

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS GASTROENTEROLÓGICAS**

Tese de Doutorado:

**DENSIDADE MICROVASCULAR INTRATUMORAL E EXPRESSÃO  
IMUNO-HISTOQUÍMICA DE p21: ASSOCIAÇÃO COM SOBREVIVÊNCIA  
EM PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA POR CARCINOMA  
EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO**

Aluna: Luíse Meurer

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss

Co-orientador: Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Kruel

Porto Alegre, setembro de 2003.

**LUÍSE MEURER**

**DENSIDADE MICROVASCULAR INTRATUMORAL E EXPRESSÃO  
IMUNO-HISTOQUÍMICA DE p21: ASSOCIAÇÃO COM SOBREVIDA  
EM PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA POR CARCINOMA  
EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Gastroenterológicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do grau de Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss

Co-orientador: Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Kruel

PORTO ALEGRE, SETEMBRO DE 2003



“Diego não conhecia o mar. O pai, Santiago Kovadloff, levou-o para que descobrisse o mar.

Viajaram para o Sul.

Ele, o mar, estava do outro lado das dunas altas, esperando.

Quando o menino e o pai enfim alcançaram aquelas alturas de areia, depois de muito caminhar, o mar estava na frente de seus olhos. E foi tanta a imensidão do mar, e tanto seu fulgor, que o menino ficou mudo de beleza.

E quando finalmente conseguiu falar, tremendo, gaguejando, pediu ao pai:

*- Me ajuda a olhar!     "*

Eduardo Galeano (1940 - ), O livro dos abraços, 1997.

***Para Marcela.***

***Para a família.***

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss, pela acolhida e pela orientação segura e transparente. Nestes anos de convívio, a relação extrapolou os limites daquela de orientadora e orientada, acrescentando à riqueza científica, a confiança que só a amizade pode trazer.

Ao Dr. Cleber Dario Pinto Krueel, pelo incentivo.

Ao Dr. André R. P. da Rosa, pela ajuda inestimável e generosidade constantes.

Ao Dr. Sérgio Gabriel da S. Barros, pela confiança e apoio. Seu entusiasmo e dedicação ao curso de Pós-Graduação são contagiantes.

Ao Dr. Adriano M. Granetto, pela ajuda na revisão dos prontuários e digitalização de numerosas imagens.

Aos colegas contratados, professores, residentes e funcionários do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio e ajuda.

Às técnicas em histologia do Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela confecção cuidadosa das lâminas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Gastroenterológicas, pela oportunidade de cursar o doutorado; a Moema e Tatiane, pela constante presteza.

Aos sócios e colegas do Laboratório Medicina Digital, pela paciência e pelas horas roubadas.

Aos meus amigos e amigas, cuja paciência, compreensão e apoio foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ao GPPG do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio logístico ao FIPE, suporte financeiro do trabalho.

Ao Sindicato dos Estabelecimentos Funerários do Rio Grande do Sul, pelas informações prestadas.

À Dra. Vânia Naomi Hiraka, pela ajuda com a estatística.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS, 8

LISTA DE TABELAS, 9

RESUMO, 10

ABSTRACT, 11

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, 12

2. JUSTIFICATIVA, 35

3. OBJETIVOS, 36

4. PACIENTES E MÉTODOS, 37

5. ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA PORTUGUESA, 40

6. ANEXOS

ANEXO 1. ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA INGLESA, 68

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, 92

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA PORTUGUESA

Figura 1. Curva global de sobrevida em 60 meses de 46 pacientes operados por carcinoma epidermóide de esôfago, 55

Figura 2. Curva de sobrevida em relação à densidade microvascular intratumoral (DMIT) em 46 pacientes operados por carcinoma epidermóide de esôfago, 56

Figura 3. Curva de sobrevida em relação à expressão imuno-histoquímica de p21 em 46 pacientes operados por carcinoma epidermóide de esôfago, 57

Figura 4. Vasos positivos para CD 31 em carcinoma epidermóide de esôfago, 58

Figura 5. Expressão imuno-histoquímica de p21, 59

### ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA INGLESA

Figure 1. Intratumoral microvascular density (IMD) and long term survival, 90

Figure 2. Immunohistochemical expression of p21 and long term survival, 91



## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Estudos envolvendo densidade microvascular intratumoral e sobrevida em pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago, 26

Tabela 2. Estudos envolvendo expressão imuno-histoquímica de p21 e sobrevida em pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago, 34

### ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA PORTUGUESA

Tabela 1. Variáveis clínico-patológicas e sua relação com a sobrevida em 46 pacientes operados por carcinoma epidermóide de esôfago, 52

Tabela 2. Estudos envolvendo densidade microvascular intratumoral e sobrevida em pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago, 53

Tabela 2. Estudos envolvendo expressão imuno-histoquímica de p21 e sobrevida em pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago, 54

### ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA INGLESA

Table 1. Clinicopathologic factors and relationship with survival in 46 cases of esophageal squamous cell carcinoma, 87

Table 2. Intratumoral microvascular density and survival in different studies, 88

Table 3. Immunohistochemical expression of p21 and survival in different studies, 89

## RESUMO

A densidade microvascular intratumoral (DMIT), representando o grau de angiogênese de uma lesão, pode ser um marcador importante no prognóstico de diversas neoplasias, destacando-se como tal nos carcinomas mamários. Seu papel no carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) ainda não está claro. O inibidor universal das quinases ciclina-dependentes (CDKs), p21<sup>WAF-1/CIP1</sup>, por ter um papel importante na regulação do ciclo celular, pode estar implicado no prognóstico de algumas neoplasias. Assim, o objetivo deste estudo é verificar se a DMIT e a expressão de p21 têm importância prognóstica no CEE. Para tal, foram estudados 46 pacientes portadores de CEE, submetidos à esofagectomia com intenção de cura. Avaliou-se a DMIT utilizando o marcador CD 31, contando os vasos em áreas de maior densidade (“hot-spots”), e a expressão de p21 foi estudada por imuno-histoquímica. Os pacientes foram acompanhados de 2,5 a 60 meses. A mediana da DMIT foi de 30,8 vasos por campo, e p21 foi expresso em 35 dos 46 casos. Concluindo, embora o grau de angiogênese tenha variado entre os casos e a expressão imuno-histoquímica de p21 estivesse presente em 77,1% dos pacientes, estes valores não influenciaram nem se correlacionaram com a sobrevida dos pacientes operados por CEE.

## ABSTRACT

Intratumoral microvascular density (IMD) reflects the degree of lesional angiogenesis and may be important as a prognostic indicator in neoplasia, especially in breast cancer. Its role in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) has not yet been clarified. The universal cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p21 has been described as a prognostic factor in several tumors, due to its key function in cell cycle regulation. This study aims to verify the importance of both IMD and p21 expression in the prognosis of ESCC. Forty-six patients who were submitted to curative esophagectomy for ESCC were selected. CD 31 was utilized to count vessels in areas of higher vascular density (hot spots) while p21 was evaluated by its immunohistochemical expression. The follow-up period varied from 2.5 to 60 months. The IMD median was 30.8 vessels/high-power-field and p21 was expressed in 35 out of 46 cases. There was some variation in angiogenesis degree and p21 was expressed in 77.1% of patients. However, they showed no correlation with survival in this study.

## **1 - INTRODUÇÃO**

### **1.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS**

O carcinoma epidermóide é a neoplasia mais comum do esôfago, constituindo-se em uma das neoplasias mais freqüentes e mais letais do mundo. Tem incidência especialmente elevada em países subdesenvolvidos, sendo três vezes mais comum em homens que em mulheres (1, 2).

Diferenças geográficas em sua incidência estão bem documentadas, tendo sido identificados diversos locais em que o tumor tem incidências muito mais elevadas. Estas áreas incluem a China, Irã, Casaquistão, norte da Argentina, sul do Brasil, França, Suíça e partes da África (3). Dentro do Rio Grande do Sul, há diferenças importantes na mortalidade produzida pelo carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) entre as diversas microrregiões, que vai de 4,74 a 16,79/100.000 homens (4). Tais diferenças geográficas fazem crer que existam diferentes patogêneses embora a neoplasia surja em uma mesma localização e envolva o mesmo tipo de célula (epitelial escamosa).

Em suas fases iniciais, os carcinomas de esôfago são geralmente assintomáticos, vindo a manifestar-se apenas em suas etapas mais avançadas, o que leva a um diagnóstico quase invariavelmente tardio. Considerando que o fator prognóstico mais importante é a extensão da doença (5), esse diagnóstico tardio, por si só, implica em um mau prognóstico (6). Nos carcinomas superficiais a situação é um pouco diferente. Na literatura ocidental os carcinomas superficiais são definidos como sendo os carcinomas que não invadem além da submucosa, independente da presença de metástase em linfonodos (7). Já as literaturas japonesa e chinesa

definem o carcinoma esofágico precoce como sendo a lesão que não invade além da submucosa e não apresenta metástases (8). Utilizando-se qualquer uma das definições, lesões superficiais ou precoces têm prognóstico melhor. Os estudos neste sentido, provenientes basicamente da França e, especialmente, do Japão, mostram um percentual entre 3 e 23% dos carcinomas como sendo superficiais ao diagnóstico, tendo estes índices melhorado nos últimos anos. Estes pacientes têm sobrevida de 86% em 5 anos e 56% em 10 anos depois da ressecção, atribuindo-se a maioria dos óbitos a causas outras que não o carcinoma esofágico (7).

Se o estadiamento é o fator prognóstico mais importante para os pacientes com carcinoma epidermóide do esôfago (CEE), existe a proposta de se acrescentar à classificação TNM o tamanho do tumor, além do número e proporção de linfonodos envolvidos (9, 10).

Por mais que a ressecção completa da lesão beneficie os pacientes (11), ela, por si só, raramente proporciona melhora da sobrevida a longo prazo, razão pela qual novos estudos têm sido direcionados para o uso de modalidades terapêuticas combinadas, a fim de melhorar o controle local e eliminar a doença micrometastática já presente na época da ressecção (12).

No sentido de detectar as lesões em suas fases mais precoces, técnicas endoscópicas com a utilização de corantes, como o lugol (13, 14), por exemplo, ou a utilização de exame citológico com diferentes modelos de balões (15), podem oferecer bons resultados, especialmente em populações de risco aumentado para a neoplasia.

A predição da agressividade biológica e da resposta ao tratamento através de análise tecidual pode ser de grande valor no manejo de pacientes com câncer. Se os tumores que não respondem ao tratamento neo-adjuvante puderem ser

identificados, tais pacientes poderiam ser poupados da morbidade inerente ao tratamento e até mesmo poderiam ser candidatos para novas abordagens terapêuticas.

Durante a década passada, o rápido desenvolvimento da biologia molecular evidenciou que os tumores surgem como resultado de alterações genéticas que interferem no controle normal do crescimento celular e da diferenciação (16). Essas alterações são divididas em duas categorias distintas: a ativação de proto-oncogenes e a inativação de genes de supressão tumoral. Proto-oncogenes são genes celulares normais que, quando inapropriadamente ativados como oncogenes, causam desregulação das vias de crescimento e de diferenciação celulares e aumentam a probabilidade de transformação tumoral. Em contraste com os proto-oncogenes, os genes de supressão tumoral são genes celulares normais que, quando inativados, levam a um distúrbio da proliferação celular e ao desenvolvimento de neoplasias (17).

A detecção de atividade da telomerase, por exemplo, foi estudada, comparando-se o CEE com mucosa escamosa normal. Num estudo sem quantificação, não houve diferença entre os grupos (77% das amostras tumorais mostraram atividade, comparado com 87% das amostras normais)(18). Outro grupo, também comparando amostras de carcinoma escamoso e mucosa escamosa normal, encontrou uma diferença importante na quantificação da atividade da telomerase (19).

Em estudo envolvendo 44 adenocarcinomas e 17 carcinomas epidermóides do esôfago, a diminuição da expressão do fator de crescimento tumoral alfa (TGF-alfa) e de p53 mostraram-se fatores negativos no prognóstico destas lesões (20). Outra publicação, estudando a expressão de VEGF e p53 em 60 pacientes com

CEE, mostrou uma relação importante entre uma pior sobrevida (de 23,1 meses) de pacientes com expressão alta de VEGF e de p53, que tinham uma densidade microvascular mais alta, comparada com pacientes sem expressão de VEGF e p53 (contagem microvascular mais baixa, e sobrevida de 68,4 meses) (21). A avaliação da expressão de VEGF e p53, no entanto, não mostrou valor prognóstico em estudo realizado no nosso meio (22).

As ciclinas também mereceram atenção. Níveis elevados de ciclina B1 mostraram-se associados a pior prognóstico (23, 24). Por outro lado, um padrão nuclear à coloração imuno-histoquímica conferiu aos pacientes um pior prognóstico, em comparação com aqueles cujo padrão de coloração era citoplasmático (25).

Descreveu-se um padrão imuno-histoquímico que conferiria um aumento da sobrevida livre de doença aos pacientes com CEE: a combinação de positividade imuno-histoquímica para a proteína do gene do retinoblastoma e negatividade da ciclina D1 (26). Um membro da família do gene do retinoblastoma, designada pRb2/p130 teve sua expressão associada com melhor diferenciação e melhor prognóstico (27).

A expressão da E-caderina foi descrita como conferindo melhor prognóstico aos pacientes com CEE (28, 29), ao contrário da expressão de um inibidor da apoptose (“survivin”), cuja expressão foi detectada em pacientes com menor sobrevida (30).

A redução da expressão do gene nm23-H1, designado como um gene de supressão de metástases tumorais, mostrou-se associada com pior prognóstico em pacientes com metástases em linfonodos, mas não naqueles sem as metástases (31).

Infiltrados inflamatórios intratumorais, constituídos pela mistura de células

CD4 e CD8 (classes de linfócitos T) podem estar associados com uma sobrevida melhor (32), embora também tenha sido descrito que um infiltrado de células CD8 positivas seria um fator positivo no prognósticos de pacientes com carcinoma esofágico, tanto no carcinoma epidermóide quanto no adenocarcinoma (33).

O CD 44, que é uma glicoproteína envolvida na interação célula-célula e célula-matriz, possui diversas variantes, sendo que uma delas, V2, parece conferir melhor prognóstico aos pacientes, sendo que naqueles sem metástases em linfonodos, mostrou-se como indicador independente de bom prognóstico (34).

Estudos complexos, com determinação de perfis de expressão gênica nas diferentes fases da carcinogênese estão sendo efetuados (35), e espera-se que estes possam contribuir para elucidar o processo de malignização nos carcinomas escamosos, e, por outro lado, auxiliar na determinação do prognóstico dos carcinomas epidermóides de esôfago.

## **1.2. Angiogênese e Densidade Microvascular Intratumoral**

Nos últimos 30 anos, a partir das primeiras publicações de Judah Folkman, tem sido dada grande importância à angiogênese tumoral. Definida como a formação de novos capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existentes, a angiogênese é fundamental para o desenvolvimento normal e a homeostasia. Em sua forma fisiológica, é essencial ao desenvolvimento tecidual, reprodução e cicatrização de feridas (36).

O processo de progressão tumoral, da geração de uma célula neoplásica ao estabelecimento de metástases à distância, caracteriza-se por alterações cumulativas no material genético das células em transformação. Essas alterações



são traduzidas, por exemplo, na perda do controle sobre a divisão celular, na imortalização e na aquisição da capacidade invasiva. Contudo, a progressão tumoral não depende somente da célula em transformação. Tumores sólidos podem ser comparados a microambientes, nos quais se encontram, além das células tumorais, fibroblastos normais, substância fundamental (matriz extracelular) normal e vasos sanguíneos normais, pelos quais trafegam leucócitos normais. Baseado na observação de que o tamanho do tumor é proporcional ao seu grau de vascularização, Folkman já postulava, em 1971, que vasos sanguíneos normais são essenciais para a expansão da massa tumoral (37, 38). Estudo utilizando técnicas de injeção de compostos siliconados na vasculatura esofágica documentou as alterações microvasculares na progressão do carcinoma esofágico (39). Enquanto nas displasias de baixo grau a vasculatura arborescente é delicada e os vasos interpilares têm discretos alongamentos, na progressão para displasia de alto grau e carcinoma intramucoso, observa-se progressiva dilatação da vasculatura arborescente e alongamento dos vasos interpilares. Apenas quando o tumor passa a invadir a submucosa é que os vasos neoformados surgem, formando uma trama complexa, que passa a fornecer oxigênio e outros nutrientes para a lesão.

Em revisão publicada em 2000, Kerbel (40) destaca os vários pontos essenciais da teoria de Folkman (41), aliados a estudos importantes de Algire e Chalkley, Greenblatt e Shubik e Warren (42-44). As primeiras evidências foram no sentido de mostrar que as neoplasias crescem de forma avascular até atingir 1 a 2 milímetros de diâmetro, obtendo oxigênio e nutrientes por difusão passiva. Em dado momento, estas células adquirem o fenótipo angiogênico, e começam a recrutar vasos maduros adjacentes, que passam a emitir brotamentos vasculares que, então, permeiam o tumor.

Para adquirir este fenótipo angiogênico, as células necessitam secretar substâncias angiogênicas. A primeira a ser descoberta foi o bFGF (fator de crescimento básico fibroblástico, também conhecido com FGF-2), que Shing e colaboradores isolaram de um condrossarcoma (45). As células da maioria dos cânceres secreta o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), que é um mitógeno específico do endotélio, funcionando, também, como inibidor da apoptose nas células endoteliais de vasos neoformados. (46-48). Outra importante família descrita é a das angiopoietinas e seus receptores (49). Angiopoietina-1 e angiopoietina-2 (ang-1 e ang-2) ligam-se, ambas, ao mesmo receptor, chamado tie-2, exercendo funções antagônicas. Ang-1 funciona como agonista, enquanto ang-2 pode causar regressão de vasos neoformados ao promover a apoptose de células endoteliais, exceto quando VEGF está presente, quando tanto ang-1 quanto ang-2 promovem a angiogênese (50-52). Nos CEEs, a ang-1 parece estar associada à neovascularização do estroma através do VEGF (53).

A fase seguinte dos estudos da angiogênese tumoral passou a descrever os inibidores endógenos da angiogênese, começando pela trombospodina-1, interferon  $\alpha\beta$ , angiostatina, endostatina, dentre numerosos outros (40).

É aceita, atualmente, a idéia de que a aquisição do fenótipo angiogênico por parte de uma neoplasia é resultado de uma alteração no balanço entre fatores estimuladores e fatores inibidores (54). Em condições de hipóxia, por exemplo, células normais reagem induzindo a formação de VEGF, um fator pró-angiogênico (55). As células tumorais também seriam capazes de induzir o mesmo tipo de resposta (aumento de substâncias pró-angiogênicas), por quaisquer mecanismos, desencadeando a resposta angiogênica e a expansão da massa tumoral. Para Folkman, o estado de dormência poderia ser atribuído a um balanço do fenômeno

de neoformação vascular, prevalecendo o efeito antiangiogênico. Através de vários estudos experimentais, Folkman conseguiu caracterizar a chamada de angiostatina, que tem grande capacidade de inibir a proliferação de células endoteliais. A angiostatina é provavelmente um fragmento de plasminogênio. A angiostatina, mas não o plasminogênio, tem ação antiangiogênica endógena e impede o crescimento de metástases em virtude de sua ação no bloqueio da neovascularização, representando uma base molecular para a dormência das metástases. Assim, um tumor primário pode suprimir a angiogênese em suas metástases, inibindo o crescimento dessas metástases (38) . Por outro lado, diversos estudos têm sido realizados, mostrando relação entre oncogenes e genes supressores de tumores com a angiogênese. A perda da expressão do p53 selvagem, por exemplo, resulta na perda da expressão da trombospodina (inibidor da angiogênese) (56, 57), além de estar possivelmente relacionada ao aumento da produção de VEGF (58).

A angiogênese também contribui para o processo metastático por facilitar o desprendimento de células tumorais no interior dos vasos sangüíneos neoformados. Estima-se que 4% da superfície vascular intra-tumoral seja ocupada por células malignas, formando dos chamados “vasos mosaico” (59). Desta população, cerca da metade se desprenderia para a circulação, resultando descamação de até um milhão de células por grama de tumor por dia (60).

Evidências sugerem que a angiogênese não só pode assegurar o crescimento tumoral pelo suprimento de mais nutrientes para o tumor, mas também pode agir através de efeitos parácrinos produzidos pelas células endoteliais. As células endoteliais são capazes de liberar fatores de crescimento que provocam a proliferação celular tumoral, sugerindo que possa haver uma interação entre as células tumorais e as células endoteliais, na qual as primeiras liberam substâncias

que estimulam as células endoteliais e, em troca, essas liberam substâncias que promovem o crescimento do tumor (61, 62). A descrição de migração direcional de células tumorais em direção a células endoteliais, mas não o reverso (atração de células endoteliais em direção a células tumorais), em ensaios com gel de fibrina coloca alguma luz sobre questão da quimiotaxia (63, 64).

Assim, a idéia de que a quantificação da angiogênese possa oferecer elementos prognósticos e, talvez, predizer a resposta à terapêutica com drogas específicas parece muito promissora (65, 66).

Atualmente, a medida da densidade microvascular intratumoral (DMIT) por imuno-histoquímica parece ser o método mais fidedigno de medida da atividade angiogênica, independente do método utilizado para determiná-la (67). Dadas as interações biológicas entre o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos e o crescimento tumoral, a invasão e as metástases, a quantificação da angiogênese tumoral humana pode proporcionar a patologistas e clínicos um parâmetro integrador dos três eventos fisiológicos chaves da progressão da doença (68) .

Embora a quantificação da angiogênese tenha sido realizada na maioria dos tipos tumorais, estudos prospectivos analisando a relação entre o prognóstico e a quantidade de vasos sanguíneos, ainda são escassos e mostram resultados contraditórios. Para que a quantificação da angiogênese se constitua num “prognosticador” confiável, a metodologia aplicada tem que ser caracterizada pela baixa variabilidade intra e interobservadores. Os resultados obtidos em diferentes locais devem ser comparados a fim de permitir a meta-análise. A metodologia proposta em 1996, e que têm mostrado bons resultados, inclui a seleção de zonas com grande proliferação vascular (“hot spot”) na margem invasiva do tumor. Os cortes, corados pelo CD31 seriam observados em pequenos aumentos, e estas

zonas, uma vez reconhecidas, seriam submetidas à contagem em grande aumento (200X). Neste método, células endoteliais ou grupos de células endoteliais claramente separados de microvasos adjacentes devem ser considerados como microvasos, e contados (68). Esta metodologia está amplamente baseada no estudo de Weidner em carcinomas mamários, onde a contagem de vasos mostrou-se como possível fator preditor de doença metastática (69). Uma alternativa para este exaustivo método foi testada em 1995. Após a seleção do “hot spot”, uma ocular contendo 25 pontos aleatórios é rodada de maneira que o máximo de pontos está sobre ou dentro de vasos, e estes são contados (contagem de pontos de Chalkley). Este parâmetro, que teve boa correlação com a contagem por análise de imagem e com a contagem manual, mostrou-se como fator preditor independente de prognóstico (70). Neste mesmo estudo, a área do lúmen vascular e o perímetro luminal foram avaliados, e se correlacionaram com a contagem de microvasos.

Alguns estudiosos, no entanto, vêem a avaliação da angiogênese pela DMIT com reservas, na medida em que ela verifica a presença de vasos, mas não verifica seu estado funcional ou o grau de angiogênese, que poderiam ser avaliados pela proliferação de células endoteliais ( com marcadores imuno-histoquímicos como PCNA e Ki-67) e o recrutamento de pericitos (que indica maturidade vascular) (71). Embora esta controvérsia não esteja resolvida na literatura, Rice sustenta que os microvasos são a manifestação visível da interação entre os fatores do microambiente tumoral, e que a quantificação de microvasos permanece como uma medida válida da angiogênese tumoral (72).

A avaliação quantitativa da neovascularização pode proporcionar informações sobre o comportamento do tumor e o potencial metastático. Muitos estudos clínicos têm demonstrado a correlação entre o grau de angiogênese, estimado pela análise

imuno-histoquímica das células positivas para o antígeno relacionado ao fator VIII ou para os marcadores CD31 e CD34, e o prognóstico de pacientes em vários tumores sólidos. Os pacientes com escores de angiogênese altos têm apresentado taxas de sobrevida diminuídas, inclusive superando fatores prognósticos clássicos como o grau de diferenciação celular, o tamanho e a localização, particularmente em tumores de pulmão, próstata e cabeça e pescoço (61, 62, 73) . Os carcinomas mamários têm sido extensamente estudados neste sentido e uma contagem microvascular maior parece estar associada a pior prognóstico (74, 75). A importância da angiogênese nas neoplasias hematológicas está bem documentada (76).

Alguns estudos, no entanto, apontam para a existência de tumores ou sítios primários nos quais a angiogênese não teria um papel tão essencial. Em comentário publicado em 2001, Pezzella e colaboradores mencionam os estudos de seu grupo, levantando a hipótese de que, quando um tumor pode obter suprimento sanguíneo suficiente a partir do leito vascular pré-existente, a criação de novos vasos não seria crítica para seu desenvolvimento e capacidade de emitir metástases (77). Seu estudo com 500 casos de carcinoma não-de-pequenas células de pulmão, descreve quatro padrões diferentes de vascularização destas lesões. Destes, três (os chamados basal, papilar e difuso) mostram destruição do pulmão normal e a produção de novos vasos. 16% dos tumores (80 de 500), no entanto, mostraram um padrão chamado alveolar, no qual não foram observados nem destruição parenquimatosa, nem formação de estroma ou vasos. Desta forma, sugerem que, se o tumor tem um leito vascular disponível, pode explorá-lo e crescer sem induzir a neo-angiogênese (78).

Naresh e colaboradores publicaram estudo cujos resultados sugerem que as

metástases de neoplasias em linfonodos não necessitariam de neo-angiogênese, dada a riqueza de vasos nativos (79). Embora existam críticas ao método empregado por estes autores no estudo (80), outros investigadores também consideram que o grau de (in)dependência da angiogênese em alguns sítios, como linfonodos, fígado e pele depende do seu padrão de crescimento (se por “substituição” das células originais do órgão, sem ruptura de sua arquitetura estromal; ou com a destruição arquitetural e formação de estroma desmoplásico na metástase) (81). Em consenso com estes achados, Tsoi e colaboradores, estudando carcinoma não-de-pequenas células do pulmão, mostraram que a expressão de VEGF e a DMIT não estavam associados com índice proliferativo da lesão, tampouco ao índice mitótico, ploidia, expressão de p53 e sobrevida global (82).

Novos estudos envolvendo tanto contagem microvascular quanto avaliações morfométricas e estimativas de volume vascular deverão esclarecer estas questões.

Em relação ao trato digestivo, as publicações relacionadas à angiogênese têm se multiplicado. Alguns relatos, por exemplo, dão conta da associação da expressão elevada da enzima COX-2 com uma densidade microvascular mais alta (83).

Estudando 146 casos de carcinoma colorretal, Sternfeld e colaboradores mostraram que uma DMIT mais alta está relacionada a pior prognóstico, mostrando-se como fator independente de sobrevida global e recorrência (84).

A noção de que a DMIT poderia ter valor na determinação do prognóstico das lesões do trato gastrointestinal alto (62) é reforçada em alguns trabalhos envolvendo o carcinoma epidermóide de esôfago, e os principais estudos envolvendo a quantificação da angiogênese no CEE estão sumarizados na Tabela 1. Um destes

foi publicado em 1997, e envolveu o acompanhamento de 43 pacientes tratados por cirurgia, com ou sem quimioterapia, por 2 anos (85). Neste estudo, no qual foram utilizados dois marcadores imuno-histoquímicos para a marcação dos vasos (CD 34 e Fator VIII), com contagem de um campo de grande aumento (200X) em cinco áreas consideradas mais vasculares, a DMIT mostrou-se relacionada ao estágio do tumor, e à invasão linfática, sendo que o grupo hipovasacular apresentou uma sobrevida mais longa ( $p < 0,01$  com CD 31 e  $p < 0,05$  com Fator VIII).

Resultado semelhante (contagens mais altas determinando uma sobrevida mais curta) foi publicado por Shih e colaboradores, que estudaram 95 pacientes, utilizando como marcador de vasos o Fator VIII, encontrando um  $p = 0,009$  (86). Coincidentemente, o mesmo valor de significância para a sobrevida mais curta dos pacientes com lesões exibindo DMIT mais alta, foi encontrado por Elpek e colaboradores em seu estudo envolvendo 53 pacientes, com período de acompanhamento variando entre 6 e 60 meses (87).

Da mesma forma, com um período de acompanhamento de 28 a 36 meses de 83 pacientes, Igarashi e colaboradores puderam mostrar que pacientes com contagem microvascular mais alta tiveram uma sobrevida menor (com  $p = 0,027$ ) (88). Neste mesmo estudo, a DMIT estava significativamente associada a tamanho maior de tumor, presença de metástase em linfonodo e ao estágio da lesão.

Takebayashi e colaboradores, por outro lado, relatam o acompanhamento de 163 pacientes com CEE, distribuídos de forma bastante homogênea entre os estágios (33 pacientes em estágio I, 43 em estágio II, 38 em estágio III e 49 em estágio IV). Utilizando como marcador vascular o Fator VIII, a DMIT não se constituiu em elemento prognóstico (89). Torres e colaboradores, da mesma forma, não encontraram significância estatística na associação entre DMIT e carcinoma



esofágico, atribuindo este resultado ao pequeno número de casos estudados (22 pacientes) (90). Resultado semelhante a este foi obtido no estudo publicado por Ahn e colaboradores em 2002 (91), que utilizaram como marcador vascular o CD 34, e não detectaram valor prognóstico para a contagem microvascular em sua casuística de 81 pacientes. Esta englobava 3 pacientes em estágio I, 32 pacientes em estágio II, 36 pacientes em estágio III e 10 pacientes em estágio IV.

Tabela 1. Estudos envolvendo densidade microvascular intratumoral e sobrevida em pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago.

Autor, ano	Casos (número)	Seguimento (meses)	Resultado
Tanigawa, 1997	43	24	Maior sobrevida no grupo hipovascular (p<0,01)
Igarashi, 1998	83	28-36	Sobrevida menor na contagem mais alta (p=0,027)
Takebayashi, 1999	163	Não especificado	Não significativo
Torres, 1999	22	1-152	Não significativo
Shih, 2000	95	Até 81	Menor sobrevida com contagens mais altas (p=0,009)
Koide, 2001	60	Não especificado	Menor sobrevida com contagens mais altas
Elpek, 2001	53	6-60	Menor sobrevida com contagens mais altas (p=0,009)
Ahn, 2002	81	3,9-128	Não significativo

Pode-se dizer, portanto, que restam dúvidas sobre o papel da DMIT no prognóstico dos pacientes portadores de CEE.

## 1.2 – p21

O p21 (WAF1/CIP1), gene localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.2) (92) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink)), sintetiza a proteína p21, que faz parte da família dos inibidores das ciclinas quinase-dependentes, funcionando, desta maneira, como regulador da progressão do ciclo celular em G1.

Resumidamente, o ciclo celular é regulado por dois tipos de mecanismo: 1) a cascata de vias de fosforilação de proteínas, envolvendo as ciclinas, e 2) os pontos de controle. Para exercer suas funções, as várias ciclinas (A, B e E) ligam-se as quinases ciclina-dependentes (CDKs). A passagem de G1 para S é, em grande parte, controlada pela fosforilação da proteína do retinoblastoma (Rb). Nas fases quiescentes, o Rb está ligado ao fator de transcrição E2F. Próximo ao ponto de restrição, Rb é fosforilado pelas quinases CDK4,6-ciclina D, o que o leva a soltar E2F, que então ativa a transcrição dos genes requeridos para a fase S (93).

O p21 é um inibidor universal de CDKs, ligando-se a todos os complexos de CDK2, CDK3, CDK4 e CDK6. Ao formar um complexo quaternário com ciclinas, CDKs e o antígeno nuclear da célula proliferante (PCNA), inibe a transição da fase G1 para a fase S (92, 94).

Outra maneira de descrever o papel do p21 no ciclo celular, seria dizer que o principal substrato das ciclinas e CDKs é o produto do Rb, e a fosforilação do Rb pelo complexo ciclina/CDK permite a progressão do ciclo celular. p21 (junto com p27), ao ligarem-se a este complexo, impedem sua atividade. Desta maneira, o Rb não é fosforilado, e o ciclo celular pára (95), ou seja, a transição da fase G1 para a fase S acontece quando a concentração do complexo ciclina A/CDK2 ultrapassa a de p21 (96).

Por ter sido clonado independentemente por vários grupos, o p21 acabou por receber diversos nomes: CIP1, como proteína interagindo com CDKs (94); WAF1, como fator ativado pelo p53 selvagem (92); SDI1, como inibidor derivado de células senescentes (97); e MDA-6, como proteína associada à diferenciação de melanomas (98).

A transcrição do p21 é controlada por mecanismos p53-dependentes e p53-independentes, ou de ambas as formas pelo oncogene *ras* ativado (99).

A transcrição do p21 durante a embriogênese normal não requer a presença do p53. Por outro lado, estudos indicam que a via p53-dependente de indução de transcrição do p21 é essencial para a resposta a danos ao DNA (100). Especificamente no esôfago, não foi detectada expressão imuno-histoquímica no tecido fetal, em contraste com uma positividade de 39% dos esôfagos normais de adultos, 38% dos casos com hiperplasia de células basais, 27% dos casos com displasia e em 14% dos casos de carcinoma epidermóide (101).

A ativação do p21 pelo *ras* e p53, por sua vez, poderia ser um mecanismo a permitir que a célula não vá a tumorigênese (102). Exemplificando, quando queratinócitos p21<sup>-/-</sup> são transformados pelo *ras*, e são introduzidos em ratos nus (sem timo), formam-se tumores agressivos, o que não acontece se os queratinócitos são normais (103).

A via p53-independente de transcrição pode ser exemplificada pelo experimento no qual o BCRA1 (proteína supressora de tumores) é introduzida em linhagens tumorais que contém o p21 funcionando, cujo resultado é a inibição de síntese do DNA (104).

Utilizando um adenovírus como vetor para a transferência do gene p21 para cultura de células de carcinoma epidermóide, obteve-se a parada do ciclo celular em

G1, e alterações morfológicas de diferenciação, além de numerosas apoptoses (105).

Sabe-se, portanto, que a expressão de p21 inibe seletivamente um grupo de genes envolvidos na mitose, replicação de DNA, segregação e reparo, e faz parte do grupo de genes que têm sido associados com senescência ou implicados em doenças relacionadas à idade (Alzheimer, amiloidose) (106). Cabe ressaltar, no entanto, que o p21 não costuma exibir mutações nas neoplasias humanas (107).

Uma droga chamada TNP 470, que é citotóxica em dose alta, e anti-angiogênica em dose baixa, induz a ativação de p53 nas células endoteliais, com expressão de p21 e parada no ciclo celular (108, 109). Cabe ainda ressaltar, ainda, algumas publicações que mostram relação da expressão de p21 com algumas formas de tratamento. Estudando cultura de células endoteliais, descreve-se que a integrina  $\alpha\beta_3$ , para a qual existem antagonistas, liga-se às células endoteliais, suprimindo a atividade tanto do p53 quanto do p21, levando à sobrevivência das células (110). O agente ftalalocianina de silicone (Pc4), administrado antes de terapia fotodinâmica, em linhagem de carcinoma epidermóide humano, induz a expressão de p21, impondo, desta maneira, um *checkpoint* artificial na transição G1-S, com parada das células em G0 e G1, via inibição das CDKs 2 e 6, ciclina D1 e ciclina E. Estas alterações seriam irreversíveis, e levariam à apoptose (111). A atividade transcricional do TP53 sobre p21 e o gene *bax* não teve relação com a resposta do carcinoma epidermóide ao tratamento quimioterápico (112). Um outro estudo, envolvendo o uso de terapia com oligonucleotídeo (*antisense oligodeoxynucleotide*) para p21 em cultura de células de carcinoma colônico mostrou aumento importante da radiosensibilidade das células, com perda da parada em G1 e aumento da apoptose (113). Michel e colaboradores descreveram melhor resposta

a quimiorradioterapia em pacientes com CEE nos quais a via de ativação do p21 através do p53 não mutado estava preservada (112).

Diversos estudos têm implicado a expressão imuno-histoquímica do p21 no prognóstico de neoplasias.

No carcinoma superficial de bexiga, por exemplo, a não-expressão do p21 está fortemente associada à sobrevida mais curta dos pacientes (114). Por outro lado, em estudo compreendendo 261 pacientes com carcinoma de mama, a expressão de p21 mostrou-se associada à sobrevida mais curta dos pacientes (115). Já nas neoplasias epiteliais ovarianas, os casos com expressão forte do p21 tiveram uma sobrevida melhor, quando comparados àqueles com expressão fraca ou ausente (116).

Em relação ao trato digestivo, está descrita a perda da expressão da proteína do p21 na progressão de carcinomas colorretais esporádicos, mas não nos carcinomas colorretais hereditários não-polipóides (117). Neste estudo, foi demonstrada positividade imuno-histoquímica para a proteína p21 em células crípticas do epitélio colônico normal, com redução desta expressão progressivamente na transição para adenomas e carcinomas. Por outro lado, a expressão mais alta de p21 apesar de associada com p53 não-mutado, não mostrou relação com as variáveis prognósticas clássicas (118). Polyak e colaboradores observaram a diminuição da expressão de p21 em epitélio displásico no cólon, em contraste com uma expressão clara de p21 no compartimento intermediário (não-proliferativo) das criptas. Este evento seria, obviamente, independente da mutação do p53, que é tardia nos carcinomas do colorreto (119).

Estudando carcinomas escamosos do canal anal, Holm e colaboradores encontraram associação da expressão de p21 com desdiferenciação tumoral e

encurtamento da sobrevida (120).

Em carcinomas gástricos, estudo japonês mostrou que a não-expressão de p21 está associada a um prognóstico pior, especialmente se a lesão também não expressa p27 (outro membro da família dos inibidores de CDKs) (121).

Estudo envolvendo a inclusão total de 10 peças de esôfago de Barrett com displasia de alto grau ou carcinoma superficial, mostrou expressão de p21 focalmente em mucosa não-displásica (normal). Além disso, ele estava sobreexpresso em 2 adenocarcinomas, uma displasia de alto grau e 2 casos de displasia de baixo grau. Tais achados, no entanto, não tinham relação com o status do p53 (122).

Ohbu e colaboradores publicaram uma seqüência de eventos no processo de progressão da displasia de baixo grau ao carcinoma escamoso do esôfago. Os passos seriam a sobre-expressão da ciclina E e do p53, seguida da redução do p21 e desregulação da ciclina D1 e do p27 (123).

No epitélio escamoso esofágico normal, a expressão do p21 estaria restrita ao compartimento proliferativo, ou seja, à camada basal, estando, desta forma, mais relacionada à proliferação do que à diferenciação (124). Um papel do p21 no processo de diferenciação dos CEEs, no entanto, é sugerido por estudo no qual sua positividade é mais freqüentemente encontrada nas partes mais diferenciadas da lesão. Além disso, neste mesmo estudo, carcinomas bem diferenciados mostraram-se fortemente positivos em 100% dos casos, comparados com coloração apenas fraca em 40% dos carcinomas pouco diferenciados (125). Achados semelhantes foram relatados em estudo envolvendo a expressão de p21 em 25 casos de CEE, mostrando que seis dentre oito casos bem diferenciados eram positivos para p21, enquanto os oito casos pouco diferenciados eram negativos. Além disso, sete casos

tinham o p53 mutado, e todos eram negativos para p21. 18 casos exibiam o p53 normal, sendo 11 positivos para p21. Disso concluiu-se que a expressão de p21 nos carcinomas epidermóides de esôfago é induzida pela via dependente de p53, e afeta apoptose e diferenciação da lesão (126).

Seta e colaboradores descrevem a expressão de p21 em 29% dos carcinomas gástricos e em 27% dos carcinomas epidermóides esofágicos estudados, sendo 14% casos com alteração do p53 e 45% sem esta alteração (127).

A expressão do p21 na via dependente do p53 nos CEEs foi estudada por Natsugoe e colaboradores, que concluíram que dentre tumores p53 negativos, os positivos para p21 tinham prognóstico melhor do que os negativos (128). Por outro lado, não foi encontrada relação entre a expressão de p21 e as mutações do p53 em estudo avaliando 106 CEEs. Os achados deste estudo, no entanto, sugerem uma atividade transcricional do gene p73 (um homólogo do p53) sobre o p21 (129). Um estudo prévio já descrevera a ausência de influência do status do p53 sobre a expressão de p21 em carcinomas esofágicos e gástricos (127).

Publicações avaliando a importância prognóstica da expressão de p21 em pacientes portadores de CEE não são muito abundantes, e mostram resultados conflitantes. Elas estão sumarizadas na Tabela 2.

O primeiro estudo é de 1998, e envolveu 149 pacientes, sem que tenham sido especificadas as suas características clínico-patológicas. Ao agrupar a positividade em menos de 50% das células e em mais de 50% delas, os autores encontraram uma sobrevida significativamente mais curta no segundo grupo ( $p=0,0081$ ), ou seja, uma expressão alta de p21 seria um fator de pior prognóstico (130).

Da mesma forma, outro estudo arrolando 153 pacientes encontrou uma sobrevida mais curta em pacientes cujas lesões expressavam p21 (que constituíram



70% dos pacientes). Em sua casuística estavam englobados, predominantemente, carcinomas em estágios II e III, com 2 casos de estágio I e 2 casos de estágio IV (131).

Em total oposição a estes achados estão os resultados de Nita e colaboradores. Diferentemente de todos os outros estudos, que utilizam essencialmente avaliações semi-quantitativas, este baseou-se na digitalização de imagens das lesões com avaliação morfométrica digital e quantificação da positividade, dividindo-a em alta e baixa. Em sua coorte de 62 pacientes, distribuídos nos estágios I (17 pacientes), IIA (15 pacientes), IIB (10 pacientes) e III (20 pacientes), aqueles que exibiam alta expressão de p21 tinham uma sobrevida mais longa (95).

Um grupo japonês dividiu seus pacientes em dois estudos: um dedicado aos pacientes com lesões superficiais (invasão até a submucosa, estágio I) (132), e outro incluindo apenas lesões mais avançadas (128). O primeiro a ser publicado incluiu 103 pacientes com lesões avançadas, e a avaliação isolada da positividade imunohistoquímica de p21 não mostrou relação com o prognóstico. Quando, porém, foram combinados os achados em relação ao p53, observou-se que pacientes com p53 negativo (não-mutado) e p21 positivo tinham um melhor prognóstico (128). O estudo descrevendo os achados nos 79 pacientes com lesões superficiais não encontrou impacto prognóstico na expressão de p21 (132).

Matthew e colaboradores estudaram 100 pacientes portadores de CEE. Em seus achados, aqueles cujas lesões não eram positivas para Rb, p16 e p21 mostraram sobrevida mais que os outros, com um  $p=0,03$  na análise univariada. Estes achados, no entanto, não foram corroborados na análise multivariada (133).

Tabela 2: Estudos envolvendo expressão imuno-histoquímica de p21 e sobrevida em pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago.

Autor, ano	Casos (número)	Seguimento (meses)	Resultado
Sarbia, 1998	149	1–224	Expressão em mais de 50% das células: pior prognóstico (p=0,0081)
Lam, 1999	153	Não especificado	Expressão conferindo pior sobrevida (p=0,03)
Nita, 1999	62	2-137	Expressão alta conferindo melhor prognóstico (p=0,0062)
Natsugoe, 1999	103	60	p21 isolado: sem importância prognóstica; p53 negativo e p21 positivo: melhor prognóstico (casos avançados)
Matsumoto, 2001	79	60	Sem importância prognóstica (casos superficiais)
Mathew, 2002	100	44	Sem importância prognóstica na análise multivariada

Pode-se, dizer, portanto, que o papel da expressão de p21 no prognóstico do carcinoma epidermóide do esôfago ainda não está estabelecido, e merece investigações adicionais.

## 2. JUSTIFICATIVA

A angiogênese, que pode ser averiguada através da densidade microvascular intratumoral, tem mostrado valor prognóstico em diversas neoplasias. Em relação ao carcinoma epidermóide do esôfago, no entanto, existem poucos estudos abordando sua relação com a sobrevida a longo prazo, e os resultados são conflitantes. Da mesma forma, o inibidor das quinases ciclina-dependentes, p21, tem um papel importante na regulação do ciclo celular. Desta forma, sua expressão imuno-histoquímica tem sido estudada, mostrando influência no prognóstico de diversas neoplasias. As publicações em relação à sua importância como tal no carcinoma epidermóide de esôfago são escassas, e exibem dados discordantes. Assim, consideramos que a importância epidemiológica do carcinoma epidermóide de esôfago, e os dados conflitantes da literatura em relação à importância da densidade microvascular intratumoral e da expressão imuno-histoquímica de p21 em seu prognóstico, justificam a realização deste estudo.

### **3. OBJETIVOS**

3.1. Quantificar a angiogênese em carcinomas epidermóides de esôfago estabelecendo sua densidade microvascular intra-tumoral (DMIT);

3.2. Verificar a associação entre a DMIT e a sobrevida em longo prazo de pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago submetidos à esofagectomia;

3.3. Verificar a expressão do p21 e sua relação com a sobrevida em longo prazo em pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago submetidos à esofagectomia.

## **4. PACIENTES E MÉTODOS**

### **Pacientes**

No período de dezembro de 1988 a agosto de 2001, 86 pacientes foram submetidos à esofagectomia subtotal com intenção de cura, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foram excluídos do presente estudo os pacientes que faleceram por causas relacionadas ao procedimento cirúrgico (mortalidade pós-operatória precoce), que receberam tratamento neo-adjuvante ou que tinham história ou presença de outra neoplasia maligna concomitante, além daqueles em que o material disponível em blocos de parafina não era representativo da lesão. Foram estudados, portanto, 46 pacientes.

### **Avaliação anátomo-patológica**

Nas peças cirúrgicas foram avaliadas a profundidade de penetração do tumor na parede esofágica, comprometimento linfonodal, as margens cirúrgicas circunferencial e longitudinal e o grau histológico de diferenciação. O estadiamento da doença foi realizado de acordo com a União Internacional Contra o Câncer (UICC)-TNM(p) (134).

Os espécimes cirúrgicos foram fixados em formalina tamponada e emblocados em parafina. Foram avaliados cortes de 4 micra de espessura, corados pela hematoxilina-eosina.

### **Imuno-histoquímica**

Foram utilizados os anticorpos p21<sup>(WAF-1/Cip-1)</sup> (clone SX118, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) e, para a avaliação da DMIT, o CD 31 (clone JC70A,

DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), que reconhece uma glicoproteína de 100 kD das células endoteliais.

Cortes representativos da margem invasora do tumor foram submetidos à técnica imuno-histoquímica utilizada na rotina do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que consiste de desparafinização e reidratação, recuperação antigênica, inativação da peroxidase endógena e bloqueio das reações inespecíficas. Os anticorpos primários foram encubados por 12 horas, a 4°C, nas diluições de 1:50 (p21) e 1:40 (CD31), seguido da aplicação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) e revelação com diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako). As reações tiveram controles positivos (carcinoma mamário positivo para p21 e tecido pulmonar para o CD31), sendo o controle negativo realizado sem a utilização do anticorpo primário.

O p21 foi considerado positivo quando no mínimo 5% dos núcleos das células neoplásicas estavam corados, sendo anotada sua expressão (1 a 10) e intensidade da reação (1 a 3). A leitura das lâminas foi realizada por dois patologistas experientes, de forma independente e sem o conhecimento dos dados clínico-patológicos. Os casos discordantes foram revistos pelos dois patologistas, obtendo-se uma avaliação de consenso.

Para a avaliação da DMIT, foram selecionadas as áreas mais vascularizadas do corte ("hot-spots"), que foram marcados e contados por dois patologistas de forma independente, contando-se o número de vasos marcados por campo de grande aumento (200 aumentos, 0,38mm<sup>2</sup>), em microscópio da marca Zeiss, modelo Standard 20 (Carl Zeiss, Alemanha). Qualquer vaso ou célula endotelial isolada, marcados em marrom, foi contado, excluindo-se os vasos com paredes espessas. A média do número de vasos por campo e o número máximo de vasos por campo de

cada observador foram tabulados. Considerou-se como DMIT a média das contagens de vasos por campo de grande aumento.

### **Delineamento e seguimento**

O delineamento utilizado foi o de coorte não-concorrente, com eixo de temporalidade histórico, considerando-se a ressecção cirúrgica como tempo zero. O seguimento foi realizado até 60 meses após a cirurgia, ou até o final do estudo (30 de junho de 2003), ou até o falecimento do paciente, conforme o caso. A morte atribuída (desfecho) foi aquela relacionada diretamente com o carcinoma (evento). Pacientes cuja morte foi atribuída a causas diversas do câncer esofágico 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, além de correspondências, telefonemas e revisão de atestados de óbito junto ao Sindicato dos Estabelecimentos Funerários do Rio Grande do Sul.

### **Análise estatística**

A correlação entre a expressão da proteína p21, a DMIT e as características clinicopatológicas foram examinadas pelo teste “t” para as variáveis contínuas e pelo teste do qui-quadrado para as variáveis categóricas, com utilização do teste exato de Fischer quando necessário. A análise da sobrevida da coorte foi feita pelo Kaplan-Meier, e o impacto de cada fator prognóstico foi testado pelo “long rank test” e o modelo de regressão de azares proporcionais de Cox foi aplicado para as variáveis selecionadas. O nível de significância utilizado foi de 5%. O programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) para Windows, versão 10.0 foi utilizado.

**ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA PORTUGUESA:**

**ANGIOGÊNESE E p21: ASSOCIAÇÃO COM SOBREVIDA EM PACIENTES COM  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DO ESÔFAGO**

**Luíse Meurer \* (1), André R. P. da Rosa (2), Adriano Messalás Granetto (1),  
Cleber Dario P. Kruel (2), Maria Isabel Edelweiss (1).**

Serviço de Patologia (1) e de Cirurgia (2) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

\* Endereço para correspondência: R. Anita Garibaldi, 233 – Mont Serrat. CEP  
90450-001 Porto Alegre, RS, Brasil.

e-mail: [meurerl@terra.com.br](mailto:meurerl@terra.com.br); telefone: 3316 8313; fax: 3332 8880

\* Artigo formatado de acordo com o padrão da revista Virchows Archiv (Springer  
Verlag), publicação oficial da Sociedade Européia de Patologia.



## RESUMO

A densidade microvascular intratumoral (DMIT), representando o grau de angiogênese de uma lesão, pode ser um marcador importante no prognóstico de diversas neoplasias, destacando-se como tal nos carcinomas mamários. Seu papel no carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) ainda não está claro. O inibidor universal das quinases ciclina-dependentes (CDKs), p21<sup>WAF-1/CIP1</sup>, por ter um papel importante na regulação do ciclo celular, pode estar implicado no prognóstico de algumas neoplasias. Assim, o objetivo deste estudo é verificar se a DMIT e a expressão de p21 têm importância prognóstica no CEE. Para tal, foram estudados 46 pacientes portadores de CEE, submetidos à esofagectomia com intenção de cura. Avaliou-se a DMIT utilizando o marcador CD 31, contando os vasos em áreas de maior densidade (“hot-spots”), e a expressão de p21 foi estudada por imunohistoquímica. Os pacientes foram acompanhados de 2,5 a 60 meses. A mediana da DMIT foi de 30,8 vasos por campo, e p21 foi expresso em 35 dos 46 casos. Concluindo, embora o grau de angiogênese tenha variado entre os casos e a expressão imunohistoquímica de p21 estivesse presente em 77,1% dos pacientes, estes valores não influenciaram nem se correlacionaram com a sobrevivência dos pacientes operados por CEE.

## 1 - INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide do esôfago (CEE), por ser detectado mais freqüentemente em suas fases mais avançadas, carrega consigo um prognóstico sombrio (32, 46, 47). A cirurgia, por si só, raramente proporciona melhora da sobrevida a longo prazo, de maneira que novos estudos estão sendo realizados, direcionados para o uso de modalidades terapêuticas combinadas.

A angiogênese e sua quantificação têm sido alvo de intensos estudos nos últimos anos. Definida como a formação de novos capilares a partir de vasos sangüíneos pré-existentes, a angiogênese é fundamental para o desenvolvimento normal e a homeostasia. Em sua forma fisiológica, é essencial ao desenvolvimento tecidual, reprodução e cicatrização de feridas (11, 12, 14). Sabe-se que as neoplasias crescem de forma avascular até atingir 1 a 2 milímetros de diâmetro. A seguir, adquirem o fenótipo angiogênico e passam a recrutar vasos maduros adjacentes, que emitem, então, brotos vasculares que passarão a permear o tumor (10, 17, 22, 44).

Pacientes com escores de angiogênese altos têm apresentado taxas de sobrevida diminuídas, inclusive superando os fatores prognósticos clássicos como o grau de diferenciação celular, o tamanho e a localização, particularmente em tumores de mama, pulmão, próstata e cabeça e pescoço (4, 13, 15, 41, 45). No carcinoma epidermóide de esôfago (CEE), os estudos mostram resultados contraditórios.

O p21 (WAF1/CIP1), gene localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.2) (5), sintetiza a proteína p21, que faz parte da família dos inibidores das ciclinas quinase-dependentes (CDKs). Ao formar um complexo quaternário com ciclinas, cdks e o antígeno nuclear da célula proliferante (PCNA), inibe a transição da

fase G1 para a fase S (3, 5, 18).

Alguns estudos mostram a associação da expressão de p21 com pior prognóstico em carcinomas de mama (2), enquanto a redução de sua expressão mostrou-se fator de pior prognóstico em lesões de canal anal (19), bexiga (27) e ovário (35).

A redução da expressão de p21, por outro lado, parece ser um evento importante na progressão da displasia de baixo grau ao carcinoma epidermóide do esôfago. (31).

No epitélio escamoso esofágico normal, a expressão do p21 está restrita ao compartimento proliferativo, ou seja, à camada basal, estando, desta forma, mais relacionada à proliferação do que à diferenciação (6). Um papel do p21 no processo de diferenciação dos CEEs, no entanto, é sugerido por estudo no qual sua positividade é mais freqüentemente encontrada nas suas partes mais diferenciadas (37).

Assim, o objetivo deste trabalho é verificar a relação da expressão da p21 e da DMIT com a sobrevida de pacientes submetidos à esofagectomia por carcinoma epidermóide de esôfago.

## **2 - PACIENTES E MÉTODOS**

### **Pacientes**

No período de dezembro de 1988 a agosto de 2001, 86 pacientes foram submetidos à esofagectomia subtotal com intenção de cura, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foram excluídos do estudo os pacientes que faleceram por causas relacionadas ao procedimento cirúrgico (mortalidade pós-operatória precoce), que receberam tratamento neo-adjuvante ou que tinham história ou presença de outra

neoplasia maligna concomitante, além daqueles em que o material disponível em blocos de parafina não era representativo da lesão. Foram estudados, portanto, 46 pacientes.

### **Avaliação anátomo-patológica**

Os espécimes cirúrgicos foram fixados em formalina tamponada (tampão fosfato, pH= 7,0) e emblocados em parafina. Foram avaliados cortes de 4 micra de espessura, corados pela hematoxilina-eosina, avaliando-se o grau histológico de diferenciação, a profundidade de penetração do tumor na parede esofágica, comprometimento linfonodal, além das margens cirúrgicas circunferencial e longitudinal. O estadiamento da doença foi realizado de acordo com a União Internacional Contra o Câncer (UICC)-TNM(p) (16).

### **Imuno-histoquímica**

Foram utilizados os anticorpos p21<sup>(WAF-1/Cip-1)</sup> (clone SX118, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) expresso no núcleo de células neoplásicas e, para a avaliação da DMIT, o CD 31 (clone JC70A, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), que reconhece uma glicoproteína de 100 kD das células endoteliais.

Cortes representativos da margem invasora do tumor foram submetidos à técnica imuno-histoquímica utilizada na rotina do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que consiste de desparafinização e reidratação, recuperação antigênica, inativação da peroxidase endógena e bloqueio das reações inespecíficas. Os anticorpos primários foram encubados por 12 horas, a 4°C, nas diluições de 1:50 (p21) e 1:40 (CD31), seguido da aplicação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) e revelação com diaminobenzidina

tetraidroclorido (Kit DAB, Dako). As reações tiveram controlos positivos (carcinoma mamário positivo para p21 e tecido pulmonar para o CD31), sendo o controlo negativo realizado sem a utilização do anticorpo primário.

O p21 foi considerado positivo quando no mínimo 5% dos núcleos das células neoplásicas estavam corados, sendo anotada sua expressão (1 a 10) e intensidade da reação (1 a 3). A leitura das lâminas foi realizada por dois patologistas experientes, de forma independente e sem o conhecimento dos dados clínico-patológicos. Os casos discordantes foram revistos pelos dois patologistas, obtendo-se uma avaliação de consenso.

Para a avaliação da DMIT, foram selecionadas as áreas mais vascularizadas do corte ("hot-spots"), que foram marcados e contados por dois patologistas de forma independente, contando-se o número de vasos marcados por campo de grande aumento (200 aumentos,  $0,38\text{mm}^2$ ), em microscópio da marca Zeiss, modelo Standard 20 (Carl Zeiss, Alemanha). Qualquer vaso ou célula endotelial isolada, marcados em marrom, foi contado, excluindo-se os vasos com paredes espessas. A média do número de vasos por campo e o número máximo de vasos por campo de cada observador foram tabulados. Considerou-se como DMIT a média das contagens de vasos por campo de grande aumento.

### **Delineamento e seguimento**

O delineamento utilizado foi o de corte não-concorrente, com eixo de temporalidade histórico, considerando-se a ressecção cirúrgica como tempo zero. O seguimento foi realizado até 60 meses após a cirurgia, ou até o final do estudo (30 de junho de 2003), ou até o falecimento do paciente, conforme o caso. A morte atribuída (desfecho) foi aquela relacionada diretamente com o carcinoma (evento).

Pacientes cuja morte foi atribuída a causas diversas do câncer esofágico 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, além de correspondências, telefonemas e revisão de atestados de óbito junto ao Sindicato dos Estabelecimentos Funerários do Rio Grande do Sul, Brasil.

### **Análise estatística**

A correlação entre a expressão da proteína p21, a DMIT e as características clinicopatológicas foram examinadas pelo teste “t” para as variáveis contínuas e pelo teste do qui-quadrado para as variáveis categóricas, com utilização do teste exato de Fischer quando necessário. A análise da sobrevida da coorte foi feita pelo Kaplan-Meier, e o impacto de cada fator prognóstico foi testado pelo “long rank test” e o modelo de regressão de azares proporcionais de Cox foi aplicado para as variáveis selecionadas. O nível de significância utilizado foi de 5%. O programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) para Windows, versão 10.0 foi utilizado.

### **3 - RESULTADOS**

Foram selecionados 46 pacientes, com idades compreendidas entre 31 e 77 anos, sendo 39 (84,8%) do sexo masculino. Ao final do estudo, 25 pacientes (54,3%) haviam falecido, 11 (21,3%) estavam vivos e os outros 10 (23,9%) foram censurados. A maioria dos pacientes foi classificada no estágio 2 (23 pacientes, 50%), estando 22 pacientes no estágio 3 (47,8%), e um paciente no estágio 1 (2,2%). A sobrevida variou de 2,5 a 60 meses, com média de 34,9 meses e mediana de 24,9 meses. A Tabela 1 mostra as variáveis clínico-patológicas estudadas.

A densidade microvascular intratumoral (DMIT) variou de 12,25 a 87,46 vasos por campo, com uma mediana de 30,8. Avaliando a variabilidade interobservador na contagem microvascular, ou seja, considerando contagem individual de ambos os observadores, não foi identificada diferença significativa (teste “t” pareado com  $p=0,4$ ). Não foi identificada diferença estatisticamente significativa entre os pacientes quando se utilizou a mediana como ponto de corte ( $p= 0,293$ ), tampouco quando foi utilizada a média da contagem máxima dos campos ( $p=0,516$ ).

Onze pacientes (23,9%) não expressaram p21. Nos demais, a expressão variou de 1 a 7, sendo 9 (19,6%) com expressão 1, 12 com expressão 2 (26,1%), 6 com expressão 4 (13%), 3 com expressões 3 e 5 (6,5% cada), além de um com expressão 6 e um com expressão 7 (2,2% cada). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na sobrevida dos pacientes em relação à expressão de p21 ( $p=0,195$  com ponto de corte em até 20% das células positivas;  $p= 0,742$  com ponto de corte em 10% de células positivas).

#### **4 - DISCUSSÃO**

À inegável importância biológica da angiogênese para as neoplasias, na medida em que os neovasos fornecem suprimento de oxigênio e permitem ao tumor a emissão de metástases, soma-se o potencial uso de drogas anti-angiogênicas para seu tratamento (9, 10, 12-14). Sua utilização como fator prognóstico têm sido amplamente discutida na literatura, destacando-se os estudos realizados em carcinomas mamários (15, 45). Em relação ao CEE, as publicações ainda são escassas, e estão sumarizadas na Tabela 2.

A comparação entre artigos que abordam a DMIT como fator prognóstico é difícil, essencialmente em função das diferenças metodológicas, a começar pelo

anticorpo utilizado para a marcação dos vasos, passando pelas diversas formas possíveis de se efetuar a contagem (em “hot spots” versus difusamente; no aumento de 400X versus o de 200X; com ou sem ajuda de sistemas computadorizados de análise de imagem). A metodologia seguida neste trabalho para a medida da densidade microvascular intratumoral (DMIT), está baseada nos estudos de Weidner em carcinoma mamário (43, 45). Outras metodologias, como a contagem a partir de imagens digitalizadas ou por grades microscópicas, mostram poder semelhante (30).

No presente estudo, não houve associação entre a contagem microvascular e a sobrevida em pacientes operados por CEE. Estes achados são semelhantes aos encontrados por Ahn e colaboradores (1), Torres e colaboradores (42), e Takebayashi e colaboradores (39). Este último tem o mérito de exibir a maior casuística (163 pacientes), e uma distribuição bastante homogênea nos diferentes estágios da doença (33 pacientes em estágio I, 43 em estágio II, 38 em estágio III e 49 em estágio IV). Os três estudos citados têm em comum o tempo longo de seguimento (até 152 meses), sendo que o de Torres e colaboradores é o único que utilizou o mesmo anticorpo (CD 31) para marcação dos vasos. Vale ressaltar que a publicação de Ahn e colaboradores (1) incluiu, na maioria, pacientes em estágios II e III, numa distribuição não muito diferente da dos pacientes do presente estudo.

Por outro lado, alguns autores associaram contagens microvasculares mais altas com uma sobrevida mais curta nos pacientes operados por CEE (8, 21, 23, 36, 40). O estudo de Tanigawa e colaboradores, por exemplo, mostrou que pacientes do grupo chamado hipovascular tinham uma sobrevida mais longa (40). Em contraste com o presente estudo, que inclui apenas um paciente em estágio I, e os demais distribuídos quase uniformemente nos estágio II e III, sua casuística consta, predominantemente, de pacientes em estágios I e II (27 pacientes), e 16 pacientes



em estágios III e IV. Igarashi e colaboradores (21), da mesma forma, mostraram uma sobrevida mais curta nos pacientes com contagens mais altas, sendo que os pacientes foram agrupados nos estágios 0, I e IIA (34 pacientes) e IIB, III e IV (59 pacientes). Estes achados podem nos levar a considerar que, em pacientes com estágios mais avançados, a angiogênese já não seja um fator importante no prognóstico dos pacientes, e a correlação com a expressão de fatores angiogênicos, como o VEGF, talvez possa corroborar esta suposição.

Chama atenção que a mediana de contagem microvascular foi a menor até agora relatada em CEE: 30,8 vasos por campo de 200 aumentos. Outros estudos, utilizando marcadores semelhantes (CD 31 e CD 34), encontraram contagens muito mais altas, variando entre 59 e 148. O tamanho do campo microscópico avaliado certamente influi neste resultado, mas esta informação não está disponível em todas as publicações. Em comparação com a área de 0,38 mm<sup>2</sup> do campo de 200 aumentos do microscópio utilizado no presente estudo, Torres utilizou um campo de 0,74 mm<sup>2</sup> (42), e Shih utilizou um campo com 0,689 mm<sup>2</sup> (36). Este dado, no entanto, não parece ter relação com os demais achados dos estudos, já que o primeiro não encontrou valor prognóstico para a DMIT, e o segundo encontrou sobrevidas mais curtas nas contagens mais altas.

O papel do p21 no prognóstico do CEE na literatura é controverso, e os principais estudos estão listados na Tabela 3.

Em relação à expressão de p21, o presente estudo não encontrou diferença significativa na sobrevida dos pacientes, independente do percentual de células positivas que se estabelecesse como ponto de corte. Este resultado está de acordo com os de Natsugoe e colaboradores, que, no entanto, estudando apenas casos mais avançados, encontraram um grupo de pacientes com prognóstico melhor: sem

expressão de p53 e com expressão de p21 (28). O mesmo grupo publicou, posteriormente, resultados abordando exclusivamente pacientes com carcinomas superficiais, e a expressão de p21 não mostrou importância prognóstica (26). A expressão de p53, isoladamente, não mostrou valor prognóstico em uma série de pacientes bastante semelhante à presentemente apresentada (33). Mathew e colaboradores encontraram associação da expressão de p21 com a sobrevida na sua coorte de 100 pacientes, mas a análise multivariada não corroborou este resultado (25). Sua casuística inclui 40 com lesões T1 e T2, e 33 pacientes com lesões T3 e T4, uma distribuição que pode ser considerada semelhante à do nosso estudo.

Outros três estudos, por outro lado, encontraram importância prognóstica na expressão de p21 em CEEs (24, 29, 34). Sarbia e colaboradores, por exemplo, mostraram uma sobrevida pior para aqueles pacientes com expressão de p21 em mais de 50% das células. Na casuística do presente estudo, no entanto, foram identificados apenas 2 pacientes com esse nível de expressão, o que dificulta a comparação. Diferenças no tipo de anticorpo utilizado e questões metodológicas poderiam explicar a discordância com os resultados de Nita e colaboradores, que utilizaram a análise de imagem computadorizada para avaliar a expressão de p21 (29), e cujos resultados são completamente opostos aos de Lam e colaboradores (24). Enquanto para o primeiro, a expressão alta de p21 é um fator indicador de sobrevida mais longa, o segundo mostrou uma sobrevida mais curta para aqueles pacientes com expressão de p21.

Cabe chamar a atenção que a única variável clínico-patológica que mostrou importância prognóstica, foi a presença de metástases em linfonodos, que conferiu uma pior sobrevida aos pacientes ( $p=0,032$ ). Estes achados estão em acordo com a

literatura, e ressaltam a importância da realização de diagnósticos mais precoces, para que se obtenha uma sobrevida melhor para os pacientes (7, 20, 38).

Em suma, os resultados do presente estudo nos levam a considerar que, para a contagem microvascular intratumoral ou para a expressão imuno-histoquímica de p21 em pacientes operados por carcinoma epidermóide do esôfago, não há valor prognóstico relevante, quando o fator em estudo for a sobrevida em até 60 meses.

**Tabela 1. Variáveis clínico-patológicas e sua relação com a sobrevida em 46 pacientes operados por carcinoma epidermóide de esôfago.**

Característica	N	Significância (p)
Idade (em anos, média)	56	0,93
Sexo		
Masculino	39	
Feminino	7	0,93
Diferenciação histológica*		
Bem diferenciado	7	
Moderadamente diferenciado	31	
Pouco diferenciado	8	0,52
Profundidade de invasão da parede**		
T1/T2	14	
T3	26	0,42
T4	6	
Linfonodos**		
Negativos (N0)	22	
Positivos (N1)	24	0,032
Estágio**		
I/II	24	
III	22	0,12
Margens cirúrgicas		
Livres	33	
Comprometidas	13	0,80
Densidade microvascular intratumoral		
Abaixo da mediana (30,8)	23	
Acima da mediana (30,8)	23	0,29
Expressão imuno-histoquímica de p21		
Até 20% das células	20	
Acima de 21% das células	26	0,19

\* De acordo com a OMS, 2002.

\*\* De acordo com a UICC/TNM (p), 1996.

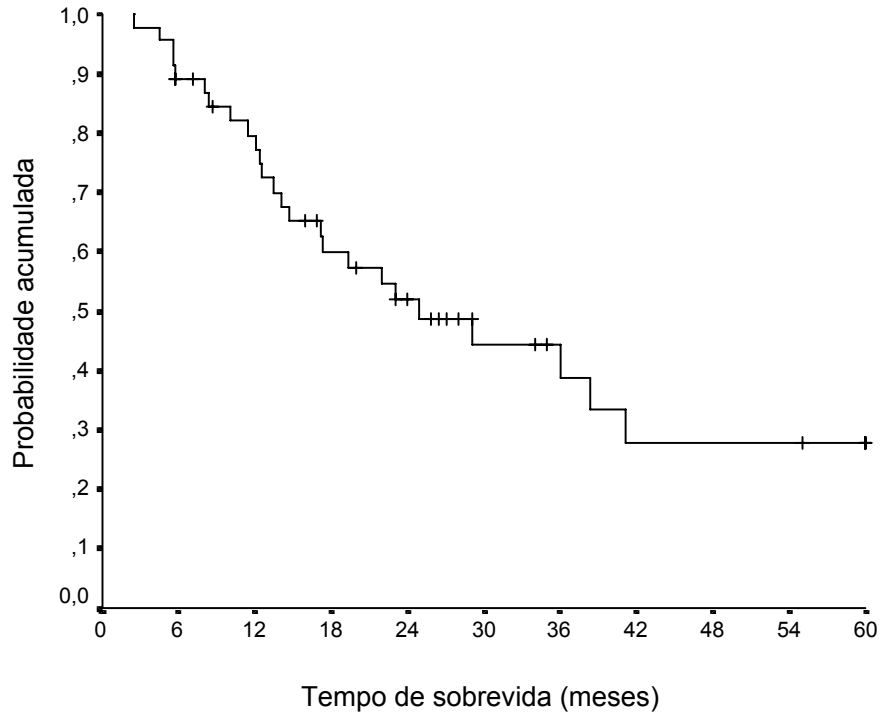
**Tabela 2. Estudos envolvendo densidade microvascular intratumoral e sobrevida em pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago.**

Autor, ano	Marcador Imuno-histoquímico	Casos (número)	Seguimento (meses)	Resultado
Tanigawa, 1997	CD 34 e Fator VIII	43	24	Maior sobrevida no grupo hipovascular ( $p < 0,01$ )
Igarashi, 1998	CD 34	83	28-36	Sobrevida menor na contagem mais alta ( $p = 0,027$ )
Takebayashi, 1999	Fator VIII	163	Não especificado	Não significativo
Torres, 1999	CD 31	22	1-152	Não significativo
Shih, 2000	Fator VIII	95	Até 81	Menor sobrevida com contagens mais altas ( $p = 0,009$ )
Koide, 2001	Fator VIII	60	Não especificado	Menor sobrevida com contagens mais altas
Elpek, 2001	CD 34	53	6-60	Menor sobrevida com contagens mais altas ( $p = 0,009$ )
Ahn, 2002	CD 34	81	3,9-128	Não significativo
Este estudo, 2003	CD 31	46	2,5-60	Não significativo

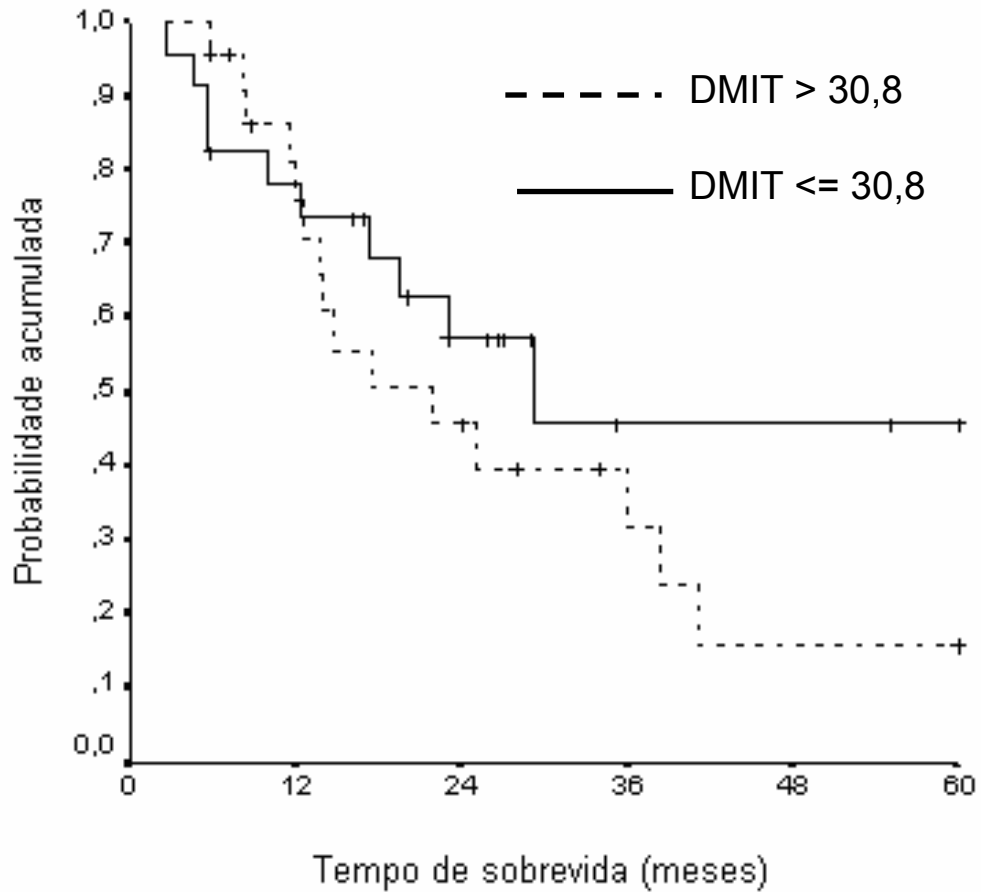
**Tabela 3: Estudos envolvendo expressão imuno-histoquímica de p21 e sobrevida em pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago.**

Autor, ano	Casos (número)	Seguimento (meses)	Resultado
Sarbia, 1998	149	1-224	Expressão em mais de 50% das células: pior prognóstico (p=0,0081)
Lam, 1999	153	Não especificado	Expressão conferindo pior sobrevida (p=0,03)
Nita, 1999	62	2-137	Expressão alta conferindo melhor prognóstico (p=0,0062)
Natsugoe, 1999	103	60	p21 isolado: sem importância prognóstica; p53 negativo e p21 positivo: melhor prognóstico (casos avançados)
Matsumoto, 2001	79	60	Sem importância prognóstica (casos superficiais)
Mathew, 2002	100	44	Sem importância prognóstica na análise multivariada
Este estudo, 2003	46	2,5-60	Sem importância prognóstica

**Figura 1 – Curva global de sobrevida em 60 meses de 46 pacientes operados por carcinoma epidermóide de esôfago.**



**Figura 2. Curva de sobrevida em relação à densidade microvascular intratumoral (DMIT) em 46 pacientes operados por carcinoma epidermóide de esôfago.**





**Figura 3. Curva de sobrevida em relação à expressão imuno-histoquímica de p21 em 46 pacientes operados por carcinoma epidermóide de esôfago.**

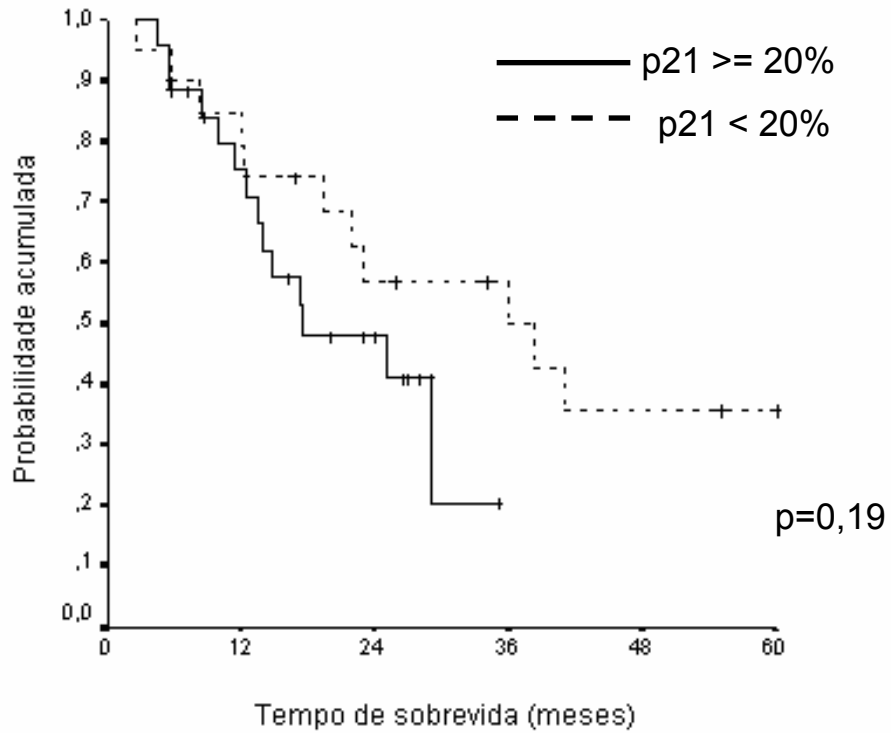
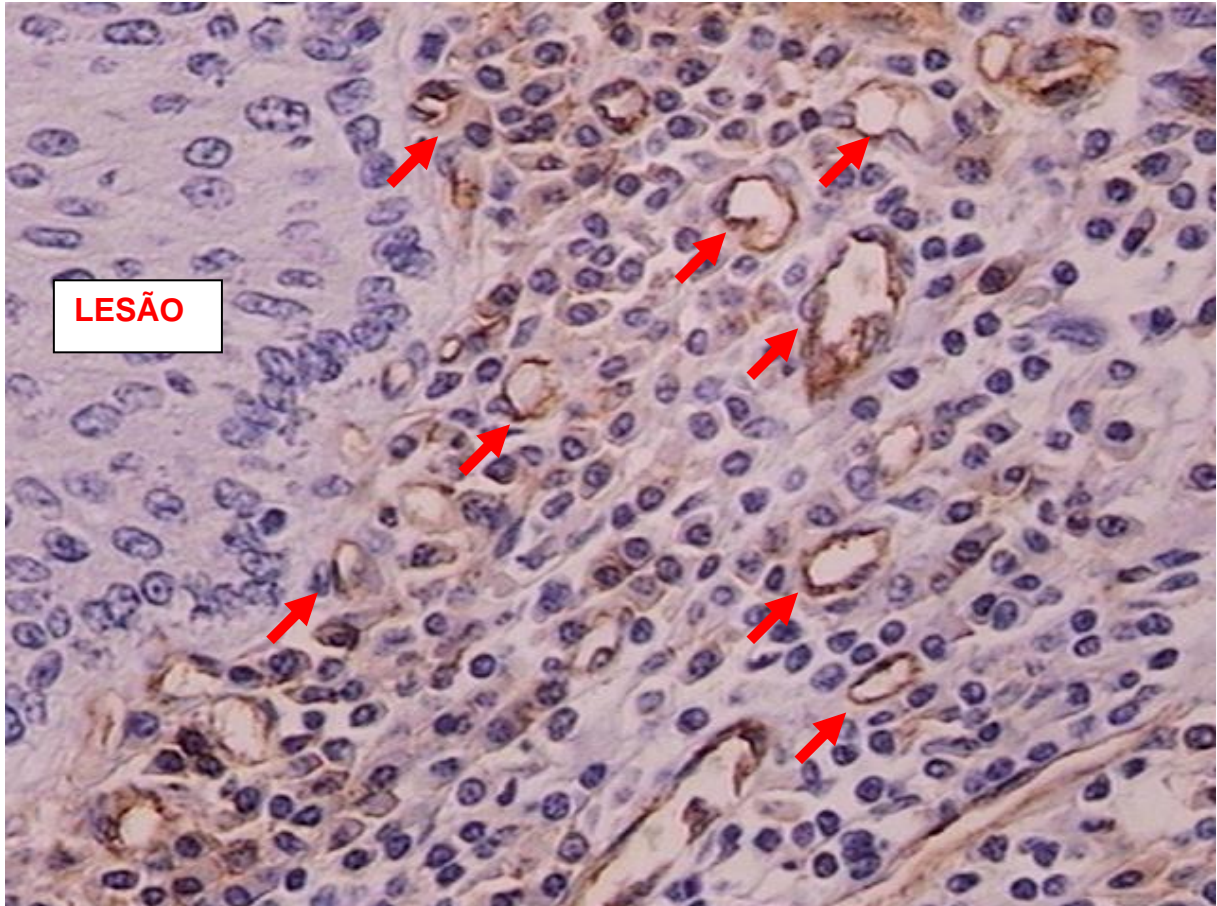
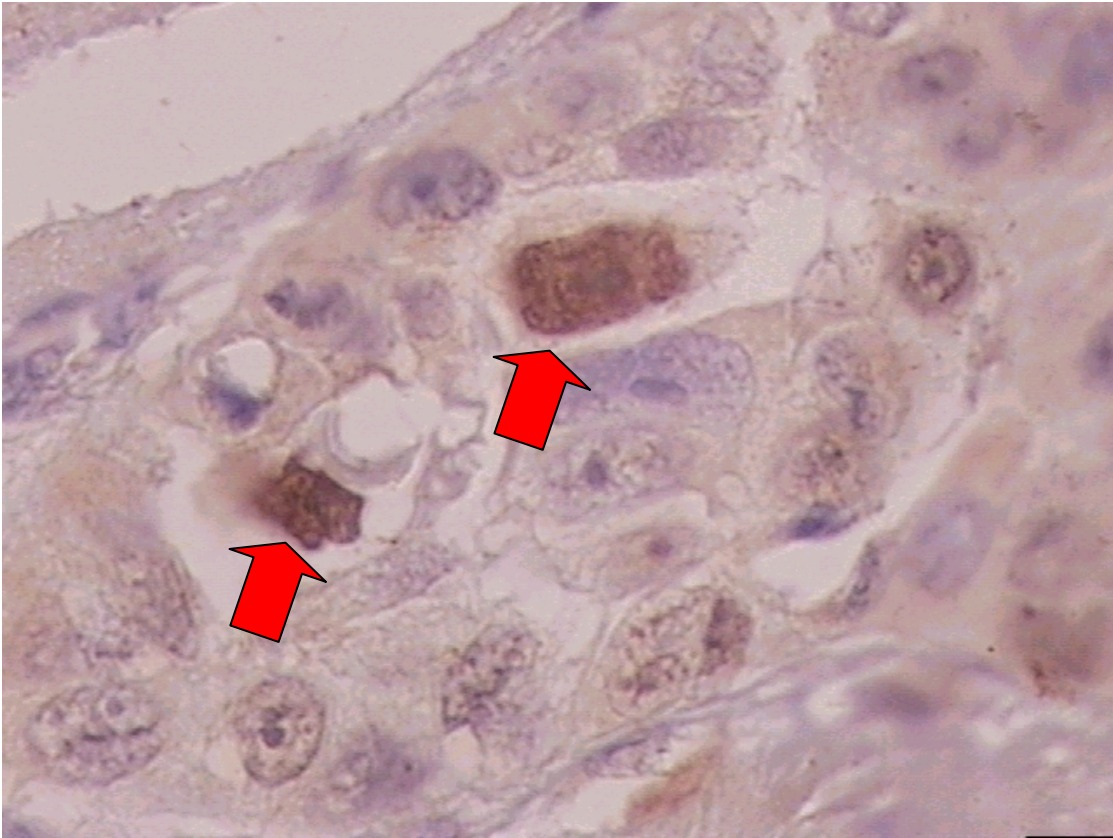


Figura 4 – Vasos positivos para CD 31 em carcinoma epidermóide do esôfago



Imuno-histoquímica com CD 31: as setas indicam alguns vasos; aumento original: 200X.

**Figura 5: Expressão imuno-histoquímica de p21**



Duas células mostrando positividade nuclear forte na imuno-histoquímica com o marcador p21; aumento original: 400X.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahn, MJ, Jang, SJ, Park, YW, Choi, JH, Oh, HS, Lee, CB, Paik, HK and Park, CK (2002) Clinical prognostic values of vascular endothelial growth factor, microvessel density, and p53 expression in esophageal carcinomas J Korean Med Sci 17 201-7
2. Caffo, O, Doglioni, C, Veronese, S, Bonzanini, M, Marchetti, A, Buttitta, F, Fina, P, Leek, R, Morelli, L, Palma, PD, Harris, AL and Barbareschi, M (1996) Prognostic value of p21(WAF1) and p53 expression in breast carcinoma: an immunohistochemical study in 261 patients with long-term follow-up Clin Cancer Res 2 1591-9
3. Cai, K and Dynlacht, BD (1998) Activity and nature of p21(WAF1) complexes during the cell cycle Proc Natl Acad Sci U S A 95 12254-9
4. Chung, YS, Maeda, K and Sowa, M (1996) Prognostic value of angiogenesis in gastro-intestinal tumours Eur J Cancer 32A 2501-5.
5. el-Deiry, WS, Tokino, T, Velculescu, VE, Levy, DB, Parsons, R, Trent, JM, Lin, D, Mercer, WE, Kinzler, KW and Vogelstein, B (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression Cell 75 817-25.
6. el-Deiry, WS, Tokino, T, Waldman, T, Oliner, JD, Velculescu, VE, Burrell, M, Hill, DE, Healy, E, Rees, JL, Hamilton, SR and et al. (1995) Topological control of

p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues *Cancer Res* 55  
2910-9

7. Eloubeidi, MA, Desmond, R, Arguedas, MR, Reed, CE and Wilcox, CM (2002)  
Prognostic factors for the survival of patients with esophageal carcinoma in the  
U.S.: the importance of tumor length and lymph node status *Cancer* 95 1434-43
8. Elpek, GO, Gelen, T, Aksoy, NH, Erdogan, A, Dertsiz, L, Demircan, A and Keles, N  
(2001) The prognostic relevance of angiogenesis and mast cells in squamous  
cell carcinoma of the oesophagus *J Clin Pathol* 54 940-944
9. Folkman, J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications *N Engl J Med* 285  
1182-6.
10. Folkman, J (1972) Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors *Ann  
Surg* 175 409-16.
11. Folkman, J (1986) How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic  
tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture *Cancer Res* 46 467-73.
12. Folkman, J (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?  
*J Natl Cancer Inst* 82 4-6.
13. Folkman, J (1995) Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston.  
Clinical applications of research on angiogenesis *N Engl J Med* 333 1757-63.

14. Folkman, J (1995) Tumor angiogenesis (The molecular basis of cancer) W.B. Saunders Philadelphia 206-32
15. Fox, SB, Leek, RD, Weekes, MP, Whitehouse, RM, Gatter, KC and Harris, AL (1995) Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis J Pathol 177 275-83.
16. Gabbert, HE, Shimoda, T, Hainaut, P, Nakamura, Y, Field, JK and Inoue, H (2000) Squamous cell carcinoma of the esophagus (Pathology and Genetics - Tumours of the Digestive System) World Health Organization Lyon 9-30
17. Greenblatt, M and Shubi, P (1968) Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique J Natl Cancer Inst 41 111-24.
18. Harper, JW, Adami, GR, Wei, N, Keyomarsi, K and Elledge, SJ (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases Cell 75 805-16.
19. Holm, R, Skovlund, E, Skomedal, H, Florenes, VA and Tanum, G (2001) Reduced expression of p21WAF1 is an indicator of malignant behaviour in anal carcinomas Histopathology 39 43-9

20. Igaki, H, Kato, H, Tachimori, Y and Nakanishi, Y (2003) Prognostic evaluation of patients with clinical T1 and T2 squamous cell carcinomas of the thoracic esophagus after 3-field lymph node dissection *Surgery* 133 368-374
21. Igarashi, M, Dhar, DK, Kubota, H, Yamamoto, A, El-Assal, O and Nagasue, N (1998) The prognostic significance of microvessel density and thymidine phosphorylase expression in squamous cell carcinoma of the esophagus *Cancer* 82 1225-32
22. Kerbel, RS (2000) Tumor angiogenesis: past, present and the near future *Carcinogenesis* 21 505-15.
23. Koide, N, Nishio, A, Hiraguri, M, Hanazaki, K, Adachi, W and Amano, J (2001) Coexpression of vascular endothelial growth factor and p53 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus *Am J Gastroenterol* 96 1733-40
24. Lam, KY, Law, S, Tin, L, Tung, PH and Wong, J (1999) The clinicopathological significance of p21 and p53 expression in esophageal squamous cell carcinoma: an analysis of 153 patients *Am J Gastroenterol* 94 2060-8
25. Mathew, R, Arora, S, Khanna, R, Mathur, M, Shukla, NK and Ralhan, R (2002) Alterations in p53 and pRb pathways and their prognostic significance in oesophageal cancer *Eur J Cancer* 38 832-41

26. Matsumoto, M, Natsugoe, S, Nakashima, S, Okumura, H, Sakita, H, Baba, M, Takao, S and Aikou, T (2001) Clinical significance and prognostic value of apoptosis related proteins in superficial esophageal squamous cell carcinoma  
Ann Surg Oncol 8 598-604
27. Migaldi, M, Sgambato, A, Garagnani, L, Ardito, R, Ferrari, P, De Gaetani, C, Cittadini, A and Trentini, GP (2000) Loss of p21Waf1 expression is a strong predictor of reduced survival in primary superficial bladder cancers Clin Cancer Res 6 3131-8
28. Natsugoe, S, Nakashima, S, Matsumoto, M, Xiangming, C, Okumura, H, Kijima, F, Ishigami, S, Takebayashi, Y, Baba, M, Takao, S and Aikou, T (1999) Expression of p21WAF1/Cip1 in the p53-dependent pathway is related to prognosis in patients with advanced esophageal carcinoma Clin Cancer Res 5 2445-9
29. Nita, ME, Nagawa, H, Tominaga, O, Tsuno, N, Hatano, K, Kitayama, J, Tsuruo, T, Domene, CE and Muto, T (1999) p21Waf1/Cip1 expression is a prognostic marker in curatively resected esophageal squamous cell carcinoma, but not p27Kip1, p53, or Rb Ann Surg Oncol 6 481-488
30. O'Byrne, KJ, Dalglish, AG, Browning, MJ, Steward, WP and Harris, AL (2000) The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease Eur J Cancer 36 151-69



31. Ohbu, M, Kobayashi, N and Okayasu, I (2001) Expression of cell cycle regulatory proteins in the multistep process of oesophageal carcinogenesis: stepwise over-expression of cyclin E and p53, reduction of p21(WAF1/CIP1) and dysregulation of cyclin D1 and p27(KIP1) *Histopathology* 39 589-96
32. Parkin, DM, Pisani, P and Ferlay, J (1999) Global cancer statistics *CA Cancer J Clin* 49 33-64, 1
33. Rosa, AR, Schirmer, CC, Gurski, RR, Meurer, L, Edelweiss, MI and Krueel, CD (2003) Prognostic value of p53 protein expression and vascular endothelial growth factor expression in resected squamous cell carcinoma of the esophagus *Dis Esophagus* 16 112-8
34. Sarbia, M, Donner, A and Gabbert, HE (2002) Histopathology of the gastroesophageal junction: a study on 36 operation specimens *Am J Surg Pathol* 26 1207-12
35. Schmider, A, Gee, C, Friedman, W, Lukas, JJ, Press, MF, Lichtenegger, W and Reles, A (2000) p21 (WAF1/CIP1) protein expression is associated with prolonged survival but not with p53 expression in epithelial ovarian carcinoma *Gynecology Oncology* 77 237-242
36. Shih, CH, Ozawa, S, Ando, N, Ueda, M and Kitajima, M (2000) Vascular endothelial growth factor expression predicts outcome and lymph node

metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus Clin Cancer Res 6  
1161-8

37. Shirakawa, Y, Naomoto, Y, Kimura, M, Kawashima, R, Yamatsuji, T, Tamaki, T,  
Hamada, M, Haisa, M and Tanaka, N (2000) Topological analysis of  
p21WAF1/CIP1 expression in esophageal squamous dysplasia Clin Cancer Res  
6 541-50

38. Tachibana, M, Dhar, DK, Kinugasa, S, Yoshimura, H, Fujii, T, Shibakita, M, Ohno,  
S, Ueda, S, Kohno, H and Nagasue, N (2002) Esophageal cancer patients  
surviving 6 years after esophagectomy Langenbecks Arch Surg 387 77-83

39. Takebayashi, Y, Natsugoe, S, Baba, M, Akiba, S, Fukumoto, T, Miyadera, K,  
Yamada, Y, Takao, S, Akiyama, S and Aikou, T (1999) Thymidine  
phosphorylase in human esophageal squamous cell carcinoma Cancer 85 282-  
9

40. Tanigawa, N, Matsumura, M, Amaya, H, Kitaoka, A, Shimomatsuya, T, Lu, C,  
Muraoka, R and Tanaka, T (1997) Tumor vascularity correlates with the  
prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma Cancer 79 220-  
5

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

42. Torres, C, Wang, H, Turner, J, Shahsafaei, A and Odze, RD (1999) Prognostic significance and effect of chemoradiotherapy on microvessel density (angiogenesis) in esophageal Barrett's esophagus-associated adenocarcinoma and squamous cell carcinoma Hum Pathol 30 753-8
43. Vermeulen, PB, Gasparini, G, Fox, SB, Toi, M, Martin, L, McCulloch, P, Pezzella, F, Viale, G, Weidner, N, Harris, AL and Dirix, LY (1996) Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation Eur J Cancer 32A 2474-84.
44. Warren, BA and Shubik, P (1966) The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch Lab Invest 15 464-78.
45. Weidner, N, Semple, JP, Welch, WR and Folkman, J (1991) Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma N Engl J Med 324 1-8.
46. Yang, CS (1980) Research on esophageal cancer in China: a review Cancer Res 40 2633-44
47. Yoshinaka, H, Shimazu, H, Fukumoto, T and Baba, M (1991) Superficial esophageal carcinoma: a clinicopathological review of 59 cases Am J Gastroenterol 86 1413-8

**6. ANEXO 1: ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA INGLESA**  
**ANGIOGENESIS AND P21: ASSOCIATION WITH SURVIVAL IN PATIENTS WITH**  
**ESOPHAGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA**

Luíse Meurer \* (1), André R. P. da Rosa (2), Adriano Messalas Granetto (1), Raquel Brodbeck Ilgenfritz (2), Antônio Carlos Krueel Pütten (1), Cleber Dario Pinto Krueel (2), Maria Isabel Albano Edelweiss (1)

Departments of Pathology (1) and Surgery (2), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

\* Address correspondence to Luíse Meurer, Rua Anita Garibaldi, 233, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, 90450-001.

e-mail: [meurerl@terra.com.br](mailto:meurerl@terra.com.br)

Tel (+55) 51 33168313; Fax: (+55) 51 33328880

Number of pages including references:

Number of words in the abstract: 166

Number of tables: 3

Number of illustrations: 3

## ABSTRACT

Intratumoral microvascular density (IMD) reflects the degree of lesional angiogenesis and may be important as a prognostic indicator in neoplasia, especially in breast cancer. Its role in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) has not yet been clarified. The universal cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p21 has been described as a prognostic factor in several tumors, due to its key function in cell cycle regulation. This study aims to verify the importance of both IMD and p21 expression in the prognosis of ESCC. Forty-six patients who were submitted to curative esophagectomy for ESCC were selected. CD 31 was utilized to count vessels in areas of higher vascular density (hot spots) while p21 was evaluated by its immunohistochemical expression. The follow-up period varied from 2.5 to 60 months. The IMD median was 30.8 vessels/high-power-field and p21 was expressed in 35 out of 46 cases. There was some variation in angiogenesis degree and p21 was expressed in 77.1% of patients. However, they showed no correlation with survival in this study.

## INTRODUCTION

Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) has usually an ominous prognosis due to its late diagnosis (32, 46, 47). As surgical treatment rarely leads to a longer survival, new combined therapeutic approaches are been proposed.

Angiogenesis and its determination have been extensively studied in recent years. Defined as the formation of new capillaries from preexistent vessels, angiogenesis is essential for normal development and homeostasis, having a central role in reproduction and wound repair (11, 12, 14).

Tumors can grow independently of vascular supply up the diameter of 1 to 2 mm. From then on they develop a vascular phenotype, recruiting new vessels from mature ones in the vicinity (10, 17, 22, 44).

High angiogenic scores have had a negative impact in survival, apparently representing a better prognostic indicator than classic features like tumor differentiation, its size and location, particularly in head and neck, breast and lung cancer (4, 13, 15, 41, 45). Controversial results have been reported in ESCC.

The gene p21 (WAF1/CIP1) is located in the short arm of chromosome 6 (6p21.2) (5) and synthesizes p21 protein, which belongs to the CDK inhibitor family. It inhibits the transition from G1 to S phase by forming a quaternary complex with proliferating cell nuclear antigen (PCNA), cyclins and CDKs (3, 5, 18).

Some studies have shown an association of the expression of p21 with poorer prognosis in breast cancer cases (2), while a reduction in its expression tended to relate to poorer prognosis in lesions of the anal canal (19), bladder (27) and ovary (35). On the other hand, a reduction in the value of p21 seems to be an important

event in the progress of low-grade displasia to carcinoma of the esophagus (31).

In the normal esophageal squamous epithelium, expression of p21 is confined to the proliferative compartment, that is, to the basal layer, and is therefore more closely related to proliferation than to differentiation (6). However, p21 may play some part in the differentiation process of ESCCs, as suggested by its greater expression in better differentiated areas of the tumour (37).

The aim of this study is to verify the relationship of both IMD and p21 expression with the survival rate of patients who had been submitted to esophagectomy for squamous cell carcinoma of the esophagus.

## **PATIENTS AND METHODS**

### **Patients**

86 patients underwent subtotal esophagectomy with cure intent at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil, between December 1988 and August 2001. Excluded from this study were patients who died from causes related to the surgical procedure (early postoperative death), who had received preoperative chemotherapy or radiotherapy, who had a history of other simultaneous malignant neoplasia as well as those cases in which the paraffin blocks were misplaced or contained insufficient tumoral tissue. These exclusions reduced the study group to 46 patients.

### **Pathological analysis and tissue preparation**

The surgical specimens were fixed in formalin and embedded in paraffin. Four-micrometer thick sections were cut, mounted on glass slides, and stained with routine haematoxylin-eosin for evaluation. This included the degree of histological differentiation; the depth of tumour penetration in the esophageal wall; the presence of lymph node metastasis as well as the circumferential and longitudinal surgical margins. The disease was staged according to the International Union Against Cancer (UICC) – TNM (p) classification (16).

### **Immunohistochemistry**

The antibodies used were p21<sup>(WAF-1/Cip-1)</sup> (clone SX118, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) and, for the evaluation of IMD, CD 31 (clone JC70A, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) which recognises a 100 kD endothelial glycoprotein. Sections representing the invasive margin of the tumour were submitted to routine immunohistochemical technique, which comprises de-paraffination and rehydration, antigenic recovery, inactivation of endogenous peroxidase, and blockage of unspecific reactions. The primary antibodies were incubated for twelve hours at a temperature of 4°C, at dilutions of 1:50 (p21) and 1:40 (CD31), followed by the application of the streptavidin horseradish peroxidase conjugate (LSAB, Dako), and diaminobenzidine tetrahydrochloride (Kit DAB, Dako). The positive controls were breast cancer for p21 and lung tissue for CD31, while negative control was obtained by omission of the primary antibody.

p21 was considered positive when more than 5% of the neoplastic cell nuclei showed a brownish stain, and the proportion of positive cells was noted. The slide readings



were made independently by two experienced pathologists who were not aware of the respective clinicopathological data. When the two experts differed in their interpretations, they consulted together and reached a consensus.

In the evaluation of IMD, the most vascularized areas – so-called hot spots - were selected, marked and independently counted by two pathologists. A Zeiss microscope, model Standard 20 (Carl Zeiss, Germany) set at a high magnification field (200X, 0,38mm<sup>2</sup>) was used. Any vessel or isolated endothelial cell marked brown was counted, excluding only thick-walled vessels. The average number of vessels and the highest vessel count per field, of each observer were registered. We considered as IMD the vessel count average per high-magnification field.

#### Delineation and follow-up

Study design was non-concurring cohort with a historic time-line, having the surgical resection as time zero. The follow-up was maintained for up to sixty (60) months after surgery, until the study ended (30.06.03) or until the death of the patient, whichever the case. Disease-attributed death (outcome) was defined as death directly related to the event (esophageal cancer). Those patients who died from causes other than esophageal cancer or who where lost to follow up were censored. The survival information was obtained from the medical records, telephone and mail contact and review of death certificates (Union of Funerary Establishments of the State of Rio Grande do Sul, Brazil).

#### **Statistical Analysis.**

The correlation between the expression of the protein p21, IMD and the clinico-

pathological characteristics was examined by the 't' test for the continuous variables and by the chi-squared test or Fisher exact test for the categorical variables. The survival analysis of the cohort was made by the Kaplan-Meier method and the impact of each prognostic factor was tested by the long rank test. Furthermore, the Cox proportional chance regression model was applied for the selected variables. A 5% significance level was used. The software Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Window, 10.0 version, was used for statistical analysis.

## RESULTS

Forty-six patients aged 31 to 77 years were enrolled, 33 of them (84.8%) being males. At the end of the study 25 patients (54.3 %) had died, 11 (21.3%) were alive and 10 (23.9%) were censored. Most of the cases were classified as stage 2 (23 patients, 50%), 22 patients had stage 3 (47.8%) and one patient had stage 1 disease (2.2%). The survival time ranged from 2.5 to 60 months, with an average of 34.9 months and median of 24.9 months. Table 1 shows the studied clinico-pathological variables. Intratumoral microvascular density (IMD) ranged from 12.25 to 87.46 vessels, with a median of 30.8 vessels per high-power-field. There was no significant difference (paired *t*-test  $p=0.04$ ) when we evaluated the interobserver microvascular counting variability, by considering the individual counting of each observer. There was no difference among patients as we used the median of the group as cut-off ( $p=0.293$ ), and the same happened when using the maximum field count ( $p=0.516$ ). Eleven patients (23.9%) did not show p21 expression; in the remaining patients the percentage of positive cells ranged from 10 to 70%; 9 patients (19.6%) had 10% of

positive cells, 12 (26.1%) had 20%, 6 (13%) had 40%, 3 (6.5% each), had 30% and 50%, and two cases (2.2% each), had 60 and 70% of positive cells respectively. The expression of p21 was not significantly related to survival ( $p=0.195$ , using a positive cell expression of 20% as cut off, and  $p=0.742$  when considering 10% of positive cells.)

## DISCUSSION

The vital importance of angiogenesis for neoplastic growth and dissemination, has led to the search of anti-angiogenic drugs for cancer treatment (9, 11, 12, 14). Its use as a prognostic factor has been widely discussed in the literature, more extensively in breast cancer studies (15, 45). Articles focusing on ESCC are still rare, and are summarized in table 2.

The comparison of studies using IMD as a prognostic factor is very difficult, essentially because of methodological differences, including the use of specific antibodies for vessel staining and the use of different counting methods (hot spot or diffuse, 400X or 200X magnification, computerized image analysis). In this study we have based IMD measuring method on those used by Weidner in his study on breast cancer (15, 43, 45). Other methods, such as digitalized image counting or the use of microscopic grates have shown similar results (30).

In this study no association was proved between microvascular counting and patient survival. This finding is similar to those reported by Ahn *et al.* (1), Torres *et al.* (42) and Takebayashi *et al.* (39). This last study presented the largest series (163 patients), and a roughly homogeneous distribution of the different disease stages (33 patients in stage 1, 43 in stage 2, 38 in stage 3 and 49 in stage 4). All three articles

cited above have a long follow up (up to 152 months), and the only group to use the same antiendothelial antibody (CD31) for vessel staining was Torres *et al.*. It is important to notice that, similarly to our study, the work from Ahn *et al.* included mostly patients with stage 2 and 3 disease.

On the other hand, some authors have associated higher microvascular counts to a shorter survival time in those patients treated for ESCC (8, 21, 23, 36, 40). The study by Tanigawa *et al.* showed that patients belonging to the hypovascular group had a longer survival time (40). In contrast with the present study, which includes only one patient with stage 1 disease, his work centers on a group of patients mostly classified as stages 1 and 2 (27 patients) with only 16 patients staged 3 and 4. The study from Igarashi *et al.* (21), like the latter, detected a shorter survival associated to higher vessel counts, and they grouped together the patients staged 0, 1 and 2A (34 patients) and those staged 2B, 3 and 4 (59 patients). We may assume from this data that angiogenesis may not be an important prognostic factor when the disease has reached a more advanced stage. This hypothesis could be corroborated by the study of the expression of angiogenic factors, like VEGF.

It is noteworthy that the median microvascular count in this study was the smallest ever reported for ESCC: 30.8 vessels in a 200X magnification field. Other studies using similar markers (CD31 and CD34) have found much higher counts, ranging from 59 to 148. The microscopic field diameter is certainly a factor that affects these findings, but this information is not usually available in publications. In the present study a 0.38mm<sup>2</sup> field with 200X magnification was used; Torres *et al.* used a 0.74mm<sup>2</sup> (42) field and Shih a 0.689mm<sup>2</sup> high-power-field (36). This variable, however, does not seem to influence the findings of those studies, for the first one

did not demonstrate a prognostic value for IMD, and the second reported shorter survival time associated to higher counts.

The role of p21 as a prognostic factor in ESCC is still controversial in the literature (see table 3 for the main studies). The present work did not find significant difference in patient survival when related to p21 expression, and this finding was not affected by the percentage of positive cells used as cut-off. This result agrees with those of Natsugoe *et al.*, that in a study of more advanced cases, found a special group with better prognosis, whose patients expressed p21 but did not express p53 (28). The same authors have published results of a study of patients with superficial carcinomas, whose p21 expression did not show prognostic significance (26). The isolated expression of p53, however, did not yield a prognostic value in a series of patients with characteristics similar to those of the present study (33). Positive relation was found between p21 expression and survival in a cohort of 100 patients by Mathew *et al.*, but this result was not confirmed by multivariate analysis (25). This study included 40 patients with lesions staged T1 and T2, and 33 cases with T3 and T4, a distribution that can be compared to our series.

In opposition to the findings above, p21 expression in ESCC was statistically significant in three other studies (24, 29, 34). Sarbia *et al.* have found shorter survival times in patients with p21 expressed in more than 50% of the cells (34). In our study, though, only two patients had such an expression level, what makes any comparison inaccurate. Different antibodies used and methodological factors could explain the discordant findings between this study and the work of Nita *et al.*, who used computerized image analysis to evaluate p21 expression (28), obtaining results that oppose those of Lam *et al.* (24). The former has shown that high p21 expression is

related to longer survival, while the latter found a shorter survival time associated to it.

When analyzing clinicopathological variables in the present study, we see clearly that the only prognostic factor of significance is the existence of metastatic disease in lymph nodes, which was associated to a shorter survival time ( $p=0.032$ ). This finding agrees with the literature and emphasizes the importance of early diagnosis, for obtaining better survival rates (7, 20, 38).

The results of this study show that IMD and p21 immunohistochemical expression are not relevant prognostic factors in patients surgically treated for ESCC, when maximal survival time of 60 months is considered.

## REFERENCES

1. Ahn, MJ, Jang, SJ, Park, YW, Choi, JH, Oh, HS, Lee, CB, Paik, HK and Park, CK (2002) Clinical prognostic values of vascular endothelial growth factor, microvessel density, and p53 expression in esophageal carcinomas (J Korean Med Sci) 17 201-7
2. Caffo, O, Doglioni, C, Veronese, S, Bonzanini, M, Marchetti, A, Buttitta, F, Fina, P, Leek, R, Morelli, L, Palma, PD, Harris, AL and Barbareschi, M (1996) Prognostic value of p21(WAF1) and p53 expression in breast carcinoma: an immunohistochemical study in 261 patients with long-term follow-up (Clin Cancer Res) 2 1591-9
3. Cai, K and Dynlacht, BD (1998) Activity and nature of p21(WAF1) complexes during the cell cycle (Proc Natl Acad Sci U S A) 95 12254-9

4. Chung, YS, Maeda, K and Sowa, M (1996) Prognostic value of angiogenesis in gastro-intestinal tumours (Eur J Cancer) 32A 2501-5.
5. el-Deiry, WS, Tokino, T, Velculescu, VE, Levy, DB, Parsons, R, Trent, JM, Lin, D, Mercer, WE, Kinzler, KW and Vogelstein, B (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression (Cell) 75 817-25.
6. el-Deiry, WS, Tokino, T, Waldman, T, Oliner, JD, Velculescu, VE, Burrell, M, Hill, DE, Healy, E, Rees, JL, Hamilton, SR and et al. (1995) Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues (Cancer Res) 55 2910-9
7. Eloubeidi, MA, Desmond, R, Arguedas, MR, Reed, CE and Wilcox, CM (2002) Prognostic factors for the survival of patients with esophageal carcinoma in the U.S.: the importance of tumor length and lymph node status (Cancer) 95 1434-43
8. Elpek, GO, Gelen, T, Aksoy, NH, Erdogan, A, Dertsiz, L, Demircan, A and Keles, N (2001) The prognostic relevance of angiogenesis and mast cells in squamous cell carcinoma of the oesophagus (J Clin Pathol) 54 940-944
9. Folkman, J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications (N Engl J Med) 285 1182-6.

10. Folkman, J (1972) Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors  
(Ann Surg) 175 409-16.
11. Folkman, J (1986) How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture (Cancer Res) 46 467-73.
12. Folkman, J (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?  
(J Natl Cancer Inst) 82 4-6.
13. Folkman, J (1995) Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston.  
Clinical applications of research on angiogenesis (N Engl J Med) 333 1757-63.
14. Folkman, J (1995) Tumor angiogenesis (The molecular basis of cancer) W.B.  
Saunders Philadelphia 206-32
15. Fox, SB, Leek, RD, Weekes, MP, Whitehouse, RM, Gatter, KC and Harris, AL  
(1995) Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis:  
comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image  
analysis (J Pathol) 177 275-83.
16. Gabbert, HE, Shimoda, T, Hainaut, P, Nakamura, Y, Field, JK and Inoue, H  
(2000) Squamous cell carcinoma of the esophagus (Pathology and Genetics -  
Tumours of the Digestive System) World Health Organization Lyon 9-30



- 17.Greenblatt, M and Shubi, P (1968) Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique (J Natl Cancer Inst) 41 111-24.
- 18.Harper, JW, Adami, GR, Wei, N, Keyomarsi, K and Elledge, SJ (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases (Cell) 75 805-16.
- 19.Holm, R, Skovlund, E, Skomedal, H, Florenes, VA and Tanum, G (2001) Reduced expression of p21WAF1 is an indicator of malignant behaviour in anal carcinomas (Histopathology) 39 43-9
- 20.Igaki, H, Kato, H, Tachimori, Y and Nakanishi, Y (2003) Prognostic evaluation of patients with clinical T1 and T2 squamous cell carcinomas of the thoracic esophagus after 3-field lymph node dissection (Surgery) 133 368-374
- 21.Igarashi, M, Dhar, DK, Kubota, H, Yamamoto, A, El-Assal, O and Nagasue, N (1998) The prognostic significance of microvessel density and thymidine phosphorylase expression in squamous cell carcinoma of the esophagus (Cancer) 82 1225-32
- 22.Kerbel, RS (2000) Tumor angiogenesis: past, present and the near future (Carcinogenesis) 21 505-15.

23. Koide, N, Nishio, A, Hiraguri, M, Hanazaki, K, Adachi, W and Amano, J (2001)  
Coexpression of vascular endothelial growth factor and p53 protein in  
squamous cell carcinoma of the esophagus (Am J Gastroenterol) 96 1733-40
24. Lam, KY, Law, S, Tin, L, Tung, PH and Wong, J (1999) The clinicopathological  
significance of p21 and p53 expression in esophageal squamous cell  
carcinoma: an analysis of 153 patients (Am J Gastroenterol) 94 2060-8
25. Mathew, R, Arora, S, Khanna, R, Mathur, M, Shukla, NK and Ralhan, R (2002)  
Alterations in p53 and pRb pathways and their prognostic significance in  
oesophageal cancer (Eur J Cancer) 38 832-41
26. Matsumoto, M, Natsugoe, S, Nakashima, S, Okumura, H, Sakita, H, Baba, M,  
Takao, S and Aikou, T (2001) Clinical significance and prognostic value of  
apoptosis related proteins in superficial esophageal squamous cell carcinoma  
(Ann Surg Oncol) 8 598-604
27. Migaldi, M, Sgambato, A, Garagnani, L, Ardito, R, Ferrari, P, De Gaetani, C,  
Cittadini, A and Trentini, GP (2000) Loss of p21Waf1 expression is a strong  
predictor of reduced survival in primary superficial bladder cancers (Clin  
Cancer Res) 6 3131-8
28. Natsugoe, S, Nakashima, S, Matsumoto, M, Xiangming, C, Okumura, H, Kijima, F,  
Ishigami, S, Takebayashi, Y, Baba, M, Takao, S and Aikou, T (1999)  
Expression of p21WAF1/Cip1 in the p53-dependent pathway is related to

- prognosis in patients with advanced esophageal carcinoma (Clin Cancer Res) 5 2445-9
29. Nita, ME, Nagawa, H, Tominaga, O, Tsuno, N, Hatano, K, Kitayama, J, Tsuruo, T, Domene, CE and Muto, T (1999) p21Waf1/Cip1 expression is a prognostic marker in curatively resected esophageal squamous cell carcinoma, but not p27Kip1, p53, or Rb (Ann Surg Oncol) 6 481-488
30. O'Byrne, KJ, Dalglish, AG, Browning, MJ, Steward, WP and Harris, AL (2000) The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease (Eur J Cancer) 36 151-69
31. Ohbu, M, Kobayashi, N and Okayasu, I (2001) Expression of cell cycle regulatory proteins in the multistep process of oesophageal carcinogenesis: stepwise over-expression of cyclin E and p53, reduction of p21(WAF1/CIP1) and dysregulation of cyclin D1 and p27(KIP1) (Histopathology) 39 589-96
32. Parkin, DM, Pisani, P and Ferlay, J (1999) Global cancer statistics (CA Cancer J Clin) 49 33-64, 1
33. Rosa, AR, Schirmer, CC, Gurski, RR, Meurer, L, Edelweiss, MI and Krueel, CD (2003) Prognostic value of p53 protein expression and vascular endothelial growth factor expression in resected squamous cell carcinoma of the esophagus (Dis Esophagus) 16 112-8

- 34.Sarbia, M, Stahl, M, zur Hausen, A, Zimmermann, K, Wang, L, Fink, U, Heep, H, Dutkowski, P, Willers, R, Müller, W, Seeber, S and Gabbert, HE (1998) Expression of p21/WAF1 predicts outcome of esophageal cancer patients treated by surgery alone or by combined therapy modalities (Clin Cancer Res) 4 2615-23
- 35.Schmider, A, Gee, C, Friedman, W, Lukas, JJ, Press, MF, Lichtenegger, W and Reles, A (2000) p21 (WAF1/CIP1) protein expression is associated with prolonged survival but not with p53 expression in epithelial ovarian carcinoma (Gynecology Oncology) 77 237-242
- 36.Shih, CH, Ozawa, S, Ando, N, Ueda, M and Kitajima, M (2000) Vascular endothelial growth factor expression predicts outcome and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus (Clin Cancer Res) 6 1161-8
- 37.Shirakawa, Y, Naomoto, Y, Kimura, M, Kawashima, R, Yamatsuji, T, Tamaki, T, Hamada, M, Haisa, M and Tanaka, N (2000) Topological analysis of p21WAF1/CIP1 expression in esophageal squamous dysplasia (Clin Cancer Res) 6 541-50
- 38.Tachibana, M, Dhar, DK, Kinugasa, S, Yoshimura, H, Fujii, T, Shibakita, M, Ohno, S, Ueda, S, Kohno, H and Nagasue, N (2002) Esophageal cancer patients surviving 6 years after esophagectomy (Langenbecks Arch Surg) 387 77-83

39. Takebayashi, Y, Natsugoe, S, Baba, M, Akiba, S, Fukumoto, T, Miyadera, K, Yamada, Y, Takao, S, Akiyama, S and Aikou, T (1999) Thymidine phosphorylase in human esophageal squamous cell carcinoma (Cancer) 85 282-9
40. Tanigawa, N, Matsumura, M, Amaya, H, Kitaoka, A, Shimomatsuya, T, Lu, C, Muraoka, R and Tanaka, T (1997) Tumor vascularity correlates with the prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma (Cancer) 79 220-5
41. Toi, M, Taniguchi, T, Yamamoto, Y, Kurisaki, T, Suzuki, H and Tominaga, T (1996) Clinical significance of the determination of angiogenic factors (Eur J Cancer) 32A 2513-9.
42. Torres, C, Wang, H, Turner, J, Shahsafaie, A and Odze, RD (1999) Prognostic significance and effect of chemoradiotherapy on microvessel density (angiogenesis) in esophageal Barrett's esophagus-associated adenocarcinoma and squamous cell carcinoma (Hum Pathol) 30 753-8
43. Vermeulen, PB, Gasparini, G, Fox, SB, Toi, M, Martin, L, McCulloch, P, Pezzella, F, Viale, G, Weidner, N, Harris, AL and Dirix, LY (1996) Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation (Eur J Cancer) 32A 2474-84.

44. Warren, BA and Shubik, P (1966) The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch (Lab Invest) 15 464-78.
45. Weidner, N, Semple, JP, Welch, WR and Folkman, J (1991) Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma (N Engl J Med) 324 1-8.
46. Yang, CS (1980) Research on esophageal cancer in China: a review (Cancer Res) 40 2633-44
47. Yoshinaka, H, Shimazu, H, Fukumoto, T and Baba, M (1991) Superficial esophageal carcinoma: a clinicopathological review of 59 cases (Am J Gastroenterol) 86 1413-8

**Table 1. Clinicopathologic factors and relationship with survival in 46 cases of esophageal squamous cell carcinoma.**

Factor	N	Significance (p)
Age (years, average)	56	0,93
Sex		
Male	39	
Female	7	0,93
Degree of differentiation*		
Well differentiated	7	
Moderately differentiated	31	
Poorly differentiated	8	0,52
Depth of invasion**		
T1/T2	14	
T3	26	
T4	6	0,42
Lymph nodes**		
Negative (N0)	22	
Positive (N1)	24	0,032
Stage**		
I/II	24	
III	22	0,12
Surgical margins		
Negative	33	
Positive	13	0,80
Intratumoral microvascular density		
$\geq$ median (30,8)	23	
$<$ median(30,8)	23	0,29
Immuno histochemical expression of p21		
$\geq$ 20% of cells	20	
$\leq$ 21% of cells	26	0,19

\* According with World Health Organisation, 2002.

\*\* According with UICC/TNM (p), 1996.

**Table 2. Intratumoral microvascular density and survival in different studies.**

Author, year	Antibody	Cases (number)	Follow - up (months)	Result
Tanigawa,1997	CD 34 and factor VIII	43	24	Longer survival in the hypovascular group (p<0,01)
Igarashi, 1998	CD 34	83	28-36	Shorter survival with higher counts (p=0,027)
Takebayashi, 1999	Factor VIII	163	Not specified	Not significant
Torres, 1999	CD 31	22	1-152	Not significant
Shih, 2000	Factor VIII	95	Up to 81	Shorter survival with higher counts (p=0,009)
Koide, 2001	Factor VIII	60	Not specified	Shorter survival with higher counts
Elpek, 2001	CD 34	53	6-60	Shorter survival with higher counts (p=0,009)
Ahn, 2002	CD 34	81	3,9-128	Not significant
This study, 2003	CD 31	46	2,5-60	Not significant



Table 3: Immunohistochemical expression of p21 and survival in different studies.

Author, year	Cases (number)	Follow up (months)	Result
Sarbia, 1998	149	1–224	Poorer survival in patient with expression in more than 50% of cells (p=0,0081)
Lam, 1999	153	Not specified	Poorer survival in the positive group (p=0,03)
Nita, 1999	62	2-137	Longer survival in high expression group (p=0,0062)
Natsugoe, 1999	103	60	p21 isolated: not significant; p53 negative and p21 positive: longer survival (advanced cases)
Matsumoto, 2001	79	60	Not significant (superficial cases)
Mathew, 2002	100	44	Not significant in multivariate analysis
This study, 2003	46	2,5-60	Not significant

Figure 1. Intratumoral vascular density (IMD) and long term survival.

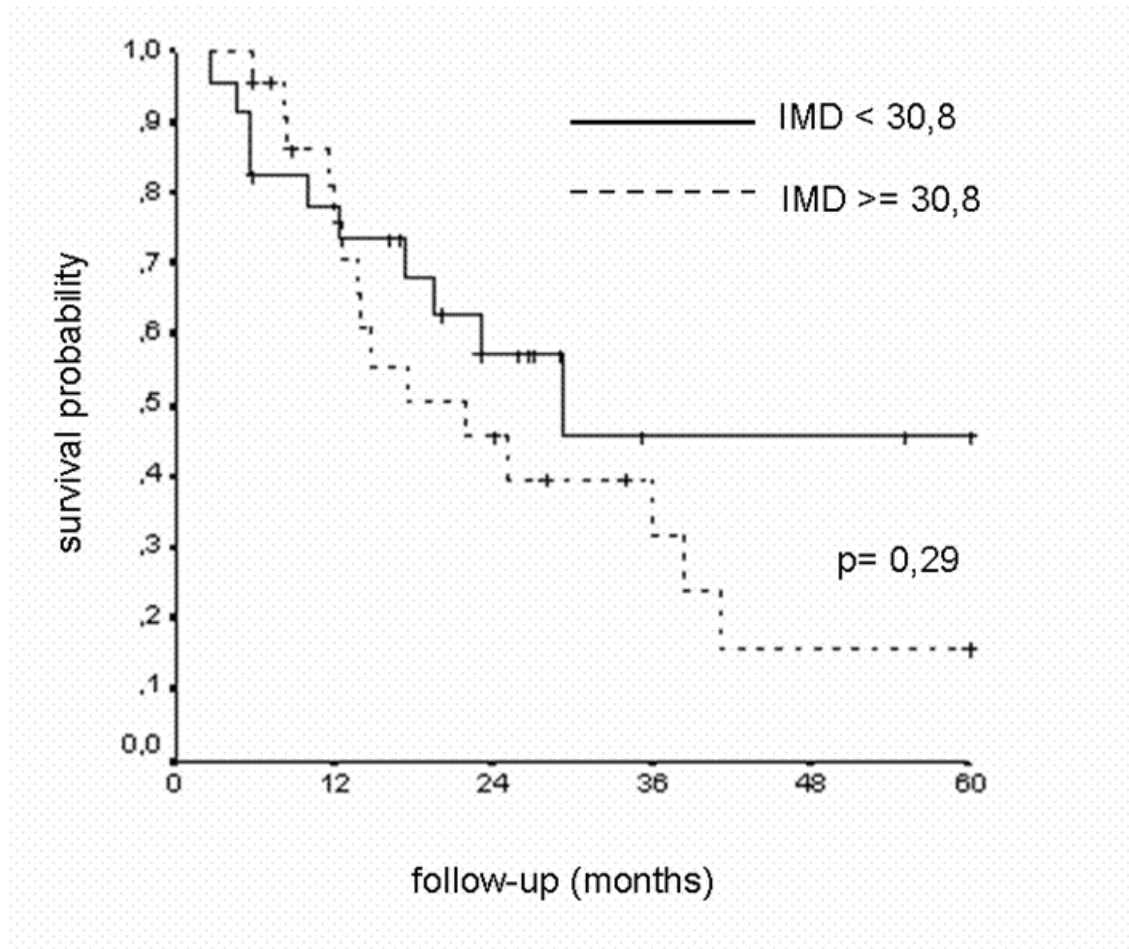
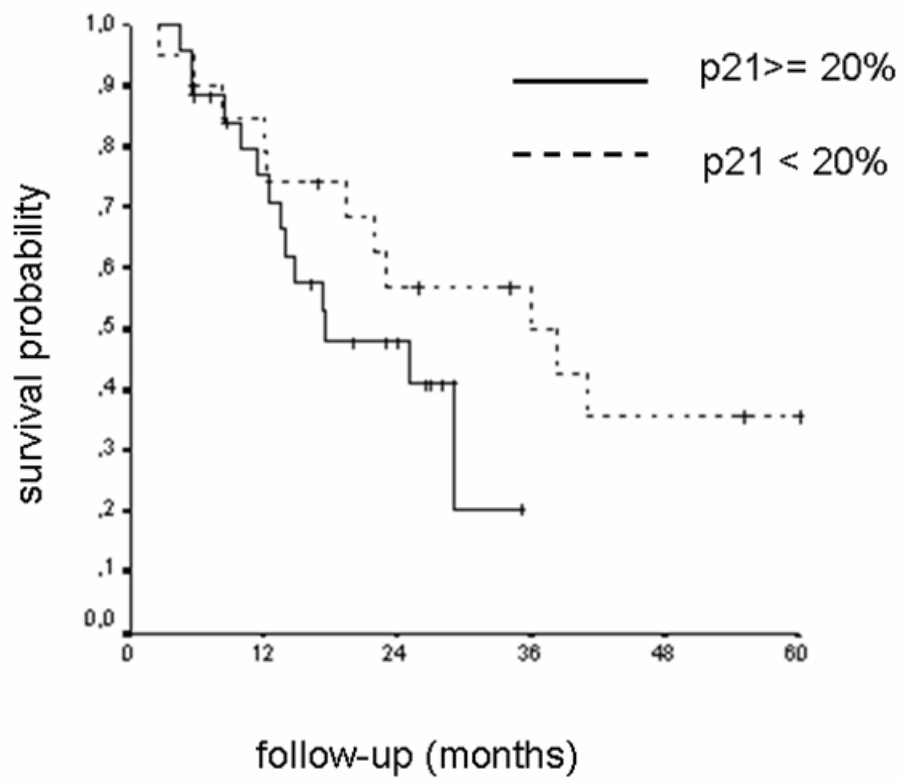


Figure 2. Immunohistochemical expression of p21 (% of neoplastic cells) and survival.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1. Roth MJ, Guo-Qing W, Lewin KJ, Ning L, Dawsey SM, Wesley MN, et al. Histopathologic changes seen in esophagectomy specimens from the high-risk region of Linxian, China: potential clues to an etiologic exposure? *Hum Pathol* 1998;29(11):1294-8.
2. Parkin DM, Pisani P., Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 1993;54(4):594-606.
3. Day NE. The geographic pathology of cancer of the oesophagus. *Br Med Bull* 1984;40(4):329-34.
4. Prolla JC, Dietz J, da Costa LA. [Geographical differences in esophageal neoplasm mortality in Rio Grande do Sul]. *Rev Assoc Med Bras* 1993;39(4):217-20.
5. Yoshinaka H, Shimazu H, Fukumoto T, Baba M. Superficial esophageal carcinoma: a clinicopathological review of 59 cases. *Am J Gastroenterol* 1991;86(10):1413-8.
6. Yang CS. Research on esophageal cancer in China: a review. *Cancer Res* 1980;40(8 Pt 1):2633-44.
7. Lewin KJ, Appelman, H.D. Tumors of the esophagus and stomach. Third series edition ed. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1996.

8. Liu FS, Wang, Q.L. Squamous cell carcinoma of the esophagus. In: Ming SC, Goldman, H., editor. Pathology of the gastrointestinal tract. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p. 439-454.
9. Tachibana M, Dhar DK, Kinugasa S, Yoshimura H, Fujii T, Shibakita M, et al. Esophageal cancer patients surviving 6 years after esophagectomy. *Langenbecks Arch Surg* 2002;387(2):77-83.
10. Eloubeidi MA, Desmond 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(7):1434-43.
11. Igaki H, Kato H, Tachimori Y, Nakanishi Y. Prognostic evaluation of patients with clinical T1 and T2 squamous cell carcinomas of the thoracic esophagus after 3-field lymph node dissection. *Surgery* 2003;133(4):368-374.
12. Rosa AR, Gurski RR, Schirmer CC, Brentano L, Krueel CD. Survival and prognostic factors in patients with resected epidermoid oesophageal carcinoma. *Int Surg* 1999;84(3):193-8.
13. Fagundes RB, de Barros SG, Putten AC, Mello ES, Wagner M, Bassi LA, et al. Occult dysplasia is disclosed by Lugol chromoendoscopy in alcoholics at high risk for squamous cell carcinoma of the esophagus. *Endoscopy* 1999;31(4):281-5.
14. Freitag CP, Barros SG, Krueel CD, Putten AC, Dietz J, Gruber AC, et al. Esophageal dysplasias are detected by endoscopy with Lugol in patients at risk for squamous cell carcinoma in southern Brazil. *Dis Esophagus* 1999;12(3):191-5.
15. Dawsey SM, Shen Q, Nieberg RK, Liu SF, English SA, Cao J, et al. Studies of esophageal balloon cytology in Linxian, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6(2):121-30.

16. Cairns J. Mutation and cancer: the antecedents to our studies of adaptive mutation. *Genetics* 1998;148(4):1433-40.
17. Chang F, Syrjanen S, Tervahauta A, Syrjanen K. Tumorigenesis associated with the p53 tumour suppressor gene. *Br J Cancer* 1993;68(4):653-61.
18. Ikeguchi M, Unate H, Maeta M, Kaibara N. Detection of telomerase activity in esophageal squamous cell carcinoma and normal esophageal epithelium. *Langenbecks Arch Surg* 1999;384(6):550-5.
19. Kubota M, Yamana H, Sueyoshi S, Fujita H, Shirouzu K. The significance of telomerase activity in cancer lesions and the noncancerous epithelium of the esophagus. *Int J Clin Oncol* 2002;7(1):32-7.
20. Aloia TA, Harpole DH, Jr., Reed CE, Allegra C, Moore MB, Herndon JE, 2nd, et al. Tumor marker expression is predictive of survival in patients with esophageal cancer. *Ann Thorac Surg* 2001;72(3):859-66.
21. Koide N, Nishio A, Hiraguri M, Hanazaki K, Adachi W, Amano J. Coexpression of vascular endothelial growth factor and p53 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2001;96(6):1733-40.
22. Rosa AR, Schirmer CC, Gurski RR, Meurer L, Edelweiss MI, Krueel CD. Prognostic value of p53 protein expression and vascular endothelial growth factor expression in resected squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esophagus* 2003;16(2):112-8.
23. Takeno S, Noguchi T, Kikuchi R, Uchida Y, Yokoyama S, Muller W. Prognostic value of cyclin B1 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2002;94(11):2874-81.

24. Murakami H, Furihata M, Ohtsuki Y, Ogoshi S. Determination of the prognostic significance of cyclin B1 overexpression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 1999;434(2):153-8.
25. Nozoe T, Korenaga D, Kabashima A, Ohga T, Saeki H, Sugimachi K. Significance of Cyclin B1 Expression as an Independent Prognostic Indicator of Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus. *Clin Cancer Res* 2002;8(3):817-822.
26. Ikeguchi M, Sakatani T, Ueta T, Kaibara N. Cyclin D1 expression and retinoblastoma gene protein (pRB) expression in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127(9):531-6.
27. Nozoe T, Korenaga D, Itoh S, Futatsugi M, Maehara Y. Clinicopathological significance of pRb2/p130 expression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128(12):691-6.
28. Inada S, Koto T, Futami K, Arima S, Iwashita A. Evaluation of malignancy and the prognosis of esophageal cancer based on an immunohistochemical study (p53, E-cadherin, epidermal growth factor receptor). *Surg Today* 1999;29(6):493-503.
29. Zhao XJ, Li H, Chen H, Liu YX, Zhang LH, Liu SX, et al. Expression of e-cadherin and beta-catenin in human esophageal squamous cell carcinoma: relationships with prognosis. *World J Gastroenterol* 2003;9(2):225-32.
30. Grabowski P, Kuhnel T, Muhr-Wilkenshoff F, Heine B, Stein H, Hopfner M, et al. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003;88(1):115-9.
31. Tomita M, Ayabe T, Matsuzaki Y, Edagawa M, Maeda M, Shimizu T, et al. Expression of nm23-H1 gene product in esophageal squamous cell carcinoma and its association with vessel invasion and survival. *BMC Cancer* 2001;1(1):3.

32. Cho Y, Miyamoto M, Kato K, Fukunaga A, Shichinohe T, Kawarada Y, et al. CD4+ and CD8+ T Cells Cooperate to Improve Prognosis of Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res* 2003;63(7):1555-1559.
33. Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, Schlag PM. Prognostic Significance of Activated CD8+ T Cell Infiltrations within Esophageal Carcinomas. *Cancer Res* 2001;61(10):3932-3936.
34. Gotoda T, Matsumura Y, Kondo H, Ono H, Kanamoto A, Kato H, et al. Expression of CD44 variants and prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Gut* 2000;46(1):14-19.
35. Zhou J, Zhao LQ, Xiong MM, Wang XQ, Yang GR, Qiu ZL, et al. Gene expression profiles at different stages of human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9(1):9-15.
36. Folkman J. Tumor angiogenesis. In: Mendelson J HP, Israel MA, Liotta LA, editor. *The molecular basis of cancer*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1995. p. 206-32.
37. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82(1):4-6.
38. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res* 1986;46(2):467-73.
39. Kumagai Y, Toi M, Inoue H. Dynamism of tumour vasculature in the early phase of cancer progression: outcomes from oesophageal cancer research. *Lancet Oncol* 2002;3(10):604-10.
40. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000;21(3):505-15.
41. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285(21):1182-6.



42. Warren BA, Shubik P. The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch. *Lab Invest* 1966;15(2):464-78.
43. Greenblatt M, Shubi P. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst* 1968;41(1):111-24.
44. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972;175(3):409-16.
45. Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 1984;223(4642):1296-9.
46. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Podes D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 1999;103(2):159-65.
47. Benjamin LE, Keshet E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(16):8761-6.
48. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995;1(10):1024-8.
49. Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA, Rossant J, Breitman ML. tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* 1992;7(8):1471-80.

50. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999;18(38):5356-62.
51. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87(7):1171-80.
52. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996;87(7):1161-9.
53. Nagata J, Kijima H, Hatanaka H, Tokunaga T, Kamochi J, Abe Y, et al. Angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor expression in human esophageal cancer. *Int J Mol Med* 2002;10(4):423-6.
54. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86(3):353-64.
55. Cao Y, Linden P, Shima D, Browne F, Folkman J. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. *J Clin Invest* 1996;98(11):2507-11.
56. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994;265(5178):1582-4.
57. Volpert OV, Stellmach V, Bouck N. The modulation of thrombospondin and other naturally occurring inhibitors of angiogenesis during tumor progression. *Breast Cancer Res Treat* 1995;36(2):119-26.
58. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG, Jr., Goldberg MA. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(20):10595-9.

59. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(26):14608-13.
60. Folkman J. Can mosaic tumor vessels facilitate molecular diagnosis of cancer? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(2):398-400.
61. Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995;333(26):1757-63.
62. Chung YS, Maeda K, Sowa M. Prognostic value of angiogenesis in gastrointestinal tumours. *Eur J Cancer* 1996;32A(14):2501-5.
63. von Bulow C, Hayen W, Hartmann A, Mueller-Klieser W, Allolio B, Nehls V. Endothelial capillaries chemotactically attract tumour cells. *J Pathol* 2001;193(3):367-76.
64. Thompson WD. Tumour versus patient: vascular and tumour survival versus prognosis. *J Pathol* 2001;193(4):425-6.
65. Gould VE, Wagner BM. Angiogenesis: an expanding universe. *Hum Pathol* 2002;33(11):1061-3.
66. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical significance of angiogenesis in gastrointestinal cancers: a target for novel prognostic and therapeutic approaches. *Ann Surg* 2003;238(1):9-28.
67. O'Byrne KJ, Dalglish AG, Browning MJ, Steward WP, Harris AL. The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. *Eur J Cancer* 2000;36(2):151-69.
68. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996;32A(14):2474-84.

69. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324(1):1-8.
70. Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. *J Pathol* 1995;177(3):275-83.
71. Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res* 2000;60(5):1388-93.
72. Rice A, Quinn CM. Angiogenesis, thrombospondin, and ductal carcinoma in situ of the breast. *J Clin Pathol* 2002;55(8):569-74.
73. Toi M, Taniguchi T, Yamamoto Y, Kurisaki T, Suzuki H, Tominaga T. Clinical significance of the determination of angiogenic factors. *Eur J Cancer* 1996;32A(14):2513-9.
74. Valkovic T, Dobrila F, Melato M, Sasso F, Rizzardi C, Jonjic N. Correlation between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and tumor-associated macrophages in invasive ductal breast carcinoma. *Virchows Arch* 2002;440(6):583-8.
75. de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP. Hot spot microvessel density and the mitotic activity index are strong additional prognostic indicators in invasive breast cancer. *Histopathology* 2000;36(4):306-12.
76. Moehler TM, Neben K, Ho AD, Goldschmidt H. Angiogenesis in hematologic malignancies. *Ann Hematol* 2001;80(12):695-705.
77. Pezzella F HA, Gatter KC. Ways of escape: are all tumours angiogenic? *Histopathology* 2001;39:551-553.

78. Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, Andreola S, Sozzi G, Gasparini G, et al. Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol* 1997;151(5):1417-23.
79. Naresh KN, Nerurkar AY, Borges AM. Angiogenesis is redundant for tumour growth in lymph node metastases. *Histopathology* 2001;38(5):466-70.
80. Reis-Filho JS SR, Schmitt FC. Angiogenesis in lymph node metastases (letter). *Histopathology* 2001;40:103-104.
81. Vermeulen PB, Colpaert C, Salgado R, Royers R, Hellemans H, Van Den Heuvel E, et al. Liver metastases from colorectal adenocarcinomas grow in three patterns with different angiogenesis and desmoplasia. *J Pathol* 2001;195(3):336-42.
82. Tsoi E, Zacharatos P, Dasiou-Plakida D, Peros J, Evangelou K, Zavras AI, et al. Growth index is independent of microvessel density in non-small-cell lung carcinomas. *Hum Pathol* 2002;33(8):812-8.
83. Kase S, Osaki M, Honjo S, Adachi H, Tsujitani S, Kaibara N, et al. Expression of cyclo-oxygenase-2 is correlated with high intratumoral microvessel density and low apoptotic index in human esophageal squamous cell carcinomas. *Virchows Arch* 2003;442(2):129-35.
84. Sternfeld T, Foss HD, Kruschewski M, Runkel N. The prognostic significance of tumor vascularization in patients with localized colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 1999;14(6):272-6.
85. Tanigawa N, Matsumura M, Amaya H, Kitaoka A, Shimomatsuya T, Lu C, et al. Tumor vascularity correlates with the prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1997;79(2):220-5.

86. 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(3):1161-8.
87. Elpek GO, Gelen T, Aksoy NH, Erdogan A, Dertsiz L, Demircan A, et al. The prognostic relevance of angiogenesis and mast cells in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *J Clin Pathol* 2001;54(12):940-944.
88. Igarashi M, Dhar DK, Kubota H, Yamamoto A, El-Assal O, Nagasue N. The prognostic significance of microvessel density and thymidine phosphorylase expression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1998;82(7):1225-32.
89. Takebayashi Y, Natsugoe S, Baba M, Akiba S, Fukumoto T, Miyadera K, et al. Thymidine phosphorylase in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1999;85(2):282-9.
90. Torres C, Wang H, Turner J, Shahsafaei A, Odze RD. Prognostic significance and effect of chemoradiotherapy on microvessel density (angiogenesis) in esophageal Barrett's esophagus-associated adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 1999;30(7):753-8.
91. Ahn MJ, Jang SJ, Park YW, Choi JH, Oh HS, Lee CB, et al. Clinical prognostic values of vascular endothelial growth factor, microvessel density, and p53 expression in esophageal carcinomas. *J Korean Med Sci* 2002;17(2):201-7.
92. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75(4):817-25.
93. Lewin B. *Genes VI*. New York: Oxford University Press and Cell Press; 1997.

94. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993;75(4):805-16.
95. Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Hatano K, Kitayama J, et al. p21Waf1/Cip1 expression is a prognostic marker in curatively resected esophageal squamous cell carcinoma, but not p27Kip1, p53, or Rb. *Ann Surg Oncol* 1999;6(5):481-488.
96. Cai K, Dynlacht BD. Activity and nature of p21(WAF1) complexes during the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(21):12254-9.
97. Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 1994;211(1):90-8.
98. Jiang H, Lin J, Su ZZ, Collart FR, Huberman E, Fisher PB. Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. *Oncogene* 1994;9(11):3397-406.
99. Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res* 1999;246(2):280-9.
100. Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, et al. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 1995;9(8):935-44.
101. Xing Y, Ning Y, Ru LQ, Wang LD. Expressions of PCNA, p53, p21(WAF-1) and cell proliferation in fetal esophageal epithelia: Comparative study with adult esophageal lesions from subjects at high-incidence area for esophageal cancer in Henan, North China. *World J Gastroenterol* 2003;9(7):1601-3.

102. Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL. p21--negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996;213(2):138-49.
103. Missero C, Di Cunto F, Kiyokawa H, Koff A, Dotto GP. The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes Dev* 1996;10(23):3065-75.
104. Somasundaram K, Zhang H, Zeng YX, Houvras Y, Peng Y, Wu GS, et al. Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/CiP1. *Nature* 1997;389(6647):187-90.
105. Kadowaki Y, Fujiwara T, Fukazawa T, Shao J, Yasuda T, Itoshima T, et al. Induction of differentiation-dependent apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma by adenovirus-mediated p21sdi1 gene transfer. *Clin Cancer Res* 1999;5(12):4233-41.
106. Chang BD, Watanabe K, Broude EV, Fang J, Poole JC, Kalinichenko TV, et al. Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(8):4291-6.
107. Shiohara M, el-Deiry WS, Wada M, Nakamaki T, Takeuchi S, Yang R, et al. Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood* 1994;84(11):3781-4.
108. Zhang Y, Griffith EC, Sage J, Jacks T, Liu JO. Cell cycle inhibition by the anti-angiogenic agent TNP-470 is mediated by p53 and p21WAF1/CIP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(12):6427-32.
109. Yeh JR, Mohan R, Crews CM. The antiangiogenic agent TNP-470 requires p53 and p21CIP/WAF for endothelial cell growth arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(23):12782-7.



110. Stromblad S, Becker JC, Yebra M, Brooks PC, Cheresh DA. Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alphaVbeta3 during angiogenesis. *J Clin Invest* 1996;98(2):426-33.
111. Ahmad N, Feyes DK, Agarwal R, Mukhtar H. Photodynamic therapy results in induction of WAF1/CIP1/P21 leading to cell cycle arrest and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(12):6977-82.
112. Michel P, Magois K, Robert V, Chiron A, Lepessot F, Bodenat C, et al. Prognostic value of TP53 transcriptional activity on p21 and bax in patients with esophageal squamous cell carcinomas treated by definitive chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;54(2):379-85.
113. Tian H, Wittmack EK, Jorgensen TJ. p21WAF1/CIP1 antisense therapy radiosensitizes human colon cancer by converting growth arrest to apoptosis. *Cancer Res* 2000;60(3):679-84.
114. Migaldi M, Sgambato A, Garagnani L, Ardito R, Ferrari P, De Gaetani C, et al. Loss of p21Waf1 expression is a strong predictor of reduced survival in primary superficial bladder cancers. *Clin Cancer Res* 2000;6(8):3131-8.
115. Caffo O, Doglioni C, Veronese S, Bonzanini M, Marchetti A, Buttitta F, et al. Prognostic value of p21(WAF1) and p53 expression in breast carcinoma: an immunohistochemical study in 261 patients with long-term follow-up. *Clin Cancer Res* 1996;2(9):1591-9.
116. Schmider A, Gee C, Friedman W, Lukas JJ, Press MF, Lichtenegger W, et al. p21 (WAF1/CIP1) protein expression is associated with prolonged survival but not with p53 expression in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecology Oncology* 2000;77:237-242.

117. Sinicrope FA, Roddey G, Lemoine M, Ruan S, Stephens LC, Frazier ML, et al. Loss of p21WAF1/Cip1 protein expression accompanies progression of sporadic colorectal neoplasms but not hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 1998;4(5):1251-61.
118. Veloso M, Wrba F, Kaserer K, Heinze G, Magalhaes A, Herbst F, et al. p53 gene status and expression of p53, mdm2, and p21Waf1/Cip1 proteins in colorectal cancer. *Virchows Arch* 2000;437(3):241-7.
119. Polyak K, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 1996;149(2):381-7.
120. Holm R, Skovlund E, Skomedal H, Florenes VA, Tanum G. Reduced expression of p21WAF1 is an indicator of malignant behaviour in anal carcinomas. *Histopathology* 2001;39(1):43-9.
121. Liu XP, Kawauchi S, Oga A, Suehiro Y, Tsushimi K, Tsushimi M, et al. Combined examination of p27(Kip1), p21(Waf1/Cip1) and p53 expression allows precise estimation of prognosis in patients with gastric carcinoma. *Histopathology* 2001;39(6):603-10.
122. Chatelain D, Flejou JF. High-grade dysplasia and superficial adenocarcinoma in Barrett's esophagus: histological mapping and expression of p53, p21 and Bcl-2 oncoproteins. *Virchows Arch* 2003;442(1):18-24.
123. Ohbu M, Kobayashi N, Okayasu I. Expression of cell cycle regulatory proteins in the multistep process of oesophageal carcinogenesis: stepwise over-expression of cyclin E and p53, reduction of p21(WAF1/CIP1) and dysregulation of cyclin D1 and p27(KIP1). *Histopathology* 2001;39(6):589-96.

124. el-Deiry WS, Tokino T, Waldman T, Oliner JD, Velculescu VE, Burrell M, et al. Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1995;55(13):2910-9.
125. Shirakawa Y, Naomoto Y, Kimura M, Kawashima R, Yamatsuji T, Tamaki T, et al. Topological analysis of p21WAF1/CIP1 expression in esophageal squamous dysplasia. *Clin Cancer Res* 2000;6(2):541-50.
126. Ohashi K, Nemoto T, Eishi Y, Matsuno A, Nakamura K, Hirokawa K. Expression of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in oesophageal squamous cell carcinomas. *Virchows Arch* 1997;430(5):389-95.
127. Seta T, Imazeki F, Yokosuka O, Saisho H, Suzuki T, Koide Y, et al. Expression of p53 and p21WAF1/CIP1 proteins in gastric and esophageal cancers: comparison with mutations of the p53 gene. *Dig Dis Sci* 1998;43(2):279-89.
128. Natsugoe S, Nakashima S, Matsumoto M, Xiangming C, Okumura H, Kijima F, et al. Expression of p21WAF1/Cip1 in the p53-dependent pathway is related to prognosis in patients with advanced esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999;5(9):2445-9.
129. Masuda N, Kato H, Nakajima T, Sano T, Kashiwabara K, Oyama T, et al. Synergistic decline in expressions of p73 and p21 with invasion in esophageal cancers. *Cancer Sci* 2003;94(7):612-7.
130. Sarbia M, Stahl M, zur Hausen A, Zimmermann K, Wang L, Fink U, et al. Expression of p21WAF1 predicts outcome of esophageal cancer patients treated by surgery alone or by combined therapy modalities. *Clin Cancer Res* 1998;4(11):2615-23.

131. Lam KY, Law S, Tin L, Tung PH, Wong J. The clinicopathological significance of p21 and p53 expression in esophageal squamous cell carcinoma: an analysis of 153 patients. *Am J Gastroenterol* 1999;94(8):2060-8.
132. Matsumoto M, Natsugoe S, Nakashima S, Okumura H, Sakita H, Baba M, et al. Clinical significance and prognostic value of apoptosis related proteins in superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2001;8(7):598-604.
133. 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(6):832-41.
134. Gabbert HE, Shimoda T, Hainaut P, Nakamura Y, Field JK, Inoue H. Squamous cell carcinoma of the esophagus. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. *Pathology and Genetics - Tumours of the Digestive System*. Lyon: World Health Organization; 2000. p. 9-30.

