

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Cirurgia**

**Avaliação da Expressão da Proteína p53 e do VEGF  
(Fator de Crescimento do Endotélio Vascular) em  
Pacientes com Adenocarcinoma do Esôfago**

**Aluno: Leandro Totti Cavazzola**

**Orientador: Prof. Dr Cleber Dario Pinto Kruel**

**Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss**

**Tese de Doutorado**

**2003**

C377d **Cavazzola, Leandro Totti**

Avaliação da expressão da proteína p53 e do VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular) em pacientes com adenocarcinoma de esôfago / Leandro Totti Cavazzola; orient. Cleber Dario Pinto KrueI; co-orient. Maria Isabel Albano Edelweiss. Porto Alegre: UFRGS, 2003.

144f.: il. táb.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Cirurgia.

1. NEOPLASIAS ESOFÁGICAS.. 2. ADENOCARCINOMA. 3. ESÔFAGO. 4. PROGNÓSTICO. 5. MARCADORES BIOLÓGICOS DE TUMOR . 6. FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR. 7. PROTEÍNA P53. 8. SOBREVIVÊNCIA. 9. SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA. 10. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR. 11. BIOLOGIA MOLECULAR. 12. ESTUDOS DE COORTES. I. KrueI, Cleber Dario Pinto. !!. Edelweiss, Maria Isabel Albano. III. Título.

C.D.D. 616.9943

C.D.U. 616.329-006.6:577.2 (043.3)

NLM W1270

Rosária Maria Lúcia Prena Geremia/Bibliotecária  
CRB10/196

*À minha família, alicerce fundamental  
para meu desenvolvimento  
pessoal e profissional.*

*Para minha querida Fernanda, por sua  
paciência, compreensão e sua alegria,  
sempre contagiante e incentivadora.*

*Ao Prof. Dr. Luiz Rohde,  
pela incansável disposição em ensinar  
e pelo modelo de pessoa e profissional  
que serve de exemplo a todos que tem  
o privilégio de desfrutar de seu convívio.*

*“If knowledge can create problems, it is not through ignorance that we can solve them”*

*Isaac Asimov*

*“To repeat what others have said, requires education; to challenge it, requires brains”*

*Mary Pettibone Poole*

*“In science the credit goes to the man who convinces the world,  
not to the man to whom the idea first occurs”*

*Sir Francis Darwin*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Cleber Dario Pinto Krueel, pela agradável convivência e orientação nestes 10 anos de realizações conjuntas.

À Professora Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss, pelo exemplo de competência e pela inestimável figura humana que representa.

Ao Professor Dr. Sérgio Gabriel Silva de Barros pelo constante estímulo científico e pessoal.

À colega Dra. Luíse Meurer, pela contribuição fundamental na análise dos dados e pelo incentivo.

Aos amigos e colegas Doutores Carlos Cauduro Schirmer, Richard Ricachenevsky Gurski, André Rosa pelo constante questionamento e apoio fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao amigo e colega Dr. Alessandro Bersch Osvaldt por sua incessante busca da perfeição e qualidade científica e pessoal.

Ao amigo e colega Dr. Fernando Rogério Beylouni Farias pela amizade e inigualável capacidade de relacionamento.

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 Dr. Mário Bernardes Wagner, pela ajuda na análise estatística.

À Sra Rosária Maria Lúcia Prena Geremia pela colaboração na elaboração da ficha catalográfica.

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

Ao Serviço de Patologia do HCPA, 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, aos técnicos Jorge Alberto Lopes e Flávia Giusti e à funcionária Zeli Fogaça Pacheco pela ajuda na separação das lâmina e blocos do acervo.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA), pelo apoio em todas as etapas do estudo e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (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.

À Universidade Luterana do Brasil, casa que me acolheu e promoveu meu crescimento nos últimos 5 anos, em especial na pessoa do Prof. Dr. Luciano Bastos Moreira.

| <b>Sumário</b>  | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| Ficha Catalográfica   | II            |
| Agradecimentos  | VI-VII        |
| Sumário   | VIII-X        |
| Resumo  | XI            |
| Abstract  | XII           |
| Lista de Figuras  | XIII          |
| Lista de Tabelas  | XIV           |
| Lista de Abreviaturas   | XV-XVI        |
| 1. Introdução   | 1-3           |
| 2. Revisão da Literatura  | 4-9           |
| 2.1 O gene TP53 como fator prognóstico em adenocarcinoma de esôfago   | 4-6           |
| 2.2 VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular) e prognóstico em pacientes com adenocarcinoma de esôfago. | 7-8           |
| 2.3 O papel do gene TP53 no controle da angiogênese   | 9             |
| 3. Objetivos  | 10            |
| 4. Pacientes e Métodos  | 11-21         |
| 4.1 População e amostra   | 11-14         |
| 4.2 Critérios de inclusão   | 15            |
| 4.3 Critérios de exclusão   | 15            |
| 4.4. Delineamento   | 15            |
| 4.5. Variáveis  | 15-16         |
| 4.5.1 Variáveis demográficas  | 15-16         |



|  |        |
|--|--------|
| 4.5.2 Variáveis histopatológicas   | 16     |
| 4.5.3 Variáveis em estudo – Imuno-histoquímica                               | 16     |
| 4.5.4 Desfecho   | 16     |
| 4.6 Análise anátomo-patológica e preparação tecidual                         | 16-17  |
| 4.7 Anticorpos e reagentes   | 17     |
| 4.8 Técnica de imuno-histoquímica  | 18-19  |
| 4.9 Determinação imuno-histoquímica das expressões da proteína p53 e do VEGF | 19     |
| 4.10 Avaliação da co-expressão da proteína p53 e do VEGF                     | 20     |
| 4.11 Ética   | 20     |
| 4.12 Análise estatística   | 21     |
| 5. Resultados  | 22-32  |
| 6. Discussão   | 33-41  |
| 7. Conclusões  | 42     |
| 8. Perspectivas  | 43-44  |
| 9. Referências Bibliográficas  | 45-62  |
| 10. Anexos   | 63-143 |
| 10.1 Artigo Científico em Língua Portuguesa                                  | 63-103 |
| - Resumo   | 64     |
| - Abstract   | 65     |
| - Introdução   | 66-68  |
| - Pacientes e Método   | 69-73  |
| - Resultados   | 74-80  |
| - Discussão  | 81-89  |
| - Referências Bibliográficas   | 90-103 |

|  |         |
|--|---------|
| 10.2 Artigo Científico em Língua Inglesa | 104-143 |
| - Abstract                               | 105     |
| - Introduction                           | 106-108 |
| - Materials and Methods                  | 109-113 |
| - Results                                | 114-120 |
| - Discussion                             | 121-129 |
| - References                             | 130-143 |

## **Resumo**

O prognóstico dos pacientes com adenocarcinoma de esôfago é bastante prejudicado pelo seu diagnóstico tardio. Na tentativa de determinar fatores que possam alterar o prognóstico destes pacientes, o estudo da biologia molecular tem recebido grande importância. As mutações no gene de supressão tumoral TP53 estão entre as anormalidades genéticas mais comuns encontradas numa ampla variedade de tumores. 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 desta angiogênese tumoral. A associação entre as expressões da proteína p53 e do VEGF e o prognóstico tem sido pouco estudada. Foram estudados 46 pacientes com adenocarcinoma de esôfago submetidos à cirurgia de ressecção com intenção curativa. As expressões da proteína p53 e do VEGF foram observadas por análise imuno-histoquímica em 52,2% e 47,8% dos tumores, respectivamente. As expressões da proteína p53 e do VEGF coincidiram em 26% dos casos, e não foi encontrada correlação entre essa expressão. Nenhum dos fatores clinicopatológicos se correlacionaram significativamente com as expressões da proteína p53 ou do VEGF. Não houve associação significativa entre as expressões da proteína p53 e do VEGF e sobrevida a longo prazo. No presente estudo, a expressão da proteína p53 e do VEGF, embora em porcentagem similar à da literatura, não se correlacionou com o prognóstico em pacientes com adenocarcinoma de esôfago submetidos à cirurgia com intenção curativa.

Palavras-chave: esôfago, adenocarcinoma, prognóstico, marcadores tumorais, p53, VEGF, sobrevida.

## **Abstract**

### **Evaluation of p53 protein and VEGF (Vacular Endothelial Growth Factor) expression in patients with esophageal adenocarcinoma**

The prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma is negatively influenced by late diagnosis. In an attempt to determine the factors that might improve the prognosis of these patients, molecular biology has been of great importance. P53 tumor suppressor gene mutations are one of the most frequent genetic disorders found in a wide variety of tumors. Angiogenesis is essential for the growth and metastatic spread of solid tumors. The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), a recently identified factor with remarkable angiogenic properties, may play a central regulatory role in tumor angiogenesis. The association between p53 protein and VEGF expressions and prognosis has been underinvestigated. Forty-six patients with esophageal adenocarcinoma, submitted to curative resection, were studied. The expressions of p53 protein and VEGF were assessed by immunohistochemistry in 52.2% and 47.8% of tumors, respectively. P53 protein and VEGF expressions coincided in 26% of the cases, and no correlation between these expressions was observed. None of the clinicopathological factors showed a significant correlation with p53 protein or VEGF expressions. There was no significant association between p53 protein and VEGF expressions and long-term survival. In the present study, the expression of p53 protein and VEGF, albeit similar to the one reported in the literature, did not correlate with prognosis in esophageal adenocarcinoma patients submitted to curative resection.

**Key words:** esophagus, adenocarcinoma, prognosis, tumor markers, p53, VEGF, survival.

| <b>Lista de Figuras</b>  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| Figura 1 - Fotomicrografia da imuno-histoquímica da expressão da proteína p53: (1A) Negativa e (1B) Positiva | 24            |
| Figura 2 - Fotomicrografia da imuno-histoquímica da expressão do VEGF: (1A) Negativa e (1B) Positiva         | 25            |
| Figura 3 - Sobrevida global dos pacientes com adenocarcinoma de esôfago                                      | 27            |
| Figura 4 - Curva de sobrevida de acordo com a expressão da proteína p53                                      | 28            |
| Figura 5 - Curva de sobrevida de acordo com a expressão do VEGF  | 29            |
| Figura 6 - Curva de sobrevida de acordo com a co-expressão da proteína p53 e do VEGF                         | 31            |

| <b>Lista de Tabelas</b>   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| Tabela 1 - Expressão da proteína p53 e sobrevida em diferentes estudos  | 6             |
| Tabela 2 - Expressão do VEGF e sobrevida em diferentes estudos  | 8             |
| Tabela 3 - Sistema de Estadiamento da UICC – TNM  | 13            |
| Tabela 4 - Câncer de esôfago por estágio histopatológico  | 14            |
| Tabela 5 - Correlação entre a positividade para imuno-histoquímica da proteína p53 e do VEGF e variáveis clinicopatológicas | 26            |
| Tabela 6 - Taxas de sobrevida e expressão do p53  | 29            |
| Tabela 7 - Taxas de sobrevida e expressão do VEGF   | 30            |
| Tabela 8 - Análise multivariada dos fatores em estudo   | 32            |

## Lista de Abreviaturas

|         |  |
|---------|--|
| Adenoca | Adenocarcinoma   |
| CA      | California   |
| CEE     | Carcinoma Epidermóide de Esôfago   |
| DAB     | Diaminobenzidina Tetraidroclorido  |
| DNA     | Desoxiribonucleic acid / Ácido desoxiribonucléico                            |
| DP      | Desvio-Padrão  |
| DRGE    | Doença do Refluxo Gastroesofágico  |
| EP      | Erro-Padrão  |
| FGFa    | Fibroblastic Growth Factor/Fator de Crescimento Fibroblástico a              |
| FGFb    | Fibroblastic Growth Factor/Fator de Crescimento Fibroblástico b              |
| GCEEID  | Grupo de Cirurgia de Esôfago, Estômago e Intestino Delgado                   |
| GPPG    | Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação  |
| HCPA    | Hospital de Clínicas de Porto Alegre   |
| JEG     | Junção Esofagogástrica   |
| LSAB    | Estreptavidina-biotina Peroxidase  |
| MI      | Metaplasia Intestinal  |
| MO      | Misouri  |
| p16     | proteína p16   |
| p53     | proteína p53   |
| p53+    | Pacientes com expressão imuno-histoquímica da proteína p53 (“p53 positivos”) |
| p53-    | Pacientes sem expressão imuno-histoquímica da proteína p53 (“p53 negativos”) |
| PBS     | Solução de tampão fosfato  |
| PCR     | Polimerase Chain Reaction/Reação em Cadeia da Polimerase                     |

|                   |  |
|-------------------|--|
| pRB               | Gene retinoblastoma  |
| REED              | Radiograma Contrastado de Esôfago, Estômago e Duodeno  |
| RNA <sub>m</sub>  | messenger Ribonucleic Acid / Ácido ribonucléico mensageiro   |
| SPSS              | Statistical Package for Social Sciences – Software para análise estatística  |
| TNM               | Classificação Histopatológica dos Tumores Malignos, que leva em conta o tamanho da lesão (T), o envolvimento ganglionar (N) e a presença de metástases (M) |
| TP53              | Gene p53   |
| UICC              | União Internacional Contra o Câncer  |
| USA               | United States of America (Estados Unidos da América)   |
| VEGF              | Vascular Endothelial Growth Factor / Fator de Crescimento do Endotélio Vascular  |
| VEGF <sup>+</sup> | Pacientes com expressão imuno-histoquímica do VEGF (“VEGF positivos”)  |
| VEGF <sup>-</sup> | Pacientes sem expressão imuno-histoquímica da VEGF (“VEGF negativos”)  |



## 1. Introdução

O câncer de esôfago é uma das neoplasias malignas mais devastadoras do trato gastrointestinal. O diagnóstico tardio, associado ao comportamento biológico agressivo, implica em prognóstico sombrio para os portadores desta doença (1).

Esta neoplasia se caracteriza por apresentar grande variabilidade em sua incidência, inclusive dentro de uma mesma microrregião, o que demonstra a ocorrência de fatores ambientais de forma decisiva em sua gênese (2-6). No Brasil, ocupa a quarta causa de morte entre todos os tumores (7). O Rio Grande do Sul apresenta o quinto lugar no mundo em mortalidade por esta doença, sendo considerado área endêmica para este tumor (8, 9). Representou em nosso estado a terceira causa de morte por câncer entre homens em 2002, com coeficiente de mortalidade de 12,9 óbitos/100.000 habitantes/ano, superado apenas pelos cânceres de pulmão e de próstata (10).

Os tumores mais comuns do esôfago são os de origem epitelial. Destes, a maior parte é representada em nosso meio pelo tipo epidermóide (3, 11-13). No entanto, existe atualmente uma tendência mundial no avanço do tipo adenocarcinoma, especialmente nas populações com melhor condição sócio-econômica (14-16). O adenocarcinoma é atualmente diagnosticado em 1-35% dos tumores primários de esôfago, na dependência da região estudada. Nos Estados Unidos representa cerca de 50% dos tumores primários de esôfago vistos atualmente (17-19). Esta ampla variação na incidência do adenocarcinoma também se faz dentro de diferentes microrregiões dentro de uma mesma área geográfica, à semelhança do que é preconizado para o carcinoma epidermóide de esôfago (18).

A apresentação clínica na maior parte das vezes é indolente. Os pacientes são referendados em quase sua totalidade com disfagia e perda de peso. Estes sintomas normalmente são tardios no processo da doença (2, 13, 15). Quando chegam a apresentar tais

sintomas, serão submetidos a procedimentos com intenção curativa em no máximo 50% das vezes, considerando-se que este tipo de cirurgia é realizado em serviços de referência com especial interesse nesta neoplasia (3, 20).

A escolha da abordagem terapêutica é determinada fundamentalmente com base no estadiamento clínico da doença, ponto a partir do qual são baseadas todas as tomadas de decisão (3, 21).

A possibilidade de se definir outros parâmetros que auxiliem a prever a agressividade biológica e o comportamento destes tumores se faz imperativa, na tentativa de definir quais os pacientes devem ser considerados para abordagem cirúrgica com intenção curativa, acompanhada ou não de tratamentos complementares (como quimio e radioterapia), e os pacientes que não apresentarão benefício em uma abordagem agressiva tendo em vista a ausência de resposta a tratamentos neoadjuvantes ou complementares (22, 23).

Na tentativa de definir estes parâmetros, podem ser utilizados diferentes métodos, entre eles corantes para detecção de áreas com alterações celulares malignas ou pré-malignas (24) ou a análise tecidual com uso de técnicas de biologia molecular. A vantagem resultante desta abordagem é a de determinar pacientes que possam se beneficiar de terapêuticas associadas, resultando em melhora do prognóstico, ou evitar que grupos de pacientes que não respondem a abordagens multimodais sejam submetidos a morbimortalidade inerente a estes procedimentos, abrindo assim espaço para a pesquisa de tratamentos alternativos ou considerando-os candidatos para tratamentos apenas com caráter paliativo.

O estudo da biologia molecular tem demonstrado que grande parte dos tumores malignos resulta da interação entre o componente hereditário e influências externas, que em indivíduos predispostos podem ocasionar alterações genéticas que influenciem o controle da diferenciação e crescimento celular. A ação de proto-oncogenes (genes que normalmente são responsáveis pelos processos de divisão normais da célula), que podem ser erroneamente

ativados por fatores externos, gerando oncogenes e resultando em um aumento da possibilidade da transformação patológica do ciclo celular (25, 26). Além deles, os genes supressores de tumor também atuam no ciclo celular, porém com ações distintas. São genes que, quando inativados, levam a um descontrole na proliferação celular com conseqüente aumento na possibilidade do desenvolvimento e progressão de neoplasias (26, 27).

## **2. Revisão da Literatura**

### **2.1. O gene TP53 como fator prognóstico em adenocarcinoma de esôfago:**

O gene TP53 está localizado no braço curto do cromossomo 17, estando incluído no grupo dos previamente citados genes supressores de tumor. Perdas alélicas envolvendo esse gene estão associadas com formas mutantes do gene. Estas mutações estão entre as alterações genéticas mais frequentes nos tumores malignos em geral (25). A perda da função do TP53 está associada à imortalização ou à transformação celular *in vitro* e ao desenvolvimento de neoplasias *in vivo* (26). Como o TP53 regula negativamente o ciclo celular, a perda de sua função pode resultar em atividade proliferativa aumentada e progressão tumoral (25, 27).

O gene considerado “normal” ou “selvagem” atua na regulação da transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular, agindo possivelmente como controlador a eventuais danos ao DNA. A morte celular programada ou apoptose também é influenciada pelo TP53, motivo pelo qual o mesmo é denominado de “guardião da molécula”, bloqueando a replicação celular cada vez que um dano ao DNA é “detectado”, permitindo que os mecanismos de reparo possam atuar para reconstituir o genoma, ao monitorar a integridade do mesmo (25). Caso este reparo não seja efetivo, a morte celular programada pode ser por ele desencadeada (23, 25-28).

Em condições normais a proteína p53 não é detectável por imuno-histoquímica, pois possui uma meia-vida extremamente curta. Quando ocorre mutação no gene TP53, a proteína mutada é mais estável, permanecendo em maior quantidade e por maior tempo na célula, permitindo a sua detecção através deste método (25, 29, 30). Na maioria das vezes, tendo em vista a facilidade de realização, as alterações do gene TP53 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 TP53 seriam classificados como negativos juntamente com tumores sem expressão da proteína p53

(31, 32). É especulada também a presença de outros mecanismos interferindo na função do gene TP53, como danos a outros componentes da fase G1 do ciclo celular (p16, pRB e ciclina D1) (30). Para determinar se a perda da função normal da proteína p53 se correlaciona com a progressão do tumor ou com o prognóstico destes pacientes, a análise do gene TP53 no DNA da célula tumoral seria necessária (através de reação em cadeia da polimerase – PCR, por exemplo). No entanto, estes testes são de uma complexidade e custo bem maior do que a imuno-histoquímica, justificando o uso tão difundido desta para pesquisa de alterações genéticas (28, 32).

Cerca de metade dos tumores de cólon, estômago, pulmão, mama, fígado, cérebro e tecidos reticuloendotelial e hematopoiético contém alterações no código do gene TP53, demonstrando que a inativação do gene supressor TP53 é passo quase universal no desenvolvimento de câncer em humanos (25, 27).

Analisando os carcinomas de esôfago especificamente, alterações genéticas no gene TP53 são detectadas em 36 a 80% dos casos e parecem ocorrer precocemente na gênese tumoral esofágica, estando presente da displasia ao carcinoma e da metaplasia de Barrett ao adenocarcinoma (23, 25, 33, 34)

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 (30, 34).

Convém ressaltar que os estudos disponíveis na maior parte das vezes são realizados em pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago ou em séries onde não ocorre a divisão entre os tipos histológicos, considerando o tipo epidermóide e o adenocarcinoma como uma entidade única. Ainda permanece controversa a relação entre expressão da proteína p53 e

sobrevida em pacientes com adenocarcinoma de esôfago, conforme demonstrado na tabela 1 abaixo.

**Tabela 1 – Expressão da Proteína p53 e Sobrevida em diferentes estudos (23, 30, 33-39) :**

| Autor/Ano           | N   | Influência Sobrevida | Observações |
|---------------------|-----|----------------------|-------------|
| Vijeyasingam (1994) | 60  | Não                  | Adeno e CEE |
| Coggi (1997)        | 74  | Não                  | Adeno e CEE |
| Patell (1997)       | 46  | Sim                  | Adeno e CEE |
| Ribeiro (1998)      | 42  | Sim                  | Adeno e CEE |
| Carson (1998)       | 61  | Sim                  | Adeno e CEE |
| Kanamoto (1999)     | 239 | Não                  | CEE         |
| Ireland (2000)      | 37  | Sim                  | Adeno       |
| Casson (2003)       | 91  | Sim                  | Adeno       |
| Dolan (2003)        | 78  | Não                  | Adeno       |

N: número de pacientes com câncer de esôfago incluídos no estudo

## **2.2. VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular) e prognóstico em pacientes com adenocarcinoma de esôfago.**

Em condições fisiológicas normais, a formação de novos capilares sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (denominada de angiogênese), é um processo fundamental no desenvolvimento e na homeostasia. Ocorre durante a embriogênese, ciclos menstruais intensos e, por ser importante mecanismo de reparo, está presente em funções regenerativas e após exercício físico intenso, lesões nervosas, na cicatrização das feridas e no crescimento ósseo. Nessas situações, possui um caráter autolimitado e controlado, através da presença de fatores que tem um efeito angiogênico positivo contrapostos contra fatores com efeito angiogênico negativo (40, 41).

No entanto, possui um papel essencial no desenvolvimento de tumores sólidos, tendo em vista que a partir de um determinado tamanho, novos vasos são fundamentais para o seu crescimento, podendo inclusive contribuir para que ocorra o desenvolvimento de metástases à distância através da disseminação de células que se desprendem do tumor pelos neovasos (42).

Como já referido, a angiogênese depende da interação entre substâncias que possuam efeito promotor e inibidores do processo de neovascularização. Substâncias como um efeito regulador positivo, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento fibroblástico, em suas formas ácida (FGFa) e básica (FGFb), quando expressos pelos tumores, levam a um aumento na microdensidade vascular (detectada por análise histopatológica das lesões) (40, 43-45).

O VEGF é secretado pelas células tumorais e estimula o crescimento das células endoteliais, normalmente em resposta a estímulos externos como hipóxia ou substâncias secretadas pelo organismo. Sua detecção é realizada de forma eficaz pela imuno-histoquímica,

que tem a capacidade de demonstrar sua presença no citoplasma das células tumorais (44-46). Esta expressão se correlaciona com o grau de vascularização de muitos tumores (mama, pulmão), sendo relatada sua importância prognóstica em alguns destes casos (40, 43). Foi demonstrada também a relação entre sua expressão e a vascularização nos adenocarcinomas de esôfago (47). Nos pacientes com tumores de esôfago em geral, sua expressão foi demonstrada em 31-60% dos casos (47-56).

Embora a quantificação da angiogênese tenha sido realizada em vários tipos de tumores, a determinação de seu efeito como fator prognóstico ainda não está completamente esclarecida, ainda que alguns estudos clínicos recentes descrevam um pior prognóstico para pacientes com elevados escores de angiogênese (40, 43-46, 57). Poucos estudos existem correlacionando a expressão do VEGF e o prognóstico em pacientes com carcinoma de esôfago, e em sua maioria possui pacientes com o tipo epidermóide. Os resultados disponíveis até o momento são conflitantes (47-54).

**Tabela 2 - Expressão do VEGF e sobrevida em diferentes estudos (47-51, 53, 54, 58)**

| Autor/Ano        | N   | Influência | Sobrevida | Observações |
|------------------|-----|------------|-----------|-------------|
| Inoue (1997)     | 75  | Sim        |           | CEE         |
| Kitadai (1998)   | 119 | Não        |           | Adeno e CEE |
| Uchida (1998)    | 109 | Sim        |           | CEE         |
| Arii (1999)      | 102 | Sim        |           | CEE         |
| Koide (1999)     | 52  | Sim        |           | CEE         |
| Shih (2000)      | 117 | Sim        |           | CEE         |
| Rosa (2003)      | 47  | Não        |           | CEE         |
| Coulevard (2003) | 78  | Não        |           | Adeno       |

N: número de pacientes com câncer de esôfago incluídos no estudo



### **2.3. O papel do gene TP53 no controle da angiogênese**

O gene TP53 parece ter papel fundamental no desenvolvimento e progressão tumoral através da regulação da expressão do VEGF, ainda que por um mecanismo não completamente entendido (59, 60). As evidências atuais sugerem uma atuação via aumento da expressão do RNAm do VEGF através da perda da função supressora do gene TP53 (41, 61).

Existem poucos estudos avaliando esta co-expressão em pacientes com carcinoma de esôfago, e a sua maioria utiliza o tipo histológico epidermóide, com resultados ainda conflitantes em relação a sua possibilidade de uso como fator prognóstico independente (50-52, 56). Ainda não está clara esta relação, e se ela realmente existe de forma direta, mas é possível que a co-expressão proteína p53/VEGF determinada por imuno-histoquímica tenha um papel importante na angiogênese e no desenvolvimento metastático, podendo no futuro se apresentar como fator prognóstico (52, 62).

### **3. Objetivos**

1. Verificar a expressão da proteína p53 e sua relação com a sobrevida a longo prazo em pacientes com adenocarcinoma de esôfago submetidos à cirurgia de ressecção com intenção curativa;
2. Verificar a expressão do VEGF e sua relação com a sobrevida;
3. Verificar a associação entre a co-expressão da proteína p53 e do VEGF e sua relação com a sobrevida.

## **4. Pacientes e Métodos**

### **4.1 População e amostra**

Todos os pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago atendidos no Ambulatório do Grupo de Cirurgia de Esôfago, Estômago e Intestino Delgado (GCEEID) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) no período de Julho de 1993 a Julho de 2001, foram avaliados prospectivamente através de um protocolo que utiliza história e exame clínico detalhados, além de exames complementares para determinar a extensão locorregional e sistêmica da doença e o risco cirúrgico que apresentam estes pacientes. São realizados como rotina deste protocolo radiograma contrastado de esôfago, estômago e duodeno (REED), endoscopia digestiva alta com biópsia (e ecoendoscopia quando possível), radiografia de tórax, tomografia computadorizada de tórax com ênfase no mediastino e fibrobroncoscopia (para os tumores de terço próxima e médio) na avaliação da extensão da doença. A avaliação hematológica e sorológica de rotina, bem como a gasometria arterial, espirometria, eletrocardiograma em repouso e avaliação nutricional fazem parte da determinação do risco cirúrgico destes pacientes.

De posse destes dados, os pacientes são classificados em pacientes de alto ou baixo risco cirúrgico, estes últimos definidos como pacientes com condições clínicas e anestésicas de serem submetidos à cirurgias de grande porte (esofagectomia ou gastrectomia total), conforme critérios previamente definidos (3, 63).

Os pacientes são ainda divididos em potencialmente curáveis ou incuráveis, definindo-se curabilidade cirúrgica como a possibilidade de retirada completa do tumor sem evidência de doença metastática.

Os pacientes considerados potencialmente curáveis e de baixo risco cirúrgico são submetidos à exploração cirúrgica e ressecção quando tecnicamente possível. Caso não seja viável a ressecção (por invasão local, por exemplo) realiza-se o desvio do trânsito alimentar,

preferencialmente através da realização de um tubo com a grande curvatura gástrico elevado ao pescoço por via retroesternal, ou ainda técnicas paliativas como próteses endoesofágicas plásticas e realização de sondagens do trato digestivo para alimentação em casos com disseminação sistêmica da doença (gastrostomia, jejunostomia).

Em sendo possível a ressecção da lesão, opta-se pela esofagectomia com toracotomia se não há evidência de metástases em linfonodos locorregionais e o tumor acomete principalmente o esôfago, com mínima ou nenhuma invasão do estômago proximal, realizando-se a reconstrução do trânsito através do levantamento gástrico até a região cervical (63). Se as metástases ganglionares estão presentes nesta situação, realiza-se a esofagectomia transhiatal, com anastomose esofagogástrica cervical. Em situações em que o tumor acomete principalmente a junção esofagogástrica com extensão ao estômago, prefere-se a gastrectomia total com ressecção do esôfago distal e esofagojejunoanastomose, procedimento realizado unicamente por via abdominal. Quando não é possível a utilização do estômago (cirurgia prévia, invasão do tumor, por exemplo), utiliza-se o cólon previamente preparado na reconstrução do trânsito alimentar e, na impossibilidade de utilização deste, o intestino delgado.

Todos os pacientes são divididos em estágio segundo a União Internacional contra o Câncer (UICC) – TNM para o câncer de esôfago, como segue nas tabelas 3 e 4 abaixo:

**Tabela 3 - Sistema de Estadiamento da UICC – TNM\***

---

T - Tumor Primário

T1 - Tumor invade a lâmina própria ou submucosa

T2 - Tumor invade a muscular própria

T3 - Tumor invade a adventícia

T4 - Tumor invade as estruturas adjacentes

N - Linfonodos Regionais\*\*

N0 - Ausência de metástases em linfonodos regionais

N1 - Metástase em linfonodos regionais

M - Metástases à Distância

M0 - Ausência de metástase à distância

M1 - Metástases para outras vísceras ou para linfonodos não-regionais

---

\* pTNM: classificação histopatológica pós-operatória

yTNM: estadiamento histopatológico realizado após tratamento neoadjuvante

\*\* Esôfago Cervical: linfonodos cervicais e supraclaviculares

Esôfago Torácico: linfonodos mediastinais e perigástricos (excluindo linfonodos do tronco celíaco)

(Modificada de Lightdale) (2)

**Tabela 4 - Câncer de esôfago por estágio histopatológico\***

---

| Estágio | T          | N          | M  |
|---------|------------|------------|----|
| I       | T1         | N0         | M0 |
| IIa     | T2         | N0         | M0 |
|         | T3         | N0         | M0 |
| IIb     | T1         | N1         | M0 |
|         | T2         | N1         | M0 |
| III     | T3         | N1         | M0 |
|         | T4         | Qualquer N | M0 |
| IV      | Qualquer T | Qualquer N | M1 |

---

\* Modificado de Lightdale (2)

#### 4.2. Critérios de inclusão:

- Pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago atendidos consecutivamente no período de julho de 1993 até julho 2001 no GCEEID/HCPA, submetidos a cirurgia de ressecção com intenção curativa conforme avaliação pré-operatória descrita acima.

#### 4.3. Critérios de exclusão:

- mortalidade pós-operatória precoce, considerada como morte até 30 dias da cirurgia ou até a alta hospitalar;
- história ou presença de outra neoplasia maligna concomitante;
- tratamento neoadjuvante (quimioterapia e/ou radioterapia);
- ressecção incompleta (margens cirúrgicas comprometidas);
- pacientes em que não foi possível localizar o bloco de parafina.

#### 4.4. Delineamento

Delineamento: Coorte histórica

Tempo zero: Tratamento cirúrgico

#### 4.5. Variáveis

4.5.1 Variáveis demográficas: - idade, sexo, tabagismo, etilismo, classificação de Siewert (altura da lesão em relação à junção esofagogástrica) (64), tipos de cirurgia de ressecção realizadas, mortalidade pós-operatória precoce e a sobrevida dos pacientes após o início do tratamento.

A Classificação de Siewert (64) distingue os tumores da junção esofagogástrica (JEG) em 3 tipos principais:

Tipo I: adenocarcinoma do esôfago distal e que pode infiltrar a JEG;

Tipo II: carcinoma do cárdia propriamente dito;

Tipo III: carcinoma “gástrico” subcárdico que infiltra a JEG e esôfago distal proveniente do estômago.

Para utilização no presente trabalho, considerou-se o epicentro da lesão conforme descrito na análise macroscópica da peça cirúrgica.

4.5.2 Variáveis histopatológicas: - grau de diferenciação histológica;

- profundidade de penetração do tumor na parede esofágica;

- comprometimento linfonodal;

- estadiamento patológico (TNM);

4.5.3 Variáveis em Estudo – Imuno-histoquímica;

- expressão da proteína p53 mutante por imuno-histoquímica;

- expressão do VEGF por imuno-histoquímica.

Comparação entre os grupos onde esta expressão estiver presente, considerados com positivos (+) ou ausente, considerados como negativos (-) em relação às variáveis sócio-demográficas citadas;

4.5.4 Desfecho: Óbito decorrente do adenocarcinoma de esôfago ou situação de vida até 12/2002. Os pacientes que morreram por causa diversa do câncer de esôfago ou que tiveram o seguimento perdido foram censurados. As informações a respeito da sobrevida 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.



No acontecimento de 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.

#### 4.6. Análise anátomo-patológica e preparação tecidual

A análise da peça cirúrgica incluiu a determinação da profundidade de penetração do tumor na parede esofágica e o comprometimento das margens cirúrgicas, do comprometimento ganglionar, dos limites cirúrgicos (proximal, distal e circunferencial) e do grau de diferenciação histológica. O estágio histopatológico da doença (pTNM) foi definido de acordo com o estabelecido pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) (2). As peças cirúrgicas ressecadas foram fixadas em formalina a 10% e embebidas em parafina, conforme rotina do serviço de patologia do HCPA na época do procedimento. Cortes de 4 micrômetros de espessura foram feitos nos blocos de parafina, sendo posteriormente montados em lâminas de vidro.

#### 4.7. Anticorpos e reagentes

Para a identificação da proteína p53 foi utilizado o anticorpo monoclonal de camundongo DO-7 (Pab 1801, Sigma Biosciences, St Louis, MO, 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 sugere o acúmulo anormal da forma mutante.

O anticorpo policlonal de coelho A-20 reconhece o VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). Este é produzido contra um epíteto aminoterminal do VEGF humano, mapeando os resíduos 1-20 e reconhecendo as variantes 165, 189 e 121 do VEGF.

#### 4.8. 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 HCPA usando os anticorpos primários anteriormente descritos.

Esta rotina compreende os passos descritos a seguir: 1) corte dos blocos de parafina distendidos em lâminas preparadas com organossilano; 2) desparafinização em estufa a 60° C com xilol; 3) colocação em solução com água destilada e tampão PBS por 5 minutos; 4) recuperação antigênica em forno de microondas (3 seqüências de 8 minutos com intervalo de 90 segundos); 5) colocação em solução com água destilada e tampão PBS por 5 minutos; 6) duas passagens em peróxido de hidrogênio 5% diluído em água destilada; 7) colocação em solução com água destilada e tampão PBS por 5 minutos; 8) colocação em solução de leite em pó desnatado 5% e tampão PBS; 9) colocação em solução com água destilada e tampão PBS por 5 minutos; 10) utilização do anticorpo primário específico; 11) lavagem lâmina à lâmina com água destilada; 12) passagem em 3 seqüências pelo tampão PBS; 13) utilização do anticorpo secundário do Kit LSAB®; 14) utilização do tampão PBS em 2 seqüências; 15) utilização do DAB®; 16) lavagem em água destilada; 17) contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 30 segundos; 18) passagem rápida em banho de água amoniacal; 19) desidratação em série de álcool à 100%; 20) clarificação em xilol; 21) montagem das lâminas com bálsamo.

Resumidamente a técnica consiste em após desparafinização e reidratação, recuperação antigênica, inativação da atividade da peroxidase endógena e bloqueio das reações inespecíficas, os cortes foram incubados 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 (passo 10 da técnica descrita acima). A localização dos anticorpos primários foi alcançada pela aplicação subsequente do complexo estreptavidina-biotina peroxidase (LSAB, Dako

Corporation, Carpinteria, CA, USA) e a revelação com a utilização do diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA). 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).

#### 4.9. 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 ou p53+). O bloqueio com soro normal e a ausência do anticorpo primário foram usados como controles negativos (30, 65).

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 ou VEGF+). O músculo liso das camadas muscular própria ou muscular da mucosa serviu como controle interno positivo, já que as células musculares lisas também expressam o VEGF (48, 49, 54, 58).

As lâminas foram examinadas por dois investigadores sem conhecimento das informações clínicas e histopatológicas. Foi realizado o teste de kappa para controle da concordância interobservador.

Os casos com escore discrepante foram reexaminados em conjunto numa segunda ocasião, e a concordância foi alcançada.

#### 4.10. Avaliação da co-expressão da proteína p53 e do VEGF

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.

#### 4.11. Ética

Tendo em vista que o presente estudo foi parte integrante do protocolo de atendimento aos pacientes com adenocarcinoma de esôfago atendidos no GCEEID/HCPA, que já possuía aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA e que nenhuma intervenção experimental foi realizada nos pacientes, pode-se eximir do pesquisador a necessidade do termo de consentimento pós-informação. Os pesquisadores se comprometeram a explicar ao paciente ou aos familiares a importância das informações obtidas e a não revelar os resultados da pesquisa de forma individual/nominal. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do GPPG/HCPA sob o número 03-100: Determinação de Fatores Prognósticos em Adenocarcinoma do Esôfago: Avaliação da Expressão da Proteína p53 e do VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular).

#### 4.12. 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. Para o controle da concordância interobservador foi utilizado o teste de Kappa. 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.

## 5. Resultados:

No período de julho de 1993 a julho de 2001 foram atendidos no GCEEID/HCPA 116 pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago. Destes pacientes, 50 (43,1%) foram submetidos à cirurgia com intenção curativa após a avaliação pré-operatória previamente descrita. Em 4 casos não foi possível a localização dos blocos de parafina para realização do estudo imuno-histoquímico, resultando em uma amostra de 46 pacientes.

Destes 46 pacientes, 8 (17,4%) foram excluídos do estudo de sobrevida por evoluírem para óbito durante a internação (mortalidade pós-operatória precoce), sendo considerados apenas para o estudo de prevalência.

Dos 46 pacientes estudados, 24 (52,2%) apresentaram positividade para a proteína p53 conforme a análise imuno-histoquímica (Figura 1). Em relação ao VEGF, 22 pacientes (47,8%) foram considerados como apresentando anticorpos positivos para esta proteína (Figura 2).

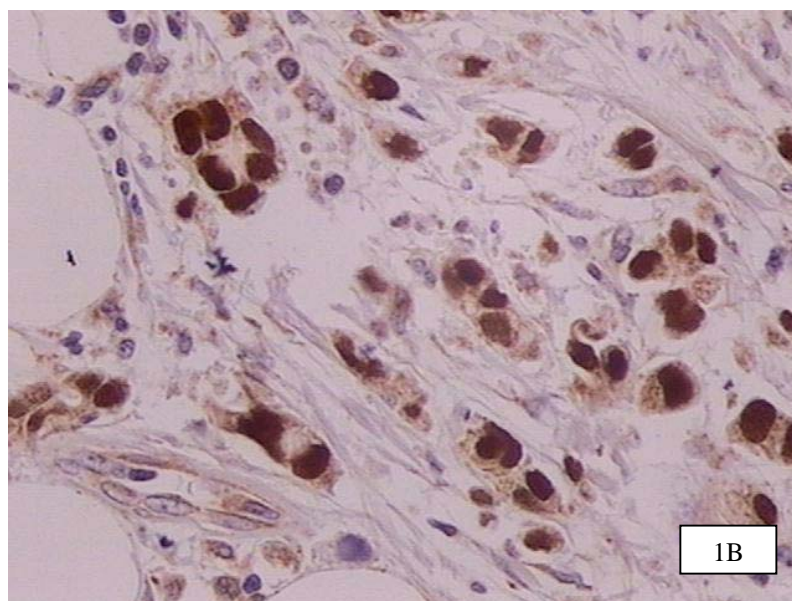
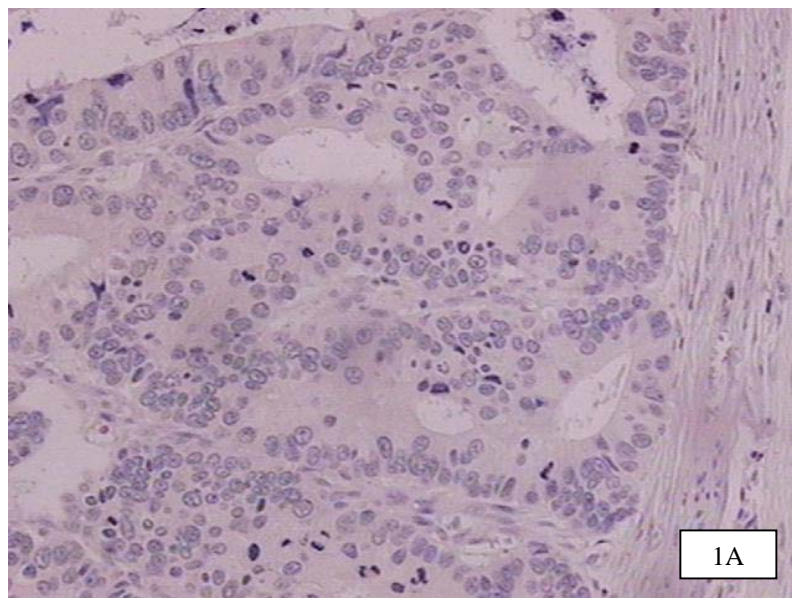
Quando são excluídos os pacientes com mortalidade operatória precoce, obtém-se um resultado de 20 (52,6%) pacientes considerados p53+ e 19 (50%) considerados VEGF positivos.

Considerando apenas os pacientes incluídos no estudo de sobrevida, a idade média foi de 60,6 anos (variando de 36,6 a 78), sendo 30 pacientes do sexo masculino (78,9%), em sua maioria tabagistas (29 casos, 76,3%). O alcoolismo esteve presente em 47,4 % dos pacientes estudados (18 casos). A cirurgia mais realizada foi a esofagectomia, em 20 casos (52,6%), sendo na maior parte das vezes o procedimento completado pela via transhiatal (19 casos), reservando-se a gastrectomia total com esofagectomia distal para os 18 casos restantes. Esta foi a amostra utilizada para o estudo de sobrevida, constituída de 38 pacientes, caracterizados conforme demonstra a tabela 5 abaixo.

Não foi demonstrada no presente estudo correlação estatisticamente significativa entre as expressões da proteína p53 e do VEGF e as variáveis idade, sexo, tabagismo, alcoolismo, classificação de Siewert, tipo de cirurgia realizada, grau de diferenciação histológica, penetração da lesão na parede esofágica (T), comprometimento linfonodal (N), presença de metástases à distância (M) e o estadiamento anatomopatológico. (Tabela 5)

A concordância interobservador foi testada através da utilização do teste de Kappa, que apresentou um valor de  $Kappa=0,912$ , com uma significância estatística para um  $p<0,0001$  quando levada em conta a análise da expressão da proteína p53 pelo exame imunohistoquímico, demonstrando uma concordância bastante elevada entre os dois observadores do presente estudo. As discordâncias foram reavaliadas através de uma reunião de consenso para que o diagnóstico definitivo fosse firmado.

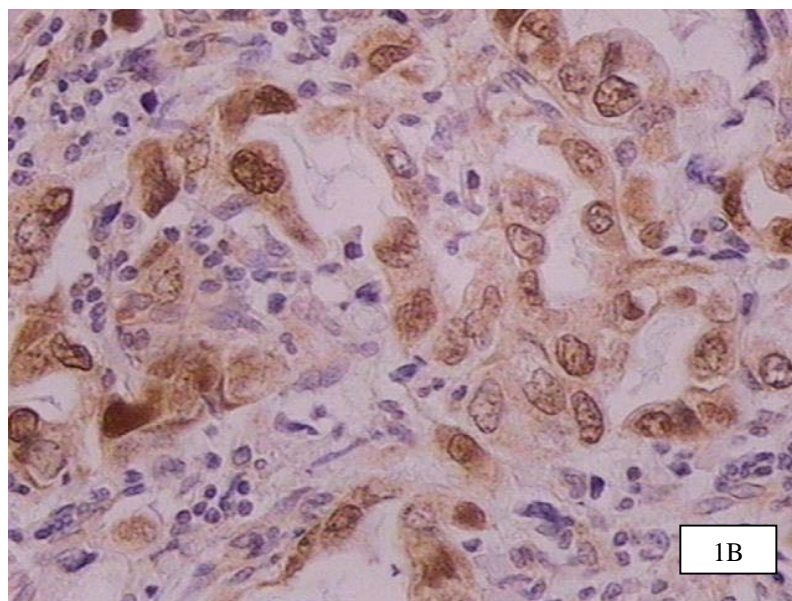
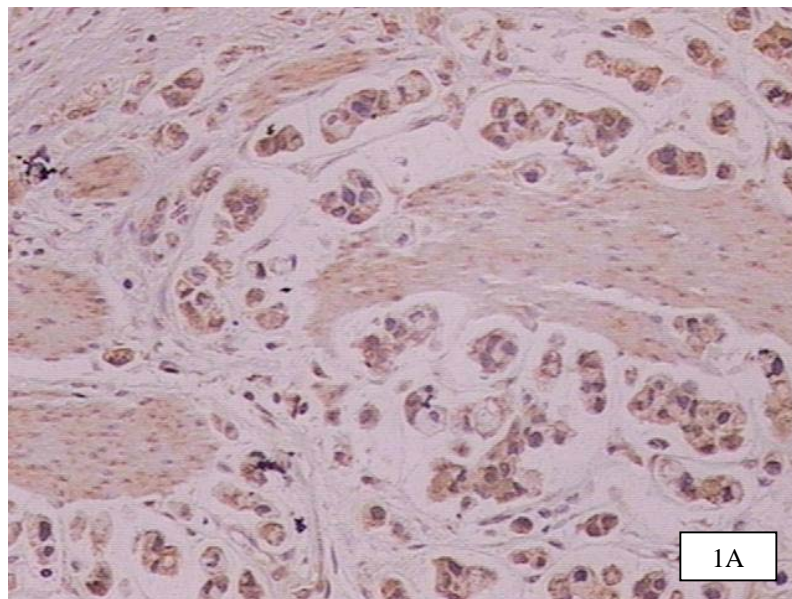
**Figura 1 - Fotomicrografia da imuno-histoquímica da expressão da proteína p53: (1A) Negativa e (1B) Positiva \***



\* A expressão da proteína é observada no núcleo das células. (100X)



**Figura 2 - Fotomicrografia da imuno-histoquímica da expressão do VEGF: (1A) Negativa e (1B) Positiva \***



\* A expressão da proteína é observada no citoplasma das células. (200X)

**Tabela 5 – Correlação entre a positividade para imuno-histoquímica da proteína p53 e do VEGF e variáveis clinicopatológicas**

| Variável        | n              | p53+    | p53-      | p     | VEGF +    | VEGF-     | p     |
|-----------------|----------------|---------|-----------|-------|-----------|-----------|-------|
|                 |                | 20      | 18        |       | 19        | 19        |       |
| Idade           | Média          | 59,1    | 62,45     | 0,357 | 60,62     | 60,78     | 0,592 |
|                 | DP             | 8,93    | 12,91     |       | 9,25      | 12,73     |       |
| Sexo            | Masculino      | 17 (85) | 13 (72,2) | 0,438 | 16 (84,2) | 14 (73,7) | 0,693 |
| Tabagismo       |                | 15 (75) | 14 (77,8) | 1     | 15 (78,9) | 14 (73,7) | 1     |
| Álcool          |                | 10 (50) | 8 (44,4)  | 0,757 | 11 (57,9) | 7 (36,8)  | 0,330 |
| Siewert*        | Tipo I         | 4 (20)  | 3 (16,7)  | 0,953 | 4 (21,1)  | 3 (15,8)  | 0,904 |
|                 | Tipo II        | 9 (45)  | 8 (44,4)  |       | 8 (42,1)  | 9 (47,4)  |       |
|                 | Tipo III       | 7 (35)  | 7 (38,9)  |       | 7 (36,8)  | 7 (36,8)  |       |
| Cirurgia        | Esofagectomia  | 9 (45)  | 11 (61,2) | 0,352 | 8 (42,1)  | 12 (63,2) | 0,330 |
|                 | Gastrectomia   | 11 (55) | 7 (38,8)  |       | 11 (57,9) | 7 (36,8)  |       |
| Diferenciação   | Bem            | 1 (5)   | 5 (27,8)  | 0,128 | 4 (21,1)  | 2 (10,5)  | 0,407 |
|                 | Moderadamente  | 8 (40)  | 4 (22,2)  |       | 7 (36,8)  | 5 (16,3)  |       |
|                 | Pouco          | 11 (55) | 9 (50)    |       | 8 (42,1)  | 12 (63,2) |       |
|                 | Indiferenciado | 0       | 0         |       | 0         | 0         |       |
| T **            | T1             | 2 (10)  | 4 (22,2)  | 0,721 | 4 (21,1)  | 2 (10,5)  | 0,122 |
|                 | T2             | 3 (15)  | 3 (16,7)  |       | 4 (21,1)  | 2 (10,5)  |       |
|                 | T3             | 8 (40)  | 5 (27,8)  |       | 3 (15,8)  | 10 (52,6) |       |
|                 | T4             | 7 (35)  | 6 (33,3)  |       | 8 (42,1)  | 5 (26,3)  |       |
| N **            | N0             | 10 (50) | 8 (44,4)  | 0,757 | 10 (52,6) | 8 (42,1)  | 0,746 |
|                 | N1             | 10 (50) | 10 (55,6) |       | 9 (47,4)  | 11 (57,9) |       |
| M **            | M0             | 18 (90) | 16 (88,9) | 1     | 17 (89,5) | 17 (89,5) | 1     |
|                 | M1             | 2 (10)  | 1 (11,1)  |       | 2 (10,5)  | 1 (10,5)  |       |
| Estadiamento ** | I              | 2 (10)  | 3 (16,7)  | 0,472 | 3 (15,8)  | 2 (10,5)  | 0,462 |
|                 | II             | 4 (20)  | 5 (27,8)  |       | 6 (31,6)  | 3 (15,7)  |       |
|                 | III            | 12 (60) | 8 (44,4)  |       | 8 (42,1)  | 12 (63,2) |       |
|                 | IV             | 2 (10)  | 2 (11,1)  |       | 2 (10,5)  | 2 (10,6)  |       |

n=número de pacientes. DP=Desvio-padrão. Dados apresentados como n(porcentagem)

\*Siewert=Classificação de Siewert para o adenocarcinoma do cárdia (64)

Tipo I: adenocarcinoma do esôfago distal

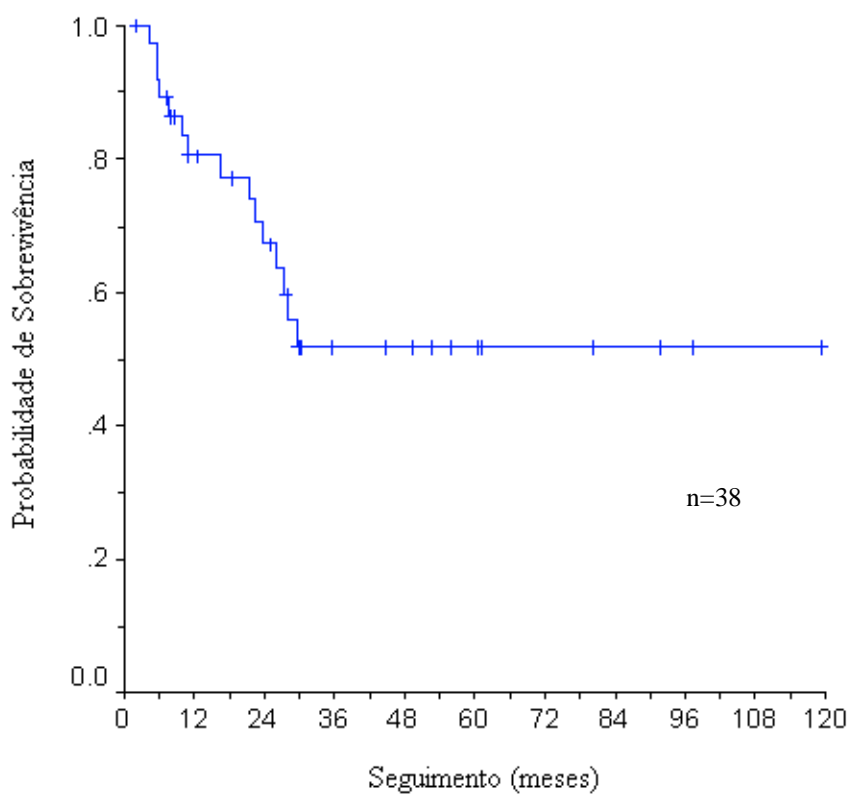
Tipo II: adenocarcinoma do epitélio do cárdia ou segmentos curtos com MI na JEG

Tipo III: adenocarcinoma gástrico subcárdico com infiltração da JEG e esôfago distal

\*\* Estadiamento UICC (referência 2)

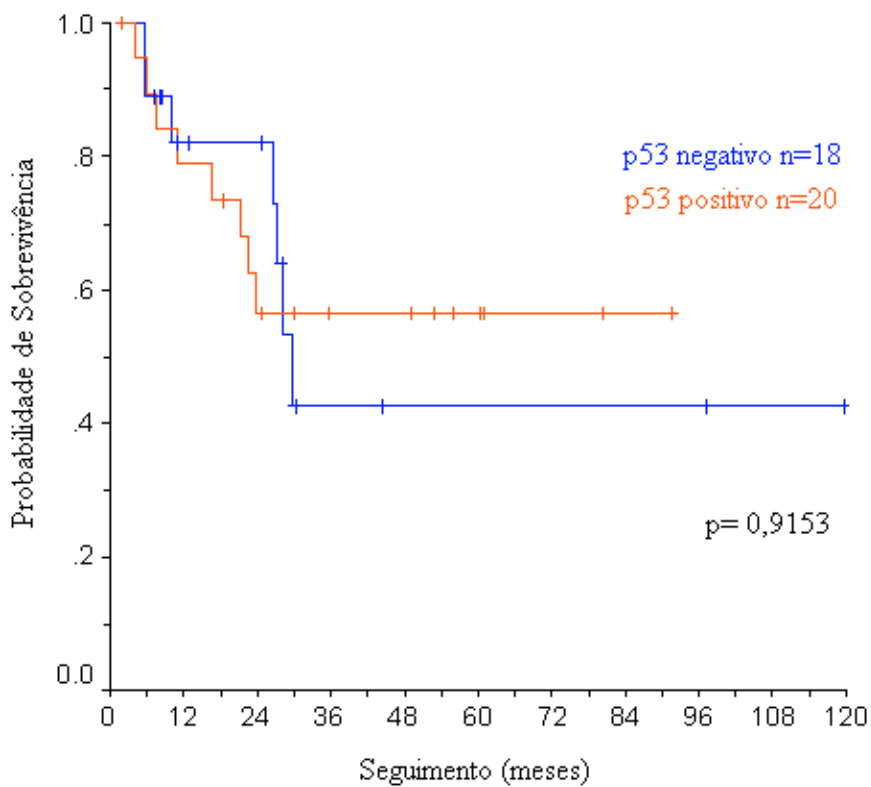
O tempo médio de seguimento foi de 31,5 meses (2-120 meses, DP= 28,3 meses). A sobrevida média foi de 70,4 meses (IC=51,9-88,5; EP=9,41). Dos 38 pacientes estudados, 15 (39,4%) apresentaram o desfecho óbito no período de seguimento determinado, conforme demonstrado na figura 3

**Figura 3 – Sobrevida global dos Pacientes com adenocarcinoma de esôfago**



A expressão da proteína p53 determinada pela imuno-histoquímica demonstrou que a sobrevida média dos pacientes positivos para esta condição (p53+) foi de 58,1 meses (IC= 40,4-75,7; EP=9), enquanto que para os pacientes onde a reação se mostrou negativa obteve média de 63,2 meses (IC=34,3-92,1, EP= 14,7). Esta diferença não apresentou significância estatística (p=0,9153)

**Figura 4 - Curva de sobrevida de acordo com a expressão da proteína p53**



As taxas de sobrevida nos diferentes períodos de tempo para os dois grupos (p53+ e p53-) estão demonstradas na tabela 6.

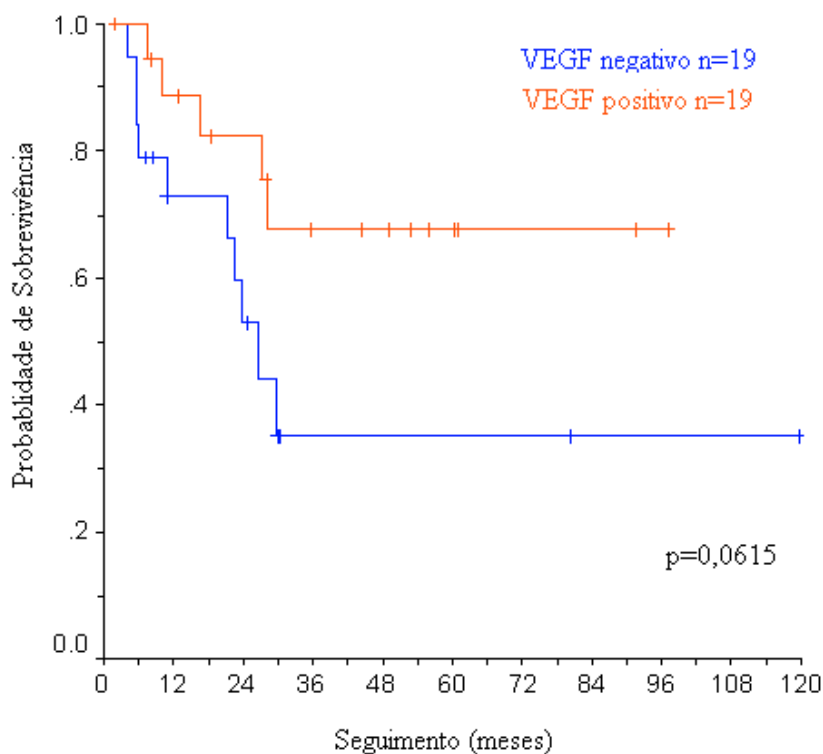
**Tabela 6 – Taxas de sobrevida e expressão do p53\*:**

| Variável     | 1 ano | 2 anos | 3 anos | 4 anos | 5 anos |
|--------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| p53 positivo | 78,9  | 56,7   | 56,7   | 56,7   | 56,7   |
| p53 negativo | 82    | 82     | 42,6   | 42,6   | 42,6   |

\*Dados apresentados em percentual de pacientes

Os pacientes que expressaram o VEGF na análise imuno-histoquímica (VEGF+) apresentaram uma sobrevida média de 72 meses (IC= 53,5-90,5; EP=9), enquanto que para os pacientes onde a reação se mostrou negativa (VEGF-) a média foi de 53,5 meses (IC= 27,5-79,4; EP= 13,2). Não há diferença estatística entre os grupos estudados ( $p=0,0615$ ), conforme demonstrado na figura 5.

**Figura 5 - Curva de sobrevida de acordo com a expressão do VEGF**



As taxas de sobrevida nos diferentes períodos de tempo para os dois grupos (VEGF+ e VEGF-) estão demonstradas na tabela 7.

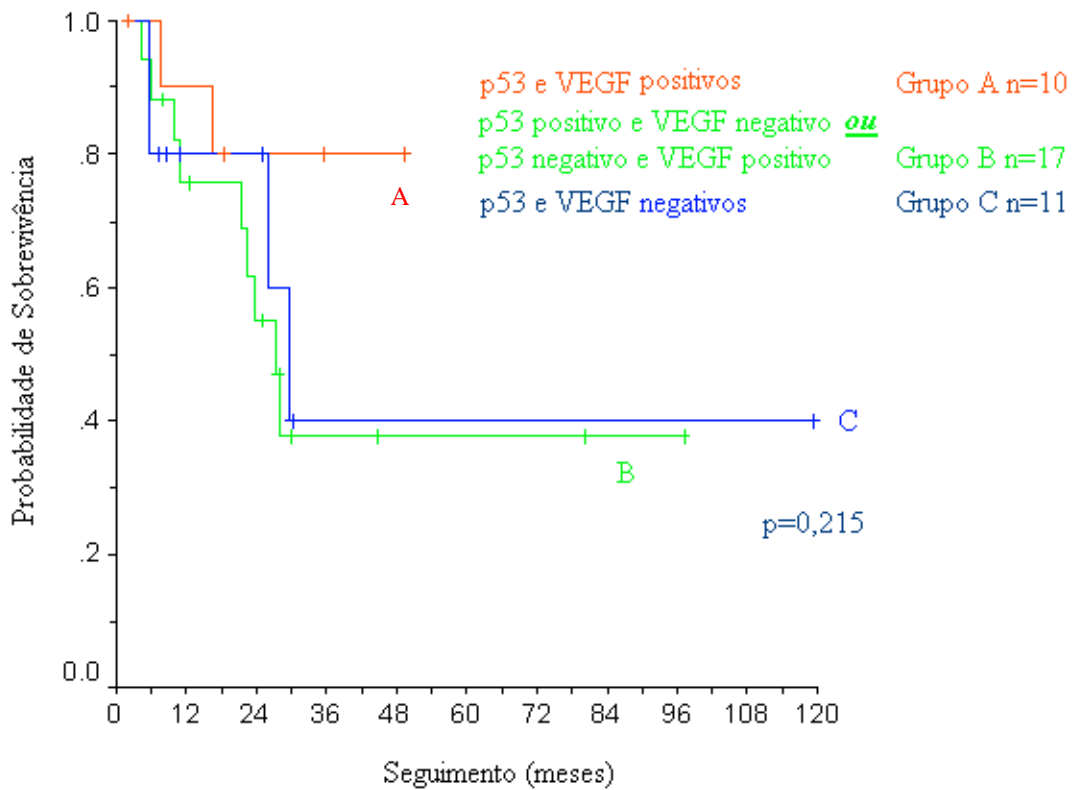
**Tabela 7– Taxas de sobrevida e expressão do VEGF\*:**

| Variável      | 1 ano | 2 anos | 3 anos | 4 anos | 5 anos |
|---------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| VEGF positivo | 88,6  | 82,2   | 67,8   | 67,8   | 67,8   |
| VEGF negativo | 72,9  | 53     | 35,3   | 35,3   | 35,3   |

\* Dados apresentados em percentual de pacientes

Para avaliar a possibilidade de que a co-expressão da proteína p53 e do VEGF pudesse alterar o prognóstico dos pacientes com adenocarcinoma do esôfago foram criados 3 grupos: Grupo A, para os pacientes com expressão positiva das duas variáveis (p53+ e VEGF+); Grupo B, em que pelo menos uma das variáveis era considerada positiva (p53+ e VEGF- ou p53- e VEGF+) e Grupo C, onde ambas não foram detectadas (p53- e VEGF-). A sobrevida média para os pacientes do grupo A foi de 75,7 meses (IC= 55,9-95,5; EP=10), para o grupo B foi de 48 meses (IC= 27,3-68,7; EP= 10,6) e para o grupo C foi de 60,2 meses (IC= 20,3-99,9; EP= 20,3), não sendo demonstrada diferença no presente estudo entre os grupos (p=0,2115), como demonstra a figura 6.

**Figura 6 - Curva de sobrevida de acordo com a co-expressão da proteína p53 e do VEGF**



Na tentativa de determinar a influência dos fatores prognósticos considerados mais importantes dentro do presente estudo, foram selecionados a profundidade de invasão do tumor (T), a presença de linfonodos comprometidos (N), o estadiamento cirúrgico (TNM), o grau de diferenciação tumoral e a classificação de Siewert). Nenhum destes fatores influenciou diretamente a sobrevida, conforme demonstrado na tabela 8 abaixo.

**Tabela 8 – Análise multivariada dos fatores em estudo \***

| Variável | RR    | IC            | p     |
|----------|-------|---------------|-------|
| p53      | 1,429 | (0,429-4,725) | 0,514 |
| VEGF     | 0,369 | (0,095-1,436) | 0,115 |

\* Ajustado pelo modelo de regressão de azares proporcionais de Cox para as variáveis profundidade de invasão do tumor, presença de linfonodos comprometidos, estadiamento cirúrgico, grau de diferenciação tumoral e classificação de Siewert



## 6. Discussão

O perfil epidemiológico dos pacientes no presente estudo é concordante com os de outros centros de referência para esta adenocarcinoma de esôfago no resto do mundo (66-68). A predominância de indivíduos do sexo masculino, acima dos 60 anos, tabagistas e etilistas encontrada nesta casuística reforça a importância do conhecimento destes fatores de risco na tentativa de detectar pacientes com maior chance de desenvolverem neoplasias malignas do esôfago e de projetar estratégias de prevenção (66, 69, 70).

Dentre os demais fatores de risco conhecidos na literatura para o desenvolvimento do adenocarcinoma de esôfago, a presença de doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) de longa data, ou mesmo o achado clínico de pirose, parecem estar implicados em um aumento na chance do aparecimento desta neoplasia ao longo do tempo (71). No entanto, tendo em vista o caráter retrospectivo do presente estudo e a dificuldade em objetivar as informações referentes a este dado que puderam ser obtidas na revisão dos prontuários optou-se por não utilizar os resultados aferidos. Da mesma forma, a obesidade, também considerada como fator determinante de risco para o desenvolvimento de adenocarcinomas de esôfago (17, 60, 72), não foi avaliada no presente estudo. A presença de esôfago de Barrett (metaplasia intestinal presente no esôfago, em pacientes com DRGE crônico) (70, 73, 74), que também está associada com um maior risco de adenocarcinoma (17, 34, 75) fica com sua avaliação prejudicada nesses pacientes tendo em vista a extensão da doença no momento do diagnóstico (63,2 % pacientes com estágio III e IV), onde a mucosa com alterações metaplásicas pode ser completamente englobada pela progressão do tumor (69, 76).

O crescente diagnóstico dos tumores do tipo adenocarcinoma em contrapartida a uma estabilidade nas taxas de ocorrência do tipo epidermóide já vem sendo relatada há vários anos na literatura ocidental (17-19, 69, 70, 75). Ainda permanece controverso o motivo porque, em séries ocidentais, o adenocarcinoma representa atualmente mais de 50% dos tumores

primários do esôfago, em contrapartida aos cerca de 5% que representava nos anos 70 (17, 75). Algumas das tentativas de elucidar este fato estão centradas na diminuição da incidência de infecção por *Helicobacter pylori*, considerado por alguns autores como fator protetor para o desenvolvimento de adenocarcinoma de esôfago (77), concomitante a um aumento na prevalência de obesidade mórbida (17). Apesar das altas taxas relatadas na literatura, há grande dificuldade em comprovar o real aumento da incidência do esôfago de Barrett, que poderia ser explicada pela disseminação e especificidade dos métodos de diagnóstico, sem que isso implique no aumento das taxas pré-existentes (17, 69, 75). No GCEEID/HCPA no período de tempo do presente estudo (julho 1993-julho 2001), foram avaliados 379 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago e 116 pacientes (23,4% casuística total) com adenocarcinoma de junção esofagogástrica.

Os tumores da junção esofagogástrica são, na sua maior parte, agrupados como uma entidade única (37, 76, 78-80), ainda que esta postura seja controversa, tendo em vista algumas características biológicas e histopatológicas distintas ressaltadas por alguns autores (81, 82).

Esta divisão tem implicação inclusive do ponto de vista de classificação histopatológica pós-operatória. Se for utilizada a classificação de Siewert para os tumores da JEG, por exemplo, os tumores do tipo I e II devem ser classificados (e estadiados) como tumores de esôfago, enquanto que os tumores do tipo III incluídos na classificação TNM para os tumores de estômago (64, 82-85), o que gera confusão para avaliação dos resultados tanto da avaliação pré-operatória quanto do estadiamento e tratamento. No presente estudo, considerou-se o TNM para os tumores de esôfago no estadiamento dos pacientes. (37, 76, 78-80), como sugerido inclusive pelo próprio idealizador da classificação supracitada (84).

Da mesma forma, a maior parte dos estudos disponíveis até o momento engloba os tumores epiteliais do esôfago como uma doença única, caracterizando os adenocarcinomas e

carcinomas epidermóides como uma entidade clínica isolada, possivelmente com o objetivo de poder oferecer um número maior de pacientes em suas casuísticas. Ainda que defendida por alguns (86-88), esta posição possui diversos contestadores, que demonstram inclusive que o tipo histológico pode (e deve) ser considerado com fator prognóstico isolado nos pacientes com lesões malignas do esôfago (82, 84, 89).

O índice de ressecabilidade nos pacientes desta série (43,1% - 50 pacientes de um universo de 116 atendidos em 8 anos) é inferior ao de grandes séries da literatura para este tipo de tumor, onde são demonstrados índices de ressecção de até 75,5% (84). Somada à elevada mortalidade perioperatória precoce demonstrada na presente casuística (8 pacientes – 17,4% dos pacientes operados com intenção curativa), pode-se inferir que a presente série é composta por maior quantidade de pacientes com tumores em estágios mais avançados da doença, com conseqüente pior prognóstico e com maiores chances de complicações pós-cirúrgicas, tendo em vista a extensão da doença.

As características locorregionais e de envolvimento ganglionar dos adenocarcinomas de esôfago justificam a utilização da abordagem transmediastinal na maioria dos casos de tumores do tipo I e II (85) e mesmo a abordagem apenas abdominal com extensão da ressecção da gastrectomia proximal ao esôfago distal nos pacientes com tumores tipo III, através de uma ampla exposição do hiato esofágico e do mediastino (82-84). Esta conduta está centrada no fato de que, em sua imensa maioria, estas lesões possuem disseminação metastática ganglionar para o mediastino posterior inferior, a região justa-cárdica e pela pequena curvatura gástrica até o tronco celíaco, áreas facilmente abordadas pelas técnicas supracitadas (84, 85).

Os dados referentes à classificação de Siewert demonstram que a porcentagem de tumores neste estudo se dividiu da seguinte maneira: tipo I - 7 casos (18,4%); tipo II – 17 casos (44,7%) e tipo III – 14 casos (36,8%), diferente em relação aos dados da maior série

mundial (82), com cerca de 1000 pacientes, que demonstra 36% de tumores do tipo I, 27% de tumores do tipo II e 37% tumores do tipo III. A menor ocorrência de tumores do tipo I nesta casuística pode estar relacionada ao fato de, com a detecção mais tardia dos tumores (63,2 % pacientes com estágio III e IV) do que na série correlata (cerca de 37% estágio III e IV), a diferenciação clínica entre os tumores do tipo I e II esteja prejudicada pela extensão locorregional da doença.

Diversos têm sido os esforços de determinar marcadores biológicos que possam influenciar a progressão do esôfago de Barrett na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma de esôfago. O TP53 parece estar implicado de forma importante neste processo (34, 69, 90-93). Tendo em vista sua capacidade de “monitorar” a integridade do genoma, o TP53 é considerado por diversos autores como um “guardião da molécula”, e em condições normais é ativado para regular negativamente a proliferação celular na transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular, sendo denominado de TP53 normal ou selvagem (27, 90). Mutações que ocorram no TP53 facilitam a instabilidade genômica e podem propiciar o aparecimento de linhagens celulares com defeitos importante em seu conteúdo nuclear e conseqüente imortalidade, levando à formação de tumores. (26, 27, 90) A perda da função de supressão pode ocorrer por mutação, rearranjo cromossômico, não-disjunção, conversão gênica, impressão ou recombinação mitótica. A interação com outras proteínas celulares ou oncoproteínas virais também pode neutralizar esta atividade supressora (26, 27).

Os principais métodos atualmente disponíveis para a determinação da expressão da proteína p53 são a imuno-histoquímica e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Apesar de mais sensível e específica que a imuno-histoquímica para a identificação de anormalidades do TP53, a PCR possui uma utilização clínica pouco prática, embora seja usada de forma rotineira na pesquisa em biologia molecular (26, 37). A técnica de imuno-histoquímica é fácil, barata e pode ser executada em qualquer laboratório de patologia, o que justifica seu uso em

larga escala na literatura (11, 28, 39). Esta técnica tem como objetivo detectar alterações fenotípicas da expressão da proteína p53. Em condições normais, a proteína p53 selvagem possui uma meia-vida curta, não sendo possível sua detecção através da imunoprecipitação. No entanto, quando ocorrem mutações no gene TP53, pode ocorrer um aumento na meia-vida da proteína para até 6 horas, permitindo sua identificação por imuno-histoquímica (26, 27). Sua utilização deve ser vista com cautela, uma vez que a ausência de expressão da proteína p53 não necessariamente exclui a existência de mutações (26, 27). Por exemplo, tumores com deleção de ambos os alelos do gene p53 podem ser classificados como negativos juntamente com tumores sem expressão da proteína p53 (26). Além disso, alguns tipos de vírus (alguns adenovírus, papilomavírus) podem causar alterações na estabilidade da proteína p53, permitindo que ela possa ser detectada pela imuno-histoquímica e levando a resultados falso-positivos (26). Para alguns autores, uma outra limitação importante da técnica é a dificuldade de reproduzir a avaliação entre diferentes patologistas (32), fato que não foi observado na presente casuística, onde a concordância entre os patologistas foi bastante elevada, confirmado pelo elevado valor obtido no teste de Kappa, demonstrando grande concordância entre os diagnósticos efetuados.

Alterações no gene TP53 são detectadas em 36 a 80% dos pacientes com câncer de esôfago e parecem ocorrer precocemente na gênese tumoral esofágica, estando presente da displasia ao carcinoma e da metaplasia no esôfago de Barrett ao adenocarcinoma. (33, 34, 94, 95). No entanto, grande parte das casuísticas ainda não divide os pacientes em subgrupos conforme o tipo histológico, impedindo que haja um consenso sobre o real papel do TP53 nos adenocarcinomas de esôfago (23, 30, 33-39). A prevalência da expressão da proteína p53 na presente série (57,2%) é concordante com os achados da literatura.

No presente estudo, não foi demonstrada correlação da proteína p53 determinada por análise imuno-histoquímica com alteração na sobrevida a longo prazo. Embora alguns estudos

apontem que esta expressão tenha valor prognóstico, seu real papel nos adenocarcinomas de esôfago ainda não está definido (30, 34). Levando-se em conta que não ocorre expressão da proteína p53 em todos os pacientes com adenocarcinoma de esôfago, pode-se inferir a atuação de mecanismos diversos ao TP53 na gênese destes tumores (25, 30, 37, 92, 96), como por exemplo a perda de função dos genes p16, pRB e ciclina D1, que também podem levar ao dano ao DNA na fase G1 do ciclo celular (97-99).

A expressão da proteína p53 não se correlacionou com a maior invasão do tumor, levando em conta a classificação TNM, indicando que, na presente série, a alteração do gene TP53 não apresenta diferença estatisticamente significativa nesses estágios. Esta expressão está relatada como ocorrendo em estágios precoces (I) e possivelmente aumentando em estágios mais avançados (IV) da doença (28, 37, 98), estando inclusive presente em alterações pré-malignas (33, 34, 37, 97-99). A expressão da proteína p53 não foi um fator prognóstico independente em pacientes com adenocarcinoma nem se correlacionou com as demais características clinicopatológicas. No presente estudo, a expressão da proteína p53 também não esteve correlacionada com pior prognóstico, tanto após análise univariada quanto multivariada ajustada pelo modelo de regressão de azares proporcionais de Cox para as variáveis profundidade de invasão do tumor, presença de linfonodos comprometidos, estadiamento cirúrgico, grau de diferenciação tumoral e classificação de Siewert.

Os tumores sólidos podem receber afluxo de nutrientes até cerca de 1 a 2mm de diâmetro por mecanismos de difusão. Após este volume celular, é fundamental que ocorra a formação de neovasos para a sua progressão (42, 100-102). Dentre as proteínas envolvidas na formação de novos vasos sanguíneos nos diferentes tipos de tumores, um dos mais estudados é o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (103,104).

O VEGF é um mitógeno específico da proliferação das células endoteliais, sendo produzido durante a embriogênese e durante a vida adulta em processos fisiológicos do

desenvolvimento e de reparo tecidual (embriogênese, ciclo menstrual, hipertrofia muscular secundária ao exercício), determinando o crescimento de novos vasos sanguíneos e o aumento da permeabilidade microvascular. Em situações patológicas, 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 (42, 105), que parece ser seu principal estímulo (42, 59, 106, 107). O VEGF é considerado o parâmetro mais importante dentre os marcadores de angiogênese (42).

No presente estudo a expressão do VEGF foi demonstrada em 47,8 % dos pacientes com adenocarcinoma de esôfago, consistente com os achados da literatura (48-55). Esta expressão não se correlacionou com nenhuma das variáveis clinicopatológicas estudadas.

A maior parte dos estudos disponíveis sobre o efeito prognóstico da expressão do VEGF em pacientes com tumores de esôfago contempla pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (48, 50, 51, 53, 54, 58). Nestes estudos, permanece controverso o papel do VEGF no prognóstico destes pacientes. Poucos estudos estão disponíveis na literatura avaliando o prognóstico dos pacientes com adenocarcinoma de esôfago nos quais a detecção do VEGF por imuno-histoquímica pode ser demonstrada (47, 49). Também nestes pacientes não é possível obter-se um consenso em relação ao verdadeiro fator prognóstico da expressão do VEGF. No presente estudo a expressão do VEGF não esteve associada com alteração do prognóstico a longo prazo, tanto na análise univariada como na análise multivariada ajustada para a profundidade de invasão do tumor, presença de linfonodos comprometidos, estadiamento cirúrgico, grau de diferenciação tumoral e classificação de Siewert.

Em um estudo realizado com pacientes com adenocarcinoma de esôfago que avaliou a expressão do VEGF e sua correlação com o prognóstico (47), a vascularização do tumor foi mais pronunciada em estágios mais precoces e se correlacionou com uma melhor sobrevida.

No entanto, neste estudo, quando foram excluídos os pacientes com tumores superficiais (que representavam cerca de 30% dos pacientes da amostra), a vascularização não apresentou valor prognóstico, e apesar da vascularização estar correlacionada com a expressão do VEGF, não houve significância prognóstica global. Conclui-se com estes dados que a angiogênese é marcada nas lesões pré-malignas e nos carcinomas precoces, sendo um evento precoce na progressão neoplásica (108) e que nos estágios mais avançados possivelmente os fatores prognósticos estabelecidos (grau de invasão na parede esofágica, presença de linfonodos comprometidos, grau de diferenciação tumoral, presença de metástases à distância) sejam mais importantes do que a angiogênese isoladamente na determinação do prognóstico (54, 103, 109, 110). Como demonstrado acima, é imprescindível considerar o grupo de pacientes estudados para real avaliação dos resultados.

Quando o grupo estudado é formado por pacientes em estágios mais precoces e que conseqüentemente apresentarão um seguimento maior, a diferença entre as curvas de sobrevida a longo prazo provavelmente será maior, determinando-se então o seu valor prognóstico. A expressão do VEGF parece ser útil em pacientes nestes estágios iniciais da doença (111). Uma postura a ser adotada nestes casos seria a utilização de um tratamento mais agressivo (neo-adjuvante, por exemplo), em pacientes VEGF positivos, já que eles mais precocemente poderiam apresentar metástases e conseqüentemente pior prognóstico (54, 112-114).

O desenvolvimento e crescimento tumoral em estágios tardios (como na presente série) parece ser independente do VEGF, enquanto que o evento metastático inicial pode ser VEGF-dependente ou no mínimo estar correlacionado a este fator (111). Nos estágios mais tardios as manifestações angiogênicas são menos pronunciadas (47, 103, 108), e por isso talvez sua influência no prognóstico dos pacientes não possa ser demonstrada em séries com grande número de pacientes em estágios avançados da doença.



Evidências clínicas e experimentais tem sugerido um papel importante do TP53 na regulação da expressão do VEGF (50, 61). A expressão da proteína p53 estaria associada com um aumento na produção do VEGF (59, 60, 62), ainda que estudos recentes especificamente relacionados ao carcinoma (sem distinção de tipo histológico) de esôfago não tenham logrado sucesso em demonstrar tal associação (52, 54, 56). A co-expressão destas proteínas estaria associada com um pior prognóstico para os pacientes (50, 52).

No presente estudo a co-expressão entre a proteína p53 e o VEGF detectados por imuno-histoquímica esteve presente em 12 pacientes (26% dos casos), e esta associação não esteve correlacionada com pior prognóstico ou com a presença de características clinicopatológicas distintas nos grupos com e sem a expressão das proteínas em estudo.

## **7. Conclusões**

1. A proteína p53 esteve expressa em 24 pacientes (52,2%). Sua expressão não esteve relacionada com pior prognóstico em pacientes com adenocarcinoma de esôfago submetidos a cirurgia com intenção curativa na presente amostra.
2. O VEGF esteve expresso em 22 pacientes (47,2%). Não houve relação entre a expressão deste fator determinada por imuno-histoquímica e a sobrevida a longo prazo destes pacientes.
3. A associação entre a co-expressão da proteína p53 determinada por análise imuno-histoquímica e o VEGF não apresentou, no presente estudo, correlação com o prognóstico.

## 8. Perspectivas

A tentativa de definir marcadores biológicos que possam prever o prognóstico dos pacientes ou mesmo a sua possibilidade de resposta a tratamentos adjuvantes é extremamente interessante (115), pois permite definir situações nas quais uma conduta mais agressiva é indicada ou deve ser evitada.

Quando tenta-se definir um marcador de progressão neoplásica para uso clínico, quatro passos devem ser respeitados (34): a seleção do marcador apropriado em material clinicamente acessível, a validação deste marcador em relação à progressão conhecida da doença, o estabelecimento de critérios quantitativos para determinar a presença ou ausência deste marcador, e a determinação do valor preditivo do mesmo em estudos prospectivos (116).

Os marcadores do presente estudo estão no último estágio de sua validação para uso clínico.

Se for considerada a expressão da proteína p53 como um evento precoce na progressão neoplásica do esôfago de Barrett ao adenocarcinoma (34, 76, 91, 92, 98, 117), os esforços no futuro deveriam ser concentrados na tentativa de elucidar se a sua expressão em pacientes com Barrett está associada com uma maior chance de desenvolvimento de adenocarcinoma ou com um pior prognóstico dos pacientes.

Para o VEGF a situação é semelhante. Tendo em vista que a expressão do VEGF aumenta conforme a progressão da doença na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma (118), estando expresso em menor freqüência nas lesões metaplásicas e sendo progressivamente mais freqüente nas displasias e no adenocarcinoma (119), sua detecção em estágios mais precoces poderá ser definitivamente comprovada como tendo efeito (ou não) na evolução desta doença.

A possibilidade de detecção do VEGF no sangue ou outros fluídos corporais dos pacientes demonstra um grande número de oportunidades futuras para tentar definir pacientes com um perfil angiogênico adequado à utilização de drogas que possam bloquear este processo e aumentar a eficácia dos tratamentos atualmente disponíveis, como já demonstrado em alguns estudos preliminares (120-124).

## 9. Referências Bibliográficas

1. Blot WJ. Cancer of the esophagus: its causes and changing patterns of occurrence. In: Perry MC, Whippen D, editors. Proceedings of the 33th American Society of Clinical Oncology - Educational Book; 1997 May 17-20; Denver, USA. USA, American Society of Clinical Oncology; 1997. p. 159-63.
2. Lightdale CJ. Practice guidelines for esophageal cancer. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 20-9.
3. Rosa ARP, Schirmer CC, Gurski RR, Brentano L, Krueel CD. Survival and prognostic factors in patients with epidermoid oesophageal carcinoma. *Int Surg* 1999; 94: 193-8.
4. Mirra AP, Souza JMP, Gotlieb SLD et al. Epidemiologia do câncer de esôfago em São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Publ São Paulo* 1982; 16: 54-65.
5. Munõz N. Epidemiological aspects of oesophageal cancer. *Endoscopy* 1993; 25 Suppl 1: 609-12.
6. Ribeiro Jr U, Posner MC, Safatle-Ribeiro AV, Reynolds JC. Risk factors for squamous cell carcinoma of the esophagus. *Br J Surg* 1996; 83: 1174-85.
7. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2002. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/>

8. Prolla JC. Mortalidade por neoplasia associada ao tabagismo no Rio Grande do Sul, 1970-1989. [tese de Doutorado]. Porto Alegre (RS): Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1992: 99 p.
9. Barros SGS. Detecção de lesões precursoras em indivíduos sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago. Experiência com a citopatologia da mucosa esofágica através de biópsias endoscópicas e do esfregaço pelo balão citológico chinês. [tese de doutorado]. Porto Alegre (RS): Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1992: 214 p.
10. Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul. Mortalidade pelos principais tipos de câncer no estado do Rio Grande do Sul, período 1980-2002, Rio Grande do Sul, 2002. Disponível em url: [www.bemcertinho.com.br/documentos/mortalidade\\_cancer15.xls](http://www.bemcertinho.com.br/documentos/mortalidade_cancer15.xls)
11. Fagundes RB, Mello CR, Tollens P et al. p53 protein in esophageal mucosa of individuals at high risk of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esophagus* 2001; 14: 185-90.
12. Ramos ACR. Avaliação do efeito inibidor da vitamina C na carcinogênese esofágica experimental induzida pela dietilnitrosamina. [dissertação de Mestrado]. Campinas (SP): Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas; 1998: 145 p.
13. Haddad NG, Fleischer DE. Neoplasms of the esophagus. In: Castell DO, editor. *The esophagus*. 2nd ed. New York: Little, Brown and Company; 1995. p. 269-91.

14. Kirby TJ, Rice TW. The epidemiology of esophageal carcinoma. *Chest Surg Clin North Am* 1994; 4; 217-25.
15. Lee RB, Miller MD. Esophagectomy for cancer. *Surg Clin North Am* 1997; 77;5: 1169-96.
16. Boyce HW. Esophageal cancer. *J Moffitt Cancer Cent* 1998; 5: 37-41. Disponível em URL:<http://www.medscape.com/moffitt/CancerControl/1998/v05.n03s/cc0503s.14.boyc/cc0503s.14.boyc-01.html>.
17. Cameron AJ. Epidemiology of Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Dis Esoph* 2002; 15: 106-8.
18. Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni Jr JF. Rising Incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 1991; 265: 1287-9.
19. Pera M, Cameron AJ, Trastek VF, Carpenter HA, Zinsmeister AR. Increasing Incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Gastroenterology* 1993; 104: 510-3.
20. Fumagalli U and Panel of Experts. Resective surgery for cancer of the thoracic esophagus. Results of a consensus conference held at the VIth World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus. *Dis Esoph* 1996; 6 Suppl 1: 30-8.

21. Bumm R and Panel of Experts. Staging and risk-analysis in esophageal carcinoma. Results of a consensus conference held at the VIth World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus. *Dis Esoph* 1996; 6 Suppl 1: 30-8 .
22. Ruol A. Multimodality treatment for non-metastatic cancer of the thoracic esophagus. *Dis Esoph* 1996; 9: 39-55.
23. Ribeiro Jr U, Filkelstein SD, Safatle-Ribeiro AV et al. p53 sequence analysis predicts treatment response and outcome of patients with esophageal carcinoma. *Cancer* 1998; 83: 7-18.
24. Breyer HP, Barros SGS, Maguilnik I, Edelweiss MI. Does Methylene Blue Detect Intestinal Metaplasia in Barrett's Esophagus ? *Gastrointestinal Endoscopy* 2003; 57(4): 505-9.
25. Jenkins GJS, Doak SH, Parry JM, D'Souza FR, Griffiths AP, Baxter JN. Genetic pathways involved in the progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma.. *Br J Surg* 2002; 89: 824-7.
26. Chang F, Syrjänen S, Tervahauta A, Syrjänen K. Tumourigenesis associated with the p53 tumour suppressor gene. *Br J Cancer* 1993; 68: 653-61.
27. Steele RJC, Thompson AM, Hall PA, Lane DP. The p53 tumor supressor gene. *Br J Surg* 1998; 85: 1460-7.



28. 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.
29. 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.
30. Coggi G, Bosari S, Roncalli M et al. p53 protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma. *Cancer* 1997; 79: 125-32.
31. 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.
32. 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.
33. Casson AG, Evans SC, Gillis A et al. Clinical implications of p53 tumor suppressor gene mutation and protein expression in esophageal adenocarcinomas: results of a ten-year prospective study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125: 1121-31.

34. Dolan K, Walker SJ, Gosney J, Field JK, Sutton R. TP53 mutations in malignant and premalignant Barrett's esophagus. *Dis Esoph* 2003; 16: 83-9.
35. 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: 1623-26.
36. Patel DD, Bhatavdekar JM, Chikhlikar PR 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.
37. Ireland AP, Shibata DK, Chandrasoma P, Lord RVN, Petters JH, DeMeester TR. Clinical Significance of *p53* Mutations in Adenocarcinoma of the Esophagus and Cardia. *Ann Surg* 2000; 231: 179-87.
38. Casson AG, Tammemagi M, Eskandarian S, Redston M, McLaughlin J, Ozcelik H. p53 alterations in oesophageal cancer: association with clinicopathological features, risk factors, and survival. *Mol Pathol* 1998; 51: 71-9.
39. Kanamoto A, Kato H, Tachimori Y et al. No prognostic significance of p53 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 1999; 72: 94-8.
40. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1757-63.

41. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2413-22.
42. Gaiso MK. Antiangiogenesis: a new anticancer therapy ? *Medscape Oncology* 1999; 2: 1-5. Disponível em url <http://www.medscape.com/viewarticle/408446>.
43. Fontanini G, Vignati S, Lucchi M 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: 1295-301.
44. 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.
45. 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.
46. 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: 2513-9.
47. Coulevard A, Paraf F, Gratio V et al. Angiogenesis in the neoplastic sequence of Barrett's oesophagus. Correlation with VEGF expression. *J Pathol* 2000; 192: 14-8.
48. 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.

49. Kitadai Y, Haruma K, Tokutomi T et al. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2195-200.
50. Uchida S, Shimada Y, Watanabe G 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: 1704-9.
51. 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: 25-30.
52. Koide N, Nishio A, Hiraguri M, Hanazaki K, Adachi W, Amano J. Coexpression of vascular endothelial growth factor and p53 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1733-40.
53. 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.
54. Rosa ARP, Schirmer CC, Gurki RR, Meurer L, Edelweiss MI, Kruehl CP. Prognostic value of p53 protein expression and vascular endothelial growth factor expression in resected squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esoph* 2003; 16: 112-8.

55. Shimada H, Takeda A, Nabeya Y et al. Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 663-9.
56. Ahn MJ, Jang SJ, Park YW et al. Clinical prognostic values of vascular endothelial growth factor, microvessel density and p53 expression in esophageal carcinomas. *J Korean Med Sci* 2002; 17: 201-7. (abstract)
57. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000; 60: 203-12.
58. Koide N, Nishio A, Kono T et al. Histochemical study of vascular endothelial growth factor in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 952-8.
59. 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.
60. 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: 6161-5.
61. Maeda K, Kang SM, Onoda N et al. Expression of p53 and vascular endothelial growth factor associated with tumor angiogenesis and prognosis in gastric cancer. *Oncology* 1998; 55: 594-9.

62. Maeda K, Kang S, Onoda N 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.
63. Cavazzola LT, Telles JPB, Pesce G et al. Delayed Cervical Esophagogastric Anastomosis. In: Pinotti HW, Ceconello I, Felix VN, Oliveira MA, editors. *Recent Advances in Diseases of the Esophagus*, Bologna: Monduzzi Editore 2001; p. 579-85.
64. Siewert JR, Stein HJ. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Br J Surg* 1998; 85: 1457-9.
65. Kajiyama Y, Hattori K, Tomita N et al. Histopathologic effects of neoadjuvant therapies of advanced squamous cell carcinoma of the esophagus: multivariate analysis of predictive factors and p53 overexpression. *Dis Esoph* 2002; 15: 61-6.
66. Engel LS, Chow WH, Vaughan TL et al. Population attributable risks of esophageal and gastric cancers. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1404-13.
67. Eloubedi MA, Desmon R, Arguedas MR, Reed CE, Wilcox CM. Prognostic Factors for the Survival of Patients with Esophageal Carcinoma in the U.S. The Importance of Tumor Length and Lymph Node Status. *Cancer* 2002; 95: 1434-43.
68. Ikeda M, Natsugoe S, Ueno S, Baba M, Aikou T. Significant Host- and Tumor-Related Factors for Predicting Prognosis in Patients with Esophageal Carcinoma. *Ann Surg* 2003; 238: 197-202.

69. Altorki NK, Oliveria S, Schrupp D. Epidemiology and Molecular Biology of Barrett's Adenocarcinoma. *Semin Surg Oncol* 1997; 13: 270-80.
70. Slehria S, Sharma P. Barrett's Esophagus. *Curr Opin Gastroenterol* 2003; 19(4): 387-93. Disponível em url [www.medscape.com/viewarticle/457731](http://www.medscape.com/viewarticle/457731).
71. Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340: 825-31
72. Brown LM, Swanson CA, Gridley G et al. Adenocarcinoma of the esophagus: role of obesity and diet. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 104-9.
73. Gurski RR, Petters JH, Hagen JA et al. Barrett's esophagus can and does regress after antireflux surgery: a study of prevalence and predictive features. *J Am Coll Surg* 2003; 196: 706-13.
74. Spechler SJ. Barrett's esophagus. *N Engl J Med* 2002; 346: 837-42.
75. Watson A. Barrett's esophagus – 50 years on. *Br J Surg* 2000, 87: 529-31.
76. Ruol A, Parenti A, Zaninotto G et al. Intestinal Metaplasia is the Probable Common Precursor of Adenocarcinoma in Barrett Esophagus and Adenocarcinoma of the Gastric Cardia. *Cancer* 2000; 88: 2520-8.

77. Hansen S, Melby KK, Aase S et al. Role of smoking and *Helicobacter pylori* infection in aetiology of cardia versus non-cardia gastric cancer. *Gastroenterology* 2000; 118: A75. (abstract)
78. Wijnhoven BPL, Siersema PD, vanDekken H et al. Adenocarcinomas of the distal oesophagus and gastric cardia are one clinical entity. *Br J Surg* 1999; 86: 529-35.
79. vanDekken H, Alers J, Riegman PHJ, Rosenberg C, Tilanus HW, Vissers K. Molecular Cytogenetic Evaluation of Gastric Cardia Adenocarcinoma and Precursor Lesions. *Am J Pathol* 2001; 158: 1961-7.
80. Bruno L, Nesi G, Montinaro F et al. Clinicopathologic findings and results of surgical treatment in Cardiac Adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2000; 74: 33-5.
81. Tanière P, Martel-Planche G, Maurici D et al. Molecular and Clinical Differences Between Adenocarcinomas of the Esophagus and Gastric Cardia. *Am J Pathol* 2001; 158: 33-40.
82. Siewert JR, Feith M, Stein HJ. Adenocarcinoma of the Esophagogastric Junction – Results of Surgical Therapy Based on Anatomical/Topographic Classification in 1002 Consecutive Patients. *Ann Surg* 2000; 232: 353-61.
83. Hardiwick RH, Williams GT. Staging of oesophageal adenocarcinoma. *Br J Surg* 2002; 89: 1076-7.



84. Siewert JR, Stein HJ, Feith M, Bruecher BLDM, Bartels H, Fink U. Histologic Tumor Type is an Independent Prognostic Parameter in Esophageal Cancer: Lessons from more than 1000 Consecutive Resections at a Single Center in the Western World. *Ann Surg* 2001; 234: 360-9.
85. Siewert JR, Stein HJ, Sendler A et al. Esophageal cancer: Clinical management. In: Kelsen DA, ed. *Principles and practice of gastrointestinal oncology*. Philadelphia: Lippincot Williams & Williams; 2001, 976 p.
86. Lerut T, DeDeyn P, Coosemans W et al. Surgical strategies in esophageal carcinoma with emphasis on radical lymphadenectomy. *Ann Surg* 1992; 216: 583-90.
87. Hagen JA, Peters JH, DeMeester TR. Superiority of extended en bloc esophagogastrectomy for carcinoma of the lower esophagus and cardia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 106: 850-8.
88. Alexandrou A, Davis PA, Law S, Murthy S, Whooley BP, Wong J. Squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lower third of the esophagus and gastric cardia: similarities and differences. *Dis Esoph* 2002; 15: 290-5.
89. Bollschweiler E, Schroder W, Holscher AH, Siewert JR. Preoperative risk analysis in patients with adenocarcinoma or squamous cell carcinoma of the esophagus. *Br J Surg* 2000; 87: 1106-10.

90. Shinohara M, Aoki T, Sato S et al. Cell cycle-regulated factors in esophageal cancer. *Dis Esophagus* 2002; 15: 149-54.
91. Audrézet MP, Robaszkiewicz M, Mercier B et al. Molecular analysis of the TP53 gene in Barrett's adenocarcinoma. *Human Mutation* 1996; 7: 109-13.
92. Hanas J, Lerner MR, Lightfoot SA et al. Expression of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and p53 Tumor Suppressor in Dysplastic Progression and Adenocarcinoma in Barrett Esophagus. *Cancer* 1999; 86: 756-63.
93. 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.
94. Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res* 1999; 59:1391-9.
95. 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.
96. Younes M, Ertan A, Lechago J. P53 protein and malignant progression in Barrett's Metaplasia (Barrett's Esophagus) *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1200-1.

97. Wu TT, Watanabe T, Heitmiller R, Zahurak M, Forastiere AA, Hamilton SR. Genetic alterations in Barrett esophagus and adenocarcinomas of the esophagus and esophagogastric junction region. *Am J Pathol* 1998; 153: 287-94.
98. Wijnhoven BPL, Tilanus HW, Dinjens WNM. Molecular Biology of Barrett's Adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001; 233: 322-37.
99. Adulaimi D, Jankowki J. Barrett's esophagus: an overview of the molecular biology. *Dis Esoph* 1999; 12: 177-80.
100. Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2451-60.
101. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
102. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? *Cancer Res* 1986; 46: 467-73.
103. Poon RTP, Fan ST, Wong J. Clinical Significance of Angiogenesis in Gastrointestinal Cancers – A Target of Novel Prognostic and Therapeutic Approaches. *Ann Surg* 2003; 238: 9-28.
104. Nicosia R. What is the Role of Vascular Endothelial Growth Factor-Related Molecules in Tumor Angiogenesis. *Am J Pathol* 1998; 153: 11-6.

105. Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996; 271: 603-6.
106. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumors: an International Consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2474-84.
107. 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.
108. Wilson KT. Angiogenic markers, neovascularization and malignant deformation of Barrett's esophagus. *Dis Esoph* 2002; 15: 16-21.
109. DeMeester SR. Lymph node involvement in esophageal adenocarcinoma: If you see one, have you seen them all? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126: 947-9.
110. Lerut T, Coosemans W, Decker G et al. Extracapsular lymph node involvement is a negative prognostic factor in T3 adenocarcinoma of the distal esophagus and gastroesophageal junction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126: 1121-7
111. 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: 1366-72.

112. Torres C, Wang H, Tuner SJ, Shahsafaei A, Odze RD. Prognostic significance and effect of chemorradioterapy on microvessel density in esophageal Barrett's adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Human Pathol* 1999; 30: 753-8
113. McDonnell CO, Bouchier-Hayes DJ, Toomey D, Foley D, Kay EW, Leen E, Walsh TN. Effect of neoadjuvant chemoradiotherapy on angiogenesis in oesophageal cancer. *Br J Surg* 2003; 90: 1373-8.
114. McDonnell CO, Harvey JH, Bouchier-Hayes DJ, Walsh NJ. Effect of multimodality therapy on circulating vascular endothelial growth factor levels in patients with esophageal cancer. *Br J Surg* 2001; 88: 1105-9
115. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002; 347: 1593-603.
116. Tockman M, Gupta PK, Presman NJ et al. Considerations in bringing a câncer biomarker to clinical aplication. *Cancer Res* 1992; 52: 2711-8
117. Kleef J, Fries H, Liao Q, Bûchler MW. Immunohistochemical presntation in non-malignant and malignant Barrett's epithelium. *Dis Esoph* 2002; 15: 10-15.
118. Lord RVN, Park JM, Wickramasinghe K et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor expression in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125: 246-53.

119. Harrison RF, Perry I, Jankowski JA. Barrett's mucosa: remodeling by the microenvironment. *J Pathol* 2000; 192: 1-3.
120. Folkman J. New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2534-9.
121. Gasparini G, Toi M, Miceli R. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in patients with node-positive breast cancer treated with earlier adjuvant chemotherapy or hormone therapy. *Cancer J Sci Am* 1999; 5: 101.
122. Kotoh T, Dhar DK, Masunaga R et al. Antiangiogenic therapy of human esophageal cancers with thalidomide in nude mice. *Surgery* 1999; 125: 536-44.
123. Cramer DA. Applied vascular biology: can angiogenesis inhibitors help control malignant growth? *Ann Intern Med* 1998; 129: 841-4.
124. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277-85.

## **10 Anexos**

### **10.1 Artigo Científico em Língua Portuguesa**

**A Expressão da Proteína p53 e do VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular) Determinada por Avaliação Imuno-Histoquímica não Altera o Prognóstico em Pacientes com Adenocarcinoma do Esôfago Avançado**

Leandro Totti Cavazzola (1), André Ricardo Pereira da Rosa (1), Carlos Cauduro Schirmer (1), Richard Ricachenevski Gurski (1), João Pedro Bueno Telles (1), Fernando Mielke (1), Luíse Meurer (2), Maria Isabel Albano Edelweiss (2), Cleber Dario Pinto Krueel (2)

**Serviços de Cirurgia Geral (1) e Patologia (2) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.**

Dr Leandro Totti Cavazzola

Av Montenegro 163/802, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90460-160. e-mail: [cavazzola@via-rs.net](mailto:cavazzola@via-rs.net)

**RESUMO.** O prognóstico dos pacientes com adenocarcinoma de esôfago é bastante prejudicado pelo seu diagnóstico tardio. Na tentativa de determinar fatores que possam alterar o prognóstico destes pacientes, o estudo da biologia molecular tem recebido grande importância. As mutações no gene de supressão tumoral TP53 estão entre as anormalidades genéticas mais comuns encontradas numa ampla variedade de tumores. 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 desta angiogênese tumoral. A associação entre as expressões da proteína p53 e do VEGF e o prognóstico tem sido pouco estudada. Foram avaliados 46 pacientes com adenocarcinoma de esôfago submetidos à cirurgia de ressecção com intenção curativa. As expressões da proteína p53 e do VEGF foram observadas por análise imuno-histoquímica em 52,2% e 47,8% dos tumores, respectivamente. As expressões da proteína p53 e do VEGF coincidiram em 26% dos casos, e não foi encontrada correlação entre essa expressão. Nenhum dos fatores clinicopatológicos se correlacionou significativamente com as expressões da proteína p53 ou do VEGF. Não houve associação significativa entre as expressões da proteína p53 e do VEGF e sobrevida a longo prazo. No presente estudo, a expressão da proteína p53 e do VEGF, embora em porcentagem similar à da literatura, não se correlacionou com o prognóstico em pacientes com adenocarcinoma de esôfago submetidos à cirurgia com intenção curativa.

Palavras-chave: esôfago, adenocarcinoma, prognóstico, marcadores tumorais, p53, VEGF, sobrevida.



## **ABSTRACT**

### **Immunohistochemical evaluation for p53 and VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) is not prognostic for long term survival in end stage esophageal adenocarcinoma**

The prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma is negatively influenced by late diagnosis. In an attempt to determine the factors that might improve the prognosis of these patients, molecular biology has been of great importance. P53 tumor suppressor gene mutations are one of the most frequent genetic disorders found in a wide variety of tumors. Angiogenesis is essential for the growth and metastatic spread of solid tumors. The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), a recently identified factor with remarkable angiogenic properties, may play a central regulatory role in tumor angiogenesis. The association between p53 protein and VEGF expressions and prognosis has been underinvestigated. Forty-six patients with esophageal adenocarcinoma, submitted to curative resection, were studied. The expressions of p53 protein and VEGF were assessed by immunohistochemistry in 52.2% and 47.8% of tumors, respectively. P53 protein and VEGF expressions coincided in 26% of the cases, and no correlation between these expressions was observed. None of the clinicopathological factors showed a significant correlation with p53 protein or VEGF expressions. There was no significant association between p53 protein and VEGF expressions and long-term survival. In the present study, the expression of p53 protein and VEGF, albeit similar to the one reported in the literature, did not correlate with prognosis in esophageal adenocarcinoma patients submitted to curative resection.

Key words: esophagus, adenocarcinoma, prognosis, tumor markers, p53, VEGF, survival.

## **Introdução**

O câncer de esôfago é uma das neoplasias malignas mais devastadoras do trato gastrointestinal. O diagnóstico tardio, associado ao comportamento biológico agressivo, implica em prognóstico sombrio para os portadores desta doença (1).

A possibilidade de se definir parâmetros que auxiliem a prever a agressividade biológica e o comportamento destes tumores se faz imperativa, na tentativa de definir quais os pacientes devem ser considerados para abordagem cirúrgica com intenção curativa, acompanhada ou não de tratamentos complementares (como quimio e radioterapia), e os pacientes que não apresentarão benefício em uma abordagem agressiva tendo em vista a ausência de resposta a tratamentos neoadjuvantes ou complementares (2, 3).

O estudo da biologia molecular tem demonstrado que grande parte dos tumores malignos resulta da interação entre o componente hereditário e influências externas, que em indivíduos predispostos podem ocasionar alterações genéticas que influenciem o controle da diferenciação e crescimento celular.

O gene TP53 está localizado no braço curto do cromossomo 17, estando incluído no grupo dos genes supressores de tumores. Perdas alélicas envolvendo esse gene estão associadas com formas mutantes do gene. Estas mutações estão entre as alterações genéticas mais frequentes nos tumores malignos em geral (4). Cerca de metade dos tumores de cólon, estômago, pulmão, mama, fígado, cérebro e tecidos reticuloendotelial e hematopoiético contém alterações no código do gene TP53, demonstrando que a inativação do gene supressor TP53 é passo quase universal no desenvolvimento de câncer em humanos (4-6).

Analisando os carcinomas de esôfago especificamente, alterações no gene TP53 são detectadas em 36 a 80% dos casos e parecem ocorrer precocemente na gênese tumoral,

estando presentes da displasia ao carcinoma e da metaplasia de Barrett ao adenocarcinoma (3, 4, 7, 8) .

Em condições fisiológicas normais, a formação de novos capilares sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (denominada de angiogênese), é um processo fundamental no desenvolvimento e na homeostasia. Ocorre durante a embriogênese, ciclos menstruais intensos e, por ser importante mecanismo de reparo, está presente em funções regenerativas e após exercício físico intenso, lesões nervosas, na cicatrização das feridas e no crescimento ósseo. Nessas situações, possui um caráter autolimitado e controlado, através da presença de fatores que tem um efeito angiogênico positivo contrapostos contra fatores com efeito angiogênico negativo (9, 10).

Possui um papel essencial no desenvolvimento de tumores sólidos, tendo em vista que a partir de um determinado tamanho, novos vasos são fundamentais para o seu crescimento, podendo inclusive contribuir para que ocorra o desenvolvimento de metástases à distância através da disseminação de células que se desprendem do tumor através dos neovasos (11).

O VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) é secretado pelas células tumorais e estimula o crescimento das células endoteliais, normalmente em resposta a estímulos externos como hipóxia ou substâncias secretadas pelo organismo. Nos pacientes com tumores de esôfago em geral, sua expressão foi demonstrada em 31-60% dos casos (12-19). Poucos estudos existem correlacionando a expressão do VEGF e o prognóstico em pacientes com carcinoma de esôfago, e a sua maioria possui pacientes com o tipo epidermóide. Os resultados disponíveis até o momento são conflitantes (12-19).

O gene TP53 parece ter papel fundamental no desenvolvimento e progressão tumoral através da regulação da expressão do VEGF, ainda que por um mecanismo não completamente entendido (20, 21). As evidências atuais sugerem uma atuação via aumento da expressão do RNAm do VEGF através da perda da função supressora do gene TP53 (10, 22).

Existem poucos estudos avaliando esta co-expressão em pacientes com carcinoma de esôfago, e a sua maioria utiliza o tipo histológico epidermóide, com resultados ainda conflitantes em relação a sua possibilidade de uso como fator prognóstico independente. (50-52,56). Ainda não está clara esta relação, e se ela realmente existe de forma direta, mas é possível que a co-expressão proteína p53/VEGF determinada por imuno-histoquímica tenha um papel importante no entendimento da angiogênese e no desenvolvimento metastático, podendo no futuro se apresentar como fator prognóstico (17, 23).

## **Pacientes e Métodos**

### Casuística

Todos os pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago atendidos no Ambulatório do Grupo de Cirurgia de Esôfago, Estômago e Intestino Delgado (GCEEID) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) no período de Julho de 1993 a Julho de 2001, submetidos a cirurgia de ressecção com intenção curativa foram avaliados prospectivamente através de um protocolo previamente descrito (24, 25). Foram excluídos os pacientes com mortalidade pós-operatória precoce, considerada como morte até 30 dias da cirurgia ou até a alta hospitalar, história ou presença de outra neoplasia maligna concomitante, tratamento neoadjuvante (quimioterapia e/ou radioterapia), ressecção incompleta (margens cirúrgicas comprometidas) e pacientes em que não foi possível localizar o bloco de parafina.

O delineamento utilizado foi de uma coorte histórica, considerando-se o tempo zero como o tratamento cirúrgico. Foram utilizadas variáveis demográficas como idade, sexo, tabagismo, etilismo, classificação de Siewert (altura da lesão em relação à junção esofagogástrica) (26), tipos de cirurgia de ressecção realizadas, mortalidade pós-operatória precoce e a sobrevida dos pacientes após o início do tratamento. Na análise histopatológica, considerou-se o grau de diferenciação histológica; a profundidade de penetração do tumor na parede esofágica, o comprometimento linfonodal e o estadiamento patológico (TNM-UICC) (25). As variáveis principais em estudo foram a expressão da proteína p53 mutante e do VEGF, comparando-se os grupos onde esta expressão esteve presente, considerados com positivos (+) ou ausente, considerados como negativos (-) em relação às variáveis sócio-demográficas citadas.

O desfecho considerado foi o óbito decorrente do adenocarcinoma de esôfago ou situação de vida até 12/2002. Os pacientes que morreram por causa diversa do câncer de esôfago ou que tiveram o seguimento perdido foram censurados. As informações a respeito da

sobrevida dos pacientes foram obtidas a partir do prontuário médico e do acompanhamento ambulatorial e hospitalar dos pacientes tratados, além de telefonemas e correspondências.

#### Análise anátomo-patológica e preparação tecidual

A análise da peça cirúrgica incluiu a determinação da profundidade de penetração do tumor na parede esofágica e o comprometimento das margens cirúrgicas, do comprometimento ganglionar, dos limites cirúrgicos (proximal, distal e circunferencial) e do grau de diferenciação histológica. O estágio histopatológico da doença (pTNM) foi definido de acordo com o estabelecido pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) (25). As peças cirúrgicas ressecadas foram fixadas em formalina a 10% e embebidas em parafina, conforme rotina do serviço de patologia do HCPA na época do procedimento. Cortes de 4 micrômetros de espessura foram feitos nos blocos de parafina, sendo posteriormente montados em lâminas de vidro.

#### Anticorpos e reagentes

Para a identificação da proteína p53 foi utilizado o anticorpo monoclonal de camundongo DO-7 (Pab 1801, Sigma Biosciences, St Louis, MO, 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 sugere o acúmulo anormal da forma mutante.

O anticorpo policlonal de coelho A-20 reconhece o VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). Este é 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 HCPA usando os anticorpos primários anteriormente descritos.

A técnica consiste em 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 Corporation, Carpinteria, CA, USA) e a revelação com a utilização do diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA). 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 ou p53+). O bloqueio com soro normal e a ausência do anticorpo primário foram usados como controles negativos (27, 28).

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 ou VEGF+). O músculo liso das camadas muscular própria ou muscular da mucosa serviu como controle interno positivo, já que as células musculares lisas também expressam o

VEGF (13, 14, 19, 29).

As lâminas foram examinadas por dois investigadores sem conhecimento das informações clínicas e histopatológicas. Foi realizado o teste de kappa para controle da concordância interobservador.

Os 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

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.

#### Ética

Tendo em vista que o presente estudo foi parte integrante do protocolo de atendimento aos pacientes com adenocarcinoma de esôfago atendidos no GCEEID/HCPA, que já possuía aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA e que nenhuma intervenção experimental foi realizada nos pacientes, pode-se eximir do pesquisador a necessidade do termo de consentimento pós-informação. Os pesquisadores se comprometeram a explicar ao paciente ou aos familiares a importância das informações obtidas e a não revelar os resultados da pesquisa de forma individual/nominal. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA sob o número 03-100: Determinação de Fatores Prognósticos em Adenocarcinoma



do Esôfago: Avaliação da Expressão da Proteína p53 e do VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular).

#### 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. Para o controle da concordância interobservador foi utilizado o teste de Kappa. 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:**

No período de julho de 1993 a julho de 2001 foram atendidos no GCEEID/HCPA 116 pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago. Destes pacientes, 50 (43,1%) foram submetidos à cirurgia com intenção curativa após a avaliação pré-operatória previamente descrita. Em 4 casos não foi possível a localização dos blocos de parafina para realização do estudo imuno-histoquímico, resultando em uma amostra de 46 pacientes.

Destes 46 pacientes, 8 (17,4%) foram excluídos do estudo de sobrevida por evoluírem para óbito durante a internação (mortalidade pós-operatória precoce), sendo considerados apenas para o estudo de prevalência.

Dos 46 pacientes estudados, 24 (52,2%) apresentaram positividade para a proteína p53 conforme a análise imuno-histoquímica. Em relação ao VEGF, 22 pacientes (47,8%) foram considerados como apresentando anticorpos positivos para esta proteína.

Quando são excluídos os pacientes com mortalidade operatória precoce, obtém-se um resultado de 20 (52,6%) pacientes considerados p53+ e 19 (50%) considerados VEGF positivos.

Considerando apenas os pacientes incluídos no estudo de sobrevida, a idade média foi de 60,6 anos (variando de 36,6 a 78), sendo 30 pacientes do sexo masculino (78,9%), sem sua maioria tabagistas (29 casos, 76,3%). O alcoolismo esteve presente em 47,4 % dos pacientes estudados (18 casos). A cirurgia mais realizada foi a esofagectomia, em 20 casos (52,6%), sendo na maior parte das vezes o procedimento completado pela via transhiatal (19 casos), reservando-se a gastrectomia total com esofagectomia distal para os 18 casos restantes. Esta foi a amostra utilizada para o estudo de sobrevida, constituída de 38 pacientes, caracterizados conforme demonstra a tabela 1 abaixo.

Não foi demonstrada no presente estudo correlação estatisticamente significativa entre as expressões da proteína p53 e do VEGF e as variáveis idade, sexo, tabagismo, alcoolismo, classificação de Siewert, tipo de cirurgia realizada, grau de diferenciação histológica, penetração da lesão na parede esofágica (T), comprometimento linfonodal (N), presença de metástases à distância (M) e o estadiamento anatomopatológico. (Tabela 1)

A concordância interobservador foi testada através da utilização do teste de Kappa, que apresentou um valor de  $Kappa=0,912$ , com uma significância estatística para um  $p<0,0001$  quando levada em conta a análise da expressão da proteína p53 pelo exame imunohistoquímico, demonstrando uma concordância bastante elevada entre os dois observadores alocados para o presente estudo. As discordâncias presentes foram avaliadas através de uma reunião de consenso para que o diagnóstico definitivo fosse firmado.

Tabela 1 – Correlação entre a positividade para imuno-histoquímica da proteína p53 e do VEGF e variáveis clinicopatológicas

| Variável        | n              | p53+<br>20 | p53-<br>18 | p     | VEGF +<br>19 | VEGF-<br>19 | p     |
|-----------------|----------------|------------|------------|-------|--------------|-------------|-------|
| Idade           | Média          | 59,1       | 62,45      | 0,357 | 60,62        | 60,78       | 0,592 |
|                 | DP             | 8,93       | 12,91      |       | 9,25         | 12,73       |       |
| Sexo            | Masculino      | 17 (85)    | 13 (72,2)  | 0,438 | 16 (84,2)    | 14 (73,7)   | 0,693 |
| Tabagismo       |                | 15 (75)    | 14 (77,8)  | 1     | 15 (78,9)    | 14 (73,7)   | 1     |
| Álcool          |                | 10 (50)    | 8 (44,4)   | 0,757 | 11 (57,9)    | 7 (36,8)    | 0,330 |
| Siewert*        | Tipo I         | 4 (20)     | 3 (16,7)   | 0,953 | 4 (21,1)     | 3 (15,8)    | 0,904 |
|                 | Tipo II        | 9 (45)     | 8 (44,4)   |       | 8 (42,1)     | 9 (47,4)    |       |
|                 | Tipo III       | 7 (35)     | 7 (38,9)   |       | 7 (36,8)     | 7 (36,8)    |       |
| Cirurgia        | Esofagectomia  | 9 (45)     | 11 (61,2)  | 0,352 | 8 (42,1)     | 12 (63,2)   | 0,330 |
|                 | Gastrectomia   | 11 (55)    | 7 (38,8)   |       | 11 (57,9)    | 7 (36,8)    |       |
| Diferenciação   | Bem            | 1 (5)      | 5 (27,8)   | 0,128 | 4 (21,1)     | 2 (10,5)    | 0,407 |
|                 | Moderadamente  | 8 (40)     | 4 (22,2)   |       | 7 (36,8)     | 5 (16,3)    |       |
|                 | Pouco          | 11 (55)    | 9 (50)     |       | 8 (42,1)     | 12 (63,2)   |       |
|                 | Indiferenciado | 0          | 0          |       | 0            | 0           |       |
| T **            | T1             | 2 (10)     | 4 (22,2)   | 0,721 | 4 (21,1)     | 2 (10,5)    | 0,122 |
|                 | T2             | 3 (15)     | 3 (16,7)   |       | 4 (21,1)     | 2 (10,5)    |       |
|                 | T3             | 8 (40)     | 5 (27,8)   |       | 3 (15,8)     | 10 (52,6)   |       |
|                 | T4             | 7 (35)     | 6 (33,3)   |       | 8 (42,1)     | 5 (26,3)    |       |
| N **            | N0             | 10 (50)    | 8 (44,4)   | 0,757 | 10 (52,6)    | 8 (42,1)    | 0,746 |
|                 | N1             | 10 (50)    | 10 (55,6)  |       | 9 (47,4)     | 11 (57,9)   |       |
| M **            | M0             | 18 (90)    | 16 (88,9)  | 1     | 17 (89,5)    | 17 (89,5)   | 1     |
|                 | M1             | 2 (10)     | 1 (11,1)   |       | 2 (10,5)     | 1 (10,5)    |       |
| Estadiamento ** | I              | 2 (10)     | 3 (16,7)   | 0,472 | 3 (15,8)     | 2 (10,5)    | 0,462 |
|                 | II             | 4 (20)     | 5 (27,8)   |       | 6 (31,6)     | 3 (15,7)    |       |
|                 | III            | 12 (60)    | 8 (44,4)   |       | 8 (42,1)     | 12 (63,2)   |       |
|                 | IV             | 2 (10)     | 2 (11,1)   |       | 2 (10,5)     | 2 (10,6)    |       |

n=número de pacientes. DP=Desvio-padrão. Dados apresentados como n(porcentagem)

\*Siewert= Classificação de Siewert para o Adenocarcinoma do Cárdia (64)

Tipo I: adenocarcinoma do esôfago distal

Tipo II: adenocarcinoma do epitélio do cárdia ou segmentos curtos com MI na JEG

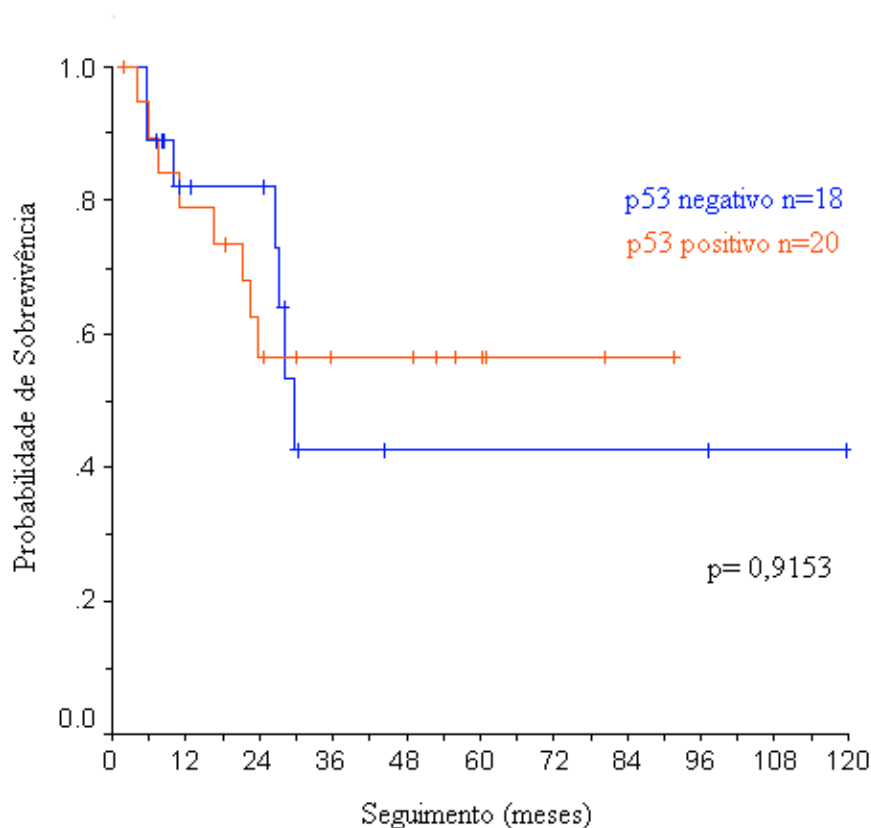
Tipo III: adenocarcinoma gástrico subcárdico com infiltração da JEG e esôfago distal

\*\* Estadiamento UICC (referência 25)

O tempo médio de seguimento foi de 31,5 meses (2-120 meses, DP= 28,3 meses). A sobrevida média foi de 70,4 meses (IC=51,9 - 88,5; EP=9,4). Dos 38 pacientes estudados, 15 (39,4%) apresentaram o desfecho óbito no período de seguimento determinado.

A expressão da proteína p53 determinada pela imuno-histoquímica demonstrou que a sobrevida média dos pacientes positivos para esta condição (p53+) foi de 58,1 meses (IC= 40,4 - 75,7; EP=9), enquanto que para os pacientes onde a reação se mostrou negativa obteve média de 63,22 meses (IC=34,3 - 92,1, EP= 14,7). Esta diferença não apresentou significância estatística (p=0,9153)

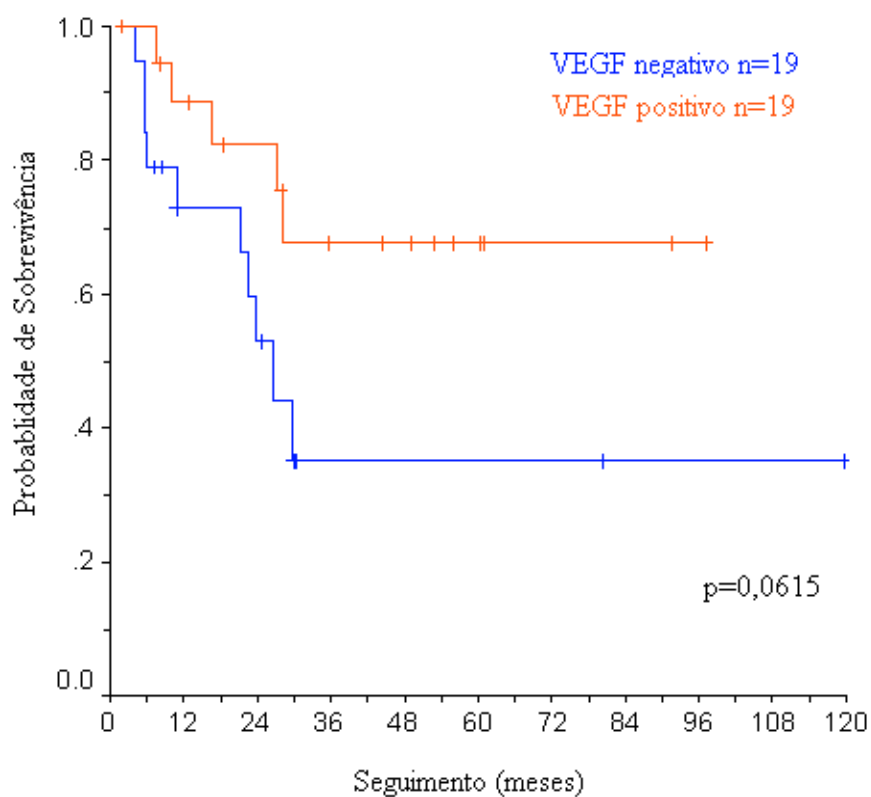
**Figura 1 - Curva de sobrevida de acordo com a expressão da proteína p53**



Os pacientes que expressaram o VEGF na análise imunohistoquímica (VEGF+) apresentaram uma sobrevida média de 72 meses (IC= 53,5 - 90,5; EP=9), enquanto que para

os pacientes onde a reação se mostrou negativa (VEGF-) a média foi de 53,5 meses (IC= 27,5-79,4; EP= 13,2). Não há diferença estatística entre os grupos estudados ( $p=0,0615$ ), conforme demonstrado na figura 2.

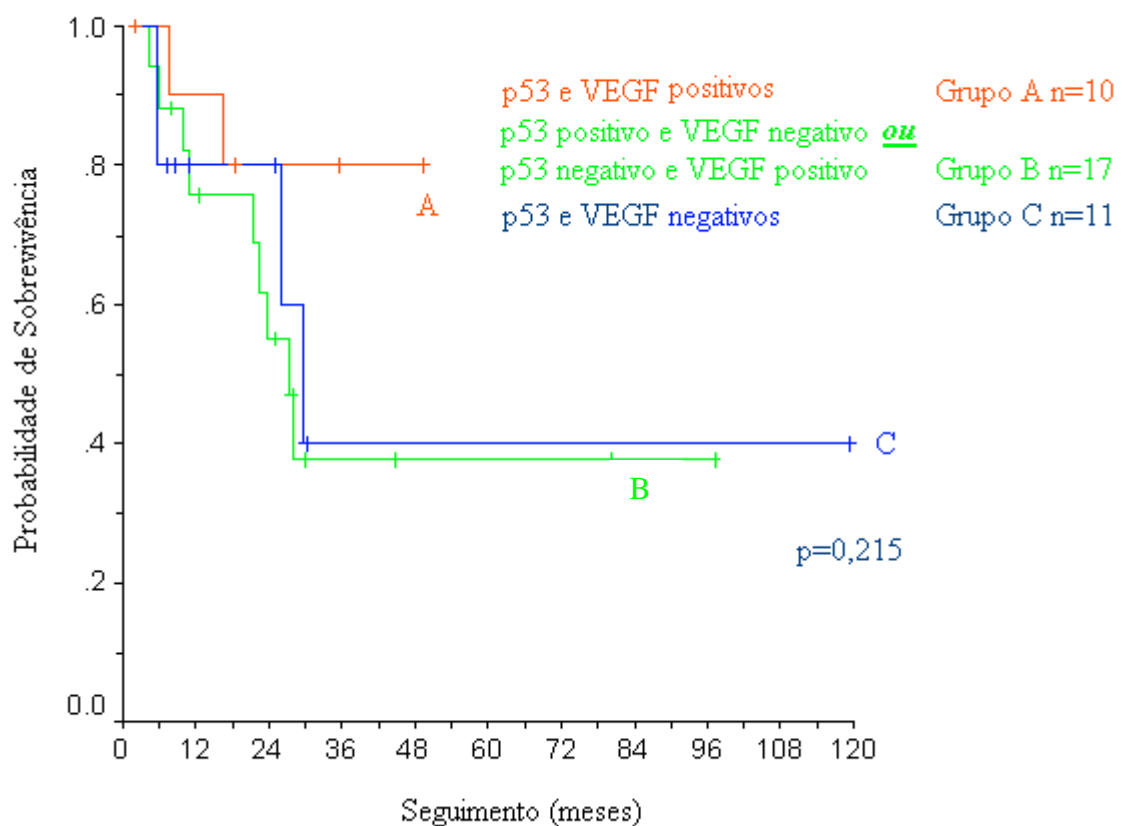
**Figura 2 - Curva de sobrevida de acordo com a expressão do VEGF**



Para avaliar a possibilidade de que a co-expressão da proteína p53 e do VEGF pudesse alterar o prognóstico dos pacientes com adenocarcinoma do esôfago foram criados 3 grupos: Grupo A, para os pacientes com expressão positiva das duas variáveis (p53+ e VEGF+); Grupo B, em que pelo menos uma das variáveis era considerada positiva (p53+ e VEGF- ou p53- e VEGF+) e Grupo C, onde ambas não foram detectadas (p53- e VEGF-). A sobrevida média para os pacientes do grupo A foi de 75,7 meses (IC= 55,9 - 95,5; EP=10), para o grupo

B foi de 48,01 meses (IC= 27,3 - 68,7; EP= 10,6) e para o grupo C foi de 60,2 meses (IC= 20,3 - 99,9; EP= 20,3), não sendo demonstrada diferença no presente estudo entre os grupos ( $p=0,2115$ ), como demonstra a figura 3.

**Figura 3 - Curva de Sobrevida de acordo com a co-expressão da proteína p53 e do VEGF**



Na tentativa de determinar a influência dos fatores prognósticos considerados mais importantes dentro do presente estudo, foram selecionados a profundidade de invasão do tumor (T), a presença de linfonodos comprometidos (N), o estadiamento cirúrgico (TNM), o grau de diferenciação tumoral e a classificação de Siewert). Nenhum destes fatores influenciou diretamente a sobrevida, conforme demonstrado na tabela 2 abaixo.

**Tabela 2 – Análise Multivariada dos Fatores em Estudo \***

| Variável | RR    | IC            | p     |
|----------|-------|---------------|-------|
| p53      | 1,429 | (0,429-4,725) | 0,514 |
| VEGF     | 0,369 | (0,095-1,436) | 0,115 |

\* Ajustado pelo modelo de regressão de azares proporcionais de Cox para as variáveis profundidade de invasão do tumor, presença de linfonodos comprometidos, estadiamento cirúrgico, grau de diferenciação tumoral e classificação de Siewert



## **Discussão:**

O perfil epidemiológico dos pacientes no presente estudo é concordante com os de outros centros de referência para adenocarcinoma de esôfago no resto do mundo (30-32). A predominância de indivíduos do sexo masculino, acima dos 60 anos, tabagistas e etilistas encontrada nesta casuística reforça a importância do conhecimento destes fatores de risco na tentativa de detectar pacientes com maior chance de desenvolverem neoplasias malignas do esôfago e de projetar estratégias de prevenção (30, 33, 34)

Dentre os demais fatores de risco conhecidos na literatura para o desenvolvimento do adenocarcinoma de esôfago, a presença de doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) de longa data, ou mesmo o achado clínico de pirose, parecem estar implicados em um aumento na chance do aparecimento desta neoplasia ao longo do tempo (35). No entanto, tendo em vista o caráter retrospectivo do presente estudo e a dificuldade em objetivar as informações referentes a este dado que puderam ser obtidas na revisão dos prontuários optou-se por não utilizar os resultados aferidos. Da mesma forma, a obesidade, também considerada como fator determinante de risco para o desenvolvimento de adenocarcinomas de esôfago (34, 36, 37), não foi avaliada no presente estudo. A presença de esôfago de Barrett (metaplasia intestinal presente no esôfago, em pacientes com DRGE crônico) (34, 38, 39), que também está associada com um maior risco de adenocarcinoma (8, 36, 40) fica com sua avaliação prejudicada nesses pacientes tendo em vista a extensão da doença no momento do diagnóstico (63,2 % pacientes com estágio III e IV), onde a mucosa com alterações metaplásicas pode ser completamente englobada pela progressão do tumor (33, 41).

O crescente diagnóstico dos tumores do tipo adenocarcinoma em contrapartida a uma estabilidade nas taxas de ocorrência do tipo epidermóide já vem sendo relatada há vários anos na literatura ocidental (33, 34, 36, 40, 42-43). Ainda permanece controverso o motivo porque, em séries ocidentais, o adenocarcinoma representa atualmente mais de 50% dos tumores

primários do esôfago, em contrapartida aos cerca de 5% que representava nos anos 70 (36, 40). Algumas das tentativas de elucidar este fato estão centradas na diminuição da incidência de infecção por *Helicobacter pylori*, considerado por alguns autores como fator protetor para o desenvolvimento de adenocarcinoma de esôfago (42), concomitante a um aumento na prevalência de obesidade mórbida (36). Apesar das altas taxas relatadas na literatura, há grande dificuldade em comprovar o real aumento da incidência do esôfago de Barrett, que poderia ser explicada pela disseminação e especificidade dos métodos de diagnóstico, sem que isso implique no aumento das taxas pré-existentes (33, 36, 40). No GCEEID/HCPA no período de tempo do presente estudo (julho 1993-julho 2001), foram avaliados 379 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago e 116 pacientes (23,4% casuística total) com adenocarcinoma de junção esôfago-gástrica.

Os tumores da junção esôfago-gástrica são, na sua maior parte, agrupados como uma entidade única (41, 43, 44-46), ainda que esta postura seja controversa, tendo em vista algumas características biológicas e histopatológicas distintas ressaltadas por alguns autores (47,48).

Esta divisão tem implicação inclusive do ponto de vista de classificação histopatológica pós-operatória. Se for utilizada a classificação de Siewert para os tumores da junção, por exemplo, os tumores do tipo I e II devem ser classificados (e estadiados) como tumores de esôfago, enquanto que os tumores do tipo III incluídos na classificação TNM para os tumores de estômago (26, 48-51), o que gera confusão para avaliação dos resultados tanto da avaliação pré-operatória quanto do estadiamento e tratamento. No presente estudo, considerou-se o TNM para os tumores de esôfago no estadiamento dos pacientes. (41, 43, 44-46), como sugerido inclusive pelo próprio Siewert (50)

Da mesma forma, a maior parte dos estudos disponíveis até o momento engloba os tumores epiteliais do esôfago como uma doença única, caracterizando os adenocarcinomas e

carcinomas epidermóides como uma entidade clínica isolada, possivelmente com o objetivo de poder oferecer um número maior de pacientes em suas casuísticas. Ainda que defendida por alguns (52-54), esta posição possui diversos contestadores, que demonstram inclusive que o tipo histológico pode (e deve) ser considerado com fator prognóstico isolado nos pacientes com lesões malignas do esôfago (48, 50, 55).

O índice de ressecabilidade nos pacientes desta série (43,1% - 50 pacientes de um universo de 116 atendidos em 8 anos) é inferior ao de grandes séries da literatura para este tipo de tumor, onde são demonstrados índices de ressecção de até 75,5% (50). Somada à elevada mortalidade peri-operatória precoce demonstrada na presente casuística (8 pacientes – 17,4% dos pacientes operados com intenção curativa), pode-se inferir que a presente série é composta por maior quantidade de pacientes com tumores em estágios mais avançados da doença, com conseqüente pior prognóstico e com maiores chances de complicações pós-cirúrgicas, tendo em vista a extensão da doença.

As características locorreionais e de envolvimento ganglionar dos adenocarcinomas de esôfago justificam a utilização da abordagem transmediastinal na maioria dos casos de tumores do tipo I e II (51) e mesmo a abordagem apenas abdominal com extensão da ressecção da gastrectomia proximal ao esôfago distal nos pacientes com tumores tipo III, através de uma ampla exposição do hiato esofágico e do mediastino (49-50). Esta conduta está centrada no fato de que, em sua imensa maioria, estas lesões possuem disseminação metastática ganglionar para o mediastino posterior inferior, a região justa-cárdica e pela pequena curvatura gástrica até o tronco celíaco, áreas facilmente abordadas pelas técnicas supracitadas (50, 51).

Os dados referentes à classificação de Siewert demonstram que a porcentagem de tumores neste estudo se dividiu da seguinte maneira: tipo I - 7 casos (18,4%); tipo II – 17 casos (44,7%) e tipo III – 14 casos (36,8%), diferente em relação aos dados da maior série

mundial (48), com cerca de 1000 pacientes, que demonstra 36% de tumores do tipo I, 27% de tumores do tipo II e 37% tumores do tipo III. A menor ocorrência de tumores do tipo I nesta casuística pode estar relacionada ao fato de, com a detecção mais tardia dos tumores (63,2 % pacientes com estágio III e IV) do que na série correlata (cerca de 37% estágio III e IV), a diferenciação clínica entre os tumores do tipo I e II esteja prejudicada pela extensão locorregional da doença.

Diversos têm sido os esforços de determinar marcadores biológicos que possam influenciar a progressão do esôfago de Barrett na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma de esôfago. O TP53 parece estar implicado de forma importante neste processo (8, 33, 56-59). Tendo em vista sua capacidade de “monitorar” a integridade do genoma, o TP53 é considerado por diversos autores como um “guardião da molécula”, e em condições normais é ativado para regular negativamente a proliferação celular na transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular, sendo denominado de TP53 normal ou selvagem (6, 56). Mutações que ocorram no TP53 facilitam a instabilidade genômica e podem propiciar o aparecimento de linhagens celulares com defeitos importante em seu conteúdo nuclear e conseqüente imortalidade, levando à formação de tumores (5, 6, 56). A perda da função de supressão pode ocorrer por mutação, rearranjo cromossômico, não-disjunção, conversão gênica, impressão ou recombinação mitótica. A interação com outras proteínas celulares ou oncoproteínas virais também pode neutralizar esta atividade supressora (5, 6) .

Os principais métodos atualmente disponíveis para a determinação da expressão da proteína p53 são a imuno-histoquímica e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Apesar de mais sensível e específica que a imuno-histoquímica para a identificação de anormalidades do TP53, a PCR possui uma utilização clínica pouco prática, embora seja usada de forma rotineira na pesquisa em biologia molecular (5, 43). A técnica de imuno-histoquímica é fácil, barata e pode ser executada em qualquer laboratório de patologia, o que justifica seu uso em

larga escala na literatura (60-62). Esta técnica tem como objetivo detectar alterações fenotípicas da expressão da proteína p53. Em condições normais, a proteína p53 selvagem possui uma meia-vida curta, não sendo possível sua detecção através da imunoprecipitação. No entanto, quando ocorrem mutações no gene TP53, pode ocorrer um aumento na meia-vida da proteína para até 6 horas, permitindo sua identificação por imuno-histoquímica (5, 6). Sua utilização deve ser vista com cautela, uma vez que a ausência de expressão da proteína p53 não necessariamente exclui a existência de mutações (5, 6). Por exemplo, tumores com deleção de ambos os alelos do gene p53 podem ser classificados como negativos juntamente com tumores sem expressão da proteína p53 (5). Além disso, alguns tipos de vírus (alguns adenovírus, papilomavírus) podem causar alterações na estabilidade da proteína p53, permitindo que ela possa ser detectada pela imuno-histoquímica e levando a resultados falso-positivos (5). Para alguns autores, uma outra limitação importante da técnica é a dificuldade de reproduzir a avaliação entre diferentes patologistas (63), fato que não foi observado na presente casuística, onde a concordância entre os patologistas foi bastante elevada, confirmado pelo elevado valor obtido no teste de Kappa, demonstrando grande concordância entre os diagnósticos efetuados.

Alterações no gene TP53 são detectadas em 36 a 80% dos pacientes com câncer de esôfago e parecem ocorrer precocemente na gênese tumoral esofágica, estando presente da displasia ao carcinoma e da metaplasia no esôfago de Barrett ao adenocarcinoma (7, 8, 64, 65). No entanto, grande parte das casuísticas ainda não divide os pacientes em subgrupos conforme o tipo histológico, impedindo que haja um consenso sobre o real papel do TP53 nos adenocarcinomas de esôfago (3, 7, 8, 27, 43, 62, 66-68). A prevalência da expressão da proteína p53 na presente série (57,2%) é concordante com os achados da literatura.

No presente estudo, não foi demonstrada correlação da proteína p53 determinada por análise imuno-histoquímica com alteração na sobrevivência a longo prazo. Embora alguns estudos

apontem que esta expressão tenha valor prognóstico, seu real papel nos adenocarcinomas de esôfago ainda não está definido (8, 27). Levando-se em conta que não ocorre expressão da proteína p53 em todos os pacientes com adenocarcinoma de esôfago, pode-se inferir a atuação de mecanismos diversos ao TP53 na gênese destes tumores (4, 27, 43, 54, 69), como por exemplo a perda de função dos genes p16, pRB e ciclina D1, que também podem levar ao dano ao DNA na fase G1 do ciclo celular (70-72).

A expressão da proteína p53 não se correlacionou com a maior invasão do tumor, levando em conta a classificação TNM, indicando que, na presente série, a alteração do gene p53 não apresenta diferença estatisticamente significativa nesses estágios, já ocorrendo em estágios precoces (I) e possivelmente aumentando em estágios mais avançados (IV) da doença (43, 57, 71), estando inclusive presente em alterações pré-malignas (7, 43, 70-72). A expressão da proteína p53 não foi um fator prognóstico independente em pacientes com adenocarcinoma nem se correlacionou com as demais características clinicopatológicas. No presente estudo, a expressão da proteína p53 também não esteve correlacionada com pior prognóstico, tanto após análise univariada quanto multivariada ajustada pelo modelo de regressão de azares proporcionais de Cox para as variáveis profundidade de invasão do tumor, presença de linfonodos comprometidos, estadiamento cirúrgico, grau de diferenciação tumoral e classificação de Siewert.

Os tumores sólidos podem receber afluxo de nutrientes até cerca de 1 a 2mm de diâmetro por mecanismos de difusão. Após este volume celular, é fundamental que ocorra a formação de neovasos para a sua progressão (11, 73-75). Dentre as proteínas envolvidas na formação de novos vasos sanguíneos nos diferentes tipos de tumores, um dos mais estudados é o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (76, 77).

O VEGF é um mitógeno específico da proliferação das células endoteliais, sendo produzido durante a embriogênese e durante a vida adulta em processos fisiológicos do

desenvolvimento e de reparo tecidual (embriogênese, ciclo menstrual, hipertrofia muscular secundária ao exercício), determinando o crescimento de novos vasos sanguíneos e o aumento da permeabilidade microvascular. Em situações patológicas, 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 (11, 78), que parece ser seu principal estímulo (11, 20, 79, 80). O VEGF é considerado o parâmetro mais importante dentre os marcadores de angiogênese (11).

No presente estudo a expressão do VEGF foi demonstrada em 47,8 % dos pacientes com adenocarcinoma de esôfago, consistente com os achados da literatura (13-19, 81). Esta expressão não se correlacionou com nenhuma das variáveis clínico-patológicas estudadas.

A maior parte dos estudos disponíveis sobre o efeito prognóstico da expressão do VEGF em pacientes com tumores de esôfago contempla pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (13, 15, 16, 18, 19, ,29). Nestes estudos, permanece controverso o papel do VEGF no prognóstico destes pacientes. Poucos estudos estão disponíveis na literatura avaliando o prognóstico dos pacientes com adenocarcinoma de esôfago nos quais a detecção do VEGF por imuno-histoquímica pode ser demonstrada (12, 14). Também nestes pacientes não é possível obter-se um consenso em relação ao verdadeiro fator prognóstico da expressão do VEGF. No presente estudo a expressão do VEGF não esteve associada com alteração do prognóstico a longo prazo, tanto na análise univariada como na análise multivariada ajustada para a profundidade de invasão do tumor, presença de linfonodos comprometidos, estadiamento cirúrgico, grau de diferenciação tumoral e classificação de Siewert.

Em um estudo realizado com pacientes com adenocarcinoma de esôfago que avaliou a expressão do VEGF e sua correlação com o prognóstico (12), a vascularização do tumor foi mais pronunciada em estágios mais precoces e se correlacionou com uma melhor sobrevida.

No entanto, neste estudo, quando foram excluídos os pacientes com tumores superficiais (que representavam cerca de 30% dos pacientes da amostra), a vascularização não apresentou valor prognóstico, e apesar da vascularização estar correlacionada com a expressão do VEGF, não houve significância prognóstica global. Conclui-se com estes dados que a angiogênese é marcada nas lesões pré-malignas e nos carcinomas precoces, sendo um evento precoce na progressão neoplásica (82) e que nos estágios mais avançados possivelmente os fatores prognósticos estabelecidos (grau de invasão na parede esofágica, presença de linfonodos comprometidos, grau de diferenciação tumoral, presença de metástases à distância) sejam mais importantes do que a angiogênese isoladamente na determinação do prognóstico (19, 76, 83, 84).

Quando o grupo estudado é formado por pacientes em estágios mais precoces e que conseqüentemente apresentarão um seguimento maior, a diferença entre as curvas de sobrevida a longo prazo provavelmente será maior, determinando-se então o seu valor prognóstico. A expressão do VEGF parece ser útil em pacientes nestes estágios iniciais da doença (85). Uma postura a ser adotada nestes casos seria a utilização de um tratamento mais agressivo (neo-adjuvante, por exemplo), em pacientes VEGF positivos, já que eles mais precocemente poderiam apresentar metástases e conseqüentemente pior prognóstico (19, 86-88).

O desenvolvimento e crescimento tumoral em estágios tardios (como na presente série) parece ser independente do VEGF, enquanto que o evento metastático inicial pode ser VEGF-dependente ou no mínimo estar correlacionado a este fator (85). Nos estágios mais tardios as manifestações angiogênicas são menos pronunciadas (12, 76, 82), e por isso talvez sua influência no prognóstico dos pacientes não possa ser demonstrada em séries com grande número de pacientes em estágios avançados da doença.



Evidências clínicas e experimentais tem sugerido um papel importante do TP53 na regulação da expressão do VEGF (15, 22). A expressão da proteína p53 estaria associada com um aumento na produção do VEGF (20, 21, 23), ainda que estudos recentes especificamente relacionados ao carcinoma (sem distinção de tipo histológico) de esôfago não tenham logrado sucesso em demonstrar tal associação (17, 19, 89). A co-expressão destas proteínas estaria associada com um pior prognóstico para os pacientes (15, 17).

No presente estudo a co-expressão entre a proteína p53 e o VEGF detectados por imuno-histoquímica esteve presente em 12 pacientes (26% dos casos), e esta associação não esteve correlacionada com pior prognóstico ou com a presença de características clínico-patológicas distintas nos grupos com e sem a expressão das proteínas em estudo.

Conclui-se que, no presente estudo a proteína p53 esteve expressa em 24 pacientes (52,2%) e sua expressão não esteve relacionada com pior prognóstico nestes pacientes, e que o VEGF esteve expresso em 22 pacientes (47,2%). Não houve relação entre a expressão deste fator determinada por imuno-histoquímica e a sobrevida a longo prazo destes pacientes. A associação entre a co-expressão da proteína p53 determinada por análise imuno-histoquímica e o VEGF não apresentou, no presente estudo, correlação com o prognóstico.

Dessa forma, nos pacientes estudados, a avaliação por imuno-histoquímica da proteína p53 e do VEGF não demonstrou ser fator prognóstico para sobrevida a longo prazo.

## **Referências Bibliográficas:**

1. Blot WJ. Cancer of the esophagus: its causes and changing patterns of occurrence. In: Perry MC, Whipple D, editors. Proceedings of the 33rd American Society of Clinical Oncology - Educational Book; 1997 May 17-20; Denver, USA. USA, American Society of Clinical Oncology; 1997. p. 159-63.
2. Ruol A. Multimodality treatment for non-metastatic cancer of the thoracic esophagus. *Dis Esoph* 1996; 9: 39-55.
3. Ribeiro Jr U, Filkelstein SD, Safatle-Ribeiro AV et al. p53 sequence analysis predicts treatment response and outcome of patients with esophageal carcinoma. *Cancer* 1998; 83:7-18.
4. Jenkins GJS, Doak SH, Parry JM, D'Souza FR, Griffiths AP, Baxter JN. Genetic pathways involved in the progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma. *Br J Surg* 2002; 89: 824-7.
5. Chang F, Syrjänen S, Tervahauta A, Syrjänen K. Tumourigenesis associated with the p53 tumour suppressor gene. *Br J Cancer* 1993; 68: 653-61.
6. Steele RJC, Thompson AM, Hall PA, Lane DP. The p53 tumor suppressor gene. *Br J Surg* 1998; 85: 1460-7.

7. Casson AG, Evans SC, Gillis A et al. Clinical implications of p53 tumor suppressor gene mutation and protein expression in esophageal adenocarcinomas: results of a ten-year prospective study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125: 1121-31
8. Dolan K, Walker SJ, Gosney J, Field JK, Sutton R. TP53 mutations in malignant and premalignant Barrett's esophagus. *Dis Esoph* 2003; 16: 83-9.
9. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1757-63.
10. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2413-22.
11. Gaiso MK. Antiangiogenesis: a new anticancer therapy ? *Medscape Oncology* 1999; 2: 1-5. Available at <http://www.medscape.com/viewarticle/408446>
12. Coulevard A, Paraf F, Gratio V et al. Angiogenesis in the neoplastic sequence of Barrett's oesophagus. Correlation with VEGF expression. *J Pathol* 2000; 192: 14-8.
13. Inoue K, Ozeki Y, Suganuma T, Sugiura Y, Tanaka S. Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1997; 79:206-13.
14. Kitadai Y, Haruma K, Tokutomi T et al. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2195-200.

15. Uchida S, Shimada Y, Watanabe G 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: 1704-9.
16. 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: 25-30.
17. Koide N, Nishio A, Hiraguri M, Hanazaki K, Adachi W, Amano J. Coexpression of vascular endothelial growth factor and p53 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1733-40.
18. 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.
19. Rosa ARP, Schirmer CC, Gurki RR, Meurer L, Edelweiss MI, Kruel CP. Prognostic value of p53 protein expression and vascular endothelial growth factor expression in resected squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esoph* 2003; 16: 112-8.
20. 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.

21. 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: 6161-5.
22. Maeda K, Kang SM, Onoda N et al. Expression of p53 and vascular endothelial growth factor associated with tumor angiogenesis and prognosis in gastric cancer. *Oncology* 1998; 55: 594-9
23. Maeda K, Kang S, Onoda N 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.
24. Rosa ARP, Schirmer CC, Gurski RR, Brentano L, Krueel CD. Survival and prognostic factors in patients with epidermoid oesophageal carcinoma. *Int Surg* 1999; 94: 193-8.
25. Cavazzola LT, Telles JPB, Pesce G et al. Delayed Cervical Esophagogastric Anastomosis. In: Pinotti HW, Ceconello I, Felix VN, Oliveira MA, editors. *Recent Advances in Diseases of the Esophagus*, Bologna: Monduzzi Editore 2001; p.579-85.
26. Siewert JR, Stein HJ. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Br J Surg* 1998; 85: 1457-9.
27. Coggi G, Bosari S, Roncalli M et al. p53 protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma. *Cancer* 1997; 79: 125-32.

28. Kajiyama Y, Hattori K, Tomita N et al. Histopathologic effects of neoadjuvant therapies for advanced squamous cell carcinoma of the esophagus: multivariate analysis of predictive factors and p53 overexpression. *Dis Esoph* 2002; 15: 61-6.
29. Koide N, Nishio A, Kono T et al. Histochemical study of vascular endothelial growth factor in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 952-8.
30. Engel LS, Chow WH, Vaughan TL et al. Population attributable risks of esophageal and gastric cancers. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1404-13.
31. Eloubedi MA, Desmon R, Arguedas MR, Reed CE, Wilcox CM. Prognostic Factors for the Survival of Patients with Esophageal Carcinoma in the U.S. The Importance of Tumor Length and Lymph Node Status. *Cancer* 2002; 95: 1434-43.
32. Ikeda M, Natsugoe S, Ueno S, Baba M, Aikou T. Significant Host- and Tumor-Related Factors for Predicting Prognosis in Patients with Esophageal Carcinoma. *Ann Surg* 2003; 238: 197-202.
33. Altorki NK, Oliveria S, Schrupp D. Epidemiology and Molecular Biology of Barrett's Adenocarcinoma. *Semin Surg Oncol* 1997; 13: 270-80.
34. Slehria S, Sharma P. Barrett's Esophagus. *Curr Opin Gastroenterol* 2003; 19(4): 387-93. Available at [www.medscape.com/viewarticle/457731](http://www.medscape.com/viewarticle/457731).

35. Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340: 825-31
36. Cameron AJ. Epidemiology of Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Dis Esoph* 2002; 15: 106-8.
37. Brown LM, Swanson CA, Gridley G et al. Adenocarcinoma of the esophagus: role of obesity and diet. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 104-9.
38. Gurski RR, Petters JH, Hagen JA et al. Barrett's esophagus can and does regress after antireflux surgery: a study of prevalence and predictive features. *J Am Coll Surg* 2003; 196: 706-13.
39. Spechler SJ. Barrett's esophagus. *N Engl J Med* 2002; 346: 837-42.
40. Watson A. Barrett's esophagus – 50 years on. *Br J Surg* 2000, 87: 529-31.
41. Ruol A, Parenti A, Zaninotto G et al. Intestinal Metaplasia is the Probable Common Precursor of Adenocarcinoma in Barrett Esophagus and Adenocarcinoma of the Gastric Cardia. *Cancer* 2000; 88: 2520-8.
42. Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni Jr JF. Rising Incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 1991; 265: 1287-9.

42. Hansen S, Melby KK, Aase S et al. Role of smoking and *Helicobacter pylori* infection in aetiology of cardia versus non-cardia gastric cancer. *Gastroenterology* 2000; 118: A75. (abstract)
43. Ireland AP, Shibata DK, Chandrasoma P, Lord RVN, Petters JH, DeMeester TR. Clinical Significance of *p53* Mutations in Adenocarcinoma of the Esophagus and Cardia. *Ann Surg* 2000; 231: 179-87.
44. Wijnhoven BPL, Siersema PD, vanDekken H et al. Adenocarcinomas of the distal oesophagus and gastric cardia are one clinical entity. *Br J Surg* 1999; 86: 529-35.
45. vanDekken H, Alers J, Riegman PHJ, Rosenberg C, Tilanus HW, Vissers K. Molecular Cytogenetic Evaluation of Gastric Cardia Adenocarcinoma and Precursor Lesions. *Am J Pathol* 2001; 158: 1961-7.
46. Bruno L, Nesi G, Montinaro F et al. Clinicopathologic findings and results of surgical treatment in Cardiac Adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2000; 74: 33-5.
47. Tanière P, Martel-Planche G, Maurici D et al. Molecular and Clinical Differences Between Adenocarcinomas of the Esophagus and Gastric Cardia. *Am J Pathol* 2001; 158: 33-40.



48. Siewert JR, Feith M, Stein HJ. Adenocarcinoma of the Esophagogastric Junction – Results of Surgical Therapy Based on Anatomical/Topographic Classification in 1002 Consecutive Patients. *Ann Surg* 2000; 232: 353-61.
49. Hardiwick RH, Williams GT. Staging of oesophageal adenocarcinoma. *Br J Surg* 2002; 89: 1076-7.
50. Siewert JR, Stein HJ, Feith M, Bruecher BLD, Bartels H, Fink U. Histologic Tumor Type is an Independent Prognostic Parameter in Esophageal Cancer: Lessons from more than 1000 Consecutive Resections at a Single Center in the Western World. *Ann Surg* 2001; 234: 360-9.
51. Siewert JR, Stein HJ, Sandler A et al. Esophageal cancer: Clinical management. In: Kelsen DA, ed. *Principles and practice of gastrointestinal oncology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams; 2001, 976 p.
52. Lerut T, DeDeyn P, Coosemans W et al. Surgical strategies in esophageal carcinoma with emphasis on radical lymphadenectomy. *Ann Surg* 1992; 216: 583-90.
53. Hagen JA, Peters JH, DeMeester TR. Superiority of extended en bloc esophagogastrectomy for carcinoma of the lower esophagus and cardia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 106: 850-8.

54. Alexandrou A, Davis PA, Law S, Murthy S, Whooley BP, Wong J. Squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lower third of the esophagus and gastric cardia: similarities and differences. *Dis Esoph* 2002; 15: 290-5.
55. Bollschweiler E, Schroder W, Holscher AH, Siewert JR. Preoperative risk analysis in patients with adenocarcinoma or squamous cell carcinoma of the esophagus. *Br J Surg* 2000; 87: 1106-10.
56. Shinohara M, Aoki T, Sato S et al. Cell cycle-regulated factors in esophageal cancer. *Dis Esophagus* 2002; 15:149-54.
57. Audrézet MP, Robaszkiewicz M, Mercier B et al. Molecular analysis of the TP53 gene in Barrett's adenocarcinoma. *Human Mutation* 1996; 7: 109-13.
58. Hanas J, Lerner MR, Lightfoot SA et al. Expression of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and p53 Tumor Suppressor in Dysplastic Progression and Adenocarcinoma in Barrett Esophagus. *Cancer* 1999; 86: 756-63.
59. 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.
60. Fagundes RB, Mello CR, Tollens P et al. p53 protein in esophageal mucosa of individuals at high risk of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esophagus* 2001; 14: 185-90.

61. 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.
62. Kanamoto A, Kato H, Tachimori Y et al. No prognostic significance of p53 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 1999; 72: 94-8.
63. 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.
64. Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res* 1999; 59: 1391-9.
65. 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.
66. 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: 1623-26.

67. Patel DD, Bhatavdekar JM, Chikhlikar PR 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.
68. Casson AG, Tammemagi M, Eskandarian S, Redston M, McLaughlin J, Ozcelik H. p53 alterations in oesophageal cancer: association with clinicopathological features, risk factors, and survival. *Mol Pathol* 1998; 51: 71-9
69. Younes M, Ertan A, Lechago J. P53 protein and malignant progression in Barrett's Metaplasia (Barrett's Esophagus) *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1200-1.
70. Wu TT, Watanabe T, Heitmiller R, Zahurak M, Forastiere AA, Hamilton SR. Genetic alterations in Barrett esophagus and adenocarcinomas of the esophagus and esophagogastric junction region. *Am J Pathol* 1998; 153: 287-94.
71. Wijnhoven BPL, Tilanus HW, Dinjens WNM. Molecular Biology of Barrett's Adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001; 233: 322-37.
72. Adulaimi D, Jankowki J. Barrett's esophagus: an overview of the molecular biology. *Dis Esoph* 1999; 12: 177-80.
73. Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2451-60.
74. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.

75. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? *Cancer Res* 1986; 46:467-73.
76. Poon RTP, Fan ST, Wong J. Clinical Significance of Angiogenesis in Gastrointestinal Cancers – A Target of Novel Prognostic and Therapeutic Approaches. *Ann Surg* 2003; 238: 9-28.
77. Nicosia R. What is the Role of Vascular Endothelial Growth Factor-Related Molecules in Tumor Angiogenesis. *Am J Pathol* 1998; 153: 11-6.
78. Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996; 271: 603-6.
79. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumors: an International Consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2474-84.
80. 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.
81. Shimada H, Takeda A, Nabeya Y et al. Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 663-9.

82. Wilson KT. Angiogenic markers, neovascularization and malignant deformation of Barrett's esophagus. *Dis Esoph* 2002; 15: 16-21.
83. DeMeester SR. Lymph node involvement in esophageal adenocarcinoma: If you see one, have you seen them all? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126: 947-9.
84. Lerut T, Coosemans W, Decker G et al. Extracapsular lymph node involvement is a negative prognostic factor in T3 adenocarcinoma of the distal esophagus and gastroesophageal junction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126: 1121-7
85. 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: 1366-72.
86. Torres C, Wang H, Tuner SJ, Shahsafaei A, Odze RD. Prognostic significance and effect of chemoradioterapy on microvessel density in esophageal Barrett's adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Human Pathol* 1999; 30: 753-8
87. McDonnell CO, Bouchier-Hayes DJ, Toomey D, Foley D, Kay EW, Leen E, Walsh TN. Effect of neoadjuvant chemoradiotherapy on angiogenesis in oesophageal cancer. *Br J Surg* 2003; 90: 1373-8.
88. McDonnell CO, Harvey JH, Bouchier-Hayes DJ, Walsh NJ. Effect of multimodality therapy on circulating vascular endothelial growth factor levels in patients with esophageal cancer. *Br J Surg* 2001; 88: 1105-9.

89. Ahn MJ, Jang SJ, Park YW et al. Clinical prognostic values of vascular endothelial growth factor, microvessel density and p53 expression in esophageal carcinomas. *J Korean Med Sci* 2002; 17: 201-7. (abstract)

## **10.2 Artigo Científico em Língua Inglesa**

**\* Formatado para Publicação na Revista Diseases of the Esophagus.**

**Immunohistochemical evaluation for p53 and VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) is not prognostic for long term survival in end stage esophageal adenocarcinoma**

Leandro Totti Cavazzola (1), André Ricardo Pereira da Rosa (1), Carlos Cauduro Schirmer (1), Richard Ricachenevski Gurski (1), João Pedro Bueno Telles (1), Fernando Mielke (1), Luíse Meurer (2), Maria Isabel Albano Edelweiss (2), Cleber Dario Pinto Krueel (2)

**Divisions of General Surgery (1) and Pathology (2) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.**

**Postgraduate Course in Medical Sciences: Surgery, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.**

Dr Leandro Totti Cavazzola

Av Montenegro 163/802, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90460-160. e-mail: [cavazzola@via-rs.net](mailto:cavazzola@via-rs.net)



## **ABSTRACT**

The prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma is negatively influenced by late diagnosis. In an attempt to determine the factors that might improve the prognosis of these patients, molecular biology has been of great importance. P53 tumor suppressor gene mutations are one of the most frequent genetic disorders found in a wide variety of tumors. Angiogenesis is essential for the growth and metastatic spread of solid tumors. The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), a recently identified factor with remarkable angiogenic properties, may play a central regulatory role in tumor angiogenesis. The association between p53 protein and VEGF expressions and prognosis has been underinvestigated. Forty-six patients with esophageal adenocarcinoma, submitted to curative resection, were studied. The expressions of p53 protein and VEGF were assessed by immunohistochemistry in 52.2% and 47.8% of tumors, respectively. P53 protein and VEGF expressions coincided in 26% of the cases, and no correlation between these expressions was observed. None of the clinicopathological factors showed a significant correlation with p53 protein or VEGF expressions. There was no significant association between p53 protein and VEGF expressions and long-term survival. In the present study, the expression of p53 protein and VEGF, albeit similar to the one reported in the literature, did not correlate with prognosis in esophageal adenocarcinoma patients submitted to curative resection.

**Key words:** esophagus, adenocarcinoma, prognosis, tumor markers, p53, VEGF, survival.

## **Introduction**

Esophageal cancer is one of the most devastating malignant neoplasms of the gastrointestinal tract. Late diagnosis, combined with aggressive biological behavior, results in poor diagnosis for the patients who suffer from this disease (1).

The possibility to establish parameters that can help predict the biological aggressiveness and the behavior of these tumors is imperative, so that one can define which patients should be submitted to curative resection, followed or not by adjuvant treatments (e.g.: chemotherapy and radiation therapy), as well as which patients might not benefit from an aggressive procedure due to unresponsiveness to neoadjuvant or adjuvant therapies (2, 3).

Molecular biology has revealed that most malignant tumors result from the interaction between inherited characteristics and external influences, which may cause genetic disorders in predisposed individuals, interfering with the control over the differentiation and growth of cells.

The p53 gene is located on the short arm of chromosome 17 and belongs to the group of tumor suppressor genes. Allelic losses involving this gene are associated with mutant gene forms. These mutations are one of the most frequent genetic disorders observed in malignant tumors (4). Approximately 50% of the tumors that affect the colon, stomach, lung, breast, liver, brain and the reticuloendothelial and hematopoietic tissues contain p53 gene mutations, which shows that the inactivation of the p53 suppressor gene is nearly a universal step towards the development of human cancers (4-6).

The specific analysis of esophageal carcinomas shows that p53 mutations are detected in 36 to 80% of the cases and that they apparently occur quite early in tumorigenesis, being characterized in all stages of the disease, from dysplasia to carcinoma and from Barrett's metaplasia to adenocarcinoma (3, 4, 7, 8).

Under normal physiological conditions, the formation of new blood vessels from pre-existing vessels (known as angiogenesis) is crucial for development and homeostasis. Angiogenesis occurs during embryonic development, intense menstrual cycles and, since it is an important repair mechanism, it is present in regenerative functions and after intense physical exercise, nerve injuries, wound healing, and bone growth. In these situations, it is controlled and short-lived, being balanced by factors with positive and negative angiogenic effects (9, 10).

Angiogenesis also plays a pivotal role in the development of solid tumors, since after a given tumor size, new blood vessels are essential for their growth, and may even contribute to the occurrence of distant metastasis by way of the dissemination of cells that loosen from the tumor and spread through the new vessels (11).

The vascular endothelial growth factor (VEGF) is secreted by tumor cells and stimulates the growth of endothelial cells, usually in response to external stimuli such as hypoxia or substances secreted by the body. In patients with esophageal tumors, VEGF expression was detected in 31-60% of the cases (12-19). There is a paucity of studies on the correlation between VEGF expression and prognosis in patients with esophageal carcinoma, and most of the reported cases are concerned with epidermoid carcinomas. Moreover, the results available to date are contradictory (12-19).

The P53 gene seems to play a key role in the development and progression of tumors by regulating VEGF expression, but this mechanism is not fully understood yet (20, 21). Current evidence suggests that there exists an increase in the expression of VEGF mRNA due to the loss of p53 gene suppression function (10, 22).

Studies that assess this coexpression in patients with esophageal carcinoma are scarce, and most of the existing studies include the epidermoid histologic type, with discrepant results as far as its possible use as an independent prognostic factor are concerned. (50-52,56). This

relationship still remains unclear, and we do not know whether it exists in a direct form, but it is possible that p53/VEGF coexpression determined by immunohistochemistry (IHC) would be important in angiogenesis and metastasis. Besides, this coexpression might be used as a prognostic factor in the near future (17, 23).

## **Patients and methods**

### **Patients**

All patients diagnosed with esophageal adenocarcinoma treated at the Outpatient Clinic of the Group for Surgeries of the Esophagus, Stomach and Small Intestine (GCEEID) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) between July 1993 and July 2001, submitted to curative resection, were prospectively assessed using a previously described protocol (24, 25). Patients with early postoperative death (up to 30 days after the surgery or until hospital discharge), history or presence of concomitant malignant neoplasm, neoadjuvant treatment (chemotherapy and/or radiation therapy), incomplete resection (compromised surgical margins), and patients whose paraffin blocks were not located were excluded from the study.

The study design consisted of a historical cohort, considering surgical treatment as zero time. Sociodemographic variables were used, including age, gender, smoking, alcoholism, Siewert's classification (lesion height in relation to the gastroesophageal junction) (26), types of resection surgeries performed, early postoperative death and survival of patients after the onset of treatment. The histological analysis took into account the level of tissue differentiation; depth of tumor penetration through the esophageal wall, lymph node involvement and pathological staging (TNM-UICC) (25). The major study variables were p53 mutant gene and VEGF expressions. The groups were compared as to mutant p53 and VEGF expressions, using the afore-mentioned sociodemographic variables. The groups that showed these expressions were regarded as positive (+), and those in which these expressions were not observed were regarded as negative (-).

As outcome, we considered deaths caused by esophageal adenocarcinoma or survival until December 2002. The patients who died of causes other than esophageal cancer or who were lost to follow-up were excluded from the study. The information about the survival of patients was obtained through their medical records and hospital and outpatient follow-up, in

addition to telephone and mail contact.

#### Pathologic analysis and tissue preparation

The analysis of the surgical specimen included the depth of tumor penetration through the esophageal wall and involvement of surgical margins, lymph node involvement, surgical limits (proximal, distal and circumferential) and level of tissue differentiation. The pathological staging of the disease (pTNM) was defined according to the International Union Against Cancer (UICC) (25). The resected surgical specimens were fixed in formalin at 10% and embedded in paraffin, according to the routine of the Division of Pathology of HCPA at the time of the procedure. Paraffin blocks were cut at a 4- $\mu$ m thickness, and later mounted onto glass slides.

#### Antibodies and reagents

The DO-7 mouse monoclonal antibody (Pab 1801, Sigma Biosciences, St Louis, MO, USA) was used for identification of p53 protein. The DO-7 recognizes both the wild and mutant types of p53 protein, but due to the extremely short half-life of the wild type, the staining of the tumor cell nucleus suggests abnormal accumulation of the mutant type.

The A-20 rabbit polyclonal antibody recognizes VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). It is produced against an aminoterminal epitope of human VEGF, mapping residues 1-20 and recognizing VEGF165, VEGF189 and VEGF121.

#### Immunohistochemical analysis

The specimens of tumor tissue were processed for the expression of p53 protein and for the expression of VEGF by way of the immunohistochemical analysis routinely performed by the Division of Pathology of HCPA, using the primary antibodies described previously.

After deparaffinization and rehydration, antigen retrieval, inactivation of endogenous peroxidase activity and blocking of nonspecific reactions, the sections were incubated overnight for 12 hours at 4°C with a diluted solution of primary antibodies at 1:100 for p53 protein and 1:400 for VEGF. The primary antibodies were located by subsequent application of the streptavidin-biotin peroxidase complex (LSAB, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) and revealed with diaminobenzidine tetrahydrochloride (Kit DAB, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA). All the reactions were executed with positive controls (breast cancer for p53 protein expression and placental tissue for VEGF expression).

#### Immunohistochemical determination of p53 protein and VEGF expressions

Tumors were considered positive for p53 protein expression if over 10% of the tumor cell nuclei were stained in brown (p53 positive or p53+). Blocking with normal saline solution and the absence of primary antibodies were used as negative controls (27, 28).

VEGF expression was regarded as positive based on the amount and intensity of tumor cells whose cytoplasm was stained. If over 30% of tumor cells were stained (brown) more intensely than smooth muscle cells in the normal adjacent esophageal tissue, tumors were considered positive (VEGF positive or VEGF+). The smooth muscle of the lamina propria or muscularis mucosa layers were used as internal positive control as smooth muscle cells also have VEGF expression (13, 14, 19, 29).

The glass slides were analyzed by two researchers that were blinded to the clinical and histopathological information. The kappa statistic was used for control of interobserver agreement.

The cases with discrepant scores were conjointly reassessed on a second occasion, and an agreement was then reached.

## Assessment of p53 protein and VEGF coexpression

The cases were classified into three groups according to the immunohistochemical determination of p53 protein and VEGF expressions. Patients who were p53 positive and VEGF positive were classified as Group A, VEGF-positive and p53-negative or VEGF-negative and p53-positive patients as Group B, and the patients with negative reactions to both p53 protein and VEGF as Group C.

## Ethics

Since the present study followed the treatment protocol for patients with esophageal adenocarcinoma admitted to the GCEEID/HCPA, which had already been approved by the local research ethics committee, and as no experimental intervention was performed on the patients, a signed informed consent form was not necessary. The researchers explained the importance of the obtained information to the patients and their families and agreed not to reveal the results of the study by mentioning patients either individually or by their names. The present study was approved by the local research ethics committee (no. 03-100): Determination of Prognostic Factors in Esophageal Adenocarcinoma: Assessment of p53 Protein and VEGF Expression.

## Statistical analysis

The correlation between p53 protein and VEGF expressions and clinicopathological characteristics were assessed by the t- test for continuous variables and by the chi-squared test for categorical variables. Fisher's exact test was used whenever necessary. Kappa statistic was used for control of interobserver agreement. The survival rate of the patients was assessed by the product-limit or Kaplan-Meier estimation. The impact of each prognostic factor on the survival rate was analyzed by the log rank test (univariate analysis). Cox proportional hazards



regression (multivariate analysis) was applied to the selected variables in order to identify a combination of prognostic factors or the independent effect of individual prognostic factors on long-term survival. A p value of 0.05 was considered to be statistically significant. The SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows, version 8.0, was used for the statistical analysis.

## Results

Between July 1993 and July 2001, 116 patients with esophageal adenocarcinoma were treated at the GCEEID/HCPA. Among these patients, 50 (43.1%) were submitted to curative resection after the previously described preoperative assessment. It was not possible to locate the paraffin blocks for immunohistochemical analysis in four cases, which reduced the sample to 46 patients.

Of these 46 patients, 8 (17.4%) were excluded from the survival analysis since they died while in hospital (early postoperative death). They were only considered for the prevalence study.

Of the 46 patients studied, 24 (52.2%) were positive for p53 protein according to the immunohistochemical analysis. With regard to VEGF, 22 patients (47.8%) were considered to present positive antibodies for this protein.

By excluding the patients with early postoperative death, we have 20 (52.6%) patients regarded as p53+ and 19 (50%) considered VEGF positive.

Taking into account only the patients included in the survival analysis, the mean age was 60.6 years (range: 36.6 to 78), 30 of whom were males (78.9%), and most of whom were smokers (29 cases, 76.3%). Alcoholism was observed in 47.4 % of the studied patients (18 cases). Esophagectomy, 20 cases (52.6%), was the most frequently performed surgery, with transhiatal removal of the adenocarcinoma in most cases (19 cases); total gastrectomy with distal esophagectomy was reserved for the remaining 18 cases. This was the sample used for the survival analysis, including 38 patients, whose characteristics can be seen in Table 1.

In the present study, no statistically significant correlation was observed between p53 protein and VEGF expressions and the variables age, gender, smoking, alcoholism, Siewert's classification, type of surgery performed, level of tissue differentiation, depth of tumor

penetration through the esophageal wall (T), lymph node involvement (N), distant metastases (M) and pathoanatomical staging. (Table 1)

Interobserver agreement was tested by kappa statistic ( $\kappa = 0.912$ ), with a statistical significance of  $p < 0.0001$ , according to the immunohistochemical analysis of p53 expression, showing strong agreement between the two observers. Discrepant results were discussed conjointly until a consensus could be reached and the definitive diagnosis could be established.

Table 1 – Correlation between positive immunohistochemical results for p53 protein and VEGF expressions and clinicopathological variables.

| Variable        | N             | p53+    | p53-      | p     | VEGF +    | VEGF-     | p     |
|-----------------|---------------|---------|-----------|-------|-----------|-----------|-------|
|                 |               | 20      | 18        |       | 19        | 19        |       |
| Age             | Mean          | 59.1    | 62.45     | 0.357 | 60.62     | 60.78     | 0.592 |
|                 | SD            | 8.93    | 12.91     |       | 9.25      | 12.73     |       |
| Gender          | Male          | 17 (85) | 13 (72.2) | 0.438 | 16 (84.2) | 14 (73.7) | 0.693 |
| Smoking         |               | 15 (75) | 14 (77.8) | 1     | 15 (78.9) | 14 (73.7) | 1     |
| Alcoholism      |               | 10 (50) | 8 (44.4)  | 0.757 | 11 (57.9) | 7 (36.8)  | 0.330 |
| Siewert*        | Type I        | 4 (20)  | 3 (16.7)  |       | 4 (21.1)  | 3 (15.8)  |       |
|                 | Type II       | 9 (45)  | 8 (44.4)  | 0.953 | 8 (42.1)  | 9 (47.4)  | 0.904 |
|                 | Type III      | 7 (35)  | 7 (38.9)  |       | 7 (36.8)  | 7 (36.8)  |       |
| Surgery         | Esophagectomy | 9 (45)  | 11 (61.2) | 0.352 | 8 (42.1)  | 12 (63.2) | 0.330 |
|                 | Gastrectomy   | 11 (55) | 7 (38.8)  |       | 11 (57.9) | 7 (36.8)  |       |
| Differentiation | Good          | 1 (5)   | 5 (27.8)  |       | 4 (21.1)  | 2 (10.5)  |       |
|                 | Moderate      | 8 (40)  | 4 (22.2)  | 0.128 | 7 (36.8)  | 5 (16.3)  | 0.407 |
|                 | Poor          | 11 (55) | 9 (50)    |       | 8 (42.1)  | 12 (63.2) |       |
|                 | None          | 0       | 0         |       | 0         | 0         |       |
| T **            | T1            | 2 (10)  | 4 (22.2)  |       | 4 (21.1)  | 2 (10.5)  |       |
|                 | T2            | 3 (15)  | 3 (16.7)  | 0.721 | 4 (21.1)  | 2 (10.5)  | 0.122 |
|                 | T3            | 8 (40)  | 5 (27.8)  |       | 3 (15.8)  | 10 (52.6) |       |
|                 | T4            | 7 (35)  | 6 (33.3)  |       | 8 (42.1)  | 5 (26.3)  |       |
| N **            | N0            | 10 (50) | 8 (44.4)  | 0.757 | 10 (52.6) | 8 (42.1)  | 0.746 |
|                 | N1            | 10 (50) | 10 (55.6) |       | 9 (47.4)  | 11 (57.9) |       |
| M **            | M0            | 18 (90) | 16 (88.9) | 1     | 17 (89.5) | 17 (89.5) | 1     |
|                 | M1            | 2 (10)  | 1 (11.1)  |       | 2 (10.5)  | 1 (10.5)  |       |
| Staging         | I             | 2 (10)  | 3 (16.7)  |       | 3 (15.8)  | 2 (10.5)  |       |
| **              | II            | 4 (20)  | 5 (27.8)  | 0.472 | 6 (31.6)  | 3 (15.7)  | 0.462 |
|                 | III           | 12 (60) | 8 (44.4)  |       | 8 (42.1)  | 12 (63.2) |       |
|                 | IV            | 2 (10)  | 2 (11.1)  |       | 2 (10.5)  | 2 (10.6)  |       |

n=number of patients. SD=standard deviation. Data presented as n(%)

\*Siewert= Siewert's classification for gastric cardia adenocarcinoma (64)

Type I: distal esophageal adenocarcinoma

Type II: gastric cardia adenocarcinoma or short segments with M1 in the GEJ

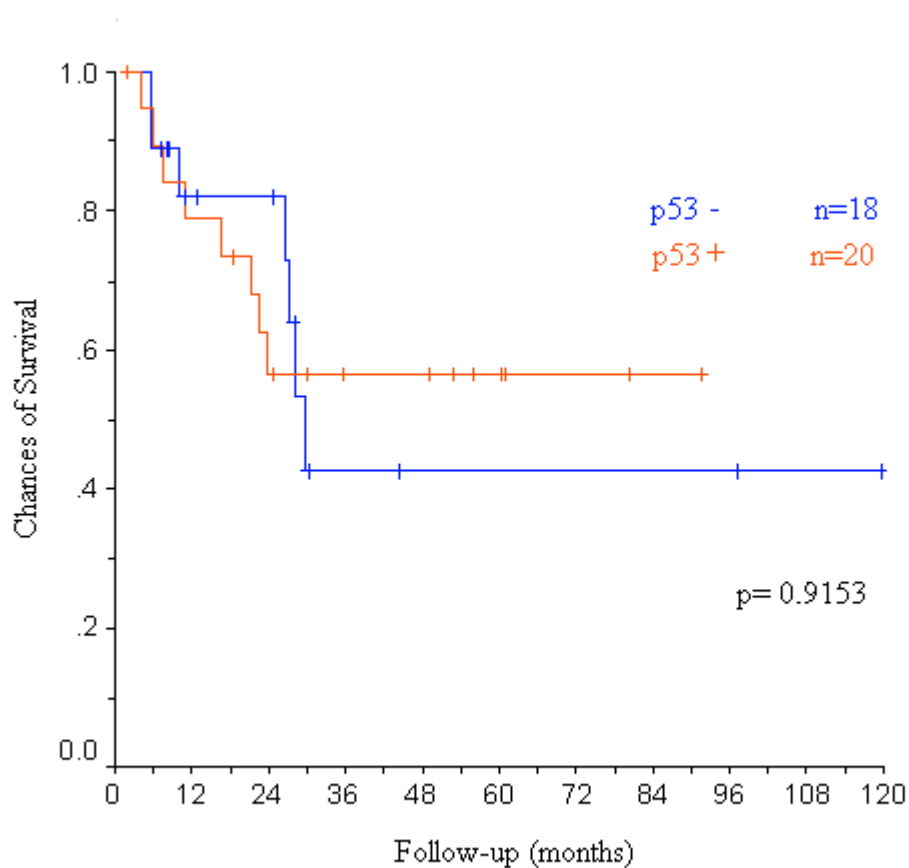
Type III: subcardial gastric adenocarcinoma with infiltration of the GEJ and distal esophagus

\*\* Staging according to UICC (see reference 25)

The average follow-up period was of 31.5 months (2-120 months, SD= 28.3 months). The average survival was of 70.4 months (CI=51.9-88.5; SE=9.4). Of the 38 patients studied, 15 (39.4%) died during the follow-up period.

The expression of p53 protein determined by the immunohistochemical analysis showed that the average survival of p53+ patients was of 58.1 months (CI= 40.4 - 75.7; SE=9), whereas for patients with a negative reaction it was of 63.22 months (CI=34.3 - 92.12, SE= 14.7). This difference was not statistically significant (p=0.9153)

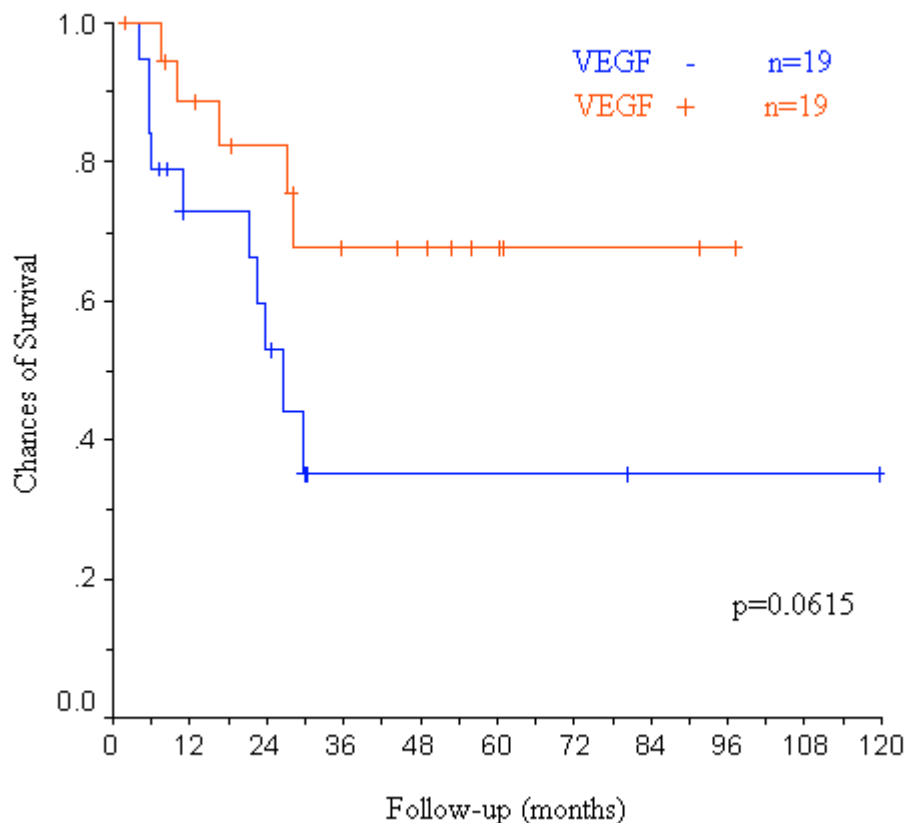
**Figure 1 – Survival curve according to p53 protein expression**



The patients who showed VEGF expression in the immunohistochemical analysis (VEGF+) had an average survival of 72 months (CI= 53.5 - 90.5; SE=9), whereas for those with a negative reaction (VEGF-) the average survival was of 53.5 months (CI= 27.5 - 79.4;

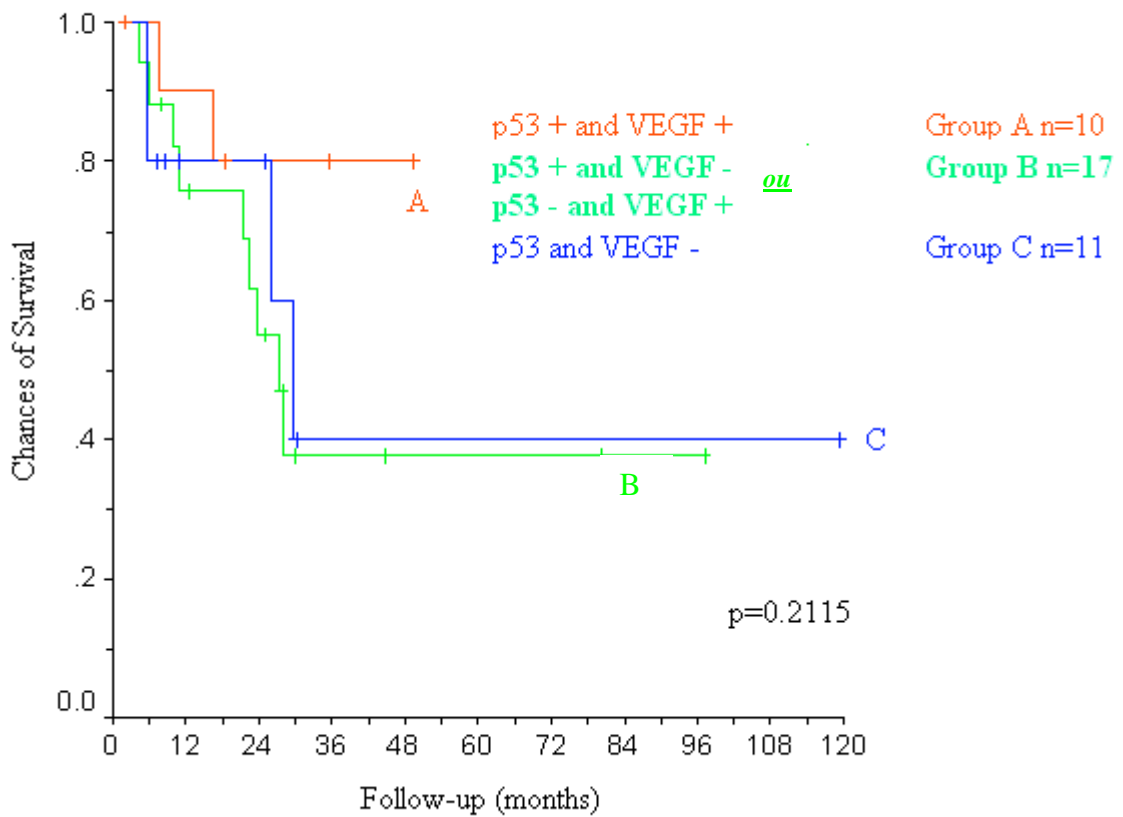
SE= 13.2). No statistical difference was observed between the groups ( $p=0.0615$ ), as shown in Figure 2.

**Figure 2 – Survival curve according to VEGF expression**



To check whether the p53 protein and VEGF coexpression could change the prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma, three groups were created: Group A, for patients with positive expression of both variables (p53+ and VEGF+); Group B, in which at least one of the variables was positive (p53+ and VEGF- or p53- and VEGF+) and Group C, where neither of the variables was detected (p53- and VEGF-). The average survival for patients in group A was of 75.7 months (CI= 55.9 - 95.5; SE=10), 48 months (CI= 27.3 - 68.7; SE= 10.6) for group B, and 60.15 months (CI= 20.3 - 99.9; SE= 20.3) for group C, with no statistically significant difference between the groups ( $p=0.2115$ ), as shown in Figure 3.

**Figure 3 – Survival curve according to p53 protein and VEGF coexpression**



In an attempt to verify the influence of the prognostic factors regarded as highly relevant in the present study, we analyzed the depth of tumor penetration through the esophageal wall (T), lymph node involvement (N), surgical staging (TNM), level of tumor differentiation and Siewert's classification). None of these factors showed a direct effect on the survival of patients, as shown in Table 2.

**Table 2 – Multivariate analysis of the studied factors \***

| Variable | RR    | CI            | p     |
|----------|-------|---------------|-------|
| p53      | 1.429 | (0.429-4.725) | 0.514 |
| VEGF     | 0.369 | (0.095-1.436) | 0.115 |

\* Adjusted according to Cox proportional hazards regression for the variables depth of tumor penetration through the esophageal wall, lymph node involvement, surgical staging, level of tumor differentiation and Siewert's classification.



## Discussion

The epidemiological profile of the patients in the present study is in agreement with other reference centers for esophageal adenocarcinoma throughout most of the world (30-32). The predominance of male individuals older than 60 years, smokers and alcoholics observed in our patient population underscores the importance of knowing the risk factors in order to identify patients at a greater risk for esophageal cancer and to establish prophylactic strategies (30, 33, 34)

Among various risk factors for esophageal adenocarcinoma described in the literature, long-established gastroesophageal reflux disease (GERD) or even the clinical presence of pyrosis seem to be implicated in a higher chance of development of this type of cancer over time (35). However, given the retrospective design of the present study and the difficulty in obtain the information obtained through the medical records of the patients, we decided not to use the results regarding GERD. Likewise, obesity, also considered a risk factor for the development of esophageal adenocarcinoma (34, 36, 37), was not assessed in the present study. The assessment of Barrett's esophagus (intestinal metaplasia observed in the esophagus of patients with chronic GERD) (34, 38, 39), which is also associated with greater risk for adenocarcinoma (8, 36, 40) was not possible in these patients due to the advanced stage of the disease at the time of diagnosis (63.2% patients with types III and IV), in which the mucosa with metaplastic alterations can be totally involved by tumor growth (33, 41).

The increase in the diagnosis of adenocarcinomas, in comparison to the stable occurrence rates of epidermoid carcinomas, has been reported in the western literature for years (33, 34, 36, 40, 42-43). Controversy still exists over the fact that in western studies adenocarcinomas account for more than 50% of primary esophageal tumors, comparatively to the nearly 5% they represented in the 1970s (36, 40). Some attempts to clarify this matter point out to the reduced incidence of *Helicobacter pylori* infection, regarded by some authors

as a protective factor against the development of esophageal adenocarcinoma (42), concomitantly to an increase in the prevalence of morbid obesity (36). Despite the high prevalence rates reported in the literature, the confirmation of the actual increase in the incidence of Barrett's esophagus has not been an easy task. This could be explained by the dissemination and specificity of diagnostic methods, without implying any increase in pre-existing rates (33, 36, 40). At GCEEID/HCPA, between July 1993 and July 2001, 379 patients with epidermoid carcinoma of the esophagus and 116 patients (23.4% of the total patient population) with adenocarcinoma of the gastroesophageal junction were studied.

Gastroesophageal junction tumors are often grouped as a single entity (41, 43, 44-46), even though this classification is controversial, due to some distinct biological and histopathological characteristics pointed out by some authors (47,48).

This division interferes with the postoperative histopathological classification as well. If Siewert's classification is used for gastroesophageal junction tumors, for instance, type I and II tumors should be classified (and staged) as esophageal tumors, whereas type III tumors included in the TNM staging system would be classified as gastric tumors (26, 48-51), which hinders the analysis of the results of preoperative assessment and of staging and treatment. In the present study, we considered TNM for esophageal tumors in the staging of patients (41, 43, 44-46), as suggested by Siewert himself (50).

Likewise, most studies available up to now have described epithelial tumors of the esophagus as a single disease, characterizing adenocarcinomas and epidermoid carcinomas as a single clinical entity, possibly with the aim of studying a larger patient population. Although advocated by some authors (52-54), this stance is contested by several researchers, who have shown that the histological type may (and should) be considered an independent prognostic factor in patients with malignant esophageal neoplasms (48, 50, 55).

The resection rate of our patients (43.1% - 50 among 116 patients treated throughout eight years) is lower than that reported in the literature for this type of tumor, which shows resection rates of up to 75.5% (50). Given the large amount of early perioperative deaths in our patient population (8 patients – 17.4% of the patients submitted to curative resection), we may infer that the present study includes a greater number of patients whose tumors are at a more advanced stage, with consequent worse prognosis and higher chances of postoperative complications, due to the dissemination of the disease.

The locoregional characteristics and lymph node involvement of esophageal adenocarcinomas justify the use of a transmediastinal approach in most type I and II tumors (51) and an abdominal approach with extension of the resection of proximal gastrectomy to the distal esophagus in patients with type III tumors, by means of wide exposure of the esophageal hiatus and mediastinum (49-50). This approach is based upon the fact that most lesions have a metastatic lymph node dissemination to the posterior lower mediastinum, juxtacardial region, and due to the small curvature of the stomach, up to the celiac trunk - sites that are easily accessed by the techniques mentioned above (50, 51).

The data regarding Siewert's classification show that the prevalence of tumors in the present study was as follows: type I - 7 cases (18.4%); type II – 17 cases (44.7%) and type III – 14 cases (36.8%), which differs from the data obtained from the most comprehensive study conducted worldwide (48), with approximately 1,000 patients, in which 36% of tumors were of type I, 27% of type II and 37% of type III. The lowest incidence of type I tumors in the present patient population may be related to later diagnosis (63.2% of patients with type III and IV tumors) comparatively to the correlative study (approximately 37% of patients with tumors of types III and IV), and the clinical differentiation between type I and II tumors may be hindered by the locoregional dissemination of the disease.

A great deal of effort has been channeled into finding biomarkers that can influence the progression of Barrett's esophagus in the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. P53 seems to be heavily implicated in this process (8, 33, 56-59). Since p53 can "monitor" the integrity of the genome, it is regarded by many authors as "guardian of the genome" and, under normal conditions, it is activated in order to downregulate cellular proliferation in the transition from G1 phase to S phase of the cell cycle, being known as normal or wild p53 (6, 56). P53 mutations facilitate genomic instability and may predispose to the development of cell lines with remarkable nuclear defects and consequent immortality, thus leading to tumorigenesis (5, 6, 56). The loss of gene suppressor function may occur due to mutation, chromosomal rearrangement, nondysjunction, gene conversion, impression or mitotic recombination. Interaction with other cell proteins or viral oncoproteins can also neutralize gene suppressor function (5, 6).

Nowadays, the major methods for determining p53 protein expression are immunohistochemistry and polymerase chain reaction (PCR). Although PCR is more sensitive and specific than immunohistochemistry for the detection of p53 mutations, its clinical use is less practical; however, it is routinely used in molecular biology (5, 43). Immunohistochemistry is easy, inexpensive and can be performed by any laboratory of pathology, and is used on a large scale as reported in the literature (60-62). Immunohistochemistry detects phenotype mutations in p53 protein expression. Under normal conditions, the wild p53 protein has a short half-life and cannot be detected by immunoprecipitation. Nevertheless, when p53 gene mutations are observed, the half-life of this protein may increase to six hours, thus allowing identification by immunohistochemistry (5, 6). It should be cautiously used since the absence of p53 protein expression does not necessarily rule out the presence of mutations (5, 6). For instance, tumors with deletion of both p53 alleles can be classified as negative, also including tumors without p53 protein

expression (5). Moreover, some types of viruses (adenovirus, papillomavirus) can cause changes in the stability of p53 protein, allowing for its detection by immunohistochemistry and leading to false positive results (5). For some authors, another limitation of immunohistochemistry is the difficulty in reproducing the analysis among different pathologists (63). However, this was not observed in the present study, in which interobserver agreement was amply obtained, as confirmed by kappa statistic, which showed broad agreement between the diagnoses.

TP53 gene mutations are detected in 36 to 80% of patients with esophageal cancer and they apparently have an early development in esophageal tumorigenesis, being detected from dysplasia to carcinoma and from Barrett's metaplasia to adenocarcinoma (7, 8, 64, 65). Nonetheless, most patient populations are not classified into subgroups according to the histological tumor type, preventing a consensus of opinion about the actual role of p53 protein in esophageal adenocarcinomas (3, 7, 8, 27, 43, 62, 66-68). The prevalence of p53 protein expression in the present study (57.2%) is in agreement with that shown in the available literature.

In the present study, we found no correlation between p53 protein expression, determined by immunohistochemistry, and improvement of long-term survival. Although some studies assert that this expression is of prognostic value, its actual role in esophageal adenocarcinomas still remains unclear (8, 27). Given the fact that p53 protein expression is not observed in all patients with esophageal adenocarcinoma, the action of other mechanisms may be inferred (4, 27, 43, 54, 69), such as the functional loss of p16, pRB and cyclin D1 genes, which can also cause DNA damage in the G1 phase of the cell cycle (70-72).

According to the TNM staging system, p53 protein expression showed no correlation with greater tumor invasion, which indicates that, in the present study, p53 gene mutation has no statistically significant difference at these stages, occurring at early stages (I) and possibly

increasing at more advanced stages (IV) of the disease (43, 57, 71), and being present in premalignant lesions (7, 43, 70-72). The expression of p53 protein was not an independent prognostic factor in patients with adenocarcinoma and did not correlate with the other clinicopathological characteristics. In the present study, p53 protein expression was not correlated with worse prognosis, after the univariate and multivariate analyses, adjusted according to Cox proportional hazards regression for the variables depth of tumor penetration through the esophageal wall, lymph node involvement, surgical staging, level of tumor differentiation and Siewert's classification.

Solid tumors can be supplied with nutrients up to a diameter of approximately 1 to 2mm by diffusion mechanisms. After this cellular volume is achieved, new vessels are necessary for tumor growth (11,73-75). Among the proteins that participate in angiogenesis in different types of tumors, the vascular endothelial growth factor (VEGF) is certainly the most widely studied (76, 77).

VEGF is a specific mitogenic factor of endothelial cell proliferation produced during embryonic development and also in adult life by physiological processes for development and tissue repair (embryonic development, menstrual cycle, hypertrophic growth of muscle tissue secondary to exercise), determining the formation of new blood vessels and increasing microvascular permeability. In pathological conditions, VEGF expression is apparently greater at the sites of the tumor that are adjacent to necrotic (avascular) areas, which is consistent with the possibility that tumor angiogenesis could be induced, to some extent, by hypoxia (11, 78) – seemingly its major stimulus (11, 20, 79, 80). VEGF is considered to be the most important parameter among angiogenic markers (11).

In the present study, VEGF expression was detected in 47.8% of the patients with esophageal adenocarcinoma, which is in agreement with the results described in the literature

(13-19, 81). VEGF expression did not correlate with any of the clinicopathological variables analyzed.

Most available studies on the prognostic effect of VEGF expression in patients with esophageal tumors are concerned with patients with epidermoid carcinoma of the esophagus (13, 15, 16, 18, 19,29). In these studies, the controversy over the role of VEGF in the prognosis of these patients still persists. Few available studies have assessed the prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma in which the detection of VEGF by immunohistochemistry could be demonstrated (12, 14). In these studies, no consensus was reached on the actual prognostic factor of VEGF expression. In the present study, VEGF expression was not associated with improvement of long-term prognosis in the univariate or multivariate analyses adjusted for depth of tumor penetration through the esophageal wall, lymph node involvement, surgical staging, level of tumor differentiation and Siewert's classification.

In a study conducted with patients with esophageal adenocarcinoma that assessed VEGF expression and its correlation with prognosis (12), tumor vascularization was more pronounced at earlier stages of the disease and correlated with better survival rates. However, in the present study, when we excluded patients with superficial tumors (accounting for approximately 30% of the patient population), vascularization did not show a prognostic value, and even though vascularization is correlated with VEGF expression, we did not observe an overall prognostic significance. These data allow us to conclude that angiogenesis is pronounced in premalignant lesions and in early carcinomas, constituting an early event in neoplastic progression (82) and that at advanced stages, the established prognostic factors (depth of tumor penetration through the esophageal wall, lymph node involvement, level of tumor differentiation, distant metastasis) are possibly more important than angiogenesis alone, for the determination of prognosis (19, 76, 83, 84).

When the study group consists of patients whose tumors are at an early stage of development and whose follow-up period will be consequently longer, the difference between the long-term survival curves will probably be greater, thus determining the prognostic value. VEGF expression appears to be useful for patients at the initial stages of the disease (85). An approach to be adopted in these cases would be the implementation of more aggressive therapies (e.g.: neoadjuvant therapy), in VEGF+ patients, since they could present metastasis quite early and consequently have a worse prognosis (19, 86-88).

Tumor development and growth at advance stages (as in the present study) seem to occur independently of VEGF expression, whereas the initial metastatic event may be VEGF-dependent or be at least correlated with this factor (85). At advanced stages, angiogenic events are less pronounced (12, 76, 82), and because of that, their influence over the prognosis of patients may not be demonstrated in studies with a large patient population with advanced carcinomas.

Clinical and experimental evidence has suggested that p53 plays an important role in the regulation of VEGF expression (15, 22). The expression of p53 protein could be associated with an increase in VEGF production (20, 21, 23), even though recent studies specifically concerned with esophageal carcinoma (with no distinction of histological type) have not successfully shown such association (17, 19, 89). The coexpression of these proteins would be associated with worse prognosis (15, 17).

In the present study, the coexpression between p53 protein and VEGF detected by immunohistochemistry was observed in 12 patients (26% of the cases), and this association was not correlated with worse prognosis or with the presence of distinct clinicopathological characteristics in groups with and without expression of the proteins.

Our conclusion is that in the present study p53 protein was expressed in 24 patients (52.2%) and its expression was no related to worse prognosis, and that VEGF expression was



detected in 22 patients (47.2%). No correlation was observed between VEGF expression (determined by immunohistochemistry) and long-term survival. The association between the coexpression of p53 protein determined by immunohistochemistry and VEGF did not correlate with prognosis in the present study.

Therefore, in the studied patients, the immunohistochemical analysis of p53 protein and VEGF did not prove to be a prognostic factor for long-term survival.

## References

1. Blot WJ. Cancer of the esophagus: its causes and changing patterns of occurrence. In: Perry MC, Whippen D, editors. Proceedings of the 33rd American Society of Clinical Oncology - Educational Book; 1997 May 17-20; Denver, USA. USA, American Society of Clinical Oncology; 1997. p. 159-63.
2. Ruol A. Multimodality treatment for non-metastatic cancer of the thoracic esophagus. *Dis Esoph* 1996; 9: 39-55.
3. Ribeiro Jr U, Filkelstein SD, Safatle-Ribeiro AV et al. p53 sequence analysis predicts treatment response and outcome of patients with esophageal carcinoma. *Cancer* 1998; 83:7-18.
4. Jenkins GJS, Doak SH, Parry JM, D'Souza FR, Griffiths AP, Baxter JN. Genetic pathways involved in the progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma. *Br J Surg* 2002; 89: 824-7.
5. Chang F, Syrjänen S, Tervahauta A, Syrjänen K. Tumourigenesis associated with the p53 tumour suppressor gene. *Br J Cancer* 1993; 68: 653-61.
6. Steele RJC, Thompson AM, Hall PA, Lane DP. The p53 tumor suppressor gene. *Br J Surg* 1998; 85: 1460-7.

7. Casson AG, Evans SC, Gillis A et al. Clinical implications of p53 tumor suppressor gene mutation and protein expression in esophageal adenocarcinomas: results of a ten-year prospective study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125: 1121-31
8. Dolan K, Walker SJ, Gosney J, Field JK, Sutton R. TP53 mutations in malignant and premalignant Barrett's esophagus. *Dis Esoph* 2003; 16: 83-9.
9. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1757-63.
10. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2413-22.
11. Gaiso MK. Antiangiogenesis: a new anticancer therapy ? *Medscape Oncology* 1999; 2: 1-5. Available at <http://www.medscape.com/viewarticle/408446>
12. Coulevard A, Paraf F, Gratio V et al. Angiogenesis in the neoplastic sequence of Barrett's oesophagus. Correlation with VEGF expression. *J Pathol* 2000; 192: 14-8.
13. Inoue K, Ozeki Y, Suganuma T, Sugiura Y, Tanaka S. Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1997; 79:206-13.
14. Kitadai Y, Haruma K, Tokutomi T et al. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2195-200.

15. Uchida S, Shimada Y, Watanabe G 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: 1704-9.
16. 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: 25-30.
17. Koide N, Nishio A, Hiraguri M, Hanazaki K, Adachi W, Amano J. Coexpression of vascular endothelial growth factor and p53 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1733-40.
18. 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.
19. Rosa ARP, Schirmer CC, Gurki RR, Meurer L, Edelweiss MI, Kruel CP. Prognostic value of p53 protein expression and vascular endothelial growth factor expression in resected squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esoph* 2003; 16: 112-8.
20. 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.

21. 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: 6161-5.
22. Maeda K, Kang SM, Onoda N et al. Expression of p53 and vascular endothelial growth factor associated with tumor angiogenesis and prognosis in gastric cancer. *Oncology* 1998; 55: 594-9
23. Maeda K, Kang S, Onoda N 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.
24. Rosa ARP, Schirmer CC, Gurski RR, Brentano L, Kruel CD. Survival and prognostic factors in patients with epidermoid oesophageal carcinoma. *Int Surg* 1999; 94: 193-8.
25. Cavazzola LT, Telles JPB, Pesce G et al. Delayed Cervical Esophagogastric Anastomosis. In: Pinotti HW, Ceconello I, Felix VN, Oliveira MA, editors. *Recent Advances in Diseases of the Esophagus*, Bologna: Monduzzi Editore 2001; p.579-85.
26. Siewert JR, Stein HJ. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Br J Surg* 1998; 85: 1457-9.
27. Coggi G, Bosari S, Roncalli M et al. p53 protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma. *Cancer* 1997; 79: 125-32.

28. Kajiyama Y, Hattori K, Tomita N et al. Histopathologic effects of neoadjuvant therapies for advanced squamous cell carcinoma of the esophagus: multivariate analysis of predictive factors and p53 overexpression. *Dis Esoph* 2002; 15: 61-6.
29. Koide N, Nishio A, Kono T et al. Histochemical study of vascular endothelial growth factor in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 952-8.
30. Engel LS, Chow WH, Vaughan TL et al. Population attributable risks of esophageal and gastric cancers. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1404-13.
31. Eloubedi MA, Desmon R, Arguedas MR, Reed CE, Wilcox CM. Prognostic Factors for the Survival of Patients with Esophageal Carcinoma in the U.S. The Importance of Tumor Length and Lymph Node Status. *Cancer* 2002; 95: 1434-43.
32. Ikeda M, Natsugoe S, Ueno S, Baba M, Aikou T. Significant Host- and Tumor-Related Factors for Predicting Prognosis in Patients with Esophageal Carcinoma. *Ann Surg* 2003; 238: 197-202.
33. Altorki NK, Oliveria S, Schrupp D. Epidemiology and Molecular Biology of Barrett's Adenocarcinoma. *Semin Surg Oncol* 1997; 13: 270-80.
34. Slehria S, Sharma P. Barrett's Esophagus. *Curr Opin Gastroenterol* 2003; 19(4): 387-93. Available at [www.medscape.com/viewarticle/457731](http://www.medscape.com/viewarticle/457731).

35. Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340: 825-31
36. Cameron AJ. Epidemiology of Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Dis Esoph* 2002; 15: 106-8.
37. Brown LM, Swanson CA, Gridley G et al. Adenocarcinoma of the esophagus: role of obesity and diet. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 104-9.
38. Gurski RR, Petters JH, Hagen JA et al. Barrett's esophagus can and does regress after antireflux surgery: a study of prevalence and predictive features. *J Am Coll Surg* 2003; 196: 706-13.
39. Spechler SJ. Barrett's esophagus. *N Engl J Med* 2002; 346: 837-42.
40. Watson A. Barrett's esophagus – 50 years on. *Br J Surg* 2000, 87: 529-31.
41. Ruol A, Parenti A, Zaninotto G et al. Intestinal Metaplasia is the Probable Common Precursor of Adenocarcinoma in Barrett Esophagus and Adenocarcinoma of the Gastric Cardia. *Cancer* 2000; 88: 2520-8.
42. Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni Jr JF. Rising Incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 1991; 265: 1287-9.

42. Hansen S, Melby KK, Aase S et al. Role of smoking and *Helicobacter pylori* infection in aetiology of cardia versus non-cardia gastric cancer. *Gastroenterology* 2000; 118: A75. (abstract)
43. Ireland AP, Shibata DK, Chandrasoma P, Lord RVN, Petters JH, DeMeester TR. Clinical Significance of *p53* Mutations in Adenocarcinoma of the Esophagus and Cardia. *Ann Surg* 2000; 231: 179-87.
44. Wijnhoven BPL, Siersema PD, vanDekken H et al. Adenocarcinomas of the distal oesophagus and gastric cardia are one clinical entity. *Br J Surg* 1999; 86: 529-35.
45. vanDekken H, Alers J, Riegman PHJ, Rosenberg C, Tilanus HW, Vissers K. Molecular Cytogenetic Evaluation of Gastric Cardia Adenocarcinoma and Precursor Lesions. *Am J Pathol* 2001; 158: 1961-7.
46. Bruno L, Nesi G, Montinaro F et al. Clinicopathologic findings and results of surgical treatment in Cardiac Adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2000; 74: 33-5.
47. Tanière P, Martel-Planche G, Maurici D et al. Molecular and Clinical Differences Between Adenocarcinomas of the Esophagus and Gastric Cardia. *Am J Pathol* 2001; 158: 33-40.



48. Siewert JR, Feith M, Stein HJ. Adenocarcinoma of the Esophagogastric Junction – Results of Surgical Therapy Based on Anatomical/Topographic Classification in 1002 Consecutive Patients. *Ann Surg* 2000; 232: 353-61.
49. Hardiwick RH, Williams GT. Staging of oesophageal adenocarcinoma. *Br J Surg* 2002; 89: 1076-7.
50. Siewert JR, Stein HJ, Feith M, Bruecher BLD, Bartels H, Fink U. Histologic Tumor Type is an Independent Prognostic Parameter in Esophageal Cancer: Lessons from more than 1000 Consecutive Resections at a Single Center in the Western World. *Ann Surg* 2001; 234: 360-9.
51. Siewert JR, Stein HJ, Sandler A et al. Esophageal cancer: Clinical management. In: Kelsen DA, ed. *Principles and practice of gastrointestinal oncology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams; 2001, 976 p.
52. Lerut T, DeDeyn P, Coosemans W et al. Surgical strategies in esophageal carcinoma with emphasis on radical lymphadenectomy. *Ann Surg* 1992; 216: 583-90.
53. Hagen JA, Peters JH, DeMeester TR. Superiority of extended en bloc esophagogastrectomy for carcinoma of the lower esophagus and cardia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 106: 850-8.

54. Alexandrou A, Davis PA, Law S, Murthy S, Whooley BP, Wong J. Squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lower third of the esophagus and gastric cardia: similarities and differences. *Dis Esoph* 2002; 15: 290-5.
55. Bollschweiler E, Schroder W, Holscher AH, Siewert JR. Preoperative risk analysis in patients with adenocarcinoma or squamous cell carcinoma of the esophagus. *Br J Surg* 2000; 87: 1106-10.
56. Shinohara M, Aoki T, Sato S et al. Cell cycle-regulated factors in esophageal cancer. *Dis Esophagus* 2002; 15:149-54.
57. Audrézet MP, Robaszkiewicz M, Mercier B et al. Molecular analysis of the TP53 gene in Barrett's adenocarcinoma. *Human Mutation* 1996; 7: 109-13.
58. Hanas J, Lerner MR, Lightfoot SA et al. Expression of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and p53 Tumor Suppressor in Dysplastic Progression and Adenocarcinoma in Barrett Esophagus. *Cancer* 1999; 86: 756-63.
59. 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.
60. Fagundes RB, Mello CR, Tollens P et al. p53 protein in esophageal mucosa of individuals at high risk of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esophagus* 2001; 14: 185-90.

61. 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.
62. Kanamoto A, Kato H, Tachimori Y et al. No prognostic significance of p53 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 1999; 72: 94-8.
63. 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.
64. Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res* 1999; 59: 1391-9.
65. 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.
66. 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: 1623-26.

67. Patel DD, Bhatavdekar JM, Chikhlikar PR 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.
68. Casson AG, Tammemagi M, Eskandarian S, Redston M, McLaughlin J, Ozcelik H. p53 alterations in oesophageal cancer: association with clinicopathological features, risk factors, and survival. *Mol Pathol* 1998; 51: 71-9
69. Younes M, Ertan A, Lechago J. P53 protein and malignant progression in Barrett's Metaplasia (Barrett's Esophagus) *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1200-1.
70. Wu TT, Watanabe T, Heitmiller R, Zahurak M, Forastiere AA, Hamilton SR. Genetic alterations in Barrett esophagus and adenocarcinomas of the esophagus and esophagogastric junction region. *Am J Pathol* 1998; 153: 287-94.
71. Wijnhoven BPL, Tilanus HW, Dinjens WNM. Molecular Biology of Barrett's Adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001; 233: 322-37.
72. Adulaimi D, Jankowki J. Barrett's esophagus: an overview of the molecular biology. *Dis Esoph* 1999; 12: 177-80.
73. Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2451-60.
74. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.

75. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? *Cancer Res* 1986; 46:467-73.
76. Poon RTP, Fan ST, Wong J. Clinical Significance of Angiogenesis in Gastrointestinal Cancers – A Target of Novel Prognostic and Therapeutic Approaches. *Ann Surg* 2003; 238: 9-28.
77. Nicosia R. What is the Role of Vascular Endothelial Growth Factor-Related Molecules in Tumor Angiogenesis. *Am J Pathol* 1998; 153: 11-6.
78. Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996; 271: 603-6.
79. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumors: an International Consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2474-84.
80. 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.
81. Shimada H, Takeda A, Nabeya Y et al. Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 663-9.

82. Wilson KT. Angiogenic markers, neovascularization and malignant deformation of Barrett's esophagus. *Dis Esoph* 2002; 15: 16-21.
83. DeMeester SR. Lymph node involvement in esophageal adenocarcinoma: If you see one, have you seen them all? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126: 947-9.
84. Lerut T, Coosemans W, Decker G et al. Extracapsular lymph node involvement is a negative prognostic factor in T3 adenocarcinoma of the distal esophagus and gastroesophageal junction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126: 1121-7
85. 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: 1366-72.
86. Torres C, Wang H, Tuner SJ, Shahsafaei A, Odze RD. Prognostic significance and effect of chemoradioterapy on microvessel density in esophageal Barrett's adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Human Pathol* 1999; 30: 753-8
87. McDonnell CO, Bouchier-Hayes DJ, Toomey D, Foley D, Kay EW, Leen E, Walsh TN. Effect of neoadjuvant chemoradiotherapy on angiogenesis in oesophageal cancer. *Br J Surg* 2003; 90: 1373-8.
88. McDonnell CO, Harvey JH, Bouchier-Hayes DJ, Walsh NJ. Effect of multimodality therapy on circulating vascular endothelial growth factor levels in patients with esophageal cancer. *Br J Surg* 2001; 88: 1105-9.

89. Ahn MJ, Jang SJ, Park YW et al. Clinical prognostic values of vascular endothelial growth factor, microvessel density and p53 expression in esophageal carcinomas. *J Korean Med Sci* 2002; 17: 201-7. (abstract)

*“If you are not criticized, you may not be doing much”*

*Donald Rumsfeld*

*“Anyone who has never made a mistake has never tried anything new”*

*Albert Einstein*