

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Programa de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia

Avaliação da expressão imunistoquímica da proteína p16^{INK4a} no adenocarcinoma de esôfago.

Mestrando: Mário Henrique 05, anai
Orientador: Dr. Richard Ricachenevsky Gurski
Co-orientadora: Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss

Porto Alegre, Janeiro de 2005.

MÁRIO HENRIQUE OSANAI

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA P16^{INK4a} NO
ADENOCARCINOMA DE ESÔFAGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Medicina, área de Cirurgia, da
Faculdade de Medicina da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, Janeiro de 2005.

CIP - Catalogação na Publicação

Osanaí, Mário Henrique

Avaliação da expressão imunistoquímica da proteína p16INK4a no adenocarcinoma de esôfago / Mário Henrique Osanaí. -- 2005.

104 f.

Orientador: Richard Ricachenevsky Gurski.

Coorientadora: Maria Isabel Albano Edelweiss.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto Alegre, BR-RS, 2005.

1. Neoplasia de esôfago. 2. Adenocarcinoma de esôfago. 3. p16INK4a. 4. p16. 5. Esôfago. I. Ricachenevsky Gurski, Richard, orient. II. Albano Edelweiss, Maria Isabel, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mário Henrique Ossanai

Avaliação da expressão imunohistoquímica da proteína p16INK4a no adenocarcinoma de esôfago

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Richard Ricachenevsky Gurski

Aprovado em: Porto Alegre, 30 de janeiro de 2005.

BANCA EXAMINADORA:

PROF. DR. CARLOS CAUDURO SCHIRMER
UFRGS

PROF. DR. FABIO SEGAL
UFRGS

PROF. DR. JULIO CARLOS PEREIRA LIMA
UFRGS

À minha família.

À minha mãe, Carmelinda Maria Bampi, mulher exemplo de perseverança, coragem, poesia e humanidade.

Ao meu pai, Mário Hideki Osanai, médico referencial de honestidade e humanidade, idealismo e ética.

*"Do not go where the path may lead, go instead
where there is no path and leave a trail."
(Não vá onde o caminho pode conduzir,
vá onde não existe caminho e deixe uma trilha).*
**Ralph Waldo Emerson, poeta norte-americano
(1803 - 1882)**

Agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Richard Ricachenevski Gurski, orientador deste estudo, pela oportunidade e compreensão. Pela convicção na pesquisa e por acreditar na sua viabilidade. Pela orientação objetiva e segura.

À Prof. Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss, Co-orientadora, conselheira, amiga e guia. Pelo reconhecimento que me possibilitou o ingresso nesse respeitado Programa de Pós-graduação. Pela paciência, dedicação e carinho com que esteve presente durante todas as etapas deste trabalho. Pelo conhecimento e sensatez com que conduziu o estudo.

Ao Prof. Dr. Luiz Rohde, exemplo e referência de retidão, disciplina, competência, habilidade cirúrgica e conhecimento científico desde minha graduação nessa Faculdade de Medicina.

À Dra. Luise Meurer, pelo empenho e disponibilidade em todas as etapas do estudo. Pelo fundamental apoio na realização de um trabalho adequado.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que torna possível uma formação acadêmica com qualidade e excelência.

Ao Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SP-HCPA), pelo suporte que permitiu a realização deste estudo e, de modo especial, às técnicas Sra. Neiva Copetti e Sra. Flávia Giusti, pela disponibilidade e competência na confecção das lâminas, aos funcionários Sr. Jorge Alberto Lopes e Sra. Zeli Fogaça Pacheco, pela ajuda na separação das lâminas e blocos do acervo e ao funcionário Sr. Adelmo Soliman, sempre prestativo.

Ao Centro de Pesquisas, nas pessoas da Sra. Rosane Schlatter e Sra. Fabiana Silva da Silva, pelo interesse e persistência na busca pelos materiais necessários e pela organização e disponibilização do Centro de Pesquisas para realização deste estudo.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG-HCPA), pela avaliação e validação éticas bem como pelo apoio e suporte em todas as etapas deste estudo.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE), pelo suporte financeiro.

Ao Prof. Dr. José Roberto Goldim que, com suas sábias reflexões sobre Medicina e Ética, manteve acesa a chama da esperança pelo resgate da dignidade de uma profissão tão nobre como a Medicina.

À Dra. Maitê de Mello Vilwock, amiga e colega, pela colaboração e apoio durante todo o trabalho.

Ao Dr. Ricardo Antônio Hoppen, pelo companheirismo, solidariedade e motivação, determinantes na realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Kruehl, Coordenador do Programa de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela qualificação e reconhecimento da pesquisa científica.

À Dra. Daniela Benzano e ao Prof. Dr. Mário Bernardes Wagner, pelos ensinamentos e auxílio na análise estatística.

À Sra. Estela Maris Emer Araripe, secretária do Programa de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia, amiga e incentivadora, pela competência e dedicação.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Moreira, pelas críticas, sugestões e contribuições na elaboração e desenvolvimento do estudo.

À Sra. Laudicena de Fátima Ribeiro, amiga e competente bibliotecária, pela ajuda imprescindível na busca e obtenção dos artigos científicos, formatação do trabalho e elaboração da ficha catalográfica.

À Sra. Camila Silvestri Dias Ossanai, pela revisão e versão do artigo para a língua inglesa.

Ao Prof. Dr. Nilton Leite Xavier, meu mestre onipresente, pelas lições de vida e da arte médica que me guiaram desde o início da formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Wolff-Dick, pela amizade e suporte. Pessoa ímpar que viabilizou de forma significativa o início de minha vida profissional, com uma generosidade inesquecível. Cirurgião brilhante com quem tive a honra de aprender muito e que me permitiu iniciar como instrutor na formação de outros profissionais.

Ao Prof. Dr. Neiro Waechter da Motta, pelo incentivo à pesquisa científica, pelo rigor e responsabilidade, sendo grande responsável pela minha formação em Cancerologia.

Ao Prof. Dr. Waldomiro Manfroi, digníssimo Diretor da Faculdade de Medicina e professor que perseverou na humanização e harmonia na prática e no ensino médico.

À Prof. Dra. Mariza Kluck, responsável pela minha descoberta da informática e de suas aplicações na Medicina. Inesquecível mentora de meus primeiros trabalhos científicos.

Ao Prof. Dr. Jaques Bacaltchuk, que me oportunizou importantes conquistas profissionais que viabilizaram, inclusive, a realização deste trabalho.

Sumário:

1.	Introdução	13
2.	Revisão da literatura	
2.1.	Câncer de esôfago	15
2.2.	Epidemiologia	17
2.3.	O ciclo celular	19
2.4.	O papel do gene p16 ^{INK4a} , proteína p16 ^{INK4a} no ciclo celular	22
2.5.	A expressão imunoistoquímica da proteína p16 ^{INK4a}	
2.6.	O p16, Esôfago de Barrett e o câncer de esôfago	26
3.	Justificativa	28
4.	Objetivo	29
5.	Metodologia	
5.5.	Pacientes	30
5.2.	Imunoistoquímica	31
5.3.	Ética	34
5.4.	Análise estatística	35
6.	Resultados	
6.1.	Características da amostra	36
6.2.	Aspectos da metodologia	38
6.3.	Análise da p16	40
7.	Discussão	
7.1.	Metodologia	44
7.2.	Resultados	46
8.	Conclusão	49
9.	Perspectivas	50
10.	Referências Bibliográficas	51
	Anexos	
	Anexo A -Artigo Científico em Língua Portuguesa	59
	Anexo B -Artigo Científico em Língua Inglesa	83
	Anexo C - Protocolo Avaliação Imunoistoquímica p16	102
	Anexo D - Protocolo Revisão Prontuários	103

Lista de abreviaturas:

CDK - Quinase ciclina dependente

CDKI - Inibidora de quinase ciclina dependente

CDKN2A - Gene p16

Cip/Kip - Proteína de interação com CDK/ Proteína inibidora da quinase (*Cdk interacting protein/Kinase inhibitory protein*).

c-myc- Oncogene MYC

DNA -Ácido desoxirribonucléico

EB - Esôfago de Barrett

FAMED - Faculdade de Medicina

FIPE - Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos

GCEEID - Grupo de Cirurgia de Esôfago, Estômago e Intestino Delgado

GIST - Tumores Estromais Gastrintestinais

HCPA- Hospital de Clínicas de Porto Alegre

INCA - Instituto Nacional do Câncer

INK - família dos inibidores da quinase ciclina dependente

IRS – Sistema de Escore de Imunorreatividade - *Immunoreactive Scoring*

System

MDM - Gene do Mal de Meleda

MTS1 - Gene Supressor de Tumor 1(*Multiple Tumor Suppressor 1*).

N.S. - Não significativo

PPG - Programa de Pós-graduação

pRb - Fosfoproteína nuclear do gene do retinoblastoma

Rb - Gene do retinoblastoma

SIM - Sistema de informações sobre mortalidade

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Lista de figuras:

Figura 1.	Ciclo celular e pontos de conferência	20
Figura 2.	A p16 e o controle de progressão pelo ciclo celular.	21
Figura 3.	Ausência de expressão imunoistoquímica da p16 (400X).	32
Figura 4.	Expressão imunoistoquímica fraca da p16 (400X).	32
Figura 5.	Expressão imunoistoquímica moderada da p16 (400X).	33
Figura 6.	Expressão imunoistoquímica forte da p16 (400X).	33
Figura 7.	Distribuição, segundo o sexo e a idade, dos pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago.	36
Figura 8.	Distribuição, segundo o escore de expressão imunoistoquímica da p16 e o estadiamento dos tumores, dos pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago.	41
Figura 9.	Distribuição, segundo o escore de expressão imunoistoquímica da p16 e o grau de diferenciação histológica dos tumores, dos pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago.	42

Lista de tabelas:

- Tabela 1.** Características dos pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago. **37**
- Tabela 2.** Avaliação da concordância entre dois patologistas quanto ao percentual de núcleos corados para a p16 em tumores de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago. **38**
- Tabela 3.** Avaliação da concordância entre dois patologistas quanto à intensidade da expressão da p16 nos núcleos em tumores de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago. **38**
- Tabela 4.** Distribuição de frequência do escore de expressão imunohistoquímica da p16 em pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago. **40**
- Tabela 5.** Distribuição da expressão imunohistoquímica da p16 em relação ao sexo, estadiamento, procedimento realizado e grau de diferenciação histológica dos tumores dos pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago. **42**

RESUMO

Introdução: O adenocarcinoma de esôfago apresenta um aumento de frequência nas últimas décadas, particularmente em países desenvolvidos. O esôfago de Barrett é reconhecido como a principal lesão precursora e o estudo da seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma mostra a ocorrência de alterações genéticas desde suas fases mais incipientes. As alterações no p16^{INK4a} são relatadas como freqüentes no esôfago de Barrett e no carcinoma de esôfago. A análise dessas informações pode contribuir para a identificação de indivíduos de maior risco através de fatores prognósticos importantes no seguimento de pacientes.

Objetivo: Verificar a prevalência da expressão imunistoquímica da proteína p16^{INK4a} em peças cirúrgicas e histopatológicas de pacientes com adenocarcinoma de esôfago.

Metodologia: A população do estudo foi constituída de 37 pacientes com adenocarcinoma de esôfago diagnosticados no GCEEID-HCPA entre janeiro de 1998 e dezembro de 2002. A expressão da proteína p16 foi detectada por meio de estudo imunistoquímico, com anticorpo primário p16^{INK4a} Ab-7, clone 16P07, NeoMarkers e avaliada de acordo com o Sistema de Escore de Imunorreatividade (Immunoreactive scoring system - IRS) modificado.

Resultados: No grupo de 37 pacientes estudados, houve predominância de pacientes do sexo masculino (86,5%) e a maioria dos casos correspondia a estádios avançados (Estádios III e IV = 67,5%). Em 12 casos (32,4%) foi identificada expressão imunistoquímica da proteína p16^{INK4a}. Não foi observada relação significativa entre a perda da expressão da proteína p16^{INK4a} e o grau de diferenciação histológica ($p=0,81$) nem com o estadiamento da doença ($p=0,485$.)

Conclusão: Os resultados obtidos no estudo demonstram a perda da expressão imunistoquímica da proteína p16^{INK4a} em 67,6% dos casos, corroborando relatos prévios de que a inativação do gene p16 é um evento freqüente e que pode exercer um papel importante na carcinogênese do adenocarcinoma de esôfago.

Palavras-chave: esôfago, neoplasia de esôfago, adenocarcinoma de esôfago, cancer de esôfago, Barrett, p16, p16^{INK4a}, CDK, carcinogênese, imunistoquímica.

ABSTRACT

Introduction: The esophageal adenocarcinoma shows an increasing frequency in the last decades, specially in the developed countries. The Barrett's esophagus is accepted as the major premalignant lesion and the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence presents a lot of genetic changes since its early events. The alterations in p16^{INK4a} are frequent in the Barrett's esophagus and the esophageal carcinoma. The analysis of those informations can contribute in perspectives to identify higher risk individuals, prognostic factors or follow-up strategies for the patients.

Objective: To verify the prevalence of the immunohistochemical expression of the p16^{INK4a} protein in patients with esophageal adenocarcinoma diagnosed between January 1998 and December 2002 by the Esophageal Surgery Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GCEEID-HCPA.)

Methods: The study population consisted of 37 patients with esophageal adenocarcinoma resected by the GCEEID-HCPA between January 1998 and December 2002. The p16^{INK4a} protein expression was determined by immunohistochemistry using primary antibody p16^{INK4a} Ab-7, clone 16P07 NeoMarkers and assessed according to the immunoreactive scoring system (IRS).

Results: Of 37 analyzed patients, the most were male (86,5%) and the advanced disease was predominant (stages III and IV= 67,5%). In 12 (32,4%) the immunohistochemistry was positive for p16^{INK4a}. There was no significative relation between the protein expression and the degrees of histological differentiation of the biopsies and surgical specimens ($p=0,81$) neither with the staging ($p=0,485$).

Conclusion: The loss of the immunohistochemical expression of the p16^{INK4a} protein in this study is according the published reports that p16 is enrolled in the carcinogenesis of the adenocarcinoma of esophagus.

Key words: esophageal, esophageal neoplasm, esophageal adenocarcinoma, esophageal cancer, Barrett's esophagus, p16, p16^{INK4a}, CDK, CDKN2A, carcinogenesis, immunohistochemistry.

1. Introdução:

Vários estudos analisaram fatores de risco e o mecanismo de progressão das lesões metaplásicas para as displasias e, destas, para o adenocarcinoma(1-6). O risco de desenvolvimento de adenocarcinoma em pacientes com Esôfago de Barrett (EB) é estimado em 1 caso para cada 56 a 250 pacientes-ano de seguimento(7;8.)

Alterações de genes específicos, relacionados a alguns tipos de tumores, evidenciam o importante papel destes genes como potenciais indicadores de prognóstico ou de resposta à terapêutica(9-13).

As alterações do gene p16^{INK4a} (o P16INK4a será referido, no texto, apenas como p16) são objeto de estudo em diversos tumores, como: carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, carcinomas epidermóides de esôfago, adenocarcinomas de pâncreas e tumores estromais gastrointestinais (11;14-17). Estudos em tumores de pâncreas e em tumores estromais gastrointestinais relatam pior prognóstico na vigência de alterações nesse gene(11;15;18).

Existem alguns estudos sobre as alterações no gene p16 em esôfago de Barrett e no carcinoma de esôfago, incluindo o adenocarcinoma, sendo a perda alélica do p16 considerada a alteração gênica inicial na progressão da metaplasia de Barrett e a hipermetilação uma das formas mais frequentes de inativação do gene(8;19-24). No entanto, são poucas as publicações específicas sobre a repercussão dessas alterações genéticas e epigenéticas na expressão da proteína p16 em adenocarcinoma de esôfago(23).

Por isso, a avaliação da expressão da proteína p16INK4a (a proteína p16INK4a será referida, no texto, apenas como proteína p16) em adenocarcinomas de esôfago pretende contribuir para a compreensão dos processos genéticos envolvidos na carcinogênese esofágica, particularmente nos

casos de adenocarcinoma.

2. Revisão da literatura:

2.1 Câncer de esôfago

O câncer de esôfago é uma das neoplasias malignas mais devastadoras do trato gastrointestinal. O diagnóstico tardio, associado ao comportamento biológico agressivo, implica em mau prognóstico para os portadores desta doença(25).

Esta neoplasia se caracteriza por apresentar grande variabilidade em sua incidência, inclusive dentro de uma mesma microrregião, o que demonstra a importância dos fatores ambientais na sua gênese(26-29). No Brasil, ocupa a quarta causa de morte entre todos os tumores malignos. O Rio Grande do Sul apresenta o quinto lugar no mundo em mortalidade por esta doença, sendo considerado área endêmica para este tumor(30;31). Estas características locais foram uma das motivações para a formação, em 1987, do Grupo de Cirurgia de Esôfago, Estômago e Intestino Delgado (GCEEID) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), que se tornou centro de referência nacional para o tratamento deste tipo de tumor.

A incidência do adenocarcinoma de esôfago aumentou de forma significativa nos últimos 30 anos, principalmente nos países desenvolvidos(13;32-34).

As causas para esse aumento ainda não estão estabelecidas, mas acredita-se que a incidência crescente dos casos de refluxo gastro-esofágico, com um maior número de casos de esôfago de Barrett (EB) secundariamente, e sua progressão para o adenocarcinoma, possa ser responsável por uma grande parte deste aumento de prevalência(13;33-39).

Sabe-se que grande parte dos casos de adenocarcinoma de esôfago surge após o epitélio escamoso da mucosa normal sofrer metaplasia para epitélio colunar especializado (metaplasia intestinal ou esôfago de Barrett), o qual pode progredir para

displasia e subsequente malignidade(22;39;40). Menos freqüentemente, os adenocarcinomas de esôfago também podem surgir de células colunares residuais congênitas, epitélio gástrico heterotópico e de glândulas esofágicas submucosas(41).

Muitos fatores de risco estão relacionados na literatura, sendo o refluxo gastroesofágico considerado o mais importante fator para o desenvolvimento do esôfago de Barrett e subsequente adenocarcinoma. Outros fatores de risco são ingestão elevada de carnes vermelhas e gorduras polissaturadas, obesidade, tabagismo e etilismo(33;36-38).

O prognóstico do adenocarcinoma de esôfago ainda é muito pobre, com altos índices de mortalidade(13;36;37). Essa realidade motiva a busca por fatores prognósticos que auxiliem no diagnóstico precoce, no tratamento e no seguimento de pacientes sob risco ou já diagnosticados(8;35;38;42;43).

2.2. Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde estimou, para o ano 2000, o surgimento de 412.327 novos casos de câncer de esôfago no mundo (278.985 no sexo masculino e 133.342 no sexo feminino) e a ocorrência de 337.501 óbitos (226.901 no sexo masculino e 110.600 no sexo feminino). Para a América do Sul, seriam 14.236 novos casos (10.477 no sexo masculino e 3.759 no sexo feminino) e 11.647 óbitos (8.545 no sexo masculino e 3.102 no sexo feminino)(44.)

No Brasil, o Ministério da Saúde estimou, para o ano 2003, 8.895 novos casos (6.775 no sexo masculino e 2.120 no sexo feminino) e 5.595 óbitos por câncer de esôfago (4.320 no sexo masculino e 1.275 no sexo feminino.) Para o Rio Grande do Sul, as estimativas foram de 1.160 novos casos (790 no sexo masculino e 370 no sexo feminino) e 830 óbitos (620 no sexo masculino e 210 no sexo feminino.) Para Porto Alegre, foram estimados 130 novos casos (90 no sexo masculino e 40 no sexo feminino) e 90 óbitos (70 no sexo masculino e 20 no sexo feminino)(45).

As mesmas estimativas atribuem ao Rio Grande do Sul as mais altas taxas brutas de incidência de neoplasia maligna de esôfago no Brasil com 15,4 casos para 100.000 homens e 6,92 casos para cada 100.000 mulheres(45.)

No Rio Grande do Sul, em 2001, foram registrados 863 óbitos por neoplasia maligna de esôfago. Destes, 85 ocorreram em Porto Alegre(46).

Os dados publicados pelo Registro de Câncer de Base Populacional de Porto Alegre mostram que, em 1996, foram 131 novos casos (98 no sexo masculino e 33 no sexo feminino). Deste total, 65 eram carcinomas epidermóides, 15 eram adenocarcinomas e os 51 restantes não tiveram especificação de sua morfologia (neoplasia maligna, carcinoma SOE). Ocorreu uma relação de 0,23 casos de adenocarcinoma para cada caso de carcinoma epidermóide. Em 1997, foram registrados 128 novos casos de câncer de esôfago no município de Porto Alegre (90

no sexo masculino e 38 no sexo feminino.) Nesses 128 casos, a distribuição por tipo histológico foi: 58 carcinomas epidermóides e 10 adenocarcinomas (índice adenocarcinoma / carcinoma epidermóide = 0,17). Em 60 casos (46,87%), não houve a especificação do tipo histológico (carcinoma SOE, neoplasia maligna)(47;48).

O Registro Hospitalar de Câncer do Hospital de Clínicas de Porto Alegre cadastrou, de 1998 a 2001, 302 novos casos de câncer de esôfago. Destes, 249 eram carcinomas epidermóides, 37 adenocarcinomas e 16 não tinham histologia conhecida (índice adenocarcinoma / carcinoma epidermóide = 0,15)(49).

2.3. O ciclo celular

As células eucarióticas possuem elaborados processos para coordenar as transições do ciclo celular e assegurar uma replicação fidedigna do genoma antes da divisão celular. A progressão pelas diferentes fases do ciclo celular é estimulada por complexos proteína-quinases, compostos por uma ciclina e uma quinase ciclina dependente (CDK). As CDKs estão expressas organicamente pelo ciclo celular enquanto os níveis de ciclinas são restritos por regulação transcricional de genes codificadores de ciclinas e pela degradação mediada pela ubiquitina(50).

Os complexos ciclina-D-CDK4, ciclina-D-CDK6, ciclina-E-CDK2 e ciclina-A-CDK2 regulam a progressão da fase G1 para a fase S(51).

A proteína do retinoblastoma (pRb) é um substrato crucial dos complexos ativados ciclina-CDK na fase G1. A pRb é seqüencialmente fosforilada por ciclina-D-CDK4,6 e ciclina-E-CDK2 durante a progressão pela fase G1 e inibe ou ativa a transcrição, dependendo de seu estado de fosforilação e proteínas associadas(20;51;52).

Existem etapas reguladoras no ciclo celular eucariótico chamados pontos de conferência ("*checkpoints*") (**Figura 1**). As células podem parar temporariamente nos pontos de conferência para permitir o reparo de danos celulares. Se o dano é irreparável, as sinalizações no ponto de conferência devem ativar caminhos que levem à morte celular programada (apoptose). A perda da integridade do ponto de conferência pode permitir a propagação de lesões no DNA e resultar em alterações genômicas permanentes(50).

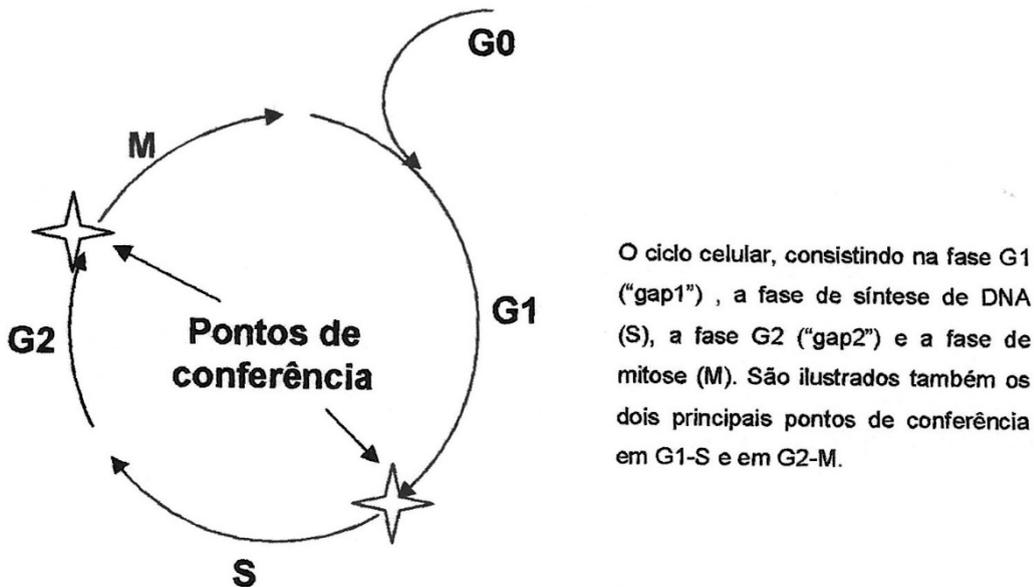


Figura 1. O ciclo celular e os pontos de conferência

As etapas dos pontos de conferência que regulam a progressão pelo ciclo celular estão freqüentemente lesadas em células tumorais, o que reforça o significado das adequadas sinalizações nos pontos de conferência para a manutenção do genoma(22;50; 53).

A inibição da fase G1 pelos complexos ciclina-CDK desempenha um papel fundamental na função do ponto de conferência G1-S. As CDKs são reguladas negativamente por um grupo de proteínas funcionalmente relacionadas chamadas inibidoras de CDK (CKIs) das quais existem duas famílias: as inibidoras INK4 e as inibidoras Cip/Kip. A família INK4 tem quatro membros $p16^{INK4a}$ (p16), $p15^{INK4a}$ (p15), $p18^{INK4a}$ (p18) e $p19^{INK4a}$ (p19); e a família Cip/Kip tem três membros: $p21^{Waf1/Cip1}$ (p21), $p27^{Kip1}$ (p27) e $p57^{Kip2}$ (p57). A família INK4 inibe a atividade da CDK4 e da CDK6 especificamente durante a fase G1, enquanto a família Cip/Kip pode inibir a atividade de CDK durante todas as fases do ciclo celular(53-55).

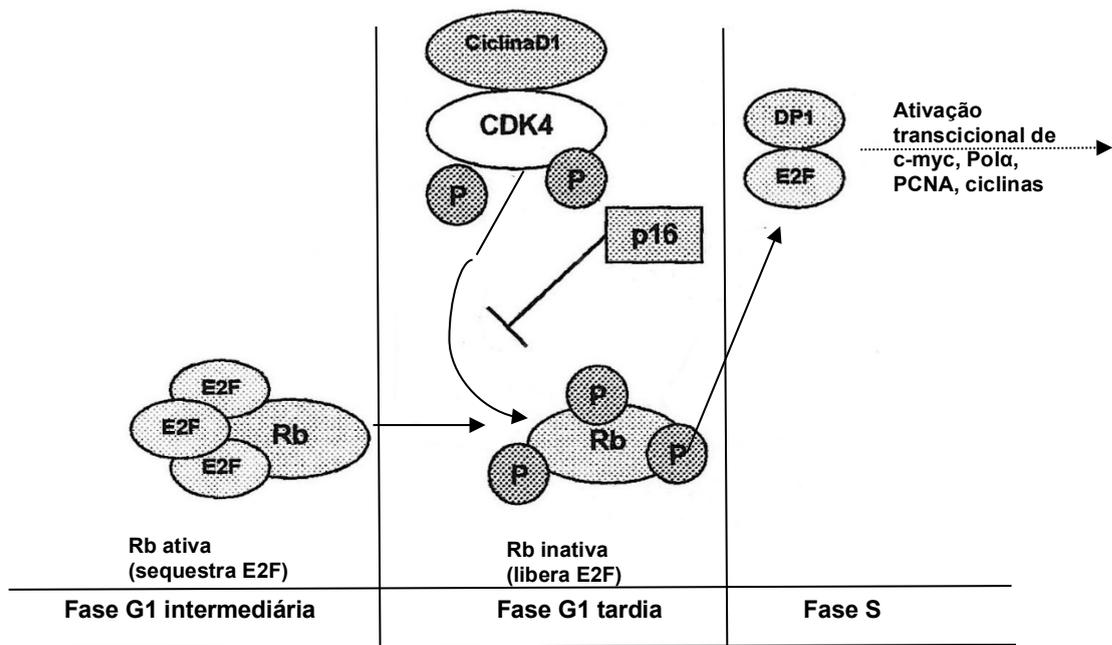


Figura 2. A p16 e o ciclo celular. Controle da progressão pelo ciclo celular. Pol α : DNA polimerase α PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular. (Modificado de Jenkins et al., 2002)

A entrada na fase S do ciclo celular é controlada pela interação de um número de produtos de genes. A proteína do retinoblastoma (Rb) é um supressor de tumor que se liga ao fator de transcrição E2F e evita a progressão no ciclo celular. Quando a célula se aproxima da fase S, a Rb é fosforilada pela quinase ciclina dependente (CDK) 4, em conjunção com a ciclina D1. A Rb fosforilada libera E2F, que subsequente se liga à proteína de dimerização (DP) 1 e age como fator de transcrição iniciando a transcrição de genes chave promotores da transcrição da fase S. A p16 (inibidora da CDK) pode bloquear a fosforilação de Rb e manter o ciclo celular parado; Assim, a perda do produto do gene p16 pode resultar na perda do controle da proliferação celular. A degradação da ciclina D pela proteólise mediada pela ubiquitina regula negativamente o sinal da fase S. A p16 oportuniza, em diversos tipos de células, a parada em G1 independentemente do p53 em resposta ao dano no DNA através da abolição da fosforilação da pRb mediada pelas ciclina-D-CDK4 e ciclina-D-CDK6(52) (Figura 2).

2.4. O papel do gene p16^{INK4a}, proteína p16^{INK4a} no ciclo celular

O gene p16 (Gene inibidor da quinase ciclina-dependente 4) codifica uma proteína de 16-kD. Ela forma complexos com as quinases ciclina-dependentes CDK4 e CDK6, inibindo sua habilidade de fosforilar a proteína do retinoblastoma. A proteína não fosforilada do retinoblastoma impede que a célula entre na fase S do ciclo celular. Então, a inativação do gene p16 pode levar a um crescimento celular descontrolado. O gene p16 está localizado no braço curto do cromossomo 9 em 9p21, um local em que perdas alélicas ocorrem frequentemente nos adenocarcinomas de esôfago (8; 19-22;24).

A compreensão da função do p16 é complicada pela observação de que o *locus* INK4a/ARF tem um papel importante nos processos do p53 e pRb. O *locus* INK4a/ARF está localizado no cromossomo 9p21 uma região que sustenta perdas alélicas em muitos tumores humanos. Deleções hoozigóticas do INK4a ocorrem predominantemente em carcinomas de bexiga, gliomas, leucemias linfoblásticas agudas de células T, melanomas e carcinomas de células renais. Esse *locus* está relacionado a duas proteínas distintas, a p16^{INK4a} e a p14^{ARF}. A proteína p16^{INK4a} é um componente chave no processo do pRb, enquanto a p14^{ARF} exerce seu papel principal no processo do p53. A p14^{ARF} age por ligação específica à MDM2, resultando em estabilização da p53 e MDM2. A parada do crescimento induzida pela p14^{ARF} é, então, dependente da p53(56).

O p16 é um gene supressor de tumor sendo referido, também, como CDKN2A, gene MTS-1 (*multiple tumor suppressor-1*)(51;57;58).

A inativação de genes supressores de tumores assim como a amplificação/superexpressão de proto-oncogenes é relatada na carcinogênese esofágica(39;40;59). A maior parte dos genes supressores de tumores está relacionada às ciclinas, às CDKs, aos inibidores da CDK e ao gene de suscetibilidade

ao retinoblastoma RB1, participando no controle do ciclo celular na progressão da fase

G à fase S1(50).

2.5. A expressão imunohistoquímica da proteína p16

Diversos estudos utilizando a comparação da expressão imunohistoquímica da proteína p16 e o seqüenciamento molecular demonstraram que o estudo imunohistoquímico evidenciou todas as deleções homozigóticas do gene p16, assim como houve correlação entre as alterações no gene p16 e a perda de expressão da proteína p16 na análise imunohistoquímica(10;23;60;61).

Bian *et al.*(23) observaram que a hipermetilação da região promotora do gene p16 é um evento muito comum no adenocarcinoma de esôfago, com perda da expressão imunohistoquímica da proteína p16 em 86% dos casos. No entanto, não encontraram relação com a perda de heterozigidade do locus do gene p16.

No adenocarcinoma de pulmão, Awaya *et al.*(62) encontraram a expressão da proteína p16 em 31,3% dos casos. Não foi observada correlação significativa entre a perda da expressão imunohistoquímica com a hipermetilação ou a perda de heterozigidade do gene. Em outro estudo, Belinski *et al.*(63) publicaram estudo em que encontraram correlação entre a perda da expressão da proteína p16 e a metilação do gene em carcinomas epidermóides de pulmão e lesões precursoras.

Takahira *et al.*(64) observaram a expressão imunohistoquímica da proteína p16 em 64,3% dos sarcomas de células claras, sem correlação significativa entre as alterações do gene e a perda da expressão da proteína.

Nishimine *et al.*(65) encontraram uma correlação significativa entre alterações no gene p16 e a perda da expressão imunohistoquímica da proteína p16 em carcinomas de glândulas salivares($p=0.003$).

Em estudo publicado por Qin *et al.*(66) foi relatada expressão imunistoquímica diminuída em carcinomas hepatocelulares e correlação significativa tanto com a hipermetilação quanto com tumores pouco diferenciados.

Trabalho de Nielsen *et al.*(67) mostrou correlação entre a perda da expressão da proteína p16 e deleções do p16, em osteossarcomas.

Vários estudos avaliaram a significância clínico-patológica da expressão de p16 em diferentes tumores(11;14-17). Yuen *et al.*(14) estudaram a expressão de p16 e carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e encontraram uma expressão fraca de p16INK4a de quinze por cento em tumores de cavidade oral, vinte e cinco por cento em tumores de faringe e sessenta e três por cento em tumores de laringe. Não houve diferença significativa em relação à sobrevida dos pacientes e a expressão fraca foi mais observada em estádios mais avançados.

Schneider-Stock *et al.*(15) realizaram um estudo sobre as alterações genéticas e a expressão imunistoquímica da proteína p16 em Tumores Estremaes Gastrintestinais (GIST) e encontraram correlação entre as alterações genéticas (metilação, mutação e perda da heterozigosidade) e a expressão ausente ou diminuída da proteína. Além disso, observaram que os pacientes com alterações no p16 apresentaram pior prognóstico, com sobrevida em cinco anos de nove por cento no grupo com alterações e de setenta e cinco por cento no grupo sem alterações no p16.

Gerdes *et al.*(11) encontraram uma importante relação entre as alterações no p16^{INK4a} e o prognóstico de pacientes submetidos à ressecção de adenocarcinoma ductal pancreático. Biankin *et al.*(16) sugerem que a perda da expressão da p16 possa estar relacionada à malignidade em tumores de pâncreas.

2.6. O p16, Esôfago de Barrett e o cancer de esôfago

As perdas alélicas do p16 foram demonstradas em setenta e cinco por cento dos epitélios metaplásicos e precedem a aneuploidia(68). As perdas alélicas em epitélios e displásicos são mais prevalentes do que as perdas alélicas do p53 e são detectadas em todo o tecido metaplásico(69).

Wong *et al.*(70) verificaram que as lesões do p16 são as anormalidades genéticas/epigenéticas somáticas mais precoces no EB, ocorrendo em mais de oitenta e cinco por cento dos casos em todos os graus de displasia.

A perda da expressão da p16 representaria a alteração genética inicial na progressão da metaplasia de Barrett(22).

Sturm *et al.*(17) encontraram um pior prognóstico em pacientes portadores de carcinoma escamoso de esôfago no grupo que perdeu a expressão imunohistoquímica da proteína p16.

Eads *et al.*(40) analisaram oitenta e quatro amostras de tecido, em diferentes estádios de esôfago de Barrett e/ou adenocarcinoma de esôfago associado, em um painel de vinte genes e encontraram padrões distintos de metilação em diferentes tipos de tecidos. O p16 esteve entre os genes mais informativos, com 15% de hipermetilação nas amostras. A frequência de hipermetilação do p16 aumentou significativamente nos estádios mais avançados da doença: 0% no esôfago normal, 20% na metaplasia intestinal, 22% na displasia e 41% do casos de adenocarcinoma de esôfago.

Bian *et al.*(23) avaliaram 22 peças operatórias de esofagectomia por adenocarcinoma em esôfago de Barrett. Lesões pré-malignas concorrentes foram encontradas em 12 casos: metaplasia intestinal (12 casos), displasia de baixo grau (12 casos) e dysplasia de alto grau (11 casos). Além dessas, foram analisados,

ainda dez amostras de epitélio normal. A hipermetilação do p16 foi observada em 82% dos casos de adenocarcinoma de esôfago, em 30% das lesões pré-malignas e em nenhuma amostra de tecido esofágico normal. Houve ausência de expressão imunohistoquímica de p16 em 19 dos 22 casos (86%), com correlação significativa entre a perda da expressão da p16 e a hipermetilação ($p < 0.00001$).

3. Justificativa:

Os indicadores epidemiológicos mostram que o câncer de esôfago persiste com altos índices de mortalidade a despeito das evoluções em técnicas diagnósticas, cirúrgicas, quimio e radioterápicas(13;32;36;37). O adenocarcinoma de esôfago apresenta um crescimento em incidência, particularmente quando comparado ao carcinoma epidermóide de esôfago(13;32-34).

O progresso da biologia molecular está permitindo elucidar processos genéticos da carcinogênese, bem como a identificação de determinados genes como auxiliares no diagnóstico precoce ou como potenciais marcadores de prognóstico(8;35;38;42;43).

Diversos estudos avaliam o potencial prognóstico das alterações do gene p16 em diferentes tumores. Sabe-se que as alterações do p16 são encontradas em fases iniciais do Esôfago de Barrett(22;70). Apesar disto, são poucos os estudos específicos sobre a prevalência da expressão imunohistoquímica da proteína p16 no adenocarcinoma de esôfago(23).

O estudo da prevalência da expressão imunohistoquímica da proteína p16 no adenocarcinoma de esôfago pode contribuir, em parte, para a compreensão dos processos genéticos envolvidos na carcinogênese esofágica, especialmente no adenocarcinoma de esôfago.

4. Objetivo:

Verificar a prevalência da expressão imunoistoquímica da proteína p16 em amostras de exames anatomopatológicos de pacientes com adenocarcinoma de esôfago.

5. Metodologia:

5.1. Pacientes:

A população estudada foi obtida pela revisão dos prontuários dos pacientes do GCEEID-HCPA com adenocarcinoma de esôfago atendidos entre 01 de janeiro de 1998 e 31 de dezembro de 2002. Para tal verificação, foram localizados os registros dos atendimentos, e consultados os prontuários junto aos arquivos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com a utilização de um formulário (protocolo) para o registro das informações necessárias.

Critério de inclusão: Pacientes com diagnóstico anatomo-patológico de adenocarcinoma de esôfago realizado no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre janeiro de 1998 e dezembro de 2002.

Critérios de exclusão: História ou presença de outra neoplasia maligna concomitante; Tratamento neoadjuvante (quimioterapia ou radioterapia); Ausência de blocos de parafina para a confecção de lâminas para o estudo.

5.1. Imunoistoquímica:

Cortes representativos do tumor, oriundos de blocos de parafina com material de biópsia ou peça cirúrgica, foram submetidos à técnica imunoistoquímica utilizada na rotina do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A técnica consistiu em desparafinização e reidratação, recuperação antigênica, inativação da peroxidase endógena e bloqueio das reações inespecíficas. O anticorpo primário, p16^{INK4a} clone 16P07 NeoMarkers, foi incubado por 12 horas, a 4°C, na diluição de 1:75, seguido da aplicação do complex estrepavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) e revelação com diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako). A reação apresentou como controle positivo a neoplasia intraepitelial cervical positiva para p16, sendo o controle negativo realizado sem a utilização do anticorpo primário.

A avaliação da p16 foi realizada de acordo com o Sistema de Escore de Imunorreatividade (Immunoreactive scoring system - IRS)(71), modificado, sendo considerada como positiva apenas a coloração nuclear.

Dois padrões de coloração foram utilizados: positivo: quando pelo menos 10% dos núcleos foram positivos, em padrão focal ou difuso pelo tecido, e negativo, quando nenhuma ou poucas células (<10%) mostraram coloração nuclear.

A intensidade da coloração foi classificada graduando-se de 0 a 3, onde: 0 = negativa, 1 = fraca, 2 = moderada e 3 = forte.

Nas figuras a seguir podem ser observados exemplos de colorações nas várias intensidades, para melhor ilustrar o método (**Figuras 3 a 6**).

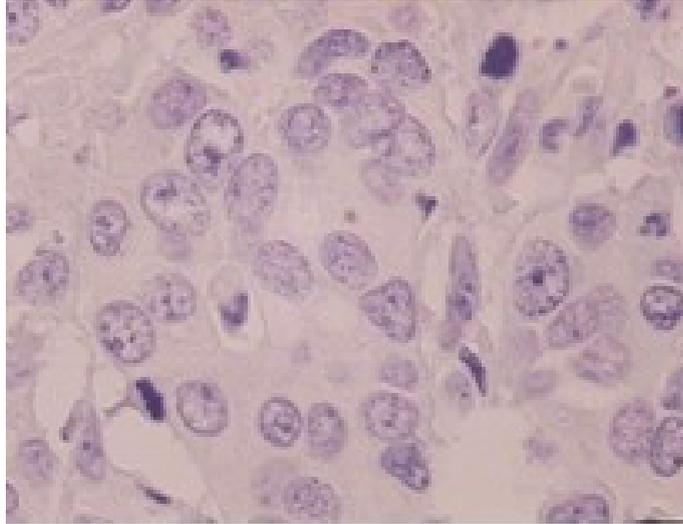


Figura 3. Expressão imunoistoquímica negativa da p16 no adenocarcinoma de esôfago (400X)

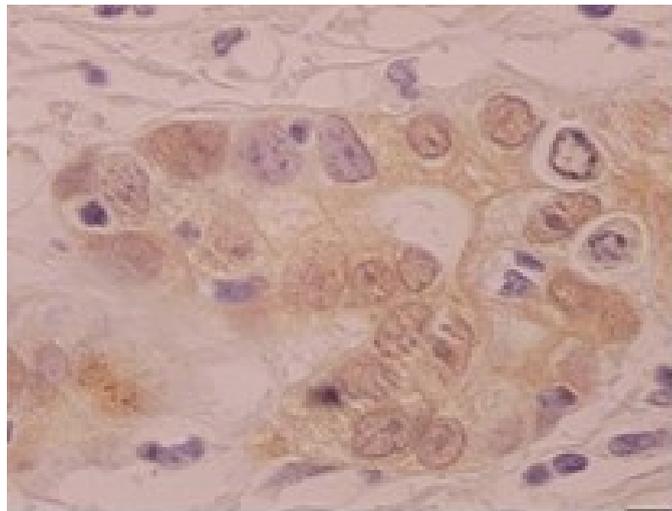


Figura 4. Expressão imunoistoquímica nuclear fraca da p16 no adenocarcinoma de esôfago (400X)

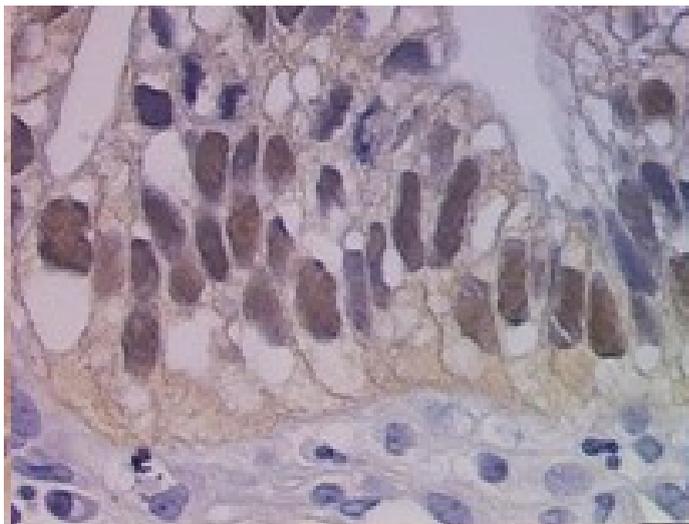


Figura 5. Expressão imunoistoquímica moderada da p16 no adenocarcinoma de esôfago (400X)

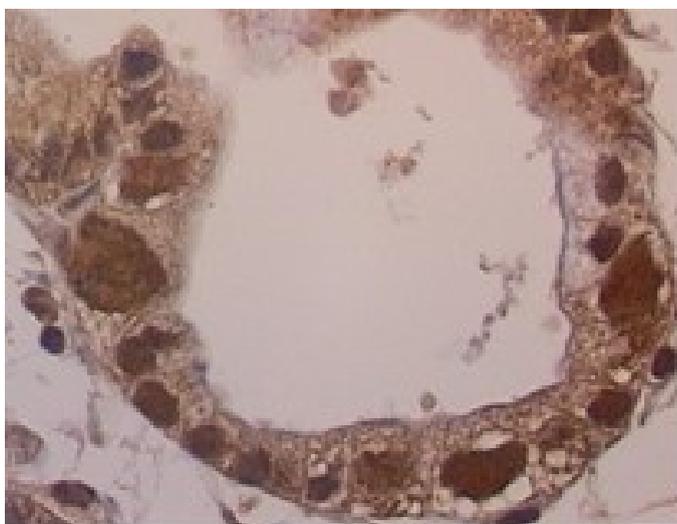


Figura 6. Expressão imunoistoquímica forte da p16 no adenocarcinoma de esôfago (400X)

O escore final da expressão da p16 foi obtido multiplicando-se as duas pontuações.

A leitura das lâminas foi realizada por dois patologistas (LM e MIE), de forma independente e sem o conhecimento dos dados clínico-patológicos. O resultado final foi obtido por revisões de consenso discutidas entre os dois patologistas.

5.2. Ética:

Todo o material biológico estudado provém de pacientes do GCEEID-HCPA. Os blocos de parafina com material de biópsia e peças cirúrgicas foram obtidos no Serviço de Patologia do HCPA, no período em análise. As Resoluções Normativas 01/97 e 02/97 da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde foram respeitadas pois: a obtenção deste material não ocasionou alterações na rotina de exame ou procedimento clínico; as amostras foram mantidas anônimas; a privacidade dos dados coletados foi garantida pela utilização do Termo de Compromisso para Utilização de Dados (os pesquisadores do presente projeto se comprometeram a preservar a privacidade dos pacientes, cujas informações foram coletadas em prontuários e bases de dados do HCPA. Concordaram, igualmente, que essas informações fossem utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente serão divulgadas de forma anônima). Os dados e o material biológico foram utilizados exclusivamente para a finalidade prevista no projeto.

O presente estudo foi submetido à análise do Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, para avaliação quanto às demais normas regulamentares e diretrizes éticas, com aprovação para execução, sob protocolo número 03-183.

5.3. Análise estatística:

Os dados quantitativos foram descritos por média e desvio padrão, e os categóricos por frequência (número absoluto) e percentual.

As observações realizadas pelos dois patologistas responsáveis pela avaliação da intensidade da coloração e expressão da p16 tiveram sua concordância estimada por medida de concordância Kappa.

A distribuição da p16 entre os grupos de diferenciação histológica e entre os estádios da doença foi comparada pelo método do qui-quadrado.

Os dados foram processados e analisados com auxílio do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 13.0.

6. Resultados:

6.1 Características da amostra:

Foram revisados 63 prontuários de pacientes que preenchiam os critérios de inclusão e que não tinham história ou presença de outra neoplasia maligna concomitante ou tratamento neoadjuvante (quimioterapia e/ou radioterapia antes do procedimento cirúrgico). Destes, foram incluídos no estudo apenas aqueles que apresentavam blocos de parafina com biópsias ou peças cirúrgicas, para estudo no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, formando uma população de 37 pacientes.

A média de idade foi de 61,9 anos (desvio padrão $\pm 8,6$ anos).

Trinta e dois pacientes eram do sexo masculino (86,5%), com uma média de idade de 61,2 anos (desvio padrão $\pm 1,6$ anos) e cinco eram do sexo feminino (13,5%), com uma média de idade de 66 anos (desvio padrão $\pm 1,1$ anos) (**Figura 7**).

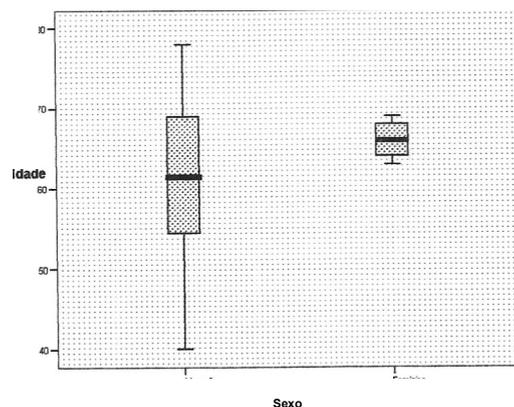


Figura 7: Distribuição, segundo o sexo e idade, dos pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago no GCEEID-HCPA em um período de cinco anos (1998-2002) n=37

A maior parte dos pacientes (67,5%) apresentava doença em estádios III e IV. Em 4 casos (10,8%) não foi localizada anotação referente ao estadiamento. Os procedimentos cirúrgicos com intenção curativa (gastrectomia total e esofagogastrectomia transiatal) foram realizados em 54% dos casos. Os demais foram submetidos à cirurgia paliativa ou não receberam tratamento cirúrgico. Quanto ao grau de diferenciação do tumor, cinco casos eram de tumores bem diferenciados (13,5%), vinte e um eram moderadamente diferenciados (56,8%) e dez casos se referiam a tumores indiferenciados (27%) (**Tabela 1**).

Tabela 1: Características dos pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago no GCEEID- HCPA em um período de cinco anos (1998-2002). n=37

Característica		Medida síntese
Idade, anos		61,9 ±8,6
Sexo	Masculino (%)	32 (86,5%)
	Feminino (%)	5 (13,5%)
Estádio	I	4 (10,8%)
	II	4 (10,8%)
	III	13 (35,1%)
	IV	12 (32,4%)
	não informado	4 (10,8%)
Procedimento	Gastrectomia total	11 (29,7%)
	Cirurgia paliativa	11 (29,7%)
	Ressecção transiatal	9 (24,3%)
	Biópsia	6 (16,2%)
Grau histológico	Bem diferenciado	5 (13,5%)
	Moderadamente diferenciado	21 (56,8%)
	Indiferenciado	10 (27%)
	Não informado	1 (2,7%)

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão ou número (percentual)

6.2. Aspectos da metodologia:

Na análise imunoistoquímica da p16, houve uma boa concordância entre os observadores em relação à avaliação do percentual de núcleos corados (Kappa=0,628) (**Tabela 2**).

Tabela 2: Avaliação da concordância entre dois patologistas quanto ao percentual de núcleos corados para o p16 em tumores de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago no GCEEID-HCPA em um período de cinco anos (1998-2002). n=37

		Observador 1			Total
		%	0	1 a 9	
Observador 2	0	12	6	0	18
	1 a 9	2	4	0	6
	≥ 10	0	1	12	13
	Total	14	11	12	37

Medida de concordância Kappa = 0,628

Em relação à avaliação da intensidade da expressão da p16 nos núcleos, a concordância foi razoável (Kappa=0,392) (**Tabela 3**).

Tabela 3: Avaliação da concordância entre dois patologistas quanto à intensidade da expressão da p16 nos núcleos em tumores de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago no GCEEID-HCPA em um período de cinco anos (1998-2002). n=37

		Observador 1				Total
		Intensidade	0	1	2	
Observador 2	0	12	4	2	0	18
	1	1	4	3	0	8
	2	0	0	4	6	10
	3	0	0	0	1	1
	Total	13	8	9	7	37

Medida de concordância Kappa= 0,392

Nos casos em que houve discordância entre os observadores, as lâminas foram revisadas pelos dois patologistas até que um consenso fosse estabelecido.

Para as análises finais, somente os resultados consensuais foram considerados.

6.3. Análise da p16:

A expressão imunistoquímica da p16 foi observada em apenas 32,4% dos casos analisados.

Em seis casos (16,2%), houve expressão forte (escore 3); em três casos (8,1%) a expressão foi moderada e em outros três casos (8,1%) se verificou uma expressão fraca da p16. Em vinte e cinco casos (67,6%), houve a perda da expressão imunistoquímica da p16 (**Tabela 4**).

Tabela 4: Distribuição de freqüência do escore de expressão imunistoquímica da p16 em pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago no GCEEID-HCPA em um período de cinco anos (1998-2002). n=37

Escore	f	%
0	25	67,6
1	3	8,1
2	3	8,1
3	6	16,2
Total	37	100

Em relação ao sexo, houve expressão da proteína em dez dos 32 pacientes do sexo masculino (31,2%) e em duas de cinco pacientes do sexo feminino (40%) (p=N.S.).

Quanto ao estadiamento, a distribuição da expressão da proteína foi de 50% no Estádio I (expressão em dois entre quatro pacientes), 50% no Estádio II (expressão em dois entre quatro pacientes), 23% no Estádio III (expressão em três entre treze pacientes) e 41,7% no Estádio IV (expressão em cinco entre doze pacientes). Não houve expressão da proteína nos quatro pacientes sem informação de estadiamento. A

análise estatística não mostrou relação significativa entre o estadiamento e a expressão da proteína ($p=0,485$) (**Figura 8**).

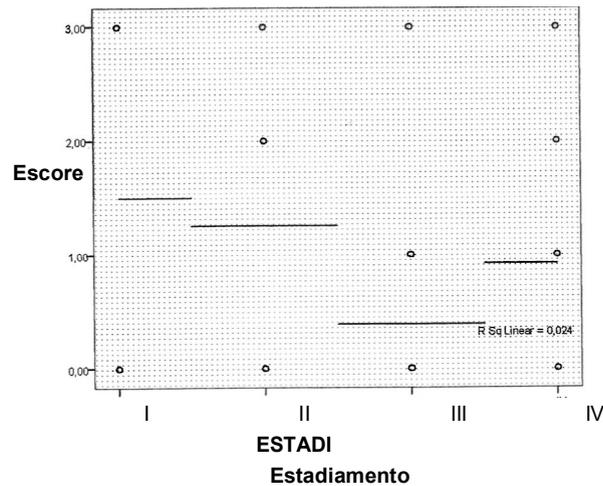


Figura 8: Distribuição, segundo o escore de expressão imunohistoquímica da p16 e o estadiamento dos tumores dos pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago no GCEEID-HCPA em um período de cinco anos (1998- 2002). $n=37$. $p=0,485$.

A distribuição da expressão da proteína p16 entre as diferentes abordagens cirúrgicas foi a seguinte: no grupo submetido a gastrectomia total, houve expressão em três de onze pacientes (27,3%); no grupo submetido a cirurgia paliativa, a expressão foi identificada em quatro de onze pacientes (36,4%); dos submetidos a ressecção transiatal, quatro dos nove pacientes (44,4%) expressaram a proteína e no grupo dos pacientes submetidos apenas à biópsia, houve expressão da proteína em um de seis pacientes (16,7%) ($p=N.S.$) (**Tabela 5**).

Tabela 5: Distribuição da expressão imunistoquímica da p16 em relação ao sexo, estadiamento, procedimento realizado e grau de diferenciação histológica dos tumores dos pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago no GCEEID-HCPA em um período de cinco anos (1998-2002). n=37

Expressão p16	12/37 (32,4%)
Sexo	
Masculino	10/32 (31,2%)
Feminino	2/5 (40%)
Estádio	
I	2/4 (50%)
II	2/4 (50%)
III	3/13 (23%)
IV	5/12 (41,7%)
Não informado	0/4 (0%)
Procedimento realizado	
Gastrectomia total	3/11 (27,3%)
Cirurgia Paliativa	4/11 (36,4%)
Ressecção transiatal	4/9 (44,4%)
Biópsia	1/6 (16,7%)
Grau de diferenciação histológica	
Bem diferenciado	2/5 (40%)
Moderadamente diferenciado	7/21 (33,1%)
Indiferenciado	3/10 (30%)
Não informado	0/1 (0%)

Os dados são apresentados como número com expressão / número total (percentual)

Também não foi observada relação estatisticamente significativa entre a expressão imunohistoquímica da p16 e o grau de diferenciação histológica do tumor, quando analisada em relação ao escore de imunorreatividade ($p=0,81$) (**Figura 9**).

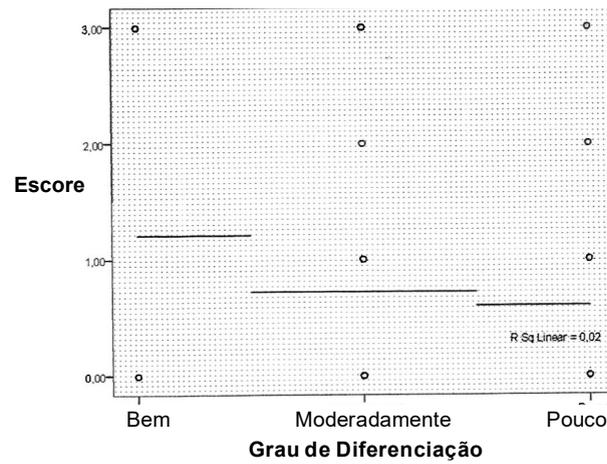


Figura 9: Distribuição, segundo o escore de expressão imunohistoquímica da p16 e o grau de diferenciação histológica dos tumores dos pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago no GCEEID-HCPA em um período de cinco anos (1998-2002), $n=37$, $p=0,81$

7. Discussão:

7.1. Metodologia:

Os critérios para a inclusão e exclusão dos casos no presente estudo foram rigorosamente analisados, visando preservar a representatividade da casuística do GCEEID-HCPA e a compatibilidade das amostras com a técnica utilizada. Isso permitiu, por exemplo, a inclusão do material obtido em biópsias, além das peças operatórias de ressecções realizadas. A maior parte dos casos de adenocarcinoma de esôfago foram diagnosticados em estádios avançados, sem possibilidade de ressecção cirúrgica curativa.

Optou-se pela exclusão dos casos submetidos a tratamento neoadjuvante ou com história ou presença de outra neoplasia maligna concomitante pois essas situações podem modificar a expressão da proteína e a integridade do gene p16(19;72).

Diversos estudos mostram que a análise da expressão imunoistoquímica da proteína p16 apresenta uma boa correlação com os demais métodos de análise das alterações do gene p16, como o sequenciamento molecular pela reação em cadeia da polimerase (PCR)(10;23;60;62;63;65;73;74). Essa fundamentação científica justificou a utilização de um método de menor custo com uma análise adequada para o objetivo proposto.

Foi localizado um único trabalho publicado com uma descrição clara da metodologia utilizada na análise imunoistoquímica da p16 no adenocarcinoma de esôfago(23). No estudo referido, foram considerados negativos os casos em que menos de dez por cento das células mostravam coloração nuclear. O presente estudo utilizou o mesmo critério, mas acrescentou a análise da intensidade da expressão, através do escore de imunorreatividade modificado, visando maiores detalhes sobre a expressão da proteína.

A avaliação da expressão da p16 através da técnica imunoistoquímica mostrou uma concordância entre boa a razoável dos observadores, quanto aos critérios de positividade (coloração nuclear) – Kappa = 0,628 - e quanto aos critérios de

intensidade da expressão – Kappa = 0,392. Essa concordância pode ser consequência da grande experiência adquirida pelos patologistas nos diversos estudos já realizados com a casuística do GCEEID(27;43;75-77).

7.2. Resultados:

Alterações no gene p16 foram estudadas em diversas lesões pré-malignas(21;40;70;72;78;79) e inúmeros tumores(19;80), como os de cólon e reto(60), pâncreas(11), colo uterino(74), glândulas salivares(65), cabeça e pescoço(10;14), mesoteliomas(81), osteossarcomas(67), gliomas(82) bexiga(58), tumores estomacais gastrointestinais(15), ovário(83), pulmão(62;63;74), estômago(84) e esôfago(17;23;40;59;70;73;85).

Inúmeras alterações já foram descritas no gene p16, sendo as mais freqüentes a hipermetilação e as deleções(10;23;40;59;60;62;63;65;70;73;74;81;84). Essas alterações são, com freqüência, associadas à perda da expressão imunohistoquímica da proteína p16(10;59;60;62;63;65;74).

Os processos moleculares que acompanham a progressão do esôfago de Barrett para o adenocarcinoma motivaram diversos estudos, considerando o EB como a principal lesão precursora do adenocarcinoma de esôfago(21-23;40;70). Dentre as causas do EB, merece destaque o refluxo gastroesofágico, doença com prevalência em ascensão(32). Gurski *et al.*(38), em 2003, mostraram que a cirurgia antirrefluxo proporcionou reversão de lesões metaplásicas e displásicas de esôfago de Barrett para formas mais benignas em um número significativo de pacientes.

As alterações do p16 na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma mostraram, em alguns estudos(23;40;70), correlação entre o grau de alteração histológica e a prevalência da expressão imunohistoquímica da proteína p16. Em

nosso estudo, não foi observada relação significativa ($p=0,81$), mas pareceu haver uma tendência de perda da intensidade da expressão com a perda da diferenciação histológica. É possível que uma casuística maior possa elucidar essa relação no adenocarcinoma de esôfago.

Uma outra observação que merece registro foi a tendência de diminuição proporcional do escore de imunorreatividade nos estádios I, II e III (progressão local e regional). Nos casos em estágio IV (metástases à distância}, não houve essa proporcionalidade, sugerindo que outros processos genéticos possam desempenhar um papel mais importante no processo de metastatização, como os envolvidos na adesividade celular e angiogênese, por exemplo. Estudos com um maior número de casos e incluindo a análise de outros genes podem evidenciar a relação entre o estadiamento e os processos genéticos envolvidos.

Papadimitrakopoulou *et al.*(72), em 2001, estudou a expressão da p16 em lesões pré-malignas do trato aerodigestivo superior, submetidas à quimioprofilaxia e não encontrou correlação significativa da perda da expressão com a progressão histológica para câncer. No entanto, não foram localizados estudos avaliando essa resposta no esôfago de Barrett, quando tratado. Estudos incluindo casos de EB tratados podem esclarecer como se comporta a expressão da proteína p16 nesses casos tratados, incluindo os diversos graus de resposta. .

No adenocarcinoma de esôfago, os poucos estudos localizados na literatura nacional e internacional e que avaliaram o p16 mostraram alta prevalência de alterações nesse gene (41% de alterações genéticas)(40) e uma perda significativa da expressão da proteína p16 (perda da expressão em 86% dos casos)(23). Nosso estudo encontrou perda da expressão imunistoquímica da p16 em 67,6% dos casos e uma expressão fraca em 8,1%. Apenas 24,3% dos casos mostraram expressão moderada a forte.

Estes achados corroboram relatos anteriores, que relacionam a perda da expressão da p16 com a carcinogênese esofágica, incluindo o adenocarcinoma. Novos estudos avaliando pacientes em todas as fases da seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma devem ser realizados, objetivando definir o papel prognóstico deste possível marcador nestes grupos de pacientes

8. Conclusão:

Os resultados do presente estudo demonstraram uma baixa prevalência (32,4%) da expressão imunohistoquímica da proteína p16 nos casos analisados, indicando um importante papel do gene p16 no processo de carcinogênese do adenocarcinoma esofágico.

9. Perspectivas:

Devido ao papel já definido das alterações do p16 no Esôfago de Barrett, associado aos achados do presente estudo, abre-se, a partir de agora, a perspectiva de realização de uma coorte de pacientes com Esôfago de Barrett que possam ser acompanhados prospectivamente com avaliação da perda da expressão deste gene no processo evolutivo da seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma do esôfago.

A continuidade desta linha de pesquisa poderá, inclusive, contemplar outras avaliações e informações sobre as lacunas de conhecimento identificadas.

10. Referências Bibliográficas

- (1) Rudolph RE, Vaughan TL, Storer B. Segment Length and Risk for Neoplastic Progression in Patients with Barrett Esophagus. *Ann Intern Med* 2000 Nov 7;133(9):748.
- (2) Hardy RG, Meltzer SJ, Jankowski JA. ABC of colorectal cancer. Molecular basis for risk factors. *BMJ* 2000 Oct 7;321(7265):886-9.
- (3) Shaheen N, Ransohoff DF. Gastroesophageal reflux, barrett esophagus, and esophageal cancer: scientific review. *JAMA* 2002 Apr 17;287(15):1972-81.
- (4) Katada N, Hinder RA, Smyrk TC, Hirabayashi N, Perdakis G, Lund RJ, et ai. Apoptosis is inhibited early in the dysplasia-carcinoma sequence of Barrett esophagus. *Arch Surg* 1997 Jul;132(7):728-33.
- (5) Sabei MS, Pastore K, Toon H, Smith JL. Adenocarcinoma of the esophagus with and without Barrett mucosa. *Arch Surg* 2000 Jul;135(7):831-5.
- (6) Jankowski JA, Perry 1, Harrison RF. Gastro-oesophageal cancer: death at the junction. *BMJ* 2000 Aug 19;321(7259):463-4.
- (7) Inadomi JM, Sampliner R, Lagergren J, Lieberman D, Fendrick AM, Vakil N. Screening and surveillance for Barrett's esophagus in high-risk groups: a cost- utility analysis. *Ann Intern Med* 2003 Feb 4;138(3):176-86.
- (8) Krishnadath KK, Reid BJ, Wang KK. Biomarkers in Barrett esophagus. *Mayo Clin Proc* 2001 Apr;76(4):438-46.
- (9) Ishii H, Dumon KR, Vecchione A, Fong LY, Baffa R, Huebner K, et ai. Potential cancer therapy with the fragile histidine triad gene.: review of the preclinical studies. *JAMA* 2001 Nov 21;286(19):2441-9.
- (10) Geisler SA, Olshan AF, Weissler MC, Cai J, Funkhouser WK, Smith J, et ai. p16 and p53 Protein expression as prognostic indicators of survival and disease recurrence from head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2002 Nov;8(11):3445- 53.
- (11) Gerdes B, Ramaswamy A, Ziegler A, Lang SA, Kersting M, Baumann R, et ai. p16INK4a is a prognostic marker in resected ductal pancreatic cancer: an analysis of p16INK4a, p53, MDM2, an Rb. *Ann Surg* 2002 Jan;235(1):51-9.
- (12) Kamoshida S, Matsuoka H, Shiogama K, Matsuyama A, Shimomura R, Inada K, et ai. Immunohistochemical analysis of thymidylate synthase, p16(INK4a), cyclin-dependent kinase 4 and cyclin D1 in colorectal cancers receiving preoperative chemotherapy: significance of p16(INK4a)-mediated cellular arrest as an indicator of chemosensitivity to 5-fluorouracil. *Pathol Int* 2004 Aug;54(8):564-75.

- (13) Tytgat GN, Bartelink H, Bemards R, Giaccone G, van Lanschot JJ, Offerhaus GJ, et al. Cancer of the esophagus and gastric cardia: recent advances. *Ois Esophagus* 2004;17(1):10-26.
- (14) Yuen PW, Man M, Lam KY, Kwong YL. Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol* 2002 Jan;55(1):58-60.
- (15) Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, Miettinen M, Peters B, Pross M, et al. High prognostic value of p16INK4 alterations in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2003 May 1;21(9):1688-97.
- (16) Biankin AV, Biankin SA., Kench JG, Morey AL, Lee CS, Head DR, et al. Aberrant p16(INK4A) and DPC4/Smad4 expression in intraductal papillary mucinous tumours of the pancreas is associated with invasive ductal adenocarcinoma. *Gut* 2002 Jun;50(6):861-8.
- (17) Sturm I, Petrowsky H, Volz R, Lorenz M, Radetzki S, Hillebrand T, et al. Analysis of p53/BAX/p16(ink4a/CDKN2) in esophageal squamous cell carcinoma: high BAX and p16(ink4a/CDKN2) identifies patients with good prognosis. *J Clin Oncol* 2001 Apr 15;19(8):2272-81.
- (18) Brabender J, Marjoram P, Salonga D, Metzger R, Schneider PM, Park JM, et al. A multigene expression panel for the molecular diagnosis of Barrett's esophagus and Barrett's adenocarcinoma of the esophagus. *Oncogene* 2004 Jun 10;23(27):4780-8.
- (19) Kubo A, Nakagawa K, Varma RK, Conrad NK, Cheng JQ, Lee WC, et al. The p16 status of tumor cell lines identifies small molecule inhibitors specific for cyclin-dependent kinase 4. *Clin Cancer Res* 1999 Dec;5(12):4279-86.
- (20) Tang KS, Guralnick BJ, Wang WK, Fersht AR, Itzhaki LS. Stability and folding of the tumour suppressor protein p16. *J Mol Biol* 1999 Jan 29;285(4):1869-86.
- (21) Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001 Mar;233(3):322-37.
- (22) Jenkins GJ, Doak SH, Parry JM, D'Souza FR, Griffiths AP, Baxter JN. Genetic pathways involved in the progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma. *Br J Surg* 2002 Jul;89(7):824-37.
- (23) Bian YS, Osterheld MC, Fontollet C, Bosman FT, Benhattar J. p16 inactivation by methylation of the CDKN2A promoter occurs early during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002 Apr;122(4):1113-21.

(24)Doak SH, Jenkins GJ, Parry EM, D'Souza FR, Griffiths AP, Toffazal N, et ai. Chromosome 4 hyperploidy represents an early genetic aberration in premalignant Barrett's oesophagus. *Gut* 2003 May;52(5):623-8.

(25)Blot WJ. Cancer of the esophagus: its causes and changing patterns of occurrence. In: Perry MC, Whippen D, editors. *Proceedings of the 33th American Society of Clinical Oncology - Educational Book*. Denver, USA: American Society of Clinical Oncology; 1997. p. 159-63.

(26)Lightdale CJ. Esophageal cancer. *American College of Gastroenterology. Am J Gastroenterol* 1999 Jan;94(1):20-9.

(27)Rosa AR, Gurski RR, Schirmer CC, Brentano L, Krueel CD. Survival and prognostic factors in patients with resected epidermoid oesophageal carcinoma. *Int Surg* 1999 Jul;84(3):193-8.

(28)Mirra AP, de Souza JM, Gotlieb SL, Pastoreio EF, Bussacos MA, Correa MC, et ai. [Epidemiology of cancer of the esophagus in Sao Paulo, Brazil]. *Rev Saude Publica* 1982 Feb;16(1):54-65.

(29)Ribeiro U, Jr., Posner MC, Safatle-Ribeiro AV, Reynolds JC. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br J Surg* 1996 Sep;83(9):1174- 85.

(30)Prolla JC. Mortalidade por neoplasia associada ao tabagismo no Rio Grande do Sul, 1970-1989. Porto Alegre-RS: Curso de Pós-graduação em Medicina: Pneumologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1992.

(31)Barros SGS. Detecção de lesões precursoras em indivíduos sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago. Experiência com a citopatologia da mucosa esofágica através de biópsias endoscópicas e do esfregaço pelo balão citológico chinês. Curso de Pós-graduação em Medicina: Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Feder I do Rio Grande do Sul; 1992.

(32)Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998 Nov 15;83(10):2049-53.

(33)Chen X, Yang CS. Esophageal adenocarcinoma: a review and perspectives on the mechanism of carcinogenesis and chemoprevention. *Carcinogenesis* 2001 Aug;22(8):1119-29.

(34)Corley DA, Buffler PA. Oesophageal and gastric cardia adenocarcinomas: analysis of regional variation using the Cancer Incidence in Five Continents database. *Int J Epidemiol* 2001 Dec;30(6):1415-25.

- (35) Sampliner RE. Adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia: is there progress in the face of increasing cancer incidence? *Ann Intern Med* 1999 Jan 5;130(1):67-9.
- (36) Blom D, Peters JH, DeMeester TR. Controversies in the current therapy of carcinoma of the esophagus. *J Am Coll Surg* 2002 Aug;195(2):241-50.
- (37) Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. *N Engl J Med* 2003 Dec 4;349(23):224-32.
- (38) Gurski RR, Peters JH, Hagen JA, DeMeester SR, Bremner CG, Chandrasoma PT, et al. Barrett's esophagus can and does regress after antireflux surgery: a study of prevalence and predictive features. *J Am Coll Surg* 2003 May;196(5):706-12.
- (39) Wang LO, Zheng S, Zheng ZY, Casson AG. Primary adenocarcinomas of lower esophagus, esophagogastric junction and gastric cardia: in special reference to China. *World J Gastroenterol* 2003 Jun;9(6):1156-64.
- (40) Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, Long TI, Kurumboor SK, Bernstein L, et al. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001 Apr 15;61(8):3410-8.
- (41) Ming se. Adenocarcinoma and other epithelial tumors of the esophagus. In: Ming se, Goldman H, editors. *Pathology of the gastrointestinal tract*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998. p. 499-521.
- (42) Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ, Triadafilopoulos G, Geboes K, Casson AG, et al. Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Pathol* 1999 Apr;154(4):965-73.
- (43) Cavazzola LT, Rosa AR, Schirmer CC, Gurski RR, Telles JPB, Mielke F, et al. Immunohistochemical evaluation for p53 and VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) is not prognostic for long term survival in end stage esophageal adenocarcinoma. *Ois Esophagus*. In press 2005.
- (44) Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*. [1.0]. 2001. Lyon, IARC Press. IARC Cancer Base No. 5. Ref Type: Data File
- (45) Brasil. Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. *Estimativas da incidência e mortalidade por câncer*. Rio de Janeiro-RJ; 2003.
- (46) Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Departamento de Análise de Situação de Saúde. *Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM*. 2002. Ref Type: Data File

- (47) Grassi PR. Registro de Câncer de Base Populacional de Porto Alegre: Dados referentes aos casos de câncer de esôfago no período 1996-1997. 2004. Ref Type: Personal Communication
- (48) Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Câncer no Brasil: dados dos registros de câncer de base populacional. Rio de Janeiro-RJ: INCA; 2004. Report No.: 3.
- (49) Ferreira J. Registro Hospitalar de Câncer do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. 2004. Ref Type: Personal Communication
- (50) Stewart ZA, Westfall MD, Pietenpol JA. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends Pharmacol Sei* 2003 Mar;24(3):139-45.
- (51) Lukas J, Parry D, Aagaard L, Mann DJ, Bartkova J, Strauss M, et al. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* 1995 Jun 8;375(6531):503-6.
- (52) Cheng L, Rossi F, Fang W, Mori T, Cobrinik D. Cdk2-dependent phosphorylation and functional inactivation of the pRB-related p130 protein in pRB(-), p16INK4A(+) tumor cells. *J Biol Chem* 2000 Sep 29;275(39):30317-25.
- (53) Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995 Mar 9;374(6518):131-4.
- (54) Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, Harlow E. Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature* 1995 Jun 8;375(6531):506-10.
- (55) Yarbrough WG, Buckmire RA, Bessho M, Liu ET. Biologic and biochemical analyses of p16(INK4a) mutations from primary tumors. *J Natl Cancer Inst* 1999 Sep 15;91(18):1569-74.
- (56) Huschtscha LI, Reddel RR. p16(INK4a) and the control of cellular proliferative life span. *Carcinogenesis* 1999 Jun;20(6):921-...s.
- (57) Hebert J, Cayuela JM, Berkeley J, Sigaux F. Candidate tumor-suppressor genes MTS1 (p16INK4A) and MTS2 (p15INK4B) display frequent homozygous deletions in primary cells from T- but not from B-cell lineage acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 1994 Dec 15;84(12):4038-44 .
- (58) Asamoto M, Iwahori Y, Okamura T, Shirai T, Tsuda H. Decreased expression of the p16/MTS1 gene without mutation is frequent in human urinary bladder carcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 1997 Feb;27(1):22-5.
- (59) Xing EP, Nie Y, Song Y, Yang GY, Cai YC, Wang LO, et al. Mechanisms of inactivation of p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999 Oct;5(10):2704-13.

- (60) Schneider-Stock R, Boltze C, Peters B, Hopfner T, Meyer F, Lippert H, et al. Differences in loss of p16INK4 protein expression by promoter methylation between left- and right-sided primary colorectal carcinomas. *Int J Oncol* 2003 Oct;23(4):1009-13.
- (61) Sharpless NE, Alson S, Chan S, Silver DP, Castrillon OH, DePinho RA. p16(INK4a) and p53 deficiency cooperate in tumorigenesis. *Cancer Res* 2002 May 15;62(10):2761-5.
- (62) Awaya H, Takeshima Y, Amatya VJ, Furonaka O, Tagawa K, Kohno N, et al. Inactivation of the p16 gene by hypermethylation and loss of heterozygosity in adenocarcinoma of the lung. *Pathol Int* 2004 Jul;54(7):486-9.
- (63) Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Sep 29;95(20):11891-6.
- (64) Takahira T, Oda Y, Tamiya S, Yamamoto H, Kawaguchi K, Kobayashi C, et al. Alterations of the p16INK4a/p14ARF pathway in clear cell sarcoma. *Cancer Sci* 2004 Aug;95(8):651-5.
- (65) Nishimine M, Nakamura M, Kishi M, Okamoto M, Shimada K, Ishida E, et al. Alterations of p14ARF and p16INK4a genes in salivary gland carcinomas. *Oncol Rep* 2003 May;10(3):555-60.
- (66) Qin Y, Liu JY, Li B, Sun ZL, Sun ZF. Association of low p16INK4a and p15INK4b mRNAs expression with their CpG islands methylation with human hepatocellular carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2004 May 1;10(9):1276-80.
- (67) Nielsen GP, Bums KL, Rosenberg AE, Louis DN. CDKN2A gene deletions and loss of p16 expression occur in osteosarcomas that lack RB alterations. *Am J Pathol* 1998 Jul;153(1):159-63.
- (68) Barrett MT, Sanchez CA, Galipeau PC, Neshat K, Emond M, Reid BJ. Allelic loss of 9p21 and mutation of the CDKN2/p16 gene develop as early lesions during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Oncogene* 1996 Nov 7;13(9):1867-73.
- (69) Galipeau PC, Prevo LJ, Sanchez CA, Longton GM, Reid BJ. Clonal expansion and loss of heterozygosity at chromosomes 9p and 17p in premalignant esophageal (Barrett's) tissue. *J Natl Cancer Inst* 1999 Dec 15;91(24):2087-95.
- (70) Wong DJ, Paulson TG, Prevo LJ, Galipeau PC, Longton G, Blount PL, et al. p16(INK4a) lesions are common, early abnormalities that undergo clonal expansion in Barrett's metaplastic epithelium. *Cancer Res* 2001 Nov 15;61(22):8284-9.

(71) Remmele W, Schickelanz KH. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs. subjective grading (IRS). *Pathol Res Pract* 1993 Sep;189(8):862-6.

(72) Papadimitrakopoulou VA, Izzo J, Mao L, Keck J, Hamilton D, Shin DM, et al. Cyclin D1 and p16 alterations in advanced premalignant lesions of the upper aerodigestive tract: role in response to chemoprevention and cancer development. *Clin Cancer Res* 2001 Oct;7(10):3127-34.

(73) Xing EP, Nie Y, Wang LO, Yang GY, Yang CS. Aberrant methylation of p16INK4a and deletion of p15INK4b are frequent events in human esophageal cancer in Linxian, China. *Carcinogenesis* 1999 Jan;20(1):77-84.

(74) Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA, Baylin SB, Herman JG. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Oct 26;96(22):12754-9.

(75) Villwock MM. Prevalência da expressão da proteína p21 nos pacientes com adenocarcinoma do esôfago atendidos no Grupo de Cirurgia de Esôfago e Estômago do Hospital de clínicas de Porto Alegre, no período de 1998 a 2002. Porto Alegre - RS: Curso de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.

(76) Meurer L. Densidade microvascular intratumoral e expressão imunohistoquímica de p21: associação com sobrevida em pacientes submetidos à cirurgia por carcinoma epidermóide de esôfago. Curso de Pós-graduação em Medicina: Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003.

(77) Sander EB. Expressão de HER-2/neu e p53 em adenocarcinoma de esôfago e cárdia Curso de Pós-graduação em Medicina: Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2001.

(78) Shahnava SA, Bradley G, Regezi JA, Thakker N, Gao L, Hogg D, et al. Patterns of CDKN2A gene loss in sequential oral epithelial dysplasias and carcinomas. *Cancer Res* 2001 Mar 15;61(6):2371-5.

(79) Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, et al. p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol* 2003 Jan;56(1):56-63.

(80) Sasaki S, Kitagawa Y, Sekido Y, Minna JD, Kuwano H, Yokota J, et al. Molecular processes of chromosome 9p21 deletions in human cancers. *Oncogene* 2003 Jun 12;22(24):3792-8.

(81) Hirao T, Bueno R, Chen CJ, Gordon GJ, Heilig E, Kelsey KT. Alterations of the p16(INK4) locus in human malignant mesothelial tumors. *Carcinogenesis* 2002 Jul;23(7):1127-30.

(82) Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, et al. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* 1999 Jul;9(3):469-79.

(83) Brown 1, Milner BJ, Rooney PH, Haites NE. Inactivation of the p16INK4A gene by methylation is not a frequent event in sporadic ovarian carcinoma. *Oncol Rep* 2001 Nov;8(6):1359-62.

(84) Ficorella C, Cannita K, Ricevuto E, Toniato E, Fusco C, Sinopoli NT, et al. P16 hypermethylation contributes to the characterization of gene inactivation profiles in primary gastric cancer. *Oncol Rep* 2003 Jan;10(1):169-73.

(85) Tokugawa T, Sugihara H, Tani T, Hattori T. Modes of silencing of p16 in development of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2002 Sep 1;62(17):4938-44.

**PERDA DE EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA P16^{INK4a} É EVENTO
FREQUENTE NO ADENOCARCINOMA DE ESÔFAGO**

Mário Henrique Osanai*¹, Richard Ricachenevsky Gurski¹, Maria Isabel Albano Edelweiss², Luise Meurer², Maitê de Mello Vilwock¹, Leandro Totti Cavazzola¹, Carlos Cauduro Schirmer¹.

Serviços de Cirurgia Geral ¹ e Patologia ² do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Programa de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

* Endereço para correspondência: Rua Luciana de Abreu, 323/501. Moinhos de Vento. CEP 90.570-060. Porto Alegre – RS. Brasil. Endereço eletrônico: mario.osanai@ufrgs.br. Telefone: (51)3222-1455

RESUMO

Introdução: O adenocarcinoma de esôfago apresenta um aumento de frequência nas últimas décadas, particularmente em países desenvolvidos. O esôfago de Barrett é reconhecido como a principal lesão precursora e o estudo da seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma mostra a ocorrência de alterações genéticas desde suas fases mais incipientes. As alterações no p16^{INK4a} são relatadas como freqüentes no esôfago de Barrett e no carcinoma de esôfago. A análise dessas informações pode contribuir para a identificação de indivíduos de maior risco através de fatores prognósticos importantes no seguimento de pacientes.

Objetivo: Verificar a prevalência da expressão imunoistoquímica da proteína p16^{INK4a} em peças cirúrgicas e biópsias de pacientes com adenocarcinoma de esôfago.

Metodologia: A população do estudo foi constituída de 37 pacientes com adenocarcinoma de esôfago diagnosticados no GCEEID-HCPA entre janeiro de 1998 e dezembro de 2002. A expressão da proteína p16 foi detectada por meio de análise imunoistoquímica, com anticorpo primário p16^{INK4a}Ab-7, clone 16P07, NeoMarkers e avaliada de acordo com o Sistema de Escore de Imunorreatividade (Immunoreactive scoring system – IRS) modificado.

Resultados: No grupo de 37 pacientes estudados, houve predominância de pacientes do sexo masculino (86,5%) e a maioria dos casos correspondia a estádios avançados (Estádios III e IV = 67,5%). Em 12 casos (32,4%) foi identificada expressão imunoistoquímica da proteína p16^{INK4a}. Não foi observada relação significativa entre a perda da expressão da proteína p16^{INK4a} e o grau de diferenciação histológica (p=0,81) nem com o estadiamento da doença (p=0,485).

Conclusão: Os resultados obtidos no estudo demonstram a perda da expressão imunoistoquímica da proteína p16^{INK4a} em 67,6% dos casos, corroborando as informações de que a inativação do gene p16 é um evento freqüente e que pode exercer um papel importante na carcinogênese do adenocarcinoma de esôfago.

Palavras-chave: esôfago, neoplasia de esôfago, adenocarcinoma de esôfago, câncer de esôfago, Barrett, p16, p16^{INK4a}, CDK, carcinogênese, imunoistoquímica.

ABSTRACT

Introduction: The esophageal adenocarcinoma shows an increasing frequency in the last decades, specially in the developed countries. The Barrett's esophagus is accepted as the major premalignant lesion and the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence presents a lot of genetic changes since its early events. The alterations in p16^{INK4a} are frequent in the Barrett's esophagus and the esophageal carcinoma. The analysis of those informations can contribute in perspectives to identify higher risk individuals, prognostic factors or follow-up strategies for the patients.

Objective: To verify the prevalence of the immunohistochemical expression of the p16^{INK4a} protein in patients with esophageal adenocarcinoma diagnosed between January 1998 and December 2002 by the Esophageal Surgery Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GCEEID-HCPA).

Methods: The study population consisted of 37 patients with esophageal adenocarcinoma resected by the GCEEID-HCPA between January 1998 and December 2002. The p16^{INK4a} protein expression was determined by immunohistochemistry using primary antibody p16^{INK4a}Ab-7, clone 16P07 NeoMarkers and assessed according to the Immunoreactive scoring system (IRS).

Results: Of 37 analyzed patients, the most were male (86,5%) and the advanced disease was predominant (stages III and IV = 67,5%). In 12 (32,4%) the immunohistochemistry was positive for p16^{INK4a}. There was no significative relation between the protein expression and the degrees of histological differentiation of the biopsies and surgical especimens ($p=0,81$) neither with the staging ($p=0,485$).

Conclusion: The lost of the immunohistochemical expression of the p16^{INK4a} protein in this study is according to the specialized literature suggesting that p16 is enrolled in the carcinogenesis of the adenocarcinoma of esophagus.

Key words: esophageal, esophageal neoplasm, esophageal adenocarcinoma, esophageal câncer, Barrett's esophagus, p16, p16^{INK4a}, CDK, CDKN2A, carcinogenesis, immunohistochemistry.

Introdução:

Vários estudos analisaram fatores de risco e o mecanismo de progressão das lesões metaplásicas para as displasias e, destas, para o adenocarcinoma(1-6). O risco de desenvolvimento de adenocarcinoma em pacientes com Esôfago de Barrett (EB) é estimado em 1 caso para cada 56 a 250 pacientes-ano de seguimento(7;8).

Alterações de genes específicos, relacionados a alguns tipos de tumores, evidenciam o importante papel destes genes como potenciais indicadores de prognóstico ou de resposta à terapêutica(9-13).

As alterações no gene p16^{INK4a} (p16) são objeto de estudo em diversos tumores como: carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, carcinomas epidermóides de esôfago, adenocarcinomas de pâncreas e tumores estromais gastrointestinais (11;14-17). Estudos em tumores de pâncreas e em tumores estromais gastrointestinais relatam pior prognóstico na vigência de alterações nesse gene(11;15;18).

Existem muitos estudos sobre as alterações no gene p16 em esôfago de Barrett e no carcinoma de esôfago, incluindo o adenocarcinoma, sendo a perda alélica do p16 considerada a alteração gênica inicial na progressão da metaplasia de Barret e a hipermetilação uma das formas mais freqüentes de inativação do gene(8;19-24). No entanto, são poucas as publicações específicas sobre a repercussão dessas alterações genéticas e epigenéticas na expressão da proteína p16 em adenocarcinomas de esôfago(23).

Metodologia:Pacientes:

A população estudada foi obtida pela revisão dos prontuários dos pacientes do GCEEID-HCPA com adenocarcinoma de esôfago atendidos entre 01 de janeiro de 1998 e 31 de dezembro de 2002.

Critério de inclusão: Pacientes com diagnóstico anatomopatológico de adenocarcinoma de esôfago realizado no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre janeiro de 1998 e dezembro de 2002.

Critérios de exclusão: História ou presença de outra neoplasia maligna concomitante; Tratamento neoadjuvante (quimioterapia ou radioterapia); Ausência de blocos de parafina para a confecção de lâminas para o estudo.

Variáveis em estudo: Idade, sexo, estadiamento, grau de diferenciação histológica, procedimento cirúrgico realizado, intensidade da expressão da proteína p16INK4a, percentual de núcleos corados para a p16INK4a.

Imunoistoquímica:

Cortes representativos do tumor, oriundos de blocos de parafina com material de biópsia ou peça cirúrgica, foram submetidos à técnica imunoistoquímica utilizada na rotina do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A técnica consistiu em desparafinização e reidratação, recuperação antigênica, inativação da peroxidase endógena e bloqueio das reações inespecíficas. O anticorpo primário, p16^{INK4a} clone 16P07 NeoMarkers, foi incubado por 12 horas, a 4°C, na diluição de 1:75, seguido da aplicação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) e revelação com diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako). A reação apresentou como controle positivo a neoplasia intraepitelial cervical positiva para p16, sendo o controle negativo realizado sem a utilização do anticorpo primário.

A avaliação da p16^{INK4a} (p16) foi realizada de acordo com o Sistema de Escore de Imunorreatividade (Immunoreactive Scoring System – IRS)(25), modificado, sendo considerada como positiva apenas a coloração nuclear.

Dois padrões de coloração foram utilizados: positivo: quando pelo menos 10% dos núcleos foram positivos, em padrão focal ou difuso pelo tecido, e negativo, quando nenhuma ou poucas células (<10%) mostraram coloração nuclear.

A intensidade da coloração foi classificada graduando-se de 0 a 3, onde: 0 é negativa, 1 é fraca, 2 é moderada e 3 é forte.

O escore final da expressão da p16 foi obtido multiplicando-se as duas pontuações.

A leitura das lâminas foi realizada por dois patologistas (LM e MIE), de forma independente e sem o conhecimento dos dados clínico-patológicos. O resultado final foi obtido por revisões de consenso discutidas entre os dois patologistas.

Nas figuras a seguir podem ser observados exemplos de colorações nas várias intensidades, para melhor ilustrar o método (**Figuras de 1 a 4**).

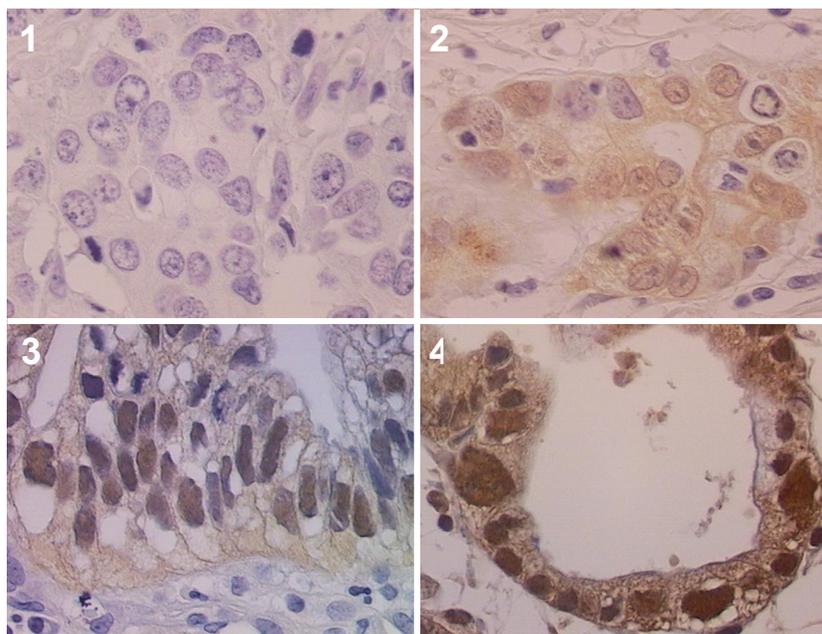


Figura 1. Expressão imunoistoquímica negativa da p16 (400X); **Figura 2.** Expressão imunoistoquímica fraca da p16 (400X);
Figura 3. Expressão imunoistoquímica moderada da p16 (400X); **Figura 4.** Expressão imunoistoquímica forte da p16 (400X)

Ética:

O presente estudo foi submetido à análise do Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, para avaliação quanto às normas regulamentares e diretrizes éticas, com aprovação para execução, sob protocolo número 03-183.

Análise estatística:

Os dados quantitativos foram descritos por média e desvio padrão, e os categóricos por frequência (número absoluto) e percentual.

As observações realizadas pelos dois patologistas responsáveis pela avaliação da intensidade da coloração e expressão da p16 tiveram sua concordância estimada por medida de concordância Kappa.

A distribuição da p16 entre os grupos de diferenciação histológica e entre os estádios da doença foi comparada pelo método do qui-quadrado.

Os dados foram processados e analisados com auxílio do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 13.0.

Resultados:

Foram revisados 63 prontuários de pacientes que preenchiam os critérios de inclusão e que não tinham história ou presença de outra neoplasia maligna concomitante, ou tratamento neoadjuvante (quimioterapia e/ou radioterapia antes do procedimento cirúrgico). Desses, foram incluídos no estudo apenas aqueles que apresentavam blocos de parafina com biópsias ou peças cirúrgicas, para estudo no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, formando uma população de 37 pacientes.

A média de idade foi de 61,9 anos (desvio padrão \pm 8,6 anos).

Trinta e dois pacientes eram do sexo masculino (86,5%), com uma média de idade de 61,2 anos (desvio padrão \pm 1,6 anos) e cinco eram do sexo feminino (13,5%), com uma média de idade de 66 anos (desvio padrão \pm 1,1 anos)(**Figura 5**).

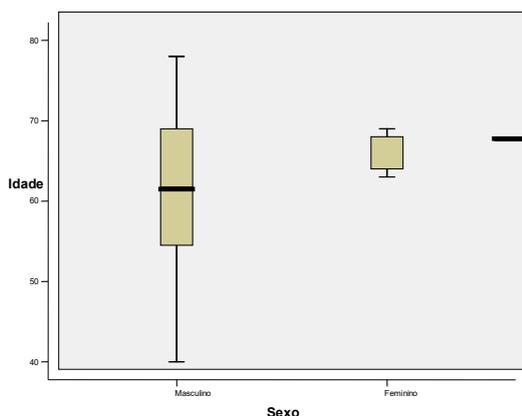


Figura 5: Distribuição, segundo o sexo e idade, dos pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago no GCEEID-HCPA em um período de cinco anos (1998-2002). n=37.

A maior parte dos pacientes (67,5%) apresentava doença em estádios III e IV. Em 4 casos (10,8%) não foi localizada anotação referente ao estadiamento.

Os procedimentos cirúrgicos com intenção curativa (gastrectomia total e esofagogastrectomia transiatal) foram realizados em 54% dos casos. Os demais foram submetidos à cirurgia paliativa ou não receberam tratamento cirúrgico.

Quanto ao grau de diferenciação do tumor, cinco casos eram de tumores bem diferenciados (13,5%), vinte e um eram moderadamente diferenciados (56,8%) e dez casos se referiam a tumores indiferenciados (27%) (**Tabela 1**).

Tabela 1: Características dos pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago no GCEEID-HCPA em um período de cinco anos (1998-2002). n=37

Característica	Medida síntese
Idade, anos	61,9 ± 8,6
Sexo	
Masculino (%)	32 (86,5%)
Feminino (%)	5 (13,5%)
Estádio	
I	4 (10,8%)
II	4 (10,8%)
III	13 (35,1%)
IV	12 (32,4%)
Não informado	4 (10,8%)
Procedimento	
Gastrectomia total	11 (29,7%)
Cirurgia Paliativa	11 (29,7%)
Ressecção transiatal	9 (24,3%)
Biópsia	6 (16,2%)
Grau histológico	
Bem diferenciado	5 (13,5%)
Moderadamente diferenciado	21 (56,8%)
Indiferenciado	10 (27%)
Não informado	1 (2,7%)

Os dados são apresentados como média±desvio padrão ou número (percentual)

Na análise imunoistoquímica da p16, houve uma boa concordância entre os observadores em relação à avaliação do percentual de núcleos corados (Kappa=0,628) **(Tabela 2)**.

Tabela 2: Avaliação da concordância entre dois patologistas quanto ao percentual de núcleos corados para o p16 em tumores de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago no GCEEID-HCPA em um período de cinco anos (1998-2002). n=37

		Observador 1				
		%	0	1 a 9	≥ 10	Total
Observador 2	0	12	6	0	18	
	1 a 0	2	4	0	6	
	≥ 10	0	1	12	13	
	Total	14	11	12	37	

Medida de concordância Kappa = 0,628

Em relação à avaliação da intensidade da expressão da p16 nos núcleos, a concordância foi razoável (Kappa=0,392) **(Tabela 3)**.

Tabela 3: Avaliação da concordância entre dois patologistas quanto à intensidade da expressão da p16 nos núcleos em tumores de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago no GCEEID-HCPA em um período de cinco anos (1998-2002). n=37

		Observador 1					
		Intensidade	0	1	2	3	Total
Observador 2	0	12	4	2	0	18	
	1	1	4	3	0	8	
	2	0	0	4	6	10	
	3	0	0	0	1	1	
	Total	13	8	9	7	37	

Medida de concordância Kappa= 0,392

Nos casos em que houve discordância entre os observadores, as lâminas foram revisadas pelos dois patologistas até que um consenso fosse estabelecido.

Para as análises finais, somente os resultados consensuais foram considerados.

A expressão imunoistoquímica da p16 foi observada em apenas 32,4% dos casos analisados.

Em seis casos (16,2%), houve expressão forte (escore 3); em três casos (8,1%) a expressão foi moderada e em outros três casos (8,1%) se verificou uma expressão fraca da p16. Em vinte e cinco casos (67,6%), houve a perda da expressão imunoistoquímica da p16 (**Tabela 4**).

Tabela 4: Distribuição de frequência do escore de expressão imunoistoquímica da p16 em pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago no GCEEID-HCPA em um período de cinco anos (1998-2002). n=37

Escore	f	%
0	25	67,6
1	3	8,1
2	3	8,1
3	6	16,2
Total	37	100

Em relação ao sexo, houve expressão da proteína em dez dos 32 pacientes do sexo masculino (31,2%) e em duas de cinco pacientes do sexo feminino (40%) ($p=N.S.$).

Quanto ao estadiamento, a distribuição da expressão da proteína foi de 50% no Estádio I (expressão em dois entre quatro pacientes), 50% no Estádio II (expressão em dois entre quatro pacientes), 23% no Estádio III (expressão em três entre treze pacientes) e 41,7% no Estádio IV (expressão em cinco entre doze pacientes). Não houve expressão da proteína nos quatro pacientes sem informação de estadiamento. A análise estatística não mostrou relação significativa entre o estadiamento e a expressão da proteína ($p=0,485$) (**Figura 6**).

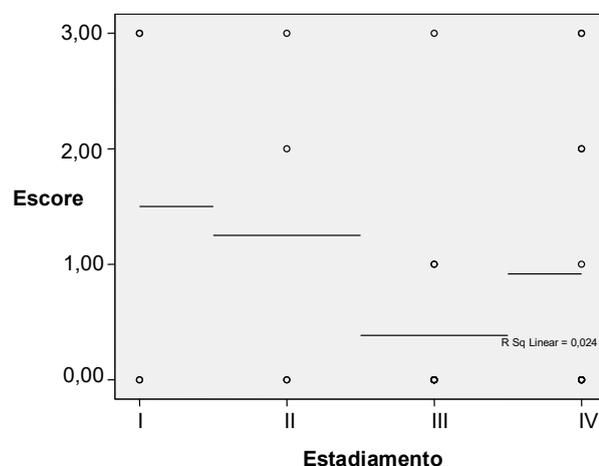


Figura 6: Distribuição, segundo o escore de expressão imunohistoquímica do p16 e o estadiamento dos tumores dos pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago no GCEEID-HCPA em um período de cinco anos (1998-2002). n=37. **p=0,485**.

A distribuição da expressão da proteína p16 entre as diferentes abordagens cirúrgicas foi a seguinte: no grupo submetido a gastrectomia total, houve expressão em três de onze pacientes (27,3%); no grupo submetido a cirurgia paliativa, a expressão foi identificada em quatro de onze pacientes (36,4%); dos submetidos a ressecção transiatal, quatro dos nove pacientes (44,4%) expressaram a proteína e no grupo dos pacientes submetidos apenas à biópsia, houve expressão da proteína em um de seis pacientes (16,7%) (p=N.S.) (**Tabela 5**).

Tabela 5: Distribuição da expressão imunistoquímica do p16 em relação ao sexo, estadiamento, procedimento realizado e grau de diferenciação histológica dos tumores dos pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago no GCEEID-HCPA em um período de cinco anos (1998-2002). n=37

Expressão p16	12/37 (32,4%)
Sexo	
Masculino	10/32 (31,2%)
Feminino	2/5 (40%)
Estádio	
I	2/4 (50%)
II	2/4 (50%)
III	3/13 (23%)
IV	5/12 (41,7%)
Não informado	0/4 (0%)
Procedimento realizado	
Gastrectomia total	3/11 (27,3%)
Cirurgia Paliativa	4/11 (36,4%)
Ressecção transiatal	4/9 (44,4%)
Biópsia	1/6 (16,7%)
Grau de diferenciação histológica	
Bem diferenciado	2/5 (40%)
Moderadamente diferenciado	7/21 (33,1%)
Indiferenciado	3/10 (30%)
Não informado	0/1 (0%)

Os dados são apresentados como número com expressão / número total (percentual)

Também não foi observada relação estatisticamente significativa entre a expressão imunohistoquímica da p16 e o grau de diferenciação histológica do tumor, quando analisada em relação ao escore de imunorreatividade ($p=0,81$) (**Figura 7**).

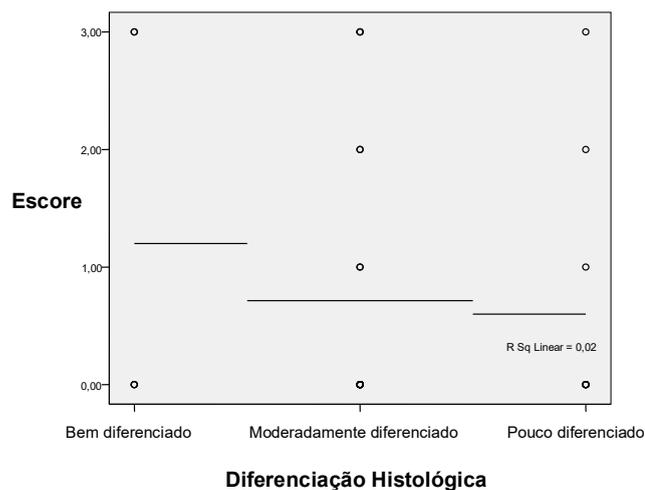


Figura 7: Distribuição, segundo o escore de expressão imunohistoquímica do p16 e o grau de diferenciação histológica dos tumores dos pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago no GCEEID-HCPA em um período de cinco anos (1998-2002). $n=37$. $p=0,81$.

Discussão:

Os critérios para a inclusão e exclusão dos casos no presente estudo foram rigorosamente analisados, visando preservar a representatividade da casuística do Serviço GCEEID-HCPA e a compatibilidade das amostras com a técnica utilizada. Isso permitiu, por exemplo, a inclusão do material obtido em biópsias, além das peças operatórias de ressecções realizadas. A maior parte dos casos de adenocarcinoma de esôfago foram diagnosticados em estádios avançados, sem indicação de cirurgia ressectiva.

Foram excluídos os casos submetidos a tratamento neoadjuvante ou com história ou presença de outra neoplasia maligna concomitante pois essas situações poderiam modificar a expressão da proteína e o estado do gene p16(19;26).

Diversos estudos mostram que a análise da expressão imunoistoquímica da proteína p16 apresenta uma boa correlação com os demais métodos de análise das alterações do gene p16, como o sequenciamento molecular e a amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR)(10;23;27-32). Essa fundamentação científica justificou a utilização de um método de menor custo com uma análise adequada para o objetivo proposto.

A avaliação da expressão da p16 através da técnica imunoistoquímica mostrou uma concordância de boa a razoável entre os observadores, quanto aos critérios de positividade (coloração nuclear) e quanto aos de intensidade da expressão. Essa concordância pode ser consequência da participação ativa dos patologistas nos diversos estudos já realizados com o trabalho do Serviço GCEEID(33-37).

Foi localizado um único trabalho publicado com uma descrição clara da metodologia utilizada na análise imunoistoquímica da p16 no adenocarcinoma de esôfago(23). No estudo referido, foram considerados negativos os casos em que menos de dez por cento das células mostravam coloração nuclear. O presente estudo utilizou o mesmo critério mas acrescentou a análise da intensidade da expressão, através do escore de imunorreatividade modificado.

Alterações no gene p16 foram estudadas em diversas lesões pré-malignas(21;26;38-41) e inúmeros tumores(19;42), como os de cólon e reto(28), pâncreas(11), colo uterino(31), glândulas salivares(29), cabeça e pescoço(10;14), mesoteliomas(43), osteossarcomas(44), gliomas(45) bexiga(46), tumores estromais gastrointestinais(15), ovário(47), pulmão(27;31;32), estômago(48) e esôfago(17;23;30;38;41;49;50).

Inúmeras alterações já foram descritas no gene p16, sendo as mais freqüentes a hipermetilação e as deleções(10;23;27-32;38;41;43;48;49). Essas alterações são, com freqüência, associadas à perda da expressão imunistoquímica da proteína p16(10;27-29;31;32;49).

Os processos moleculares que acompanham a progressão do esôfago de Barrett para o adenocarcinoma motivaram diversos estudos, consagrando o EB como a principal lesão precursora do adenocarcinoma de esôfago(21-23;38;41). Dentre as causas do EB, merece destaque o refluxo gastroesofágico, doença com prevalência em ascensão(51). Gurski *et al.*(52), em 2003, mostraram que a cirurgia antirefluxo proporcionou reversão de lesões metaplásicas e displásicas de esôfago de Barrett para formas mais benignas em um número significativo de pacientes.

As alterações do p16 na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma mostraram, em alguns estudos(23;38;41), correlação entre o grau de alteração histológica e a prevalência da expressão imunistoquímica da proteína p16. Em nosso estudo, não foi observada relação significativa ($p=0,81$), mas pareceu haver uma tendência de perda da intensidade da expressão com a perda da diferenciação histológica. É possível que uma casuística maior possa confirmar essa relação no adenocarcinoma de esôfago.

Uma outra observação que merece registro foi a tendência de diminuição proporcional do escore de imunorreatividade nos estádios I, II e III (progressão local e regional). Nos casos em estágio IV (metástases à distância), não houve essa proporcionalidade, sugerindo que outros processos genéticos possam desempenhar um papel mais importante no processo de metastatização, como os envolvidos na adesividade celular e angiogênese, por exemplo. Estudos com um maior número de casos e incluindo a análise de outros genes podem evidenciar a relação entre o estadiamento e os processos genéticos envolvidos.

Papadimitrakopoulou *et al.*(26), em 2001, estudou a expressão da p16 em lesões pré-malignas do trato aerodigestivo superior, submetidas à quimioprofilaxia e não encontrou correlação significativa da perda da expressão com a progressão histológica para câncer. No entanto, não foram localizadas publicações avaliando essa resposta no esôfago de Barrett, quando tratado. Estudos incluindo casos de EB tratados podem esclarecer como se comporta a expressão da proteína p16 nesses casos tratados, incluindo os diversos graus de resposta.

No adenocarcinoma de esôfago, os poucos estudos localizados e que avaliaram o p16 mostraram alta prevalência de alterações nesse gene (41% de alterações genéticas)(38) e uma perda significativa da expressão da proteína p16 (perda da expressão em 86% dos casos)(23). Nosso estudo encontrou perda da expressão imunistoquímica da p16 em 67,6% dos casos e uma expressão fraca em 8,1%. Apenas 24,3% dos casos mostrou expressão moderada a forte.

Conclusão:

Os resultados do presente estudo demonstraram uma baixa prevalência (32,4%) da expressão imunohistoquímica da proteína p16 nos casos analisados, corroborando o conhecimento já existente sobre as freqüentes alterações do gene p16 no adenocarcinoma esofágico.

Bibliografia

- (1) Rudolph RE, Vaughan TL, Storer B. Segment Length and Risk for Neoplastic Progression in Patients with Barrett Esophagus. *Ann Intern Med* 2000 Nov 7;133(9):748.
- (2) Hardy RG, Meltzer SJ, Jankowski JA. ABC of colorectal cancer. Molecular basis for risk factors. *BMJ* 2000 Oct 7;321(7265):886-9.
- (3) Shaheen N, Ransohoff DF. Gastroesophageal reflux, barrett esophagus, and esophageal cancer: scientific review. *JAMA* 2002 Apr 17;287(15):1972-81.
- (4) Katada N, Hinder RA, Smyrk TC, Hirabayashi N, Perdakis G, Lund RJ, et al. Apoptosis is inhibited early in the dysplasia-carcinoma sequence of Barrett esophagus. *Arch Surg* 1997 Jul;132(7):728-33.
- (5) Sabel MS, Pastore K, Toon H, Smith JL. Adenocarcinoma of the esophagus with and without Barrett mucosa. *Arch Surg* 2000 Jul;135(7):831-5.
- (6) Jankowski JA, Perry I, Harrison RF. Gastro-oesophageal cancer: death at the junction. *BMJ* 2000 Aug 19;321(7259):463-4.
- (7) Inadomi JM, Sampliner R, Lagergren J, Lieberman D, Fendrick AM, Vakil N. Screening and surveillance for Barrett's esophagus in high-risk groups: a cost-utility analysis. *Ann Intern Med* 2003 Feb 4;138(3):176-86.
- (8) Krishnadath KK, Reid BJ, Wang KK. Biomarkers in Barrett esophagus. *Mayo Clin Proc* 2001 Apr;76(4):438-46.
- (9) Ishii H, Dumon KR, Vecchione A, Fong LY, Baffa R, Huebner K, et al. Potential cancer therapy with the fragile histidine triad gene: review of the preclinical studies. *JAMA* 2001 Nov 21;286(19):2441-9.
- (10) Geisler SA, Olshan AF, Weissler MC, Cai J, Funkhouser WK, Smith J, et al. p16 and p53 Protein expression as prognostic indicators of survival and disease recurrence from head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2002 Nov;8(11):3445-53.
- (11) Gerdes B, Ramaswamy A, Ziegler A, Lang SA, Kersting M, Baumann R, et al. p16INK4a is a prognostic marker in resected ductal pancreatic cancer: an analysis of p16INK4a, p53, MDM2, and Rb. *Ann Surg* 2002 Jan;235(1):51-9.
- (12) Kamoshida S, Matsuoka H, Shiogama K, Matsuyama A, Shimomura R, Inada K, et al. Immunohistochemical analysis of thymidylate synthase, p16(INK4a), cyclin-dependent kinase 4 and cyclin D1 in colorectal cancers receiving preoperative chemotherapy: significance of p16(INK4a)-mediated cellular arrest as an indicator of chemosensitivity to 5-fluorouracil. *Pathol Int* 2004 Aug;54(8):564-75.

- (13) Tytgat GN, Bartelink H, Bernards R, Giaccone G, van Lanschot JJ, Offerhaus GJ, et al. Cancer of the esophagus and gastric cardia: recent advances. *Dis Esophagus* 2004;17(1):10-26.
- (14) Yuen PW, Man M, Lam KY, Kwong YL. Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol* 2002 Jan;55(1):58-60.
- (15) Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, Miettinen M, Peters B, Pross M, et al. High prognostic value of p16INK4 alterations in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2003 May 1;21(9):1688-97.
- (16) Biankin AV, Biankin SA, Kench JG, Morey AL, Lee CS, Head DR, et al. Aberrant p16(INK4A) and DPC4/Smad4 expression in intraductal papillary mucinous tumours of the pancreas is associated with invasive ductal adenocarcinoma. *Gut* 2002 Jun;50(6):861-8.
- (17) Sturm I, Petrowsky H, Volz R, Lorenz M, Radetzki S, Hillebrand T, et al. Analysis of p53/BAX/p16(ink4a/CDKN2) in esophageal squamous cell carcinoma: high BAX and p16(ink4a/CDKN2) identifies patients with good prognosis. *J Clin Oncol* 2001 Apr 15;19(8):2272-81.
- (18) Brabender J, Marjoram P, Salonga D, Metzger R, Schneider PM, Park JM, et al. A multigene expression panel for the molecular diagnosis of Barrett's esophagus and Barrett's adenocarcinoma of the esophagus. *Oncogene* 2004 Jun 10;23(27):4780-8.
- (19) Kubo A, Nakagawa K, Varma RK, Conrad NK, Cheng JQ, Lee WC, et al. The p16 status of tumor cell lines identifies small molecule inhibitors specific for cyclin-dependent kinase 4. *Clin Cancer Res* 1999 Dec;5(12):4279-86.
- (20) Tang KS, Guralnick BJ, Wang WK, Fersht AR, Itzhaki LS. Stability and folding of the tumour suppressor protein p16. *J Mol Biol* 1999 Jan 29;285(4):1869-86.
- (21) Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001 Mar;233(3):322-37.
- (22) Jenkins GJ, Doak SH, Parry JM, D'Souza FR, Griffiths AP, Baxter JN. Genetic pathways involved in the progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma. *Br J Surg* 2002 Jul;89(7):824-37.
- (23) Bian YS, Osterheld MC, Fontolliet C, Bosman FT, Benhattar J. p16 inactivation by methylation of the CDKN2A promoter occurs early during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002 Apr;122(4):1113-21.

(24) Doak SH, Jenkins GJ, Parry EM, D'Souza FR, Griffiths AP, Toffazal N, et al. Chromosome 4 hyperploidy represents an early genetic aberration in premalignant Barrett's oesophagus. *Gut* 2003 May;52(5):623-8.

(25) Remmele W, Schicketanz KH. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs. subjective grading (IRS). *Pathol Res Pract* 1993 Sep;189(8):862-6.

(26) Papadimitrakopoulou VA, Izzo J, Mao L, Keck J, Hamilton D, Shin DM, et al. Cyclin D1 and p16 alterations in advanced premalignant lesions of the upper aerodigestive tract: role in response to chemoprevention and cancer development. *Clin Cancer Res* 2001 Oct;7(10):3127-34.

(27) Awaya H, Takeshima Y, Amatya VJ, Furonaka O, Tagawa K, Kohno N, et al. Inactivation of the p16 gene by hypermethylation and loss of heterozygosity in adenocarcinoma of the lung. *Pathol Int* 2004 Jul;54(7):486-9.

(28) Schneider-Stock R, Boltze C, Peters B, Hopfner T, Meyer F, Lippert H, et al. Differences in loss of p16INK4 protein expression by promoter methylation between left- and right-sided primary colorectal carcinomas. *Int J Oncol* 2003 Oct;23(4):1009-13.

(29) Nishimine M, Nakamura M, Kishi M, Okamoto M, Shimada K, Ishida E, et al. Alterations of p14ARF and p16INK4a genes in salivary gland carcinomas. *Oncol Rep* 2003 May;10(3):555-60.

(30) Xing EP, Nie Y, Wang LD, Yang GY, Yang CS. Aberrant methylation of p16INK4a and deletion of p15INK4b are frequent events in human esophageal cancer in Linxian, China. *Carcinogenesis* 1999 Jan;20(1):77-84.

(31) Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA, Baylin SB, Herman JG. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Oct 26;96(22):12754-9.

(32) Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Sep 29;95(20):11891-6.

(33) Cavazzola LT, Rosa AR, Schirmer CC, Gurski RR, Telles JPB, Mielke F, et al. Immunohistochemical evaluation for p53 and VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) is not prognostic for long term survival in end estage esophageal adenocarcinoma. *Dis Esophagus*. In press 2005.

(34) Rosa AR, Gurski RR, Schirmer CC, Brentano L, Krueel CD. Survival and prognostic factors in patients with resected epidermoid oesophageal carcinoma. *Int Surg* 1999 Jul;84(3):193-8.

(35) Villwock MM. Prevalência da expressão da proteína p21 nos pacientes com adenocarcinoma do esôfago atendidos no Grupo de Cirurgia de Esôfago e Estômago do Hospital de clínicas de Porto Alegre, no período de 1998 a 2002. Porto Alegre - RS: Curso de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.

(36) Meurer L. Densidade microvascular intratumoral e expressão imunohistoquímica de p21: associação com sobrevida em pacientes submetidos à cirurgia por carcinoma epidermóide de esôfago. Curso de Pós-graduação em Medicina: Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003.

(37) Sander EB. Expressão de HER-2/neu e p53 em adenocarcinoma de esôfago e cárdia Curso de Pós-graduação em Medicina: Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2001.

(38) Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, Long TI, Kurumboor SK, Bernstein L, et al. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001 Apr 15;61(8):3410-8.

(39) Shahnava SA, Bradley G, Regezi JA, Thakker N, Gao L, Hogg D, et al. Patterns of CDKN2A gene loss in sequential oral epithelial dysplasias and carcinomas. *Cancer Res* 2001 Mar 15;61(6):2371-5.

(40) Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, et al. p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol* 2003 Jan;56(1):56-63.

(41) Wong DJ, Paulson TG, Prevo LJ, Galipeau PC, Longton G, Blount PL, et al. p16(INK4a) lesions are common, early abnormalities that undergo clonal expansion in Barrett's metaplastic epithelium. *Cancer Res* 2001 Nov 15;61(22):8284-9.

(42) Sasaki S, Kitagawa Y, Sekido Y, Minna JD, Kuwano H, Yokota J, et al. Molecular processes of chromosome 9p21 deletions in human cancers. *Oncogene* 2003 Jun 12;22(24):3792-8.

(43) Hirao T, Bueno R, Chen CJ, Gordon GJ, Heilig E, Kelsey KT. Alterations of the p16(INK4) locus in human malignant mesothelial tumors. *Carcinogenesis* 2002 Jul;23(7):1127-30.

(44) Nielsen GP, Burns KL, Rosenberg AE, Louis DN. CDKN2A gene deletions and loss of p16 expression occur in osteosarcomas that lack RB alterations. *Am J Pathol* 1998 Jul;153(1):159-63.

(45) Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, et al. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* 1999 Jul;9(3):469-79.

- (46) Asamoto M, Iwahori Y, Okamura T, Shirai T, Tsuda H. Decreased expression of the p16/MTS1 gene without mutation is frequent in human urinary bladder carcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 1997 Feb;27(1):22-5.
- (47) Brown I, Milner BJ, Rooney PH, Haites NE. Inactivation of the p16INK4A gene by methylation is not a frequent event in sporadic ovarian carcinoma. *Oncol Rep* 2001 Nov;8(6):1359-62.
- (48) Ficorella C, Cannita K, Ricevuto E, Toniato E, Fusco C, Sinopoli NT, et al. P16 hypermethylation contributes to the characterization of gene inactivation profiles in primary gastric cancer. *Oncol Rep* 2003 Jan;10(1):169-73.
- (49) Xing EP, Nie Y, Song Y, Yang GY, Cai YC, Wang LD, et al. Mechanisms of inactivation of p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999 Oct;5(10):2704-13.
- (50) Tokugawa T, Sugihara H, Tani T, Hattori T. Modes of silencing of p16 in development of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2002 Sep 1;62(17):4938-44.
- (51) Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998 Nov 15;83(10):2049-53.
- (52) Gurski RR, Peters JH, Hagen JA, DeMeester SR, Bremner CG, Chandrasoma PT, et al. Barrett's esophagus and does regress after antireflux surgery: a study of prevalence and predictive features. *J Am Coll Surg* 2003 May;196(5):706-12.

LOSS OF P16^{INK4a} PROTEIN IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION IS A FREQUENT EVENT IN THE ESOPHAGEAL ADENOCARCINOMA

Mário Henrique Osanai* ¹, Richard Ricachenevsky Gurski ¹, Maria Isabel Albano Edelweiss ², Luise Meurer ², Maitê de Mello Vilwock ¹, Leandro Totti Cavazzola ¹, Carlos Cauduro Schirmer ¹.

Divisions of Surgery ¹ and Pathology ² of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Graduate Program in Medicine: Surgery of the Medicine School of Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

* Correspondence to: Rua Luciana de Abreu, 323/501. Moinhos de Vento. ZIP Code 90.570-060. Porto Alegre – RS. Brazil. Phone/Fax: +55(51)3222-1455
E-mail: mario.osanai@ufrgs.br

ABSTRACT

Introduction: The esophageal adenocarcinoma has showed an increasing frequency in the last decades, specially in the developed countries. The Barrett's esophagus is accepted as the major premalignant lesion and the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence presents a lot of genetic changes since its early events. The alterations in p16^{INK4a} are frequent in the Barrett's esophagus and the esophageal carcinoma. The analysis of those information can contribute in perspectives to identify higher risk individuals, prognostic factors or follow-up strategies for the patients.

Objective: To verify the prevalence of the immunohistochemical expression of the p16^{INK4a} protein in patients with esophageal adenocarcinoma diagnosed between January 1998 and December 2002 by the Esophageal Surgery Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GCEEID-HCPA).

Methods: The study population consisted of 37 patients with esophageal adenocarcinoma resected by the GCEEID-HCPA between January 1998 and December 2002. The p16^{INK4a} protein expression was determined by immunohistochemistry using primary antibody p16^{INK4a}Ab-7, clone 16P07 NeoMarkers and assessed according to the Immunoreactive scoring system (IRS).

Results: Of 37 analyzed patients, the most were male (86,5%) and the advanced disease was predominant (stages III and IV = 67,5%). In 12 cases (32,4%) the immunohistochemistry was positive for p16^{INK4a}. There was no significative relation between the protein expression and the degrees of histological differentiation of the biopsies and surgical especimens (p=0,81) neither with the staging (p=0,485).

Conclusion: The lost of the p16^{INK4a} protein immunohistochemical expression in this study is according to the specialized literature suggesting that p16 is enrolled in the carcinogenesis of the adenocarcinoma of esophagus.

Key words: esophageal, esophageal neoplasm, esophageal adenocarcinoma, esophageal câncer, Barrett's esophagus, p16, p16^{INK4a}, CDK, CDKN2A, carcinogenesis, immunohistochemistry.

Introduction: Many studies had analyzed risk factors and the mechanism of progression on the sequence metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma(1-6). The risk of development of adenocarcinoma in patients with Barrett's esophagus (BE) is estimated in 1 case for each 56-250 patient-year of follow-up(7;8). Alterations of specific genes, related to some types of tumors, evidence the important role of these genes as potential indicators of prognostic or therapeutic response (9-13). The alterations in the gene p16^{INK4a} (p16) were reported in various tumors as: epidermoid carcinomas of head and neck, epidermoid carcinomas of esophagus, adenocarcinomas of pancreas and gastrointestinal estromal tumors (11;14-17). Studies in tumors of pancreas and gastrointestinal estromal tumors had worse prognostic when this gene was altered (11;15;18). There are many studies about alterations in the gene p16 in BE and the carcinoma of esophagus, including the adenocarcinoma, being the allelic loss of p16 the early genetic alteration in the progression of the metaplasia of Barrett and hypermethylation one of the most frequent forms of gene inactivation (8;19-24). However, there are few specific publications about the repercussion of these genetic and epigenetics alterations in the p16 protein immunohistochemical expression in esophageal adenocarcinomas (23).

Methodology:

Patients: The population of the study was obtained by the review of the medical charts of patients of the Group for Surgeries of the Esophagus and Stomach of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GCEEID-HCPA) diagnosed with esophageal adenocarcinoma, between January 1998 and December 2002, with no history or presence of another concomitant malignant neoplasm, or neoadjuvant treatment (chemotherapy and/or radiation therapy before surgery). Only those patients who had paraffin-embedded biopsies or surgical specimens were included in the study (n=37). The paraffin blocks were analyzed by the Division of Pathology of Hospital de Clinicas de Porto Alegre.

Immunohistochemical: The paraffin-embedded biopsies or surgical specimens (representative sections of the tumor) were submitted to the immunohistochemical analysis routinely performed by the Division of Pathology of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, which consisted of deparaffinization and rehydration, antigen retrieval, inactivation of endogenous peroxidase activity and blocking of nonspecific reactions. The primary antibody, p16^{INK4a}, clone 16P07 (NeoMarkers), was incubated for 12 hours at 4°C, diluted 1:50, followed by the application of streptavidin-biotin-peroxidase complex (LSAB, Dako) and exposed to diaminobenzidine tetrahydrochloride (Kit DAB, Dako) for visualization. Patients with p16-positive cervical intraepithelial neoplasia were used as positive controls, while negative controls did not include the primary antibody. p16^{INK4a} expression (p16) was assessed using the Immunoreactive Scoring System – IRS)(25), modified. Only nuclear staining was regarded as positive.

Two staining patterns were distinguished: positive, when at least 10% of nuclei were positive, in clusters or scattered throughout the tissue, and negative, when no or only a few cells (<10%) showed nuclear staining. The staining intensity was classified as: 0 = negative, 1 = weak, 2 = moderate and 3 = strong (**Figure 1 to 4**).

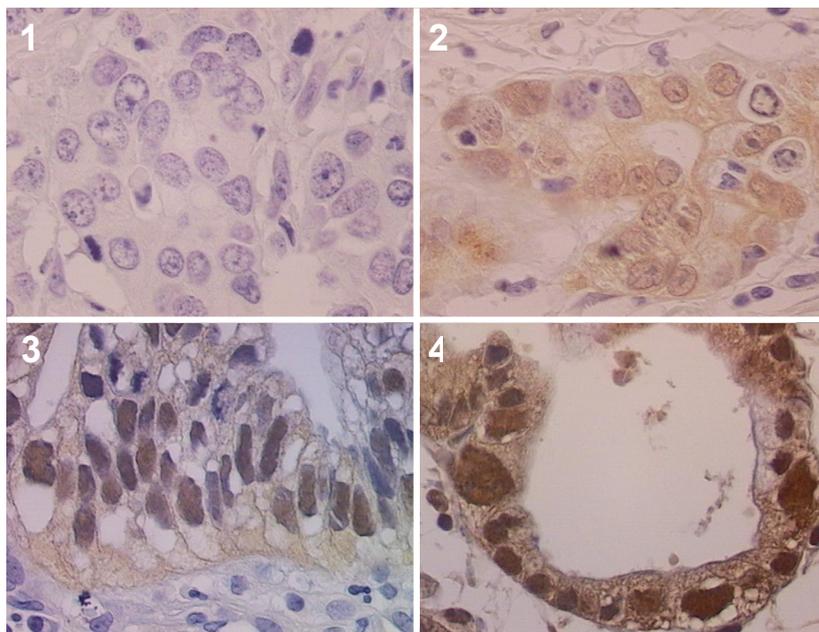


Figure 1. Negative p16 immunohistochemical expression (400X); **Figure 2.** Weak p16 immunohistochemical expression (400X); **Figure 3.** Moderate p16 immunohistochemical expression (400X); **Figure 4.** Strong p16 immunohistochemical expression (400X)

Two pathologists who were blinded to the clinical and histopathological information independently analyzed the glass slides. The final result was obtained through by consensus reviews between the two pathologists.

Ethics: The study was submitted to the analysis of the Group of Research and Graduation of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, for evaluation about norms and ethical aspects, with approval for execution, under protocol number 03-183.

Statistical Analysis: The quantitative data had been described for average and standard deviation, and categorical data had been described for frequency (absolute number) and the percentage. The comments carried through for the two responsible pathologists for the evaluation of the intensity of the coloring and expression of p16 had its agreement calculated for measure of agreement Kappa. The distribution of p16 within the groups of hystologic differentiation and enters levels of the illness was compared by the method of the qui-square. The data had been processed and analyzed with the SPSS program (Statistical Package will be the Social Sciences) version 13.0.

Results: 63 medical records of patients had been revised for the inclusion criteria and that they did not have history or presence of another concomitant malignant neoplasia, or neoadjuvante treatment (chemotherapy and/or radiation therapy before the surgical procedure). From these, only those that presented paraffin blocks with biopsy or surgical parts had been enclosed in the study, for study in the Service of Pathology of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre, forming a population of 37 patients. The age average was of 61,9 years (standard deviation $\pm 8,6$ years). Thirty two patients were male (86,5%), with a average of age of 61,2 years (standard deviation $\pm 1,6$ years) and five were female (13,5%), with a average of age of 66 years (standard deviation ± 1.1 years) (**Figure 5**).

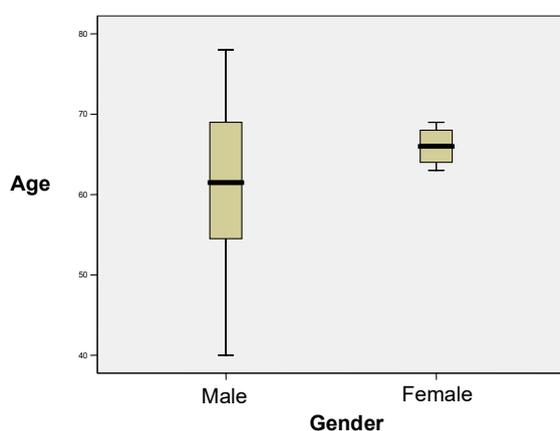


Figure 5: Distribution, according to gender and age, of the patients with diagnosis of esophageal adenocarcinoma in the GCEEID-HCPA in a five year period (1998-2002). n=37.

Most of the patients (67,5%) presented disease in stages III and IV. In 4 cases (10,8%) were not found notation about to the stage. The surgical procedures with curative intention (total gastrectomia and transiatal esofagogastrectomia) had been carried through in 54% of the cases. They had been just submitted to the palliative surgery or they had not received surgical treatment. About the differentiation grade of the tumor, five cases were of well differentiated tumors (13,5%), twenty one was moderately differentiated (56,8%) and ten cases were related the poorly differentiated tumors (27%) (**Table 1**).

Table 1: Characteristics of the patients with diagnosis of esophageal adenocarcinoma in the GCEEID-HCPA in a five year period (1998-2002). n=37

Characteristics	Medida sintese
Age, years	61,9 ± 8,6
Gender	
Male (%)	32 (86,5%)
Female (%)	5 (13,5%)
Staging	
I	4 (10,8%)
II	4 (10,8%)
III	13 (35,1%)
IV	12 (32,4%)
Not informed	4 (10,8%)
Procedure	
Total Gastrectomy	11 (29,7%)
Paliative Surgery	11 (29,7%)
Transiatal Ressection	9 (24,3%)
Biopsy	6 (16,2%)
Histological Grade	
Well Differentiated	5 (13,5%)
Moderately Differentiated	21 (56,8%)
Poorly differentiated	10 (27%)
Not informed	1 (2,7%)

The data are presented as average ± standard deviation or number (percentile)

In the p16 immunohistochemical analysis, it had a good agreement between the observers in the evaluation of the percentage of staining nuclei (Kappa=0,628).

The agreement between the observers about the evaluation of the intensity of the p16 expression in the nuclei was fair (Kappa=0,392).

In the cases with discordance between the observers, the glass slides had been revised by the two pathologists until a consensus was established. For the final analyses, only the consensual results had been considered. The immunohistochemical expression was observed in 32.4% of the analyzed cases. In six cases (16,2%), it had strong expression (it props up 3); in three cases (8,1%) the expression was moderate and in others three cases (8,1%) if verified a weak expression. In twenty and five cases (67,6%), occurred a loss of the imunoistoquímica expression (**Table 2**).

Table 2: Distribution of frequency of immunohistochemical score of p16 in patients with diagnosis of esophageal adenocarcinoma in the GCEEID-HCPA in a five year period (1998-2002).n=37

Score	f	%
0	25	67,6
1	3	8,1
2	3	8,1
3	6	16,2
Total	37	100

In relation to genders, it had protein expression in 10 of the 32 male patients (31,2%) and in two of the five female patients (40%) (p=N.S.).

About the staging, the distribution of the protein expression was of 50% in Stage I (expression in 2 of 4 patients), 50% in Stage II (expression in 2 of 4 patients), 23% in Stage III (expression in 3 of 13 patients) and 41.7% in Stage IV (expression in 5 of 12 patients). There was no protein expression in the 4 patients without staging information. The statistic analysis did not show a significant relation between the staging and the protein expression (p=0,485) (**Figure 6**).

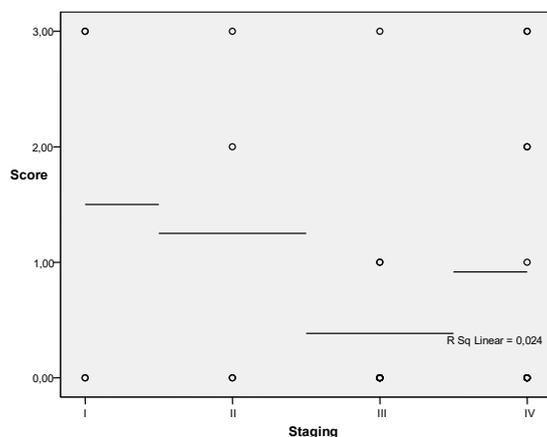


Figure 6: Distribution, according the immunohistochemical score of p16 and the staging of the tumors of the patients with diagnosis of esophageal adenocarcinoma in the GCEEID-HCPA in a five year period (1998-2002). n=37. **p=0,485.**

The distribution of the p16 protein expression between the different surgical approaches was the following one: the group submitted to total gastrotomy had expression in three of eleven patients (27,3%); in the group submitted to palliative surgery, the expression was identified in four of eleven patients (36,4%); in the transiatal resection group, four of the nine patients (44,4%) had expressed the protein and in the group of the patients submitted only to the biopsy, it had protein expression in one of six patients (16,7%) (p=N.S.) (**Table 3**).

Table 3: Distribution of the p16 immunohistochemical expression in relation to gender, staging, surgical procedure and degree of histologic differentiation of the tumors of the patients with diagnosis of esophageal adenocarcinoma in GCEEID-HCPA in a five year period (1998-2002). n=37

p16 expression	12/37 (32,4%)
Gender	
Male	10/32 (31,2%)
Female	2/5 (40%)
Staging	
I	2/4 (50%)
II	2/4 (50%)
III	3/13 (23%)
IV	5/12 (41,7%)
Not informed	0/4 (0%)
Surgical procedure	
Total Gastrectomy	3/11 (27,3%)
Palliative Surgery	4/11 (36,4%)
Transiatal Ressection	4/9 (44,4%)
Biopsy	1/6 (16,7%)
Histologic Grade	
Well differentiated	2/5 (40%)
Moderately differentiated	7/21 (33,1%)
Poorly differentiated	3/10 (30%)
Not informed	0/1 (0%)

Data presented as cases with expression / total cases (percentile)

No significant statistic relation was observed between the p16 immunohistochemical expression and the degree of histologic differentiation of the tumor, when analyzed in relation to it props up it of imunorreativity ($p=0,81$) (**Figure 7**).

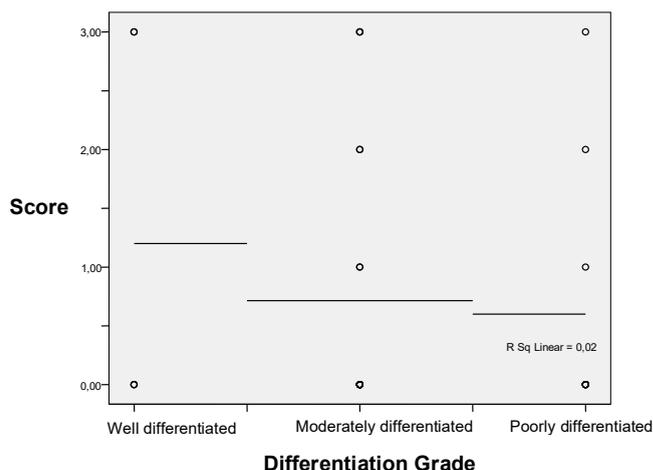


Figure 7: Distribution, according score of p16 immunohistochemical expression and the degree of histologic differentiation of the tumors of the patients with diagnosis of esophageal adenocarcinoma in the GCEEID-HCPA in a five year period (1998-2002). $n=37$. $p=0,81$.

Discussion: Many studies show that the analysis of the p16 protein immunohistochemical expression presents a good correlation with the other methods of analysis of the gene p16 alterations, as the molecular sequencing and the polymerase chain reaction (PCR)(10;23;27-32). This scientific background justified the use of the immunohistochemical method.

The evaluation of the p16 immunohistochemical expression showed a good to fair agreement between the observers, about the criteria of positivity (nuclear coloring) and about the criteria of intensity of the expression. This agreement can be consequence of the active participation of the pathologists in the diverse studies already performed with the casuistry of GCEEID(33-37).

We found only one work published with a clear description of the methodology used in the immunohistochemical analysis of p16 in the esophageal adenocarcinoma(23). In the related study, the cases had been considered negative when less than ten percent of the cells showed nuclear staining. The present study used the same criteria plus the analysis of the expression intensity.

Alterations in the gene p16 had been studied in diverse pre-malignant lesions(21;26;38-41) and malignancies(19;42), as colorectal(28), pancreas(11), cervical(31), salivary glands(29), head and neck(10;14), mesotheliomas(43), osteosarcomas(44), gliomas(45) urinary bladder(46), gastrointestinal stromal tumors(15), ovarian(47), lung(27;31;32), stomach(48) and esophagus(17;23;30;38;41;49;50). A lot of alterations had been already described in the gene p16, being the most frequent hypermethylation and deletions(10;23;27-32;38;41;43;48;49). These alterations are associated to the loss of the p16 protein immunohistochemical expression (10;27-29;31;32;49).

The molecular processes that follow the progression of the Barrett's esophagus to adenocarcinoma had motivated diverse studies, consecrating the BE as the main precursory injury of the esophageal adenocarcinoma(21-23;38;41). Amongst the causes of the BE, the gastroesophageal reflux has a key role(51). Gurski et al.(52) had shown that the antireflux surgery provided reversion of metaplastic and dysplastic lesions of Barrett's esophagus for more benign forms in a significant number of patients. The alterations of p16 in the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence had shown, in some studies(23;38;41), correlation between the degree of histologic alteration and the prevalence of the p16 protein immunohistochemical expression.

In the presented study, no significant relation was observed ($p=0,81$), but seemed to have a trend of loss of the intensity of the expression with the loss of the histologic differentiation. It is possible that a bigger casuistry can confirm this relation in the esophageal adenocarcinoma. There was observed another trend of proportional reduction of staining in stages I, II and III (local and regional progression). In the cases in stage IV (distant metastasis), it did not have this proportion, suggesting that other genetic processes can play a more important role in the process, as the involved in the cellular adhesivity and angiogenesis, for example. Studies with more cases and including the analysis of other genes can evidence the relation between the involved staging and genetic processes.

Papadimitrakopoulou et al.(26), studied the p16 expression in premalignant lesions of the superior aerodigestive tract, submitted to the chemoprophylaxis with no significant correlation of the loss of the expression with the histologic progression for cancer. However, publications had not been found evaluating the response in the Barrett's esophagus, when treated. Studies including treated cases of BE can clarify if p16 in these treated cases holds the protein expression, including the diverse degrees of response. In the esophageal adenocarcinoma, there are few studies that had evaluated p16 showing a high prevalence of alterations in this gene (41% of genetic alterations)(38) and a significant loss of the p16 protein expression (loss of the expression in 86%)(23). Our study found loss of the p16 immunohistochemical expression in 67,6% of the cases and a weak expression in 8,1%. But 24.3% of the cases showed moderate to strong expression.

Conclusion: The results of the present study had demonstrated a low prevalence (32,4%) of the p16 protein immunohistochemical expression in the analyzed cases, indicating an important role of the gene p16 in the process of carcinogenesis of the esophageal adenocarcinoma.

Reference List

- (1) Rudolph RE, Vaughan TL, Storer B. Segment Length and Risk for Neoplastic Progression in Patients with Barrett Esophagus. *Ann Intern Med* 2000 Nov 7;133(9):748.
- (2) Hardy RG, Meltzer SJ, Jankowski JA. ABC of colorectal cancer. Molecular basis for risk factors. *BMJ* 2000 Oct 7;321(7265):886-9.
- (3) Shaheen N, Ransohoff DF. Gastroesophageal reflux, barrett esophagus, and esophageal cancer: scientific review. *JAMA* 2002 Apr 17;287(15):1972-81.
- (4) Katada N, Hinder RA, Smyrk TC, Hirabayashi N, Perdakis G, Lund RJ, et al. Apoptosis is inhibited early in the dysplasia-carcinoma sequence of Barrett esophagus. *Arch Surg* 1997 Jul;132(7):728-33.
- (5) Sabel MS, Pastore K, Toon H, Smith JL. Adenocarcinoma of the esophagus with and without Barrett mucosa. *Arch Surg* 2000 Jul;135(7):831-5.
- (6) Jankowski JA, Perry I, Harrison RF. Gastro-oesophageal cancer: death at the junction. *BMJ* 2000 Aug 19;321(7259):463-4.
- (7) Inadomi JM, Sampliner R, Lagergren J, Lieberman D, Fendrick AM, Vakil N. Screening and surveillance for Barrett esophagus in high-risk groups: a cost-utility analysis. *Ann Intern Med* 2003 Feb 4;138(3):176-86.
- (8) Krishnadath KK, Reid BJ, Wang KK. Biomarkers in Barrett esophagus. *Mayo Clin Proc* 2001 Apr;76(4):438-46.
- (9) Ishii H, Dumon KR, Vecchione A, Fong LY, Baffa R, Huebner K, et al. Potential cancer therapy with the fragile histidine triad gene: review of the preclinical studies. *JAMA* 2001 Nov 21;286(19):2441-9.
- (10) Geisler SA, Olshan AF, Weissler MC, Cai J, Funkhouser WK, Smith J, et al. p16 and p53 Protein expression as prognostic indicators of survival and disease recurrence from head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2002 Nov;8(11):3445-53.

- (11) Gerdes B, Ramaswamy A, Ziegler A, Lang SA, Kersting M, Baumann R, et al. p16INK4a is a prognostic marker in resected ductal pancreatic cancer: an analysis of p16INK4a, p53, MDM2, an Rb. *Ann Surg* 2002 Jan;235(1):51-9.
- (12) Kamoshida S, Matsuoka H, Shiogama K, Matsuyama A, Shimomura R, Inada K, et al. Immunohistochemical analysis of thymidylate synthase, p16(INK4a), cyclin-dependent kinase 4 and cyclin D1 in colorectal cancers receiving preoperative chemotherapy: significance of p16(INK4a)-mediated cellular arrest as an indicator of chemosensitivity to 5-fluorouracil. *Pathol Int* 2004 Aug;54(8):564-75.
- (13) Tytgat GN, Bartelink H, Bernards R, Giaccone G, van Lanschot JJ, Offerhaus GJ, et al. Cancer of the esophagus and gastric cardia: recent advances. *Dis Esophagus* 2004;17(1):10-26.
- (14) Yuen PW, Man M, Lam KY, Kwong YL. Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol* 2002 Jan;55(1):58-60.
- (15) Schneider-Stock R, Boltze C, Lasota J, Miettinen M, Peters B, Pross M, et al. High prognostic value of p16INK4 alterations in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2003 May 1;21(9):1688-97.
- (16) Biankin AV, Biankin SA, Kench JG, Morey AL, Lee CS, Head DR, et al. Aberrant p16(INK4A) and DPC4/Smad4 expression in intraductal papillary mucinous tumours of the pancreas is associated with invasive ductal adenocarcinoma. *Gut* 2002 Jun;50(6):861-8.
- (17) Sturm I, Petrowsky H, Volz R, Lorenz M, Radetzki S, Hillebrand T, et al. Analysis of p53/BAX/p16(ink4a/CDKN2) in esophageal squamous cell carcinoma: high BAX and p16(ink4a/CDKN2) identifies patients with good prognosis. *J Clin Oncol* 2001 Apr 15;19(8):2272-81.
- (18) Brabender J, Marjoram P, Salonga D, Metzger R, Schneider PM, Park JM, et al. A multigene expression panel for the molecular diagnosis of Barrett's esophagus and Barrett's adenocarcinoma of the esophagus. *Oncogene* 2004 Jun 10;23(27):4780-8.
- (19) Kubo A, Nakagawa K, Varma RK, Conrad NK, Cheng JQ, Lee WC, et al. The p16 status of tumor cell lines identifies small molecule inhibitors specific for cyclin-dependent kinase 4. *Clin Cancer Res* 1999 Dec;5(12):4279-86.

- (20) Tang KS, Guralnick BJ, Wang WK, Fersht AR, Itzhaki LS. Stability and folding of the tumour suppressor protein p16. *J Mol Biol* 1999 Jan 29;285(4):1869-86.
- (21) Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001 Mar;233(3):322-37.
- (22) Jenkins GJ, Doak SH, Parry JM, D'Souza FR, Griffiths AP, Baxter JN. Genetic pathways involved in the progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma. *Br J Surg* 2002 Jul;89(7):824-37.
- (23) Bian YS, Osterheld MC, Fontolliet C, Bosman FT, Benhattar J. p16 inactivation by methylation of the CDKN2A promoter occurs early during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002 Apr;122(4):1113-21.
- (24) Doak SH, Jenkins GJ, Parry EM, D'Souza FR, Griffiths AP, Toffazal N, et al. Chromosome 4 hyperploidy represents an early genetic aberration in premalignant Barrett's oesophagus. *Gut* 2003 May;52(5):623-8.
- (25) Remmele W, Schicketanz KH. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs. subjective grading (IRS). *Pathol Res Pract* 1993 Sep;189(8):862-6.
- (26) Papadimitrakopoulou VA, Izzo J, Mao L, Keck J, Hamilton D, Shin DM, et al. Cyclin D1 and p16 alterations in advanced premalignant lesions of the upper aerodigestive tract: role in response to chemoprevention and cancer development. *Clin Cancer Res* 2001 Oct;7(10):3127-34.
- (27) Awaya H, Takeshima Y, Amatya VJ, Furonaka O, Tagawa K, Kohno N, et al. Inactivation of the p16 gene by hypermethylation and loss of heterozygosity in adenocarcinoma of the lung. *Pathol Int* 2004 Jul;54(7):486-9.
- (28) Schneider-Stock R, Boltze C, Peters B, Hopfner T, Meyer F, Lippert H, et al. Differences in loss of p16INK4 protein expression by promoter methylation between left- and right-sided primary colorectal carcinomas. *Int J Oncol* 2003 Oct;23(4):1009-13.
- (29) Nishimine M, Nakamura M, Kishi M, Okamoto M, Shimada K, Ishida E, et al. Alterations of p14ARF and p16INK4a genes in salivary gland carcinomas. *Oncol Rep* 2003 May;10(3):555-60.
- (30) Xing EP, Nie Y, Wang LD, Yang GY, Yang CS. Aberrant methylation of p16INK4a and deletion of p15INK4b are frequent events in human esophageal cancer in Linxian, China. *Carcinogenesis* 1999 Jan;20(1):77-84.

- (31) Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA, Baylin SB, Herman JG. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Oct 26;96(22):12754-9.
- (32) Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Sep 29;95(20):11891-6.
- (33) Cavazzola LT, Rosa AR, Schirmer CC, Gurski RR, Telles JPB, Mielke F, et al. Immunohistochemical evaluation for p53 and VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor) is not prognostic for long term survival in end stage esophageal adenocarcinoma. *Dis Esophagus*. In press 2005.
- (34) Rosa AR, Gurski RR, Schirmer CC, Brentano L, Kruehl CD. Survival and prognostic factors in patients with resected epidermoid oesophageal carcinoma. *Int Surg* 1999 Jul;84(3):193-8.
- (35) Villwock MM. Prevalência da expressão da proteína p21 nos pacientes com adenocarcinoma do esôfago atendidos no Grupo de Cirurgia de Esôfago e Estômago do Hospital de clínicas de Porto Alegre, no período de 1998 a 2002. Porto Alegre - RS: Curso de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.
- (36) Meurer L. Densidade microvascular intratumoral e expressão imuno-histoquímica de p21: associação com sobrevida em pacientes submetidos à cirurgia por carcinoma epidermóide de esôfago. Curso de Pós-graduação em Medicina: Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003.
- (37) Sander EB. Expressão de HER-2/neu e p53 em adenocarcinoma de esôfago e cárdia Curso de Pós-graduação em Medicina: Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2001.
- (38) Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, Long TI, Kurumboor SK, Bernstein L, et al. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001 Apr 15;61(8):3410-8.
- (39) Shahnava SA, Bradley G, Regezi JA, Thakker N, Gao L, Hogg D, et al. Patterns of CDKN2A gene loss in sequential oral epithelial dysplasias and carcinomas. *Cancer Res* 2001 Mar 15;61(6):2371-5.
- (40) Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, et al. p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol* 2003 Jan;56(1):56-63.

- (41) Wong DJ, Paulson TG, Prevo LJ, Galipeau PC, Longton G, Blount PL, et al. p16(INK4a) lesions are common, early abnormalities that undergo clonal expansion in Barrett's metaplastic epithelium. *Cancer Res* 2001 Nov 15;61(22):8284-9.
- (42) Sasaki S, Kitagawa Y, Sekido Y, Minna JD, Kuwano H, Yokota J, et al. Molecular processes of chromosome 9p21 deletions in human cancers. *Oncogene* 2003 Jun 12;22(24):3792-8.
- (43) Hirao T, Bueno R, Chen CJ, Gordon GJ, Heilig E, Kelsey KT. Alterations of the p16(INK4) locus in human malignant mesothelial tumors. *Carcinogenesis* 2002 Jul;23(7):1127-30.
- (44) Nielsen GP, Burns KL, Rosenberg AE, Louis DN. CDKN2A gene deletions and loss of p16 expression occur in osteosarcomas that lack RB alterations. *Am J Pathol* 1998 Jul;153(1):159-63.
- (45) Ishii N, Maier D, Merlo A, Tada M, Sawamura Y, Diserens AC, et al. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol* 1999 Jul;9(3):469-79.
- (46) Asamoto M, Iwahori Y, Okamura T, Shirai T, Tsuda H. Decreased expression of the p16/MTS1 gene without mutation is frequent in human urinary bladder carcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 1997 Feb;27(1):22-5.
- (47) Brown I, Milner BJ, Rooney PH, Haites NE. Inactivation of the p16INK4A gene by methylation is not a frequent event in sporadic ovarian carcinoma. *Oncol Rep* 2001 Nov;8(6):1359-62.
- (48) Ficorella C, Cannita K, Ricevuto E, Toniato E, Fusco C, Sinopoli NT, et al. P16 hypermethylation contributes to the characterization of gene inactivation profiles in primary gastric cancer. *Oncol Rep* 2003 Jan;10(1):169-73.
- (49) Xing EP, Nie Y, Song Y, Yang GY, Cai YC, Wang LD, et al. Mechanisms of inactivation of p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999 Oct;5(10):2704-13.
- (50) Tokugawa T, Sugihara H, Tani T, Hattori T. Modes of silencing of p16 in development of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2002 Sep 1;62(17):4938-44.

- (51) Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998 Nov 15;83(10):2049-53.
- (52) Gurski RR, Peters JH, Hagen JA, DeMeester SR, Bremner CG, Chandrasoma PT, et al. Barrett's esophagus can and does regress after antireflux surgery: a study of prevalence and predictive features. *J Am Coll Surg* 2003 May;196(5):706-12.