

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: GASTROENTEROLOGIA  
MESTRADO E DOUTORADO

**DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR  
EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE ESÔFAGO E ÁREAS  
ADJACENTES COM MIB-1 E 7B11  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

LÚCIA MARIA KLIEMANN

Porto Alegre  
1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: GASTROENTEROLOGIA

**DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR  
EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE ESÔFAGO E ÁREAS  
ADJACENTES COM MIB-1 E 7B11**

LÚCIA MARIA KLIEMANN

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO CARLOS PROLLA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia  
para obtenção do Título de Mestre em Medicina

Porto Alegre  
1998

**K65d** Kliemann, Lúcia Maria

Determinação do índice de proliferação celular em carcinomas epidermóides de esôfago e áreas adjacentes com MIB-1 e 7B11 / Lúcia Maria Kliemann ; orient. João Carlos Prolla. – Porto Alegre : UFRGS, 1998.  
54 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia.

1. Carcinoma de células escamosas : Diagnóstico. 2. Neoplasias esofágicas. 3. Antígeno nuclear de célula em proliferação. I. Prolla, João Carlos. II. Título.

NLM: QZ 365

Catálogo na fonte: Biblioteca FAMED/HCPA

Aos meus pais  
pelas condições de aprender  
e amor ao saber.

Ao meu amado esposo **Enilson**,  
amigo e companheiro,  
fonte de incentivo e amor,  
pelas horas subtraídas,  
por mais um objetivo alcançado.

## Agradecimentos

Ao final dessa dissertação gostaria de agradecer a todos que, de uma maneira ou outra contribuíram para a conclusão desse trabalho, e, de forma especial:

- ✓ ao Prof. Dr. João Carlos Prolla, pela orientação e apoio em todas as fases deste trabalho;
- ✓ ao colega Antônio Carlos Weston, pelo auxílio nas fases iniciais de coleta de material e bibliografia;
- ✓ ao colega Manoel Constant Neto, pelas sugestões, orientações na parte estatística e versão para o inglês;
- ✓ aos acadêmicos de Medicina Andrea Proença de Oliveira e Valentino Magno pela ajuda na revisão dos prontuários;
- ✓ à bibliotecária Helen Flores da Faculdade de Medicina - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela elaboração da ficha catalográfica;
- ✓ à Dra. Andrea Pires, do Laboratório Anticorpos, RJ, pela dedicação e responsabilidade científica na confecção das lâminas;
- ✓ ao Instituto de Pesquisa Cito-Oncológicas (IPCO) da FFFCMPA, na pessoa de seu Chefe, Prof. Roque Furian, pelas condições de trabalho oportunizadas;
- ✓ à técnica em histologia Rosália Guimarães, pela confecção das primeiras lâminas;
- ✓ ao Curso de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia, em especial ao Prof. Dr. Sérgio Barros, pelo estímulo e tolerância ao longo da execução deste trabalho;
- ✓ à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES- pelo auxílio financeiro

## Índice

## Página

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1.     | Introdução   | 1  |
| 1.1.   | Comparação do MIB-1 com outros marcadores  | 6  |
| 1.2.   | Índices de proliferação celular em outros tumores pela marcação com MIB-1          | 11 |
| 1.3.   | Utilização de MIB-1 na previsão da recorrência de tumores e sobrevida de pacientes | 13 |
| 2.     | Objetivos  | 15 |
| 3.     | Materiais e Métodos  | 16 |
| 3.1.   | População amostrada  | 16 |
| 3.2.   | Amostragem   | 17 |
| 3.3.   | Processamento das amostras   | 18 |
| 3.3.1. | Procedimento   | 18 |
| 3.4.   | Avaliação das lâminas  | 19 |
| 3.5.   | Análise estatística  | 19 |
| 4.     | Resultados   | 21 |
| 4.1.   | Características da população amostrada   | 21 |
| 4.2.   | Avaliação anatomopatológica  | 22 |
| 4.3.   | Avaliação do padrão das lâminas coradas pelo método imunoistoquímico               | 24 |
| 4.4.   | Avaliação do índice de marcação com o anticorpo monoclonal MIB-1                   | 34 |
| 4.5.   | Avaliação do índice de marcação com o anticorpo monoclonal 7B11                    | 36 |
| 5.     | Discussão  | 40 |

|    |                            | <b>Página</b> |
|----|----------------------------|---------------|
| 6. | Conclusões                 | 43            |
| 7. | Referências bibliográficas | 44            |
|    | Normas adotadas            | 50            |
|    | Resumo                     | 51            |
|    | Summary                    | 52            |
|    | Anexo A                    | 53            |
|    | Anexo B                    | 54            |



## Índice de Tabelas

### Página

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> | Caracterização da população amostrada quanto ao sexo, idade, procedência e consumo de álcool e fumo .....   | 17 |
| <b>Tabela 2.</b> | Índice de marcação (%) com o anticorpo monoclonal MIB-1 em amostras de carcinoma epidermóide de esôfago e epitélio esofágico não neoplásico distante 5 e 10 cm do tumor, diâmetro do tumor e presença de metástases ..... | 35 |
| <b>Tabela 3.</b> | Índice de marcação (%) com o anticorpo monoclonal 7B11 em amostras de carcinoma epidermóide de esôfago e epitélio esofágico não neoplásico distante 5 e 10 cm do tumor, diâmetro do tumor e presença de metástases .....  | 37 |

## Índice de Figuras

|  | Página |
|--|--------|
| <b>Figura 1.</b> Percentual de usuários de álcool e fumo na população da amostra .....   | 21     |
| <b>Figura 2.</b> Percentual de diferentes graus de disfagia apresentados pelos pacientes .....   | 22     |
| <b>Figura 3.</b> Distribuição do número de casos em função do tamanho do tumor .....   | 23     |
| <b>Figura 4.</b> Percentual dos tumores quanto ao grau de diferenciação na avaliação anatomopatológica .....   | 24     |
| <b>Figura 5.</b> Microfotografia de carcinoma epidermóide de esôfago corado com anticorpo monoclonal MIB-1: <b>A)</b> - frequência e homogeneidade da coloração, observando-se presença de coloração de fundo (100 X); <b>B)</b> - detalhe da intensidade dos núcleos (400 X); <b>C)</b> - padrão de coloração nuclear com nucléolo evidente (1000 X) .....  | 25     |
| <b>Figura 6.</b> Microfotografia de epitélio esofágico não neoplásico a 5 cm do tumor corado com anticorpo monoclonal MIB-1: <b>A)</b> - espessamento do epitélio com grande número de papilas circundadas por núcleos positivos (100 X); <b>B)</b> - positividade nuclear ao redor das papilas e na segunda camada do epitélio (400 X); <b>C)</b> - papila circundada por células coradas (1000 X).....                     | 26     |
| <b>Figura 7.</b> Microfotografia de epitélio esofágico não neoplásico a 10 cm do tumor corado com anticorpo monoclonal MIB-1: <b>A)</b> - papilas no terço inferior e coloração nuclear ao redor e junto à camada basal (100 X); <b>B)</b> - células coradas circundando a papila e na segunda camada e camada basal não corada (400 X); <b>C)</b> - coloração nuclear da segunda camada do epitélio esofágico 1000 X) ..... | 27     |
| <b>Figura 8.</b> Microfotografia de epitélio esofágico não neoplásico com núcleos corados com anticorpo monoclonal MIB-1, mostrando intensa coloração nucleolar (1000 X) .....   | 29     |
| <b>Figura 9.</b> Microfotografia de epitélio esofágico não neoplásico com núcleos corados com anticorpo monoclonal MIB-1, mostrando a disposição das células coradas ao redor da papila (1000 X) ...   | 30     |

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 10.</b> | Microfotografia de carcinoma epidermóide de esôfago corado com anticorpo monoclonal 7B11: <b>A)</b> - coloração nuclear difusa com baixa intensidade (100 X); <b>B)</b> - distribuição irregular da coloração dos núcleos, alguns com coloração apenas na periferia, outros fracamente corados com pouca coloração de fundo (400 X); <b>C)</b> - heterogeneidade da coloração nuclear dificultando a diferenciação entre células positivas e negativas (1000 X)..... | 31 |
| <b>Figura 11.</b> | Microfotografia de epitélio esofágico não neoplásico a 5 cm do tumor corado com anticorpo monoclonal 7B11mostrando padrão de coloração: <b>A)</b> - terço inferior do epitélio e ao redor das papilas (100 X); <b>B)</b> - células circundantes das papilas (400 X); <b>C)</b> - coloração difusa no nucleoplasma (1000 X) .....   | 32 |
| <b>Figura 12.</b> | Microfotografia de epitélio esofágico não neoplásico a 10 cm do tumor corado com anticorpo monoclonal 7B11: <b>A)</b> - raras células coradas no terço inferior do epitélio e ao redor das papilas (100 X); <b>B)</b> – coloração nuclear fraca presente em algumas células da camada basal (400 X); <b>C)</b> - coloração difusa e pouco intensa no nucleoplasma (1000 X) .....   | 33 |
| <b>Figura 13.</b> | Comparação entre os valores médios do índice de marcação com o anticorpo monoclonal MIB-1 em amostras de carcinoma epidermóide e de epitélio esofágico normal a 5 e 10 cm do tumor .....   | 38 |
| <b>Figura 14.</b> | Comparação entre os valores médios do índice de marcação com o anticorpo monoclonal 7B11 em amostras de carcinoma epidermóide e de epitélio esofágico normal a 5 e 10 cm do tumor .....  | 39 |

## 1. Introdução:

As neoplasias malignas são responsáveis por 23% das causas de morte nos países desenvolvidos, causando mais de 530.000 óbitos por ano só nos Estados Unidos (COTRAN et al., 1994). Vários tipos de tumor, de origem epitelial, mesenquimal ou germinativa, acometem pessoas e animais de diversas idades e raças. Muitos fatores são causadores ou estão associados a cada uma das neoplasias, alguns diretamente relacionados, outros especulativamente lembrados.

Entre os principais tipos de câncer, o do esôfago é uma doença severa na qual há uma longa fase de desenvolvimento subclínico em que uma variedade de fatores podem interagir, tanto simultaneamente como em tempos diferentes. Esta neoplasia tem atraído interesse crescente nos últimos anos, sendo a sexta causa mais frequente de mortalidade por câncer em todo o mundo e a quarta em países desenvolvidos (MUÑOZ, 1993; REED & JOHNSTON, 1993). A caracterização dos tumores de esôfago, elucidação de sua oncogênese e identificação dos fatores de risco e das populações sob risco são essenciais para um levantamento efetivo, resultando na adoção de novas estratégias diagnósticas e terapêuticas (ASTE & CRESPI, 1993). O tipo de câncer de esôfago que predomina histologicamente é o carcinoma epidermóide (REED & JOHNSTON, 1993), sendo que em um levantamento de 400 casos de câncer de esôfago, 85,3% eram carcinomas epidermóides e 11,4% adenocarcinomas (CHENG & DAY, 1992)

Grandes variações na incidência de câncer de esôfago em diversos países tem sido observadas, tanto em homens como em mulheres. Em homens, as taxas mais altas têm sido observadas em Calvados (França) na ordem de 26,5 por 100.000

habitantes, em Tianjin (China) de 16,6 por 100.000 habitantes e em Porto Alegre (Brasil), cerca de 25,9 por 100.000 habitantes. Enquanto isso, nos países do norte da Europa são observadas taxas de incidência mais baixas, na ordem de 4,0 por 100.000 habitantes e no Reino Unido cerca de 4,9 por 100.000 (MACFARLANE & BOYLE, 1994; CHALASANI, 1998).

Entre as mulheres, a incidência de câncer de esôfago é menor, mas taxas elevadas tem sido observadas em Tianjin (China), na ordem de 8,0 por 100.000, em Porto Alegre (Brasil) 6,9 por 100.000 e entre a população negra dos Estados Unidos. Entretanto, as taxas mais altas tem sido relatadas em áreas da Índia, Bangalore com 8,8 por 100.000 e Bombaim com 8,4 por 100.000 habitantes. As áreas do chamado cinturão asiático do câncer de esôfago, que se estende do oeste da Turquia, leste do Mar Cáspio até o norte do Irã e norte do Afeganistão e áreas do sul da antiga União Soviética, Turkmenistão e Tajikistão, até o norte da China, apresentam as maiores taxas de ocorrência de câncer de esôfago, cerca de 100 por 100.000 habitantes. (MACFARLANE & BOYLE, 1994).

Nos países europeus, a proporção de incidência de câncer de esôfago para homens e mulheres é de 4,4:1. Nos últimos trinta anos, tem sido observado um aumento no número de casos em homens. No Reino Unido, a taxa de incidência de carcinoma epidermóide aumentou de 1,9 para 2,1 por 100.000, no período de 1962 a 1981, enquanto que as taxas de ocorrência de adenocarcinoma aumentaram seis vezes no mesmo período, passando de 0,1 para 0,6 por 100.000 habitantes (POWELL & MCCONKEY, 1990).

O câncer de esôfago pode ser dividido em duas categorias principais: aquele associado ao tabaco e ao álcool e aquele ocorrendo em populações com uma dieta

pobre, geralmente com falta de consumo de vegetais de folhas verdes, frutas cítricas, micronutrientes como o zinco, riboflavina e vitamina A, e outros fatores ainda desconhecidos (CRADDOCK, 1992). Nestas circunstâncias, a mucosa do esôfago torna-se mais suscetível a diversos carcinógenos como micotoxinas, como ocorre em Transkei, África do Sul (MARASAA et al., 1981), hidroxifenantrenos substituídos, encontrados em uma forma pirolizada de ópio no Irã que é fortemente mutagênica (GHADIRAIAN et al., 1990) e compostos com N-nitroso na China (REED & JOHNSTON, 1993).

O álcool e o de fumo têm sido apontados como fatores responsáveis pela maioria dos casos de câncer do esôfago, sendo estimado em 84% o risco de ocorrência atribuível aos dois fatores no norte da Itália e de 87% no norte da França, para pessoas do sexo masculino. Entretanto, também ocorre aumento no risco de câncer de esôfago com o aumento do consumo de álcool mesmo entre não fumantes. Além disso, o fumo aumenta de cinco a seis vezes os riscos de ocorrência de câncer de esôfago em fumantes, em comparação com não fumantes, mesmo entre abstêmios (TUYNNS, 1983; LA VECCHIA & NEGRI, 1989).

Além do fumo e do álcool, acredita-se que a condição em que o epitélio escamoso que normalmente recobre o esôfago distal é substituído por epitélio colunar (esôfago de Barrett) pode resultar no aumento do risco de ocorrência de adenocarcinoma do esôfago (CAMERON et al., 1985). A maioria dos adenocarcinomas de esôfago está localizada no terço inferior do órgão (POWELL & MCCONKEY, 1992)

É largamente aceito que a cinética das células dos tumores influencia o curso clínico de pacientes com câncer. Recentemente cresceu o interesse na determinação

imunoistoquímica de antígenos associados à proliferação celular, pois eles têm demonstrado ser marcadores de prognóstico (HELLQUIST, 1997; JOCHUM, 1996) e o estadiamento convencional utilizado- TNM da UICC ( Union Internationale Contre Cancer) e o da AJC ( American Joint Committee), não fornece as informações de maneira satisfatória, visto haver subdivisões dentro da classificação original. Um dos reagentes mais amplamente utilizados é o anticorpo monoclonal Ki-67, que pertence a subclasse das imunoglobulinas G<sub>1</sub> (IgG<sub>1</sub>), o qual reage com antígenos associados com a proliferação do núcleo celular. O gene para este antígeno está localizado no braço longo do cromossoma humano 10 (10q25) (FONATSCH et al. 1991). Este antígenos são proteínas nucleares não histonas de 345 e 395 kD (GERDES et al., 1991), comumente chamadas de pKi-67 e que estão presentes em todas as partes ativas do ciclo celular, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, e mitose, mas estão ausentes em G<sub>0</sub> (GERDES, 1984). Estas proteínas tem sido detectadas dentro do núcleo, entre 90 e 95% no nucléolo da célula e entre 5 e 10% no nucleoplasma , durante a metáfase na superfície dos cromossomas que estão realizando a mitose (VERHEIJEN et al., 1989; ISOLA et al., 1990).

Também tem sido demonstrado que as proteínas Ki-67 podem existir em forma livre ou formando um complexo associando-se ao DNA de fita dupla. A formação deste complexo aumenta a imunorreatividade do antígeno Ki-67, aumentando a afinidade com MIB-1 em cerca de 50 vezes em relação à afinidade com o anticorpo Ki-67, sendo mais reativo do que a proteína Ki-67 pura. Aparentemente, a formação do complexo entre as proteínas Ki-67 e DNA de fita dupla ocorre devido a existência de seqüências específicas do DNA (LOPEZ et al. 1994).

O valor diagnóstico direto e valor prognóstico independente de colorações com Ki-67 já é bem conhecido. Entretanto, secções fixadas em formalina e embebidas em parafina, rotineiramente processadas para imunohistoquímica, não coram com Ki-67, uma vez que o epítipo que é detectado pelo Ki-67 é destruído pelo processo de fixação do tecido (GERDES et al., 1992). Novos anticorpos monoclonais como MIB-1, 2 e 3, foram desenvolvidos, mas apenas os anticorpos MIB-1 e MIB-3 foram capazes de marcar figuras mitóticas em preparações com parafina (CATTORETTI et al., 1992).

MIB-1 e MIB-3 são anticorpos monoclonais preparados pela fusão de células do baço de ratos, da linhagem BALB/C, imunizadas com partes recombinantes do antígeno de Ki-67, com células de mieloma de ratos, da linhagem celular X63Ag8.653 (GERDES et al., 1983; CATTORETTI et al., 1992; KEY et al., 1993).

Os anticorpos monoclonais MIB-1 e MIB-3 são considerados verdadeiros equivalentes ao antígeno Ki-67 com base em técnicas de imunocoloração de secções congeladas, técnicas imunobioquímicas e moleculares (CATTORETTI et al., 1992), e apresentam boa imunorreatividade em material fixado em formalina e congelado (KEY et al., 1993; GERDES et al., 1992). Entretanto, em métodos de coloração imunohistoquímica de rotina em preparações com parafina, os anticorpos MIB-1 e MIB-3 marcavam apenas figuras mitóticas, mas não as células proliferantes não mitóticas, o que tornava o procedimento decepcionante (CATTORETTI et al., 1992). Para contornar este problema, foi proposto um novo procedimento baseado em uma modificação do método de SHI et al. (1991) com o tratamento dos cortes, após a retirada da parafina, em tampão citrato (pH 6,0) por duas vezes em forno de microondas a 700 W por 5 minutos (GERDES et al., 1992; CATTORETTI et al.



1992). Este procedimento tornou possível a detecção do antígeno previamente definido por Ki-67, em tecidos rotineiramente fixados em formalina e embebidos em parafina, através da imunocoloração com os anticorpos MIB-1 e MIB-3 de secções de parafina processadas em forno de microondas. Neste procedimento, não ocorre a reação de coloração cruzada citoplasmática de células epiteliais escamosas, observada em material fresco congelado corado com Ki-67 (CATTORETTI et al., 1992).

### **1.1. - Comparação do MIB-1 com outros marcadores**

A taxa proliferativa dos tumores, um dos fatores prognósticos mais estudados, tem sido avaliada através de diversos métodos. Entre eles, os índices de marcação celular através de colorações imunoistoquímicas do antígeno Ki-67 com MIB-1 tem sido comparados com índices obtidos com diversos marcadores nos mais variados tipos de tumores e de tecidos.

O mais antigo e utilizado método para medir a taxa proliferativa de tumores é a contagem de figuras mitóticas em secções histopatológicas de rotina. Tem sido demonstrado que a contagem de figuras mitóticas correlaciona-se fortemente com o prognóstico nos casos de câncer de mama (BAAK et al., 1985; CLAYTON, 1991). Diversas críticas tem sido formuladas em relação a este método baseadas na subjetividade na identificação das figuras mitóticas, nas diferenças dos protocolos de contagem, em fatores técnicos como tempo de fixação, espessura da secção, heterogeneidade da distribuição das figuras mitóticas dentro do tumor e outras fontes de variabilidade (HALL & LEVINSON, 1990; WOOSLEY, 1991; GILCHRIST, 1992; LINDEN et al., 1992)

Um método, que era utilizado principalmente em laboratórios de pesquisa, determina a incorporação de timidina marcada. Apesar das taxas de proliferação determinadas por este método, correlacionarem-se com o prognóstico, o procedimento é tecnicamente difícil e não adequado para uso em procedimentos de rotina (WOOSLEY, 1991; LINDEN et al., 1992)

Outro índice utilizado para avaliar a atividade proliferativa de tumores é a incorporação de Bromodesoxiuridina (BrdUrd) em células na fase S. A relação entre os índices de marcação com Ki-67 e BrdUrd em um estudo com secções congeladas de tumores malignos de 20 pacientes, sendo cinco casos de câncer de mama, quatro casos de câncer genital feminino, três casos de câncer oral e oito casos de diversos tipos de tumores, foi grandemente variável de paciente para paciente, mas, em geral os índices com Ki-67 foram maiores do que os índices com BrdUrd (SASAKI et al., 1988). Os índices de proliferação com Bromodesoxiuridina (BrdUrd) e marcação de Ki-67 com MIB-1 também foram comparados em meningiomas de 40 pacientes, sendo 31 meningiomas benignos, 4 meningiomas atípicos e 5 meningiomas malignos. Os índices obtidos com MIB-1 foram maiores do que os obtidos com BrdUrd, não sendo afetados por pré-tratamentos com esteróides ou pela idade dos pacientes. A atividade proliferativa pode ser determinada com MIB-1 em todos os tecidos de meningioma rotineiramente fixados, inclusive de meningiomas intra-ósseos que normalmente requerem descalcificação. O anticorpo monoclonal MIB-1 pode ser utilizado como uma alternativa para a determinação de índices de proliferação, evitando-se a administração intravenosa de BrdUrd, uma droga potencialmente mutagênica (LANGFORD et al., 1996).

Em outro estudo, realizado por ITOH et al. (1993) em línguas de ratos, foi determinado um índice de proliferação com o emprego de BrdUrd. Os valores obtidos foram menores para epitélio normal, na ordem de  $3,49 \pm 0,49\%$ , médios em papilomas, na ordem de  $8,24 \pm 1,76\%$ , e maiores em carcinomas epidermóides, na ordem de  $13,36 \pm 4,40\%$ .

Também a medição da fração na fase S por citometria de fluxo é um método importante para a avaliação da taxa proliferativa. Vários estudos em carcinoma de mama, tem mostrado uma importante associação entre a elevada fração na fase S e o prognóstico pobre, sem relação com metástases para linfonodos regionais (KESHEGEGIAN & CNAAN, 1995). Entretanto, este método necessita de equipamentos caros, procedimentos complexos, interpretação e pode produzir resultados variáveis dependendo da proporção de células de tumor na amostra de tecido (HALL & LEVINSON, 1990; WOOSLEY, 1991). Outras causas que podem impedir a obtenção de resultados com este método são a falta de padronização para o método e o uso de material congelado por alguns laboratórios e embebido em parafina por outros (KESHEGEGIAN & CNAAN, 1995).

Os problemas com a determinação da fração na fase S e as controvérsias envolvendo a contagem de figuras mitóticas tem levado os pesquisadores a buscarem antígenos marcadores de proliferação para procedimentos de imunoistoquímica. Um marcador imunoistoquímico freqüentemente utilizado é o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Em carcinoma de mama, tem sido observada a falta de associação entre os índices de PCNA e a idade do paciente, o tamanho do tumor, o envolvimento de nódulos linfáticos e as dosagens dos receptores hormonais (GASPARINI et al., 1992; LEONARDI et al., 1992; FRIERSON, 1993;

SCHIMMELPENNING et al., 1993; TAHAN et al., 1993; THOMAS et al., 1993; KESHEGEGIAN & CNAAN, 1995). Entretanto, os índices de positividade de PCNA, em carcinoma de mama, correlacionaram-se com o índice de MIB-1 e com a contagem de figuras mitóticas por campos de 10 aumentos (FRIERSON, 1993; TAHAN et al., 1993; KESHEGEGIAN & CNAAN, 1995).

Um estudo imunoistoquímico da cinética celular de 62 tumores epiteliais de timo com o uso de PC10, um anticorpo monoclonal para o antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), e de MIB-1, anticorpo monoclonal para o antígeno Ki-67, mostrou que, apesar de os índices de marcação de PCNA serem consistentemente maiores do que os de Ki-67, houve correlação entre os índices de proliferação celular obtidos com estes marcadores. Em geral, as imunocolorações de PCNA apresentaram graduação na intensidade de marcação nuclear e as de Ki-67 apresentaram coloração nuclear difusa com menor variação de intensidade e acentuaram os nucléolos (YANG et al. 1996).

Vários estudos tem empregado o anticorpo PC10, para PCNA, o qual pode ser utilizado em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina. Contudo, a disparidade de resultados de PCNA provavelmente reflete diversas variáveis que podem afetar a positividade, como o tempo de fixação, o qual afeta substancialmente a positividade de PC10 (LEONG et al., 1993; COLTRERA et al., 1993), embora existam trabalhos com resultados consistentes em relação ao tempo de fixação (KESHEGEGIAN & CNAAN, 1995). Recentemente foi sugerido que o emprego do anticorpo monoclonal 19A2 para PCNA, juntamente com procedimentos de recuperação antigênica de tecidos fixados em formalina, pode dar melhores resultados em câncer de mama que o PC10 (VISSCHER et al., 1992)

Dados recentes indicam que a detecção de PCNA em espécimes embebidos em parafina é dependente do manuseio do tecido e do procedimento de fixação, principalmente a fixação em formalina, a qual reduz a intensidade da coloração e o número de células positivas para PCNA (DIEBOLD et al., 1992; BUFFORD-MASON et al., 1994). Além destes fatores, o PCNA também pode ser expresso como resposta à injúria em células não proliferantes (WOLF & DITTRICH, 1992).

Com base em todas estas observações, tem sido sugerido que, para carcinoma de mama, o PCNA não é um marcador de proliferação convincentemente útil. Por outro lado, os índices obtidos com anticorpo monoclonal MIB-1, utilizado em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina, mostraram forte correlação com a contagem de figuras mitóticas, com o grau histológico do tumor, com índices bioquímicos e imunocitoquímicos de receptores hormonais e também com a sobrevivência do paciente livre de doença, sendo um meio útil e largamente aplicável para avaliação da proliferação celular (KESHEGEGIAN & CNAAN, 1995)

Recentemente, a expressão da proteína p27, uma proteína inibidora da atividade de quinase dependente de ciclina, codificada pelo gene p27<sup>kip1</sup>, em tecidos normais e neoplásicos foi utilizada como marcador de ciclo celular em estudos imunoquímicos e pode ser relacionada com a marcação do antígeno Ki-67 pelo anticorpo monoclonal MIB-1. A expressão do gene p27 foi inversamente relacionada com o marcador de proliferação, o antígeno Ki-67, isto é, tecido normal que foi fortemente positivo para p27 apresentou poucas células positivas para MIB-1 enquanto que neoplasias benignas ou malignas apresentaram poucas células positivas para p27 e muitas para Ki-67. Apenas em hiperplasias e adenomas de paratireóide os índices de Ki-67 foram similares, enquanto que, para p27, ocorreram cerca de três

vezes mais células positivas em hiperplasias do que em adenomas (LLOYD et al. 1997).

### **1.2. - Índices de proliferação celular em outros tumores pela marcação com MIB-1**

O percentual de células positivas, ou índice de marcação com Ki-67, obtido por LLOYD et al. (1997) através da contagem ao acaso de 1000 células por lâmina, foi o seguinte: em suprarrenal variou de  $0,2 \pm 0,1\%$  para células de medula normal,  $12 \pm 5,6\%$  para feocromocitoma,  $7,3 \pm 3\%$  para ganglioneuroblastoma e  $66 \pm 9,5\%$  para neuroblastoma; em mama  $1,2 \pm 0,5\%$  para tecido normal e  $24 \pm 4\%$  em adenocarcinoma; em adenocarcinoma do cólon  $43 \pm 7,6\%$ ; em hepatocarcinoma  $65 \pm 19\%$ ; em pulmão  $39 \pm 8\%$  para carcinoma não de pequenas células e  $79 \pm 2,4\%$  para carcinoma de pequenas células; em linfonodos  $60 \pm 32\%$  para linfoma; em paratireóide  $0,3 \pm 0,1\%$  para tecido normal,  $2 \pm 0,3\%$  em hiperplasia,  $2,6 \pm 0,2\%$  em adenoma e  $11,7 \pm 1,1\%$  em carcinoma; em adenocarcinoma da próstata  $13 \pm 5,5\%$ ; em carcinoma medular de tireóide  $5,3 \pm 1,2\%$ ; na pele  $69 \pm 5,7\%$  em carcinoma de células de Merkel e  $57 \pm 13\%$  em melanoma.

Em um estudo com 135 carcinomas de mama utilizando-se coloração imunoistoquímica, os índices de proliferação celular apresentaram um valor médio de  $12,7\%$  por 1000 células com Ki-67, variando de 0 a  $48,2\%$ , e valor médio de  $10,2\%$  com MIB-1, variando de 0 a  $50\%$  (KESHEGEGIAN & CNAAN, 1995).

No relato de um caso de paciente com carcinoma de paratireóide, uma doença incomum que ocorre em menos de 2-3% de todos os casos com características de hiperparatireoidismo primário e para a qual é difícil de o estabelecimento de critérios

morfológicos claros para a distinção entre tumores benignos e malignos da paratireóide, observou-se uma fração proliferativa de tumor de 56 núcleos positivos para Ki-67 por 1000 células e uma contagem média de mitose de 0,5% nas células positivas para Ki-67. Estes índices permitiram o diagnóstico de carcinoma de paratireóide apesar da escassez de sinais microscópicos considerados característicos de malignidade como presença de muitas bandas fibrosas espessas ou nucléolos proeminentes (DIONISIO et al. 1996).

Em tumores epiteliais de timo, o prognóstico depende do estágio (invasividade) e do sub-tipo histológico e os índices de proliferação tem sido utilizados como importantes indicadores do comportamento biológico dos tumores. No estudo de 62 casos de tumores epiteliais de timo os índices de marcação de Ki-67 foram da ordem de  $0,60\% \pm 0,07\%$  para 4 casos de timoma medular, de  $0,94\% \pm 0,85\%$  para 17 casos de timoma composto, de  $2,18\% \pm 0,21\%$  para 11 casos de timoma organóide (predominantemente cortical), de  $2,51\% \pm 0,92\%$  para 10 casos de timoma cortical, de  $3,11\% \pm 3,53\%$  para 18 casos de carcinoma tímico bem diferenciado e para 2 casos de carcinoma tímico pobremente diferenciado os índices foram 11,4 e 7,5% (YANG et al. 1996).

Os índices de proliferação celular avaliados com técnicas imunoistoquímicas com MIB-1 em meningiomas típicos variaram entre 1,5% e 11,2% com mediana de 3,4%, em meningiomas atípicos variaram entre 2,9% e 12,6% com mediana de 6,6% e em meningiomas malignos variaram entre 9,1% e 19,3% apresentando o maior valor mediano 11,8% (LANGFORD et al., 1996).

NAGAO et al. (1995) encontrou índices de proliferação com MIB-1 que variaram de 0% a 84,7% em fígados com hepatite crônica a hepatocarcinomas pouco

diferenciados, havendo correlação desses índices com a taxa mitótica e grau de diferenciação tumoral.

Em um trabalho desenvolvido com tumores estromais do trato gastrointestinal ( CARRILLO et al., 1997), foram obtidos índices que variaram de 0,62% a 47,23%, os quais mostraram correlação com o índice mitótico, ploidia, tamanho do tumor e presença de necrose.

### **1.3. - Utilização de MIB-1 na previsão da recorrência de tumores e sobrevida de pacientes**

A recorrência e a sobrevivência de pacientes com carcinoma epidermóide de laringe pode ser determinada através do emprego de fatores que reflitam a biologia do tumor: análises de DNA, da morfologia do tumor e o índice de marcação Ki-67, com a utilização de MIB-1. Esta bateria de testes permitiu o reconhecimento de pacientes com alto risco de desenvolver a recorrência do tumor, com a vantagem de que pode ser realizada em espécimes de biopsia pré-operatória, o que pode influenciar nas decisões com respeito ao manejo terapêutico e levar a uma terapia mais apropriada e individualizada (WELKOBORSKY et al., 1995).

Em estudo de tumores epiteliais de timo, YANG et al. (1996) observaram que os tumores de quatro pacientes, sendo três com carcinoma de timo bem diferenciado e 1 cortical, recidivaram após um período de acompanhamento de 6 meses, 1, 4 e 7 anos. O timoma cortical, apresentando índice de marcação com Ki-67 de 1,1%, recidivou após 7 anos, sem evidência de morte do paciente após 10 anos; um dos carcinomas bem diferenciados de timo, apresentando índice de marcação com Ki-67 de 2,4%, recidivou após 4 anos, com morte do paciente pela doença após 7 anos;



outro com índice de marcação com Ki-67 de 1,1%, recidivou após 1 ano, com morte do paciente pela doença após 5 anos; e outro com índice de marcação com Ki-67 de 10,9% recidivou após 6 meses, com morte pela doença aos 10 meses. Com a utilização do Ki-67, observou-se uma tendência ao aumento no índice de marcação com o aumento do estágio do tumor, ocorrendo uma diferença estatística significativa dos índices de marcação entre os estágios menores e os maiores. Entretanto, a correlação entre o índice de marcação e o período de recidiva não pode ser avaliada devido ao pequeno tamanho do grupo de pacientes estudados.

A determinação do índice de proliferação com MIB-1 também foi estudada em carcinoma epidermóide do esôfago de uma amostra de 72 pacientes, sendo 20 mulheres com idade média de 64 anos e 52 homens com idade média de 61 anos, estabelecendo-se o valor de índice de proliferação de 30% como limite para a separação entre grupos com baixos índices (< 30%) e grupo com altos índices (>30%). O tempo de sobrevivência médio para pacientes que tinham tumores com baixo índice de proliferação foi de 46,2 meses e de 16,3 meses para os pacientes que tinham tumores com elevados índices de proliferação (YOUSSEF et al., 1995)

## 2. – Objetivos:

Este trabalho foi realizado com os seguintes objetivos:

- comparação do índice de proliferação celular em carcinomas epidermóides de esôfago e em amostras de epitélio esofágico distantes 5,0cm e 10,0cm do tumor, através da coloração imunoistoquímica com anticorpo monoclonal MIB-1;
- comparação do índice de proliferação celular em carcinomas epidermóides de esôfago e em amostras de epitélio esofágico distantes 5,0cm e 10,0cm do tumor, através da coloração imunoistoquímica com anticorpo monoclonal 7B11;
- comparação dos índices obtidos pela marcação dos dois anticorpos.

### 3. – Materiais e Métodos

#### 3.1 - População amostrada

Este estudo abrangeu uma amostra de 18 pacientes da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA) submetidos à esofagectomia com diagnóstico anatomopatológico prévio de carcinoma epidermóide de esôfago, que não tivessem sido submetidos à quimio ou radioterapia prévias. Foram considerados critérios de exclusão a margem proximal menor do que 10cm e o prazo de fixação superior a 48 horas, de acordo com procedimento realizado por LAM et al. (1996). Não foi considerada necessária a autorização do paciente ou da Comissão de Ética para a realização deste experimento, pois não houve qualquer alteração em relação a conduta diagnóstica ou terapêutica, além de os dados de identificação utilizados serem somente de caráter epidemiológico, sendo mantida em sigilo a identidade dos pacientes. Não havia nenhum conhecimento prévio de qualquer condição referente ao paciente. Todos os dados foram obtidos com base no prontuário hospitalar, sendo utilizados aqueles julgados necessários para compor este trabalho. Os dados acima referidos estavam descritos em um protocolo de pesquisa que acompanhava prontuário de cada paciente (Anexo 1). As principais características da população amostrada, sexo, idade e utilização de álcool e fumo são apresentadas na Tabela 1. Não foi feita avaliação quantitativa do consumo de álcool, chá ou chimarrão, apesar desses serem descritos como potenciais fatores de risco para carcinoma epidermóide de esôfago, por esses dados não constarem no prontuário hospitalar.

### 3.2. - Amostragem

Foram coletadas amostras do tumor (na sua margem com o epitélio macroscopicamente normal) e de duas áreas localizadas cranialmente ao mesmo, distando, respectivamente, 5cm e 10cm da borda proximal desse. Os fragmentos retirados mediam cerca de 1,0 x 0,5cm e, imediatamente após sua extração, foram fixados em formalina tamponada a 10%, por um período mínimo de 24 horas e máximo de 48 horas. O prazo decorrido entre a retirada do esôfago e a imersão dos fragmentos no fixador variou de 40 a 150 minutos.

Tabela 1. – Caracterização da população amostrada quanto ao sexo, idade, procedência e consumo de álcool e fumo.

| Pacientes | Sexo      | Idade (anos) | Procedência        | Alcoolista | Tabagista |
|-----------|-----------|--------------|--------------------|------------|-----------|
| 1         | Masculino | 64           | Porto Alegre       | sim        | não       |
| 2         | Masculino | 62           | Três Coroas        | não        | não       |
| 3         | Masculino | 49           | Rio Pardo          | sim        | sim       |
| 4         | Masculino | 72           | Bento Gonçalves    | não        | sim       |
| 5         | Masculino | 68           | Lagoa Vermelha     | sim        | sim       |
| 6         | Masculino | 62           | Júlio de Castilhos | sim        | sim       |
| 7         | Masculino | 48           | Araranguá          | sim        | sim       |
| 8         | Masculino | 57           | São Luís Gonzaga   | sim        | sim       |
| 9         | Feminino  | 52           | Roca Sales         | sim        | não       |
| 10        | Masculino | 64           | Santo Antônio      | sim        | sim       |
| 11        | Feminino  | 66           | Livramento         | não        | não       |
| 12        | Masculino | 77           | Estrela            | não        | sim       |
| 13        | masculino | 57           | ND*                |            |           |
| 14        | masculino | 49           | Teotônia           | sim        | sim       |
| 15        | masculino | 64           | Viamão             | não        | sim       |
| 16        | masculino | 62           | ND*                |            |           |
| 17        | masculino | 70           | Encruzilhada       | sim        | sim       |
| 18        | masculino | 53           | Venâncio Aires     | sim        | sim       |

ND\* = Informação não disponível

### 3. 3. – Processamento das amostras

Após a fixação dos tecidos, realizou-se o processamento histológico de rotina em aparelho histotécnico automático, marca ANCAP, com ciclo de desidratação em álcool por 9 horas, clarificação em xilol por 3 horas e impregnação em parafina por 3 horas, seguido da inclusão em blocos de parafina.

#### 3.3.1 - Procedimento

Os blocos de parafina foram processados pelo Laboratório Anticorpos Ltda. (Niterói, RJ), sendo cortados em secções de 4  $\mu$ m de espessura em micrótomo manual American Optical, com navalhas descartáveis e confeccionadas duas lâminas de cada bloco. Uma delas foi corada imunistoquimicamente pelo método de imunoperoxidase, sistema avidina-biotina (ABC), com o anticorpo monoclonal MIB-1 (clone MIB-1, Immunotech), diluído em água destilada estéril na proporção de 1:50, desenvolvido para identificação da fração carboxi terminal da proteína Ki-67, marcadora do ciclo celular e a segunda lâmina com um outro anticorpo monoclonal marcador, também, do Ki-67 (clone 7B11, Zymed Technical Services), pronto para uso. O 7B11, segundo informações pessoais de Steve Quinlivan, representante técnico, e do Dr. Barry H. Hellman Jr, do Departamento de Patologia da do De Paul-Bon Secours Medical Center, Norfolk, VA USA, é um anticorpo de propriedade da Zymed para detectar o proteína Ki-67 em cortes de parafina, o qual foi desenvolvido a partir de uma seqüência de peptídeos sintéticos da fração carboxi-terminal, da mesma forma que o MIB-1, porém o exato sítio imunogênico por ele detectado não é conhecido, por tratar-se de informação confidencial. As lâminas foram previamente preparadas com organocilano e a recuperação antigênica feita através de

processamento em forno de microondas. Toda a técnica imunoistoquímica utilizada foi semelhante para os dois marcadores. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina.

#### **3. 4. – Avaliação das lâminas**

A leitura das lâminas foi feita em microscópio Nikon, Alphaphot II, em 1000 aumentos, por um patologista sem que este soubesse qual dos dois marcadores estava sendo analisado. Foram contadas todas as células coradas e, a seguir, as não coradas, de diversos campos seqüenciais ao longo da amostra, até que se obtivesse um número mínimo de 2000 células. Determinou-se o índice de marcação (IM) calculando-se o percentual de células coradas pelo anticorpo específico em relação ao total de células contadas. A contagem iniciou-se sempre por uma das extremidades do corte e incluiu células de todas as camadas do epitélio, neoplásico ou não.

Não foi possível a interpretação “duplo cego” de qual das amostras de cada esôfago estava sendo observada, pois as alterações histológicas da amostra de tumor eram inequívocas para carcinoma epidermóide.

#### **3.5 Análise estatística**

As médias dos índices de marcação das amostras de tumor e de epitélio esofágico não neoplásico a 5 e 10 cm do tumor de um mesmo marcador foram comparados entre si utilizando-se o teste não-paramétrico para amostras agrupadas (teste de Friedman) com alfa de 5%. Também foram comparadas as médias dos índices de marcação das mesmas amostras submetidas a coloração com marcadores

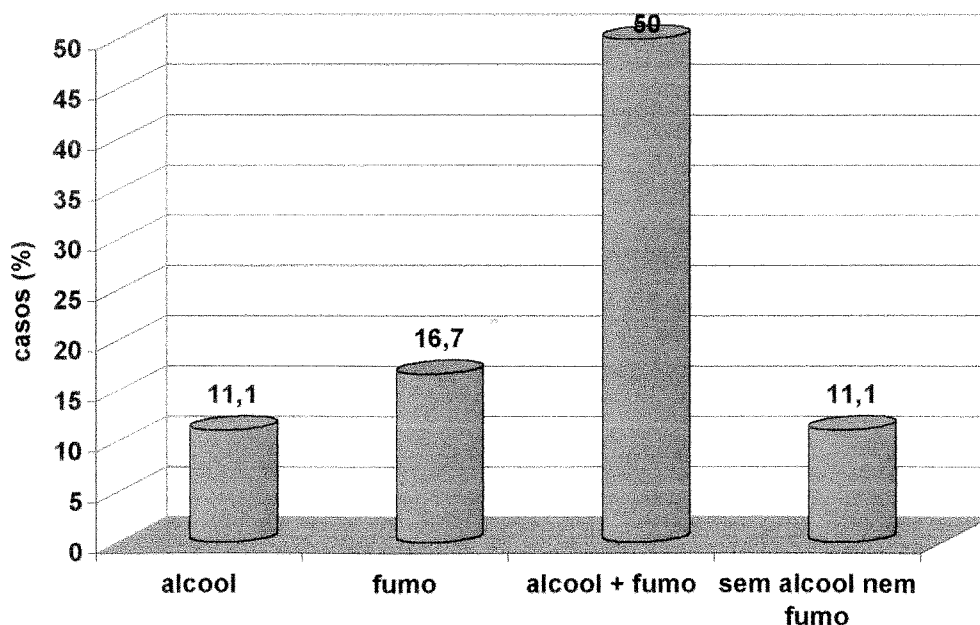
diferentes (os anticorpos monoclonais MIB-1 e 7B11) utilizando-se o teste de Mann-Whitney, também com alfa de 5%.

## 4. – Resultados

### 4.1 – Características da população amostrada.

Da população amostrada de 18 pacientes, a maioria constituía-se de pacientes do sexo masculino (16), sendo apenas 2 pacientes do sexo feminino. Os pacientes apresentavam idades variando de 48 a 77 anos (com idade média de 60,89 anos) (Tabela 1), sendo alcoolistas e tabagistas 50%, apenas alcoolistas 11,1%, apenas tabagistas 16,7% e aqueles que não bebiam nem fumavam constituíam 11,1% da população amostrada (Figura 1).

Figura 1. – Percentual de usuários de álcool e fumo na população da amostra.

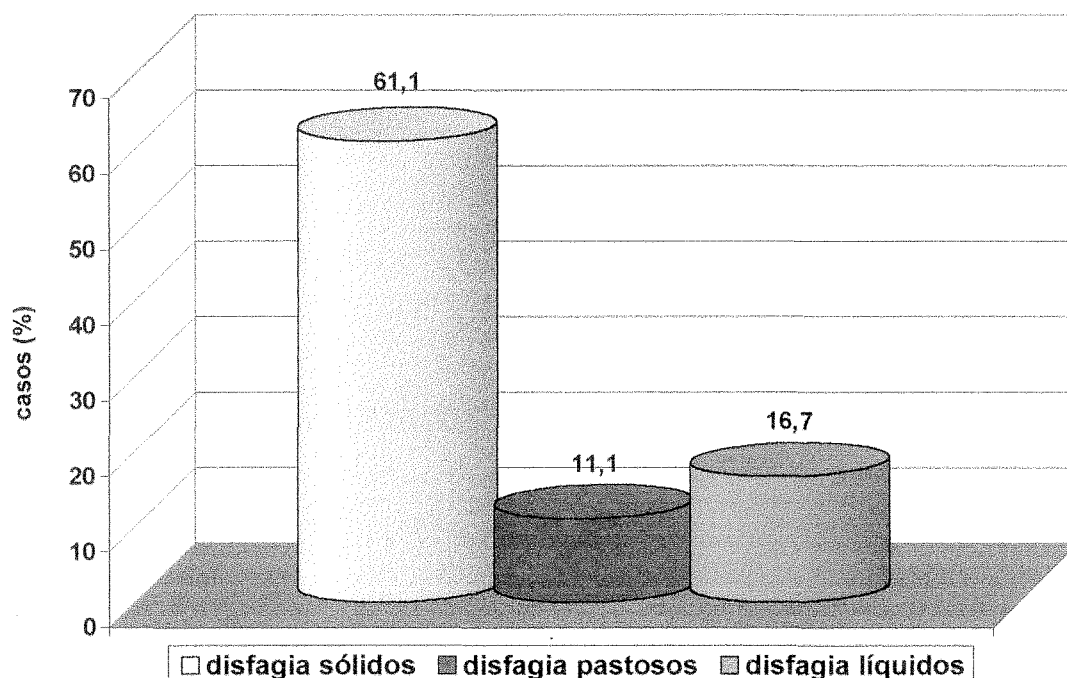


Os pacientes apresentavam diferentes graus de sintomatologia, sendo que 61,1% dos pacientes apresentavam disfagia a alimentos sólidos, 11,1% apresentavam



disfagia a alimentos pastosos e 16,7% a líquidos (Figura 2). Apenas um dos pacientes não apresentou emagrecimento.

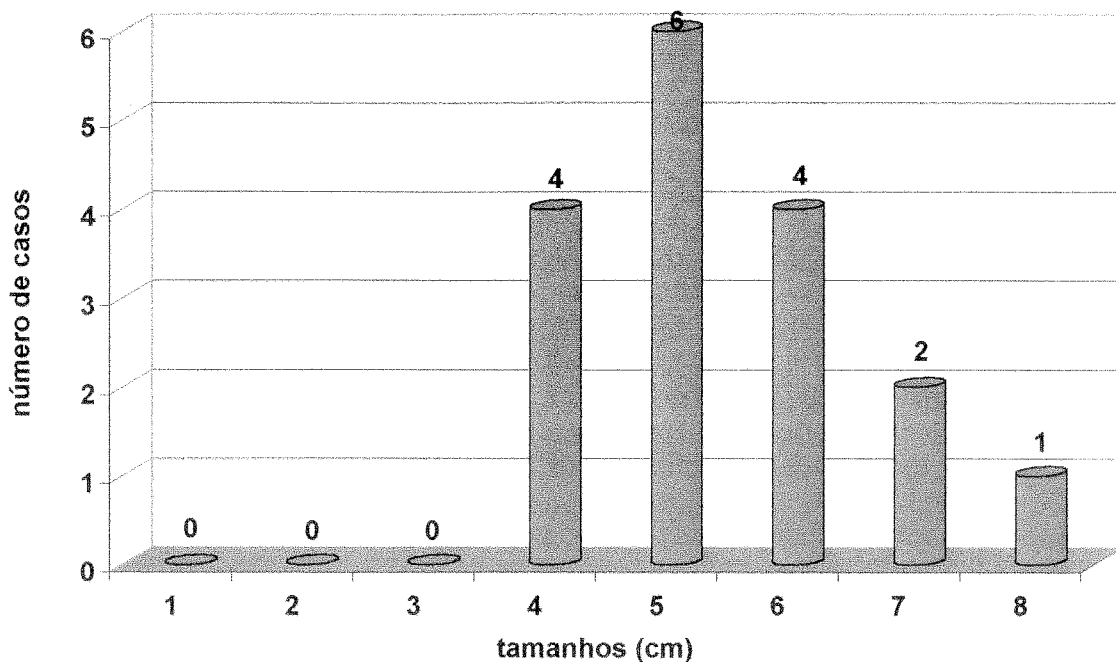
Figura 2. – Percentual de diferentes graus de disfagia apresentados pelos pacientes



#### 4.2. - Avaliação anatomopatológica

Os esôfagos ressecados mostravam tumores com tamanhos variando de 4 a 8 cm de diâmetro máximo sendo que o maior número de pacientes apresentou tumores com 5 cm de diâmetro máximo (Figura 3). A maioria dos tumores (14 casos) localizava-se no terço distal, sendo que apenas em quatro casos os tumores localizavam-se no terço médio do esôfago.

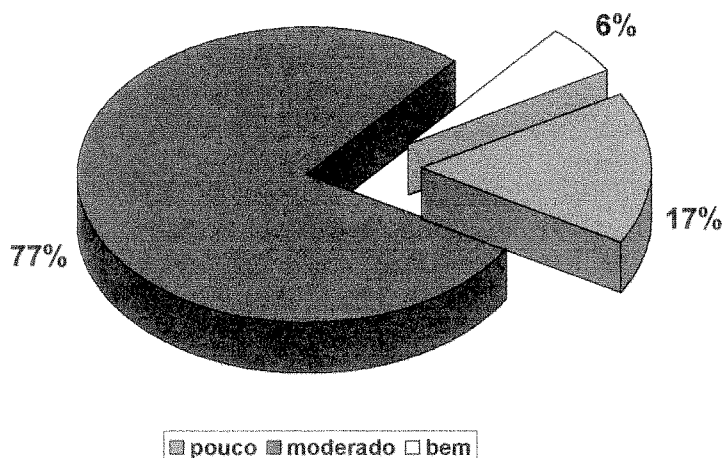
Figura 3 . Distribuição do número de casos em função do tamanho do tumor



A presença de metástases, independente do número e da localização, foi verificada em 11 pacientes e não apresentou relação com o tamanho do tumor. A ausência de relação entre a presença de metástases e o tamanho do tumor pode ser devida ao pequeno tamanho da amostra populacional estudada.

A avaliação microscópica das amostras de carcinoma epidermóide revelou que predominaram os tumores moderadamente diferenciados (77% dos casos). Os demais graus de diferenciação compuseram o restante dos casos estudados (Figura 4).

Figura 4. – Percentual dos tumores quanto ao grau de diferenciação na avaliação anatomopatológica

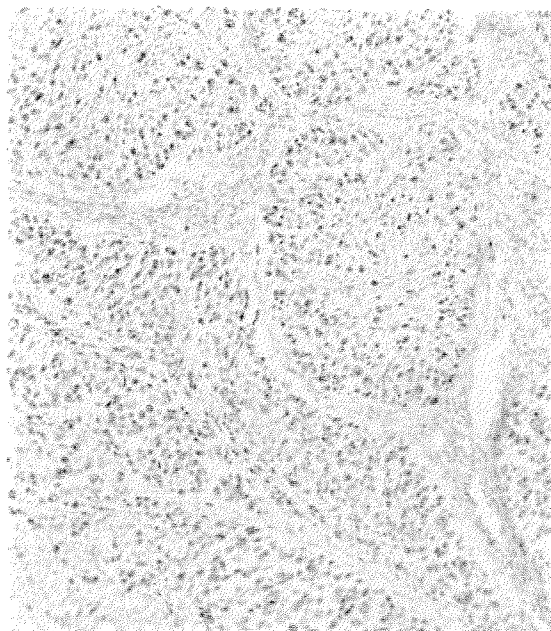


#### 4.3. - Avaliação do padrão das lâminas imunoistoquimicamente coradas

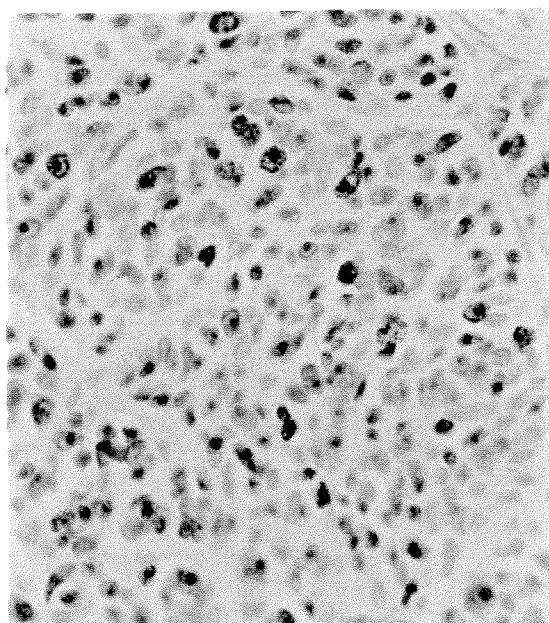
Observou-se que todas as lâminas coradas com o anticorpo monoclonal MIB-1, tanto da amostra de tumor (Figura 5) como de tecidos a 5 cm (Figura 6) e a 10 cm do mesmo (Figura 7), apresentaram uma coloração nuclear forte e homogênea, com predomínio da coloração do nucléolo. Apresentaram também, uma leve coloração acastanhada sobre todo o corte, a qual não dificultou a diferenciação entre coloração de fundo e positividade nuclear, pois a intensidade e homogeneidade desta última foram marcantes.

As amostras de epitélio escamoso não neoplásico mostraram o padrão de coloração nucleolar mais evidente do que no epitélio neoplásico, como pode ser observado na figura 8, apresentando núcleos corados predominantemente na segunda

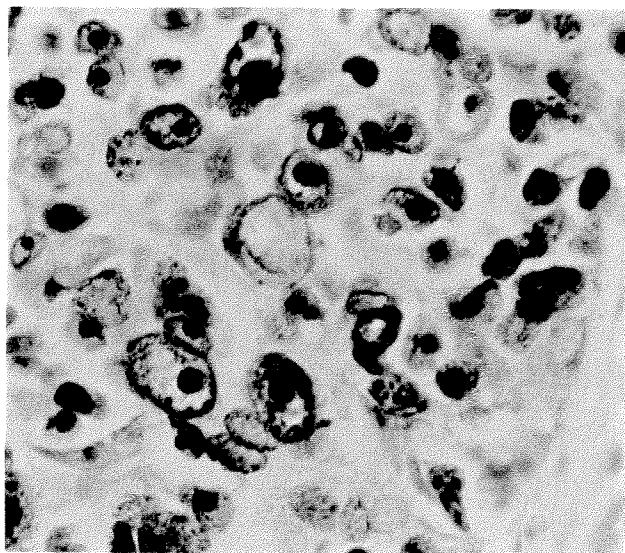
Figura 5. – Carcinoma epidermóide de esôfago corado com anticorpo monoclonal MIB-1: **A**)- frequência e homogeneidade da coloração, observando-se presença de coloração de fundo (100 X); **B**)- detalhe da intensidade dos núcleos (400 X); **C**)- padrão de coloração nuclear com nucléolo evidente (1000 X).



A

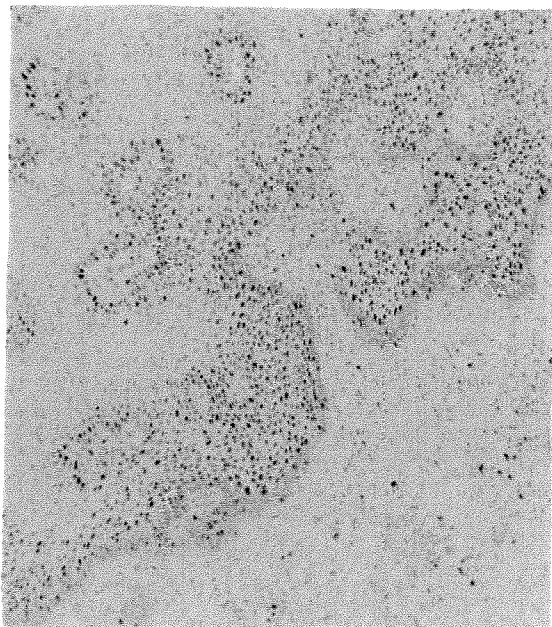


B

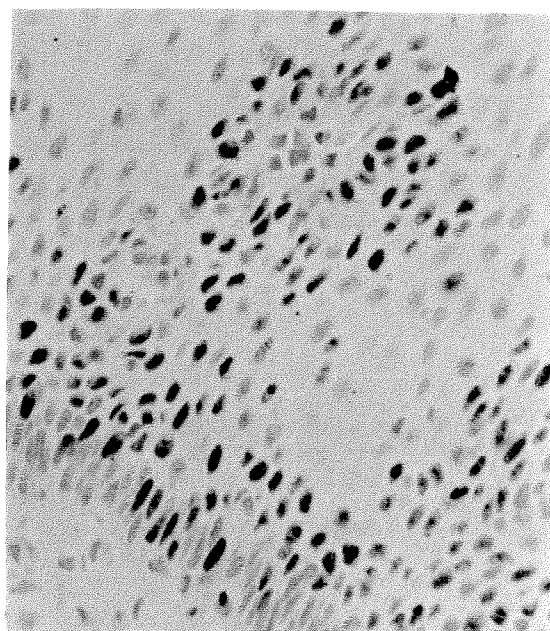


C

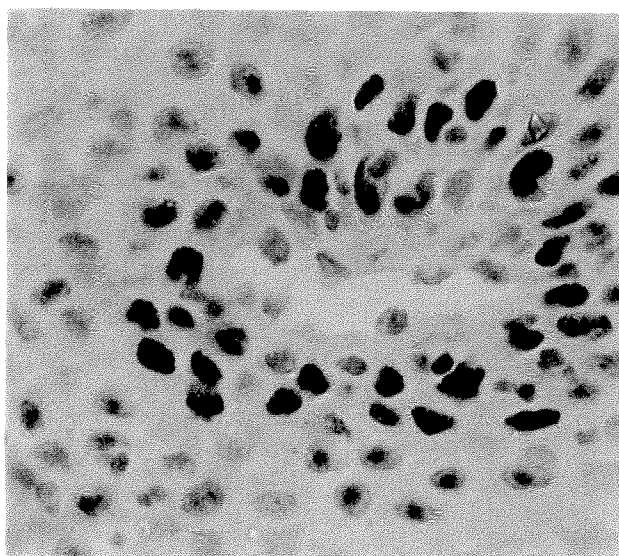
Figura 6. – Epitélio esofágico não neoplásico a 5 cm do tumor corado com anticorpo monoclonal MIB-1: **A**) - espessamento do epitélio com grande número de papilas circundadas por núcleos positivos (100 X); **B**) - positividade nuclear ao redor das papilas e na segunda camada do epitélio (400 X); **C**) - papila circundada por células coradas (1000 X).



A

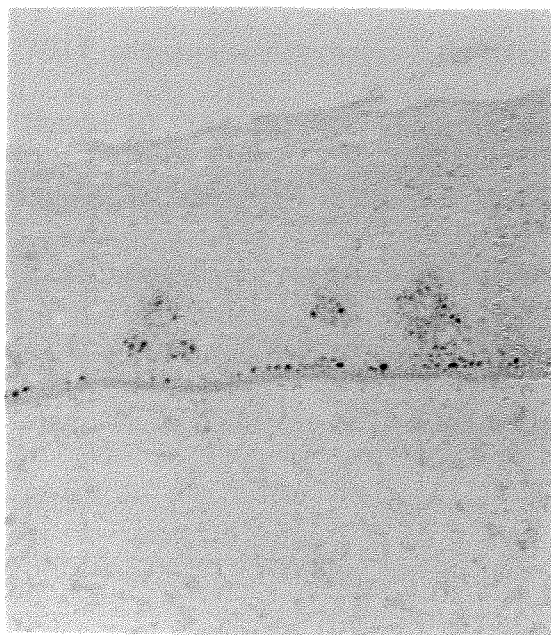


B

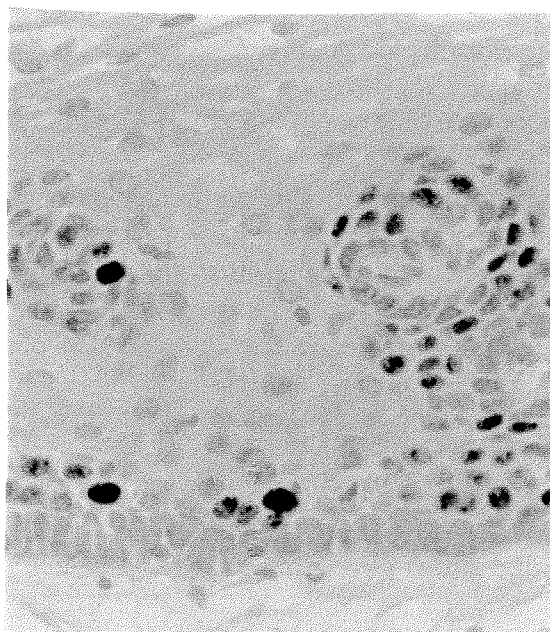


C

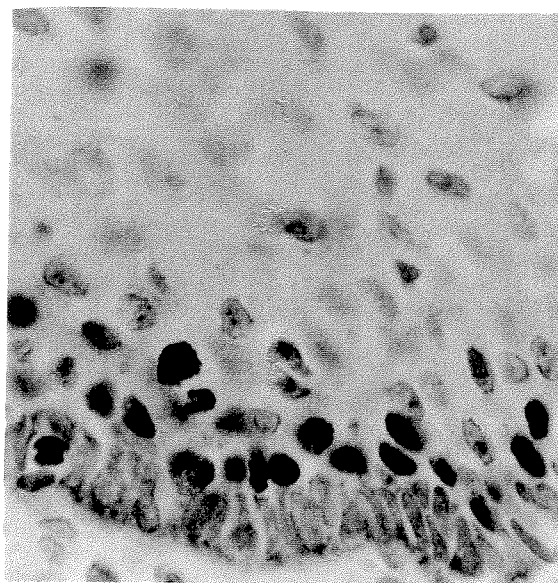
Figura 7. – Epitélio esofágico não neoplásico a 10 cm do tumor corado com anticorpo monoclonal MIB-1: **A)**- papilas no terço inferior e coloração nuclear ao redor e junto à camada basal (100 X); **B)**- células coradas circundando a papila e na segunda camada e camada basal não corada (400 X); **C)**- coloração nuclear da segunda camada do epitélio esofágico (1000 X).



A



B



C

camada de células, a partir da camada basal, e ao redor das papilas que invaginavam o epitélio, como pode ser observado nas figuras 7-B e 9. Somente uma pequena proporção de células da camada basal corou com o anticorpo monoclonal MIB-1.

Em relação às lâminas submetidas à coloração com o anticorpo monoclonal 7B11, nas amostras de tumor e de epitélio a 5 e 10 cm, como pode ser observado nas figuras 10, 11 e 12, verificou-se menos coloração de fundo do que naquelas coradas com MIB-1. Porém, a intensidade da coloração nuclear e nucleolar foi menor do que a decorrente da exposição ao MIB-1, havendo uma maior variabilidade na intensidade da coloração dos núcleos. Esta variabilidade não prejudicou a contagem devido à ausência de coloração de fundo, embora dificultasse a determinação do índice de marcação. O padrão de coloração nucleolar predominou nas células positivas, principalmente no epitélio não neoplásico. Interessantemente, da mesma forma que o MIB-1, o anticorpo monoclonal 7B11 corou predominantemente os núcleos da segunda camada de células, a partir da camada basal e das células ao redor das papilas, havendo poucas células da camada basal coradas com o anticorpo.

As células das camadas intermediária e superficial do epitélio esofágico não exibiram imunorreatividade a nenhum dos marcadores como pode ser observado nas figuras 7-A e B, em amostras coradas com o anticorpo monoclonal MIB-1, e nas figuras 11-A e 12-A, coradas com o anticorpo monoclonal 7B11.

Figura 8. – Epitélio esofágico não neoplásico com núcleos corados com anticorpo monoclonal MIB-1, mostrando intensa coloração nucleolar (1000 X).

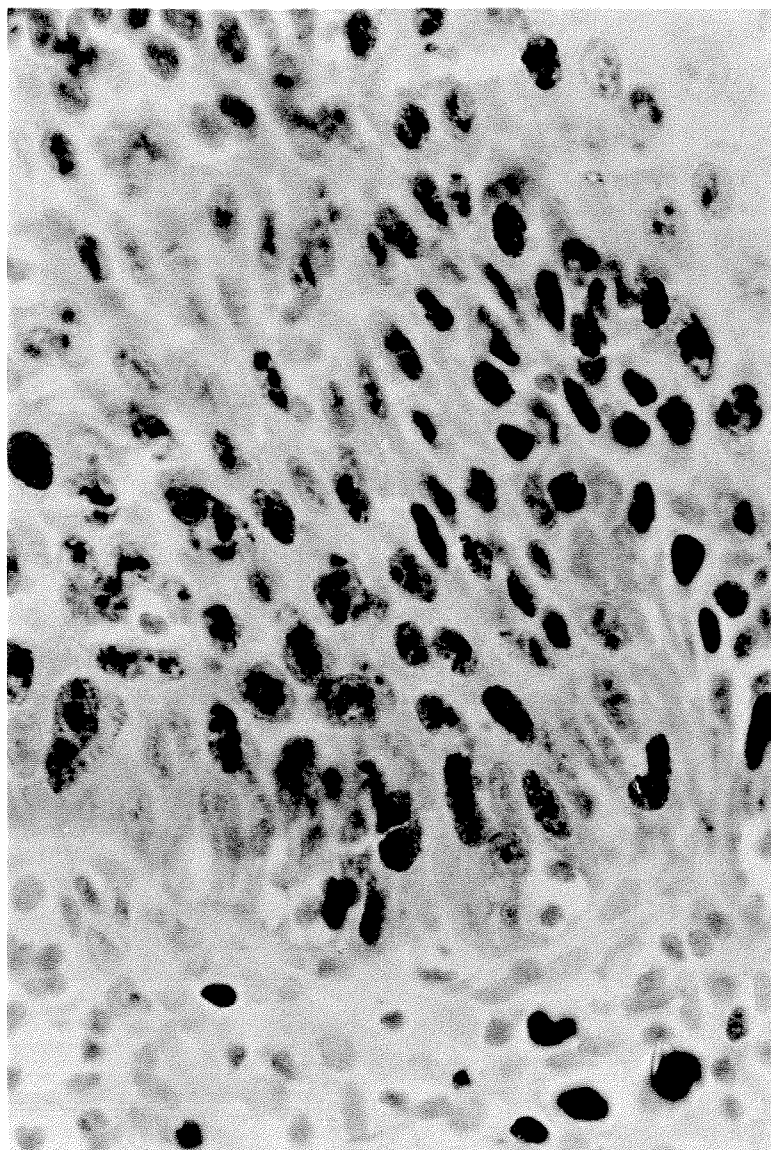




Figura 9. – Epitélio esofágico não neoplásico com núcleos corados com anticorpo monoclonal MIB-1, mostrando a disposição circundante das células coradas ao redor da papila (1000 X).

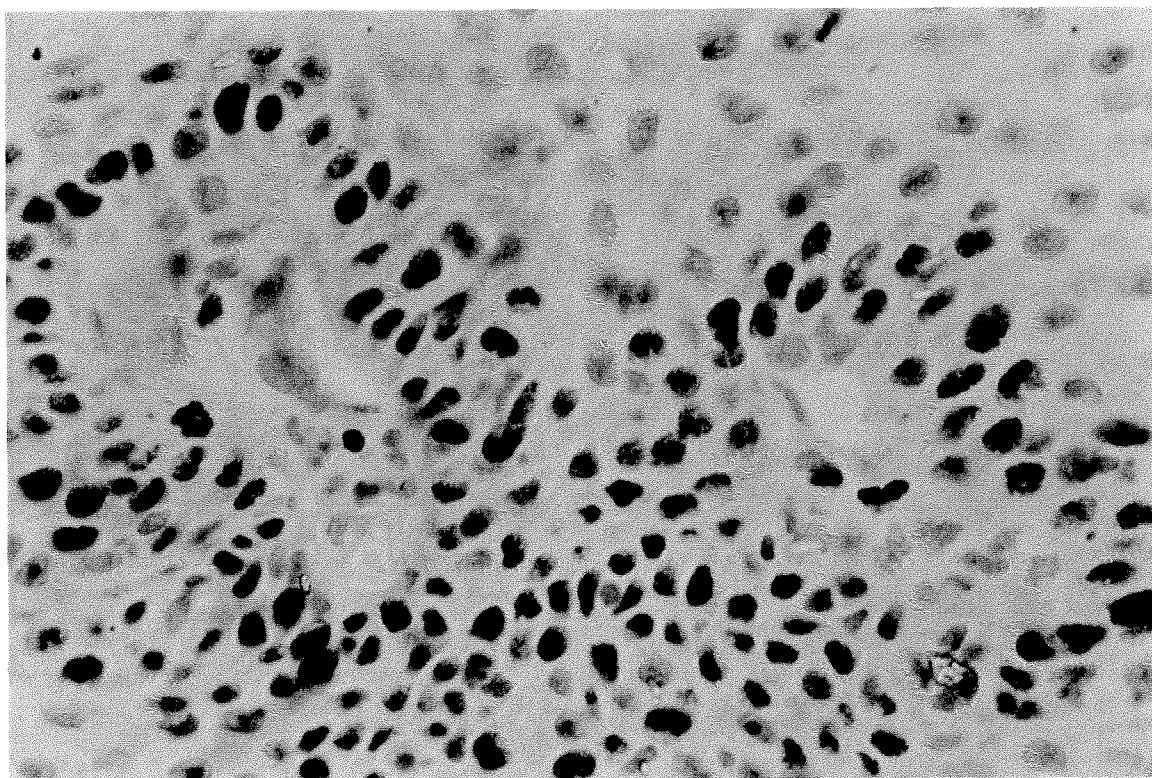


Figura 10. – Carcinoma epidermóide de esôfago corado com anticorpo monoclonal 7B11: **A**)- coloração nuclear difusa com baixa intensidade (100 X); **B**)- distribuição irregular da coloração dos núcleos, alguns com coloração apenas na periferia, outros fracamente corados com pouca coloração de fundo (400 X); **C**)- heterogeneidade da coloração nuclear dificultando a diferenciação entre células positivas e negativas (1000 X).

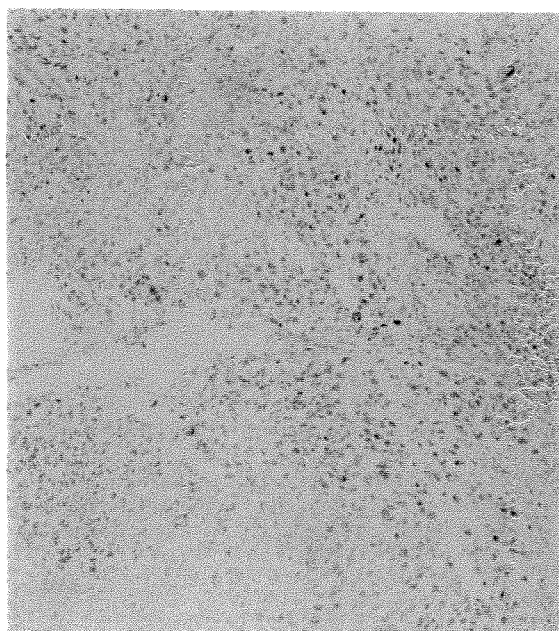
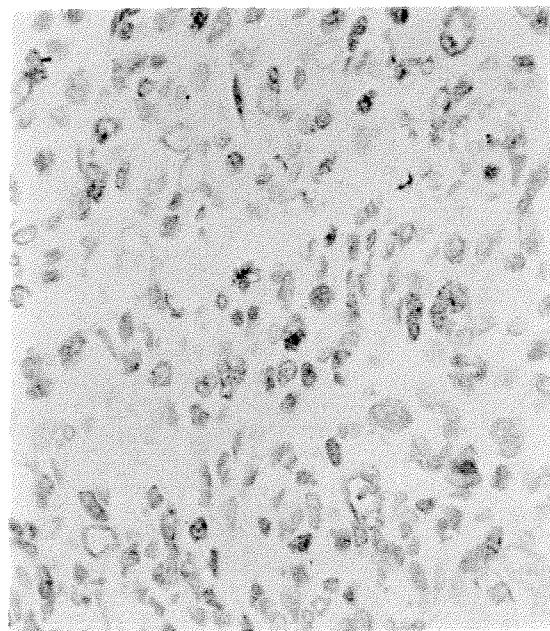
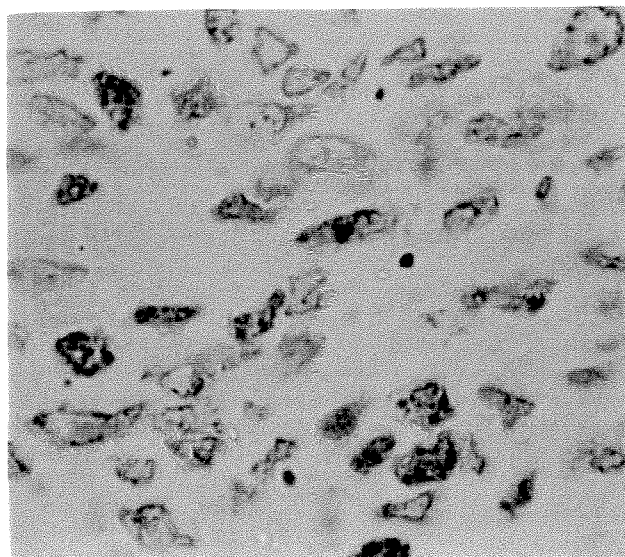
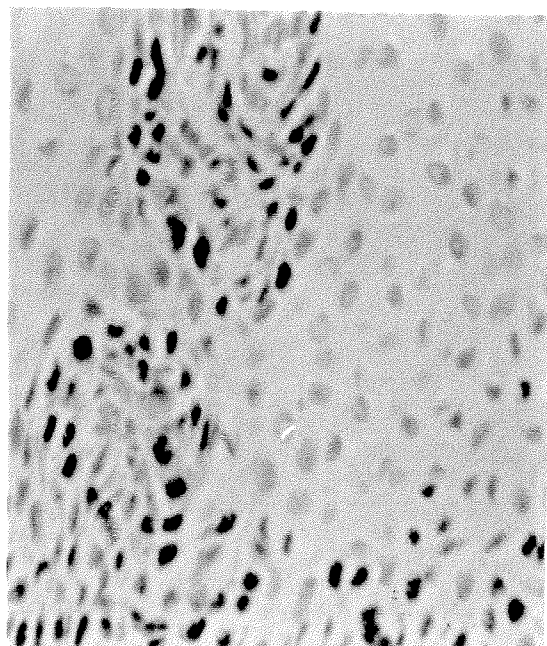
**A****B****C**

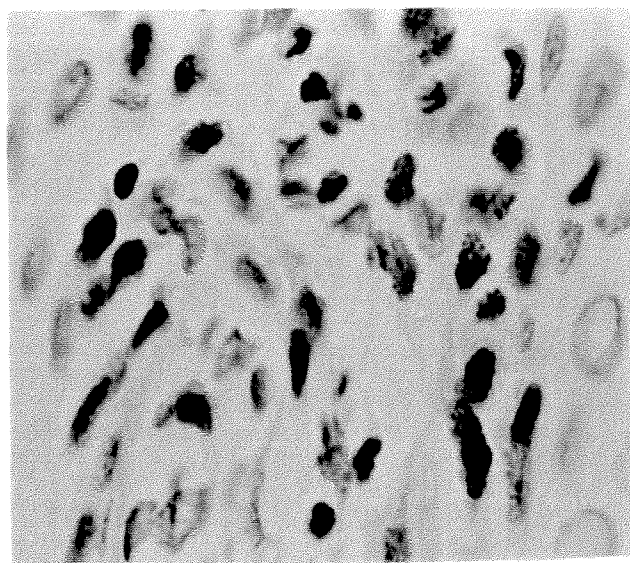
Figura 11. – Epitélio esofágico não neoplásico a 5 cm do tumor corado com anticorpo monoclonal 7B11 mostrando o padrão de coloração: **A)**- terço inferior do epitélio e ao redor das papilas (100 X); **B)**- células circundantes das papilas (400 X); **C)**- coloração difusa no nucleoplasma (1000 X).



A

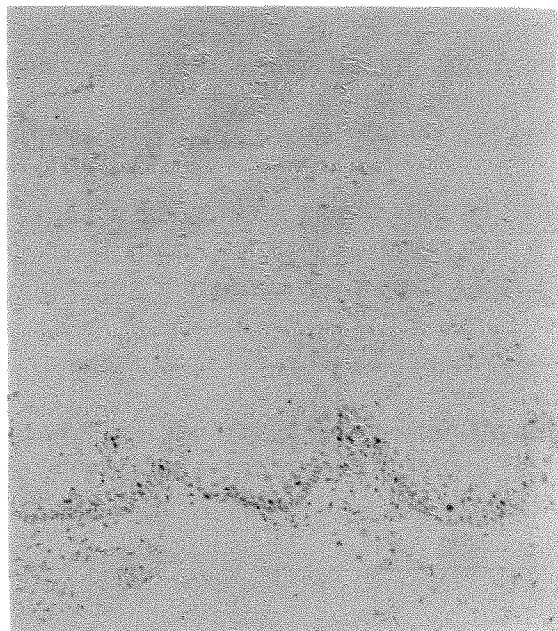
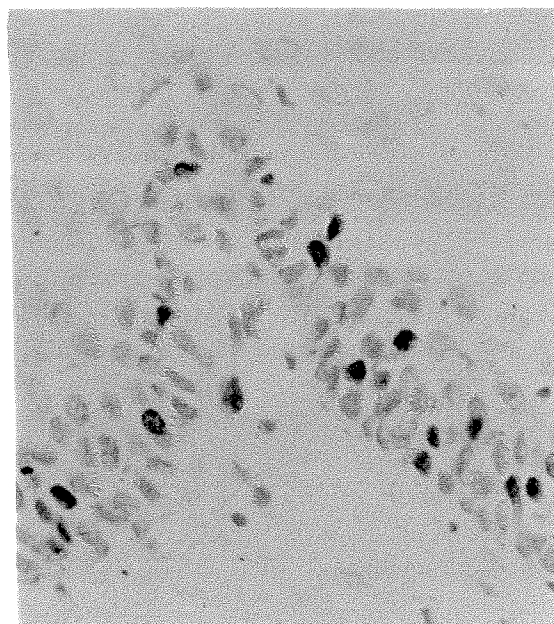
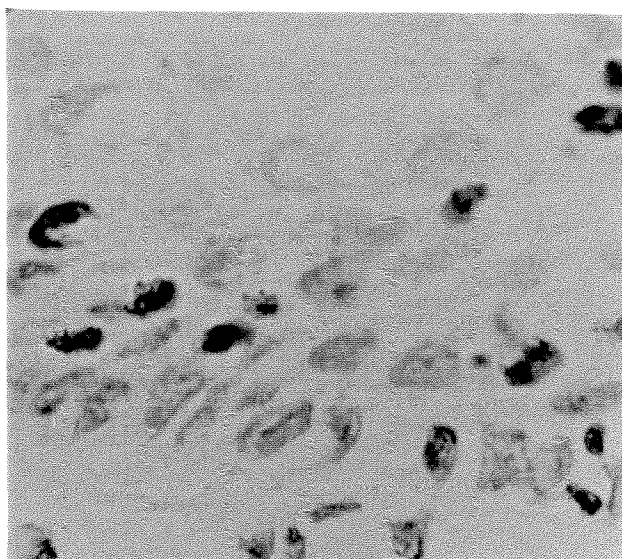


B



C

Figura 12. – Epitélio esofágico não neoplásico a 10 cm do tumor corado com anticorpo monoclonal 7B11: **A)** - raras células coradas no terço inferior do epitélio e ao redor das papilas (100 X); **B)** – coloração nuclear fraca presente em algumas células da camada basal (400 X); **C)**- coloração difusa e pouco intensa no nucleoplasma (1000 X).

**A****B****C**

#### 4.4. - Avaliação do índice de marcação com o anticorpo monoclonal MIB-1

Na tabela 2 são apresentados os valores obtidos para determinação do índice de marcação com o anticorpo monoclonal MIB-1 em amostras de tumor e de epitélio normal a 5 e 10 cm do tumor, dimensão máxima do tumor e presença de metástases. Os índices de marcação obtidos nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago corados com MIB-1 variaram de 43,51% a 76,13%, nas amostras de epitélio a 5 cm do tumor variaram de 4,21% a 14,83 e nas amostras de epitélio a 10 cm do tumor variaram de 5,47% a 14,67%. A média dos índices de proliferação na amostra de tumor foi de 58,274 com intervalo de confiança com 95% entre 52,721 a 63,626. Esses índices nas amostras de epitélio não neoplásico a 5 cm e 10 cm foram, respectivamente, 9,664 (8,236-11,092) e 7,498 (6,467-8,529). A comparação dos índices obtidos mostra, como já era esperado, índices maiores com diferenças estatisticamente significantes para amostras de tumor (Figura 13), quando comparadas às amostras de epitélio não tumoral tanto a 5 cm do tumor como a 10cm.

Tabela 2.- Índice de marcação (%) com o anticorpo monoclonal MIB-1 em amostras de carcinoma epidermóide de esôfago e epitélio esofágico não neoplásico distante 5 e 10 cm do tumor, diâmetro do tumor e presença de metástases.

| Caso   | Diâm. (cm) | metást. | Tumor        | Epitélio normal |             |
|--------|------------|---------|--------------|-----------------|-------------|
|        |            |         |              | 5 cm            | 10 cm       |
| 1      | 7          | +       | 49,3         | 7,64            | 6,99        |
| 2      | 4          | +       | 76,13        | 10,73           | 8,3         |
| 3      | 6          | +       | 43,67        | 7,78            | 7,43        |
| 4      | 5          | +       | 46,68        | 6,24            | 5,69        |
| 5      | 5          | +       | 48,73        | 8,52            | 6,56        |
| 6      | 5          | +       | 71,25        | 13,93           | 7,75        |
| 7      | 5          | +       | 64,28        | 14,83           | 14,67       |
| 8      | ND         | -       | 53,48        | 6,1             | 5,67        |
| 9      | 6          | +       | 48,42        | 12,28           | 8,3         |
| 10     | 4          | +       | 69,56        | 14,23           | 8,27        |
| 11     | 4          | -       | 70,87        | 10,44           | 6,14        |
| 12     | 5          | -       | 68,63        | 9,68            | 8,3         |
| 13     | 8          | -       | 68,85        | 10,07           | 5,47        |
| 14     | 7          | -       | 54,09        | 8,07            | 5,79        |
| 15     | 6          | +       | 63,82        | 9,83            | 7,54        |
| 16     | 5          | +       | 43,51        | 9,82            | 6,12        |
| 17     | 6          | -       | 45,3         | 9,56            | 8,11        |
| 18     | 4          | -       | 62,36        | 4,21            | 7,87        |
| Médias |            |         | <b>58,27</b> | <b>9,67</b>     | <b>7,49</b> |

#### 4.5. - Avaliação do índice de marcação com o anticorpo monoclonal 7B11

Na tabela 3 são apresentados os valores obtidos para determinação do índice de marcação com o anticorpo monoclonal 7B11 em amostras de tumor e de epitélio não neoplásico a 5 e 10 cm do tumor, diâmetro máximo do tumor e presença de metástases. Os índices de marcação obtidos nas amostras de carcinoma epidermóide de esôfago corados com 7B11 variaram de 42,55% a 75,45%, nas amostras de epitélio não neoplásico a 5 cm do tumor variaram de 4,06% a 10,08% e nas amostras de epitélio não neoplásico a 10 cm do tumor variaram de 4,01% a 9,12%. A média dos índices de proliferação na amostra de tumor foi de 56,883 com intervalo de confiança com 95% entre 51,512 a 62,253. Esses índices nas amostras de epitélio não neoplásico a 5 cm e 10 cm foram, respectivamente, 8,058 (7,226-8,888) e 6,843 (6,170-7,515). A comparação dos índices obtidos evidencia índices maiores para amostras de tumor (Figura 14), sendo que, como foi observado para o anticorpo MIB-1, houve diferença estatisticamente significante entre as amostras de epitélio tumoral e não tumoral.

Tabela 3.- Índice de marcação (%) com o anticorpo monoclonal 7B11 em amostras de carcinoma epidermóide de esôfago e epitélio esofágico não neoplásico distante 5 e 10 cm do tumor, diâmetro do tumor e presença de metástases.

| Caso   | Diâm. (cm) | metást. | Tumor        | Epitélio normal |             |
|--------|------------|---------|--------------|-----------------|-------------|
|        |            |         |              | 5 cm            | 10 cm       |
| 1      | 7          | +       | 47,6         | 6,89            | 6,07        |
| 2      | 4          | +       | 75,45        | 8,96            | 7,99        |
| 3      | 6          | +       | 43,50        | 6,78            | 6,56        |
| 4      | 5          | +       | 44,59        | 6,15            | 5,87        |
| 5      | 5          | +       | 47,07        | 7,35            | 6,93        |
| 6      | 5          | +       | 68,98        | 9,12            | 7,28        |
| 7      | 5          | +       | 65,32        | 9,66            | 9,12        |
| 8      | ND         | -       | 53,16        | 5,35            | 4,46        |
| 9      | 6          | +       | 45,73        | 9,14            | 8,45        |
| 10     | 4          | +       | 67,54        | 10,08           | 8,17        |
| 11     | 4          | -       | 70,12        | 9,34            | 6,78        |
| 12     | 5          | -       | 65,32        | 8,46            | 7,61        |
| 13     | 8          | -       | 65,66        | 10,07           | 5,99        |
| 14     | 7          | -       | 54,84        | 7,84            | 6,02        |
| 15     | 6          | +       | 61,47        | 8,14            | 7,43        |
| 16     | 5          | +       | 42,55        | 8,54            | 6,19        |
| 17     | 6          | -       | 46,87        | 9,11            | 8,24        |
| 18     | 4          | -       | 58,13        | 4,06            | 4,01        |
| Médias |            |         | <b>56,88</b> | <b>8,05</b>     | <b>6,84</b> |



Figura 13. – Comparação entre os valores médios do índice de marcação com o anticorpo monoclonal MIB-1 em amostras de carcinoma epidermóide e de epitélio esofágico normal a 5 e 10 cm do tumor.

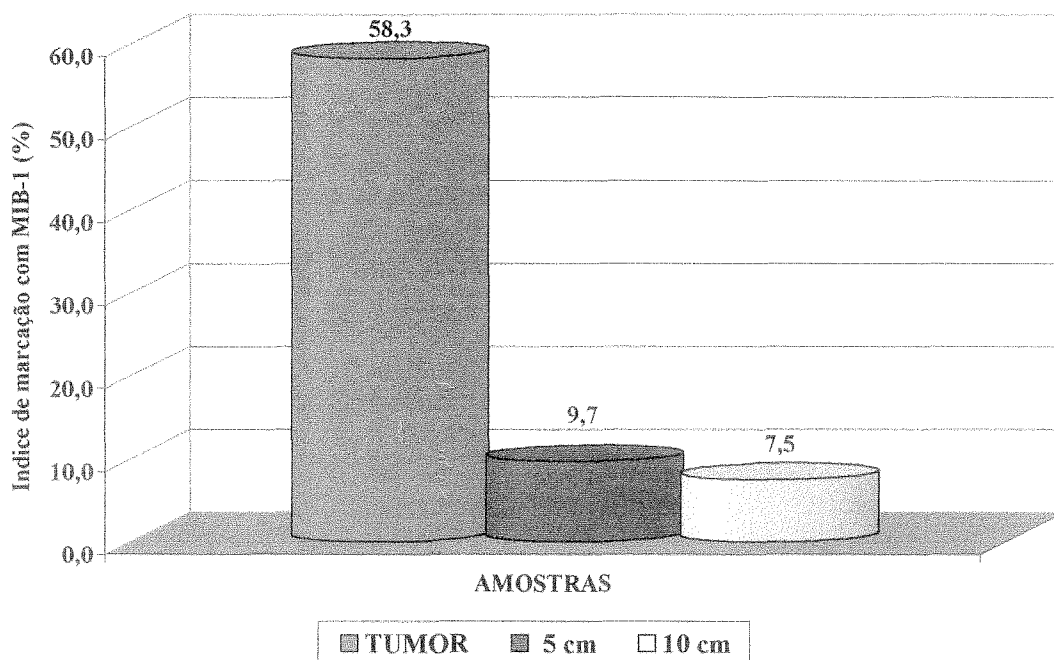
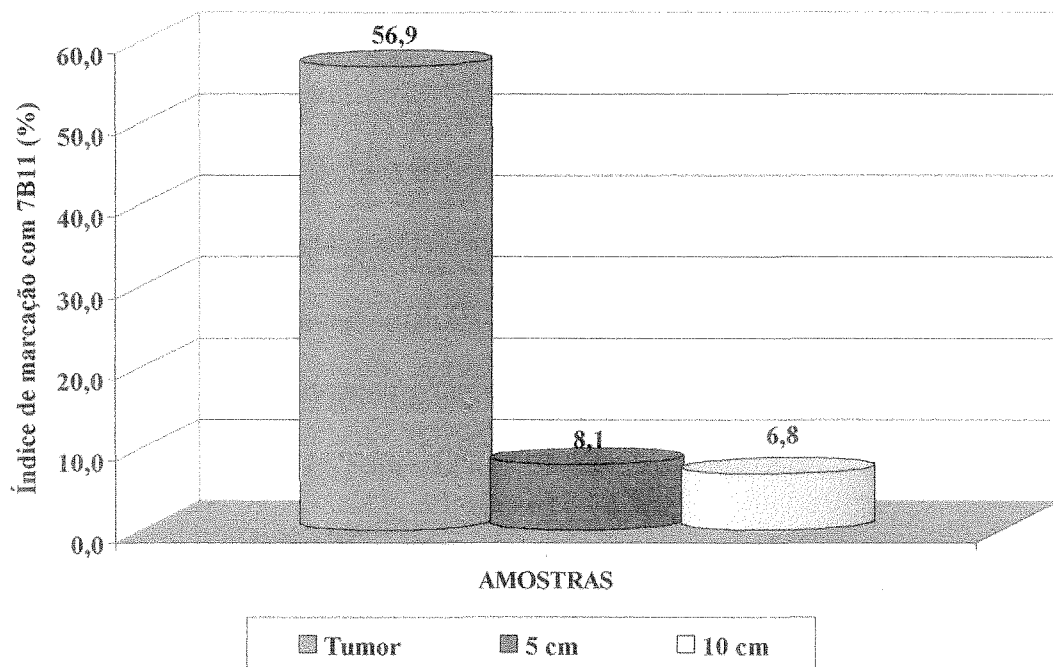


Figura 14. – Comparação entre os valores médios do índice de marcação com o anticorpo monoclonal 7B11 em amostras de carcinoma epidermóide e de epitélio esofágico normal a 5 e 10 cm do tumor.



## 5. - Discussão:

O antígeno Ki-67 tem sido usado como marcador dos índices de proliferação celular em diversos tecidos, relacionando-se, inclusive, os índices de tumores com o prognóstico do paciente ( CATTORETTI et al., 1992; JOCHUN et al., 1995; DIONISIO et al., 1996; HELLQUIST et al., 1997).

Na literatura são freqüentemente encontrados resultados de pesquisas com o emprego do índice de marcação com MIB-1 mas o mesmo não ocorre com a utilização do anticorpo monoclonal 7B11, que é facilmente encontrado no mercado e cujo desenvolvimento é mantido como segredo industrial. Resultados de comparação entre índices de marcação com estes anticorpos também não são encontrados na literatura. Até o momento, este parece ser o primeiro trabalho em que os índices de marcação com o anticorpo monoclonal MIB-1 são comparados com os índices de marcação com o anticorpo monoclonal 7B11.

O achado das células positivas para os dois marcadores encontrarem-se predominantemente na segunda camada de células a partir da membrana basal não é relatado na literatura. Dados obtidos em trabalho paralelo, em andamento, parecem indicar que o fenômeno também ocorre em amostras de epitélio de esôfago humano que não apresentam lesão. Como o Ki-67 é encontrado em todas as fases do ciclo celular, exceto  $G_0$ , é possível que este achado esteja relacionado a uma fase  $G_1$  longa, ou seja, células que estão em  $G_1$ , com chance de entrar em  $G_0$  e diferenciar-se, que provavelmente não re-entrarão no ciclo proliferativo, ainda coram com anticorpos relacionados a este antígeno. Uma forma de tentar resolver esta questão, seria através da determinação da duração de cada uma das fases do ciclo proliferativo do epitélio

esofágico, através do método da timidina marcada (tritiada), através de pulsos. Esta documentação, porém, apenas poderá ser feita “in vitro” e após estudos para verificar se o mesmo achado se repete em esôfagos de animais de laboratório.

Não foram observadas diferenças significativas entre os índices de marcação com MIB-1 e com 7B11, sendo os valores obtidos muito semelhantes para os dois marcadores, como pode ser observado nas tabelas 2 e 3 e nas figuras 13 e 14.

Os índices obtidos neste trabalho para as amostras de carcinoma epidermóide de esôfago corados com MIB-1 foram superiores àqueles encontrados por YOUSSEF et al. (1995), que foram da ordem de  $21,9 \pm 14,4\%$  em pacientes sem metástases linfonodais e  $31,4 \pm 13,6\%$  em pacientes com metástases. Os autores compararam os índices de tumores com diâmetro maior e menor do que 6 cm, os quais foram, respectivamente  $34,5 \pm 7,3\%$  e  $23,3 \pm 14,5\%$ . Não foi observada qualquer relação entre os índices de marcação com MIB-1 e 7B11 com o diâmetro dos tumores nem com a presença de metástases (Tabelas 2 e 3), provavelmente devido ao tamanho reduzido da amostra estudada

Já LAM et al.(1996), encontraram valores maiores, que variaram de  $464 \pm 196$  células positivas por 1000 células contadas, em tumores bem diferenciados, até  $776 \pm 146$  células positivas em 1000 células contada nos tumores pouco diferenciados.

REICHERT et al.(1998) encontraram índices de proliferação celular de 26,5% em carcinomas epidermóides bem diferenciados de cabeça e pescoço e de 68,8% nos pouco diferenciados, usando-se marcadores de Ki-67, havendo forte correlação entre o grau de diferenciação e o índice de marcação observado.

CHINO et al.(1998) relatam ter encontrado diferenças estatisticamente significantes em carcinomas epidermóides superficiais de esôfago quando

correlacionaram os índices de proliferação celular obtidos com a marcação com MIB-1 com grau de invasão, presença ou não de metástases linfonodais e invasão vascular e linfática.

Como a amostra da população estudada neste trabalho foi muito pequena (18 casos) não foram estabelecidas as relações entre índices de marcação com sexo e idade dos pacientes, sítio, diferenciação e estágio do tumor. Neste trabalho, a média dos índices das amostras de tumor foi comparável à média de  $623 \pm 186$  por 1000 células obtida por LAM et al. (1996) para carcinomas epidermóides moderadamente diferenciados.

Os índices de marcação obtidos neste trabalho, para as amostras de epitélio distantes 5 e 10 cm do tumor, foram superiores àqueles observados na maioria dos tecidos não neoplásicos estudados por LLOYD et al. (1997), mas são comparáveis àqueles encontrados por HIRANO et al. (1993) em faringes normais, através do método de marcação com Bromodesoxiuridina, obtendo um índice de  $162 \pm 52,4$  por 2000 células contadas.

Entretanto, o índice de marcação com Bromodesoxiuridina da mucosa do intestino grosso em sítios diversos, adjacentes a um tumor, obtidos por POTTEN et al. (1992) foi de 5,4% de células positivas na mucosa colônica próxima ao tumor e 10% na distante e para a mucosa retal o índice foi de 4,6% nas áreas próximas e de 8,5% nas distantes, diferindo dos resultados obtidos no presente trabalho com MIB-1 e com 7B11, em que áreas de epitélio esofágico peritumoral apresentaram índices maiores do que de áreas mais distantes.

## 6. - Conclusões:

- 1- O anticorpo monoclonal 7B11, comercialmente disponível, apresentou resultados praticamente idênticos aos do ao anticorpo monoclonal MIB-1 nas análises de imunistoquímica de amostras fixadas em parafina de carcinoma epidermóide de esôfago.
- 2- O índice de marcação das amostras de carcinoma epidermóide foi significativamente maior do que o mesmo índice medido nas áreas não neoplásicas, distando 5 e 10cm do mesmo, independente do marcador utilizado.
- 3- O índice de marcação de todas as amostras de carcinoma epidermóide foi sempre superior a 42% com ambos os marcadores, enquanto que nas amostras de epitélio não-neoplásico o índice foi sempre inferior a 15%.
- 4- Tanto MIB-1 como 7B11 coraram mais células da segunda camada do que da camada basal.

## 6. - Referências bibliográficas:

- ASTE, H. & CRESPI, M. Cancer of the esophagus. *Endoscopy*, v. 25 (Suppl.):605. 1993.
- BAAK, J.P.A.; Van DOP, H.; KURVER, P.H.J. & HERMANS, J. The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer*, v.56:374-382. 1985.
- BUFFORD-MASON, A.P.; MACKAY, A.J.; CUMMINS, M. Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in parafin-embedded specimens is dependent on pre-embedding tissue handling and fixation. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v.118:1007-1013. 1994.
- CAMERON, A.J.; OTT, B.J. & PAYNE, W.S. The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus. *N. Engl. J. Med.*, v. 313:857-859. 1985.
- CARRILLO, R.; CANDIA, A.; RODRIGUEZ-PERALTO, J.L. & CAZ, V. Prognostic significance of DNA ploidy and proliferative index (MIB-1 index) in gastrointestinal stromal tumors. *Human Pathology*, v. 28:160-165. 1997.
- CATTORETTI, G.; BECKER, M.; KEY, G.; DUCHROW, M.; SCHLUTER, C.; GALLE, J & GERDES, J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed parafin sections. *J. Pathol.*, v. 168: 357-363. 1992.
- CHALASANI, N.; WO. J.M. & WARING, J.P. Racial differences in the histology, location, and the risk factors of esophageal cancer. *J. Clin. Gastroenterol.* v. 26: 11-13. 1998.
- CHINO, O.; MAKUUCHI, H.; SHIMADA, H.; MACHIMURA, T. MITOMI, T. & OSAMURA, R.Y. Assessment of the proliferative activity of superficial esophageal carcinoma using MIB-1 immunostaining for the Ki-67 antigen. *J. Surg. Oncol.* v67:18-24. 1998.
- CLAYTON, F. Pathologic correlates of survival in 378 lymph node-negative infiltrating ductal breast carcinomas. *Cancer*, v.68:1309-1317. 1991.
- COLTRERA, M.D.; SKELLY, M. & GOWN, A.M. Anti-PCNA antibody PC10 yields unreliable proliferation indexes in routinely processed, deparaffinized, formalin-fixed tissue. *Appl. Immunohistochem.*, v. 1:193-200. 1993.
- COTRAN, R. S. ; ROBBINS, S.L. & KUMAR, V. Robbins pathologic basis of disease. 5<sup>th</sup> ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia. p. 1400. 1994.

- CRADDOCK, V.M. Aetiology of oesophageal cancer: some operative factors. **European J. Cancer Prevention**, v. 1:89-104. 1992.
- DIEBOLD, J.; LAI, M.D. & LORHS, U. Analysis of proliferative activity in colorectal mucosa by immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA): Methodological aspects and application to routine diagnose material. **Virchows Arch. (Cell Pathol)**, v.62:283-289. 1992.
- DIONISIO, P.; STRAMIGNONI, E.; PASSARINO, G.; PUCCI, A.; VALENTI, V.; BERTO, I.M.; BARBOS, M.P.; CADARIO, A.; GASPARI, G. & BAJARDI, P. Recurrent secondary hyperparathyroidism due to parathyroid carcinoma: usefulness of Ki-67 immunostaining in the diagnosis of malignant parathyroid tumor. **Nephron**, v.74:720-723. 1996.
- FONATSCH, C. DUTCHROW, M. RIEDER, H. SCHLUTER, C. & GERDES, J. Assignment of the human Ki-67 genes (MK167) to 10q25-qter. **Genomics**, v. 11:476-477. 1991.
- FRIERSON, Jr., H.F. Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in infiltrating ductal carcinomas: Comparison with clinical and pathologic variables. **Mod. Pathol.**, v.6:290-294. 1993.
- GASPARINI, G.; MELI, S.; POZZA, F.; CAZZAVILLAN, S. & BEVILACQUA, P. PC-10 antibody to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is not related to prognosis in human breast carcinoma. **Growth Regulation**, v. 2:145-150. 1992.
- GERDES, J.; BECKER, M.H.H.; KEY, G.; CATTORETTI, G. Immunohistological detection of tumor growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. **J. Pathol.**, v. 168:85-86. 1992.
- GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H.; WACHER, H.H.; SCHWAB, U. & STEIN, H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **J. Immunol.**, v.133:1710-1715. 1984.
- GERDES, J.; LI, L.; SCHLUETER, C.; DUCHROW, M.; WOHLLENBERG, C.; GERLACH, C.; STAHRMER, I.; KLOTH, S.; BRANDT, E. & FLAD, H. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **Am. J. Pathol.**, v.138:867-873. 1991.
- GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMBKE, H.; STEIN, H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int. J. Cancer**, v.31:13-20. 1983.
- GHADIRAIAN, P.; STEIN, G.F.; GORODETSKY, C. Oesophageal cancer studies in the Caspian litoral of Iran. Some residual results including opium use as a risk factor. **Int. J. Cancer**, v. 35:454-467. 1990.



- GILCHRIST, K.W. Routine histoprognotic factors in early-stage breast carcinoma: A review. **Cancer Invest.**, v. 10:565-573. 1992.
- HALL, P.A. & LEVINSON, D.A. Review: Assessment of cell proliferation in histological material. **J. Clin. Pathol.**, v.43:184-192. 1990.
- HELLQUIST, H.B.; SUNDELIN, K.; DI BACCO, A.; TYTOR, M.; MANZOTTI, M. & VIALE, G. Tumour growth fraction and apoptosis in salivary gland acinic cell carcinomas. Prognostic implications of Ki-67 and *bcl-2* expression and of *in situ* end labelling (TUNEL). **J. Pathology**, v.181:323-329. 1997
- HIRANO, T.; ZITSCH III, R.P. & GLUCKMAN, J.L. Cell kinetics study of upper aerodigestive tract squamous cell carcinoma using bromodeoxyuridine. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.**, v.102:42-46. 1993.
- ISOLA, J.; HELIN, H.; KALLIONIEMI, O.P. Immunoelectron-microscopic localization of a proliferation associated antigen Ki-67 in MCF-7 cells. **Histochem. J.**, v.22:498-506. 1990.
- ITOH, T.; YAMAMOTO, Y.; SAKA, T.; INOUE, I. & TAKAHASHI, H. Estimation of proliferative activity of experimental tongue carcinoma in rats. **Acta Otolaryngol (Stockh)**, v.113:568-574. 1993.
- JOCHUM, W.; SCHRÓDER, S.; AL-TAHA, R.; AUGUST, C.; GROSS, A.J.; BERGER, J. & PADBERG, B.C. Prognostic significance of nuclear DNA content and proliferative activity in renal cell carcinomas. **Cancer**, v.77:514-521. 1996.
- KESHEGEGIAN, A.A. & CNAAN, A. Proliferation markers in breast carcinoma: Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.104:42-49. 1995.
- KEY, G.; BECKER, M.H.G.; BARON, B.; DUCHROW, M.; SCHLUTER, C.; FLAD, H.D. New Ki-67 equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 bp repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. **Lab Invest.**, v. 68:629-636. 1993.
- LA VECCHIA, C. & NEGRI, E. The role of alcohol in oesophageal cancer in non-smokers, and of tobacco in non-drinkers. **Int. J. Cancer**, v. 43:784-785. 1989.
- LAM, K-Y.; LAW, S.Y-K.; SO, M. K-P.; FOK, M.; MA, L.T. & WONG, J. Prognostic implication of proliferative markers MIB-1 and PC10 in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer**, v.77:7-13. 1996.
- LANGFORD, L.A.; COOKSLEY, C.S. & DeMONTE, F. Comparison of MIB-1 (Ki-67) antigen and bromodeoxyuridine proliferation indices in meningiomas. **Hum. Pathol.**, v.27:350-354.1996.

- LEONARDI, E.; GIRLANDO, S.; SERIO, G. PCNA and Ki-67 expression in breast carcinoma: Correlation with clinical and biological variables. **J. Clin. Pathol.**, v. 45:416-419. 1992.
- LEONG, A.S.Y.; MILIOS, J. & TANG, S.K. Is immunolocalization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in paraffin sections a valid index of cell proliferation? **Appl. Immunohistochem.**, v. 1:127-135. 1993.
- LINDEN, M.D.; TORRES, F.X.; KUBUS, J. & ZARBO, R.J. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.97:S4-S13. 1992
- LLOYD, R.V.; JIN, L.; QIAN, X. & KULIG, E. Aberrant p27<sup>kip1</sup> expression in endocrine and other tumors. **Am. J. Pathol.**, v.150:401-407. 1997.
- LOPEZ, F.; BELLOC, F.; LACOMBE, F.; DUMAIN, P.; REIFFERS, J.; BERNARD, P. & BOISSEAU, M.R. The labelling of proliferating cells by Ki-67 and MIB-1 antibodies depends on the binding of a nuclear protein to the DNA. **Exp. Cell Res.**, v.210:145-153. 1994
- MACFARLANE, G. J. & BOYLE, P. The epidemiology of oesophageal cancer in the UK and other European countries. **J. Royal Soc. Med.**, v.87:334-337. 1994.
- MARASAA W.F.O.; WEHNER, F.C.; Van RESENBURG, S.J. Mycoflora of corn produced in human esophageal areas in Transkei, South Africa. **Phytopathology**, v. 71:792-796. 1981.
- MARQUES PEREIRA, J.P.E. Ciclo proliferativo e ritmo circadiano das células em síntese do ácido desoxirribonucleico (ADN) no epitélio esofágico do rato. Porto Alegre, 1976. 106p. Tese (Livre Docência) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- MUÑOZ, N. Epidemiological aspects of oesophageal cancer. **Endoscopy**, v.25(Suppl.):609-612. 1993.
- NAGAO, T.; KONDO, F.; SATO, T.; NAGATO, Y. & KONDO, Y. Immunohistochemical detection of aberrant p53 expression in hepatocellular carcinoma. **Human Pathology**, v. 26:326-333. 1995.
- POTTEN, C.S.; KELLETT, M.; REW, D.A. & ROBERTS, S.A. Proliferation in human gastrointestinal epithelium using bromodeoxyuridine in vivo: data for different sites, proximity to a tumor, and polyposis coli. **Gut**, v.33:524-529. 1992.
- POWELL, J. & McCONKEY, C.C. Increasing incidence of adenocarcinoma of the gastric cardia and adjacent sites. **Br. J. Cancer**, v.62:440-443. 1990.
- POWELL, J. & McCONKEY, C.C. The rising trend in oesophageal adenocarcinoma and gastric cardia. **European J. Cancer Prevention**, v.1:265-269. 1992.

- REED, P.I. & JOHNSTON, B.J. The changing incidence of oesophageal cancer. *Endoscopy*, v.25 (suppl.):606-608. 1993.
- REICHERT, T.E.; WATKINS, S.; STANSON, J.; JOHNSON, J.T. & WHITESIDE, T.L. Endogenous IL-2 in cancer cells: a marker of cellular proliferation. *J. Histochem. Cytochem.* v.46:603-611. 1996.
- ROSS, J.S. DNA ploidy and cell cycle analysis in pathology. New York, USA, Igaku-Shoin Medical Publishers, 1996. Cap 1, pág. 1-25: Background, Basic principles and Techniques.
- SASAKI, K.; MATSUMURA, K.; TSUJI, T.; SHINOZAKI, F. & TAKAHASHI, M. Relationship between labeling indices of Ki-67 and BrdUrd in human malignant tumors. *Cancer*, v. 62:989-993. 1988.
- SCHIMMELPENNING, H.; ERIKSSON, E.T.; FRANZEN, B.; ZETTERBERG, A. & AUER, G.U. Prognostic value of the combined assessment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining and nuclear DNA content in invasive human mammary carcinomas. *Virchows Arch (A)*, v.423:273-279. 1993.
- SKALOVA, A.; LEHTONEN, H.; BOGUSLAWSKY, K. V. & LEIVO, I. Prognostic significance of cell proliferation in mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland: clinicopathological study using MIB 1 antibody in paraffin sections. *Human Pathol.* v.25: 929-935. 1994.
- SPECKLER, S.J. & GOYAL, R.K. Barrett's esophagus. *N. Engl. J. Med.*, v.315:362-371. 1986.
- TAHAN, S.R.; NEUBERG, D.S.; DIEFFENBACH, A. & YACOUB, L. Prediction of early relapse and shortened survival in patients with breast cancer by proliferating cell nuclear antigen score. *Cancer*, v. 71:3552-3559. 1993.
- THOMAS, M.; NOGUCHI, M.; KITAGAWA, H.; KINOSHITA, K. & MIYAZAKI, I. Poor prognosis value of proliferating cell nuclear antigen labeling index in breast carcinoma. *J. Clin Pathol.*, v.46:525-528. 1993.
- TUYNS, A.J. Oesophageal cancer in non-smoking drinkers and in non-drinkers smokers. *Int. J. Cancer*, v. 43:443-444. 1983.
- VERHEIJEN, R.; KUIJPERS, H.J.H.; SCHLINGEMANN, R. ; BOEHMER, A.L.M.; Van DRIEL, R.; BRAKENHOFF, G. H. & RAMAEKERS, F.C.S. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen: 1. Intracellular localization during interphase. *J. Cell Sci.*, v. 92:123-130. 1989.
- VISSCHER, D.W.; WYKES, S.; KUBUS, J. & CRISSMAN, J.D. Comparison of PCNA/cyclin immunohistochemistry with flow cytometric S-phase fraction in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, v.22:111-118. 1992.

WELKOBORSKY, H.J.; DIENES, H.P.; HINNI, M. & MANN, W.J. Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading, and proliferation markers. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.**, v.104:503-510. 1995.

WOLF, H.K. & DITTRICH, K.L. Detection of proliferating cell nuclear antigen in diagnostic histopathology. **J. Histochem. Cytochem.**, v.40:1269-1273. 1992.

WOOSLEY, J.T. Measuring cell proliferation. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.115:555-557. 1991.

YANG, W-I.; EFIRD, J.T.; QUNTANILLA-MARTINEZ, L.; CHOI, N. & HARRIS, N.L. Cell kinetic study of thymic epithelial tumors using PCNA (PC10) and Ki-67 (MIB-1) antibodies. **Hum. Pathol.**, v. 27:70-76. 1996.

YOUSSEFF, E.M.; MATSUDA, T.; TAKADA, N.; OSUGI, H.; HIGASHINO, M.; KINOSHITA, H.; WATANABE, T.; KATSURA, Y.; WANIBUCHI, H. & FUKUSHIMA, S. Prognostic significance of the MIB-1 proliferation index for patients with Squamous Cell carcinoma of the esophagus. **Cancer**, v.76:358-366. 1995.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 3<sup>rd</sup>. Ed., Ed. Prentice Hall, 1996. Cap. 11 e 12.

**Normas adotadas:**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. **Estrutura e apresentação de dissertações e teses.** São Paulo, 1991.

GOLDENBERG, S. Orientação normativa para elaboração de tese. **Acta Cir. Bras.**, 8(supl. 1):1-24, 1993.

## Resumo

O carcinoma epidermóide de esôfago é uma neoplasia freqüente que tem altas taxas de mortalidade, sendo que o curso clínico de pacientes com câncer é influenciado pela cinética das células dos tumores. Recentemente cresceu o interesse na determinação imunoistoquímica de antígenos associados à proliferação celular. Entre essas substâncias encontram-se os anticorpos monoclonais que identificam a proteína Ki-67, a qual pode ser detectada em todas as fases do ciclo celular, exceto  $G_0$ . A quantificação da Ki-67 pelo MIB-1 e 7B11, em cortes parafinados, permite estabelecer o índice de marcação, ou seja, o percentual de células que estão proliferando, que já foi relacionado com o prognóstico de pacientes em diversos outros tipos de neoplasias. Este trabalho visou determinar o índice de marcação, com os dois anticorpos citados, em esôfagos ressecados por carcinoma epidermóide, tanto na área de tumor, como em áreas de epitélio não neoplásico distantes 5,0 e 10,0cm da borda cranial do mesmo, comparando-se os índices intra-grupo e entre os marcadores diferentes. Uma vez que os resultados mostraram uma distribuição não normal, foi feita a análise estatística usando-se os testes não-paramétricos de Friedman e Mann-Whitney. Ambos os anticorpos apresentaram valores de p menores que 0,001 quando se compararam as amostras de tumor 5,0cm e 10,0cm em cada esôfago (teste de Friedman). Os valores de p para cada sítio estudado, comparando-se os dois marcadores, foi de 0,5902 nas amostras de tumor, 0,0315 a 5,0 cm e 0,4098 a 10,0cm.

## Summary

The squamous esophageal cancer is a prevalent clinical condition in our state. Usually it is associated with high morbidity and mortality. Among the efforts done in order to change this scenario, the improvement on the knowledge of its molecular biology is of utmost importance. We intended to study how MIB-1 and 7B11 (monoclonal antibodies for Ki-67) are expressed on these tumors. The Ki-67 is a protein found in all cell cycles but G0. In consequence it is used as a marker for cell proliferation. The analyses of the labeling indexes for MIB-1 and 7B11 were performed using surgical specimens of esophagectomy for squamous cancer of the esophagus. Samples were taken from tumor and from normal esophageal tissue 5cm and 10cm away from the gross border between tumor and the esophagus. The comparisons of labeling indexes of proliferation were performed among the different sites (tumor, 5cm and 10cm) for each antibody and between same sites for distinct antibodies. Since the data had non normal distribution the statistical analyses were done using non parametric tests of its frequencies ( Friedman and Mann-Whitney tests). For both antibodies we found p values lesser than 0,0001 when considering comparisons done among samples from tumor, 5cm and 10cm for each of them (Friedman test). The calculated p values for each site between the antibodies were 0,5902 (tumor), 0,0315(5cm) and 0,4098 (10cm).

## ANEXO A

PROTÓCOLO - CANCER DE ESÓFAGO

DATA INTERNAÇÃO: / / DATA DE ALTA: / /

IDENTIFICAÇÃO: NOME: REGISTRO:

idade: cor: sexo: natural: profissão:

endereço: cidade: fone:

Fatores de risco: ( ) álcool tipo: quantid.: tempo:

( ) fumo tipo: quantid.: tempo:

( ) chimarrão ( ) café ( ) chá

Sintomas: 0 ( ) sem disfagia ( ) disfagia-início:

1 ( ) sólidos ( ) odinofagia-início:

2 ( ) pastosos ( ) emagrecimento-Kg/tempo:

3 ( ) líquidos ( ) outros:

4 ( ) total

Exame físico: altura: peso: estado geral: prega cutânea:

massas palpáveis: toque retal:

EXAMES COMPLEMENTARES: proteínas totais: albumina: FA: CEA:

Ht: Hb: Leucócitos: Linfócitos: Transferrina: TGO: TGP:

GASOMETRIA ARTERIAL: pH: paO2: paCO2: BE: SatO2: HCO3: CO2:

ESPIROMETRIA: VEF1: CV:

BRONCOSCOPIA:

EDA: tipo: altura: Anatomo-pat.:

RX TORAX:

REED: local: extensão: outros:

ECOGRAFIA:

TOMOGRAFIA:

Estadiamento: (TMN) T: M: A: Estádio: I( ) II( ) III( ) IV( )

Preparo pré-operatório: \*NPT ( ) tempo: \*QxT ( ) droga: tempo:

\*Enteral ( ) tempo: \*RxT ( ) rads: tempo:

Cirurgia: data: / / procedimento: ( ) anterior ( ) posterior

( ) piloroplastia ( ) jejunostomia ( ) dreno tórax- ( ) dir ( ) esq tempo:

Pós-operatório: UTI (tempo): SNG (tempo): início VO: alta após \_\_\_\_ dias

drenos (tempo): ventilação (tempo): complicações:

Estadiamento PO: T: M: N: Estádio: I( ) II( ) III( ) IV( )

Exames PO: gasometria: pH: paO2: paCO2: BE: SatO2: CO2:

Seguimento: 30º PO: ( ) disfagia ( ) outros: \_\_\_\_\_

60º PO: ( ) espirometria: VEF1: CV:





08-0192 6 ml  
 Mouse Anti-Human  
 Ki-67 antigen  
 Lot No 70536578

ZYMED LABORATORIES, INC.  
 458 Carlton Court  
 So. San Francisco, CA 94080  
 Phone (800) 874-4494  
 FAX (415) 871-4499

### MONOCLONAL MOUSE ANTI--HUMAN Ki-67 ANTIGEN

#### FORM:

Liquid. Ready-to-use (DO NOT DILUTE). This antibody, stored in PBS containing BSA and 0.05% sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ), consists of purified immunoglobulin fractions derived from ascites.

#### SPECIFICITY:

This antibody was created by using a synthetic peptide representing one antigenic site of Ki-67 cDNA sequence as an immunogen. It reacts with Ki-67 nuclear antigen expressed on all human proliferating cells. It recognizes all stages of the cell cycle, including late G1, S, M, and G2 phases, but not in G0 phase.

CLONE: 7B11

ISOTYPE: IgG1

#### APPLICATION:

This antibody can be used to identify the proliferative grade of cell growth. It has been tested as a marker to define growth fraction in benign and malignant tissues, such as prostate, breast, and lymph tissues. Therefore, it may play a role as a prognostic factor of malignant tumors.

#### RECOMMENDED GUIDELINES FOR USE:

This antibody is suitable for immunohistochemical staining of formalin-fixed paraffin embedded or frozen tissue sections. For formalin-fixed paraffin embedded tissue sections, trypsin digestion (ZyMed cat No. 00-3003 or 00-3008) followed by Protocol for Heat Induced Antigen Recovery is required for specific staining. (ZyMed supplies instructions for the Heat induced Antigen Recovery). To stain, incubate overnight at 4°C.

ZyMed's prediluted antibodies were standardized using ZyMed's Histostain-SP (AEC) or Histostain-SAP (AP-Red) Kit. If DAB is used as a chromogen for immunoperoxidase staining, a further dilution of the primary antibody may be required. Other detection systems can be used, but in some cases the incubation time may vary.

#### STORAGE:

Store at 2-8°C

#### REFERENCES:

1. Gerdes J., et al: Int. J. Cancer 31:13, 1983
2. Gerdes J., et al: J. Immunol 133:1710, 1984
3. Key G, et al: Lab Invest 68: 629, 1993
4. Munakata S., Hendricks J.B.: J. Histochem Cytochem 41:1241, 1993
5. Railo M, et al: Br J Cancer 68:579, 1993

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

## Antigen Recovery

A Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) procedure

Antigen Recovery was developed at ZyMed Laboratories. It is used to reverse the loss of antigenicity that occurs with some epitopes in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. We have found that some antibodies require Antigen Recovery (e.g., estrogen receptor, and Ki-67 antibodies), while the staining of many other antibodies will be enhanced by Antigen Recovery (e.g., S-100, cytokeratin, and synaptophysin antibodies). No licensing fee is required for using Antigen Recovery. Please call us if you have any questions.

### A. Materials

- Hot plate
- 1 liter glass beaker
- 0.01 M citrate buffer, pH 6.0 (ZyMed cat. no. 00-5000)
- PBS

### B. Protocol

Deparaffinize slides.

Optional: To eliminate endogenous peroxidase activity, treat tissue sections with 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in absolute methanol for 10 minutes.

1. Wash slides with distilled water 3 times for 2 minutes each.
2. Put the slides in a slide rack and place it in a 1 liter glass beaker (Pyrex) containing 500 ml of 0.01 M citrate buffer.
3. Place beaker on hot plate. Heat the solution until it boils and keep it boiling for 10 minutes.
4. After heating, remove beaker from the hot plate and allow it to cool down for at least 10-20 minutes at room temperature.
5. Rinse slides with PBS and start the immunostaining protocol.

#### \*Note:

Tissues should be mounted on silane or poly-L-Lysine coated slides, or slides coated with HistoGrip™ (ZyMed cat. no. 00-8050).

**ZYMED LABORATORIES INC.**  
 458 Carlton Court • South San Francisco • CA 94080  
 Customer Service: 1-800-874-4494 / FAX: 415-871-4499