

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia - Doutorado

**VALOR PROGNÓSTICO DAS EXPRESSÕES DA PROTEÍNA p53 E DO FATOR DE
CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR EM PACIENTES COM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO SUBMETIDOS À
ESOFAGECTOMIA**

Aluno: André Ricardo Pereira da Rosa

Orientador: Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Kruel

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss

Tese de Doutorado

2002

À minha esposa Kai Hua, pela companhia, pelo incentivo e sobretudo pelo amor.

À minha filha Juliana, cuja presença ilumina nossas vidas e nos fortalece para os desafios do dia-a-dia.

"A melhor maneira de prever o futuro é inventá-lo."

Richard Feynman (1919-1988), físico norte-americano, Nobel de Física (1965)

"Há uma tênue linha entre a persistência e a obstinação em pesquisa. Se você não vive o suficiente para provar sua teoria, você será chamado de obstinado."

Judah Folkman (1933-), cirurgião norte-americano, Hospital Infantil de Boston

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Cleber Dario Pinto Kruel, pela orientação e pelo inestimável apoio durante todas as etapas de minha formação acadêmica e profissional.

À Professora Maria Isabel Albano Edelweiss, pela oportunidade do convívio e pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

À Dra. Luíse Meurer, pelo prestimoso auxílio em todas as etapas do trabalho, notadamente na análise das lâminas e na digitalização de imagens.

Aos colegas Carlos Cauduro Schirmer, Richard Ricachenevsky Gurski, Leandro Totti Cavazzola, Cleber Rosito Pinto Kruel e Luis Fernando Moreira, pelo incentivo e pelo agradável convívio pessoal e profissional.

Aos acadêmicos da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul João Pedro Telles e Fernando Mielke, pelo auxílio na coleta de dados.

Ao Professor Mário Bernardes Wagner, pela ajuda na análise estatística.

Ao Professor Luiz Rohde, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, pela confiança depositada e pelo exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, Estela Maris Emer Araripe, pela presteza demonstrada.

Ao Serviço de Patologia do HCPA, pela cessão dos blocos de parafina e pelo apoio estrutural para a realização desse estudo e, de modo especial, à técnica em patologia Neiva Copetti, pela disponibilidade e pela competência na confecção das lâminas.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG/HCPA), pelo apoio em todas as etapas do estudo e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), pelo auxílio financeiro.

Aos pacientes estudados e a todas as pessoas a eles ligadas, pela compreensão e pela colaboração na obtenção das informações relativas à sobrevida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1. p53 e prognóstico.....	13
2.2. VEGF e prognóstico.....	15
2.3. Papel do gene p53 no controle da angiogênese	21
3. OBJETIVOS.....	24
4. ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA PORTUGUESA.....	25
Resumo.....	26
Introdução.....	27
Materiais e Métodos.....	28
Resultados.....	32
Discussão.....	42
Referências bibliográficas.....	48
5. ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA INGLESA.....	53
Summary.....	54
Introduction.....	55
Materials and Methods.....	56
Results.....	59
Discussion.....	61
References.....	65

6. DISCUSSÃO.....	79
7. PERSPECTIVAS.....	88
8. CONCLUSÕES.....	89
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

CEE: Carcinoma Epidermóide de Esôfago

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor, Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

PCR: Polimerase Chain Reaction, Reação em Cadeia da Polimerase

FGF: Fibroblastic Growth Factor, Fator de Crescimento Fibroblástico

IMD: Intratumoral Microvascular Density, Densidade Microvascular Intratumoral

UICC: União Internacional Contra o Câncer

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1 - Imuno-histoquímica da expressão da proteína p53: (1A) Positiva e (1B) Negativa. A expressão da proteína p53 foi observada no núcleo das células tumorais (100X).....35
- Fig. 2 - Imuno-histoquímica da expressão do VEGF: (2A) Positiva e (2B) Negativa. A expressão do VEGF foi observada no citoplasma das células tumorais (100X).....36
- Fig. 3 - Curvas de sobrevida a longo prazo de acordo com a expressão da proteína p53.....38
- Fig. 4 - Curvas de sobrevida a longo prazo de acordo com a expressão do VEGF.....39
- Fig. 5 - Curvas de sobrevida a longo prazo de acordo com a co-expressão da proteína p53 e do VEGF.....40

LISTA DE TABELAS

Tab. 1 - Relação entre as expressões da proteína p53 e do VEGF e as características clinicopatológicas em 47 casos de CEE.....	37
Tab. 2 - Análise multivariada (modelo de regressão de azares proporcionais de Cox) das seis características clinicopatológicas selecionadas.....	41
Tab. 3 - Expressão do VEGF e sobrevida em diferentes estudos.....	47 e 87

1. INTRODUÇÃO

O câncer de esôfago é a sexta neoplasia maligna mais freqüente no mundo e uma das mais agressivas (1). No Brasil, consta entre os dez mais incidentes, segundo dados obtidos dos Registros de Base Populacional existentes, e em 1999 foi o sexto tipo mais mortal, com 5.158 óbitos. No Rio Grande do Sul, representou a terceira causa de morte por câncer entre homens em 1999, com coeficiente de mortalidade de 12,2 óbitos/100.000 habitantes/ano, superado apenas pelos cânceres de pulmão e de próstata. De acordo com as Estimativas de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil, publicadas anualmente pelo Instituto Nacional do Câncer, o câncer de esôfago deverá atingir 8.865 pessoas (6.590 homens e 2.275 mulheres) e causar 5.550 mortes em 2002, mantendo-se na mesma posição entre as causas de morte por câncer entre homens (2).

Com relação especificadamente ao carcinoma epidermóide de esôfago (CEE), o prognóstico permanece ruim, com sobrevida em 5 anos para todos os estágios inferior a 10%, devido principalmente à doença avançada na época do diagnóstico (3).

A esofagectomia tem sido considerada o tratamento padrão nos pacientes com doença localizada, isolada ou associada à quimioterapia e/ou à radioterapia (4). Recente estudo realizado em nosso meio, com o objetivo de estudar o prognóstico de 74 pacientes com CEE torácico submetidos à esofagectomia, verificou que a sobrevida média a longo prazo no grupo tratado somente com esofagectomia (58 casos) foi de 26 meses, com taxas de sobrevida em 1, 2, 3, 4 e 5 anos de 81%, 56%, 30%, 12% e 0%, respectivamente. Já no grupo tratado com quimioterapia e radioterapia pré-operatórias e após esofagectomia (16 casos), a sobrevida média a longo prazo foi 33 meses, sendo as taxas de sobrevida a longo prazo em 1, 2, 3, 4 e 5 anos de, respectivamente, 89%, 67%, 67%, 44% e 33%, não havendo diferença estatisticamente significativa na sobrevida entre os grupos (5).

Levando-se em consideração que a técnica da esofagectomia por si só não evoluiu no sentido de aumentar a sobrevida a longo prazo, novos estudos têm sido direcionados para o uso de modalidades terapêuticas combinadas, a fim de melhorar o controle local e eliminar as micrometástases já presentes na época da ressecção. Apesar dos recentes avanços, os efeitos benéficos da terapêutica neo-adjuvante em relação à sobrevida a longo prazo não têm sido observados em todos os pacientes com câncer de esôfago. A falta de eficácia em determinados casos pode estar relacionada à baixa potência do regime terapêutico ou à aplicação da terapia num grupo inadequado de pacientes. Ao passo que o desenvolvimento de agentes quimioterápicos tende a melhorar a eficácia da terapia neo-adjuvante, a sobrevida a longo prazo pode também ser melhorada pela análise de marcadores tumorais para aprimorar o atual sistema de estadiamento e orientar as decisões terapêuticas (6).

A predição da agressividade biológica e da resposta ao tratamento neo-adjuvante por meio de análise tecidual pode ser de grande valor no manejo de pacientes com câncer de esôfago. Se os tumores que não respondem ao tratamento puderem ser identificados, tais pacientes poderiam ser poupados não só da morbidade inerente a ele como também ser candidatos a novas abordagens terapêuticas (7).

Embora haja evidências de que pacientes com câncer de esôfago em estágio precoce estejam tratados adequadamente se submetidos somente à esofagectomia, algumas vezes são encontrados pacientes com doença recorrente que morreram depois de uma ressecção considerada curativa, mesmo em estágio precoce da doença. É difícil, portanto, prever um resultado desfavorável com base apenas no estadiamento convencional. Assim, a busca de novos indicadores do potencial maligno do CEE é necessária (7).

Durante a década passada, o rápido desenvolvimento da biologia molecular evidenciou que os tumores surgem como resultado de alterações genéticas que interferem no controle normal do crescimento e da diferenciação celulares. Essas alterações são divididas em duas

categorias distintas: a ativação de proto-oncogenes e a inativação de genes de supressão tumoral. Os proto-oncogenes são genes celulares normais que, quando inapropriadamente ativados como oncogenes, causam desregulação das vias de crescimento e de diferenciação celulares e aumentam a probabilidade de transformação maligna. Em contraste com os proto-oncogenes, os genes de supressão tumoral são genes celulares normais que, quando inativados, determinam distúrbio da proliferação celular e desenvolvimento de neoplasias (8).

Dessa forma, o estudo das alterações genóticas no CEE cresceu rapidamente nos últimos anos, particularmente em relação à associação entre a expressão da proteína p53 e a sobrevida a longo prazo. No entanto, a expressão do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor), sua correlação com a expressão da proteína p53 e seu valor prognóstico permanecem pouco estudados, necessitando investigação para avaliar a real importância dessas associações na prática clínica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. p53 e prognóstico

As alterações funcionais do gene de supressão tumoral p53 estão entre as anormalidades genéticas mais comuns e estudadas em vários tipos de neoplasias malignas. O gene p53 está localizado no braço curto do cromossomo 17 e sua estrutura pode ser alterada pela ação de fatores físicos, agentes químicos ou vírus tumorais. Uma vez ativado, o gene p53 (denominado selvagem/normal) regula a proliferação celular (transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular), controlando o dano ao DNA ou, no caso de falha do reparo, determina a morte celular através da apoptose. Assim, o gene p53 normal age como um “guardião da molécula”, monitorando a integridade do genoma (8).

Se houver dano genotóxico ao DNA, a proteína p53 se acumula e bloqueia a replicação para permitir um tempo adicional para a ação dos mecanismos de reparo. Por outro lado, a perda da função do gene p53 está associada à imortalização celular, resultando em atividade proliferativa aumentada e progressão do tumor, pelo fato do gene p53 regular negativamente o ciclo celular (1,8-11).

Em condições normais, a proteína p53 não se acumula em quantidades detectáveis por imuno-histoquímica, devido à sua meia-vida curta (aproximadamente 6 a 20 minutos). Entretanto, grandes quantidades de proteína p53 (5 a 100 vezes) podem ser detectadas em tumores humanos, visto que a mutação no gene p53 torna a proteína mutante mais estável e portanto detectável (12).

As alterações no gene de supressão tumoral p53 são encontradas em aproximadamente metade dos cânceres de cólon, estômago, pulmão, mama, fígado e sistema nervoso central (8). Portanto, a inativação do gene p53 é atualmente apontada como passo indispensável para o desenvolvimento de câncer em humanos. Especificamente em relação aos tumores de esôfago,

as mutações do gene p53 são detectadas em 36 a 80% dos casos e parecem ocorrer precocemente, estando presente da displasia ao carcinoma (1). Fagundes e colaboradores (13) verificaram a expressão da proteína p53 em 17% das biópsias de esôfago em pacientes de alto risco para CEE, sugerindo dano precoce à mucosa esofágica. Gates e colaboradores (14), estudando por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, Polimerase Chain Reaction) 15 fragmentos de biópsia de pacientes com CEE, encontraram uma alta percentagem de mutações (72% em negros e 50% em brancos). Kobayashi e colaboradores (11) detectaram mutações do gene p53 em 14 de 42 casos de CEE (33,3%).

Entretanto, a associação entre expressão da proteína p53 e sua mutação não é linear. Coggi e colaboradores (15) encontraram mutações do gene p53 nos exons 5 e 8 em 53% e acumulação da proteína p53 em 57% dos casos de câncer de esôfago, respectivamente, com discordância de 38%, sugerindo que a função do gene p53 pode ser inativada por outros mecanismos além da mutação. Além disso, tanto a acumulação como a mutação do gene p53 não estavam relacionadas com a sobrevida a longo prazo.

O papel da acumulação da proteína p53 detectada por imuno-histoquímica e a sua utilidade como fator prognóstico da progressão do tumor de esôfago tem sido investigado. Sarbia e colaboradores (16), investigando a expressão da proteína p53 em 204 pacientes com CEE e sua relação com a sobrevida, verificaram que a expressão da proteína p53 estava presente em 67% dos casos, porém não havia relação com menor sobrevida a longo prazo após análises univariada e multivariada. Vijeyasingam e colaboradores (17) estudaram o valor da expressão da proteína p53 como indicador prognóstico de sobrevida a longo prazo em pacientes com câncer de esôfago localizado submetidos à esofagectomia, observando que a expressão da proteína p53 não estava associada com pior sobrevida a longo prazo. Novamente Sarbia e colaboradores (18), investigando o significado prognóstico da expressão da proteína p53 em 104 pacientes com CEE potencialmente ressecável, verificaram que a expressão da

proteína p53 foi positiva em 67% dos tumores, não tendo relação com a sobrevida a longo prazo. Ikeguchi e colaboradores (10), investigando a relação entre a expressão da proteína p53 e a atividade proliferativa em 94 pacientes com CEE, encontraram positividade em 53% dos casos, sem identificar a expressão da proteína p53 como fator prognóstico. Todavia, Patel e colaboradores (19), estudando 46 pacientes com carcinoma de esôfago T3/4-N1-M0 (epidermóide e adenocarcinoma), verificaram que a expressão da proteína p53 foi detectada em 70% dos casos e que os pacientes desse grupo apresentaram pior prognóstico. Também Mathew e colaboradores (20), estudando a expressão da proteína p53 por imuno-histoquímica em 100 pacientes com CEE, demonstraram que a combinação das alterações nas vias do gene p53 estaria associada a pior prognóstico.

A maioria dos estudos sobre a relação entre a expressão da proteína p53 e o prognóstico tem se baseado em imuno-histoquímica e os resultados são, até o momento, conflitantes. A resposta definitiva entre a associação da expressão da proteína p53 e o fenótipo mais agressivo ou maior resistência do tumor ao tratamento (pior prognóstico) ainda não foi encontrada (21). Conforme demonstrado no estudo de Koide e colaboradores (22), os pacientes com CEE que apresentam expressão da proteína p53 têm alta atividade proliferativa e baixa frequência de apoptose, sugerindo que tais tumores podem apresentar alto potencial maligno ou agressividade biológica.

2.2. VEGF e prognóstico

A angiogênese, definida como a formação de novos capilares a partir de vasos sangüíneos pré-existentes, é fundamental para o desenvolvimento normal e para a homeostasia. Em condições fisiológicas normais, a angiogênese ocorre durante a embriogênese, os ciclos menstruais regulares e também após exercício físico intenso, além de ser um importante componente do reparo (regeneração nervosa, cicatrização de feridas,

crescimento ósseo). No organismo adulto, a angiogênese é tipicamente controlada e autolimitada.

Por outro lado, a angiogênese desregulada tem um papel essencial no desenvolvimento de tumores. Baseado na observação de que o tamanho do tumor é proporcional ao seu grau de vascularização, Folkman já postulava, em 1971, que vasos sanguíneos normais seriam essenciais para a expansão da massa tumoral. Esse conceito foi demonstrado experimentalmente anos depois: o fluxo de nutrientes a tumores de até 1 a 2 milímetros de diâmetro pode ocorrer por difusão. Para a expansão da massa tumoral além desse tamanho, a neovascularização é essencial (23, 24). A hipóxia, uma característica comum dos tumores malignos e da cicatrização, parece ser um potente indutor do VEGF. Já foi demonstrado que os níveis de RNA mensageiro são dramaticamente aumentados poucas horas após a exposição de diferentes culturas celulares à hipóxia, retornando aos valores anteriores quando o suprimento de oxigênio é retomado (25-27). A angiogênese também contribui para o processo metastático por facilitar o desprendimento de células tumorais no interior dos vasos sanguíneos neoformados (26, 28, 29).

Para estimular a angiogênese, os tumores controlam a produção de uma variedade de fatores angiogênicos, incluindo o VEGF e os Fatores de Crescimento Fibroblástico ácido e básico (FGFa e FGFb, Fibroblastic Growth Factor). Os mesmos tumores, entretanto, também geram inibidores da angiogênese, incluindo a angiostatina, a endostatina e a trombospondina-1. Dessa forma, o fenótipo angiogênico é o resultado do balanço entre reguladores positivos e negativos da neovascularização. A angiostatina, por exemplo, tem se mostrado um potente inibidor da angiogênese. A terapia sistêmica com angiostatina faz com que as metástases se mantenham em estado de latência microscópica, definido pelo balanço entre apoptose e proliferação das células tumorais. A endostatina é um inibidor específico da proliferação endotelial e é um potente inibidor da angiogênese. A terapia sistêmica com endostatina causa

uma supressão quase completa da angiogênese induzida pelo tumor, resultando em forte atividade antitumoral (30).

O VEGF foi descrito pela primeira vez por Senger e colaboradores em 1983, e posteriormente por Ferrara e colaboradores, Connolly e colaboradores e Plouet e colaboradores em 1989 (31). O VEGF é uma glicoproteína ligante da heparina que existe em no mínimo quatro isoformas (VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189 e VEGF-206). A permeabilidade vascular induzida pelo VEGF é 50.000 vezes superior àquela induzida pela histamina. Receptores de alta afinidade tirosina-quinase para o VEGF (VEGFR-1 e VEGFR-2) são expressados quase que exclusivamente pelas células endoteliais (29, 32).

O VEGF está envolvido no processo de formação de novos vasos sanguíneos, particularmente as isoformas VEGF-121 e VEGF-165. É secretado pelas células tumorais e estimula o crescimento de células endoteliais. Usando técnica de imuno-histoquímica, o VEGF está principalmente localizado no citoplasma das células tumorais (33).

A avaliação quantitativa da neovascularização pode proporcionar informações sobre o comportamento do tumor e o potencial metastático. Recentemente, estudos clínicos têm demonstrado a correlação entre o grau de angiogênese e o prognóstico em vários tumores sólidos. Os pacientes com altos escores de angiogênese têm apresentado taxas de sobrevida diminuídas, inclusive superando fatores prognósticos clássicos como o grau de diferenciação histológica, o tamanho e a localização do tumor, particularmente em tumores de mama, pulmão, próstata e cabeça e pescoço (31, 33, 34). Assim, outros fatores prognósticos além dos fatores clinicopatológicos têm sido relacionados aos tumores gastrointestinais. A análise semiquantitativa da angiogênese (contagem microvascular) e a expressão imuno-histoquímica de fatores angiogênicos, tais como o VEGF, têm aplicação clínica como indicadores de sobrevida e de recorrência.

A expressão do VEGF e de seus receptores determinada por imuno-histoquímica se correlaciona com o grau de vascularização de muitos tumores e tem sido usada como indicador do risco aumentado de metástases (32). Embora o mecanismo molecular detalhado do chamado "disparo angiogênico", pelo qual o endotélio quiescente torna-se ativado, seja desconhecido, o VEGF parece ser o principal indutor da angiogênese tumoral. A hipóxia tumoral e os oncogenes elevam os níveis de VEGF nas células tumorais e a hipóxia, em combinação com as concentrações localmente elevadas de VEGF, elevam a quantidade de VEGFR-1 e de VEGFR-2 nas células endoteliais do tumor (32). A identificação do VEGF marcou o início de uma rápida expansão na compreensão do que agora parece ser um dos mais importantes mediadores da angiogênese fisiológica e patológica (35). O VEGF estimula direta e especificamente as células endoteliais a proliferar e a migrar, ativando uma série de proteinases que degradam a matriz tecidual adjacente (35, 36).

Para estudar a angiogênese em tecidos tumorais utilizando a atual tecnologia é necessário obter uma amostra de tecido para avaliação histológica. Três métodos estão disponíveis para tal avaliação: marcação do endotélio vascular com anticorpo anti-Fator VIII, contagem de vasos sanguíneos em campo de grande aumento e quantificação do grau de angiogênese pela contagem do número de vasos dentro do tumor (29).

Atualmente, a medida da densidade microvascular intratumoral (IMD) por imuno-histoquímica parece ser o método mais fidedigno de medida da atividade angiogênica. Dadas as interações biológicas entre o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos e o crescimento tumoral, a invasão e as metástases, a quantificação da angiogênese tumoral humana pode proporcionar um parâmetro integrador dos três eventos fisiológicos fundamentais da progressão da doença (37). Tanigawa e colaboradores (38), por exemplo, estudaram a contagem microvascular intratumoral em 43 pacientes com CEE e verificaram que a contagem foi significativamente mais alta em tumores que atingiam as camadas mais

profundas da parede esofágica. A sobrevida a longo prazo foi pior nos casos com comprometimento linfonodal e com maior contagem de vasos no tumor, após análise multivariada. Maeda e colaboradores (39), estudando 129 pacientes com câncer gástrico, verificaram que a densidade microvascular, determinada por antígeno relacionado ao fator VIII por imuno-histoquímica, foi significativamente maior em tumores VEGF-positivos do que em tumores VEGF-negativos, concluindo que o VEGF é um bom marcador da angiogênese tumoral. Outros estudos semelhantes também observaram a correlação entre a expressão do VEGF e a contagem de vasos no tumor (36, 40, 41).

Poucos estudos relacionando a associação entre a expressão do fator angiogênico e a angiogênese foram realizados em pacientes com câncer de esôfago. Inoue e colaboradores (42), estudando a expressão do VEGF e da densidade microvascular em 75 pacientes com carcinomas primários de esôfago, observaram que 47% dos tumores eram VEGF-positivos, havendo ampla correlação entre densidade microvascular e expressão do VEGF e estágio avançado, metástases à distância e pior prognóstico.

A expressão do VEGF, determinada por imuno-histoquímica, foi descrita como de valor prognóstico em vários tumores sólidos. A expressão do VEGF tem sido demonstrada em 31 a 60% dos casos de câncer de esôfago. Inoue e colaboradores (42) relataram que a expressão do VEGF estava significativamente associada a metástases à distância e à menor sobrevida. Portanto, a expressão do VEGF é responsável pelo potencial maligno do câncer de esôfago e é um marcador útil para estimar o prognóstico (43).

Shimada e colaboradores (7), avaliando 116 pacientes com CEE submetidos à esofagectomia com ressecção completa, verificaram que, embora após análise univariada a expressão do VEGF fosse de valor prognóstico, a análise multivariada não revelou tal evidência. Os mesmos autores (43), estudando a concentração sérica de VEGF em pacientes normais e em pacientes com CEE avançado, verificaram que a concentração de VEGF foi

significativamente mais elevada nos pacientes com CEE. Além disso, diferenças estatisticamente significativas foram encontradas quando os pacientes foram categorizados de acordo com o tamanho do tumor, profundidade de penetração do tumor na parede esofágica, metástases para linfonodos, metástases à distância e estágio tumoral. Quanto ao prognóstico, uma alta concentração sérica de VEGF estava associada a pior sobrevida.

Shih e colaboradores (44), estudando 117 casos de CEE torácico, verificaram que 31% dos casos eram VEGF-positivos e que o número de linfonodos comprometidos estava amplamente relacionado com a expressão do VEGF. A taxa de sobrevida dos pacientes com tumores VEGF-positivos era significativamente pior do que naqueles com tumores VEGF-negativos. Os autores concluíram que a expressão do VEGF é um marcador útil do prognóstico em pacientes com CEE mais avançado, sendo importante, junto com o estadiamento convencional, para a seleção de tratamentos apropriados.

A recidiva local ou sistêmica dos tumores em geral e do esôfago em particular provavelmente se deve ao crescimento de micrometástases ocultas que já estavam presentes na época da cirurgia. Portanto, a presença de fatores específicos do potencial metastático dos tumores primários permitiria a melhor estratificação do prognóstico dos pacientes e o tratamento mais eficaz.

Kitadai e colaboradores (45), estudando 119 casos de câncer de esôfago por imunohistoquímica, encontraram expressão do VEGF em 59,6% dos pacientes. A expressão do VEGF se correlacionou com a profundidade de penetração do tumor na parede esofágica, estágio do tumor, invasão linfática e invasão venosa. Havia também uma tendência de pior prognóstico no grupo VEGF-positivo comparado com o grupo VEGF-negativo, sugerindo que a expressão do VEGF está associada com progressão tumoral por estimular a angiogênese. Novamente Kitadai e colaboradores (46), avaliando 48 peças cirúrgicas de pacientes com câncer de esôfago, verificou a expressão do VEGF em 39,6% dos casos. A expressão do

VEGF se correlacionou com a profundidade de penetração do tumor na parede esofágica, estágio tumoral, invasão venosa, invasão linfática e metástases linfonodais. Os referidos autores concluíram que o VEGF pode ter um papel na progressão do tumor via linfangiogênese e angiogênese.

Portanto, os pacientes que se beneficiariam de tratamento adjuvante devem ser selecionados usando alguns indicadores que reflitam a probabilidade de recorrência. Assim, a análise da expressão do VEGF pode fornecer uma informação adicional para a identificação de pacientes que necessitam de tratamento complementar.

2.3. Papel do gene p53 no controle da angiogênese

Para que células normais tenham a capacidade de se transformar em tumores sólidos, elas devem adquirir no mínimo três características que as diferenciem de suas progenitoras normais: ser capazes de se dividir de maneira fácil e ordenada nas condições em que as células normais sejam quiescentes, adquirir a capacidade de atrair novos vasos sanguíneos para sustentar sua expansão progressiva e evitar o ataque do sistema imune. Essas alterações no fenótipo ocorrem como resultado de danos genéticos que ativam oncogenes ou inativam genes de supressão tumoral. Assim, num determinado tecido, não se esperaria o surgimento de um tumor a menos que suas células contivessem uma combinação de oncogenes ativados e genes de supressão tumoral inativados que fossem suficientes para capacitá-lo a ser potencialmente angiogênico no meio. Embora a ativação do oncogene seja importante para o desenvolvimento da angiogênese, é a perda do gene de supressão tumoral que tem um efeito mais profundo no fenótipo angiogênico dos tumores (47).

O gene p53 parece ter papel importante na angiogênese por regular a expressão do VEGF. Quando expressado exogenamente em fibroblastos humanos, o gene p53 selvagem influencia a angiogênese de duas maneiras: ele determina a expressão da trombospondina

inibitória e diminui a expressão do VEGF. Ao contrário, quando o gene p53 está inativado, os fibroblastos se tornam mais angiogênicos devido à diminuição da trombospondina inibitória, a qual cai cerca de 20 vezes, e ao aumento de aproximadamente quatro vezes na secreção do VEGF. Destes dois efeitos, a queda do inibidor é o fenômeno mais importante, tanto que em fibroblastos com gene p53 selvagem a atividade inibitória é tão importante que ela pode ser diminuída três vezes e ainda assim bloquear a angiogênese induzida pelas células tumorais (47). Dameron e colaboradores (48) demonstraram que, em cultura de fibroblastos de pacientes com a Síndrome de Li-Fraumeni, a mudança para o estado angiogênico coincidiu com a perda do alelo do p53 selvagem, resultando na perda da expressão da trombospondina.

Kieser e colaboradores (49) verificaram que o gene p53 mutante induziu a expressão do VEGF. Mukhopadyay e colaboradores (50) relataram que o p53 selvagem diminuiu o nível de RNA mensageiro do VEGF. Por outro lado, o gene p53 mutante estimula a expressão do RNA mensageiro do VEGF (51). Além disso, Fontanini e colaboradores (27) relataram que no câncer de pulmão a expressão do gene p53 mutante estava associada à angiogênese tumoral e à expressão do VEGF.

Maeda e colaboradores (52) também sugerem uma clara relação entre p53 mutante, VEGF e vascularização aumentada em tumores de estômago. No referido estudo, as expressões da proteína p53 e do VEGF coincidiram em 73% dos casos e uma correlação positiva foi encontrada. Além disso, ambas expressões estiveram significativamente associadas à microvascularização tumoral, além da presença aumentada de metástases para linfonodos em tumores VEGF-positivos. Assim, pode ser postulado que tumores que perdem a função supressora do gene p53 produziram um meio apropriado para induzir metástases através do VEGF.

Os mecanismos moleculares da expressão do VEGF ainda estão sendo especulados. O gene p53 mutante poderia aumentar a expressão do VEGF induzida pela 12-O-

tetradecanoilforbol-13-acetato, com ativação da proteína-quinase C (49). A mutação do gene p53 ocorre precocemente no câncer de esôfago e estimula a expressão do VEGF (49, 53). Outras possibilidades são de que o gene p53 selvagem iniba a transcrição do VEGF, o contrário ocorrendo quando o gene p53 está na forma mutante. Embora a correlação entre a expressão do VEGF e a expressão da proteína p53 tenha sido sugerida experimentalmente, há poucos estudos demonstrando essa correlação em pacientes com CEE.

Maeda e colaboradores (54), estudando pacientes com câncer gástrico precoce, verificaram que a expressão do VEGF foi observada mais frequentemente em pacientes com recorrência da doença comparada com aqueles sem recorrência da doença, enquanto que a expressão da proteína p53 não se relacionou com o prognóstico.

Embora o mecanismo da indução da expressão do VEGF ainda não esteja esclarecido, Arii e colaboradores (55) obtiveram evidências indicando que a mutação do gene p53 está associada com alta expressão do VEGF no câncer de esôfago. Uchida e colaboradores (36), comparando a expressão do VEGF com a mutação do gene p53 por PCR, verificaram que a expressão do VEGF se correlacionou com a mutação do gene p53. Koide e colaboradores (56), estudando 60 pacientes com CEE depois da ressecção cirúrgica, verificaram que 58,3% e 61,7% dos pacientes expressaram o VEGF e a proteína p53, respectivamente, e que ambos foram co-expressados em 43,4% dos casos. Além disso, a expressão da proteína p53 estava associada a metástases à distância. Os referidos autores sugerem que a expressão da proteína p53 está associada à angiogênese e a metástases à distância, e que a expressão concomitante da proteína p53 e do VEGF pode ter um importante significado clínico como marcador da angiogênese. Ainda não está claro se o gene p53 mutante está associado com a angiogênese. É possível que a co-expressão da proteína p53 e do VEGF tenha um papel importante na angiogênese e nas metástases à distância e, portanto, possa ser um indicador útil do prognóstico (56).

3. OBJETIVOS

3.1. Verificar a expressão da proteína p53 e sua relação com a sobrevida a longo prazo em pacientes com CEE submetidos à esofagectomia.

3.2. Verificar a expressão do VEGF e sua relação com o prognóstico.

3.3. Verificar a associação entre as expressões da proteína p53 e do VEGF (angiogênese).

3.4. Verificar se a co-expressão da proteína p53 e do VEGF influencia o prognóstico.

4. ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA PORTUGUESA

Valor prognóstico das expressões da proteína p53 e do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular em pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago submetidos à esofagectomia

André R. Rosa, M.D.¹, Carlos C. Schirmer, M.D., PhD¹, Richard R. Gurski, M.D., PhD¹,
Luíse Meurer, M.D.², Maria I. Edelweiss, M.D., PhD², Cleber D. Kruehl, M.D., PhD¹

Serviço de Cirurgia Geral¹ e Serviço de Patologia² do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Endereço para correspondência: Dr. André R. Rosa, Rua Castro Alves, 915/303, Porto Alegre,
Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 90430-131. Tel.: 51 33335795; Fax: 51 33114371; E-mail:
ar.rosa@uol.com.br

RESUMO. As mutações no gene de supressão tumoral p53 estão entre as anormalidades genéticas mais comuns encontradas numa ampla variedade de tumores. Embora a função do gene p53 ainda não esteja completamente esclarecida, ele parece ser um fator de transcrição nuclear que controla a proliferação celular, a apoptose e a manutenção da estabilidade genética. A angiogênese é essencial para o crescimento e a metastatização de tumores sólidos. O Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor), um fator de crescimento identificado recentemente com propriedades angiogênicas significativas, pode ser um importante regulador da angiogênese tumoral. A associação entre as expressões da proteína p53 e do VEGF e o prognóstico tem sido pouco estudada. Foram estudadas peças cirúrgicas de 47 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) submetidos à esofagectomia em estágios II e III, utilizando-se coloração imuno-histoquímica. As expressões da proteína p53 e do VEGF foram observadas em 53% e 40% dos tumores, respectivamente. As expressões da proteína p53 e do VEGF coincidiram em somente 21% dos casos, e não foi encontrada correlação entre elas. Nenhum dos fatores clinicopatológicos se correlacionaram significativamente com as expressões da proteína p53 ou do VEGF. Em relação ao prognóstico, não havia associação significativa entre as expressões da proteína p53 e do VEGF e pior prognóstico. Os autores concluem que tanto a expressão da proteína p53 como a expressão do VEGF não se correlacionaram com o prognóstico em pacientes com CEE em estágios II e III.

INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços nas estratégias terapêuticas e do manejo pós-operatório, o prognóstico dos pacientes com câncer de esôfago permanece ruim. O insucesso do tratamento pode estar relacionado tanto à falta de potência do regime terapêutico como à sua utilização numa população inadequada. Ao passo que o desenvolvimento de agentes quimioterápicos possa melhorar a eficácia do tratamento, a sobrevida pode ser melhorada também pelo uso de marcadores tumorais para refinar o atual sistema de estadiamento e orientar decisões terapêuticas (1-3).

A angiogênese é essencial para o crescimento de tumores sólidos, facilitando sua progressão e a disseminação. Levando-se em consideração que os fatores clinicopatológicos são baseados na classificação morfológica, fatores adicionais baseados nas características biológicas devem ser examinados para identificar pacientes que são de maior risco para a recorrência da doença. A recorrência, por sua vez, provavelmente aumenta com a existência de micrometástases ocultas que já tenham se estabelecido na época da cirurgia. Portanto, a identificação de indicadores específicos do potencial metastático de tumores primários permitiriam melhor estratificação prognóstica dos pacientes e um tratamento mais efetivo (4-6).

O Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor) é um fator angiogênico que estimula o crescimento das células endoteliais e é o principal componente dos fatores angiogênicos em muitos tumores. Tem sido sugerido que o grau de angiogênese tumoral está relacionado com o resultado clínico, sugerindo que as propriedades angiogênicas se correlacionam com a agressividade tumoral. Com relação ao seu papel no câncer de esôfago, há poucos estudos em relação à associação entre expressão do VEGF, angiogênese e prognóstico (7-12).

Por outro lado, a gene de supressão tumoral p53 tem sido encontrado em uma grande variedade de tumores, e as suas mutações estão entre as alterações genéticas mais comuns encontradas em tumores malignos. Embora a função do gene p53 ainda não esteja completamente esclarecida, o gene p53 parece ser um fator de transcrição nuclear que controla a proliferação celular, a apoptose e a manutenção da estabilidade genética. Entretanto, trabalhos recentes demonstraram que o gene p53 tem um papel fundamental no controle da angiogênese regulando a expressão do VEGF (9, 13). Entretanto, os estudos clínicos em pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) não são esclarecedores em relação à referida associação.

O objetivo do presente estudo é esclarecer se as expressões da proteína p53 e do VEGF se correlacionam com o prognóstico, se a expressão da proteína p53 está associada com a expressão do VEGF e se a co-expressão da proteína p53 e do VEGF influencia o prognóstico de pacientes com CEE.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes

No período de dezembro de 1988 a agosto de 2001, 86 pacientes com CEE torácico foram submetidos à esofagectomia subtotal com intenção de cura. Foram excluídos os pacientes que faleceram por causas relacionadas diretamente ao procedimento cirúrgico (mortalidade pós-operatória precoce), que receberam tratamento neo-adjuvante ou que tinham história ou presença de outra neoplasia maligna concomitante, além daqueles em que não foi possível localizar o bloco de parafina ou que a lâmina não continha amostra adequada de tecido tumoral. Foram selecionados, portanto, 47 pacientes, que preencheram os critérios exigidos

para inclusão no estudo.

Análise anátomo-patológica e preparação tecidual

A análise da peça cirúrgica incluiu a determinação da profundidade de penetração do tumor na parede esofágica, do comprometimento linfonodal, do comprometimento das margens cirúrgicas (proximal, distal e circunferencial) e do grau de diferenciação histológica. O estágio da doença foi definido de acordo com o estabelecido pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) - TNM(p), 1987. As peças cirúrgicas ressecadas foram fixadas em formalina a 10% e embebidas em parafina. Cortes de 4 micrômetros de espessura foram feitos nos blocos de parafina, sendo posteriormente montados em lâminas de vidro.

Anticorpos e reagentes

Como anticorpos primários foram utilizados o anticorpo monoclonal de camundongo DO-7, o qual reconhece a proteína p53 (Pab 1801, Sigma Biosciences, St Louis, MO, USA), e o anticorpo policlonal de coelho A-20, o qual reconhece o VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Calif., USA). O DO-7 reconhece tanto a forma selvagem como a forma mutante da proteína p53, mas dada a meia-vida extremamente curta da forma selvagem, a coloração do núcleo da célula tumoral quase certamente representa a acumulação anormal da forma mutante. O A-20 é um anticorpo policlonal de coelho produzido contra um epíteto aminoterminal do VEGF humano, mapeando os resíduos 1-20 e reconhecendo as variantes 165, 189 e 121 do VEGF.

Técnica de imuno-histoquímica

As amostras de tecido tumoral foram processadas para expressão da proteína p53 e para expressão do VEGF por técnica de imuno-histoquímica de rotina do Serviço de Patologia do

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) usando os anticorpos primários anteriormente descritos. Após desparafinização e reidratação, recuperação antigênica, inativação da atividade da peroxidase endógena e bloqueio das reações inespecíficas, os cortes foram encubados por 12 horas ("overnight") a 4°C com uma solução diluída dos anticorpos primários a 1:100 para a proteína p53 e 1:400 para o VEGF. A localização dos anticorpos primários foi alcançada pela aplicação subsequente do complexo estreptavidina-biotina peroxidase (LSAB, Dako) e a revelação com a utilização do diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako). Todas as reações foram executadas com controles positivos (câncer de mama para a expressão da proteína p53 e tecido placentário para a expressão do VEGF).

Determinação imuno-histoquímica das expressões da proteína p53 e do VEGF

Os tumores foram considerados positivos para a expressão da proteína p53 se mais de 10% dos núcleos das células tumorais estivessem corados em marrom (p53-positivos). O bloqueio com soro normal e a ausência do anticorpo primário foram usados como controles negativos. A expressão do VEGF foi caracterizada como positiva ou negativa de acordo com a quantidade e a intensidade de células tumorais com citoplasma corado. Se mais do que 30% das células tumorais foram coradas (marrom) mais intensamente do que as células musculares lisas no tecido esofágico adjacente normal, os tumores foram considerados positivos (VEGF-positivos). O músculo liso das camadas muscular própria ou muscular da mucosa serviu como controle positivo, já que as células musculares lisas também expressam o VEGF. As lâminas foram examinadas por dois investigadores sem conhecimento das informações clinicopatológicas. Os poucos casos com escore discrepante foram reexaminados em conjunto numa segunda ocasião, e a concordância foi alcançada.

Avaliação da co-expressão da proteína p53 e do VEGF

Todos os casos foram divididos em três grupos baseados na determinação imunohistoquímica da proteína p53 e do VEGF. Os pacientes p53-positivos e VEGF-positivos foram categorizados como Grupo A, os pacientes VEGF-positivos e p53-negativos ou VEGF-negativos e p53-positivos como Grupo B e os pacientes com reações negativas para ambas as proteínas p53 e VEGF como Grupo C.

Delineamento, seguimento e ética

O delineamento utilizado foi uma coorte não-concorrente. A ressecção cirúrgica foi considerada o tempo zero. O seguimento foi iniciado após a ressecção do tumor e realizado até o final do período do estudo (31 de maio de 2002) ou até a morte do paciente, conforme o caso. A morte atribuída (desfecho) foi àquela relacionada diretamente com o evento (câncer de esôfago). Os pacientes que morreram por causa diversa do câncer de esôfago ou que tiveram o seguimento perdido foram censurados. As informações a respeito da sobrevivência dos pacientes foram obtidas a partir do prontuário médico e do acompanhamento ambulatorial e hospitalar dos pacientes tratados, além de telefonemas e correspondências. Os pacientes em acompanhamento ambulatorial eram orientados a consultar a cada três meses durante o primeiro ano pós-operatório, a cada seis meses no segundo ano e, após, uma vez a cada ano. Após a recidiva do tumor, os pacientes foram tratados pelo método considerado mais adequado para controle da doença e alívio dos sintomas, como radioterapia paliativa e medicamentos ou técnicas anestésicas para manejo da dor. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA.

Análise estatística

A correlação entre a expressão da proteína p53, a expressão do VEGF e as características

clinicopatológicas foram examinadas pelo teste “t” para as variáveis contínuas e do teste do qui-quadrado para as variáveis categóricas. Quando necessário, o teste exato de Fisher foi utilizado. A análise da sobrevida da coorte foi feita pelo método produto-limite ou Kaplan-Meier. O impacto de cada fator prognóstico na sobrevida foi testado pelo “log rank test” (análise univariada). O modelo de regressão de azares proporcionais de Cox (análise multivariada) foi aplicado para as variáveis selecionadas para identificar uma combinação de fatores prognósticos ou o efeito independente de fatores prognósticos individuais sobre a sobrevida a longo prazo. O nível de significância considerado foi de 5%. O programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) para Windows versão 8.0 foi utilizado para a análise estatística.

RESULTADOS

Pacientes e técnica cirúrgica

A idade variou de 31 a 77 anos (média de 55,7 anos), sendo 41 pacientes do sexo masculino e seis pacientes do sexo feminino. Vinte e cinco pacientes (53,2%) foram submetidos à esofagectomia transtorácica e 22 pacientes (46,8%) à esofagectomia transiatal.

Imuno-histoquímica das expressões da proteína p53 e do VEGF

A expressão da proteína p53 foi observada no núcleo das células do CEE e foi positiva em 25 (53,2%) e negativa em 22 (46,8%) dos 47 casos estudados (Fig. 1 - A e B, respectivamente).

A expressão do VEGF foi positiva em 19 (40,4%) e negativa em 28 (59,6%) dos 47 pacientes com CEE e a reação imuno-histoquímica foi observada principalmente no citoplasma das células tumorais (Fig. 2 - A e B, respectivamente).

Expressões da proteína p53 e do VEGF e características clinicopatológicas

As relações entre as expressões da proteína p53 e do VEGF e as características clinicopatológicas são demonstradas na Tabela 1. Não houve correlação estatisticamente significativa entre as expressões da proteína p53 ou do VEGF e a idade, o sexo, o grau de diferenciação histológica, a profundidade de penetração do tumor na parede esofágica, o comprometimento linfonodal, o tipo de ressecção e o estágio patológico.

Seguimento médio e sobrevida global

O seguimento médio dos 47 pacientes estudados foi de 20,5 meses (DP=15,14; mínimo=4,43 e máximo=60 meses; mediana=16 meses). A sobrevida média global foi 28,9 meses (IC=22,27-35,49; EP=3,37), com mediana de 23 meses.

Expressão da proteína p53 e sobrevida a longo prazo

A sobrevida média a longo prazo dos 25 pacientes com expressão positiva da proteína p53 foi 24,6 meses (IC=18,67-30,5; EP=3,02) e dos 22 pacientes com expressão negativa da proteína p53 foi 33,6 meses (IC=22,36-44,8; EP=5,72). As taxas de sobrevida em 1, 2, 3, 4 e 5 anos, dos dois grupos estudados, foram, respectivamente, 78,7%, 45,9%, 32,8%, 0% e 0% para o grupo p53-positivo e 75,5%, 50,8%, 42,3%, 42,3% e 33,6% para o grupo p53-negativo (Figura 3). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p=0,3435$).

Expressão do VEGF e sobrevida a longo prazo

A sobrevida média a longo prazo dos 19 pacientes com expressão positiva do VEGF foi 38,1 meses (IC=25,9-50,3; EP=6,24) e dos 28 pacientes com expressão negativa do VEGF foi 24,1 meses (IC=17,5-30,7; EP=3,36). As taxas de sobrevida em 1, 2, 3, 4 e 5 anos, dos dois grupos

estudados, foram, respectivamente, 82,8%, 51,9%, 51,9%, 51,9% e 51,9% para o grupo VEGF-positivo e 73,2%, 45,2%, 27,1%, 6,8% e 6,8% para o grupo VEGF-negativo (Figura 4). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p=0,0881$).

Co-expressão da proteína p53 e do VEGF e sobrevida a longo prazo

A sobrevida média a longo prazo dos pacientes do Grupos A ($n=10$), B ($n=30$) e C ($n=7$) foi 24 meses (IC=10,2-37,8; EP=7,04), 30,7 meses (IC=22,6-38,7; EP=4,11) e 20,3 meses (IC=15,7-24,9; EP=2,36), respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos ($p=0,6849$), conforme demonstrado na Figura 5. Também não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre as expressões da proteína p53 e do VEGF ($p=0,999$).

Análise multivariada

A fim de determinar a influência de cada um dos seis fatores prognósticos selecionados (profundidade de penetração do tumor na parede esofágica, comprometimento linfonodal, tipo de ressecção, estágio, expressão da proteína p53 e expressão do VEGF), foi realizada análise multivariada. Não foi identificado nenhum fator prognóstico independente relacionado diretamente com a sobrevida (Tabela 2).

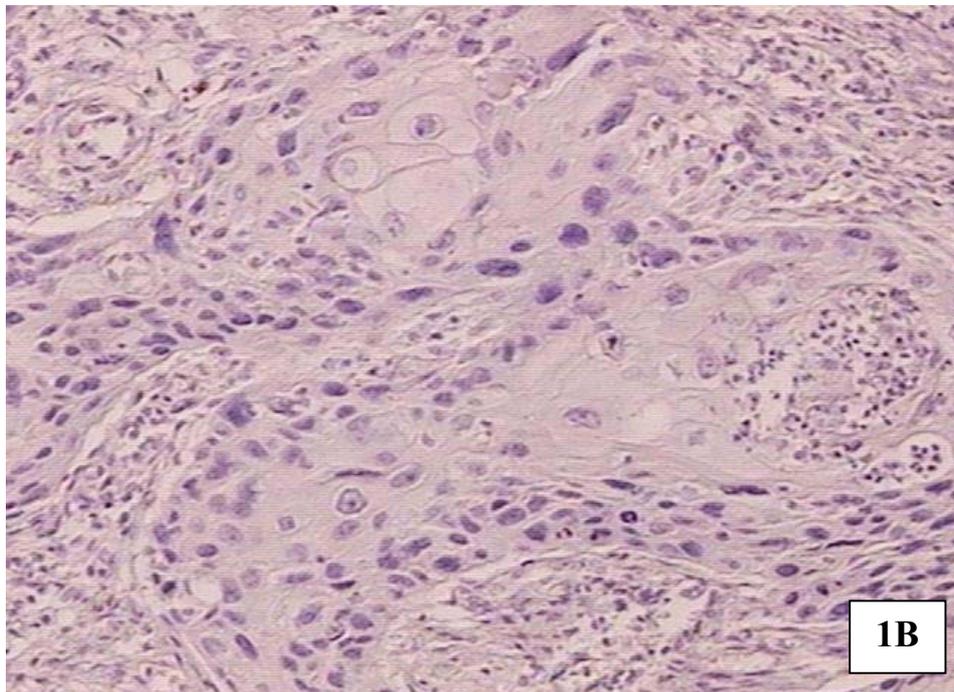
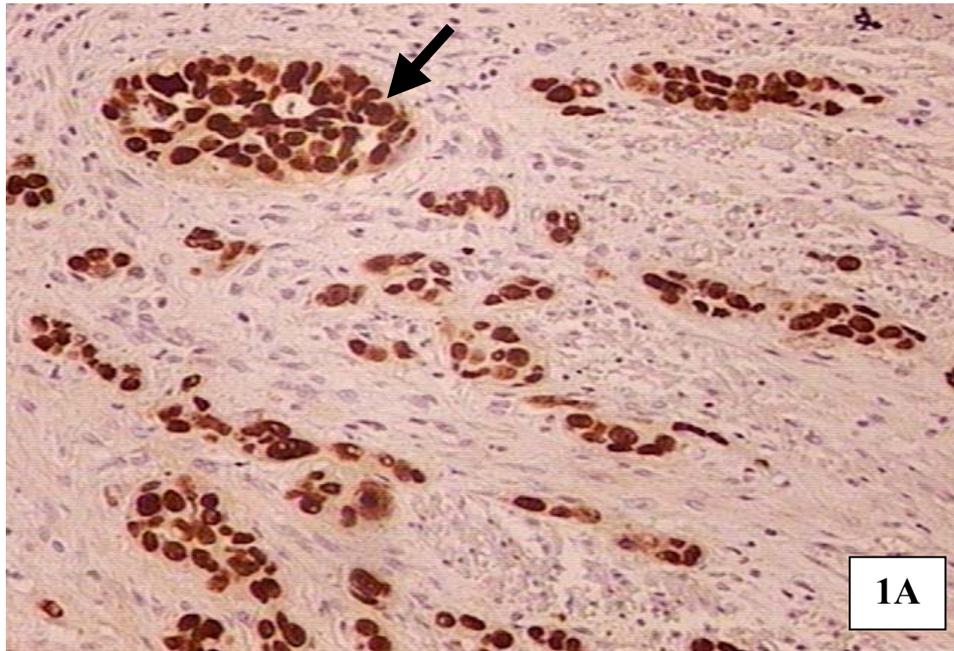


Fig. 1 - Imuno-histoquímica da expressão da proteína p53: (1A) Positiva e (1B) Negativa.

A expressão da proteína p53 foi observada no núcleo (seta) das células tumorais (100X)

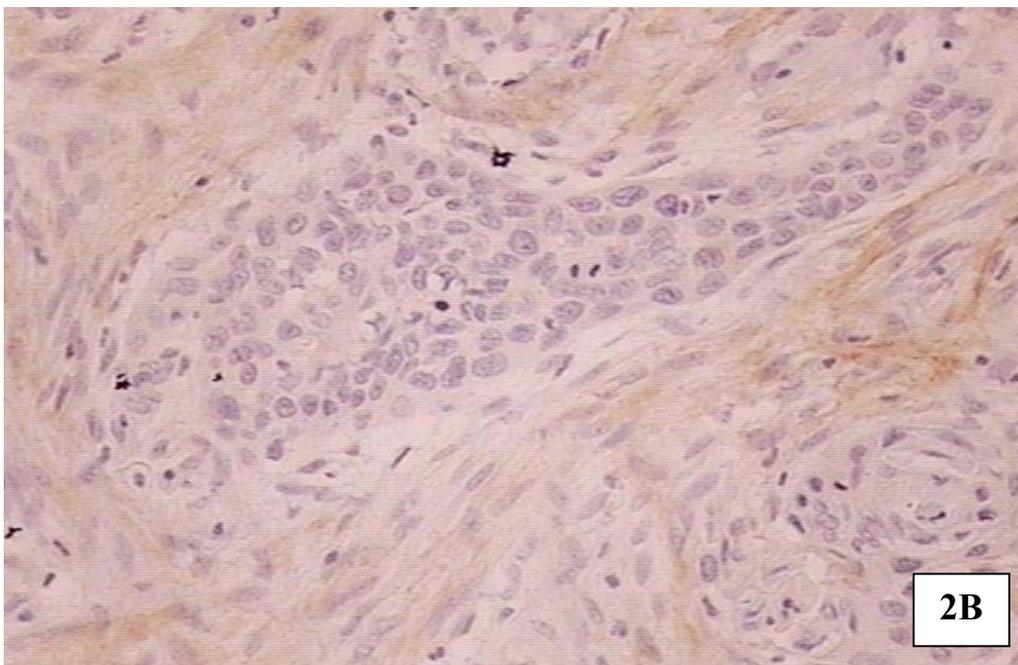
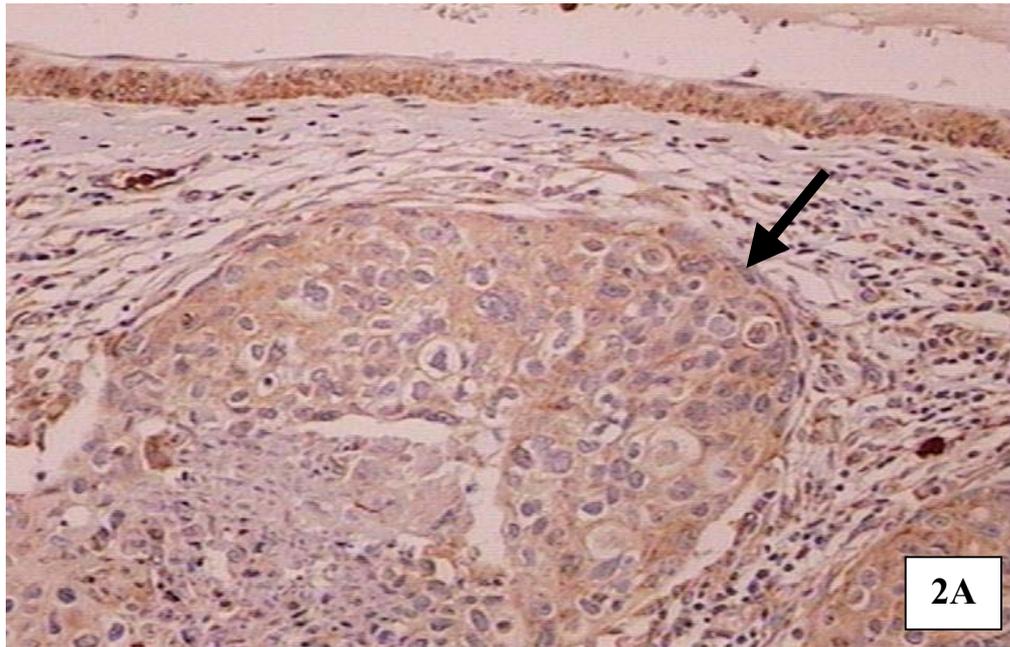


Fig. 2 - Imuno-histoquímica da expressão do VEGF: (2A) Positiva e (2B) Negativa. A expressão do VEGF foi observada no citoplasma (seta) das células tumorais (100X)

Tabela 1 - Relação entre as expressões da proteína p53 e do VEGF e as características clinicopatológicas em 47 casos de CEE*

Características*	p53 Positivo	p53 Negativo	Valor de p	VEGF Positivo	VEGF Negativo	Valor de p
Idade	53,7 ± 10,5	58 ± 12,7	0,208	55,1 ± 12,1	56,1 ± 11,5	0,795
Sexo						
Masculino	23 (92)	18 (81,8)	0,398	17 (89,5)	24 (85,7)	0,999
Feminino	2 (8)	4 (18,2)		2 (10,5)	4 (14,3)	
Grau de diferenciação histológica						
Bem diferenciado	4 (16)	3 (13,6)	0,545	4 (21,1)	3 (10,7)	0,721
Moderadamente diferenciado	16 (64)	15 (68,2)		12 (62,3)	19 (67,9)	
Pouco diferenciado	3 (12)	4 (18,2)		2 (10,5)	5 (17,9)	
Indiferenciado	2 (8)	0 (0)		1 (5,3)	1 (3,6)	
Profundidade de invasão**						
T1-2	8 (32)	5 (22,7)	0,437	4 (21,1)	9 (32,1)	0,703
T3	13 (52)	15 (68,2)		13 (68,4)	15 (53,6)	
T4	4 (16)	2 (9,1)		2 (10,5)	4 (14,3)	
Comprometimento linfonodal						
Positivo	9 (36)	13 (59,1)	0,197	11 (57,9)	11 (39,3)	0,339
Negativo	16 (64)	9 (40,9)		8 (42,1)	17 (60,7)	
Tipo de ressecção						
Curativo	18 (72)	16 (72,7)	0,999	14 (73,7)	20 (71,4)	0,999
Paliativo	7 (28)	6 (27,3)		5 (26,3)	8 (28,6)	
Estágio***						
II	11 (44)	12 (54,5)	0,668	10 (52,6)	13 (46,4)	0,904
III	14 (56)	10 (45,5)		9 (47,4)	15 (53,6)	

*O número entre parênteses corresponde ao percentual

**T1: comprometimento das camadas mucosa ou submucosa; T2: comprometimento da camada muscular; T3: comprometimento da adventícia; T4: invasão dos tecidos vizinhos.

***De acordo com a UICC - TNM(p), 1987

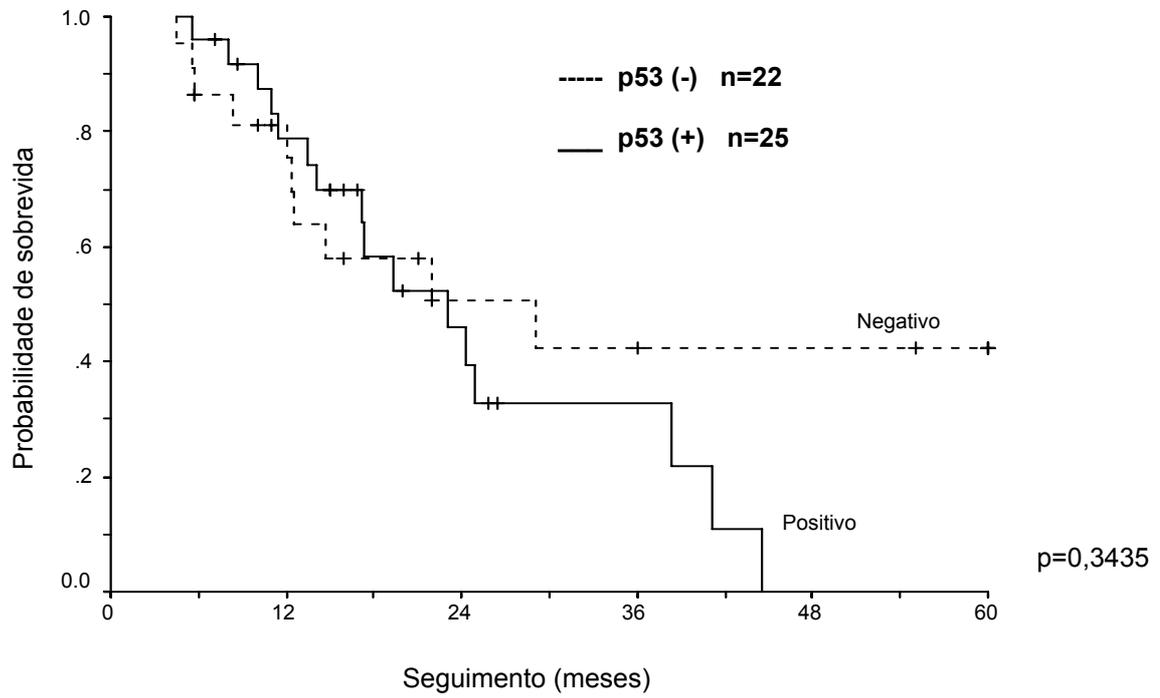


Fig. 3 - Curvas de sobrevivência a longo prazo de acordo com a expressão da proteína p53

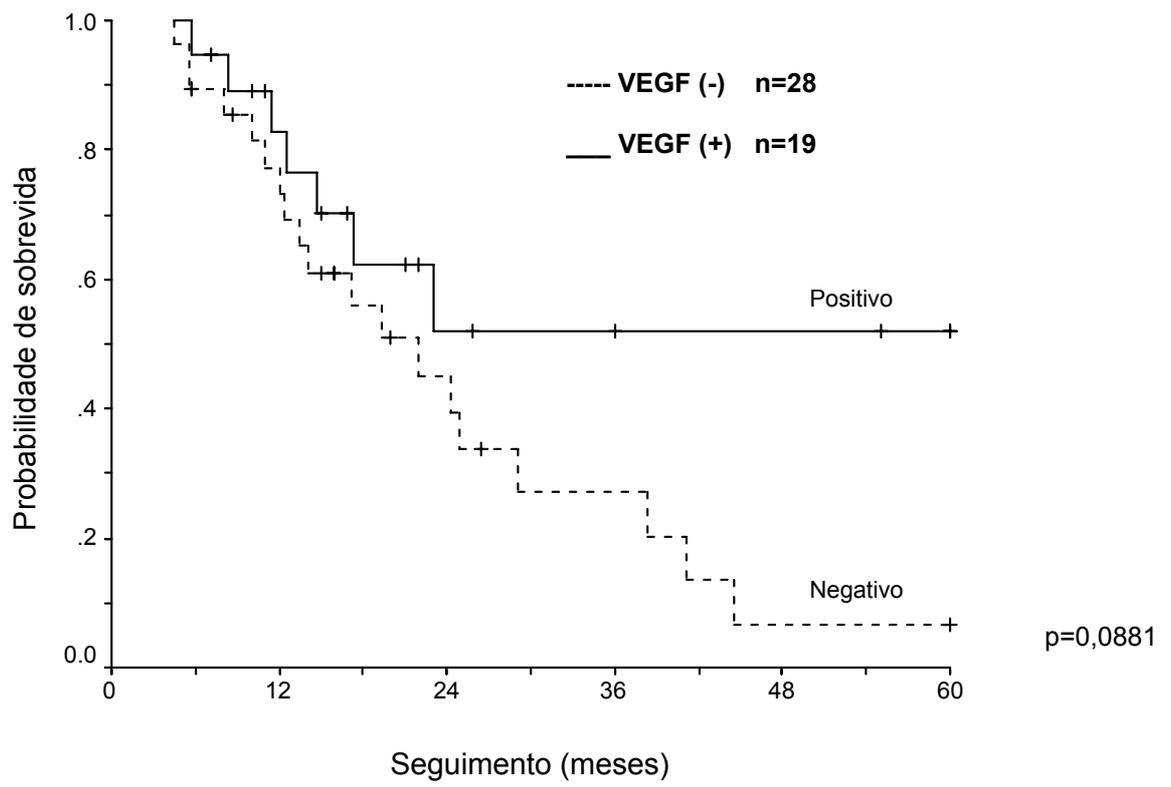


Fig. 4 - Curvas de sobrevida a longo prazo de acordo com a expressão do VEGF

**Tabela 2 - Análise multivariada (modelo de regressão de azares proporcionais de Cox)
das seis características clinicopatológicas seleccionadas**

Característica	Risco Relativo (95% IC)	Valor de p
Profundidade de penetração	2,335 (0,600 - 9,091)	0,221
Comprometimento linfonodal	4,949 (0,994 - 24,643)	0,051
Tipo de ressecção	1,697 (0,589 - 4,892)	0,327
Estágio	0,422 (0,066 - 2,701)	0,363
p53	0,762 (0,272 - 2,132)	0,604
VEGF	0,484 (0,178 - 1,315)	0,155

DISCUSSÃO

As mutações do gene de supressão tumoral p53 são encontradas em cerca de metade de todos os tipos de câncer (14). Nós observamos que a expressão da proteína p53 ocorreu em 53,2% dos casos de CEE, sugerindo que alterações do gene p53 são realmente freqüentes e fundamentais na carcinogênese esofágica.

Particularmente, foram estudados pacientes com duas características específicas: portadores exclusivamente de CEE e em estágios II e III. A expressão da proteína p53 não se correlacionou com a progressão (invasão) do tumor, indicando que a alteração do gene p53 não difere estatisticamente nesses estágios, já ocorrendo em estágios precoces (I) e possivelmente aumentando em estágios mais avançados (IV) da doença (15). Além disso, a expressão da proteína p53 não foi um fator prognóstico, tanto após análise univariada quanto multivariada, nem se correlacionou com as demais características clinicopatológicas.

A associação entre a expressão da proteína p53 e o prognóstico tem sido amplamente investigada por imuno-histoquímica, estando significativamente relacionada a pior prognóstico nos tumores de mama, pulmão, estômago e cólon (16). Com relação ao CEE, o papel da expressão da proteína p53 ainda necessita ser determinado. A maioria dos estudos envolvendo predominantemente pacientes com CEE indica que a expressão da proteína p53 não está associada a pior sobrevida a longo prazo (15, 17-21). Por outro lado, outros estudos verificaram que a expressão da proteína p53 estava relacionada a pior prognóstico (22-24). Tal discordância é justificada porque muitos estudos incluem pacientes com tipos histológicos diferentes (adenocarcinoma e carcinoma epidermóide), tumores em diferentes estágios e diferentes tipos de ressecção (paliativa e curativa) (3, 23). Além disso, na maioria das vezes as alterações do gene p53 são investigadas por imuno-histoquímica e a ausência de expressão da proteína p53 não necessariamente exclui a existência de mutações. Por exemplo, tumores com

deleção de ambos os alelos do gene p53 seriam classificados como negativos juntamente com tumores sem expressão da proteína p53 (18). É especulada também a presença de outros mecanismos interferindo na função do gene p53, como danos a outros componentes da fase G1 do ciclo celular (p16, pRB e ciclina D1) (16). Para determinar se a perda da função normal da proteína p53 se correlaciona com a progressão do tumor ou com o prognóstico de pacientes com CEE, a análise do gene p53 no DNA da célula tumoral seria necessária (15, 17).

A expressão do VEGF ocorreu em 40,4% dos casos, percentual inferior à média da literatura (Tabela 3), mesmo levando-se em consideração o fato de contar com tumores mais avançados (Estágios II e III) e considerar como VEGF-positivos somente os casos com 30% ou mais de células coradas.

O verdadeiro papel da expressão do VEGF e sua relação com a sobrevida a longo prazo em pacientes submetidos à esofagectomia ainda não estão esclarecidos. Para a correta interpretação dos resultados, é fundamental considerar o grupo de pacientes que está sendo avaliado. Se tal grupo for composto por pacientes com doença mais avançada (estágios II e III), a expressão do VEGF pode não ser útil, já que ela sofrerá a influência de outros fatores (como por exemplo a profundidade de penetração do tumor na parede esofágica ou o comprometimento linfonodal) que a impedirão de ser, por si só, determinante de pior prognóstico (25). Por outro lado, se o grupo estudado for formado por pacientes em estágios mais precoces (com seguimento mais longo), a diferença entre as curvas de sobrevida a longo prazo (determinante da significância estatística) será maior, observando-se então o seu valor prognóstico. Somando-se a isso, é importante também lembrar que muito das diferenças encontradas se verifica na cauda da curva, onde se observa menor número de pacientes, devendo-se, portanto, ter cautela na interpretação dos resultados. Dessa forma, a expressão do VEGF é especialmente útil em pacientes em estágios iniciais da doença (notadamente estágio I), que deveriam ser tratados de acordo com a expressão do VEGF, conforme recomenda a

maioria dos autores (Tabela 3). Se VEGF-positivos, estaria indicado um tratamento mais agressivo (neo-adjuvante, por exemplo), já que mais precocemente poderiam apresentar metástases à distância e conseqüentemente pior prognóstico.

Embora haja uma tendência de encurtamento da sobrevida no grupo VEGF-positivo (7, 12, 26-28), Kitadai e colaboradores (29) verificaram que tal associação não atingiu significância estatística, porque a angiogênese tumoral não é controlada simplesmente pela presença do VEGF mas pode ser mediada por outros fatores angiogênicos. Devido ao fato do processo angiogênico ser complexo, estudos adicionais interessando outros reguladores angiogênicos devem ser realizados.

Sato e colaboradores (30), estudando 134 pacientes com CEE, verificaram que a expressão do VEGF se correlacionou com as metástases para linfonodos: 48,6% no grupo sem comprometimento linfonodal e 74,2% no grupo com comprometimento linfonodal. Além disso, os autores demonstraram que nos estágios precoces de metástases linfonodais (envolvimento inferior a 50% do linfonodo) a expressão do VEGF é maior quando comparada com os estágios tardios, postulando que o desenvolvimento tumoral em estágios tardios pode ser independente do VEGF, enquanto que o evento metastático inicial pode ser VEGF-dependente ou no mínimo correlacionado. A expressão do VEGF, portanto, parece ser mais importante para predizer o prognóstico em tumores precoces, cujas diferenças entre os grupos (VEGF-positivo versus VEGF-negativo) podem ser observadas com mais clareza (Tabela 3). Como nosso estudo contou apenas com pacientes em Estágios II e III, tais diferenças não puderam ser observadas, pois tais pacientes já se encontram com doença avançada, não dando mais tempo para manifestações angiogênicas, típicas de outros tumores menos agressivos. Assim, recomenda-se a utilização da expressão do VEGF para tumores precoces, uma vez que o estadiamento convencional (TNM) não diferencia claramente o prognóstico de tumores localizados na mucosa dos localizados na submucosa, uma distinção que tem sido

demonstrada ser de importância clínica (31).

Outro aspecto que deve ser levado em conta ao se estudar o prognóstico do CEE é o fato de que os pacientes invariavelmente apresentam um seguimento curto, devido ao estágio avançado da doença na época do diagnóstico, dificultando a identificação de fatores prognósticos que porventura se manifestariam mais tardiamente na evolução da doença.

Recentemente, foi relatado que o gene p53 tem um papel importante na regulação da expressão do VEGF. A mutação do gene de supressão tumoral, aumentando a proliferação celular tumoral, estaria envolvida na regulação para menos de inibidores da angiogênese, como por exemplo a trombospondina e na regulação para mais de fatores angiogênicos, como o VEGF. A hipóxia, a qual caracteriza os tumores malignos como resultado da proliferação celular com conseqüente consumo de oxigênio, estimula a produção do VEGF (32, 33).

Apesar das evidências experimentais e clínicas de que exista associação entre as expressões da proteína p53 e do VEGF e pior prognóstico (12, 33-35), tal fato não foi demonstrado no presente estudo, tanto através de associação direta como pela análise de subgrupos (Figura 5). Pode ser postulado, entretanto, que tal diferença se tornaria mais evidente se fossem estudados maior número de pacientes e com tumores mais precoces, visto que outros fatores clinicopatológicos poderiam estar interferindo em cada subgrupo.

Os mecanismos moleculares da expressão do VEGF ainda estão sendo especulados. O gene p53 mutante poderia aumentar a expressão do VEGF induzida pela 12-0-tetradecanoilforbol-13-acetato, com ativação da proteína-quinase C (33). A mutação do gene p53 ocorre precocemente no câncer de esôfago e estimula a expressão do VEGF (33, 36). Outras possibilidades são de que o gene p53 selvagem iniba a transcrição do VEGF, o contrário ocorrendo quando o gene p53 está na forma mutante. Embora a correlação entre as expressões do VEGF e da proteína p53 tenha sido sugerida experimentalmente, há poucos estudos demonstrando essa correlação em pacientes com CEE (10, 37).

Concluindo, nosso estudo não demonstrou associação entre as expressões da proteína p53 e do VEGF com pior sobrevida a longo prazo. No entanto, a busca outros fatores prognósticos para identificar pacientes com CEE com alto risco de recorrência, os quais poderiam se beneficiar de tratamentos neo-adjuvantes e/ou adjuvante, deve ser perseguida. A expectativa de que um marcador da angiogênese possa identificar pacientes com doença metastática oculta ou com prováveis metástases à distância pode não ser possível, por no mínimo duas razões: os tumores humanos são heterogêneos (formados por subpopulações de células com propriedades biológicas diferentes) e o processo metastático é seqüencial e seletivo, consistindo em uma série de passos interligados porém independentes. Da mesma forma que todos os outros passos da cascata metastática, a angiogênese é fundamental mas não suficiente para a patogênese de uma metástase. Portanto, a angiogênese é uma etapa essencial no início e no final do processo metastático, mas, isoladamente, não resulta em efetivo desenvolvimento de metástases.

Tabela 3 - Expressão do VEGF e sobrevida em diferentes estudos

Autor (ano)	n	% Est. II e III	% mínimo VEGF+	% VEGF+	Influência do T/VEGF+	Influência do Estágio/ VEGF+	VEGF+ influencia SV?	Observações
Inoue (1997)	75	55	≥30	46,7	Sim	Não	Sim(multi)	SV 5 anos: VEGF+ = 40% VEGF- = 60%
Kitadai (1998)	119	NI	≥30	59,7	Sim	Sim	Não	
Uchida (1998)	109	51	≥10	59,6	Sim	Sim	Sim (uni)	29% Estágio I
Arii (1999)	102	51	NI	60	Sim	Sim	Sim	32% Estágio I
Koide (1999)	52	NI	≥30	57,7	Não	NI	Sim	SV 5 anos: VEGF+ = 34% VEGF- = 67%
Shih (2000)	117	81	≥80	31	Não	Não	Sim (T3N1)	
Esse estudo (2002)	47	100	≥30	40,4	Não	Não	Não	

n: número de pacientes com CEE incluídos no estudo

% Est. II e III: percentual de pacientes no estudo nos Estágios II e III

% mínimo VEGF+: percentual mínimo de células tumorais coradas para a expressão do VEGF ser considerada positiva

% VEGF+: percentual de pacientes com expressão do VEGF

Influência do T/VEGF+: influência da profundidade de penetração do tumor na parede esofágica e expressão do VEGF

Influência do Estágio/ VEGF+: influência do estágio histopatológico e expressão do VEGF

NI: não informado

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Harrison LE. Is esophageal cancer a surgical disease? *J Surg Oncol* 2000; 75:227-231.
2. Rosa AR, Schirmer CC, Gurski RR, Brentano L, Kruehl CD. Survival and prognostic factors in patients with epidermoid oesophageal carcinoma. *Int Surg* 1999; 94:193-198.
3. Aloia TA, Harpole Jr DH, Reed CE, Allegra C, Moore MH, Herndon II JE, et al. Tumor marker expression is predictive of survival in patients with esophageal cancer. *Ann Thorac Surg* 2001; 72:859-866.
4. Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14): 2451-2460.
5. Chung YS, Maeda K, Sowa M. Prognostic value of angiogenesis in gastrointestinal tumors. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14):2501-2505.
6. Maeda K, Chung Y, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang S, Ogawa M, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 77:858-863.
7. Inoue K, Ozeki Y, Suganuma T, Sugiura Y, Tanaka S. Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal cell carcinoma. *Cancer* 1997; 79:206-213.
8. Kitadai Y, Haruma K, Tokutomi T, Tanaka S, Sumii K, Carvalho M, et al. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas. *Clin Cancer Res* 1998; 4:2195-2200.
9. Uchida S, Shimada Y, Watanabe G, Tanaka H, Shibagaki I, Miyahara T, et al. In oesophageal squamous cell carcinoma vascular endothelial growth factor is associated with p53 mutation, advanced stage and poor prognosis. *Br J Cancer* 1998; 77(10):1704-1709.
10. Arii S, Mori A, Uchida S, Fujimoto K, Shimada Y, Inamura M. Implication of vascular endothelial growth factor in the development and metastasis of human cancers. *Human Cell* 1999; 12(1):25-30.

11. Koide N, Nishio A, Kono T, Yazawa K, Igarashi J, Watanabe H, et al. Histochemical study of vascular endothelial growth factor in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hepatogastroenterology* 1999; 46:952-958.
12. Shih CH, Ozawa S, Ando N, Ueda M, Kitajima M. Vascular endothelial growth factor expression predicts outcome and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res* 2000; 6:1161-1168.
13. Maeda K, Kang SM, Onoda N, Ogawa M, Sawada T, Nakata B, et al. Expression of p53 and vascular endothelial growth factor associated with tumor angiogenesis and prognosis in gastric cancer. *Oncology* 1998; 55:594-599.
14. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. *N Engl J Med* 1993; 329(18):1318-1327.
15. Ikeguchi M, Saito H, Katawo K, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N. Clinicopathologic significance of the expression of mutated p53 protein and the proliferative activity of cancer cells in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *J Am Coll Surg* 1997; 185:398-403.
16. Coggi G, Bosari S, Roncalli M, Graziani D, Bossi P, Viale G, et al. p53 protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma. *Cancer* 1997; 79:125-132.
17. Sarbia M, Porschen R, Borchard F, Horstmann O, Willers R, Gabbert HE. p53 protein expression and prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1994; 74:2218-2223.
18. Sarbia M, Vereet PR, Röher HD. Relevant prognostic biological and morphological factors in esophageal cancer. In: Perachia A, Rosati R, Bonavina L, Fumagalli U, Bona S, Chella B, editors. *Recent Advances in Diseases of the Esophagus*. Bologna: Monduzzi Editore, 1996. p.15-18.

19. Vijeyasingam R, Darnton SJ, Jenner K, Allen CA, Billingham C, Matthews HR. Expression p53 protein in oesophageal carcinoma: clinicopathological correlation and prognostic significance. *Br J Surg* 1994; 81:1623-1626.
20. Kanamoto A, Kato H, Tachimori Y, Watanabe H, Nakanishi Y, Kondo H, et al. No prognostic significance of p53 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 1999; 72(2):94-98.
21. Shinohara M, Aoki T, Sato S, Takagi Y, Osaka Y, Koyanagi Y, et al. Cell cycle-regulated factors in esophageal cancer. *Dis Esophagus* 2002; 15(2):149-154.
22. Patel DD, Bhatavdekar JM, Chikhlikar PR, Patel YV, Shah NG, Ghosh N, et al. Clinical significance of p53, nm23, and bcl-2 in T3-4N1M0 oesophageal carcinoma: an immunohistochemical approach. *J Surg Oncol* 1997; 65:111-116.
23. Kobayashi S, Koide Y, Endo M, Isono K, Ochiai T. The p53 gene mutation is of prognostic value in esophageal squamous cell carcinoma patients in unified stages of curability. *Am J Surg* 1999; 177:497-502.
24. Ikeda G, Isaji S, Chandra B, Watanabe M, Kawarada Y. Prognostic significance of biologic factors in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1999; 86(8):1396-1405.
25. Ogata Y, Harada Y, Fujii T, Yamana H, Fujita H, Shirouzu K. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *Kurume Med J* 1996; 43:157-163.
26. Shimada Y, Imamura M, Watanabe G, Uchida S, Harada H, Makino T, et al. Prognostic factors of oesophageal squamous cell carcinoma from the perspective of molecular biology. *Br J Cancer* 1999; 80(8):1281-1288.

27. Shimada H, Takeda A, Nabeya Y, Okazumi S, Matsubara H, Funami Y, et al. Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2001; 92:663-669.
28. Kitadai Y, Amioka T, Haruma K, Tanaka S, Yoshihara M, Sumii K, et al. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001; 93:662-666.
29. Kitadai Y, Haruma K, Tokutomi T, Tanaka S, Sumii K, Carvalho M, et al. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas. *Clin Cancer Res* 1998; 4:2195-2200.
30. Sato F, Shimada Y, Watanabe G, Uchida S, Makino T, Imamura M. Expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-9 and E-cadherin in the process of lymph node metastasis in oesophageal cancer. *Br J Cancer* 1999; 80(9):1366-1372.
31. Mathew R, Arora S, Khanna R, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. Alterations in p53 and pRb pathways and their prognostic significance in oesophageal cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38:832-841.
32. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumors: International Consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14):2474-2484.
33. Keiser A, Weich HA, Brandner G, Marme D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein Kinase-C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994; 9:963-969.
34. Mulkhopadhyay D, Tsioskas L, Sukhatame VP. Wild-type p53 and v-src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* 1995; 55:6161-6165.
35. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14):2413-2422.

36. Rak J, Mitsuhashi Y, Bakyo L, Filmus J, Shirakawa S, Sasazuki T, et al. Mutant *ras* oncogenes up-regulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995; 55:4575-4580.
37. Koide N, Nishio A, Hiraguri M, Hanazaki K, Adachi W, Amano J. Coexpression of vascular endothelial growth factor and p53 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(6):1733-1740.

5. ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA INGLESA*

Prognostic value of p53 protein expression and vascular endothelial growth factor expression in resected squamous cell carcinoma of the esophagus

André R. Rosa, MD¹; Carlos C. Schirmer, MD, PhD¹; Richard R. Gurski, MD, PhD¹; Luíse Meurer, MD²; Maria I. Edelweiss, MD, PhD²; Cleber D. Kruehl, MD, PhD¹.

Departments of General Surgery¹ and Pathology², Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Medical Post-Graduate Program: Surgery. School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Address correspondence to: Dr. André R. Rosa. Rua Castro Alves, 915/303, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, 90430-131. Tel.: +55 51 33335795; Fax: +55 51 33114371; e-mail: ar.rosa@uol.com.br

*Formatado de acordo com as Instruções para Autores do periódico "Diseases of the Esophagus", jornal oficial da International Society for Diseases of the Esophagus

SUMMARY. p53 tumor suppressor gene mutations are the most common genetic alterations found in a wide variety of cancers. Although the function of the p53 gene has not been definitely established, p53 appears to be a nuclear transcription factor that plays a role in the control of cell proliferation, apoptosis, and the maintenance of genetic stability. Angiogenesis is a critical process in solid tumor growth and metastasis. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), a recently identified growth factor with significant angiogenic properties, may be a major tumor angiogenesis regulator. Few studies have investigated the association between p53 and VEGF expressions and prognosis in esophageal carcinoma. Forty-seven specimens resected from patients with stage II and III squamous cell carcinoma (SCC) of the esophagus were studied by means of immunohistochemical staining. p53 and VEGF expressions were observed in 53% and 40% of the tumors, respectively. p53 and VEGF staining statuses were coincident in only 21% of the tumors, and no significant correlation was found between p53 and VEGF statuses. No clinicopathologic factors were significantly correlated with p53 or VEGF expression. No significant association between p53 and VEGF expressions and poor prognosis was found. In conclusion, p53 and VEGF were not correlated with prognosis in patients with stage II and III SCC of the esophagus.

INTRODUCTION

Despite advances in therapeutic strategies and postoperative management, prognosis for esophageal cancer patients remains poor. Such inefficacy may be assigned to either a lack of potency of therapeutic regimens or the administration of these therapies to an inappropriate population. Although the development of better chemotherapeutic agents may improve the efficacy of induction therapy, survival may also be improved by using tumor marker analysis to refine the current staging system and to guide therapeutic decisions (1-3).

Angiogenesis is a critical factor in solid tumor growth. It has been suggested that angiogenesis may promote tumor progression and metastasis. Because clinicopathologic factors are based on morphologic classification, additional factors based on biological characteristics should be examined to identify patients who are at a greater risk of disease recurrence. Recurrence probably arises from the growth of hidden micrometastasis that have already developed by the time of surgery. Therefore, identification of specific indicators of metastatic potential of primary tumors would promote a better prognostic stratification of patients, and, thus, more effective treatment (4-6).

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is an angiogenic factor that stimulates the growth of endothelial cells, and a major component of angiogenesis in several tumors. The degree of tumor angiogenesis is associated with clinical outcome, and angiogenic properties correlate with tumor aggressiveness. Few studies about the association between VEGF expression, angiogenesis and prognosis have been done in esophageal carcinoma (7-12).

At the same time, the p53 tumor suppressor gene has been found in a wide variety of cancers. Mutations in this gene are the most common genetic alterations found in malignant tumors. Although the function of the p53 gene has not been definitely established, p53 appears to be a nuclear transcription factor that plays a role in the control of cell proliferation,

apoptosis, and the maintenance of genetic stability. Moreover, recent reports have demonstrated that the p53 gene plays an important role in angiogenesis by regulating VEGF expression (9, 13). However, definitive clinical studies about squamous cell carcinoma (SCC) of the esophagus and p53 and VEGF expressions have not been found in the literature.

The purpose of this study was to investigate how p53 and VEGF expressions correlate with prognosis, whether p53 expression is associated with VEGF expression, and whether p53 and VEGF coexpression influences the prognosis in patients with SCC of the esophagus.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Eighty-six consecutive patients with SCC of the esophagus underwent subtotal esophagectomy with curative intent from December 1988 to August 2001. We excluded patients who died by reasons directly associated with the surgical procedure (early postoperative death), received preoperative chemotherapy and radiotherapy, or had a history or presence of an associated malignant tumor. We also excluded patients whose paraffin block was misplaced or whose slide did not contain an adequate sample of the tumoral tissue. Forty-seven patients fulfilled the selection criteria and were included in the study.

Pathological analysis and tissue preparation

A routine pathologic examination was performed to determine depth of penetration, presence of lymph node metastasis, surgical margins, and histologic differentiation. Disease was staged according to the UICC-TNM (p) classification (1987). Resected specimens were fixed in a

10% formaldehyde solution and embedded in paraffin. Four-micrometer-thick sections were cut and mounted on glass slides.

Antibodies and reagents

The primary antibodies used were a mouse monoclonal antibody DO-7, which recognizes p53 protein, and a rabbit polyclonal antibody A-20, which recognizes VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). DO-7 recognizes both wild type and mutant p53, but given the extremely short half-life of wild type p53 protein, staining is likely to represent abnormal accumulation of the mutant type only. A-20 is an affinity-purified rabbit polyclonal antibody raised against an aminoterminal epitope of human VEGF mapping at residues 1-20, and recognizes the 165, 189 and 121 amino acid splice variants of VEGF.

Immunohistochemical staining techniques

Samples were analyzed for p53 and VEGF expressions by an immunohistochemical technique previously described. After dewaxing, inactivating endogenous peroxidase activity, and blocking cross-reaction with normal serum, the sections were incubated overnight at 4°C with a diluted solution of the primary antibodies (1:100 for p53 and 1:400 for VEGF). Identification of primary antibody location was achieved by subsequent application of biotinylated antibody, streptavidin horseradish peroxidase conjugate (LSAB, Dako, and diamino-benzidine tetrahydrochloride/H₂O₂ (Kit DAB, Dako). All reactions were executed with positive controls (breast cancer for p53 protein expression and placenta tissue for VEGF expression).

Immunohistochemical determination of p53 and VEGF expressions

Intense brownish nuclear staining in more than 10% of cells was the criterion for immunostaining positivity for p53. Normal serum blocking and omission of the primary antibody were used as negative control. VEGF expression was characterized as a negative or positive reaction according to the intensity of cytoplasm immunostaining. If more than 30% of the carcinoma cells were stained more intensely than the smooth muscle in the adjacent normal esophageal tissue, the tumor was classified as positive. Smooth muscle in the section served as positive control, because smooth muscle cells have been shown to express VEGF. Slides were examined by two investigators blinded to the corresponding patient's status. The few cases of significantly disagreeing scores were reevaluated jointly on a second occasion, and an agreement was reached.

Evaluation of coexpression of VEGF and p53 protein

Cases were divided into three groups according to VEGF and p53 protein immunostaining. Group A was composed of VEGF-positive and p53-positive samples; Group B, VEGF-positive and p53-negative, or VEGF-negative and p53-positive; and Group C, VEGF-negative and p53-negative samples.

Design, follow-up and ethics

Study design was nonconcurrent cohort. Surgical resection was considered time zero. Follow-up started after surgery and continued until the end of the study (05/31/2002) or death of patient. Disease-attributed death (outcome) was defined as death directly associated with the event (esophageal cancer). Data from all patients who died by other causes or were lost to follow-up were censored. The study protocol was approved by the local Ethics Committee.

Statistical analysis

Clinicopathologic factors and histochemical results were analyzed with the "t" test for continuous variables and the chi-square test or Fisher exact test for categorical variables. Survival rates were retrospectively surveyed and calculated by means of the Kaplan-Meier method according to the number of patients who died of carcinoma. Differences between survival curves were compared by a log-rank test. The influence of each variable on survival and on the mode of recurrence was assessed by means of the Cox proportional hazards model and multivariate logistic regression analysis. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. The software SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 8.0 version was used for statistical analysis.

RESULTS

Patients and surgical technique

Patients' ages ranged from 31 to 77 years (mean, 55.7); 41 were men, and 6 were women. Twenty-five patients (46.8%) underwent transthoracic esophagectomy and twenty-two patients (46.8%), transhiatal esophagectomy.

p53 protein and VEGF expression

p53 protein expression was observed in nuclei of tumor cells of SCC of the esophagus and was classified as positive in 25 (53.2%) and negative in 22 (46.8%) of the 47 patients studied (Fig. 1A and 1B, respectively). VEGF expression was classified as positive in 19 (40.4%) and negative in 28 (59.6%) of the 47 patients with SCC of the esophagus; immunohistochemical staining was primarily observed in the cytoplasm of tumor cells (Fig. 2A and 2B).

p53 protein and VEGF expression and clinicopathologic features

The association between VEGF expression and clinicopathologic factors is shown in Table 1. There was no significant correlation between p53 protein and VEGF expressions and age, sex, degree of differentiation, depth of penetration, lymph node metastasis, type of resection, or stage.

Mean follow-up and overall survival

Mean follow-up time was 20.5 months (SD = 15.14, 4.43-60 months; median = 16). Mean overall survival was 28.9 months (CI = 22.27-35.49; PE = 3.37; median = 23).

p53 expression and long-term survival

Mean long-term survival of 25 patients with positive p53 protein expression was 24.6 months (CI = 18.67-30.5; PE = 3.02) and of 22 patients with negative p53 protein expression was 33.6 months (CI = 22.36-44.8; PE = 5.72). Survival rates in 1, 2, 3, 4 and 5 years were 78.7%, 45.9%, 32.8%, 0% and 0% for the p53-positive group, and 75.5%, 50.8%, 42.3%, 42.3% and 33.6% for the p53-negative group (Figure 3). There was no statistical difference between groups ($p=0.3435$).

VEGF expression and long term survival

Mean long term survival of 19 patients with positive VEGF expression was 38.1 months (CI = 25.9-50.3; PE = 6.24), and of 28 patients with negative VEGF expression was 24.1 months (CI = 17.5-30.7; PE = 3.36). Survival rates in 1, 2, 3, 4 and 5 years were 82.8%, 51.9%, 51.9%, 51.9% and 51.9% for the VEGF-positive group, and 73.2%, 45.2%, 27.1%, 6.8% and 6.8% for the VEGF-negative group (Figure 4). There was no statistical difference between groups ($p=0.0881$).

p53 protein and VEGF coexpression

Mean long term survival of Groups A (n=10), B (n=30) and C (n=7) was 24 months (CI = 10.2-37.8; PE = 7.04), 30.7 months (CI = 22.6-38.7; PE = 4.11) and 20.3 months (CI = 15.7-24.9; PE = 2.36). There was no statistical difference between the three groups (p=0.6849) (Figure 5). There was no statistically significant association between p53 protein and VEGF expressions (p=0.999).

Multivariate analysis

Multivariate analysis was conducted to determine the influence of each of the six prognostic factors in long term survival. No independent prognostic factor of long term survival was identified (Table 2).

DISCUSSION

Mutations of the p53 tumor suppressor gene are found in about half of all types of cancer (14). p53 expression was observed in 53.2% of our patients with SCC of the esophagus, which suggests that p53 gene mutations are frequent and critical in esophageal carcinogenesis.

Our study, in particular, focused on two specific characteristics: patients with SCC of the esophagus only, and with stage II and III disease. p53 protein expression was not correlated with the progression (invasion) of tumor. This indicates that p53 gene mutations do not change at an statistically significant rate in these stages, and that mutations occur at earlier stages (I), and probably increase in more advanced stages (IV) of the disease (15). Moreover, p53 protein expression was not a prognostic factor either in univariate or multivariate

analysis, and was not correlated with the other clinicopathologic characteristics.

The association of p53-protein expression and prognosis has been widely investigated by means of immunohistochemical studies, and has been shown to be significantly associated with poor prognosis in breast, lung, stomach and colon cancers (16). The role of p53 protein expression in SCC of the esophagus has not been determined yet. Most studies that included a predominant number of patients with SCC of the esophagus report that p53 protein expression is not associated with a worse long-term survival (15, 17-21). On the other hand, some studies report that p53 protein expression is associated with a poor prognosis (22-24). Such discrepancy is explained by the fact that several studies include patients with different histologic types of cancer (adenocarcinoma and epidermoid carcinoma), tumors at different stages, or different types of resection (palliative or curative) (3, 23). Moreover, the p53 gene mutations are often investigated by means of immunohistochemical studies, and the absence of p53 protein expression does not rule out mutations. For instance, tumors with deletion of both alleles of the p53 gene would be classified as negative together with tumors without p53 protein expression (18). It has also been suggested that other mechanisms interfere in the function of the p53 gene, such as damage to other components of the G1 phase of the cell cycle (p16, pRB, and cyclin D1) (16). The analysis of the p53 gene in the DNA of the tumor cell would be necessary to determine whether the loss of normal function of the p53 protein is associated with tumor progression or prognosis for patients with SCC of the esophagus.

VEGF expression occurred in 40.4% of our cases, a rate below the mean found in literature (Table 3) even after adjusting results to the fact that our study included tumors at a more advanced stage (stages II and III) and that we classified as positive only those samples that had 30% or more of the cells stained.

The actual role of VEGF expression and its association with long term survival in patients who undergo esophagectomy is still unclear. It is important to consider the

characteristics of the patients under investigation to interpret results accurately. If the group of patients is composed of individuals with more advanced disease (stages II and III), VEGF expression may be influenced by other factors, such as the depth of tumor penetration through the esophageal wall or lymph node involvement, which will preclude its use as a determinant factor of a poor prognosis (25). On the other hand, if the disease of patients under study is at earlier stages (with longer follow-ups), the differences between long-term survival curves, which determine statistic differences, will be greater, and VEGF will have a prognostic value. In addition, much of the differences are found in the curve tail, where there is a smaller number of patients, which stresses that results should be carefully interpreted. Therefore, VEGF expression is especially useful in patients at earlier stages of the disease, particularly at stage I, who should be treated according to VEGF expression, as recommended by most authors (Table 3). For VEGF-positive patients, a more aggressive treatment (neoadjuvant, for example) is recommended since distant metastases may develop earlier and, consequently, result in a poorer prognosis.

Although a shortened survival has been observed for VEGF-positive patients (7, 12, 26-28), Kitadai and colleagues (29) reported that such association has not reached statistical significance because tumoral angiogenesis is not controlled only by the presence of VEGF, but may also be mediated by other angiogenic factors. Since the angiogenic process is complex, further studies about other angiogenic regulators should be conducted.

Sato and colleagues (30) studied 134 patients with SCC of the esophagus and reported that VEGF expression correlated with lymph node metastasis, which were observed in 48.4% of their patients without and 74.2% of those with lymph node involvement. They also demonstrated that VEGF expression is greater at earlier stages of lymph node metastasis (less than 50% lymph node involvement) than at later stages, and suggested that tumoral development at later stages may be independent of VEGF, while the initial metastatic event

may be VEGF-dependent or at least correlated with it. Therefore, VEGF expression seems to be more important in the prediction of prognosis in earlier tumors when the differences between groups (VEGF-positive versus VEGF-negative) are more clearly observed (Table 3). Such differences were not observed in our study since our series included patients at stages II and III, when the disease is already advanced and there is no time to observe angiogenic events that are typical of less aggressive tumors. Therefore, we recommend the use of VEGF expression for early tumors since conventional staging (TNM) does not clearly differentiate between the prognosis of tumors in the mucosa and tumors in the submucosa, a distinction that has been shown to be clinically important (31).

Moreover, when studying prognosis of SCC of the esophagus, we study patients that usually have a short follow-up because of the advanced stage of the disease at the time of diagnosis, and prognostic factors that may be observed later in the progression of the disease are not easily identified.

It has been recently reported that the p53 gene has an important role in the regulation of VEGF expression. The mutation of the tumor suppressor gene, which increases tumor cell proliferation, may be involved in the down-regulation of angiogenesis inhibitors, such as thrombospondin, and the up-regulation of angiogenic factors, such as VEGF. Hypoxia, a characteristic of malignant tumors as a result of cell proliferation and the consequent oxygen consumption, stimulates the production of VEGF (32, 33).

Although there are experimental and clinical evidences of the association of p53 protein and VEGF expressions and a poor prognosis (12, 33-35), such association was not found in our study, neither by means of direct association nor by the analysis of subgroups (Figure 5). This difference, however, might have been made evident if we had studied a larger number of patients or patients with tumors at an earlier stage since other clinicopathologic factors may interfere in each subgroup.

Molecular mechanisms of VEGF expression are still under study. The mutant p53 gene may increase VEGF expression induced by 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate with activation of the protein kinase C (33). p53 gene mutation occurs at an early stage in esophageal cancer, and stimulates VEGF expression (33, 36). Also, the wild type p53 gene may inhibit VEGF transcription, and mutant p53 gene may promote it. Although the correlation of VEGF and p53 protein expressions has been experimentally suggested, few studies demonstrate this correlation in patients with SCC of the esophagus (10, 37).

In conclusion, our study did not find an association between p53 protein and VEGF expressions and a worse long-term survival. However, the search for other prognostic factors to identify patients at a greater risk of recurrence, who may benefit from neoadjuvant or adjuvant treatments, should go on. The expectation that an angiogenesis marker may be able to identify patients with hidden metastatic disease or possible distant metastases may be unrealistic for at least two reasons: human tumors are heterogeneous, that is, formed by cell subpopulations with different biological characteristics; and the metastatic process is sequential and selective, consisting of a series of stages that are related but independent. Similarly to all other steps in the metastatic cascade, angiogenesis is fundamental but not enough for metastatic pathogenesis. Therefore, angiogenesis is a critical phase in the beginning and the end of the metastatic process, but is not the only factor responsible for the development of metastasis.

REFERENCES

1. Harrison LE. Is esophageal cancer a surgical disease? *J Surg Oncol* 2000; 75:227-231.

2. Rosa AR, Schirmer CC, Gurski RR, Brentano L, Kruehl CD. Survival and prognostic factors in patients with epidermoid oesophageal carcinoma. *Int Surg* 1999; 94:193-198.
3. Aloia TA, Harpole Jr DH, Reed CE, Allegra C, Moore MH, Herndon II JE, et al. Tumor marker expression is predictive of survival in patients with esophageal cancer. *Ann Thorac Surg* 2001; 72:859-866.
4. Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14): 2451-2460.
5. Chung YS, Maeda K, Sowa M. Prognostic value of angiogenesis in gastrointestinal tumors. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14):2501-2505.
6. Maeda K, Chung Y, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang S, Ogawa M, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 77:858-863.
7. Inoue K, Ozeki Y, Suganuma T, Sugiura Y, Tanaka S. Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal cell carcinoma. *Cancer* 1997; 79:206-213.
8. Kitadai Y, Haruma K, Tokutomi T, Tanaka S, Sumii K, Carvalho M, et al. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas. *Clin Cancer Res* 1998; 4:2195-2200.
9. Uchida S, Shimada Y, Watanabe G, Tanaka H, Shibagaki I, Miyahara T, et al. In oesophageal squamous cell carcinoma vascular endothelial growth factor is associated with p53 mutation, advanced stage and poor prognosis. *Br J Cancer* 1998; 77(10):1704-1709.
10. Arii S, Mori A, Uchida S, Fujimoto K, Shimada Y, Inamura M. Implication of vascular endothelial growth factor in the development and metastasis of human cancers. *Human Cell* 1999; 12(1):25-30.
11. Koide N, Nishio A, Kono T, Yazawa K, Igarashi J, Watanabe H, et al. Histochemical study of vascular endothelial growth factor in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hepatogastroenterology* 1999; 46:952-958.

12. Shih CH, Ozawa S, Ando N, Ueda M, Kitajima M. Vascular endothelial growth factor expression predicts outcome and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res* 2000; 6:1161-1168.
13. Maeda K, Kang SM, Onoda N, Ogawa M, Sawada T, Nakata B, et al. Expression of p53 and vascular endothelial growth factor associated with tumor angiogenesis and prognosis in gastric cancer. *Oncology* 1998; 55:594-599.
14. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. *N Engl J Med* 1993; 329(18):1318-1327.
15. Ikeguchi M, Saito H, Katawo K, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N. Clinicopathologic significance of the expression of mutated p53 protein and the proliferative activity of cancer cells in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *J Am Coll Surg* 1997; 185:398-403.
16. Coggi G, Bosari S, Roncalli M, Graziani D, Bossi P, Viale G, et al. p53 protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma. *Cancer* 1997; 79:125-132.
17. Sarbia M, Porschen R, Borchard F, Horstmann O, Willers R, Gabbert HE. p53 protein expression and prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1994; 74:2218-2223.
18. Sarbia M, Vereet PR, Röher HD. Relevant prognostic biological and morphological factors in esophageal cancer. In: Perachia A, Rosati R, Bonavina L, Fumagalli U, Bona S, Chella B, editors. *Recent Advances in Diseases of the Esophagus*. Bologna: Monduzzi Editore, 1996. p.15-8.
19. Vijeyasingam R, Darnton SJ, Jenner K, Allen CA, Billingham C, Matthews HR. Expression p53 protein in oesophageal carcinoma: clinicopathological correlation and prognostic significance. *Br J Surg* 1994; 81:1623-1626.

20. Kanamoto A, Kato H, Tachimori Y, Watanabe H, Nakanishi Y, Kondo H, et al. No prognostic significance of p53 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 1999; 72(2):94-98.
21. Shinohara M, Aoki T, Sato S, Takagi Y, Osaka Y, Koyanagi Y, et al. Cell cycle-regulated factors in esophageal cancer. *Dis Esophagus* 2002; 15(2):149-154.
22. Patel DD, Bhatavdekar JM, Chikhlikar PR, Patel YV, Shah NG, Ghosh N, et al. Clinical significance of p53, nm23, and bcl-2 in T3-4N1M0 oesophageal carcinoma: an immunohistochemical approach. *J Surg Oncol* 1997; 65:111-116.
23. Kobayashi S, Koide Y, Endo M, Isono K, Ochiai T. The p53 gene mutation is of prognostic value in esophageal squamous cell carcinoma patients in unified stages of curability. *Am J Surg* 1999; 177:497-502.
24. Ikeda G, Isaji S, Chandra B, Watanabe M, Kawarada Y. Prognostic significance of biologic factors in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1999; 86(8):1396-1405.
25. Ogata Y, Harada Y, Fujii T, Yamana H, Fujita H, Shirouzu K. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *Kurume Med J* 1996; 43:157-163.
26. Shimada Y, Imamura M, Watanabe G, Uchida S, Harada H, Makino T, et al. Prognostic factors of oesophageal squamous cell carcinoma from the perspective of molecular biology. *Br J Cancer* 1999; 80(8):1281-1288.
27. Shimada H, Takeda A, Nabeya Y, Okazumi S, Matsubara H, Funami Y, et al. Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2001; 92:663-669.

28. Kitadai Y, Amioka T, Haruma K, Tanaka S, Yoshihara M, Sumii K, et al. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001; 93:662-666.
29. Kitadai Y, Haruma K, Tokutomi T, Tanaka S, Sumii K, Carvalho M, et al. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas. *Clin Cancer Res* 1998; 4:2195-2200.
30. Sato F, Shimada Y, Watanabe G, Uchida S, Makino T, Imamura M. Expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-9 and E-cadherin in the process of lymph node metastasis in oesophageal cancer. *Br J Cancer* 1999; 80(9):1366-1372.
31. Mathew R, Arora S, Khanna R, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. Alterations in p53 and pRb pathways and their prognostic significance in oesophageal cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38:832-841.
32. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumors: International Consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14):2474-2484.
33. Keiser A, Weich HA, Brandner G, Marme D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein Kinase-C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994; 9:963-969.
34. Mulkhopadhyay D, Tsioskas L, Sukhatame VP. Wild-type p53 and v-src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* 1995; 55:6161-6165.
35. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14):2413-2422.
36. Rak J, Mitsuhashi Y, Bakyo L, Filmus J, Shirakawa S, Sasazuki T, et al. Mutant *ras* oncogenes up-regulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995; 55:4575-4580.

37. Koide N, Nishio A, Hiraguri M, Hanazaki K, Adachi W, Amano J. Coexpression of vascular endothelial growth factor and p53 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(6):1733-1740.

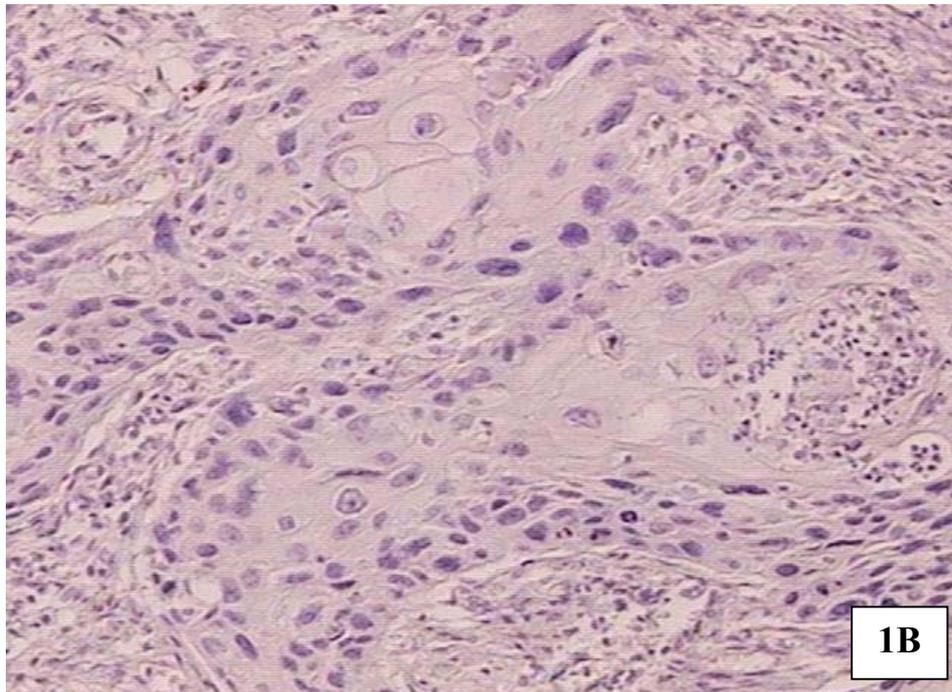
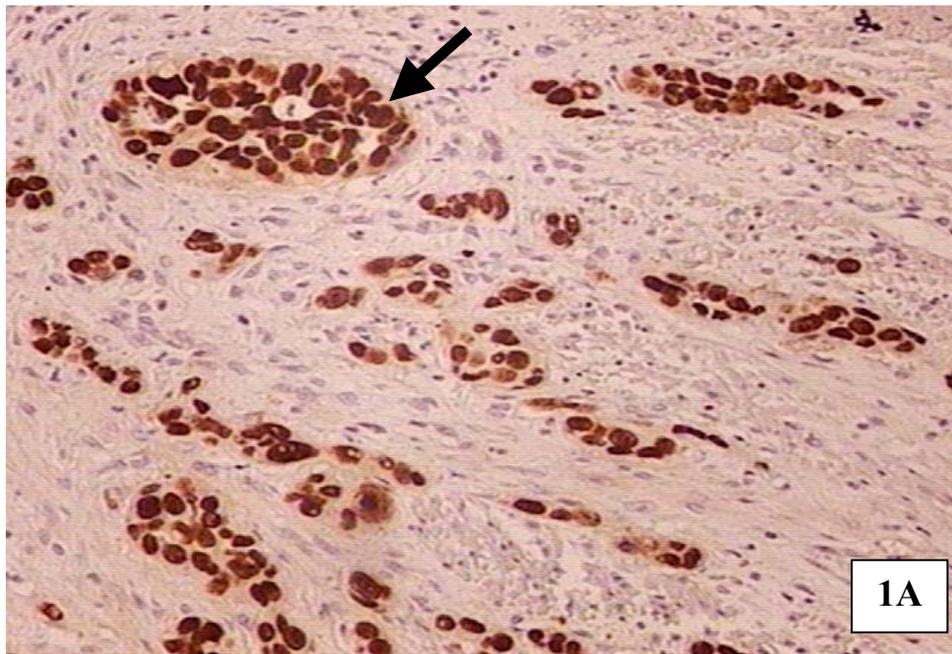


Fig. 1 - Immunohistochemical staining for p53 protein: (1A) Positive and (1B) Negative. p53 protein expression was observed in the nuclei of the cancer cells (100X)

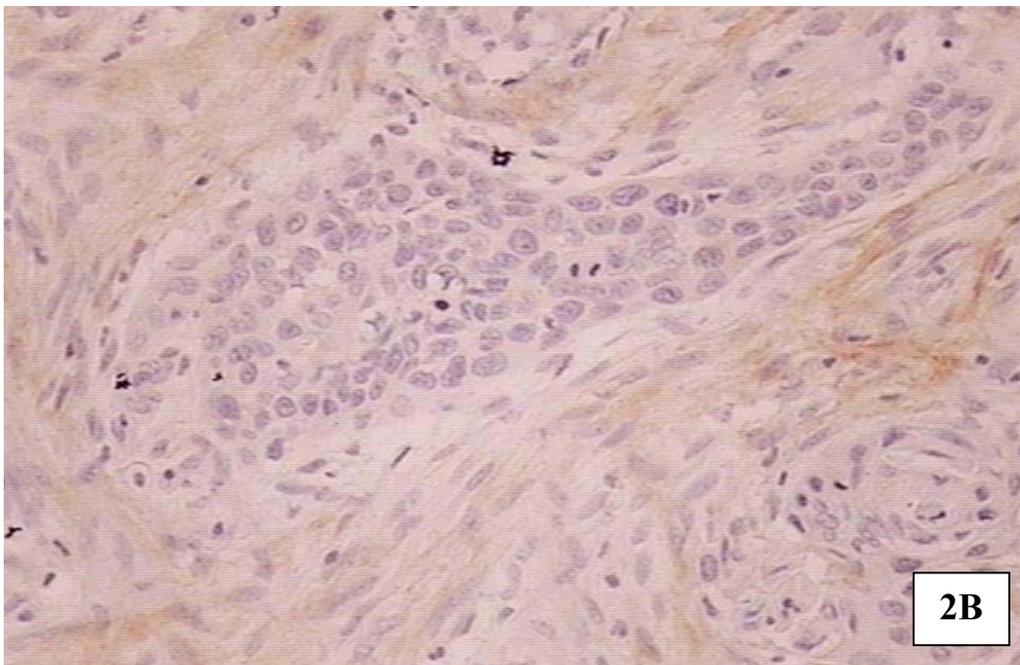
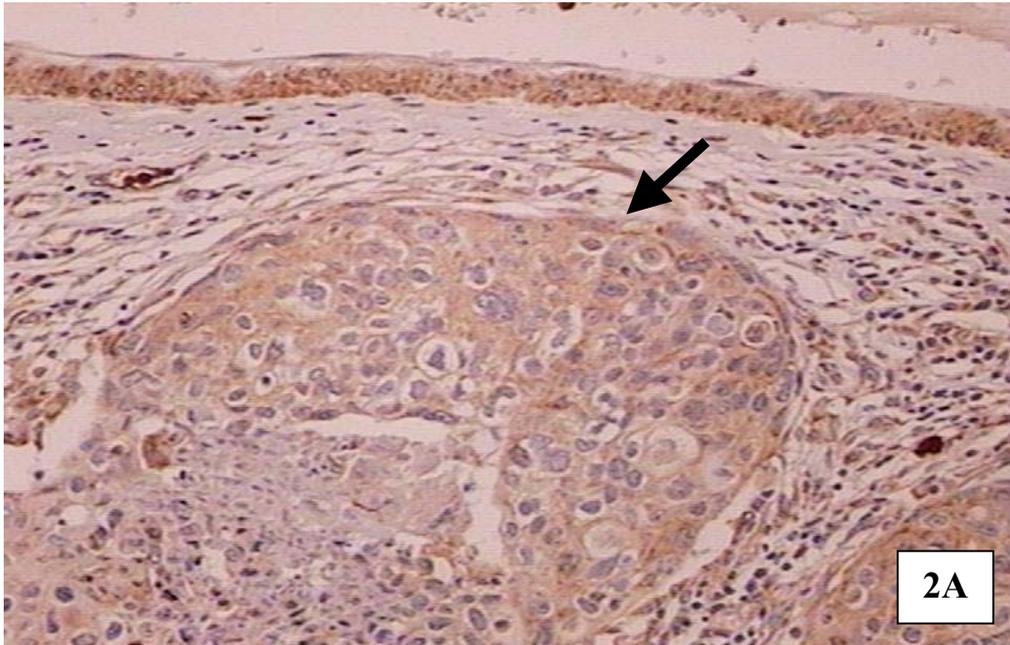


Fig. 2 - Immunohistochemical staining for VEGF: (2A) Positive and (2B) Negative. VEGF expression was observed in the cytoplasm of the cancer cells (100X)

Table 1 - Relationship between p53 and VEGF expressions and clinicopathologic factors in 47 cases of the esophageal squamous cell carcinoma*

Factors	p53 Positive	p53 Negative	p value	VEGF Positive	VEGF Negative	p value
Age	53.7 ± 10.5	58 ± 12.7	0.208	55.1 ± 12.1	56.1 ± 11.5	0.795
Sex						
Male	23 (92)	18 (81.8)	0.398	17 (89.5)	24 (85.7)	0.999
Female	2 (8)	4 (18.2)		2 (10.5)	4 (14.3)	
Degree of differentiation						
Well-differentiated	4 (16)	3 (13.6)	0.545	4 (21.1)	3 (10.7)	0.721
Moderately differentiated	16 (64)	15 (68.2)		12 (62.3)	19 (67.9)	
Poorly differentiated	3 (12)	4 (18.2)		2 (10.5)	5 (17.9)	
Undifferentiated	2 (8)	0 (0)		1 (5.3)	1 (3.6)	
Depth of invasion**						
T1-2	8 (32)	5 (22.7)	0.437	4 (21.1)	9 (32.1)	0.703
T3	13 (52)	15 (68.2)		13 (68.4)	15 (53.6)	
T4	4 (16)	2 (9.1)		21 (10.5)	4 (14.3)	
Lymph node metastases						
Positive	9 (36)	13 (59.1)	0.197	11 (57.9)	11 (39.3)	0.339
Negative	16 (64)	9 (40.9)		8 (42.1)	17 (60.7)	
Type of resection						
Curative	18 (72)	16 (72.7)	0.999	14 (73.7)	20 (71.4)	0.999
Negative	7 (28)	6 (27.3)		5 (26.3)	8 (28.6)	
Stage***						
II	11 (44)	12 (54.5)	0.668	10 (52.6)	13 (46.4)	0.904
III	14 (56)	10 (45.5)		9 (47.4)	15 (53.6)	

*The percent value is given in parentheses

**T1: confined to mucosa or submucosal layer; T2: penetrating to muscular layer; T3: penetrating to adventicia layer; T4: invading to neighboring tissue.

***According with American Joint Committee on Cancer

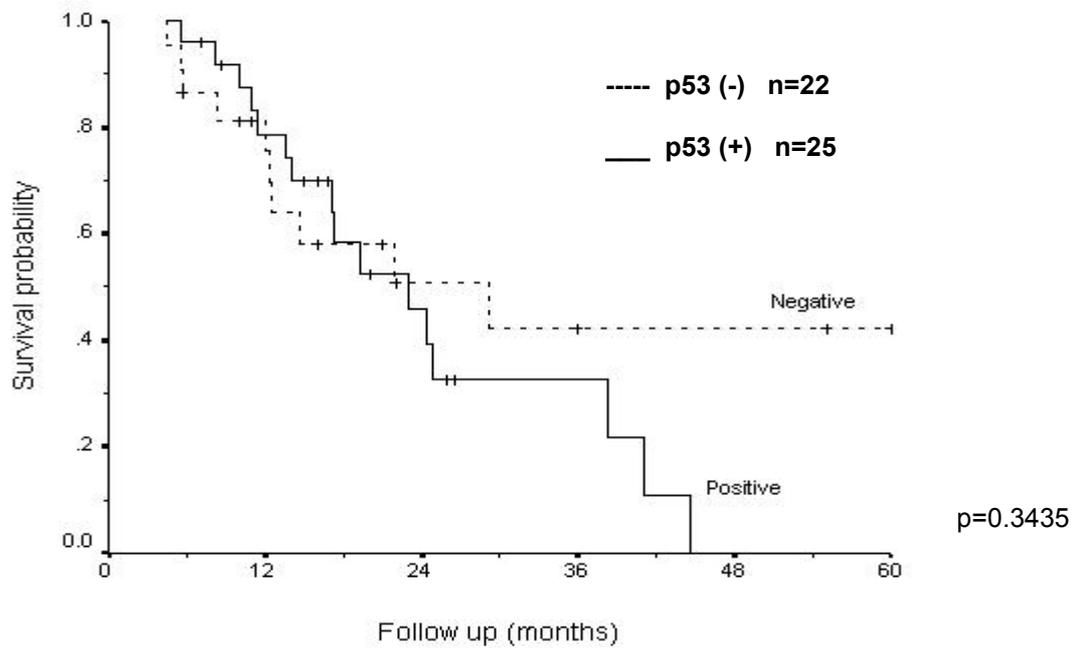


Fig. 3 - p53 protein expression and long term survival

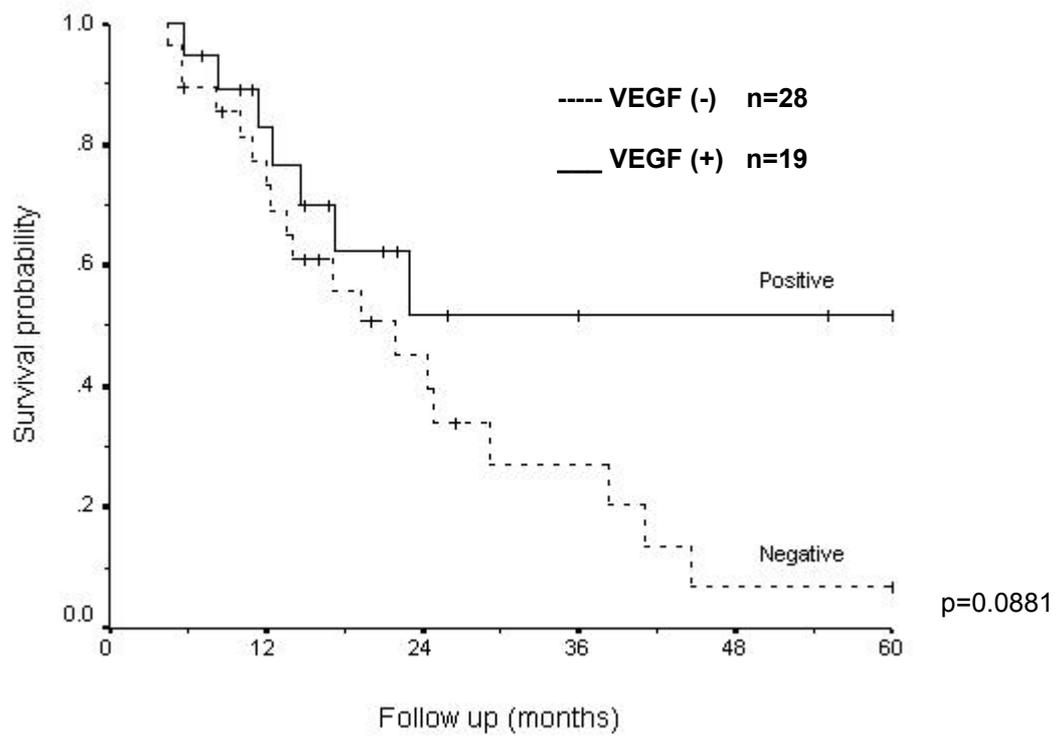


Fig. 4 - VEGF expression and long term survival

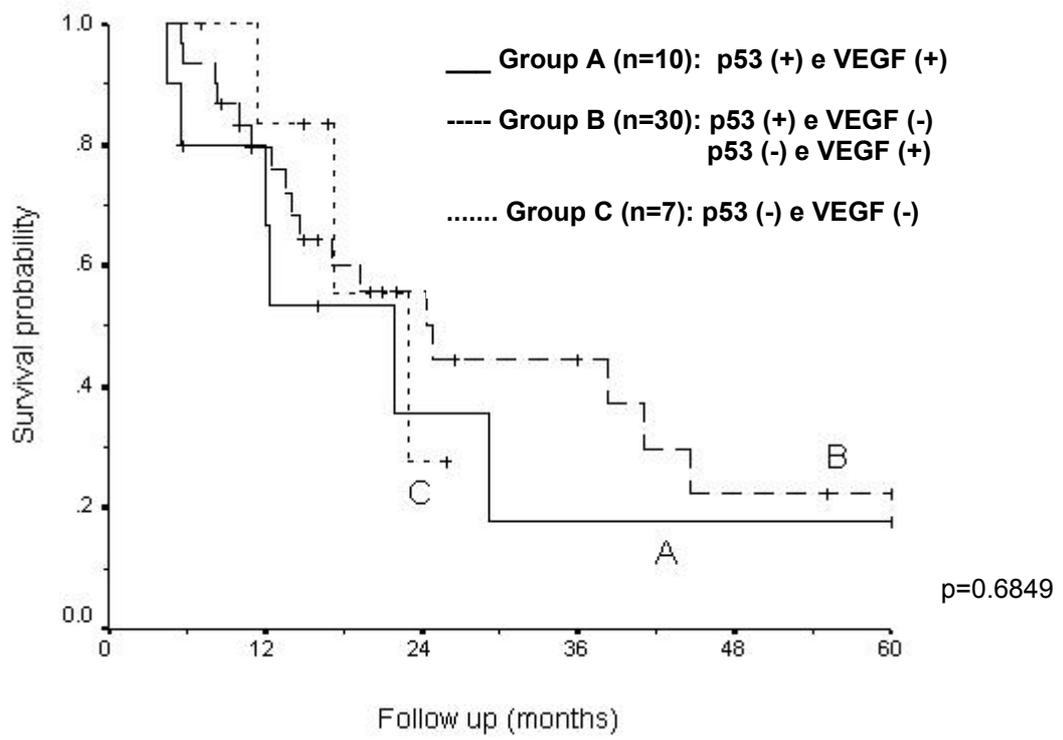


Fig. 5 - p53 protein and VEGF coexpression

Table 2 - Multivariate analysis (Cox proportional hazards model) of the six selected clinicopathologic characteristics

Characteristic	Relative Risk (95% CI)	p value
Depth of invasion	2.335 (0.600 - 9.091)	0.221
Lymph node metastases	4.949 (0.994 - 24.643)	0.051
Type of resection	1.697 (0.589 - 4.892)	0.327
Stage	0.422 (0,066 - 2,701)	0.363
p53	0.762 (0.272 - 2.132)	0.604
VEGF	0.484 (0.178 - 1.315)	0.155

Table 3 - VEGF expression and survival in different studies

Author (year)	n	% Stages II and III	% minimum VEGF+	% VEGF+	Influence of T/VEGF+	Influence of Stage/VEGF+	VEGF+ influences SV?	Observations
Inoue (1997)	75	55	≥30	46.7	Yes	No	Yes (multi)	5-year SV: VEGF+ = 40% VEGF- = 60%
Kitadai (1998)	119	NA	≥30	59.7	Yes	Yes	No	
Uchida (1998)	109	51	≥10	59.6	Yes	Yes	Yes (uni)	29% Stage I
Arii (1999)	102	51	NA	60	Yes	Yes	Yes	32% Stage I
Koide (1999)	52	NA	≥30	57.7	No	NA	Yes	5-year SV: VEGF+ = 34% VEGF- = 67%
Shih (2000)	117	81	≥80	31	No	No	Yes (T3N1)	
This study (2002)	47	100	≥30	40.4	No	No	No	

n: number of patients with SCC of the esophagus in the study

% Stages II e III: percentage of study patients in Stages II and III

% minimum VEGF+: minimum percentage of stained tumor cells for VEGF expression to be classified as positive

% VEGF+: percentage of VEGF-positive patients

Influence of T/VEGF+: influence of the depth of tumor penetration through the esophageal wall and VEGF expression

Influence of Stage/VEGF+: influence of histopathological Stage and VEGF expression

SV: survival

NA: data not available

6. DISCUSSÃO

As mutações do gene de supressão tumoral p53 são encontradas em cerca de metade de todos os tipos de câncer (12). No presente estudo, ocorreu a expressão da proteína p53 em 53,2% dos casos de CEE, de forma semelhante a outros estudos, indicando que alterações do gene de supressão tumoral p53 são realmente freqüentes e fundamentais na carcinogênese esofágica.

Existem atualmente dois métodos para a determinação da expressão da proteína p53: imuno-histoquímica e PCR. Em relação à acurácia, a PCR é mais sensível e específica se comparada à imuno-histoquímica para a identificação de anormalidades do gene p53. Devido à sua complexidade, sua utilização clínica é ainda hoje pouco viável, embora seja usada de forma rotineira na pesquisa em biologia molecular. Por outro lado, a técnica de imuno-histoquímica é fácil, barata e pode ser executada em qualquer laboratório de patologia (13). No entanto, sua utilização deve ser vista com cautela, já que a ausência de expressão da proteína p53 não necessariamente exclui a existência de mutações. Por exemplo, tumores com deleção de ambos os alelos do gene p53 seriam classificados como negativos juntamente com tumores sem expressão da proteína p53. Outra limitação da técnica é a dificuldade de reproduzir a avaliação entre diferentes patologistas (18).

Os genes de supressão tumoral são locais vulneráveis de danos críticos ao DNA porque, em condições normais, eles funcionam como barreiras fisiológicas contra a expansão clonal ou mutabilidade genômica e são capazes de impedir o crescimento incontrolado e as metástases. A perda da função supressora tumoral pode ocorrer por mutação, rearranjo cromossômico, não-disjunção, conversão gênica, impressão ou recombinação mitótica. A atividade supressora tumoral pode também ser neutralizada pela interação com outras proteínas celulares ou oncoproteínas virais. A proteína p53 tem sido implicada no controle do

ciclo celular, no reparo e na síntese do DNA, na diferenciação celular, na plasticidade genômica e na morte celular programada. A forma mutante pode agir como oncogene dominante, enquanto que o gene p53 selvagem tem características de um gene recessivo (12).

A expressão da proteína p53 foi encontrada em 82% dos tumores avançados (T3/4-N1-M0) e pouco diferenciados de esôfago, sugerindo que a expressão (acumulação) da proteína p53 aumenta proporcionalmente ao estágio da doença e possa ser um evento tardio, associado ao aumento do potencial metastático (19). Resultados semelhantes foram encontrados por Ribeiro Jr. e colaboradores (1), que verificaram que a mutação do gene p53 (detectada por PCR) se correlacionou positivamente com o estágio patológico e pior prognóstico.

Nem todos os casos de CEE têm necessariamente mutações do gene p53, por várias razões. Em primeiro lugar, a proteína p53 selvagem pode ser incapaz de realizar sua função supressora. Em segundo, produtos secretados por vírus ou oncogenes podem agir como inibidores da função do p53 selvagem. Em terceiro lugar, outro evento molecular pode produzir uma mudança fenotípica semelhante que determine uma alteração suficiente para o desenvolvimento do tumor (14).

O presente estudo, portanto, acrescenta informações quanto à expressão da proteína p53 num grupo de pacientes com duas características específicas: portadores exclusivamente de CEE e em estágios II e III. A expressão da proteína p53 não se correlacionou com a progressão (invasão) do tumor, indicando que a alteração do gene p53 não difere estatisticamente nesses estágios, já ocorrendo em estágios precoces (I) e possivelmente aumentando em estágios mais avançados (IV) da doença (10). Além disso, a expressão da proteína p53 não foi um fator prognóstico independente em pacientes com CEE nem se correlacionou com as demais características clinicopatológicas. A expressão da proteína p53 também não esteve correlacionada com pior prognóstico, tanto após análise univariada quanto multivariada.

A associação entre a expressão da proteína p53 e o prognóstico tem sido amplamente investigada por imuno-histoquímica, estando significativamente relacionada a pior prognóstico nos tumores de mama, pulmão, estômago e cólon (15). Com relação ao CEE, o papel da expressão da proteína p53 ainda necessita ser determinado.

Sarbia e colaboradores (16), por exemplo, demonstraram que a expressão da proteína p53 não se relacionou com a profundidade de penetração do tumor na parede esofágica, comprometimento linfonodal e metástases à distância, indicando que as alterações do gene p53 possam ser um evento precoce da carcinogênese esofágica e não estão relacionadas à progressão do tumor, ao espalhamento metastático ou a pior prognóstico. Kanamoto e colaboradores (57), estudando 239 pacientes com CEE submetidos à esofagectomia (160 pacientes em Estágios II e III), verificaram a expressão da proteína p53 em 48% dos casos e não encontraram associação entre a expressão da proteína p53 e pior prognóstico. Além disso, a expressão da proteína p53 não se correlacionou com idade, sexo, grau de diferenciação histológica, comprometimento linfonodal, invasão vascular ou estágio.

Kobayashi e colaboradores (11), por sua vez, verificaram que a diferença na sobrevida dependeu da presença ou da ausência da mutação do gene p53, sendo a diferença mais acentuada nos dois primeiros anos após a ressecção cirúrgica. Tais resultados sugerem que tumores com mutação do gene p53 têm maior capacidade de desenvolver metástases do que os tumores com gene p53 selvagem. Portanto, pacientes com câncer de esôfago com mutação do gene p53 devem ser cuidadosamente seguidos, especialmente na procura de metástases nos dois primeiros anos, quando a recorrência hematogênica ou linfonodal ocorre mais frequentemente (7). Ikeda e colaboradores (58) identificaram a expressão da proteína p53 em 71% dos 53 pacientes com CEE ressecado, encontrando correlação estatisticamente significativa entre menor expressão da proteína p53 e melhor sobrevida a longo prazo.

A correlação entre a alteração do gene p53 e o pior prognóstico tem sido investigada

na maioria das vezes por imuno-histoquímica, razão pela qual o valor prognóstico da expressão da proteína p53 tem sido controverso, principalmente se forem considerados tumores ressecados em estágios mais avançados (6). Além disso, muitos estudos incluem casos de adenocarcinoma com carcinoma epidermóide, analisam tumores em diferentes estágios e não separam as ressecções paliativas das curativas (11).

Outro aspecto importante a ser considerado é a controvérsia em relação ao percentual de núcleos corados para que a expressão da proteína p53 seja considerada positiva. A maioria dos autores considera a faixa entre 5 e 10% dos núcleos corados como p53-positivo, também considerada nesse estudo. Essa variação, embora pequena, pode influenciar os resultados a respeito do valor prognóstico da expressão da proteína p53 e tal detalhe, portanto, deve ser lembrado na interpretação dos resultados.

Embora alguns estudos apontem que a expressão da proteína p53 tenha valor prognóstico, seu real valor no CEE ainda está indefinido, especulando-se a presença de outros mecanismos interferindo na função supressora tumoral do gene p53 (15). Shinohara e colaboradores (59), estudando 144 pacientes submetidos à esofagectomia, verificaram a expressão da proteína p53 em 69% dos casos, não havendo correlação com qualquer outra expressão gênica. Os mesmos autores afirmam, inclusive, que em 98% de todos os pacientes estudados o dano na fase G1 do ciclo celular é devido à perda de função dos genes p16, pRB e ciclina D1. As implicações desse estudo são de que a expressão da proteína p53 por imuno-histoquímica não é uma ferramenta de valor para estabelecer o prognóstico de pacientes com CEE ou mesmo para identificar subgrupos de pacientes com alto risco de recidiva. Para determinar se a perda da função normal da proteína p53 se correlaciona com a progressão do tumor ou com o prognóstico de pacientes com CEE, a análise do gene p53 no DNA da célula tumoral seria necessária (10, 16).

O VEGF é um estimulante da proliferação das células endoteliais, determinando o

crescimento de novos vasos sanguíneos e o aumento da permeabilidade microvascular. A expressão do VEGF parece ser maior nas regiões do tumor adjacentes a áreas necróticas (avasculares), consistente com a possibilidade de que a angiogênese tumoral possa ser induzida, pelo menos em parte, pela hipóxia (35).

No presente estudo, foi observado que a expressão do VEGF ocorreu em 40,4% dos casos, percentual inferior à média da literatura, conforme pode ser visto na Tabela 3, mesmo levando-se em consideração o fato de que essa série apresentar nitidamente tumores mais avançados (Estágios II e III) e considerar como VEGF-positivos somente os casos com 30% ou mais de células coradas.

A avaliação da expressão do VEGF pode ser de valor para identificar pacientes com CEE de alto risco de recorrência, os quais poderiam se beneficiar de tratamentos neo-adjuvante e/ou adjuvante. No entanto, a expectativa de que um marcador da angiogênese possa identificar pacientes com doença metastática oculta ou com prováveis metástases à distância pode não ser possível, por no mínimo duas razões: os tumores humanos são heterogêneos (formados por subpopulações de células com propriedades biológicas diferentes) e o processo metastático é seqüencial e seletivo, consistindo em uma série de passos interligados porém independentes. Por exemplo, células tumorais que puderem induzir intensa angiogênese, mas que não puderem sobreviver na circulação ou proliferar em órgãos distantes, não produzirão metástases. Da mesma forma que todos os outros passos da cascata metastática, a angiogênese é fundamental mas não suficiente para a formação de uma metástase (29).

Ogata e colaboradores (40) verificaram a expressão do VEGF em 26,7% de todos os casos de CEE ressecados. Nos casos de invasão somente da camada mucosa, a expressão do VEGF foi de apenas 7,6%. Entretanto, quando o tumor invadia a camada submucosa a expressão aumentava para 33,3%, juntamente com o aumento da densidade de microvasos no

bordo de invasão do tumor, sugerindo que o VEGF possa ter um papel importante na progressão do tumor e na angiogênese através de mecanismos autócrino e parácrino.

O verdadeiro papel da expressão do VEGF e sua relação com a sobrevida a longo prazo em pacientes submetidos à esofagectomia ainda não estão esclarecidos. Para a correta interpretação dos resultados, é fundamental considerar o grupo de pacientes que está sendo avaliado. Se o grupo for composto por pacientes com doença mais avançada (estágios II e III), como nesse estudo, a expressão do VEGF pode não ser útil, já que ela sofrerá a influência de outros fatores (como por exemplo a profundidade de penetração do tumor na parede esofágica ou o comprometimento linfonodal) que a impedirão de ser, por si só, determinante de pior prognóstico. Por outro lado, se o grupo estudado for formado por pacientes em estágios mais precoces (com seguimento mais longo), a diferença entre as curvas de sobrevida a longo prazo (determinante da significância estatística) será maior, observando-se então o seu valor prognóstico. Somando-se a isso, é importante também lembrar que as maiores diferenças são encontradas na cauda da curva, que contém menor número de pacientes. Portanto, é necessária cautela na interpretação de resultados embasados na referida região. Dessa forma, a expressão do VEGF é útil em pacientes em estágios iniciais da doença (notadamente estágio I), que poderiam ser tratados de acordo com a expressão do VEGF, conforme pode ser visto na Tabela 3. Se VEGF-positivos, estaria indicado um tratamento mais agressivo (neoadjuvante, por exemplo), já que mais precocemente poderiam apresentar metástases à distância e conseqüentemente pior prognóstico.

Inoue e colaboradores (42), estudando 75 pacientes com CEE ressecados, verificaram que a expressão do VEGF foi positiva em 46,7% dos casos, estando associada a tumores bem diferenciados, maior penetração na parede esofágica, metástases à distância e pior prognóstico a longo prazo. Embora haja uma tendência de encurtamento da sobrevida no grupo VEGF-positivo, Kitadai e colaboradores (45) verificaram que tal associação não atingiu significância

estatística, porque a angiogênese tumoral não é controlada simplesmente pela presença do VEGF mas pode ser mediada por outros fatores angiogênicos. Devido ao fato do processo angiogênico ser complexo, estudos adicionais interessando outros reguladores angiogênicos devem ser realizados. Uchida e colaboradores (36), estudando 109 pacientes com CEE submetidos à esofagectomia, encontraram a expressão de VEGF em 59,6% dos casos e uma correlação significativa foi encontrada entre a expressão do VEGF e a profundidade de penetração do tumor na parede esofágica e o comprometimento linfonodal.

Sato e colaboradores (41), estudando 134 pacientes com CEE, verificaram que a expressão do VEGF se correlacionou com as metástases para linfonodos: 48,6% no grupo sem comprometimento linfonodal e 74,2% no grupo com comprometimento linfonodal. Além disso, os autores demonstraram que nos estágios precoces de metástases linfonodais (envolvimento inferior a 50% do linfonodo) a expressão do VEGF é maior quando comparada com os estágios tardios, postulando que o desenvolvimento tumoral em estágios tardios pode ser independente do VEGF, enquanto que o evento metastático inicial pode ser VEGF-dependente ou no mínimo correlacionado.

Koide e colaboradores (22), estudando 52 pacientes com CEE ressecado, verificaram que a expressão do VEGF foi positiva em 57,7% dos casos, estando associada com comprometimento linfonodal, metástases à distância e pior prognóstico. Já Noguchi e colaboradores (60), estudando 71 pacientes com CEE ressecado, evidenciaram que apenas o grau de diferenciação histológica tinha correlação com a expressão do VEGF e não havia associação entre a expressão do VEGF e pior prognóstico.

A expressão do VEGF, portanto, parece ser mais importante para predizer o prognóstico em tumores precoces, cujas diferenças entre os grupos (VEGF-positivo versus VEGF-negativo) podem ser observadas com mais clareza (Tabela 3). Como o presente trabalho apresentou apenas pacientes em Estágios II e III, tais diferenças não puderam ser

observadas, pois tais pacientes já se encontram com doença avançada, não permitindo mais a identificação das manifestações angiogênicas, típicas de outros tumores menos agressivos. Assim, recomenda-se a utilização da expressão do VEGF para tumores precoces, uma vez que o estadiamento convencional (TNM) não diferencia claramente o prognóstico de tumores localizados na mucosa dos localizados na submucosa, uma distinção de provável importância clínica (20).

Outro aspecto que deve ser levado em conta ao se estudar o prognóstico do CEE é o fato de que os pacientes invariavelmente apresentam um seguimento curto, devido ao estágio avançado da doença na época do diagnóstico, dificultando a identificação de fatores prognósticos que porventura se manifestariam mais tardiamente na evolução da doença.

Recentemente, foi relatado que o gene p53 tem um papel importante na regulação da expressão do VEGF. As mutações do gene de supressão tumoral p53 e do oncogene *ras*, ambos aumentando a proliferação celular tumoral, estão também envolvidos na regulação para menos de inibidores da angiogênese, como por exemplo a trombospondina (p53 mutante), e na regulação para mais de fatores angiogênicos, como o VEGF (p53 mutante e *ras* mutante). A hipóxia, a qual caracteriza os tumores malignos como resultado da proliferação celular com conseqüente consumo de oxigênio, estimula a produção de VEGF (37, 49).

Apesar das evidências experimentais e clínicas de que exista associação entre as expressões da proteína p53 e do VEGF e pior prognóstico, tal fato não foi demonstrado no presente estudo, tanto através de associação direta como pela análise de subgrupos (Figura 5). Pode ser postulado, entretanto, que tal diferença se tornaria mais evidente se fossem estudados maior número de pacientes e com tumores mais precoces, visto que outros fatores clinicopatológicos poderiam estar interferindo em cada subgrupo.

Tabela 3 - Expressão do VEGF e sobrevida em diferentes estudos

Autor (ano)	n	% Est. II e III	% mínimo VEGF+	% VEGF+	Influência do T/VEGF+	Influência do Estágio/ VEGF+	VEGF+ influencia SV?	Observações
Inoue (1997)	75	55	≥30	46,7	Sim	Não	Sim(multi)	SV 5 anos: VEGF+ = 40% VEGF- = 60%
Kitadai (1998)	119	NI	≥30	59,7	Sim	Sim	Não	
Uchida (1998)	109	51	≥10	59,6	Sim	Sim	Sim (uni)	29% Estágio I
Arii (1999)	102	51	NI	60	Sim	Sim	Sim	32% Estágio I
Koide (1999)	52	NI	≥30	57,7	Não	NI	Sim	SV 5 anos: VEGF+ = 34% VEGF- = 67%
Shih (2000)	117	81	≥80	31	Não	Não	Sim (T3N1)	
Esse estudo (2002)	47	100	≥30	40,4	Não	Não	Não	

n: número de pacientes com CEE incluídos no estudo

% Est. II e III: percentual de pacientes no estudo nos Estágios II e III

% mínimo VEGF+: percentual mínimo de células tumorais coradas para a expressão do VEGF ser considerada positiva

% VEGF+: percentual de pacientes com expressão do VEGF

Influência do T/VEGF+: influência da profundidade de penetração do tumor na parede esofágica e expressão do VEGF

Influência do Estágio/ VEGF+: influência do estágio histopatológico e expressão do VEGF

NI: não informado

7. PERSPECTIVAS

A instabilidade genômica e a heterogeneidade das células tumorais podem explicar o fato de pacientes com tumores em estágios clínicos e patológicos semelhantes apresentarem respostas diferentes a tratamentos neo-adjuvantes ou adjuvantes. A quantificação de fatores angiogênicos no sangue, na urina ou nos tecidos tumorais possibilitará no futuro estabelecer o perfil angiogênico e ajustar a terapia antiangiogênica de acordo com as necessidades de cada paciente, a qual poderá ser adicionada à quimioterapia convencional, radioterapia, imunoterapia ou terapia gênica, objetivando reduzir a toxicidade e o risco de resistência às drogas e aumentar a eficácia terapêutica (61).

Os esforços no sentido de impedir o crescimento de novos vasos sanguíneos que nutrem os tumores e que portanto sustentam o seu crescimento apontam para três direções (29):

- Bloqueio das ações de numerosos fatores (mais de 15) que mantêm o crescimento e a proliferação das células endoteliais. Dois dos mais bem conhecidos são o VEGF e aquele que pode ser a mais potente de todas as substâncias angiogênicas, o denominado FGFb;
- Inibição da atividade das metaloproteinases da matriz, cuja regulação é perdida durante o crescimento e a metastatização do tumor com o conseqüente aumento de sua atividade;
- Uso de inibidores da angiogênese, substâncias que paradoxalmente são produzidas pelas células tumorais mas que fortemente inibem o crescimento de novos vasos sanguíneos.

A terapia antiangiogênica tem por objetivo alvejar as células endoteliais ativadas sem atingir os vasos normais que nutrem os tecidos normais e apresenta muitas vantagens em relação ao tratamento quimioterápico convencional. Em primeiro lugar, as células endoteliais são geneticamente estáveis, diplóides e mutações espontâneas raramente ocorrem. Além disso, o "turnover" das células endoteliais do tumor pode ser 50 vezes mais alto do que as

células endoteliais de um tecido quiescente normal e os vasos sanguíneos ativados expressam marcadores específicos, como o próprio VEGF (62).

Recente estudo sugeriu que pacientes com baixa expressão do VEGF têm um resultado mais favorável após terapia adjuvante. Os tumores com alto índice angiogênico podem representar uma variante mais agressiva da doença, contra a qual terapias adjuvantes convencionais são ineficazes. Assim o crescimento do tumor poderia ser restringido pela inibição seletiva do processo angiogênico com drogas antiangiogênicas que exerceriam poucos efeitos inibitórios sobre as células hospedeiras (63, 64). Portanto, ensaios clínicos bem controlados deveriam ser desenhados para determinar a eficácia da terapia antiangiogênica como um adjuvante no tratamento de pacientes com tumores sólidos altamente vascularizados (29, 41).

Das drogas antiangiogênicas disponíveis para ensaios clínicos, a endostatina parece ser uma das mais promissoras. A administração sistêmica da endostatina potencialmente inibe a angiogênese, mantém as metástases em tamanho microscópico e regride o tumor primário a menos de um milímetro cúbico, uma redução acima de 150 vezes. Os resultados com a endostatina sustentam a proposta prévia de Folkman que, para fins terapêuticos, é útil pensar um tumor em termos de duas populações celulares distintas: uma população celular tumoral e uma população de células endoteliais, cada uma das quais pode estimular o crescimento das outras. O crescimento de cada população celular pode ser inibido otimamente por agentes que seletivamente ou especificamente alvejam aquele tipo celular, ou seja, quimioterapia citotóxica e terapia antiangiogênica (30).

O desenvolvimento de drogas antiangiogênicas parece ser, juntamente com a identificação dos pacientes que se beneficiariam com seu uso, o mais promissor desafio, sendo o CEE de particular interesse, pelo seu caráter agressivo e pela atual falta de opções terapêuticas.

8. CONCLUSÕES

Levando-se em consideração os objetivos propostos e os resultados obtidos, foi verificado que:

7.1. A proteína p53 foi expressa em 53,2% dos pacientes com CEE e não estava associada a pior sobrevida a longo prazo.

7.2. A expressão do VEGF ocorreu em 40,4% dos pacientes com CEE e não estava associada a pior sobrevida a longo prazo.

7.3. Não houve associação entre a expressão da proteína p53 e a angiogênese tumoral, representada pela expressão do VEGF.

7.4. Não foi identificada associação entre a co-expressão da proteína p53 e do VEGF e pior sobrevida a longo prazo.

Portanto, como o número de pacientes incluídos no estudo é limitado e tais pacientes se encontravam com doença avançada no momento do diagnóstico (Estágios II e III), tanto a expressão da proteína p53 como a expressão do VEGF não demonstraram valor prognóstico.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ribeiro Jr U, Filkelstein SD, Safatle-Ribeiro AV, Landreneau RJ, Clarke MR, Bakker A, et al. p53 sequence analysis predicts treatment response and outcome of patients with esophageal carcinoma. *Cancer* 1998; 83:7-18.
2. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2002. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/>
3. Ruol A. Multimodality treatment for non-metastatic cancer of the thoracic esophagus. *Dis Esoph* 1996; 9:39-55.
4. Harrison LE. Is esophageal cancer a surgical disease? *J Surg Oncol* 2000; 75:227-31.
5. Rosa AR, Schirmer CC, Gurski RR, Brentano L, Krueel CD. Survival and prognostic factors in patients with epidermoid oesophageal carcinoma. *Int Surg* 1999; 94:193-8.
6. Aloia TA, Harpole Jr DH, Reed CE, Allegra C, Moore MH, Herndon II JE, et al. Tumor marker expression is predictive of survival in patients with esophageal cancer. *Ann Thorac Surg* 2001; 72:859-66.

7. Shimada Y, Imamura M, Watanabe G, Uchida S, Harada H, Makino T, et al. Prognostic factors of oesophageal squamous cell carcinoma from the perspective of molecular biology. *Br J Cancer* 1999; 80(8):1281-8.
8. Chang F, Syrjänen S, Tervahauta A, Syrjänen K. Tumourigenesis associated with the p53 tumour suppressor gene. *Br J Cancer* 1993; 68:653-61.
9. Gabbert HE, Müller W, Schneiders A, Meier S, Hommel G. The relationship of p53 expression to the prognosis of 418 patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 76:720-6.
10. Ikeguchi M, Saito H, Katano K, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N. Clinicopathologic significance of the expression of mutated p53 protein and the proliferative activity of cancer cells in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *J Am Coll Surg* 1997; 185:398-403.
11. Kobayashi S, Koide Y, Endo M, Isono K, Ochiai T. The p53 gene mutation is of prognostic value in esophageal squamous cell carcinoma patients in unified stages of curability. *Am J Surg* 1999; 177:497-502.
12. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993; 329(18):1318-27.

13. Fagundes RB, Mello CR, Tollens P, Pütten AC, Wagner MB, Moreira LF, Barros SG. p53 protein in esophageal mucosa of individuals at high risk of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esophagus* 2001; 14:185-90.
14. Gates CE, Reed CE, Bromberg JS, Everett ET, Baron P. Prevalence of p53 mutations in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 108(1):148-52.
15. Coggi G, Bosari S, Roncalli M, Graziani D, Bossi P, Viale G, et al. p53 protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma. *Cancer* 1997; 79:125-32.
16. Sarbia M, Porschen R, Borchard F, Horstmann O, Willers R, Gabbert HE. p53 protein expression and prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1994; 74:2218-23.
17. Vijeyasingam R, Darnton SJ, Jenner K, Allen CA, Billingham C, Matthews HR. Expression of p53 protein in oesophageal carcinoma: clinicopathological correlation and prognostic significance. *Br J Surg* 1994; 81:1623-6.
18. Sarbia M, Vereet PR, Röher HD. Relevant prognostic biological and morphological factors in esophageal cancer. In: Perachia A, Rosati R, Bonavina L, Fumagalli U, Bona S,

Chella B, editors. Recents Advances in Diseases of the Esophagus. Bologna: Monduzzi Editore; 1996. p.15-8.

19. Patel DD, Bhatavdekar JM, Chikhlikar PR, Patel YV, Shah NG, Ghosh N, et al. Clinical significance of p53, nm23, and bcl-2 in T3-4N1M0 oesophageal carcinoma: an immunohistochemical approach. *J Surg Oncol* 1997; 65:111-6.

20. Mathew R, Arora S, Khanna R, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. Alterations in p53 and pRb pathways and their prognostic significance in oesophageal cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38:832-41.

21. Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res* 1999; 59:1391-9.

22. Koide N, Nishio A, Kono T, Yazawa K, Igarashi J, Watanabe H, et al. Histochemical study of vascular endothelial growth factor in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hepatogastroenterology* 1999; 46:952-8.

23. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? *Cancer Res* 1986; 46:467-73.

24. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:4-6.
25. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359:843-5.
26. Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14):2451-60.
27. Fontanini G, Vignati S, Lucchi M, Mussi A, Calcinai A, Boldrini L, et al. Neoangiogenesis and p53 protein in lung cancer: their prognostic role and their relation with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *Br J Cancer* 1997; 75:1295-1301.
28. Stetler-Stevenson WG, Kleiner Jr DE. Molecular biology of cancer: invasion and metastasis. In: De Vita Jr VT, Hellmann S, Rosenberg ST, editors. *Cancer: Principles and practice of Oncology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p.123-36.
29. Fidler IJ, Kerbel RS, Ellis LM. Biology of cancer: angiogenesis. In: De Vita Jr VT, Hellmann S, Rosenberg ST, editors. *Cancer: Principles and practice of Oncology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p.137-47.

30. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88:277-85.

31. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333(26):1757-63.

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

33. Toi M, Taniguchi T, Yamamoto Y, Kurisaki T, Suzuki H, Tominaga T. Clinical significance of the determination of angiogenic factors. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14):2513-9.

34. Chung YS, Maeda K, Sowa M. Prognostic value of angiogenesis in gastrointestinal tumors. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14):2501-5.

35. Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996; 271(2):603-6.

36. Uchida S, Shimada Y, Watanabe G, Tanaka H, Shibagaki I, Miyahara T, et al. In oesophageal squamous cell carcinoma vascular endothelial growth factor is associated with p53 mutation, advanced stage and poor prognosis. *Br J Cancer* 1998; 77(10):1704-9.

37. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumors: an International Consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14):2474-84.

38. Tanigawa N, Matsumura M, Amaya H, Kitaoka A, Shimomatsuya T, Lu C, et al. Tumor vascularity correlates with the prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1997; 79:220-5.

39. Maeda K, Chung Y, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang S, Ogawa M, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996; 77:858-63.

40. Ogata Y, Harada Y, Fujii T, Yamana H, Fujita H, Shirouzu K. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *Kurume Med J* 1996; 43:157-63.

41. Sato F, Shimada Y, Watanabe G, Uchida S, Makino T, Imamura M. Expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-9 and E-cadherin in the process of lymph node metastasis in oesophageal cancer. *Br J Cancer* 1999; 80(9):1366-72.

42. Inoue K, Ozeki Y, Sukanuma T, Sugiura Y, Tanaka S. Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1997; 79:206-13.

43. Shimada H, Takeda A, Nabeya Y, Okazumi S, Matsubara H, Funami Y, et al. Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2001; 92:663-9.

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

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

46. Kitadai Y, Amioka T, Haruma K, Tanaka S, Yoshihara M, Sumii K, et al. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001; 93:662-6.

47. Stellmach V, Volpert OV, Crawford SE, Lawler J, Hynes RO, Bouck N. Tumour suppressor genes and angiogenesis: the role of TP53 in fibroblasts. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14):2394-2400.

48. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouk N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265:1502.
49. Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marme D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994; 9:963-9.
50. Mulhophadyay D, Tsioskas L, Sukhatame VP. Wild-type p53 and v-src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* 1995; 55:6161-5.
51. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14): 2413-22.
52. Maeda K, Kang SM, Onoda N, Ogawa M, Sawada T, Nakata B, et al. Expression of p53 and vascular endothelial growth factor associated with tumor angiogenesis and prognosis in gastric cancer. *Oncology* 1998; 55:594-9.
53. Rak J, Mitsuhashi Y, Bakyo L, Filmus J, Shirakawa S, Sasazuki T, et al. Mutant *ras* oncogenes up-regulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995; 55:4575-80.

54. Maeda K, Kang S, Onoda N, Ogawa M, Kato Y, Sawada T, et al. Vascular endothelial growth factor expression in preoperative biopsy specimens correlates with disease recurrence in patients with early gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 86:566-71.
55. Arii S, Mori A, Uchida S, Fujimoto K, Shimada Y, Inamura M. Implication of vascular endothelial growth factor in the development and metastasis of human cancers. *Human Cell* 1999; 12(1):25-30.
56. Koide N, Nishio A, Hiraguri M, Hanazaki K, Adachi W, Amano J. Coexpression of vascular endothelial growth factor and p53 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(6):1733-40.
57. Kanamoto A, Kato H, Tachimori Y, Watanabe H, Nakanishi Y, Kondo H, et al. No prognostic significance of p53 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 1999; 72(2):94-8.
58. Ikeda G, Isaji S, Chandra B, Watanabe M, Kawarada Y. Prognostic significance of biologic factors in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1999; 86(8):1396-405.
59. Shinohara M, Aoki T, Sato S, Takagi Y, Osaka Y, Koyanagi Y, et al. Cell cycle-regulated factors in esophageal cancer. *Dis Esophagus* 2002; 15(2):149-54.

60. Noguchi T, Takeno S, Shibata T, Uchida Y, Yokoyama S, Muller W. VEGF-C expression correlates with histological differentiation and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncol Rep* 2002; 95(5):995-9.

61. Folkman J. New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14): 2534-9.

62. Cramer DA. Applied vascular biology: can angiogenesis inhibitors help control malignant growth? *Ann Intern Med* 1998; 129(10):841-4.

63. Gasparini G, Toi M, Miceli R. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorilase in patients with node-positive breast cancer treated with earlier adjuvant chemotherapy or hormone therapy. *Cancer J Sci Am* 1999; 5:101.

64. Kotoh T, Dhar DK, Masunaga R, Tabara H, Tachibana M, Kubota H, et al. Antiangiogenic therapy of human esophageal cancers with thalidomide in nude mice. *Surgery* 1999; 125(5):536-44.