

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA GERAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO:

**PREVALÊNCIA DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA p21  
EM ADENOCARCINOMA DO ESÔFAGO.**

Aluno: Maitê de Mello Villwock

Orientador: Prof. Dr. Carlos Cauduro Schirmer

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Albano Edelweiss

Porto Alegre, março de 2004

**MAITÊ DE MELLO VILLWOCK**

**PREVALÊNCIA DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA p21  
EM ADENOCARCINOMA DO ESÔFAGO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Medicina, área de cirurgia geral  
da Faculdade de Medicina da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre, março de 2004.

**V761p** Villwock, Maitê de Mello

Prevalência da expressão imunoistoquímica da proteína p21em adenocarcinoma do esôfago / Maitê de Mello Villwock ; orient. Carlos Cauduro Schirmer ; co-orient. Maria Isabel Albano Edelweiss. – 2004.  
86 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia. Porto Alegre, BR-RS, 2004.

1. Neoplasias esofágicas : Epidemiologia 2. Adenocarcinoma : Epidemiologia 3. Proteína p21 4. Esôfago de Barrett 5. Hospital de Clínicas de Porto Alegre I. Schirmer, Carlos Cauduro II. Edelweiss, Maria Isabel Albano III. Título.

NLM: WI 250

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Aos meus pais, pelo apoio, incentivo e colaboração integral, especialmente, pelo amor incondicional. Ao meu pai, pelo exemplo constante de formação e dedicação acadêmica, e à minha mãe, pelo exemplo de mulher.

Ao meu irmão, Luís Humberto, e à minha cunhada, Carla, pelo exemplo, e à minha afilhada, Ana Luiza, pela alegria contagiante.

Ao Kim, pelo amor e companheirismo total, e pelas incansáveis ajudas na informática.

*Aventurar-se causa ansiedade,  
mas deixar de arriscar-se é perder a si  
mesmo... e aventurar-se no sentido mais  
elevado é precisamente tomar consciência  
no sentido de si próprio.*

*Kierkegaard*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Carlos Cauduro Schirmer, por ser tranquilo sem ser distante, mantendo a calma até quando os primeiros projetos não deram certo, não desanimando e sempre mantendo o bom humor, que é fundamental nesses momentos. Por ser exemplo de professor e cirurgião, conciliando a vida acadêmica e a de profissional liberal.

À minha Co-Orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Isabel Edelweiss, minha mãe acadêmica e também minha paraninfa, que me deu a oportunidade de fazer o meu primeiro trabalho, em que recebi minha primeira bolsa de iniciação científica.

À Doutora Luíse Meurer, por ter sido também uma Co-Orientadora, estando sempre disposta a esclarecer dúvidas, orientar bibliografia, mantendo sempre o incentivo, além da contribuição fundamental na análise das lâminas.

À minha grande família, por terem agüentado os maus momentos e nunca permitirem o desânimo. Por serem exemplo de que amor e trabalho podem andar juntos.

Ao Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Krueel, por ser responsável pela manutenção da pesquisa científica, por seu exemplo como profissional e, principalmente, como pessoa.

Ao Dr. Aljamir Chedid e à Dra. Maria Bernadete Fernandes Chedid, por terem me incentivado profissionalmente.

Ao acadêmico Márcio Chedid, pela presteza na coleta de bibliografias e nos experimentos. Por estar sempre disponível e de bom humor.

À Dra. Lúcia Helena Severo Kluwe Carvalhal, pelo convívio e amizade, pelo exemplo como Mestre.

Ao Dr. Mário Henrique Osanai, pela amizade, conhecimento e rigor científico.

Ao Dr. Leandro Totti Cavazzola, pelo exemplo de empenho científico e dedicação ao ensino desde os tempos da faculdade, onde era um monitor admirado e respeitado por todos, sendo hoje um Doutor tão jovem.

À Sra. Helen Flores, bibliotecária-chefe, pela colaboração na elaboração da ficha catalográfica.

Ao Dr. Mário Bernardes Wagner, pelo auxílio na análise estatística.

Aos pacientes avaliados, por permitirem o estudo científico.

Ao Serviço de Arquivo Médico e de Informações em Saúde (SAMIS), por disponibilizar os prontuários.

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

Ao Centro de Pesquisas, na pessoa da Sra. Rosane Schlatter, 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), pelo apoio e suporte em todas as etapas deste estudo.

Ao Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE), pelo auxílio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo incentivo à pesquisa neste país, fornecendo bolsas de mestrado, inclusive para esta mestranda.

À Sra. Estela Maris Emer Araripe, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, pela eficiência e amizade, por estar sempre esclarecendo, incentivando e solucionando.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, por ter me aceitado como mestranda e ter possibilitado este estudo.



**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>1</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>14</b>
<b>3. OBJETIVO</b>	<b>15</b>
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>16</b>
4.1. Pacientes	16
4.2. Imunoistoquímica	17
4.3. Delineamento	20
<b>5. ÉTICA</b>	<b>21</b>
<b>6. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>22</b>
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>23</b>
<b>8. DISCUSSÃO</b>	<b>27</b>
<b>9. CONCLUSÃO</b>	<b>31</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	<b>32</b>
<b>11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>33</b>
<b>12. ANEXOS</b>	<b>39</b>
12.1. Protocolo	39
12.2. Artigo Científico em Língua Portuguesa	40
12.3. Artigo Científico em Língua Inglesa	57

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1 :** Expressão imunoistoquímica negativa de p21 (400X) **18**
- Figura 2 :** Expressão imunoistoquímica fraca de p21 (400X) **18**
- Figura 3 :** Expressão imunoistoquímica moderada de p21 (400X) **19**
- Figura 4 :** Expressão imunoistoquímica forte de p21 (400X) **19**
- Figura 5 :** Histograma representando a distribuição de frequências do p21, destacando a proporção de observações com expressão positiva (escore  $\geq 3$ ) em pacientes com adenocarcinoma de esôfago identificados em um período de cinco anos, n=42, HCPA, 1998-2002. **24**
- Figura 6 :** Gráfico de “dot-plot” representando a distribuição dos valores do escore de imunorreatividade do p21 em pacientes com adenocarcinoma de esôfago, segundo diferenciação histológica (BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pouco diferenciado), identificados em um período de cinco anos, n=42, HCPA, 1998-2002. **26**

## **LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1** : Características dos pacientes com adenocarcinoma de esôfago identificados em um período de cinco anos, n=42, HCPA, 1998-2002. **23**
- Tabela 2** : Distribuição de frequência do p21 e proporção de observações com expressão positiva (escore  $\geq 3$ ) em pacientes com adenocarcinoma de esôfago identificados em um período de cinco anos, n=42, HCPA, 1998-2002. **24**
- Tabela 3** : Avaliação de concordância entre dois patologistas quanto ao grau de intensidade de coloração do p21 em lâminas (400X) de pacientes com adenocarcinoma de esôfago identificados em um período de cinco anos, n=42, HCPA, 1998-2002 **25**
- Tabela 4** : Avaliação de concordância entre dois patologistas quanto ao grau de expressão de células positivas para p21 por campo em lâminas (400X) de pacientes com adenocarcinoma de esôfago identificados em um período de cinco anos, n=42, HCPA, 1998-2002. **25**
- Tabela 5** : Avaliação de concordância entre dois patologistas quanto ao escore de imunorreatividade do p21 em lâminas (400X) de pacientes com adenocarcinoma de esôfago identificados em um período de cinco anos, n=42, HCPA, 1998-2002. **26**

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

APC - Gene supressor tumoral da Polipose Adenomatosa Colônica/ *Adenomatous Polyposis Coli*

BRCA1 - Gene para câncer de mama 1/ *breast cancer gene 1*

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CDK - Quinases ciclina-dependentes

CDKN2A - Quinases ciclina-dependentes N2A

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

EB - Esôfago de Barrett

ERBB2 - Oncogene v-erb-b2/ *erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 = c-erbB2*

Fase G0 - Fase do ciclo celular (gap 0)

Fase G1 - Fase do ciclo celular (gap 1)

Fase G2 - Fase do ciclo celular (gap 2)

Fase M - Mitose

Fase S - Síntese

FHIT - Gene da Tríade da Histidina Frágil/ *Fragile Histidine Triad Gene*

FIPE - Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos

GCEE - Grupo de Cirurgia de Esôfago e Estômago

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

IGCA - Associação Internacional de Câncer Gástrico/ *International Gastric Cancer Association*

INCA - Instituto Nacional do Câncer

IRS - Sistema de Escore de Imunorreatividade/ *Immunoreactivite Scoring System*

ISDE - Sociedade Internacional para Doenças do Esôfago/ *International Society for Diseases of the Esophagus*

MDA-6 - Proteína associada à diferenciação de melanomas

MSI - Instabilidade Microssatélite

p21 - =MDA-6=SDI1=WAF1/CIP1 gene supressor tumoral

p27<sup>Kip1</sup> - Proteína p27

p53 - Proteína p53

PCNA - Antígeno Nuclear da Célula Proliferante

pRb - Fosfoproteína nuclear do gene do retinoblastoma

Rb - Gene do retinoblastoma

SAMIS - Serviço de Arquivo Médico e de Informações em Saúde

SDI1 - Inibidor derivado de células senescentes

SPSS - Pacote Estatístico para Ciências Sociais/ *Statistical Package for the Social Sciences*

TP53 - Gene p53

VEGF - Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

WAF1/CIP1 - Fragmento associado ao p53 selvagem 1/ proteína interagindo com cdK 1/

*wild type p53 associated fragment 1/ cdK-interacting protein 1*

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** No mundo ocidental, a prevalência de adenocarcinoma da junção esofagogástrica vem crescendo nas últimas décadas. Atualmente, é aceito que o adenocarcinoma do esôfago se desenvolve de uma lesão pré-maligna: esôfago de Barrett. Este carcinoma é de difícil diagnóstico nos seus estágios iniciais, o que resulta em uma mortalidade significativa. O estudo da biologia molecular tem demonstrado que grande parte dos tumores malignos tem origem na interação entre o componente hereditário e influências externas, que em indivíduos predispostos podem ocasionar alterações genéticas que influenciem o controle da diferenciação e crescimento celular. O p21<sup>(WAF1/CIP1)</sup> tem um papel fundamental na regulação do ciclo celular, e sua expressão imunohistoquímica tem sido estudada em diversos tumores, mostrando influência no prognóstico de várias neoplasias.

**OBJETIVO:** Verificar a prevalência da expressão da proteína p21 em pacientes com adenocarcinoma de esôfago diagnosticados nos últimos cinco anos no Grupo de Cirurgia de Esôfago e Estômago do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GCEE/HCPA).

**METODOLOGIA:** A população em estudo foi constituída de 42 pacientes com adenocarcinoma de esôfago diagnosticados no GCEE/HCPA entre janeiro de 1998 e dezembro de 2002. A expressão da proteína p21 foi realizada por meio de imunohistoquímica, com anticorpo primário, p21, clone SX118, código M7202 da DAKO, e avaliada de acordo com o Sistema de Escore de Imunoreatividade (Immunoreactive scoring system – IRS).

**RESULTADOS:** Foram estudados 42 pacientes. 83,3% eram do sexo masculino, com idade superior a 40 anos. Destes, 56,2% foram submetidos a procedimentos cirúrgicos com intenção curativa: Gastrectomia total e Esofagogastrectomia transiatal. Os demais foram submetidos à cirurgia paliativa ou não sofreram tratamento cirúrgico. Apenas cinco pacientes receberam tratamento adjuvante com quimioterapia e radioterapia, isoladas ou combinadas. Quanto ao estadiamento, 78,6% dos pacientes apresentavam doença avançada, estádios III e IV. Apenas 9 apresentaram positividade para o p21, quando considerado o Sistema de Escore de Imunoreatividade (em que p21+ é  $\geq 3$ ).

**CONCLUSÃO:** A proteína p21 esteve expressa em 9 dos 42 pacientes (21,4%) com adenocarcinoma de esôfago diagnosticados nos últimos cinco anos no Grupo de Cirurgia de Esôfago e Estômago do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Nessa casuística, o acúmulo de p21 não se mostrou essencial no processo de carcinogênese do adenocarcinoma esofágico.

**Palavras-chave:** esôfago, neoplasia de esôfago, adenocarcinoma de esôfago, câncer de esôfago, Barrett, p21, WAF1, CIP1, carcinogênese, imunohistoquímica.

## **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** In western societies, the prevalence of adenocarcinoma of the gastroesophageal junction has increased in recent years. It is commonly accepted today that esophageal adenocarcinoma develops from a premalignant lesion: Barrett's esophagus. This type of carcinoma is hardly diagnosed at early stages, which results in significant mortality. Molecular biology studies have shown that most malignant tumors originate from the interaction between inherited characteristics and external factors, which may cause genetic changes that interfere with the control over the differentiation and growth of cells in susceptible individuals. p21<sup>(WAF1/CIP1)</sup> has a key role in the regulation of the cell cycle, and its immunohistochemical expression has been investigated in several tumors, showing that it influences the prognosis of various neoplasms.

**OBJECTIVE:** To check the prevalence of p21 protein expression in patients with esophageal adenocarcinoma diagnosed in the last five years by the Group for Surgeries of the Esophagus and Stomach of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GCEE/HCPA).

**METHODS:** The study population consisted of 42 patients with esophageal adenocarcinoma diagnosed by the GCEE/HCPA between January 1998 and December 2002. The expression of p21 protein was determined by immunohistochemistry using primary antibody, p21, clone SX118, code M7202 (Dako), and assessed according to the Immunoreactive scoring system (IRS).

**RESULTS:** Of 42 analyzed patients, 83.3% were male and older than 40 years. Among these, 56.2% were submitted to curative resection: total gastrectomy and transhiatal esophagogastrectomy. The remaining patients were submitted to palliative surgery or did not undergo any surgical treatment. Only five patients received adjuvant chemotherapy and radiation therapy, either alone or combined. Advanced disease (stages III and IV) was detected in 78.6% of the patients. Only nine patients were positive for p21, according to the immunoreactive scoring system (p21+  $\geq$  3).

**CONCLUSION:** p21 was expressed in 9 of 42 patients (21.4%) with esophageal adenocarcinoma diagnosed in the last five years by the Group for Surgeries of the Esophagus and Stomach of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. In our patient population, the accumulation of p21 did not play a key role in the carcinogenesis of esophageal adenocarcinoma.

**Key words:** esophagus, esophageal neoplasm, esophageal adenocarcinoma, esophageal cancer, Barrett's esophagus, p21, WAF1, CIP1, carcinogenesis, immunohistochemistry.

## **1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA**

No mundo ocidental, a prevalência de adenocarcinoma da junção esofagogástrica vem crescendo nas últimas décadas (1-4), principalmente quando em comparação com a estabilidade ou diminuição da incidência do carcinoma epidermóide do esôfago (5). Esse crescimento corresponderia a um aumento na incidência do esôfago de Barrett (3). Segundo diversos autores, entre eles, Wijnhoven e Jenkins, esse crescimento excede ao de qualquer outra neoplasia maligna (3,4).

Segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer), para o ano de 2003, no Brasil o câncer de esôfago (todos os tipos histológicos) foi a nona incidência entre os cânceres em geral e ocupou o sexto lugar nos óbitos por câncer (6). Representou, no Rio Grande do Sul, a terceira causa de óbito por câncer entre homens em 2003, com coeficiente de mortalidade de 12,03 óbitos/100.000 habitantes, superado apenas pelos cânceres de pulmão e próstata (6). Nos Estados Unidos da América, entre 1988 e 1990, a incidência do adenocarcinoma de esôfago foi quatro vezes maior em homens brancos do que em homens negros. A incidência foi oito vezes maior (2,5 versus 0,3/100.000/ano) em homens brancos comparados com mulheres brancas. A incidência também varia entre os diferentes países europeus, sendo maior na Inglaterra (6,9/100.000/ano, homens) e menor na Finlândia (0,9/100.000/ano, homens) e na República Tcheca (0,5/100.000/ano, homens) (7).

Atualmente, é aceito que o adenocarcinoma do esôfago origina-se de uma lesão pré-maligna – o esôfago de Barrett (EB). O EB é uma alteração metaplásica do epitélio escamoso normal do esôfago para um epitélio do tipo colunar, como consequência do refluxo gastroesofágico de longa data, o que predispõe o indivíduo afetado a desenvolver adenocarcinoma (3,4,8-12). O risco de adenocarcinoma em pacientes com EB parece ser



aproximadamente 30-125 vezes maior que o da população em geral, com uma incidência estimada de 1 em 180 pacientes/ano (4). Alguns autores, no entanto, obtiveram resultados diferentes. O estudo de Murray e cols., por exemplo, que envolveu uma coorte de 2.969 pacientes, conclui que pacientes com EB têm baixo risco de desenvolver adenocarcinoma esofágico. No mesmo trabalho, porém, o risco foi quase exclusivo dos pacientes que exibiam metaplasia intestinal especializada (13). Isso reforça a importância da presença de células caliciformes, ou seja, de metaplasia intestinal como critério necessário para caracterizar o EB. O Comitê do Colégio Americano de Gastroenterologia e outros autores definem o EB pela presença de um epitélio colunar visível endoscopicamente, com biópsia confirmando presença de metaplasia intestinal (5,12,14-16). O diagnóstico endoscópico se faz quando o epitélio escamoso normal, de aparência brancacenta, é substituído por um epitélio colunar tipo intestinal, vermelho brilhante e de aparência aveludada (7,16-18). Devido à forte associação entre Barrett e adenocarcinoma do esôfago, recomenda-se seguimento endoscópico periódico dos pacientes com Barrett, operados ou não, para se detectar adenocarcinoma nos estágios iniciais (potencialmente curáveis) (5). O segmento da metaplasia exige exame endoscópico regular com biópsias em quadrantes de 2 cm. No presente momento, a detecção histológica de displasia é o principal meio de se acessar o risco de progressão para câncer (3).

O EB representaria o primeiro passo numa seqüência para adenocarcinoma do esôfago. O epitélio colunar metaplásico, contendo células caliciformes, poderia progredir para uma displasia de baixo grau, de alto grau e, finalmente, para adenocarcinoma (3,5,8). Os segmentos metaplásicos de Barrett podem variar no comprimento – de fato, o comprimento do segmento representa um importante fator na progressão da doença. A metaplasia pode ser dividida em um segmento curto (menos de 3 cm) ou um segmento

longo (mais do que 3 cm). O risco de se desenvolver um adenocarcinoma é diretamente proporcional ao comprimento do segmento. Segmentos longos de metaplasia representam o fator de risco mais importante de progressão para adenocarcinoma (3). No atual momento, a metaplasia intestinal, mesmo num segmento curto, é considerada pré-maligna (19). No estudo de Gurski e cols., que avaliou os fatores preditivos para regressão histopatológica do EB, a presença de um segmento curto foi o único fator independente para esta regressão (12).

Uma série de alterações genéticas tem sido correlacionada com a seqüência metaplasia-displasia-carcinoma da doença do refluxo gastroesofágico. Estudos prospectivos de biópsias feitas por endoscopia mostram que as alterações no TP53 e CDKN2A ocorrem nos estágios iniciais. Na neoplasia intra-epitelial de alto grau, que ocorre no carcinoma epidermóide do esôfago, a prevalência encontrada de mutações do TP53 é de aproximadamente 60%, semelhante ao adenocarcinoma. A mutação em um alelo freqüentemente é acompanhada pela perda de outro (17p13.1). As mutações ocorrem em células diplóides e precedem a aneuploidia. Entre outras alterações precoces em estágios pré-malignos de metaplasia, estão alterações na transcrição do FHIT, um gene presuntivamente supressor tumoral. Uma série de outros “*loci*” é alterada relativamente tarde durante o desenvolvimento do adenocarcinoma, sem uma seqüência obrigatória de eventos. Alterações prevalentes (>50%) incluem perda de heterozigidade nos cromossomos 4 (braço longo) e 5 (vários “*loci*”, incluindo APC) e amplificação do ERBB2 (8,18).

O carcinoma de esôfago (em todos os seus subtipos histológicos) é uma neoplasia difícil de ser identificada nos seus estágios iniciais, por ser assintomática. O diagnóstico em estádios mais avançados resulta em uma mortalidade significativa (10,20). Tem um

prognóstico extremamente pobre, já que metástases estão muitas vezes presentes no momento da sua descoberta (8). As metástases linfonodais ocorrem mais frequentemente nos cânceres esofágicos em comparação às outras malignidades gastrintestinais, o que piora o prognóstico. Cerca de 40% dos carcinomas esofágicos com invasão da submucosa apresentam metástases linfonodais, e somente 60% dos pacientes com invasão da submucosa sobrevivem 5 anos (21).

Embora todas as neoplasias malignas do esôfago e estômago sejam caracterizadas por uma alta taxa de mortalidade, o adenocarcinoma do esôfago tem uma taxa particularmente alta, com sobrevida média, para pacientes com estágio avançado, menor que 20% (5).

Esse prognóstico ruim para a maioria dos pacientes com câncer de esôfago, tanto para adenocarcinoma, quanto para carcinoma epidermóide, trouxe o uso de estratégias terapêuticas alternativas, incluindo o uso de terapia multimodal (20). Apesar dos aparentes avanços, o amplo uso de quimioterapia e/ou radioterapia não tem sido bem-sucedido em melhorar a sobrevivência em geral (20). Essa falta de eficácia pode estar relacionada tanto à falta de potência do regime terapêutico, quanto à aplicação dessa terapêutica a uma população de pacientes não bem selecionados (20).

A apresentação clínica, na maior parte das vezes, é lenta. Os pacientes são referendados em quase sua totalidade com disfagia e perda de peso. Esses sintomas normalmente são tardios no processo da doença (22).

Existe uma crescente evidência de que os adenocarcinomas do cárdia, da junção esofagogastrica e do esôfago compartilhem similaridades que sugerem uma etiologia comum (11). A localização desses tumores na transição entre o esôfago e o estômago mostra muitas discrepâncias na literatura a respeito de sua causa e classificação. Siewert e

cols. propuseram uma classificação desse tumor em três tipos, com base em critérios puramente anatômicos e topográficos (1,2). Esta classificação foi aceita em um consenso entre a *International Gastric Cancer Association (IGCA)* e a *International Society for Diseases of the Esophagus (ISDE)*, em 1998. São definidos e descritos como adenocarcinomas da junção esofagogástrica os tumores que têm o seu centro entre os cinco centímetros proximais e distais do cárdia anatômico. Classificam-se os seguintes tipos conforme a localização do tumor (1,2):

Tipo I            Adenocarcinoma do esôfago distal que usualmente se origina em uma área com metaplasia intestinal especializada do esôfago (isto é, EB) e que pode infiltrar a junção esofagogástrica.

Tipo II            Carcinoma verdadeiro de cárdia surgindo no epitélio cárdico ou em curtos segmentos com metaplasia intestinal na junção esofagogástrica; essa entidade também é referida como “carcinoma juncional”.

Tipo III            Carcinoma gástrico subcárdico que infiltra a junção esofagogástrica e o esôfago distal.

A classificação da lesão em um dos três tipos é puramente morfológica e baseada na localização anatômica do centro do tumor ou, em pacientes com tumor avançado, na localização da massa tumoral (1,2).

A alta proporção de pacientes que se apresentam com doença avançada, combinada com a resposta pobre ao tratamento, incentiva uma pesquisa de melhores métodos de identificar pacientes em estádios iniciais, potencialmente melhor tratáveis (5).

É geralmente aceito que um processo de múltiplos passos de alterações genéticas e epigenéticas causa a transformação de uma célula normal em uma célula tumoral maligna (4). Essas alterações tornam a célula independente da regulação proliferativa e do ciclo de

morte celular, e também infundem na célula capacidades proliferativas, infiltrativas e metastatizantes (4).

Segundo Aloia, a análise de marcadores imunoistoquímicos em pacientes com câncer esofágico pode ser usada para rastreamento, diagnóstico precoce, prognóstico, detecção de metástases ocultas e determinação de quimiorresistência (20).

Recentemente, vários oncogenes e genes supressores tumorais foram encontrados mutados em neoplasias humanas (11,21).

Acredita-se que pelo menos 5 a 10 alterações genéticas sejam necessárias para gerar um fenótipo maligno. A maioria dos tumores é caracterizada por instabilidade genômica, facilitando o acúmulo de mutações. A instabilidade genômica ocorre em duas formas diferentes: uma caracterizada por instabilidade microssatélite (MSI) e outra por instabilidade cromossomal. Os alvos da instabilidade genômica são quatro classes de genes: proto-oncogenes, genes supressores tumorais, genes de reparo do emparelhamento (“mismatch repair genes”) e genes dos pontos de controle mitótico (“mitotic checkpoint genes”) (4,23).

Os proto-oncogenes são genes dominantes que agem na transdução do estímulo extracelular para o núcleo ou na regulação da expressão gênica, e têm um papel na proliferação celular ou inibição de apoptose. Quando ativados por mutação, amplificação, translocação e outros, esses genes se transformam em oncogenes com atividade constitutiva, não-regulada. Isso resulta em estimulação excessiva da proliferação celular ou prevenção de apoptose, e ambos contribuem para formação tumoral (3,4,24).

Os genes supressores tumorais são genes celulares normais que primariamente estão envolvidos na proliferação celular, apoptose, adesão celular e regulação da expressão gênica. São genes recessivos, o que significa que ambas as cópias gênicas precisam ser

inativadas para contribuírem com a gênese tumoral (4,24,25).

Uma deficiência no reparo do emparelhamento leva a uma ampla acumulação de mutações no genoma, também nos proto-oncogenes e nos genes supressores tumorais, assim, contribuindo para origem de neoplasia (4).

Uma inativação dos pontos de controle mitótico resulta em instabilidade cromossômica e num número anormal de cromossomos (aneuploidia) (4). Aneuploidia tem sido fortemente implicada na progressão da doença e prediz o desenvolvimento do adenocarcinoma (3).

A instabilidade genômica ao nível do nucleotídeo ou do cromossomo finalmente leva à ativação dos proto-oncogenes e inativação dos genes supressores tumorais. Não existem proto-oncogenes ou genes supressores tumorais que sejam ativados ou deletados em todas as neoplasias malignas. Mesmo tumores comparáveis do mesmo órgão e tipo celular nunca compartilham completamente alterações nos mesmos oncogenes e genes supressores tumorais (3,4).

O câncer é freqüentemente descrito como uma doença do ciclo celular (3), portanto, para se entender o câncer é preciso compreender a proliferação celular e como ela é controlada (26).

No centro da proliferação celular está o ciclo de divisão celular, o processo pelo qual a célula cresce, replica seu DNA e então se divide para originar duas células filhas. Esse processo é dividido em fases seqüenciais (26), explicadas a seguir: Mitose (fase M) é o processo de divisão nuclear. Replicação do DNA ocorre na fase S (síntese). O intervalo entre a fase M e a fase S é chamado de fase G1 (gap), e o intervalo entre o fim da fase S e o início da fase M é a fase G2. As células podem sair do ciclo e entrar na fase G0, que é o estado quiescente (4).

Existe um conceito-chave sobre o ciclo celular dando conta de que a fase S deve sempre seguir a fase M e de que a fase M não deve começar até que a fase S tenha terminado. De outra forma, a replicação do DNA não deve começar até que a mitose seja completada, e a mitose não deve começar até que a replicação prévia do DNA tenha terminado, pois assim se mantém a integridade do genoma (26).

Após dano no DNA, a célula pára na transição entre G1 e S ou entre G2 e M do ciclo celular, com conteúdo do DNA em 2N ou 4N, respectivamente. As paradas, nesses pontos de controle, previnem a replicação e a mitose do DNA na presença de alterações cromossomais não-reparadas (27). A proporção de células que param em G1-S ou G2-M depende do tipo celular, das condições de crescimento e dos comandos dos pontos de controle que estão operando nas células (27). A parada em G1-S resulta, em parte, na síntese de p21 dependente do p53, que leva à inibição dos complexos ciclina-CDK, complexo necessário para a transição da fase G1 para S (27).

A divisão das populações de células normais mantém o balanço entre proliferação e perda celular (4,28). Isso é importante para se manter um número constante de células em um tecido. Se há um aumento na proliferação celular, ou uma diminuição de apoptose, ou ambos, ocorre um crescimento não-controlado, e isso pode resultar numa formação tumoral (4).

Apoptose, ou morte celular programada, é um dos mecanismos responsáveis pela perda celular. Também fornece um mecanismo de proteção em remover as células senescentes, com dano no DNA, ou células doentes que podem interferir na função normal ou levar à proliferação neoplásica (4).

A progressão das células por meio do ciclo celular é governada por genes que codificam proteínas que transmitem sinais positivos, isto é, ciclinas ativadas e quinases

ciclina-dependentes [CDKs] e negativos, ou seja, os inibidores de CDKs (3,4,26,29).

As ciclinas formam uma família em conjunto com as CDKs. A fosforilação da proteína do retinoblastoma [o gene do retinoblastoma (Rb) codifica uma fosfoproteína nuclear (pRb) que funciona como um importante regulador negativo na progressão do ciclo celular (30)] pela ciclina D1-CDK4/6 está correlacionada com a transição por meio da fase G1. A atividade da ciclina D1-CDK4/6 é regulada por eventos de fosforilação e pelos inibidores de CDKs, que se ligam ao complexo ciclina-CDK e inibem sua atividade. Essa inibição do complexo ciclina-CDK altera a fosforilação da proteína do retinoblastoma e, portanto, impede a célula de entrar no ciclo celular (fase S) (4,28,31).

Recentemente, a proteína p21 tem sido descrita como um fator inibidor importante na via p53-específica do controle de crescimento, já que é um inibidor do complexo CDK (32). A proteína p21 é produzida quando um dano no DNA provoca atividade do p53 (33). A proteína p21 é codificada pelo gene WAF1/CIP1 (“wild type p53 associated fragment 1/cdk-interactin protein 1”), um gene supressor tumoral, que está localizado no cromossomo 6p21.2 (32).

Por ter sido clonado independentemente por vários grupos, o p21 acabou por receber diversos nomes: CIP1, como proteína interagindo com CDKs (34); WAF1, como fator ativado pelo p53 selvagem (35); SDI1, como inibidor derivado de células senescentes (36); e MDA-6, como proteína associada à diferenciação de melanomas (37).

A transcrição do p21 é controlada por mecanismos p53-dependentes e p53-independentes, ou de ambas as formas pelo oncogene *ras* ativado (38).

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



(34,35).

A indução do p21 é um mecanismo comum de parada do crescimento em diversas situações fisiológicas. O p21 é transitoriamente induzido no curso da senescência, ou dos genes implicados em doenças relacionadas à idade (Alzheimer, amiloidose), formas reversíveis e irreversíveis de dano induzido na parada do crescimento, na diferenciação terminal das células pós-mitóticas (39-41). Também pode ser um importante meio pelo qual as células com dano no seu DNA param seu crescimento para tentar repará-lo ou para entrar em apoptose (33,42). Cabe ressaltar, no entanto, que o p21 não costuma exibir mutações nas neoplasias humanas (42).

Como visto anteriormente, a fase G1-S do ciclo celular pode ser inibida pela ligação das CDKs ao p21 (10,32,40). A expressão nuclear do p21 é aumentada pelo gene supressor tumoral p53 normal ou selvagem, e não pelo p53 mutado (4,10,29,32,40,42-44). Existe uma via de regulação do p21 que é independente do p53 (10,29,32,39,40,42-44). Num estudo de Wijnhoven e cols., sobre a biologia molecular do adenocarcinoma de Barrett, não foi encontrada relação entre p21 e p53, indicando que há uma via independente do p53 na regulação do p21. Como o p53, o p21 também possui atividade supressora tumoral (10).

A transcrição do p21 durante a embriogênese normal não requer a presença do p53. Por outro lado, estudos indicam que a via p53-dependente de indução de transcrição do p21 é essencial para a resposta a danos ao DNA (45). Especificamente no esôfago, não foi detectada expressão imunoistoquímica no tecido fetal, em contraste com uma positividade de 39% dos esôfagos normais de adultos, 38% dos casos com hiperplasia de células basais, 27% dos casos com displasia e em 14% dos casos com carcinoma epidermóide (46).

A via p53-dependente de transcrição pode ser exemplificada pelo experimento no qual o BRCA1 (gene supressor tumoral do câncer de mama 1) é introduzido em linhagens

tumorais que contêm o p21 funcionando, cujo resultado é a síntese de DNA (47).

Segundo um estudo de El-Deiry e cols., a expressão do p21 após dano ao DNA induzido por radiação da pele humana segue um padrão compatível com sua regulação pelo p53. Quando melhor estudado, comparando-se as expressões do p21 em humanos, ratos e camundongos, observou-se que a indução foi, provavelmente, mediada por sítios ligantes de p53 no início do sítio de transcrição. Em tecidos não-radiados, a expressão do p21 foi aparentemente independente do p53 e foi observada numa variedade de células (48).

Diversos estudos têm implicado a expressão imunistoquímica do p21 no prognóstico de neoplasias. No carcinoma superficial de bexiga, por exemplo, a não-expressão do p21 está fortemente associada à sobrevida mais curta dos pacientes (49). Por outro lado, em estudo compreendendo 261 pacientes com carcinoma de mama, a expressão do p21 mostrou-se associada à sobrevida mais curta dos pacientes (50).

Em estudo com 74 pacientes com carcinoma de colo uterino e 10 pacientes com leiomiomas uterinos benignos, a expressão do p21 foi de 96% nos pacientes com tumor e não foi encontrada nos pacientes com neoplasia benigna (51).

No trato digestivo, Sinicrope e cols. descreveram a perda da expressão da proteína p21 na progressão de carcinomas colorretais esporádicos, mas não nos carcinomas colorretais hereditários não-polipóides (52). Nesse estudo, a expressão do p21 foi uniformemente detectada nas células crípticas do epitélio colônico normal, e em casos esporádicos, houve uma redução dessa expressão progressivamente no desenvolvimento de adenomas e na progressão para carcinomas (52). Por outro lado, a expressão mais alta de p21, apesar de associada com p53 não-mutado, não mostrou relação com as variáveis prognósticas clássicas (53). Polyak e colaboradores observaram a diminuição da expressão de p21 em epitélio displásico no cólon, em contraste com uma expressão clara de p21 no

compartimento intermediário (não-proliferativo) das criptas. Este evento seria, obviamente, independente da mutação do p53, que é tardia nos carcinomas colorretais (54).

A expressão do p21 foi encontrada em 29% dos cânceres gástricos, 27% dos cânceres esofágicos (32 pacientes com adenocarcinoma gástrico e 15 com carcinoma epidermóide de esôfago) e em 14% com alteração do p53, e em 45% nos pacientes sem alteração. Como resultado final, a expressão da proteína p21 foi suprimida nos tecidos neoplásicos com e sem alteração do gene p53 (55).

Quando a expressão do p21 é combinada com a expressão p27<sup>Kip1</sup>, a taxa de mortalidade do carcinoma gástrico foi maior em pacientes com p27<sup>Kip1</sup> e p21 negativos do que nos pacientes com ambas expressões positivas ( $p < 0,01$ ) (56). Nas neoplasias epiteliais ovarianas, os casos com expressão forte do p21 tiveram uma sobrevida melhor, quando comparados àqueles com expressão fraca ou ausente (57).

No estudo de Ohashi e cols., com 25 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago, 44% expressaram a proteína p21, sem relação com a expressão do p53. Com relação ao grau de diferenciação histológica do tumor, 6 dos 8 (75%) bem diferenciados expressaram p21, em contraste com expressão negativa do p21 em todos os 8 casos pouco diferenciados (58). No epitélio escamoso esofágico normal, a expressão do p21 estaria restrita ao compartimento proliferativo, ou seja, à camada basal, estando, desta forma, mais relacionada à proliferação do que à diferenciação (48). Um papel do p21 no processo de diferenciação do carcinoma epidermóide do esôfago, no entanto, é sugerido por estudo no qual sua positividade é mais freqüentemente encontrada nas partes mais diferenciadas da lesão. Além disso, neste mesmo estudo, carcinomas bem diferenciados mostraram-se fortemente positivos em 100% dos casos, comparados com coloração apenas fraca em 40% dos carcinomas pouco diferenciados (40). No estudo de Lam e cols., com 153 pacientes

com carcinoma epidermóide do esôfago, a expressão da proteína p21 foi encontrada em 70% dos casos (32). A taxa de sobrevida dos pacientes foi pior quando estes apresentaram expressão de ambas as proteínas p53 e p21 (32).

Num estudo de Natsugoe e cols., em que foram avaliados 111 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago, a expressão do p21 na via p53-dependente foi um fator prognóstico independente. No grupo p53-negativo, a sobrevida em cinco anos dos pacientes com p21 positivo foi de 22%, que foi significativamente melhor que aquela dos pacientes p21 negativos (12,7%;  $p < 0,05$ ) (43).

Segundo Ohbu e cols., a expressão do p21 diminui à medida que aumenta o grau de atipia celular no processo de evolução displasia-carcinoma, na carcinogênese esofágica (44). Do mesmo modo, Holm e cols. observaram que p21 negativo foi associado significativamente com carcinomas anais pouco diferenciados, inclusive com sobrevida menor para aqueles pacientes que não expressaram o p21 (59).

Estudo envolvendo a inclusão total de 10 peças de EB com displasia de alto grau ou carcinoma superficial mostrou expressão de p21 focalmente em mucosa não-displásica (normal). Além disso, ele estava sobre-expresso em 2 adenocarcinomas, uma displasia de alto grau e 2 casos de displasia de baixo grau. Tais achados, no entanto, não tinham relação com o status do p53 (9).

No estudo de Moskaluk e cols., envolvendo 98 espécimes de esofagectomia, 10 casos de Barrett, 35 casos de adenocarcinoma do esôfago e 53 casos de adenocarcinoma da junção esofagogástrica, 88% dos cânceres expressaram proteína p21, mas não houve associação com expressão do p53. A proteína p21 também foi identificada no EB, nos epitélios escamoso esofágico e gástrico normais. Nesse estudo, no entanto, o status do p21 não mostrou associação com o prognóstico (11).

## **2. JUSTIFICATIVA**

No mundo ocidental, a incidência do adenocarcinoma de esôfago está crescendo consideravelmente. Com o desenvolvimento da biologia molecular, evidenciou-se que os tumores surgem como resultado de alterações genéticas que interferem no controle normal do crescimento e da diferenciação celular. O p21 tem um papel fundamental na regulação do ciclo celular, e sua expressão imunoistoquímica tem sido estudada em diversos tumores, mostrando influência no prognóstico de várias neoplasias. Estudos mostrando a relação do p21 com o adenocarcinoma de esôfago são escassos, e não se sabe realmente qual a prevalência da sua expressão imunoistoquímica em nosso meio. Considerando a importância epidemiológica do adenocarcinoma de esôfago e o papel do p21 no desenvolvimento tumoral, os poucos dados abrangendo ambos e a busca de fatores prognósticos, justifica-se a realização deste estudo.

### **3. OBJETIVO**

Verificar a prevalência da expressão da proteína p21 em pacientes com adenocarcinoma de esôfago atendidos no Grupo de Cirurgia de Esôfago e Estômago do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GCEE/HCPA), no período de 1998 a 2002.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Pacientes**

A população de pesquisa foi constituída pelos pacientes do GCEE/HCPA com adenocarcinoma de esôfago atendidos e tratados entre janeiro de 1998 e dezembro de 2002.

*Crítérios de Inclusão:*

- Pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago atendidos entre janeiro de 1998 e dezembro de 2002.

*Crítérios de Exclusão:*

- História ou presença de outra neoplasia maligna concomitante;
- Tratamento neoadjuvante (quimioterapia e/ou radioterapia);
- Ausência de blocos de parafina para confeccionar lâminas.

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). Para cada paciente foi preenchido um protocolo, em anexo, para estabelecermos as características da população estudada (vide tabela 1). 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 42 pacientes.

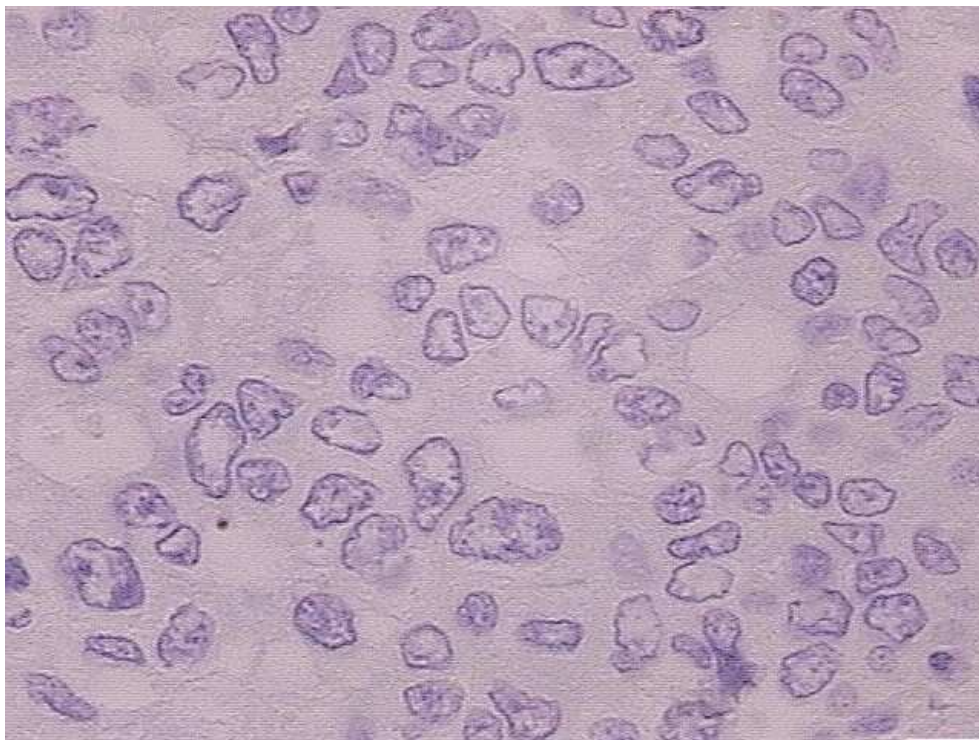
## 4.2. Imunoistoquímica

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 consiste em desparafinização e reidratação, recuperação antigênica, inativação da peroxidase endógena e bloqueio das reações inespecíficas. O anticorpo primário, p21, clone SX118, código M7202 da DAKO, foi encubado por 12 horas, a 4°C, na diluição de 1:50, seguido da aplicação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) e revelação com diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako). A reação apresentou como controle positivo o carcinoma mamário positivo para p21, sendo o controle negativo realizado sem a utilização do anticorpo primário.

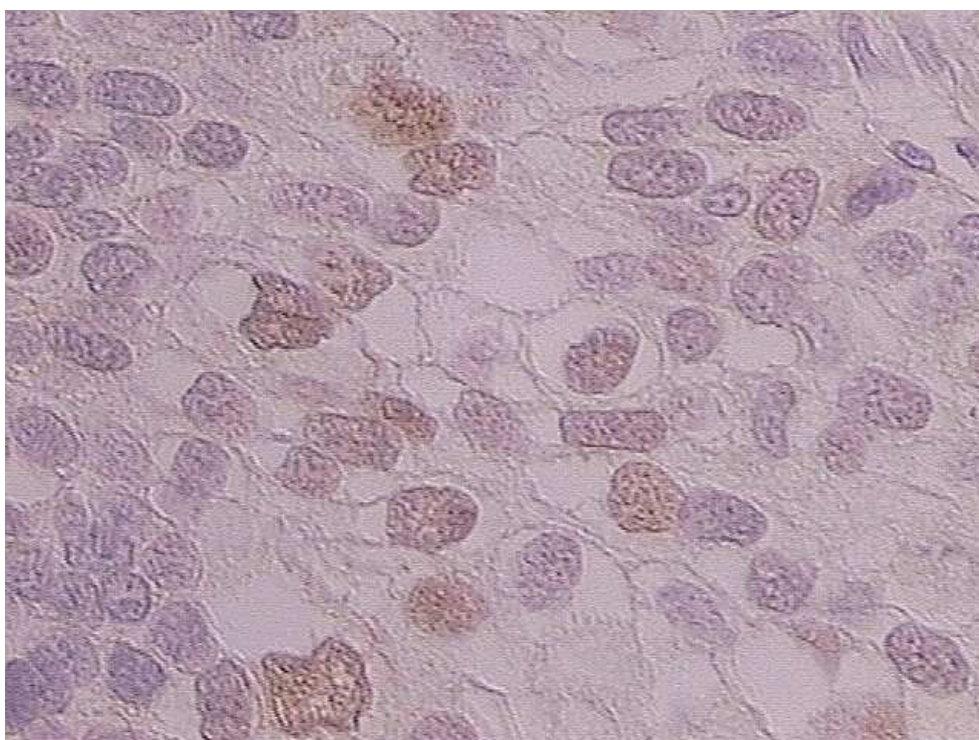
A avaliação do p21 foi realizada de acordo com o Sistema de Escore de Imunorreatividade (Imunoreactive scoring system-IRS), usado por Remmele e Schicketanz (60,61) e citado por Hannas e cols. (10).

Inicialmente, foi avaliada a intensidade da coloração, graduando-se de 0 a 3, em que: 0 é negativa, 1 é fraca, 2 é moderada e 3 é forte (vide figuras 1 a 4).

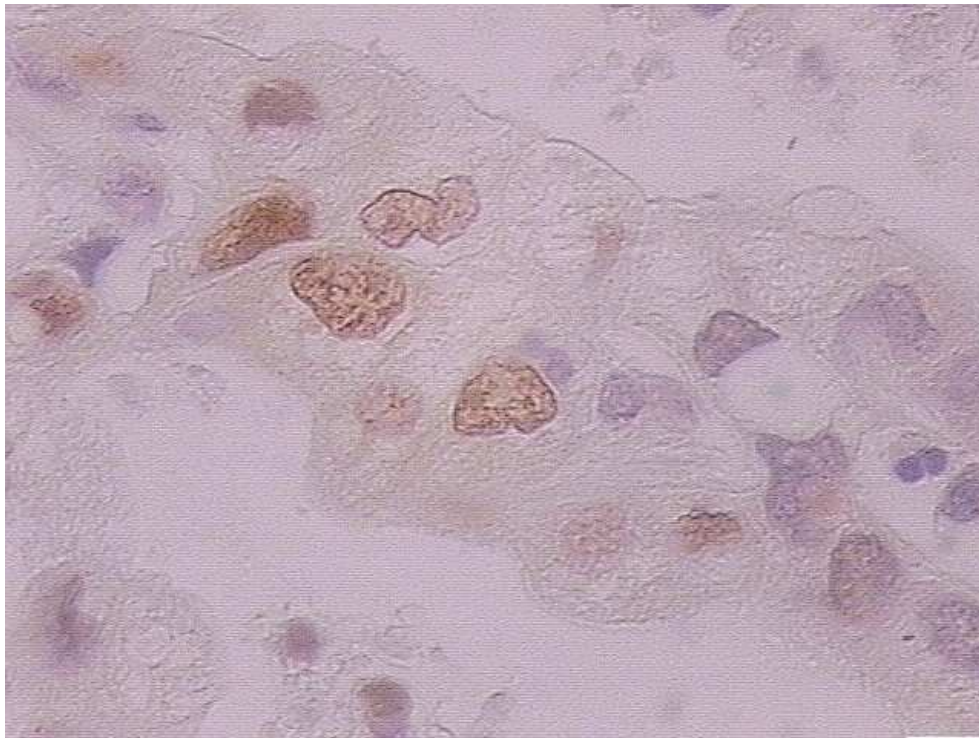




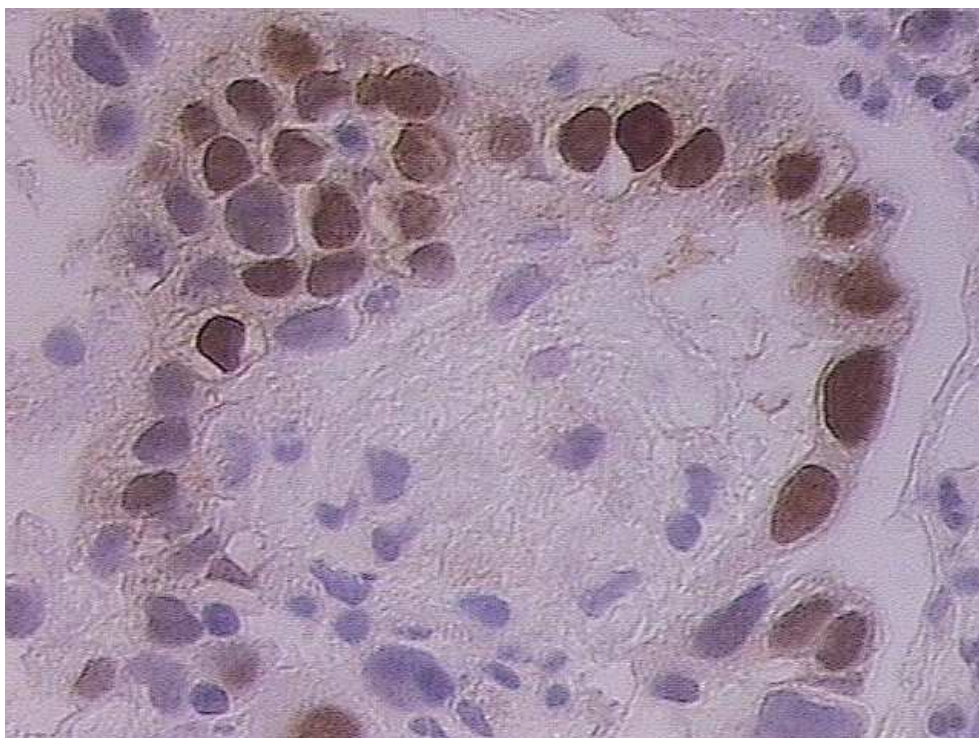
**Figura 1 :** Expressão imunoistoquímica negativa de p21 (400X)



**Figura 2 :** Expressão imunoistoquímica fraca de p21 (400X)



**Figura 3 :** Expressão imunoistoquímica moderada de p21 (400X)



**Figura 4 :** Expressão imunoistoquímica forte de p21 (400X)

A avaliação da proporção de células positivas foi graduada de 0 a 4, em que: 0 é negativo, 1 é 10% de células positivas, 2 é 11-50% de células positivas, 3 é 51-80% de células positivas e 4 é > 80% de células positivas. O escore final da expressão de p21 foi obtido multiplicando-se as duas pontuações. Um mínimo de 10 campos visuais de grande aumento (400X) foi usado para cada avaliação IRS. Escores  $\leq 2$  pontos foram considerados imunopositivos fracos e não indicativos de sobre-expressão de p21, e escores  $\geq 3$  pontos foram considerados fortemente imunorreativos e indicativos de sobre-expressão de p21(10).

A leitura das lâminas foi realizada por dois patologistas, de forma independente e sem o conhecimento dos dados clínico-patológicos. O resultado final foi obtido pela média entre os escores dos patologistas.

#### **4.3. Delineamento**

Trata-se de um estudo de prevalência, no qual os dados foram coletados de prontuários de pacientes com adenocarcinoma de esôfago no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2002, no GCEE/HCPA

## **5. ÉTICA**

Todo o material biológico estudado provém de pacientes do GCEE. Os blocos de parafina com material de biópsia e peças cirúrgicas foram obtidos no Laboratório 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 desse 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 Hospital de Clínicas de Porto Alegre. 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, para avaliação quanto às demais normas regulamentares e diretrizes éticas, tendo sido aprovado para execução, sob protocolo nº 03.174.

## **6. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

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

Inicialmente, as observações realizadas entre os dois patologistas responsáveis pela avaliação da intensidade de coloração e expressão do p21 tiveram sua concordância estimada por meio do coeficiente de correlação intraclasse.

A porcentagem de lâminas consideradas positivas para o p21 (escore de imunorreatividade  $\geq 3$ ) foi determinada pelo cálculo de proporções, com seu respectivo intervalo de confiança de 95% obtido pela distribuição binomial.

A distribuição do p21 entre os três grupos de diferenciação histológica foi comparada pela análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi  $\alpha 0,05$ .

Os dados foram processados e analisados com o auxílio dos programas SPSS (*“Statistical Package for the Social Sciences”*) versão 10.0 e SigmaPlot versão 2.0.

## 7. RESULTADOS

Os 42 pacientes com adenocarcinoma de esôfago identificados em um período de cinco anos (1º de janeiro de 1998 a 31 de dezembro de 2002) no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e tratados pelo Grupo de Cirurgia de Esôfago e Estômago (GCEE) eram, na sua maioria, do sexo masculino (83,3%), com idade superior a 40 anos.

Os procedimentos cirúrgicos com intenção curativa, gastrectomia total e esofagogastrectomia transiatal, foram realizados em 56,2% dos pacientes; os demais foram submetidos à cirurgia paliativa ou não sofreram tratamento cirúrgico. Apenas cinco pacientes receberam tratamento adjuvante com quimioterapia e radioterapia, isoladas ou combinadas. Cerca de 78,6% dos pacientes apresentavam doença em estado avançado, estádios III e IV (vide tabela 1).

**Tabela 1:** Características dos pacientes com adenocarcinoma de esôfago identificados em um período de cinco anos, n=42, HCPA, 1998-2002.

Característica	Medida síntese
Idade, anos	62,3±9,9
Sexo M/F, (%)	83,3 / 16,7
Estádio	
I	3 (7,1)
II	6 (14,3)
III	22 (52,4)
IV	11 (26,2)
Procedimento	
Gastrectomia total	13 (31,0)
Cirurgia paliativa	12 (28,6)
Ressecção transiatal	11 (25,2)
Biópsia	6 (14,3)
Tratamento adjuvante, n° (%)	5 (11,9)

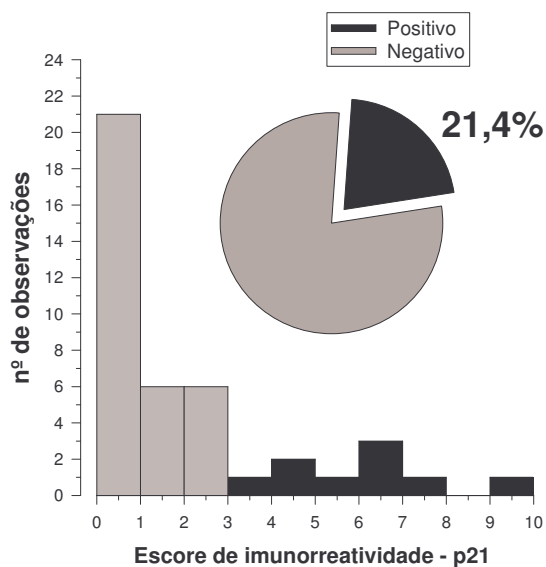
Os dados são apresentados como média±desvio padrão ou número (percentual)

Dos 42 pacientes estudados, 9 apresentaram positividade para o p21, quando considerado o Sistema de Escore de Imunorreatividade (em que p21+ é  $\geq 3$ ), citado anteriormente (vide tabela 2 e figura 5).

**Tabela 2:** Distribuição de frequência do p21 e proporção de observações com expressão positiva (escore  $\geq 3$ ) em pacientes com adenocarcinoma de esôfago identificados em um período de cinco anos, n=42, HCPA, 1998-2002.

p21	f	%
0-1	21	50,0
1-2	6	14,3
2-3	6	14,3
3-4	1	2,4
4-5	2	4,8
5-6	1	2,4
6-7	3	7,1
7-8	1	2,4
8-9	0	0,0
9	1	2,4
<b>p21 + (<math>\geq 3</math>)</b>	<b>9</b>	<b>21,4</b>

média ( $\pm$ desvio padrão): 1,7 $\pm$ 2,4  
IC95% para p21 +: 11,0 a 35,7



**Figura 5:** Histograma representando a distribuição de frequências do p21, destacando a proporção de observações com expressão positiva (escore  $\geq 3$ ) em pacientes com adenocarcinoma de esôfago identificados em um período de cinco anos, n=42, HCPA, 1998-2002.

A concordância entre os observadores foi estimada por meio do coeficiente de correlação intraclass e apresentou valor de 0,96 tanto para grau de intensidade de coloração do p21 (vide tabela 3), quanto para grau de expressão de células positivas para p21 por campo (vide tabela 4), com uma significância estatística para um  $p < 0,001$  e um valor de 0,94 para o escore de imunorreatividade do p21, com  $p < 0,001$  (vide tabela 5), demonstrando uma concordância bastante elevada entre os dois observadores presentes no estudo.

**Tabela 3:** Avaliação de concordância entre dois patologistas quanto ao grau de intensidade de coloração do p21 em lâminas (400X) de pacientes com adenocarcinoma de esôfago identificados em um período de cinco anos, n=42, HCPA, 1998-2002

Observador 1	Observador 2				Total
	0	1	2	3	
0	21				21
1		5	2		7
2		1	7		8
3			1	5	6
Total	21	6	10	5	42

Coeficiente de correlação intraclass: 0.96 ( $P < 0,001$ ). Grau de intensidade: 0: ausência de coloração, 1: fraco, 2: moderado, 3: forte.

**Tabela 4:** Avaliação de concordância entre dois patologistas quanto ao grau de expressão de células positivas para p21 por campo em lâminas (400X) de pacientes com adenocarcinoma de esôfago identificados em um período de cinco anos, n=42, HCPA, 1998-2002.

Observador 1	Observador 2					Total
	0	1	2	3	4	
0	21					21
1		11	2			13
2			6			6
3				1	1	2
4						
Total	21	11	8	1	1	42

Coeficiente de correlação intraclass: 0.96 ( $P < 0,001$ ). Grau de expressão: 0: ausência de positividade, 1: até 10%, 2: 11 a 50%, 3: 51 a 80%, 4: > 80%.

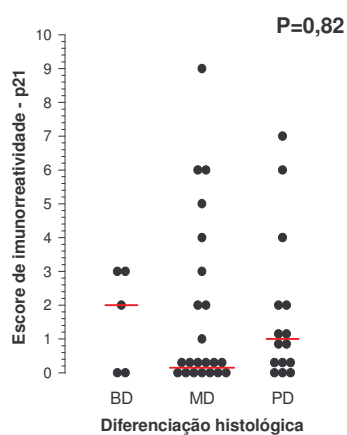


**Tabela 5:** Avaliação de concordância entre dois patologistas quanto ao escore de imunorreatividade do p21 em lâminas (400X) de pacientes com adenocarcinoma de esôfago identificados em um período de cinco anos, n=42, HCPA, 1998-2002.

Observador 1	Observador 2									Total	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8		9
0	21										21
1		5			2						7
2		1	4								5
3				1							1
4					2						2
5											
6					1		3		1		5
7											
8											
9										1	1
Total	21	6	4	1	5		3		1	1	42

Coefficiente de correlação intraclassa: 0.94 (P<0,001).

A expressão do p21 não apresentou correlação com os graus de diferenciação histológica das biópsias e peças estudadas (vide figura 6).



**Figura 6:** Gráfico de “dot-plot” representando a distribuição dos valores do escore de imunorreatividade do p21 em pacientes com adenocarcinoma de esôfago, segundo diferenciação histológica (BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pouco diferenciado), identificados em um período de cinco anos, n=42, HCPA, 1998–2002.

## 8. DISCUSSÃO

O esôfago normalmente possui um epitélio escamoso. O tipo histológico usual de câncer esofágico é o carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide; historicamente, o adenocarcinoma é menos comum (62). Entretanto, vários estudos têm mostrado que a incidência do adenocarcinoma está aumentando nos países ocidentais (7,62-64), enquanto a incidência do carcinoma epidermóide permanece relativamente estável (64). Ainda permanece controverso o motivo pelo qual esteja ocorrendo esse crescimento, e, segundo alguns autores, a diminuição da prevalência da infecção pelo *Helicobacter pylori*, que parece ser um fator protetor, um aumento da prevalência de obesidade, o aumento da ingestão de gordura e o tabagismo podem estar contribuindo para esse fato (7,64). No carcinoma epidermóide do esôfago, o fumo e o álcool são fatores etiológicos (64).

O carcinoma epidermóide e o adenocarcinoma do esôfago são freqüentemente relatados como uma doença única na literatura, provavelmente porque as estratégias cirúrgicas sejam similares (65). Ainda não está claro se dois tipos histológicos diferem somente na localização, ou se também no comportamento biológico (65).

O EB é uma condição pré-maligna associada com refluxo gastro-esofágico, em que o epitélio escamoso do esôfago é substituído por um epitélio colunar metaplásico (63). O refluxo tem sido sugerido como um fator etiológico não só para o adenocarcinoma, como para o câncer do cárdia (64), o que colabora para que sejam estudados como a mesma doença (62). O estudo de Wijnhoven mostrou que pacientes com carcinomas do cárdia compartilhavam características em termos de idade, distribuição sexual (predominando

homens) e achados histológicos com pacientes com adenocarcinoma do esôfago, e que, portanto, devam ser considerados entidades únicas, inclusive porque o carcinoma do cárdia apresentava diferenças significativas quando comparado ao carcinoma gástrico não-cárdico (66). Por outro lado, Weiss, apesar de considerar que o carcinoma do cárdia e o adenocarcinoma do esôfago sejam virtualmente idênticos, e formas claramente diferentes do carcinoma epidermóide, acredita que eles devam ser considerados entidades clínicas diferentes (64).

O perfil epidemiológico dos pacientes no presente estudo é semelhante ao de outros centros de referência no resto do mundo (62,64,65), como a predominância de pacientes do sexo masculino (83,3%) e idade superior a 60 anos (idade média de 62,3 anos).

A presença de EB, que está associada com um maior risco de adenocarcinoma (7), fica com sua avaliação prejudicada nesses pacientes, tendo em vista a extensão da doença no momento do diagnóstico (78,6% dos pacientes com estágio III e IV), em que a mucosa com alterações metaplásicas pode ser completamente englobada pela progressão do tumor (67).

Diversos têm sido os esforços para determinar marcadores biológicos que possam influenciar a progressão do EB na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma de esôfago. No GCEE/HCPA, Cavazzola e cols. estudaram a expressão da proteína p53 e do VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular) em 46 pacientes com adenocarcinoma do esôfago. As expressões da proteína p53 e do VEGF foram observadas em 52,2% e 47,8% dos tumores, respectivamente, e coincidiram em 26% dos casos, não tendo sido encontrada relação entre essa expressão. Suas expressões não se correlacionaram com o prognóstico em pacientes com adenocarcinoma de esôfago submetidos à cirurgia com intenção curativa (68).

A proteína p21 é um inibidor das CDKs, que inibe a transição da fase G1 para Fase S do ciclo celular (35). Nas células humanas, a proteína p21 é considerada um fator maior na supra-regulação da expressão nuclear do p53 (35). A expressão da proteína p21 foi verificada em diversas neoplasias malignas, incluindo adenocarcinomas do esôfago (9-11).

No carcinoma epidermóide do esôfago, a expressão da proteína p21 também tem uma grande variabilidade. No estudo de Seta e cols., foi de 27% (55), no de Shirakawa e cols. foi de 59% nos carcinomas epidermóides superficiais (40). Segundo Shirakawa, a expressão do p21 se correlacionou com o grau de diferenciação histológica do tumor. A expressão do p21 foi alta em 8 (100%) dos 8 bem diferenciados e em 4 (57%) dos 7 moderadamente diferenciados, mas foi fraca em 4 (40%) dos 10 pouco diferenciados (40). No estudo de Natsugoe e cols., a expressão do p21 foi 43,2% (48 de 111 pacientes) em carcinomas epidermóides do esôfago em estádios avançados (43). Neste mesmo estudo, a análise multivariada revelou que a expressão do p21 na via p53-dependente foi um fator prognóstico independente (43). A expressão do p21 foi detectada em 44% (11 de 25 pacientes) com carcinoma epidermóide do esôfago, numa porcentagem de células positivas de 1% a 10%, no estudo de Ohashi e cols. (58). Nesse mesmo trabalho também se observou uma boa correlação entre a expressão e o grau de diferenciação histológica. Dos 8 casos bem diferenciados, 6 (67%) estiveram positivos, enquanto que todos os 8 casos pouco diferenciados foram negativos (58). No trabalho de Meurer, em nosso meio, que estudou pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago, a expressão da proteína p21 foi de 77,1% e não esteve relacionada com a sobrevida dos pacientes operados para carcinoma epidermóide de esôfago (69).

No adenocarcinoma gástrico, segundo Liu e cols., a proteína p21 esteve expressa em 40% dos pacientes, e sua positividade foi considerada fator positivo no prognóstico dos doentes (56).

No estudo de Moskaluk e cols., 66% (58 de 88 pacientes) dos adenocarcinomas do esôfago tiveram uma expressão fraca do p21 (<25% das células positivas), apenas 9 (10%) adenocarcinomas tiveram expressão difusa do p21 (menos da metade das células positivas) (11). A comparação das mesmas áreas de tumor com expressão de p53 e p21 revelou uma discordância na maioria dos casos, portanto, se acredita que a expressão do p21 seja independente do p53 (11). Hanas e cols., mostraram uma sobre-expressão do p21 em uma pequena série de 3 pacientes com adenocarcinoma (10). Em outra série pequena, o p21 esteve sobre-expresso em 2 adenocarcinomas superficiais, e na maioria dos casos a expressão do p21 não se relacionou com a expressão do p53 (9).

Neste estudo, optou-se por utilizar um escore de imunorreatividade para se avaliar a expressão da proteína p21, porque seu modo de avaliação difere nos diversos estudos. A proteína p21 esteve expressa em 9 dos 42 (21,4%) pacientes com adenocarcinoma da junção esofagogástrica selecionados, o que é bem diferente dos outros estudos com adenocarcinoma, talvez porque o método de análise do p21 não seja padronizado nos vários artigos revisados. Não se observou correlação com o grau de diferenciação histológica do tumor, como foi visto em alguns estudos com carcinoma epidermóide do esôfago relatados acima (40,58).

## **9. CONCLUSÃO**

A proteína p21 esteve expressa em 9 dos 42 pacientes (21,4%) com adenocarcinoma de esôfago diagnosticados nos últimos cinco anos no Grupo de Cirurgia de Esôfago e Estômago do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Perante a observação da baixa prevalência da expressão do p21, provavelmente essa molécula estudada não seja essencial no processo patogenético da carcinogênese do adenocarcinoma do esôfago.

## **10. PERSPECTIVAS**

Como perspectiva temos a possibilidade de avaliarmos a prevalência do p21 em adenocarcinomas em estágios iniciais e a prevalência do p21 em Barrett e Barrett com displasia.

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rudiger SJ, Feith M, Werner M, Stein HJ. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction: results of surgical therapy based on anatomical/topographic classification in 1,002 consecutive patients. *Ann Surg* 2000; 232: 353-61.
2. Siewert JR, Stein HJ. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Br J Surg* 1998; 85: 1457-9.
3. 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; 89: 824-37.
4. Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001; 233: 322-37.
5. Corley DA, Levin TR, Habel LA, Weiss NS, Buffler PA. Surveillance and survival in Barrett's adenocarcinomas: a population-based study. *Gastroenterology* 2002; 122: 633-40.
6. Estimativas de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. Instituto Nacional do Câncer 2003. <http://www.inca.gov.br>
7. Cameron AJ. Epidemiology of Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Dis Esophagus* 2002; 15: 106-8.
8. Riegman PH, Vissers KJ, Alers JC, Geelen E, Hop WC, Tilanus HW, van Dekken H. Genomic alterations in malignant transformation of Barrett's esophagus. *Cancer Res* 2001; 61: 3164-70.
9. Chatelain D, Flejou JF. High-grade dysplasia and superficial adenocarcinoma in Barrett's esophagus: histological mapping and expression of p53, p21 and Bcl-2 oncoproteins. *Virchows Arch* 2003; 442: 18-24.
10. Hanas JS, Lerner MR, Lightfoot SA, Raczkowski C, Kastens DJ, Brackett DJ, Postier RG. Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1) and p53 tumor suppressor in dysplastic progression and adenocarcinoma in Barrett esophagus. *Cancer* 1999; 86: 756-63.
11. Moskaluk CA, Heitmiller R, Zahurak M, Schwab D, Sidransky D, Hamilton SR. p53 and p21(WAF1/CIP1/SDI1) gene products in Barrett esophagus and adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Hum Pathol* 1996; 27: 1211-20.



12. Gurski RR, Peters JH, Hagen JA, DeMeester SR, Bremner CG, Chandrasoma PT, DeMeester TR. Barrett's esophagus can and does regress after antireflux surgery: a study of prevalence and predictive features. *J Am Coll Surg* 2003; 196: 706-12.
13. Murray L, Watson P, Johnston B, Sloan J, Mainie IM, Gavin A. Risk of adenocarcinoma in Barrett's oesophagus: population based study. *BMJ* 2003; 327: 534-5.
14. Haggitt RC. Pathology of Barrett's esophagus. *J Gastrointest Surg* 2000; 4: 117-8.
15. Attwood SE, Morris CD. Who defines Barrett's oesophagus: endoscopist or pathologist? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 97-9.
16. Weinstein WM, Ippoliti AF. The diagnosis of Barrett's esophagus: goblets, goblets, goblets. *Gastrointest Endosc* 1996; 44: 91-5.
17. Krishnadath KK, Reid BJ, Wang KK. Biomarkers in Barrett esophagus. *Mayo Clin Proc* 2001; 76: 438-46.
18. Pathology & Genetics - Tumours of the Digestive System. World Health Organization Classification of Tumours ed. p. 9-32, 2000.
19. DeMeester SR, DeMeester TR. Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus: fifty years of controversy. *Ann Surg* 2000; 231: 303-21.
20. Aloia TA, Harpole DH, Jr., Reed CE, Allegra C, Moore MB, Herndon JE, D'Amico TA. Tumor marker expression is predictive of survival in patients with esophageal cancer. *Ann Thorac Surg* 2001; 72: 859-66.
21. Masuda N, Kato H, Nakajima T, Sano T, Kashiwabara K, Oyama T, Kuwano H. Synergistic decline in expressions of p73 and p21 with invasion in esophageal cancers. *Cancer Sci* 2003; 94: 612-7.
22. Rosa AR, Gurski RR, Schirmer CC, Brentano L, Kruel CD. Survival and prognostic factors in patients with resected epidermoid oesophageal carcinoma. *Int Surg* 1999; 84: 193-8.
23. Cairns J. Mutation and cancer: the antecedents to our studies of adaptive mutation. *Genetics* 1998; 148: 1433-40.
24. Chang F, Syrjanen S, Tervahauta A, Syrjanen K. Tumourigenesis associated with the p53 tumour suppressor gene. *Br J Cancer* 1993; 68: 653-61.
25. Steele RJ, Thompson AM, Hall PA, Lane DP. The p53 tumour suppressor gene. *Br J Surg* 1998; 85: 1460-7.
26. Garrett MD. Cell cycle control and cancer. *Current Science* 2001; 81: 515-22.

27. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998; 282: 1497-501.
28. Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Hatano K, Kitayama J, Tsuruo T, Domene CE, Muto T. p21Waf1/Cip1 expression is a prognostic marker in curatively resected esophageal squamous cell carcinoma, but not p27Kip1, p53, or Rb. *Ann Surg Oncol* 1999; 6: 481-8.
29. Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL. p21--negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 213: 138-49.
30. Nakanishi M, Kaneko Y, Matsushime H, Ikeda K. Direct interaction of p21 cyclin-dependent kinase inhibitor with the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 35-40.
31. Cai K, Dynlacht BD. Activity and nature of p21(WAF1) complexes during the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 12254-9.
32. Lam KY, Law S, Tin L, Tung PH, Wong J. The clinicopathological significance of p21 and p53 expression in esophageal squamous cell carcinoma: an analysis of 153 patients. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2060-8.
33. Rudolph JJBFCCT-SGaWC. Analysis of p21 accumulation at complex DNA lesions. GSI Biophysics, Planckstr 1, D-64291 Darmsadt 2002.
34. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-16.
35. el Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-25.
36. Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 1994; 211: 90-8.
37. Jiang H, Lin J, Su ZZ, Collart FR, Huberman E, Fisher PB. Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. *Oncogene* 1994; 9: 3397-406.
38. Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res* 1999; 246: 280-9.
39. Chang BD, Watanabe K, Broude EV, Fang J, Poole JC, Kalinichenko TV, Roninson IB. Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for

- carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 4291-6.
40. Shirakawa Y, Naomoto Y, Kimura M, Kawashima R, Yamatsuji T, Tamaki T, Hamada M, Haisa M, Tanaka N. Topological analysis of p21WAF1/CIP1 expression in esophageal squamous dysplasia. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 541-50.
  41. Morisaki H, Ando A, Nagata Y, Pereira-Smith O, Smith JR, Ikeda K, Nakanishi M. Complex mechanisms underlying impaired activation of Cdk4 and Cdk2 in replicative senescence: roles of p16, p21, and cyclin D1. *Exp Cell Res* 1999; 253: 503-10.
  42. Shiohara M, el Deiry WS, Wada M, Nakamaki T, Takeuchi S, Yang R, Chen DL, Vogelstein B, Koeffler HP. Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood* 1994; 84: 3781-4.
  43. Natsugoe S, Nakashima S, Matsumoto M, Xiangming C, Okumura H, Kijima F, Ishigami S, Takebayashi Y, Baba M, Takao S, Aikou T. Expression of p21WAF1/Cip1 in the p53-dependent pathway is related to prognosis in patients with advanced esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2445-9.
  44. Ohbu M, Kobayashi N, Okayasu I. Expression of cell cycle regulatory proteins in the multistep process of oesophageal carcinogenesis: stepwise over-expression of cyclin E and p53, reduction of p21(WAF1/CIP1) and dysregulation of cyclin D1 and p27(KIP1). *Histopathology* 2001; 39: 589-96.
  45. Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 1995; 9: 935-44.
  46. Xing Y, Ning Y, Ru LQ, Wang LD. Expressions of PCNA, p53, p21(WAF-1) and cell proliferation in fetal esophageal epithelia: comparative study with adult esophageal lesions from subjects at high-incidence area for esophageal cancer in Henan, North China. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1601-3.
  47. Somasundaram K, Zhang H, Zeng YX, Houvras Y, Peng Y, Zhang H, Wu GS, Licht JD, Weber BL, el Deiry WS. Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/CiP1. *Nature* 1997; 389: 187-90.
  48. el Deiry WS, Tokino T, Waldman T, Oliner JD, Velculescu VE, Burrell M, Hill DE, Healy E, Rees JL, Hamilton SR, . Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1995; 55: 2910-9.
  49. Migaldi M, Sgambato A, Garagnani L, Ardito R, Ferrari P, De Gaetani C, Cittadini A, Trentini GP. Loss of p21Waf1 expression is a strong predictor of reduced survival in primary superficial bladder cancers. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3131-8.

50. Caffo O, Doglioni C, Veronese S, Bonzanini M, Marchetti A, Buttitta F, Fina P, Leek R, Morelli L, Palma PD, Harris AL, Barbareschi M. Prognostic value of p21(WAF1) and p53 expression in breast carcinoma: an immunohistochemical study in 261 patients with long-term follow-up. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1591-9.
51. Skomedal H, Kristensen GB, Lie AK, Holm R. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol* 1999; 73: 223-8.
52. Sinicrope FA, Roddey G, Lemoine M, Ruan S, Stephens LC, Frazier ML, Shen Y, Zhang W. Loss of p21WAF1/Cip1 protein expression accompanies progression of sporadic colorectal neoplasms but not hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1251-61.
53. Veloso M, Wrba F, Kaserer K, Heinze G, Magalhaes A, Herbst F, Teleky B. p53 gene status and expression of p53, mdm2, and p21Waf1/Cip1 proteins in colorectal cancer. *Virchows Arch* 2000; 437: 241-7.
54. Polyak K, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colorectal neoplasia. *Am J Pathol* 1996; 149: 381-7.
55. Seta T, Imazeki F, Yokosuka O, Saisho H, Suzuki T, Koide Y, Isono K. Expression of p53 and p21WAF1/CIP1 proteins in gastric and esophageal cancers: comparison with mutations of the p53 gene. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 279-89.
56. Liu XP, Kawauchi S, Oga A, Suehiro Y, Tsushima K, Tsushima M, Sasaki K. Combined examination of p27(Kip1), p21(Waf1/Cip1) and p53 expression allows precise estimation of prognosis in patients with gastric carcinoma. *Histopathology* 2001; 39: 603-10.
57. Schmider A, Gee C, Friedmann W, Lukas JJ, Press MF, Lichtenegger W, Reles A. p21 (WAF1/CIP1) protein expression is associated with prolonged survival but not with p53 expression in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 237-42.
58. Ohashi K, Nemoto T, Eishi Y, Matsuno A, Nakamura K, Hirokawa K. Expression of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in oesophageal squamous cell carcinomas. *Virchows Arch* 1997; 430: 389-95.
59. Holm R, Skovlund E, Skomedal H, Florenes VA, Tanum G. Reduced expression of p21WAF1 is an indicator of malignant behaviour in anal carcinomas. *Histopathology* 2001; 39: 43-9.
60. 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; 189: 862-6.

61. Gassel AM, Backe J, Krebs S, Schon S, Caffier H, Muller-Hermelink HK. Endometrial carcinoma: immunohistochemically detected proliferation index is a prognosticator of long-term outcome. *J Clin Pathol* 1998; 51: 25-9.
62. Pera M, Cameron AJ, Trastek VF, Carpenter HA, Zinsmeister AR. Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Gastroenterology* 1993; 104: 510-3.
63. Whittles CE, Biddlestone LR, Burton A, Barr H, Jankowski JA, Warner PJ, Shepherd NA. Apoptotic and proliferative activity in the neoplastic progression of Barrett's oesophagus: a comparative study. *J Pathol* 1999; 187: 535-40.
64. Weiss MM, Kuipers EJ, Hermsen MA, van Grieken NC, Offerhaus J, Baak JP, Meuwissen SG, Meijer GA. Barrett's adenocarcinomas resemble adenocarcinomas of the gastric cardia in terms of chromosomal copy number changes, but relate to squamous cell carcinomas of the distal oesophagus with respect to the presence of high-level amplifications. *J Pathol* 2003; 199: 157-65.
65. Alexandrou A, Davis PA, Law S, Murthy S, Whooley BP, Wong J. Squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lower third of the esophagus and gastric cardia: similarities and differences. *Dis Esophagus* 2002; 15: 290-5.
66. Wijnhoven BP, Siersema PD, Hop WC, van Dekken H, Tilanus HW. Adenocarcinomas of the distal oesophagus and gastric cardia are one clinical entity. Rotterdam Oesophageal Tumour Study Group. *Br J Surg* 1999; 86: 529-35.
67. Ruol A, Parenti A, Zaninotto G, Merigliano S, Costantini M, Cagol M, Alfieri R, Bonavina L, Peracchia A, Ancona E. Intestinal metaplasia is the probable common precursor of adenocarcinoma in barrett esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia. *Cancer* 2000; 88: 2520-8.
68. Cavazzola LT. Avaliação da Expressão da Proteína p53 e do VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular) em Pacientes com Adenocarcinomado Esôfago.[Tese de Doutorado]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Medicina Programa de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia 2004.
69. Meurer L. Densidade microvascular intratumoral e expressão imuno-histoquímica de p21: associação com sobrevida em pacientes submetidos à cirurgia por carcinoma epidermóide de esôfago.[Tese de Doutorado]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Medicina Programa de Pós-graduação em Medicina: Gastroenterologia 2003.

## 12. ANEXOS

### 12.1. Protocolo

**UFRGS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA - MESTRADO  
SERVIÇO DE CIRURGIA GERAL - GCEEID/HCPA  
p 21 em Pacientes com Adenocarcinoma de Esôfago**

Nº DE ORDEM: \_\_\_\_\_ PRONTUÁRIO: \_\_\_\_\_

PACIENTE: \_\_\_\_\_

DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ IDADE: \_\_\_\_ anos

SEXO: (1) Masculino (2) Feminino

Endoscopia: CLASSIFICAÇÃO DE SIEWERT: Tipo: (I) (II) (III)  
DISTÂNCIA DO TUMOR DA ADS: \_\_\_\_ cm

Estadiamento Clínico Pré-Operatório: T \_\_\_\_ N \_\_\_\_ M \_\_\_\_ Estágio (I-IV): \_\_\_\_

CIRURGIA REALIZADA: (1) Via Transtorácica (2) Via Transiatal (3) Gastrectomia Total  
Tipo Anastomose: (1) Primária (2) Postergada

DATA DA CIRURGIA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

ÓBITO: (1) Pós-Operatório Precoce Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Tempo PO: \_\_\_\_ meses

Causa: \_\_\_\_\_

(2) Tardio Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Tempo PO: \_\_\_\_ meses

Causa: \_\_\_\_\_

VIVO: Última consulta/informação em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_. Tempo PO: \_\_\_\_ meses

Condição: (1) Curado (2) Recidiva (3) Menos de 5 anos sem recidiva

TRATAMENTO ADJUVANTE: (1) Não (2) Sim, do tipo: \_\_\_\_\_

EXAME ANATOMO-PATOLÓGICO DA *Endoscopia*: AP no: \_\_\_\_\_

EXAME ANATOMO-PATOLÓGICO DA *Peça Cirúrgica*: AP no: \_\_\_\_\_

MARGENS CIRÚRGICAS: (1) Livres (2) Comprometidas

GRAU DE DIFERENCIAÇÃO: (1) Bem (2) Moderadamente (3) Pouco (4) Outro

PROFUNDIDADE DE PENETRAÇÃO DO TUMOR NA PAREDE ESOFÁGICA:

(1) Mucosa e SM (2) Muscular

(3) Adventícia (4) Estruturas vizinhas

COMPROMETIMENTO LINFONODAL: (1) Não (2) Sim

Localização: \_\_\_\_\_

Nº de linfonodos comprometidos/examinados: \_\_\_\_/\_\_\_\_

Classificação T \_\_\_\_ N \_\_\_\_ M \_\_\_\_

ESTÁGIO: (I) (II) (III) (IV)

Marcador:

p 21: (1) Positivo (2) Negativo

## **12.2. Artigo Científico em Língua Portuguesa**

### **PREVALÊNCIA DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA p21 EM ADENOCARCINOMA DO ESÔFAGO.**

Maitê de Mello Villwock\*(1), Luise Meurer (2), Leandro Totti Cavazzola (1), Mário Henrique Osanai (1), Richard R. Gurski(1), Maria Isabel Edelweiss (2), Carlos Cauduro Schirmer (1).

**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 Santa Rita, 285/201 – Floresta. CEP 90220-220. Porto Alegre, RS, Brasil.

E-mail: [javillwock@via-rs.net](mailto:javillwock@via-rs.net)

Telefone: 51 3222.7375.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** No mundo ocidental, a prevalência de adenocarcinoma da junção esofagogástrica vem crescendo nas últimas décadas. Atualmente, é aceito que o adenocarcinoma do esôfago se desenvolve de uma lesão pré-maligna: esôfago de Barrett. Este carcinoma é de difícil diagnóstico nos seus estágios iniciais, o que resulta em uma mortalidade significativa. O estudo da biologia molecular tem demonstrado que grande parte dos tumores malignos tem origem na interação entre o componente hereditário e influências externas, que em indivíduos predispostos podem ocasionar alterações genéticas que influenciem o controle da diferenciação e crescimento celular. O p21<sup>(WAF1/CIP1)</sup> tem um papel fundamental na regulação do ciclo celular, e sua expressão imunoistoquímica tem sido estudada em diversos tumores, mostrando influência no prognóstico de várias neoplasias.

**OBJETIVO:** Verificar a prevalência da expressão da proteína p21 em pacientes com adenocarcinoma de esôfago diagnosticados nos últimos cinco anos no Grupo de Cirurgia de Esôfago e Estômago do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GCEE/HCPA).

**METODOLOGIA:** A população em estudo foi constituída de 42 pacientes com adenocarcinoma de esôfago diagnosticados no GCEE/HCPA entre janeiro de 1998 e dezembro de 2002. A expressão da proteína p21 foi avaliada por meio de imunoistoquímica, com anticorpo primário, p21, clone SX118, código M7202 da DAKO, e quantificada de acordo com o Sistema de Escore de Imunorreatividade (Immunoreactive scoring system-IRS).

**RESULTADOS:** Foram estudados 42 pacientes. 83,3% eram do sexo masculino, com idade superior a 40 anos. Destes, 56,2% foram submetidos a procedimentos cirúrgicos com intenção curativa: Gastrectomia total e Esofagogastrectomia transiatal. Os demais foram submetidos à cirurgia paliativa ou não sofreram tratamento cirúrgico. Apenas cinco pacientes receberam tratamento adjuvante com quimioterapia e radioterapia, isoladas ou combinadas. Quanto ao estadiamento, 78,6% dos pacientes apresentavam doença avançada, estádios III e IV. Apenas 9 apresentaram positividade para o p21, quando considerado o Sistema de Escore de Imunorreatividade (em que p21+ é  $\geq 3$ ).

**CONCLUSÃO:** A proteína p21 esteve expressa em 9 dos 42 pacientes (21,4%) com adenocarcinoma de esôfago diagnosticados nos últimos cinco anos no Grupo de Cirurgia de Esôfago e Estômago do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Nessa casuística, o acúmulo de p21 não se mostrou essencial no processo de carcinogênese do adenocarcinoma esofágico.

**Palavras-chave:** esôfago, neoplasia de esôfago, adenocarcinoma de esôfago, câncer de esôfago, Barrett, p21, WAF1, CIP1, carcinogênese, imunoistoquímica.



## 1. INTRODUÇÃO

No mundo ocidental, a prevalência de adenocarcinoma da junção esofagogástrica vem crescendo nas últimas décadas(1-4), principalmente quando comparado com a estabilidade ou diminuição da incidência do carcinoma epidermóide do esôfago(5). Esse crescimento corresponderia a um aumento na incidência do esôfago de Barrett(3). Segundo diversos autores, entre eles, Wijnhoven e Jenkins, esse crescimento excede o de qualquer outra neoplasia maligna(3,4)

Atualmente, é aceito que o adenocarcinoma do esôfago origina-se de uma lesão pré-maligna do esôfago de Barrett. O esôfago de Barrett é uma alteração metaplásica do epitélio escamoso normal do esôfago para um epitélio do tipo colunar, como consequência do refluxo gastresofágico de longa data, o que predispõe o indivíduo afetado a desenvolver adenocarcinoma(3,4,6-9).

O esôfago de Barrett representa o primeiro passo na seqüência para adenocarcinoma do esôfago. O esôfago metaplásico subseqüentemente progride para displasia de baixo grau, de alto grau e, finalmente, para adenocarcinoma(3,5,6).

O carcinoma de esôfago é uma neoplasia difícil de ser identificada nos seus estágios iniciais, por ser assintomática. O diagnóstico em estádios mais avançados resulta em uma mortalidade significativa (8,10). A alta proporção de pacientes que se apresentam com doença avançada, em combinação com a resposta pobre ao tratamento, incentiva uma pesquisa de melhores métodos de identificar pacientes em estádios iniciais, potencialmente melhor tratáveis(5).

É geralmente aceito que um processo de múltiplos passos de alterações genéticas e epigenéticas causa a transformação de uma célula normal em uma célula tumoral maligna(4). Essas alterações tornam a célula independente da regulação proliferativa e do

ciclo de morte celular, e também infundem na célula capacidades proliferativas, infiltrativas e metastatizantes(4).

No centro da proliferação celular está o ciclo de divisão celular, o processo pelo qual a célula cresce, replica seu DNA e então se divide para originar duas células filhas. Esse processo é dividido em fases seqüenciais, explicadas a seguir (11): Mitose (fase M) é o processo de divisão nuclear. Replicação do DNA ocorre na fase S (síntese). O intervalo entre a fase M e a fase S é chamado de fase G1 (gap), e o intervalo entre o fim da fase S e o início da fase M é a fase G2. As células podem sair do ciclo e entrar na fase G0, que é o estado quiescente(4).

Após dano no DNA, a célula pára na transição entre G1 e S ou entre G2 e M do ciclo celular, com conteúdo do DNA em 2N ou 4N, respectivamente. As paradas, nesses pontos de controle, previnem a replicação e a mitose do DNA na presença de alterações cromossomais não-reparadas(12). O câncer é freqüentemente descrito como uma doença do ciclo celular(3). A divisão das populações de células normais mantém o balanço entre proliferação e perda celular(4,13). A progressão das células por meio do ciclo celular é governada por genes que codificam proteínas que transmitem sinais positivos (isto é, ciclinas ativadas e quinases ciclina-dependentes [CDKs]) e negativos (isto é, inibidores de CDKs)(3,4,14).

A proteína p21 é codificada pelo gene WAF1/CIP1 (“wild type p53 associated fragment 1/cdK-interactin protein 1”), um gene supressor tumoral, que está localizado no cromossomo 6p21.2 (15).

A indução do p21 é um mecanismo comum de parada do crescimento em diversas situações fisiológicas. O p21 é transitoriamente induzido no curso da senescência, ou dos genes implicados em doenças relacionadas à idade (Alzheimer, amiloidose), formas

reversíveis e irreversíveis de dano induzido na parada do crescimento, e na diferenciação terminal das células pós-mitóticas(16-18).

O p21 é um inibidor universal de CDKs, ligando-se a todos os complexos de CDK2, CDK3, CDK4 e CDK6. Ao formar um complexo quaternário com ciclinas, CDKs e o antígeno nuclear da célula proliferante (PCNA), inibe a transição da fase G1 para a fase S(19,20).

Vários estudos têm verificado a expressão imunoistoquímica do p21 nas diversas neoplasias.

Alguns estudos mostram a associação da expressão de p21 com pior prognóstico em carcinomas de mama(21), enquanto a redução de sua expressão mostrou-se fator de pior prognóstico em lesões de canal anal(22), bexiga(23) e ovário(24).

No epitélio escamoso esofágico normal, a expressão do p21 está restrita ao compartimento proliferativo, ou seja, à camada basal, estando, desta forma, mais relacionada à proliferação do que à diferenciação(25).

Estudos mostrando a relação do p21 com o adenocarcinoma de esôfago são raros, e não se sabe realmente qual a prevalência da sua expressão imunoistoquímica em nosso meio. Considerando a importância epidemiológica do adenocarcinoma de esôfago e o papel do p21 no desenvolvimento tumoral, os poucos dados abrangendo ambos e a busca de fatores prognósticos, o objetivo deste estudo é verificar a prevalência da expressão da proteína p21 em pacientes com adenocarcinoma de esôfago atendidos no Grupo de Cirurgia de Esôfago e Estômago do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GCEE/HCPA), no período de 1998 a 2002.

## **2. PACIENTES E MÉTODOS**

### **Pacientes**

A população de pesquisa foi constituída pelos pacientes do GCEE/HCPA com adenocarcinoma de esôfago atendidos e tratados entre janeiro de 1998 e dezembro de 2002. Foram revisados 63 prontuários com o referido diagnóstico 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 42 pacientes.

### **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 consiste na desparafinização e reidratação, recuperação antigênica, inativação da peroxidase endógena e bloqueio das reações inespecíficas. O anticorpo primário, p21, clone SX118, código M7202 da DAKO, foi encubado por 12 horas, a 4°C, na diluição de 1:50, seguido da aplicação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) e revelação com diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako). A reação apresentou como controle positivo o carcinoma mamário positivo para p21, sendo o controle negativo realizado sem a utilização do anticorpo primário.

A avaliação do p21 foi realizada de acordo com o Sistema de Escore de Imunorreatividade (Imunoreactive scoring system – IRS), usado por Remmele e Schicketanz e citado por Hannas e cols. O IRS é obtido por meio da multiplicação da

intensidade da coloração (0 é negativa, 1 é fraca, 2 é moderada e 3 é forte) pela porcentagem de células positivas no campo (0 é negativo, 1 é 10% positivo, 2 é 11-50% positivo, 3 é 51-80% positivo e 4 é > 80%). No total, 10 campos visuais são usados para cada avaliação IRS. Escores  $\leq 2$  pontos foram considerados imunopositivos fracos e não-indicativos de sobre-expressão de p21, e escores  $\geq 3$  pontos foram considerados fortemente imunorreativos e indicativos de sobre-expressão de p21 (8).

A leitura das lâminas foi realizada por dois patologistas, de forma independente e sem o conhecimento dos dados clínico-patológicos. O resultado final foi obtido pela média entre os escores dos patologistas.

### **Delineamento**

Trata-se de um estudo de prevalência, em que os dados foram coletados de prontuários de pacientes com adenocarcinoma de esôfago no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2002, no GCEE/HCPA.

### **Análise Estatística**

Os dados quantitativos foram descritos por média e desvio padrão, e os categóricos, por frequência (número absoluto) e percentual. Inicialmente, as observações realizadas pelos dois patologistas responsáveis pela avaliação da intensidade de coloração e expressão do p21 tiveram sua concordância estimada por meio do coeficiente de correlação intraclasse. A porcentagem de casos considerados positivos para o p21 (escore de imunorreatividade  $\geq 3$ ) foi determinada pelo cálculo de proporções com seu respectivo intervalo de confiança de 95% obtido pela distribuição binomial. A distribuição do p21 entre os três grupos de diferenciação histológica foi comparada pela análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi  $\alpha$  0,05. Os dados

foram processados e analisados com o auxílio dos programas SPSS (“*Statistical Package for the Social Sciences*”) versão 10.0 e SigmaPlot versão 2.0.

### 3. RESULTADOS

Os 42 pacientes com adenocarcinoma de esôfago identificados em um período de cinco anos (1º de janeiro de 1998 a 31 de dezembro de 2002) no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e tratados pelo Grupo de Cirurgia de Esôfago e Estômago (GCEE) eram, na sua maioria, do sexo masculino (83,3%), com idade superior a 40 anos.

Os procedimentos cirúrgicos com intenção curativa, gastrectomia total e esofagogastrectomia transiatal, foram realizados em 56,2% dos pacientes, os demais foram submetidos à cirurgia paliativa ou não sofreram tratamento cirúrgico. Apenas cinco pacientes receberam tratamento adjuvante com quimioterapia e radioterapia, isoladas ou combinadas. Cerca de 78,6% dos pacientes apresentavam doença em estado avançado, estádios III e IV (vide tabela 1).

**Tabela 1:** Características dos pacientes com adenocarcinoma de esôfago identificados em um período de cinco anos, n=42, HCPA, 1998–2002.

Característica	Medida síntese
Idade, anos	62,3±9,9
Sexo M/F, (%)	83,3 / 16,7
Estádio	
I	3 (7,1)
II	6 (14,3)
III	22 (52,4)
IV	11 (26,2)
Procedimento	
Gastrectomia total	13 (31,0)
Cirurgia paliativa	12 (28,6)
Ressecção transiatal	11 (25,2)
Biópsia	6 (14,3)
Tratamento adjuvante, n° (%)	5 (11,9)

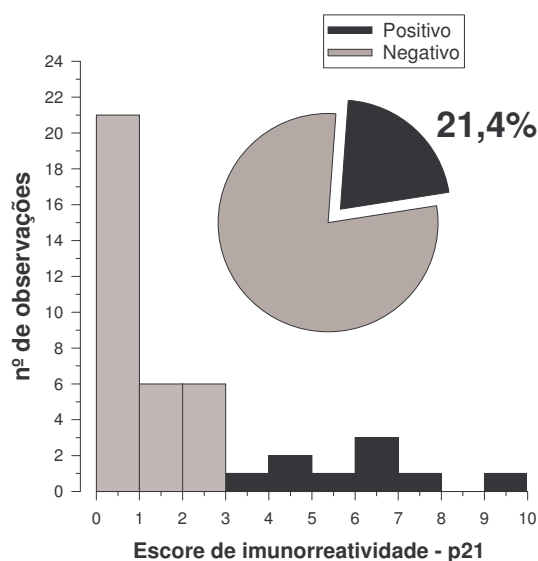
Os dados são apresentados como média±desvio padrão ou número (percentual)

Dos 42 pacientes estudados, 9 apresentaram positividade para o p21, quando considerado o Sistema de Escore de Imunorreatividade (em que p21+ é  $\geq 3$ ), citado anteriormente (vide tabela 2 e figura 1).

**Tabela 2:** Distribuição de frequência do p21 e proporção de observações com expressão positiva (escore  $\geq 3$ ) em pacientes com adenocarcinoma de esôfago identificados em um período de cinco anos, n=42, HCPA, 1998–2002.

P21	f	%
0–1	21	50,0
1–2	6	14,3
2–3	6	14,3
3–4	1	2,4
4–5	2	4,8
5–6	1	2,4
6–7	3	7,1
7–8	1	2,4
8–9	0	0,0
9	1	2,4
<b>P21 + (<math>\geq 3</math>)</b>	<b>9</b>	<b>21,4</b>

média ( $\pm$ desvio padrão): 1,7 $\pm$ 2.4  
 IC95% para p21 +: 11,0 a 35,7

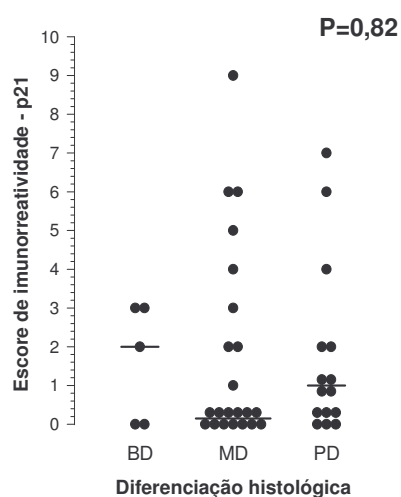


**Figura 1:** Histograma representando a distribuição de frequências do p21, destacando a proporção de observações com expressão positiva (escore  $\geq 3$ ) em pacientes com adenocarcinoma de esôfago identificados em um período de cinco anos, n=42, HCPA, 1998–2002.

A concordância entre os observadores foi estimada por meio do coeficiente de correlação intraclasse e apresentou valor de 0,96 tanto para grau de intensidade de

coloração do p21, quanto para grau de expressão de células positivas para p21 por campo, com uma significância estatística para um  $p < 0,001$  e um valor de 0,94 para o escore de imunorreatividade do p21, com  $p < 0,001$ , demonstrando uma concordância bastante elevada entre os dois observadores presentes no estudo.

A expressão do p21 não apresentou correlação com os graus de diferenciação histológica das biópsias e peças estudadas (vide figura 2).



**Figura 2:** Gráfico de “dot-plot” representando a distribuição dos valores do escore de imunorreatividade do p21 em pacientes com adenocarcinoma de esôfago, segundo diferenciação histológica (BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pouco diferenciado), identificados em um período de cinco anos, n=42, HCPA, 1998–2002.

#### 4. DISCUSSÃO

O esôfago normalmente possui um epitélio escamoso. O tipo histológico usual de câncer esofágico é o carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide; historicamente o adenocarcinoma é menos comum(26). Entretanto, vários estudos têm mostrado que a incidência do adenocarcinoma está aumentando nos países ocidentais(26-29), enquanto a incidência do carcinoma epidermóide permanece relativamente estável(28).



Ainda segue controverso o motivo pelo qual esteja ocorrendo esse crescimento; segundo alguns autores, a diminuição da prevalência da infecção pelo *Helicobacter pylori*, que parece ser um fator protetor, um aumento da prevalência de obesidade, o aumento da ingestão de gordura e o tabagismo podem estar contribuindo para isso(28,29). No carcinoma epidermóide do esôfago distal, o fumo e o álcool são fatores etiológicos(28).

O carcinoma epidermóide e o adenocarcinoma do esôfago são frequentemente relatados como uma doença única do esôfago na literatura, provavelmente porque as estratégias cirúrgicas sejam similares(30). Ainda não está claro se os tipos histológicos diferem somente na localização, ou se também no comportamento biológico(30).

O esôfago de Barrett é uma condição pré-maligna associada com refluxo gastroesofágico, em que o epitélio escamoso do esôfago é substituído por um epitélio colunar metaplásico(27). O refluxo tem sido sugerido como um fator etiológico não só para o adenocarcinoma, como para o câncer do cárdia gástrico(28), o que colabora para que sejam estudados como a mesma doença(26). O estudo de Wijnhoven e cols. mostrou que pacientes com carcinomas do cárdia gástrico compartilhavam características em termos de idade, distribuição sexual (predominando homens) e achados histológicos com pacientes com adenocarcinoma do esôfago, e que, portanto, devem ser considerados entidades únicas, inclusive porque o carcinoma do cárdia apresentava diferenças significativas quando comparado ao carcinoma gástrico não-cárdico (31). Por outro lado, Weiss, apesar de considerar que o carcinoma do cárdia e o adenocarcinoma do esôfago sejam virtualmente idênticos, e formas claramente diferentes do carcinoma epidermóide, afirma que eles devem ser considerados entidades clínicas diferentes (28). O perfil epidemiológico dos pacientes no presente estudo é semelhante ao de outros centros de referência no resto do

mundo, como a predominância de pacientes do sexo masculino (83,3%) e idade superior a 60 anos (idade média de 62,3 anos).

A presença de esôfago de Barrett, que está associada com um maior risco de adenocarcinoma(29), fica com sua avaliação prejudicada nesses pacientes tendo em vista a extensão da doença no momento do diagnóstico (78,6% dos pacientes com estágio III e IV), em que a mucosa com alterações metaplásicas pode ser completamente englobada pela progressão do tumor(32).

Diversos têm sido os esforços para determinar marcadores biológicos que possam influenciar a progressão do esôfago de Barrett na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma de esôfago. No GCEE/HCPA, Cavazzola e cols. estudaram a expressão da proteína p53 e do VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular) em 46 pacientes com adenocarcinoma do esôfago. As expressões da proteína p53 e do VEGF foram observadas em 52,2% e 47,8% dos tumores, respectivamente, e coincidiram em 26% dos casos, e não tendo sido encontrada relação entre essa expressão. Suas expressões não se correlacionaram com o prognóstico em pacientes com adenocarcinoma de esôfago submetidos à cirurgia com intenção curativa(33).

A proteína p21 é um inibidor das CDKs, que inibe a transição da Fase G1 para a Fase S do ciclo celular(20). Nas células humanas, a proteína p21 é considerada um fator maior na supra-regulação da expressão nuclear do p53(20). A expressão da proteína p21 foi verificada em diversas neoplasias malignas, incluindo adenocarcinomas do esôfago(7-9).

No carcinoma epidermóide do esôfago, a expressão da proteína p21 também tem uma grande variabilidade. No estudo de Seta e cols., foi de 27%(34), e no de Shirakawa e cols. foi de 59% nos carcinomas epidermóides superficiais(17). Segundo Shirakawa, a expressão do p21 se correlacionou com o grau de diferenciação histológica do tumor. A

expressão do p21 foi alta em 8 (100%) dos 8 bem diferenciados e em 4 (57%) dos 7 moderadamente diferenciados, mas foi fraca em 4 (40%) dos 10 pouco diferenciados(17). No estudo de Natsugoe e cols., a expressão do p21 foi 43,2% (48 de 111 pacientes) em carcinomas epidermóides do esôfago em estádios avançados(35). Nesse mesmo estudo, a análise multivariada revelou que a expressão do p21 na via p53-dependente foi um fator prognóstico independente(35). A expressão do p21 foi detectada em 44% dos pacientes (11 de 25) com carcinoma epidermóide do esôfago, numa porcentagem de células positivas de 1% a 10%, no estudo de Ohashi e cols.(36). Nesse mesmo trabalho também se observou uma boa correlação entre a expressão e o grau de diferenciação histológica. Dos 8 casos bem diferenciados, 6 (67%) estiveram positivos, enquanto que todos os 8 casos pouco diferenciados foram negativos(36). No trabalho de Meurer, que estudou pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago, a expressão da proteína p21 foi de 77,1%, e não esteve relacionada com a sobrevida dos pacientes operados para carcinoma epidermóide de esôfago(37).

No adenocarcinoma gástrico, segundo Liu e cols., a proteína p21 esteve expressa em 40% dos pacientes, e sua positividade foi considerada fator positivo no prognóstico dos doentes(38).

No estudo de Moskaluk e cols., 66% (58 de 88 pacientes) dos adenocarcinomas do esôfago tiveram uma expressão fraca do p21 (<25% das células positivas), e apenas 9 (10%) adenocarcinomas tiveram expressão difusa do p21 (menos da metade das células positivas)(9). A comparação das mesmas áreas de tumor com expressão de p53 e p21 revelou uma discordância na maioria dos casos, portanto, se acredita que a expressão do p21 seja independente do p53(9). Segundo Hanas e cols., mostrou uma super-expressão do p21 em uma pequena série de 3 pacientes com adenocarcinoma(8). Em outra série pequena,

o p21 esteve sobre-expresso em 2 adenocarcinomas superficiais, e na maioria dos casos a expressão do p21 não se relacionou com a expressão do p53(7).

Neste estudo, optou-se por utilizar um escore de imunorreatividade para se avaliar a expressão da proteína p21, porque seu modo de avaliação difere nos diversos estudos. A proteína p21 esteve expressa em 9 dos 42 (21,4%) pacientes com adenocarcinoma da junção esofagogástrica selecionados, o que é bem diferente dos outros estudos com adenocarcinoma, talvez porque o método de análise do p21 seja diferente nos vários artigos revisados. Não se observou correlação com o grau de diferenciação histológica do tumor, como foi visto em alguns estudos com carcinoma epidermóide do esôfago, relatados acima(17,36).

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rudiger SJ, Feith M, Werner M, Stein HJ. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction: results of surgical therapy based on anatomical/topographic classification in 1,002 consecutive patients. *Ann Surg* 2000; 232: 353-61.
2. Siewert JR, Stein HJ. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Br J Surg* 1998; 85: 1457-9.
3. 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; 89: 824-37.
4. Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001; 233: 322-37.
5. Corley DA, Levin TR, Habel LA, Weiss NS, Buffler PA. Surveillance and survival in Barrett's adenocarcinomas: a population-based study. *Gastroenterology* 2002; 122: 633-40.
6. Riegman PH, Vissers KJ, Alers JC, Geelen E, Hop WC, Tilanus HW, van Dekken H. Genomic alterations in malignant transformation of Barrett's esophagus. *Cancer Res* 2001; 61: 3164-70.

7. Chatelain D, Flejou JF. High-grade dysplasia and superficial adenocarcinoma in Barrett's esophagus: histological mapping and expression of p53, p21 and Bcl-2 oncoproteins. *Virchows Arch* 2003; 442: 18-24.
8. Hanas JS, Lerner MR, Lightfoot SA, Raczkowski C, Kastens DJ, Brackett DJ, Postier RG. Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1) and p53 tumor suppressor in dysplastic progression and adenocarcinoma in Barrett esophagus. *Cancer* 1999; 86: 756-63.
9. Moskaluk CA, Heitmiller R, Zahurak M, Schwab D, Sidransky D, Hamilton SR. p53 and p21(WAF1/CIP1/SDI1) gene products in Barrett esophagus and adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Hum Pathol* 1996; 27: 1211-20.
10. Aloia TA, Harpole DH, Jr., Reed CE, Allegra C, Moore MB, Herndon JE, D'Amico TA. Tumor marker expression is predictive of survival in patients with esophageal cancer. *Ann Thorac Surg* 2001; 72: 859-66.
11. Garrett MD. Cell cycle control and cancer. *Current Science* 2001; 81: 515-22.
12. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998; 282: 1497-501.
13. Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Hatano K, Kitayama J, Tsuruo T, Domene CE, Muto T. p21Waf1/Cip1 expression is a prognostic marker in curatively resected esophageal squamous cell carcinoma, but not p27Kip1, p53, or Rb. *Ann Surg Oncol* 1999; 6: 481-8.
14. Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL. p21--negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 213: 138-49.
15. Lam KY, Law S, Tin L, Tung PH, Wong J. The clinicopathological significance of p21 and p53 expression in esophageal squamous cell carcinoma: an analysis of 153 patients. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2060-8.
16. Chang BD, Watanabe K, Broude EV, Fang J, Poole JC, Kalinichenko TV, Roninson IB. Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 4291-6.
17. Shirakawa Y, Naomoto Y, Kimura M, Kawashima R, Yamatsuji T, Tamaki T, Hamada M, Haisa M, Tanaka N. Topological analysis of p21WAF1/CIP1 expression in esophageal squamous dysplasia. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 541-50.
18. Morisaki H, Ando A, Nagata Y, Pereira-Smith O, Smith JR, Ikeda K, Nakanishi M. Complex mechanisms underlying impaired activation of Cdk4 and Cdk2 in replicative senescence: roles of p16, p21, and cyclin D1. *Exp Cell Res* 1999; 253: 503-10.

19. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-16.
20. el Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-25.
21. Caffo O, Doglioni C, Veronese S, Bonzanini M, Marchetti A, Buttitta F, Fina P, Leek R, Morelli L, Palma PD, Harris AL, Barbareschi M. Prognostic value of p21(WAF1) and p53 expression in breast carcinoma: an immunohistochemical study in 261 patients with long-term follow-up. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1591-9.
22. Holm R, Skovlund E, Skomedal H, Florenes VA, Tanum G. Reduced expression of p21WAF1 is an indicator of malignant behaviour in anal carcinomas. *Histopathology* 2001; 39: 43-9.
23. Migaldi M, Sgambato A, Garagnani L, Ardito R, Ferrari P, De Gaetani C, Cittadini A, Trentini GP. Loss of p21Waf1 expression is a strong predictor of reduced survival in primary superficial bladder cancers. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3131-8.
24. Schmider A, Gee C, Friedmann W, Lukas JJ, Press MF, Lichtenegger W, Reles A. p21 (WAF1/CIP1) protein expression is associated with prolonged survival but not with p53 expression in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 237-42.
25. el Deiry WS, Tokino T, Waldman T, Oliner JD, Velculescu VE, Burrell M, Hill DE, Healy E, Rees JL, Hamilton SR, . Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1995; 55: 2910-9.
26. Pera M, Cameron AJ, Trastek VF, Carpenter HA, Zinsmeister AR. Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Gastroenterology* 1993; 104: 510-3.
27. Whittles CE, Biddlestone LR, Burton A, Barr H, Jankowski JA, Warner PJ, Shepherd NA. Apoptotic and proliferative activity in the neoplastic progression of Barrett's oesophagus: a comparative study. *J Pathol* 1999; 187: 535-40.
28. Weiss MM, Kuipers EJ, Hermsen MA, van Grieken NC, Offerhaus J, Baak JP, Meuwissen SG, Meijer GA. Barrett's adenocarcinomas resemble adenocarcinomas of the gastric cardia in terms of chromosomal copy number changes, but relate to squamous cell carcinomas of the distal oesophagus with respect to the presence of high-level amplifications. *J Pathol* 2003; 199: 157-65.
29. Cameron AJ. Epidemiology of Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Dis Esophagus* 2002; 15: 106-8.

30. Alexandrou A, Davis PA, Law S, Murthy S, Whooley BP, Wong J. Squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lower third of the esophagus and gastric cardia: similarities and differences. *Dis Esophagus* 2002; 15: 290-5.
31. Wijnhoven BP, Siersema PD, Hop WC, van Dekken H, Tilanus HW. Adenocarcinomas of the distal oesophagus and gastric cardia are one clinical entity. Rotterdam Oesophageal Tumour Study Group. *Br J Surg* 1999; 86: 529-35.
32. Ruol A, Parenti A, Zaninotto G, Merigliano S, Costantini M, Cagol M, Alfieri R, Bonavina L, Peracchia A, Ancona E. Intestinal metaplasia is the probable common precursor of adenocarcinoma in barrett esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia. *Cancer* 2000; 88: 2520-8.
33. Cavazzola LT. Avaliação da Expressão da Proteína p53 e do VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular) em Pacientes com Adenocarcinoma do Esôfago. [Tese de Doutorado]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Medicina Programa de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia 2004.
34. Seta T, Imazeki F, Yokosuka O, Saisho H, Suzuki T, Koide Y, Isono K. Expression of p53 and p21WAF1/CIP1 proteins in gastric and esophageal cancers: comparison with mutations of the p53 gene. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 279-89.
35. Natsugoe S, Nakashima S, Matsumoto M, Xiangming C, Okumura H, Kijima F, Ishigami S, Takebayashi Y, Baba M, Takao S, Aikou T. Expression of p21WAF1/Cip1 in the p53-dependent pathway is related to prognosis in patients with advanced esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2445-9.
36. Ohashi K, Nemoto T, Eishi Y, Matsuno A, Nakamura K, Hirokawa K. Expression of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in oesophageal squamous cell carcinomas. *Virchows Arch* 1997; 430: 389-95.
37. Meurer L. Densidade microvascular intratumoral e expressão imuno-histoquímica de p21: associação com sobrevida em pacientes submetidos à cirurgia por carcinoma epidermóide de esôfago. [Tese de Doutorado]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Medicina Programa de Pós-graduação em Medicina: Gastroenterologia 2003.
38. Liu XP, Kawauchi S, Oga A, Suehiro Y, Tsushima K, Tsushima M, Sasaki K. Combined examination of p27(Kip1), p21(Waf1/Cip1) and p53 expression allows precise estimation of prognosis in patients with gastric carcinoma. *Histopathology* 2001; 39: 603-10.

### **12.3. Artigo Científico em Língua Inglesa**

#### **PREVALENCE OF p21 IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION IN ESOPHAGEAL ADENOCARCINOMA.**

Maitê de Mello Villwock\*(1), Luise Meurer (2), Leandro Totti Cavazzola (1), Mário Henrique Osanai (1), Richard R. Gurski(1), Maria Isabel Edelweiss (2), Carlos Cauduro Schirmer (1).

**Divisions of General Surgery (1) and Pathology (2) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.  
Graduate Course in Medicine: Surgery, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.**

Correspondence to:

Dr. Maitê de Mello Villwock

Rua Santa Rita, 285/201 – Floresta. CEP 90220-220. Porto Alegre, RS, Brasil.

E-mail: [javillwock@via-rs.net](mailto:javillwock@via-rs.net)

Phone: +55 51 32227375.



## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** In western societies, the prevalence of adenocarcinoma of the gastroesophageal junction has increased in recent years. It is commonly accepted today that esophageal adenocarcinoma develops from a premalignant lesion: Barrett's esophagus. This type of carcinoma is hardly diagnosed at early stages, which results in significant mortality. Molecular biology studies have shown that most malignant tumors originate from the interaction between inherited characteristics and external factors, which may cause genetic changes that interfere with the control over the differentiation and growth of cells in susceptible individuals. p21<sup>(WAF1/CIP1)</sup> has a key role in the regulation of the cell cycle, and its immunohistochemical expression has been investigated in several tumors, showing that it influences the prognosis of various neoplasms.

**OBJECTIVE:** To check the prevalence of p21 protein expression in patients with esophageal adenocarcinoma diagnosed in the last five years by the Group for Surgeries of the Esophagus and Stomach of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GCEE/HCPA).

**METHODS:** The study population consisted of 42 patients with esophageal adenocarcinoma diagnosed by the GCEE/HCPA between January 1998 and December 2002. The expression of p21 protein was determined by immunohistochemistry using primary antibody, p21, clone SX118, code M7202 (Dako), and assessed according to the Immunoreactive scoring system (IRS).

**RESULTS:** Of 42 analyzed patients, 83.3% were male and older than 40 years. Among these, 56.2% were submitted to curative resection: total gastrectomy and transhiatal esophagogastrectomy. The remaining patients were submitted to palliative surgery or did not undergo any surgical treatment. Only five patients received adjuvant chemotherapy and radiation therapy, either alone or combined. Advanced disease (stages III and IV) was detected in 78.6% of the patients. Only nine patients were positive for p21, according to the immunoreactive scoring system ( $p21+ \geq 3$ ).

**CONCLUSION:** p21 was expressed in 9 of 42 patients (21.4%) with esophageal adenocarcinoma diagnosed in the last five years by the Group for Surgeries of the Esophagus and Stomach of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. In our patient population, the accumulation of p21 did not play a key role in the carcinogenesis of esophageal adenocarcinoma.

**Key words:** esophagus, esophageal neoplasm, esophageal adenocarcinoma, esophageal cancer, Barrett's esophagus, p21, WAF1, CIP1, carcinogenesis, immunohistochemistry.

## 1.INTRODUCTION

In western societies, the prevalence of adenocarcinoma of the gastroesophageal junction has considerably increased in the last years (1-4), especially compared to the stable or lower incidence of epidermoid carcinoma of the esophagus (5). Such increase corresponds to a rise in the incidence of Barrett's esophagus (3). According to various authors, including Wijnhoven and Jenkins, this increase is larger than in any other malignant neoplasm (3,4)

It is commonly accepted today that esophageal adenocarcinoma originates from a premalignant lesion: Barrett's esophagus. Barrett's esophagus is a condition in which the normal squamous epithelium of the esophagus is replaced by a columnar epithelium as a result of long-established gastroesophageal reflux, which predisposes the affected individual to the development of adenocarcinoma (3,4,6-9).

Barrett's esophagus is the preliminary step towards esophageal adenocarcinoma. A metaplastic esophagus subsequently progresses to low-grade and high-grade dysplasia, and finally to adenocarcinoma (3,5,6).

Early-stage esophageal carcinoma is often asymptomatic and detection is uncommon. Diagnosis is usually established at advanced stages, which results in remarkable mortality (8,10). The large number of patients with advanced disease, combined with poor response to treatment, stresses the necessity to find better tools for early diagnosis and intervention, which may increase the chances of treatment success (5).

It is generally accepted that a multiple-step process of genetic and epigenetic changes causes normal cells to mutate into malignant tumor cells (4). These changes allow the cells to become independent from proliferative regulation and from the cycle of cell death, and also stimulate the proliferative, infiltrative and metastasizing capacities of the

cells (4).

The cell cycle: mitosis (M phase) is the nuclear division process. DNA replication takes place in the S phase (synthesis). The period between the M and S phases is known as G1, and the period between the end of the S phase and the beginning of the M phase is known as the G2 phase. The cells may exit the cycle and enter the G0 phase, which is a quiescent stage (4).

After DNA damage, the cell cycle arrests at the G1/S or G2/M phase transition, with a 2N or 4N DNA content, respectively. Arrests at these checkpoints prevent DNA replication and mitosis in the presence of unrepaired chromosome damage (11). Cancer is often described as a cell cycle disease (3). The division of normal cell populations maintains the balance between cellular proliferation and cell loss (4,12). The progression of cells through different phases of the cell cycle is governed by activated cyclins and cyclin-dependent kinases (CDKs), and CDK inhibitors (3,4,13).

Protein p21 is encoded by WAF1/CIP1 (“wild-type p53 associated fragment 1/CDK-interacting protein 1”), a tumor suppressor gene located on chromosome 6p21.2 (14).

Induction of p21 is a common mechanism of growth arrest in different physiological situations. p21 is transiently induced in the course of senescence, or of the genes implicated in age-related diseases (Alzheimer’s disease, amyloidosis), reversible and irreversible forms of damage-induced growth arrest, and in the terminal differentiation of postmitotic cells (15-17).

p21 is a universal CDK inhibitor, binding to all CDK2, CDK3, CDK4 and CDK6 complexes. When p21 forms a quaternary complex with cyclins, CDKs, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA), it inhibits the G1/S phase transition (18,19).

Several studies have analyzed the immunohistochemical expression of p21 in different types of neoplasms

Some studies have revealed an association of p21 expression with worse prognosis in breast cancers (20), whereas its lower expression proved to be a worse prognostic factor for carcinomas of the anal canal (21), bladder(22), and ovaries(23).

In normal esophageal squamous epithelium, p21 expression is restricted to the proliferative compartment (basal layer), thus being more highly associated with proliferation than with differentiation (24).

Studies that show an association between p21 and esophageal adenocarcinoma are rare, and the prevalence of the immunohistochemical expression of p21 is still unknown in our setting. Given the epidemiological importance of esophageal adenocarcinoma and the role of p21 in tumorigenesis, the scant data on both, and the search for better prognostic factors, the aim of the present study is to check the prevalence of p21 expression in patients with esophageal adenocarcinoma treated by the Group for Surgeries of the Esophagus and Stomach of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GCEE/HCPA), between 1998 and 2002.

## **2.PATIENTS AND METHODS**

### **Patients**

The study population consisted of patients with esophageal adenocarcinoma treated by the GCEE/HCPA between January 1998 and December 2002. We reviewed 63 medical charts of patients diagnosed with esophageal adenocarcinoma and 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= 42). The

paraffin blocks were analyzed by the Division of Pathology of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **Immunohistochemical analysis**

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 Clínicas de Porto Alegre, which consisted of deparaffinization and rehydration, antigen retrieval, inactivation of endogenous peroxidase activity and blocking of nonspecific reactions. The primary antibody, p21<sup>(WAF-1/CIP-1)</sup>, clone SX118, code M7202 (Dako), 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 p21-positive breast cancer were used as positive controls, while negative controls did not include the primary antibody.

p21 expression was assessed using the Immunoreactive Scoring System (IRS), used by Remmele and Schicketanz(25) and cited by Hanas et al. IRS is obtained by multiplying the staining intensity (0 = negative, 1 = weak, 2 = moderate, and 3 = strong) by the percentage of positive cells (0 = negative, 1 = 10% positive, 2 = 11-50% positive, 3 = 51-80% positive, and 4 = > 80%). A total of 10 high-power fields are used for each IRS assessment. Scores  $\leq 2$  were considered weakly immunopositive, without p21 overexpression, whilst scores  $\geq 3$  were regarded as strongly immunoreactive, with p21 overexpression (8). Two pathologists who were blinded to the clinical and histopathological information independently analyzed the glass slides. The final result was obtained through the mean between the pathologists' scores.

### **Study design**

This is a prevalence study, in which the data were collected from the medical charts of patients with esophageal adenocarcinoma treated by the GCEE/HCPA between January 1998 and December 2002.

### **Statistical analysis**

The quantitative variables were expressed as mean and standard deviation, and the categorical ones expressed as frequency (absolute value) and percentage. Initially, the agreement between the two pathologists regarding the staining intensity and p21 expression was determined through the intraclass correlation coefficient. The occurrence of p21 positive cases (immunoreactivity score  $\geq 3$ ) was expressed in percentages with a 95%CI obtained via binomial distribution. The Kruskal-Wallis nonparametric analysis of variance was used to compare the distribution of p21 in the three groups of histological differentiation. A p value of 0.05 was considered to be statistically significant. The data were processed and analyzed by SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) version 10.0 and SigmaPlot version 2.0.

## **3.RESULTS**

Most of the 42 patients with esophageal adenocarcinoma diagnosed between January 1st 1998 and December 31st 2002 at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and treated by the Group for Surgeries of the Esophagus and Stomach (GCEE), were male and older than 40 years.

Total gastrectomy and transhiatal esophagogastrectomy were performed in 56.2% of the patients, whereas the remaining patients were submitted to palliative surgery or did not

undergo any surgical treatment. Only five patients received adjuvant chemotherapy and radiation therapy, either alone or combined. Approximately 78.6% of the patients had advanced disease, stages III and IV (Table 1).

**Table 1:** Characteristics of patients with esophageal adenocarcinoma diagnosed between 1998 and 2002 at HCPA, n=42.

Characteristic	Summary measure
Age (years)	62.3±9.9
Gender M/F, (%)	83.3 / 16.7
Stage	
I	3 (7.1)
II	6 (14.3)
III	22 (52.4)
IV	11 (26.2)
Procedure	
Total gastrectomy	13 (31.0)
Palliative surgery	12 (28.6)
Transhiatal resection	11 (25.2)
Biopsy	6 (14.3)
Adjuvant therapy, n (%)	5 (11.9)

The data are expressed as mean ±standard deviation or number (percentage)

Among the 42 studied patients, 9 were positive for p21, according to the immunoreactivity score (p21+ ≥ 3) (Table 2 and Figure 1).

**Table 2:** Frequency distribution of p21 and number of observations with positive expression (score ≥3) in patients with of esophageal adenocarcinoma identified between 1998 and 2002 at HCPA, n=42.

p21	f	%
0-1	21	50.0
1-2	6	14.3
2-3	6	14.3
3-4	1	2.4
4-5	2	4.8
5-6	1	2.4
6-7	3	7.1
7-8	1	2.4
8-9	0	0.0
9	1	2.4
p21 + (≥3)	9	21.4

mean (±standard deviation): 1.7±2.4

95%CI for p21 +: 11.0 to 35.7





#### 4.DISCUSSION

The esophagus usually has a squamous epithelium. The most common histological type of esophageal cancer is the squamous cell carcinoma or epidermoid carcinoma; historically, adenocarcinoma is less frequent (26). However, several studies have shown that the incidence of adenocarcinoma has been increasing in western countries (26-29), whereas the incidence of epidermoid carcinoma has remained relatively stable (28). The reason why such increase occurs is controversial; according to some authors, the lower prevalence of *Helicobacter pylori* infection, which seems to be a protective factor, and the higher prevalence of obesity, increased fat intake, and smoking may be involved (28,29). Smoking and alcoholism are etiologic factors in epidermoid carcinoma of the esophagus (28).

Epidermoid carcinoma and esophageal adenocarcinoma are frequently described in the literature as a single disease of the esophagus, probably because the surgical procedures are similar (30). It is still unclear whether histological types differ as to location only or as to biological behavior as well (30).

Barrett's esophagus is a premalignant condition associated with gastroesophageal reflux, where the esophageal squamous epithelium is replaced by a metaplastic columnar epithelium (27). Gastroesophageal reflux has been suggested as an etiologic factor for adenocarcinoma and gastric cardia cancer as well (28), which results in their being studied as a single entity (26). The study conducted by Wijnhoven showed that patients with carcinomas of the gastric cardia shared common characteristics, such as age, sexual distribution (male predominance) and histological findings, with patients with esophageal adenocarcinoma, and that, these diseases should therefore be regarded as a single entity,

especially because carcinoma of the gastric cardia revealed remarkable differences when compared to noncardial gastric carcinoma (31). On the other hand, although Weiss considers carcinoma of the gastric cardia and esophageal adenocarcinoma to be virtually identical and clearly different forms of epidermoid carcinoma, he advocates that they should be regarded as clinically distinct entities (28). The epidemiological profile of patients in the present study is similar to that of other reference centers around the world, which also have reported a predominance of male individuals (83.3%) aged above 60 years old (mean age of 62.3 years).

The assessment of Barrett's esophagus, which is associated with a greater risk for adenocarcinoma (29), is impaired in these patients due to the extension of the disease at diagnosis (78.6% of patients with stages III and IV disease), where the mucous membrane with metaplastic lesions may be totally affected by tumor progression (32).

A great deal of effort has been channeled into finding biomarkers that can influence the progression of Barrett's esophagus in the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. At the GCEE/HCPA, Cavazzola et al. assessed the expression of p53 and VEGF (vascular endothelial growth factor) in 46 patients with esophageal adenocarcinoma. p53 and VEGF were expressed in 52.2% and 47.8% of the tumors, respectively, coinciding in 26% of the cases, but no association with this expression was established. The expressions of p53 and VEGF were not correlated with prognosis in patients with esophageal adenocarcinoma submitted to curative resection (33).

p21 is a CDK inhibitor, which inhibits the G1/S phase transition (19). In human cells, p21 is considered a major factor in the up-regulation of the nuclear expression of p53(19). p21 has been expressed in several malignant neoplasms, including esophageal adenocarcinomas (7-9).

p21 expression also varies considerably in epidermoid carcinoma of the esophagus. Seta et al. found an expression of 27% (34), whereas Shirakawa found an expression of 59% in superficial epidermoid carcinomas (16). According to Shirakawa, p21 expression was correlated with the degree of histological differentiation of the tumor. The expression of p21 was high in 8 (100%) of 8 well-differentiated and in 4 (57%) of 7 moderately differentiated cases, but weak in 4 (40%) of 10 poorly differentiated cases (16). Natsugoe found a p21 expression of 43.2% (48 of 111 patients) in epidermoid carcinomas of the esophagus at advanced stages of the disease (35). The same author used multivariate analysis and found that p21 expression in the p53-dependent pathway was an independent prognostic factor (35). The expression of p21 was detected in 44% (11 of 25 patients) with epidermoid carcinoma of the esophagus, with a percentage of positive cells between 1 and 10% in the study carried out by Ohashi et al.(36). The same study also showed a good correlation between expression and the degree of histological differentiation. Of 8 well-differentiated cases, 6 (67%) were positive, whereas all of the poorly differentiated cases (8) were negative (36). Meurer, who studied patients with epidermoid carcinoma of the esophagus, found a p21 expression of 77.1%, which was not related to the survival of patients submitted to surgery (37).

According to Liu et al., in gastric adenocarcinoma, p21<sup>(WAF1/CIP1)</sup> was expressed in 40% of the patients, and its expression was considered a positive prognostic factor (38).

In the study conducted by Moskaluk, 66% (58 of 88 patients) of esophageal adenocarcinomas showed a weak p21 expression (<25% of positive cells), only 9 (10%) adenocarcinomas revealed a diffuse p21 expression (less than 50% of positive cells) (9). The comparison of the same tumor areas with p53 and p21 expression showed discrepant results in most cases; therefore, it is believed that p21 expression is independent of p53

protein (9). According to Hanas et al., an overexpression of p21 was observed in a small series of three patients with adenocarcinoma (8). In another small series, p21 was overexpressed in 2 superficial adenocarcinomas, and in most cases, p21 expression was not related to p53 expression (7).

In the present study, we decided to use an immunoreactivity score to evaluate the expression of p21, since evaluation methods vary in different studies. p21 was expressed in 9 of 42 (21.4%) patients with adenocarcinoma of the gastroesophageal junction included in the study, a result that is quite different from other studies on adenocarcinoma, probably because the method used to determine p21 expression varies among studies. No correlation was found as to the degree of histological differentiation of the tumor as described in some studies on epidermoid carcinoma of the esophagus (16,36).

## **5.REFERENCES**

1. Rudiger SJ, Feith M, Werner M, Stein HJ. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction: results of surgical therapy based on anatomical/topographic classification in 1,002 consecutive patients. *Ann Surg* 2000; 232: 353-61.
2. Siewert JR, Stein HJ. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Br J Surg* 1998; 85: 1457-9.
3. 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; 89: 824-37.
4. Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001; 233: 322-37.
5. Corley DA, Levin TR, Habel LA, Weiss NS, Buffler PA. Surveillance and survival in Barrett's adenocarcinomas: a population-based study. *Gastroenterology* 2002; 122: 633-40.

6. Riegman PH, Vissers KJ, Alers JC, Geelen E, Hop WC, Tilanus HW, van Dekken H. Genomic alterations in malignant transformation of Barrett's esophagus. *Cancer Res* 2001; 61: 3164-70.
7. Chatelain D, Flejou JF. High-grade dysplasia and superficial adenocarcinoma in Barrett's esophagus: histological mapping and expression of p53, p21 and Bcl-2 oncoproteins. *Virchows Arch* 2003; 442: 18-24.
8. Hanas JS, Lerner MR, Lightfoot SA, Raczkowski C, Kastens DJ, Brackett DJ, Postier RG. Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1) and p53 tumor suppressor in dysplastic progression and adenocarcinoma in Barrett esophagus. *Cancer* 1999; 86: 756-63.
9. Moskaluk CA, Heitmiller R, Zahurak M, Schwab D, Sidransky D, Hamilton SR. p53 and p21(WAF1/CIP1/SDI1) gene products in Barrett esophagus and adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Hum Pathol* 1996; 27: 1211-20.
10. Aloia TA, Harpole DH, Jr., Reed CE, Allegra C, Moore MB, Herndon JE, D'Amico TA. Tumor marker expression is predictive of survival in patients with esophageal cancer. *Ann Thorac Surg* 2001; 72: 859-66.
11. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998; 282: 1497-501.
12. Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Hatano K, Kitayama J, Tsuruo T, Domene CE, Muto T. p21Waf1/Cip1 expression is a prognostic marker in curatively resected esophageal squamous cell carcinoma, but not p27Kip1, p53, or Rb. *Ann Surg Oncol* 1999; 6: 481-8.
13. Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL. p21--negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 213: 138-49.
14. Lam KY, Law S, Tin L, Tung PH, Wong J. The clinicopathological significance of p21 and p53 expression in esophageal squamous cell carcinoma: an analysis of 153 patients. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2060-8.
15. Chang BD, Watanabe K, Broude EV, Fang J, Poole JC, Kalinichenko TV, Roninson IB. Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 4291-6.
16. Shirakawa Y, Naomoto Y, Kimura M, Kawashima R, Yamatsuji T, Tamaki T, Hamada M, Haisa M, Tanaka N. Topological analysis of p21WAF1/CIP1 expression in esophageal squamous dysplasia. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 541-50.

17. Morisaki H, Ando A, Nagata Y, Pereira-Smith O, Smith JR, Ikeda K, Nakanishi M. Complex mechanisms underlying impaired activation of Cdk4 and Cdk2 in replicative senescence: roles of p16, p21, and cyclin D1. *Exp Cell Res* 1999; 253: 503-10.
18. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-16.
19. el Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-25.
20. Caffo O, Doglioni C, Veronese S, Bonzanini M, Marchetti A, Buttitta F, Fina P, Leek R, Morelli L, Palma PD, Harris AL, Barbareschi M. Prognostic value of p21(WAF1) and p53 expression in breast carcinoma: an immunohistochemical study in 261 patients with long-term follow-up. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1591-9.
21. Holm R, Skovlund E, Skomedal H, Florenes VA, Tanum G. Reduced expression of p21WAF1 is an indicator of malignant behaviour in anal carcinomas. *Histopathology* 2001; 39: 43-9.
22. Migaldi M, Sgambato A, Garagnani L, Ardito R, Ferrari P, De Gaetani C, Cittadini A, Trentini GP. Loss of p21Waf1 expression is a strong predictor of reduced survival in primary superficial bladder cancers. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3131-8.
23. Schmider A, Gee C, Friedmann W, Lukas JJ, Press MF, Lichtenegger W, Reles A. p21 (WAF1/CIP1) protein expression is associated with prolonged survival but not with p53 expression in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 237-42.
24. el Deiry WS, Tokino T, Waldman T, Oliner JD, Velculescu VE, Burrell M, Hill DE, Healy E, Rees JL, Hamilton SR, . Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1995; 55: 2910-9.
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; 189: 862-6.
26. Pera M, Cameron AJ, Trastek VF, Carpenter HA, Zinsmeister AR. Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Gastroenterology* 1993; 104: 510-3.
27. Whittles CE, Biddlestone LR, Burton A, Barr H, Jankowski JA, Warner PJ, Shepherd NA. Apoptotic and proliferative activity in the neoplastic progression of Barrett's oesophagus: a comparative study. *J Pathol* 1999; 187: 535-40.
28. Weiss MM, Kuipers EJ, Hermsen MA, van Grieken NC, Offerhaus J, Baak JP, Meuwissen SG, Meijer GA. Barrett's adenocarcinomas resemble adenocarcinomas of

the gastric cardia in terms of chromosomal copy number changes, but relate to squamous cell carcinomas of the distal oesophagus with respect to the presence of high-level amplifications. *J Pathol* 2003; 199: 157-65.

29. Cameron AJ. Epidemiology of Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Dis Esophagus* 2002; 15: 106-8.
30. Alexandrou A, Davis PA, Law S, Murthy S, Whooley BP, Wong J. Squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lower third of the esophagus and gastric cardia: similarities and differences. *Dis Esophagus* 2002; 15: 290-5.
31. Wijnhoven BP, Siersema PD, Hop WC, van Dekken H, Tilanus HW. Adenocarcinomas of the distal oesophagus and gastric cardia are one clinical entity. Rotterdam Oesophageal Tumour Study Group. *Br J Surg* 1999; 86: 529-35.
32. Ruol A, Parenti A, Zaninotto G, Merigliano S, Costantini M, Cagol M, Alfieri R, Bonavina L, Peracchia A, Ancona E. Intestinal metaplasia is the probable common precursor of adenocarcinoma in barrett esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia. *Cancer* 2000; 88: 2520-8.
33. Cavazzola LT. Avaliação da Expressão da Proteína p53 e do VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular) em Pacientes com Adenocarcinoma do Esôfago. [Tese de Doutorado]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Medicina Programa de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia 2004.
34. Seta T, Imazeki F, Yokosuka O, Saisho H, Suzuki T, Koide Y, Isono K. Expression of p53 and p21WAF1/CIP1 proteins in gastric and esophageal cancers: comparison with mutations of the p53 gene. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 279-89.
35. Natsugoe S, Nakashima S, Matsumoto M, Xiangming C, Okumura H, Kijima F, Ishigami S, Takebayashi Y, Baba M, Takao S, Aikou T. Expression of p21WAF1/Cip1 in the p53-dependent pathway is related to prognosis in patients with advanced esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2445-9.
36. Ohashi K, Nemoto T, Eishi Y, Matsuno A, Nakamura K, Hirokawa K. Expression of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in oesophageal squamous cell carcinomas. *Virchows Arch* 1997; 430: 389-95.
37. Meurer L. Densidade microvascular intratumoral e expressão imuno-histoquímica de p21: associação com sobrevida em pacientes submetidos à cirurgia por carcinoma epidermóide de esôfago. [Tese de Doutorado]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Medicina Programa de Pós-graduação em Medicina: Gastroenterologia 2003.
38. Liu XP, Kawauchi S, Oga A, Suehiro Y, Tsushima K, Tsushima M, Sasaki K. Combined examination of p27(Kip1), p21(Waf1/Cip1) and p53 expression allows precise estimation of prognosis in patients with gastric carcinoma. *Histopathology* 2001; 39: 603-10.