18
6	8,031	191,674	6,679	190,685	228,647	227,22	7,05	0,281
7	6,886	170,642	4,841	184,444	187,274	217,43	4,2	4,18
8	20,525	204,884	5,04	221,583	127,09	34,923	47,23	4,75
9	17,707	164,528	18,368	183,683	191,37	233,86	31,34	17,23
10	6,864	179,629	5,864	215,767	206,728	233,99	4,33	0,814
11	5,081	160,11	8,93	190,436	133,2	204,27	18,3	11,61
12	11,55	162,278	6,069	170,7	215,41	213,27	11,5	9,11
13	2,738	160,611	1,706	183,944	161,14	201,93	18,16	2,94
14	21,945	134,441	12,604	156,926	163,05	210,48	17,92	5,19
15	4,359	184,415	6,1	188,742	201,11	210,48	0,89	2
16	6,393	156,349	6,371	174,132	162,74	193,39	3,63	3,207
17	9,671	150,98	5,723	158,129	133,649	177,58	4,2	1,43
18	11,603	128,873	2,633	165,356	177,1	174,78	13,21	3,22
19	29,851	171,85	25,334	171,101	204,23	192,34	18,63	10,34
20	8,829	186,477	9,992	206,971	223,06	243,49	1,3	5,34
21	10,83	155,459	11,911	176,812	130,17	187,01	18,34	10,63
22	11,107	178,076	7,026	201,317	167,91	196,14	53,66	15,54
23	14,564	178,462	8,223	216,674	168,99	203,88	35,54	13,88
24	10,083	172,313	6,916	221,814	214,66	326,04	11,92	2,8
25	7,244	173,478	8,285	210,503	188,848	230,14	10,67	5,42
26	28,523	183,592	2,106	200,443	238,16	222,04	3,3	2,86
27	21,061	151,406	5,821	175,804	220,12	236,28	6,1	3,21
28	19	139,019	7,481	159,849	205,03	224,84	23,89	4,41
29	30,549	140,607	28,657	189,096	194,06	236,06	27,93	32,09
30	25,024	134,946	8,931	158,416	180,29	192,84	32,7	11,54
31	5,258	128,122	3,977	167,67	132,672	181,16	1,83	0,006
32	6,995	124,148	5,227	133,219	139,035	137,37	8,21	2,44
33	4,461	129,798	4,066	150,756	123,312	159,23	0	0,349
34	3,904	164,577	15,747	172,52	240,37	223,23	52,06	43,82
35	14,793	153,868	5,582	191,254	203,592	240,068	21,78	2,58
36	3,864	142,019	3,694	159,998	158,4	178,71	5,53	0

37	3,906	162,461	2,866	194,851	122,602	181,26	0,25	0,25
38	6,634	164,044	6,261	143,592	230,894	232,61	7,94	2,86
39	3,605	136,28	12,262	168,672	153,399	192,2	0,73	7,05
40	18,72	198,403	31,02	209,77	198,38	241,5	47,59	28,95
41	6,38	142,833	16,568	161,832	156,47	198,63	1,81	1,47
42	4,047	167,524	1,399	210,004	190,83	231,62	0	0,366
43	5,764	155,093	3,751	185,643	151,06	206,93	0,45	1,192
44	5,962	150,848	5,866	171,404	137,02	176,95	2,4	0,22
45	7,794	143,191	6,54	217,398	187,57	194,49	11,94	1,03
46	3,819	138,449	14,359	187,687	155,524	215,23	0	0,1
47	6,168	152,574	10,47	174,774	146,38	99,34	2,22	0,002
48	18,745	180,663	7,41	193,012	221,23	197,52	12,01	7,57
49	8,155	148,941	6,066	200,935	167,09	171,41	0,6	0,129
50	5,521	118,556	2,413	171,646	133,155	173,78	4,36	0,472
51	8,143	119,451	5,327	160,238	160,463	180,92	5,5	5,36
52	6,269	163,452	5,915	174,669	166,85	163,83	4,62	6,64
53	10,118	182,01	15,165	194,866	237,27	231,2	17,04	19,16
54	12,24	165,813	11,786	179,862	191,23	205,31	24,29	2,51
55	16,73	186,622	11,182	209,901	217,354	240,11	26,3	37,31
56	24,057	184,15	39,789	144,787	209,32	199,59	43,61	56,23
57	31,135	262,08	31,668	224,909	195,24	238,81	17,13	38,01
58	8,257	184,644	13,333	177,477	206,83	192,03	18,65	18,65