Iberê Cauduro Soares

**Avaliação de fatores de estadiamento em carcinoma
epidermoide do esôfago e de fatores imuno-
histoquímicos relacionados a apoptose e p53**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de: Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Soares, Iberê Cauduro

Avaliação de fatores de estadiamento em carcinoma epidermoide do esôfago, e de fatores imuno-histoquímicos relacionados a apoptose e p53 / Iberê Cauduro Soares. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientador: Venâncio Avancini Ferreira Alves

Descritores: 1.Carcinoma de células escamosas 2.Esôfago 3.Imunoistoquímica
4.Proteína supressora de tumor p53 5.Apoptose 6.Estadiamento de neoplasias

USP/FM/DBD-034/11

Dedicatória

A meu pai Francisco Soares Sobrinho, a minha mãe Mathilde Cauduro Soares e a minhas irmãs Diacuí e Anahi pelo carinho familiar;

A Manoel Francisco Soares patriarca oitocentista da família Soares;

À cidade soarina de Santa Cruz do Rio Pardo, à cidade de São Paulo e à cidade de Santa Maria meus berços fundacional, concepcional e natal.

Agradecimentos

Agradeço a orientação do Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, Professor Titular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em todos os momentos da realização desta investigação, a começar quando me ofereceu a oportunidade de colaborar com ele no Laboratório de Investigação Médica 14 (LIM-14) em 2006 e ao propor-me o tema de minha tese de doutoramento. Seus direcionamentos e comentários foram o guia na condução deste estudo, estimulando-me a prosseguir com espírito crítico e investigativo. O Prof. Venâncio também teve participação fundamental na forma como minha atividade profissional como médico patologista conduziu-se ao longo desses anos de convivência, oferecendo-me oportunidades para implantação de novas técnicas aplicadas quer à patologia cirúrgica diagnóstica quer à patologia como ferramenta de compreensão dos fenômenos biológicos;

A equipe de Cirurgia do Esôfago do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo na pessoa do Prof. Dr. Ivan Cecconello, Professor Titular de Cirurgia do Aparelho Digestivo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, cujos espécimes cirúrgicos de altíssima qualidade técnica estão na origem desta investigação;

Todos os professores e colegas da Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo que tiveram participação no período de minha vida em que cursei a Residência Médica em Anatomia Patológica naquela instituição;

Todos os professores e colegas da Universidade Federal de Santa Maria no Rio Grande do Sul, onde fiz meus primeiros e segundos estudos de graduação no Curso de Medicina daquela Instituição, em especial os Professores Dr. Carlos Renato Almeida Melo, Dra. Dorotéia Melo, Dr. Evandro Sobroza de Mello (então professor naquela Universidade e meu atual coordenador no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo) e Dra. Marília Cechela que formavam o saudoso time de professores do Departamento de Patologia daquela Instituição. Eles despertaram meu interesse pela anatomia patológica, me ensinaram os fundamentos da patologia cirúrgica, e os Professores Carlos Renato e Evandro ainda me permitiram auxiliar na montagem do Laboratório de Imuno-histoquímica do Hospital Universitário de Santa Maria, onde pude aprender pela primeira vez essa técnica;

A Dra. Virgínia Coser que me franqueou meu primeiro estágio quando aluno de graduação em seu Laboratório de Citogenética do Serviço de Hematologia do Hospital Universitário de Santa Maria;

A equipe atual e antiga do LIM14, Alda Wakamatsu, Rodrigo Réssio, Cinthya Cirqueira, Marta Privato e Melissa Ratz pelo apoio nas etapas experimentais desse estudo e pela convivência no mesmo laboratório de pesquisa;

Todos os colegas do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e do Hospital das Clínicas Luzia Pinho de Melo em Mogi das Cruzes, onde trabalho atualmente, principalmente por sua compreensão nas semanas finais de elaboração desta tese de doutoramento, citando especialmente o Dr. Evandro Sobroza de Mello, coordenador do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, o Dr. Rimarcs Gomes Ferreira, coordenador do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas Luzia Pinho de Melo, e o Dr. Kleber Simões do Espírito Santo, meu colega desde os tempos de residência médica e em várias instituições onde trabalhamos juntos;

Meus familiares diretos Francisco Soares Sobrinho, Mathilde Cauduro Soares, Teresa Diacuí Soares, Rita Anahi Soares e meus sobrinhos Júlio César, Luís Guilherme e Ângelo, pela estímulo ao longo dos anos e pela paciência durante a fase final deste projeto nas festividades de Natal e Ano Novo do ano de 2010;

Meus poucos amigos como Dom Alexandre de Andrade, monge beneditino, pelas palavras de amizade;

A cidade de Santa Cruz do Rio Pardo que, embora não sendo a cidade do meu nascimento, é a cidade fundada por meu antepassado Manuel Francisco Soares, berço atemporal dos Soares e que me inspira a almejar coisas boas;

Minha terra natal, Santa Maria, e meu querido Rio Grande do Sul onde deixei tantos amigos, parentes e boas lembranças da infância e adolescência;

Enfim a música erudita de forma geral, pois é minha mais cara diversão e de cuja companhia me afastei nos últimos meses de elaboração dessa tese de doutoramento.

Agradecimentos institucionais:

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio e fomento aos projetos “Genoma Clínico do Câncer” (2001/12904-4) e temático “Apoptose em Tumores” (04/09932-4), ocorridos entre 2001 e 2008, durante os quais coletaram-se os casos aqui estudados;

Todos os colegas pesquisadores da RECEPTA Biopharma, na pessoa dos Professores José Fernando Perez e José Barbosa, pelo convívio em certames de discussão de idéias científicas ao longo do projeto “Caracterização Imuno-histoquímica de Novos Anticorpos de Interesse Oncológico”, desde 2006.

Normalização adotada

Esta tese segue as seguintes normas em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver);

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Lista de figuras

Resumo

Summary

INTRODUÇÃO.....	1
1 Epidemiologia.....	2
2 Estadiamento	3
3 Proteína p53.....	5
4 Apoptose.....	8
5 Micromatriz tecidual.....	11
6 Síntese da introdução.....	13
OBJETIVOS.....	14
MÉTODOS.....	16
1 Casuística e variáveis patológicas de estadiamento.....	17
2 Micromatriz tecidual (TMA).....	19
3 Imuno-histoquímica.....	22
4 Avaliação dos achados imuno-histoquímicos.....	23
5 Avaliação estatística.....	26
6 Levantamento bibliográfico.....	27
7 Aspectos éticos.....	27

RESULTADOS.....	28
1 Achados demográficos e anátomo-patológicos.....	29
2 Distribuição semiquantitativa das variáveis imuno-histoquímicas.....	32
2.1 Distribuição da imuno-expressão de p53.....	32
2.2 Distribuição da imuno-expressão de bax.....	34
2.3 Distribuição da imuno-expressão de citocromo c.....	36
2.4 Distribuição da imuno-expressão de APAF-1.....	38
2.5 Distribuição da imuno-expressão de caspase 3 clivada....	40
2.6 Distribuição da imuno-expressão do antígeno Ki67.....	42
3 Distribuição da relação das variáveis imuno-histoquímicas com as variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário.....	44
3.1 Distribuição da imuno-expressão de p53 em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário.....	44
3.2 Distribuição da imuno-expressão de bax em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário.....	46
3.3 Distribuição da imuno-expressão de citocromo c em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário.....	48
3.4 Distribuição da imuno-expressão de APAF-1 em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário.....	49
3.5 Distribuição da imuno-expressão de caspase 3 clivada em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário.....	51
3.6 Distribuição da imuno-expressão de Ki67 em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário.....	52
3.7 Síntese da distribuição da relação das variáveis imuno-histoquímicas com as variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário.....	53
4 Correlação entre as variáveis imuno-histoquímicas	54
4.1 Correlação da imuno-expressão de p53 com as demais proteínas avaliadas.....	54

4.2	Correlação da imuno-expressão de bax com as demais proteínas avaliadas.....	56
4.3	Correlação da imuno-expressão de citocromo c com as demais proteínas avaliadas.....	57
4.4	Correlação da imuno-expressão de APAF-1 com as demais proteínas avaliadas.....	58
4.5	Correlação da imuno-expressão de caspase 3 clivada com a do antígeno Ki67.....	59
4.6	Síntese da correlação entre as variáveis imuno-histoquímicas	61
DISCUSSÃO.....		62
1	Proteína p53 em carcinoma epidermoide do esôfago.....	63
1.1	Imuno-expressão de p53 em carcinoma epidermoide do esôfago.....	63
1.2	Proteína p53 e variáveis anátomo-patológicas de estadiamento.....	65
1.3	Proteína p53 e outras variáveis imuno-histoquímicas.....	68
2	Bax em carcinoma epidermoide do esôfago.....	71
2.1	Imuno-expressão de bax em carcinoma epidermoide do esôfago.....	71
2.2	Bax e variáveis anátomo-patológicas de estadiamento.....	72
2.3	Bax e outras variáveis imuno-histoquímicas.....	75
3	Citocromo c em carcinoma epidermoide do esôfago.....	77
4	APAF-1 em carcinoma epidermoide do esôfago.....	80
5	Caspase 3 clivada em carcinoma epidermoide do esôfago.....	83
5.1	Atividade apoptótica detectada pela imuno-expressão de caspase 3 clivada em carcinoma epidermoide do esôfago.....	83
5.2	Atividade apoptótica e variáveis anátomo-patológicas de estadiamento.....	85
5.3	Atividade apoptótica e outras variáveis imuno-histoquímicas.....	85

5.4	Relação da atividade apoptótica detectada pela imuno-expressão de caspase 3 clivada e da atividade proliferativa detectada pela imuno-expressão do antígeno Ki67 em carcinoma epidermoide do esôfago.....	86
6	Síntese de avaliação da imuno-expressão de p53 e de proteínas relacionadas a via intrínseca da apoptose (bax, APAF-1, citocromo c) em carcinoma epidermoide do esôfago.....	90
	CONCLUSÕES.....	92
	ANEXOS.....	95
	Anexo A – Variáveis anátomo-patológicas em 63 carcinomas epidermoides do esôfago, caso a caso.....	96
	Anexo B – Variáveis de imuno-expressão em 63 carcinomas epidermoides do esôfago, caso a caso (valores expressos em percentual de células neoplásicas imuno-reativas, exceto para caspase 3 clivada, cujos valores são expressos em número de células ou corpúsculos celulares imuno-reativos em 1000 células).....	97
	REFERÊNCIAS.....	99
	APÊNDICE	
	Apêndice A – Planilhas dos três blocos de TMA construídos contendo a casuística de carcinomas epidermoides esofágicos desta investigação	

Lista de Abreviaturas

APAF-1	Fator ativador de protease apoptótica-1
CEE	Carcinoma epidermoide do esôfago
DNA	Ácido desoxirribonucléico
LIM-14	Laboratório de Investigação Médica 14
M	Presença ou ausência de metástases à distância avaliada clinicamente
N	Estado dos linfonodos regionais avaliado clinicamente
pM	Presença ou ausência de metástases à distância avaliado anátomo-patologicamente
pN	Estado dos linfonodos regionais avaliado anátomo-patologicamente
pT	Nível de invasão do tumor primário avaliado anátomo-patologicamente
T	Nível de invasão do tumor primário avaliado clinicamente
TMA	Micromatriz tecidual
TNM	Estadiamento Tumor – Linfonodo - Metástase
TUNEL	Marcação de terminação fragmentada com dUTP-biotinilada e mediada pela enzima TdT

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Artigos pertinentes à investigação da proteína p53, em carcinomas epidermóides do esôfago.....	7
Tabela 2-	Artigos pertinentes à aplicação da tecnologia de micromatriz tecidual em carcinomas epidermóides do esôfago.....	12
Tabela 3 -	Título e fonte dos anticorpos primários.....	23
Tabela 4 -	Dados anátomo-patológicos, idade e gênero de 63 casos de carcinoma epidermoide do esôfago.....	30
Tabela 5 -	Distribuição da imuno-expressão da proteína p53 em 63 carcinomas epidermóides do esôfago.....	32
Tabela 6 -	Distribuição da imuno-expressão da proteína bax em 63 carcinomas epidermóides do esôfago.....	34
Tabela 7 -	Distribuição da imuno-expressão da proteína citocromo c em 63 carcinomas epidermóides do esôfago.....	36
Tabela 8 -	Distribuição da imuno-expressão da proteína APAF-1 em 63 carcinomas epidermóides do esôfago.....	38
Tabela 9 -	Distribuição da imuno-expressão do antígeno Ki67 em 63 carcinomas epidermóides do esôfago.....	42
Tabela 10 -	Distribuição da imuno-expressão de p53 em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário em 63 carcinomas epidermóides do esôfago.....	45
Tabela 11 -	Distribuição da imuno-expressão de bax em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário em 63 carcinomas epidermóides do esôfago.....	46

Tabela 12 - Distribuição da imuno-expressão de citocromo c em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário em 63 carcinomas epidermóides do esôfago.....	48
Tabela 13 - Distribuição da imuno-expressão de APAF-1 em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário em 63 carcinomas epidermóides do esôfago.....	50
Tabela 14 - Distribuição da imuno-expressão de caspase 3 clivada em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário em 63 carcinomas epidermóides do esôfago.....	51
Tabela 15 - Distribuição da imuno-expressão do antígeno Ki67 em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário em 63 carcinomas epidermóides do esôfago.....	52
Tabela 16 - Valores de p para a análise estatística pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para as variáveis proteína p53, bax, citocromo c, APAF-1, caspase 3 clivada e antígeno Ki67 em relação às variáveis pT, pN, grau de diferenciação do tumor primário, local do tumor primário no esôfago e tamanho do tumor primário em 63 carcinomas epidermóides do esôfago (n = 55 para as avaliações a respeito de pN).....	53
Tabela 17 - Correlação entre a imuno-expressão de p53 e as imuno-expressões de bax, citocromo c, APAF-1, caspase 3 clivada e antígeno Ki67 em 63 carcinoma epidermóides do esôfago.....	55
Tabela 18 - Correlação entre a imuno-expressão de bax e as imuno-expressões de citocromo c, APAF-1, caspase 3 clivada e antígeno Ki67 em 63 carcinoma epidermóides do esôfago.....	56
Tabela 19 - Correlação entre a imuno-expressão de citocromo c e as imuno-expressões de APAF-1, caspase 3 clivada e antígeno Ki67 em 63 carcinoma epidermóides do esôfago.....	57

Tabela 20 - Correlação entre a imuno-expressão de APAF-1 e as imuno-expressões de caspase 3 clivada e antígeno Ki67 em 63 carcinoma epidermóides do esôfago.....	58
Tabela 21 - Correlação entre a imuno-expressão de caspase 3 clivada como medida da atividade apoptótica e a imuno-expressão do antígeno Ki67 como medida da atividade proliferativa em 63 carcinoma epidermóides do esôfago.....	60
Tabela 22 - Coeficiente rho de Spearman e valores de p para as correlações entre as imuno-expressões de p53, bax, citocromo c, APAF-1, caspase 3 clivada e antígeno Ki67 em 63 carcinomas epidermóides do esôfago.....	61
Tabela 23 - Artigos pertinentes à investigação da proteína p53 por imuno-histoquímica, em carcinomas epidermóides do esôfago.....	64
Tabela 24 - Artigos pertinentes à investigação da associação entre a imuno-expressão da proteína p53 e variáveis de estadiamento em carcinomas epidermóides do esôfago.....	66
Tabela 25 - Artigos pertinentes à investigação da associação entre a imuno-expressão da proteína p53 e a imuno-expressão de outras proteínas semelhantes às estudadas no presente estudo em carcinomas epidermóides do esôfago.....	69
Tabela 26 - Artigos pertinentes à investigação da proteína bax por imuno-histoquímica, em carcinomas epidermóides do esôfago.....	71
Tabela 27 - Artigos pertinentes à investigação da associação entre a imuno-expressão da proteína bax e variáveis de estadiamento em carcinomas epidermóides do esôfago.....	73
Tabela 28 - Artigos pertinentes à investigação da associação entre a imuno-expressão da proteína bax e a imuno-expressão de outras	

proteínas semelhantes às estudas no presente estudo em carcinomas epidermoides do esôfago.....	76
Tabela 29 - Artigos pertinentes à investigação de um índice de apoptose em carcinomas epidermoides do esôfago.....	84
Tabela 30 - Artigos pertinentes à investigação de a atividade proliferativa em carcinomas epidermoides do esôfago através do antígeno Ki67.	87
Tabela 31 - Artigos pertinentes à investigação de a atividade proliferativa através do antígeno Ki67, atividade apoptótica, e suas relações com variáveis de estadiamento em carcinomas epidermoides do esôfago.....	89

Lista de Gráficos

- Gráfico 1 - Relação entre a imuno-expressão de bax e o grau de diferenciação do tumor primário em 63 carcinomas epidermóides do esôfago ($p=0,073$ pelo teste de Kruskal-Wallis).....47
- Gráfico 2 - Associação entre a imunoexpressão de APAF-1 e o grau de diferenciação do tumor primário em 63 carcinomas epidermóides do esôfago ($p<0,001$ pelo teste de Kruskal-Wallis).....49
- Gráfico 3 - Correlação entre a imunoexpressão do antígeno Ki67 e a imunoexpressão de caspase 3 clivada em 63 carcinomas epidermóides do esôfago (coeficiente rho de Spearman = 0,373, $p=0,003$).....59

Lista de figuras

Figura 1.	Desenho representando aspectos da via intrínseca da apoptose relacionada à proteína p53.....	10
Figura 2.	Ilustração da técnica de marcação de lâminas histológicas e blocos de parafina, preliminares a confecção dos TMAs.....	19
Figura 3.	Etapas significativas na confecção de blocos de TMA, começando na lâmina histológica marcada no canto superior esquerdo e finalizando no bloco de TMA no canto inferior direito.....	20
Figura 4.	Lâminas coradas pela coloração de hematoxilina e eosina e provenientes dos três blocos de TMA contendo amostras de carcinoma epidermoide do esôfago.....	21
Figura 5.	Esquema de conversão do sistema de semiquantificação em incrementos percentuais de 10% para o sistema de semiquantificação em seis categorias	25
Figura 6.	Três casos representativos dentre os 63 carcinomas epidermóides desta investigação, corados pela hematoxilina e eosina.....	31
Figura 7.	Principais achados imuno-histoquímicos para p53.....	33
Figura 8.	Principais achados imuno-histoquímicos para bax.....	35
Figura 9.	Principais achados imuno-histoquímicos para citocromo c.....	37
Figura 10.	Principais achados imuno-histoquímicos para APAF-1.....	39
Figura 11.	Principais achados imuno-histoquímicos para caspase 3 clivada.....	41
Figura 12.	Principais achados imuno-histoquímicos para antígeno Ki67.....	43

Resumo

Soares IC. *Avaliação de fatores de estadiamento em carcinoma epidermoide do esôfago, e de fatores imuno-histoquímicos relacionados a apoptose e p53* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

O carcinoma epidermoide do esôfago continua sendo a principal neoplasia maligna esofágica na população brasileira. Os objetivos desta investigação foram: avaliar a imuno-expressão de um grupo de proteínas relacionadas à via intrínseca da apoptose (bax, APAF-1 e citocromo c) e da proteína p53 em um grupo de carcinomas epidermóides do esôfago; confrontar estes resultados com a atividade proliferativa medida pela imuno-expressão do antígeno Ki67 e com a atividade apoptótica medida pela imuno-expressão da caspase 3 clivada; e confrontá-los com parâmetros implicados no estadiamento do carcinoma epidermoide do esôfago (invasão local ou pT, estado dos linfonodos regionais ou pN, grau de diferenciação do tumor primário e local do tumor primário no esôfago) e com o tamanho do tumor primário. De um grupo inicial de 91 carcinomas esofágicos consecutivos, 66 carcinomas epidermóides do esôfago foram revistos, alocados em micromatrizes teciduais e submetidos à técnica de imuno-peroxidase com anticorpos primários anti: bax, APAF-1, citocromo c, p53, Ki67 e caspase 3 clivada. Suas imuno-expressões foram semiquantificada de 0 a 5+, exceto caspase 3 clivada que foi contada em 1000 células. Apresentaram amostras válidas um conjunto de 63 carcinomas epidermóides do esôfago. A mediana de imuno-expressão destas 6 proteínas foi: 2+, 5+, 5+, 5+, 3+ e 26, respectivamente. Houve correlação positiva entre a imunoexpressão do antígeno Ki67 e a de caspase 3 clivada (coeficiente rho de Spearman =0,373, p=0,003). Houve associação entre a imunoexpressão de APAF-1 e o grau de diferenciação, com valores maiores de APAF-1 para os carcinomas epidermóides do esôfago bem diferenciados (mediana de 5+ para tumores bem diferenciados, contra mediana de 2+ para tumores pouco diferenciados, p<0,001, teste de Kruskal-Wallis). Houve associação entre o tamanho do tumor primário e o nível de invasão local do tumor primário, com tamanhos maiores quanto maior o nível de invasão local dos carcinomas epidermóides do esôfago (mediana de 32,5 mm para os tumores pT1 e mediana de 50,0 mm para os tumores pT3 ou pT4, p=0,027, teste de Kruskal-Wallis). Não houve associação entre as demais variáveis. Embora atividade proliferativa e atividade apoptótica caminhem juntas nos carcinomas epidermóides do esôfago, no estágio invasivo do principal tipo histológico de carcinoma esofágico da população brasileira, não são mais os fatores ligados à via intrínseca da apoptose que influenciam a sua progressão. Além disso, se a imunoexpressão aumentada da proteína APAF-1 estimula a diferenciação nos carcinomas epidermóides esofágicos, não o faz através de estímulo da atividade apoptótica pura e simplesmente.

Descritores: 1. Carcinoma de células escamosas 2. Esôfago 3. Imunoistoquímica 4. Proteína supressora de tumor p53 5. Apoptose 6. Estadiamento de neoplasias

Summary

Soares IC. *Assessment of staging factors in squamous cell carcinoma of the esophagus, and of immunohistochemical factors related to apoptosis and p53* [thesis]. , University of Sao Paulo School of Medicine, SP (Brazil); 2011.

Squamous cell carcinoma of the esophagus remains as the major malignant esophageal neoplasm in the Brazilian population. The objectives of this study were: to assess the immunoexpression of a group of proteins related to the intrinsic pathway of apoptosis (bax, APAF-1 and cytochrome c) and to p53 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus; to confront these results with proliferative activity measured by the immunoexpression of Ki67 and with apoptotic activity measured by the immunoexpression of cleaved caspase 3; and to confront them with parameters involved in the staging of squamous cell carcinoma of the esophagus (local invasion or pT, lymph node status or pN, grade of differentiation of primary tumor and site of primary tumor in the esophagus) and with size of primary tumor. From a starting group of 91 consecutive carcinomas of the esophagus, 66 squamous cell carcinomas of the esophagus were selected, revised, placed in tissue microarrays blocks, and submitted to immunoperoxidase technique with primary antibodies to: bax, APAF-1, cytochrome c, p53, Ki67 and cleaved caspase 3. The immunoexpression was semiquantified in a scale from 0 to 5+, except for cleaved caspase 3, which was counted in 1000 cells. Sixty three squamous cell carcinomas of the esophagus displayed valid cores for analysis. The median immunoexpression of these 6 proteins were: 2+, 5+, 5+, 5+, 3+ and 26, respectively. A positive correlation was found between Ki67 antigen and cleaved caspase 3 immunoexpression (Spearman's rho coefficient =0.373, $p=0.003$). There was association between the immunoexpression of APAF-1 and the grade of differentiation, with higher values of APAF-1 for well differentiated squamous cell carcinomas of the esophagus (median of 5+ for well differentiated tumors and median of 2+ for poorly differentiated tumors, $p<0.001$, Kruskal-Wallis test). The size of primary tumor was statistically associated to the degree of local invasion of primary tumor, with higher size associated to deeper local invasion (median of 32.5 mm for pT1 tumors and median of 50.0 mm for pT3 or pT4 tumors, $p=0.027$, Kruskal-Wallis test). There was no association among the other variables. Although proliferative activity and apoptotic activity go together in squamous cell carcinomas of the esophagus, the factors involved in the intrinsic pathway of apoptosis does not differ significantly according to the histological parameters in the invasive phase of the development of squamous cell carcinoma of esophagus. Moreover, if increased immunoexpression of APAF-1 stimulates differentiation of squamous cell carcinomas of the esophagus, it does not work through direct higher apoptotic activity.

Descriptors: 1. Squamous cell carcinoma 2. Esophagus 3. Immunohistochemistry 4. Tumor suppressor protein p53 5. Apoptosis 6. Neoplasm staging

INTRODUÇÃO

1 Epidemiologia

Globalmente, o câncer do esôfago encontra-se entre as neoplasias mais frequentes, escalado como o sexto câncer mais comum entre homens e o nono câncer mais comum entre as mulheres (Parkin et al., 2005; Guo, Jiang, 2009). É uma neoplasia altamente agressiva, sendo relacionada como a sexta causa de mortes por câncer do ponto de vista mundial (Pisani et al., 1999). Devido a seu potencial de invasão local e de metástase para linfonodos e para vísceras à distância, a taxa de sobrevivência global em 5 anos permanece baixa, em torno de 14% (Enzinger, Mayer, 2003).

O Brasil, especialmente o sul do Brasil integra o grupo de regiões do ocidente em que a incidência do câncer do esôfago é maior, junto com França, Bermudas e sudeste da África (Lehrbach et al., 2003; Pinto et al. 2003; Faivre et al. 2005). No Brasil, segundo estimativa do Instituto Nacional de Câncer (2010), o câncer do esôfago encontra-se entre os dez grupos de neoplasias malignas mais incidentes, figurando também em sexto lugar entre os homens e também em nono lugar entre as mulheres. O mesmo órgão ainda afirma que a estimativa de novos casos, no Brasil, em 2010, é de 10.630 dos quais 7.890 afetando homens e 2.740 acometendo mulheres, e que o tipo histológico mais comum de câncer do esôfago é o carcinoma epidermóide do esôfago (CEE). No nosso meio, o segundo tipo histológico mais comum é o adenocarcinoma do esôfago. Entretanto esse panorama histológico das neoplasias malignas do esôfago não é unívoco, pois varia tanto geograficamente, quanto etnicamente.

Em países ocidentais do hemisfério norte, o adenocarcinoma do esôfago já é o tipo histológico mais freqüente (Eslick, 2009; Hongo et al., 2009), enquanto, na Ásia, assim como no Brasil, o CEE segue sendo o subtipo histológico preponderante (Hongo et al., 2009). Mesmo em países ocidentais do hemisfério norte, podem-se identificar diferenças com relação à etnia, perceptíveis desde a década de 90 (Devesa, Fraumeni Jr, 1998). Cummings e Cooper (2008) registraram preponderância de CEE em afro-americanos, e dominância de adenocarcinoma esofágico em caucasianos, quando relataram os dados do registro epidemiológico do estado de Ohio, nos Estados Unidos da América.

2 Estadiamento

Uma vez diagnosticado, a próxima etapa no manejo do CEE é seu estadiamento, ou seja a determinação do quanto a doença já está afetando o paciente. O estadiamento mais usado para os cânceres de maneira geral, e para o carcinoma epidermoide do esôfago em especial, é o estadiamento TNM (estadiamento tumor, linfonodo, metástase, Edge et al, 2010). Trata-se de um sistema de estadiamento que avalia três parâmetros básicos: a extensão da neoplasia no sítio de origem (T), o estado dos linfonodos de drenagem regional (N), e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Os três parâmetros podem ser avaliados clinicamente ou anátomo-patologicamente através do estudo macro e microscópico do espécime de ressecção esofágico.

Quando os três parâmetros básicos do estadiamento TNM são avaliados pelo estudo histopatológico, adiciona-se a letra p aos mesmos, consubstanciando, portanto, pT, pN e pM. Entretanto, com a utilização do estadiamento TNM e sua aplicação em pesquisas epidemiológicas, houve uma evolução ao longo dos anos, de tal forma que encontramos na sétima edição deste sistema de estadiamento para neoplasias.

Estimuladas por uma série de investigações publicadas entre 2001 e 2009, na sétima edição do estadiamento TNM, houve várias mudanças significativas no que diz respeito aos carcinomas do esôfago (Siewert et al., 2001; Natsugoe et al., 2001; Rice et al., 2003; Chen et al., 2006; Rice et al., 2009). Foram incluídos os parâmetros tipo histológico e grau de diferenciação como imprescindíveis para a realização do estadiamento, pois os carcinomas epidermoides dos estadios iniciais apresentavam sobrevida em 5 anos pior que os adenocarcinomas do esôfago em iguais estadios, e os carcinomas epidermoides T1 não metastáticos bem diferenciados apresentavam sobrevida em 5 anos ligeiramente superior aos moderadamente e pouco diferenciados (Siewert et al., 2001; Rice et al., 2003; Rice et al., 2009). Para o tipo histológico carcinoma epidermoide também seria necessária a valorização da localização do tumor como parâmetro para o adequado estadiamento, pois os carcinomas epidermoides do esôfago distal apresentavam sobrevida em 5 anos ligeiramente melhor que os do esôfago médio e proximal nos tumores T1, T2 e T3 não metastáticos (Rice et al. 2009). Além disso o parâmetro pN foi subdividido em 4 subcategorias de acordo com o número de linfonodos regionais acometidos por metástase, já que observou-se que quanto maior o número de linfonodos metastáticos pior a sobrevida em 5 anos (Chen et al.,

2006; Natsugoe et al., 2001). Em conjunto, estas mudanças procuraram enfatizar que a determinação histológica do subtipo de um carcinoma do esôfago, sua localização e seu grau de diferenciação histológica também são eventos importantes na determinação do estadiamento final do paciente e, conseqüentemente, na avaliação prognóstica de sua sobrevida. Dito com outras palavras, o estadiamento atual do carcinoma epidermóide do esôfago agrega dois novos parâmetros, além dos parâmetros tradicionais P, T e N.

3 Proteína p53

Nos dias dias de hoje, qualquer pesquisador da biologia tumoral já se deparou com algum artigo descrevendo a atuação da proteína p53 na área sua área de interesse específica, uma vez que essa proteína tem papel relevante em virtualmente todos os aspectos do estudo das neoplasias (Vousden, Prives, 2009). Estima-se que cerca de 50.000 publicações existam abordando algum aspecto da proteína p53 e de suas relações com a biologia celular e neoplásica e que cerca de metade dos espécimes tumorais estudados alberguem mutações no gene p53, o que o caracteriza como o gene mais frequentemente mutado em tumores humanos (Levine, Oren, 2009).

Clonado em 1983, o gene p53 inicialmente foi descrito como um oncogene (Oren, Levine, 1983; Pennica et al., 1984). Em 1989, ficou claro que

esse gene atuava como um gene supressor de tumor, produzindo neoplasias quando mutado e não funcionante (Finlay et al., 1989). Em 1990 descobriu-se que a proteína p53 induzia a parada do ciclo celular, e, em 1991, que ela determinava a morte por apoptose das células consideradas alteradas (Michalovitz et al., 1990; Yonish-Rouach E, et al. 1991). Nessa mesma época, evidenciou-se que a proteína p53 mantém a estabilidade do genoma e que ela age como um fator de transcrição de outros genes, principalmente genes envolvidos na indução da apoptose (Kern SE et al., 1991; Yin et al., 1992). Um pouco mais tarde, em 2003, tornou-se claro que a proteína p53 também pode atuar diretamente na indução da apoptose pela via intrínseca mitocondrial (Mihara et al., 2003; Chipuk et al., 2004). Mais recentemente, foi observado que a proteína p53 possui um papel até mesmo como reguladora do metabolismo celular (Jones et al., 2005).

Especificamente no que diz respeito ao carcinoma epidermoide do esôfago, a proteína p53 apresentou imuno-expressão alterada num número expressivo de casos, variando amplamente entre 40,8 e 82,8%, conforme disposto na tabela 1, o que poderia pressupor sua participação na carcinogênese dessa neoplasia.

Tabela 1. Artigos pertinentes à investigação da proteína p53, em carcinomas epidermoides do esôfago.

Autores	Imuno-expressão (% de casos positivos)
Wagata et al. (1993)	44,8%
Sarbia et al. (1994)	67,2%
Monges et al. (1996)	51,3%
Chaves et al. (1997)	56,8%
Ribeiro et al. (1998)	59,5%
Ikeda et al. (1999)	71,7%
Kanamoto et al. (1999)	48,1%
Lam et al. (1999)	64,0%
Mizobuchi et al. (2000)	48,6%
Shimoji et al. (2000)	48,8%
Szumilo et al. (2000)	67,6%
Arora et al. (2001)	82,8%
Koide et al. (2001)	67,2%
Kurabayashi et al. (2001)	40,8%
Ikeguchi et al. (2002)	46,0%
Güner et al. (2003)	81,1%
Rosa et al. (2003)	53,0%
Cao et al. (2004)	51,1%
Kimura et al. (2005)	58,0%
Miyazaki et al. (2005)	54,0%
Qi et al. (2006)	60,0%
Han et al. (2007)	50,0%
Kang et al. (2007)	47,0%
Liu et al. (2007)	51,1%
Boone et al. (2008)	69,8%
Felin et al. (2008)	48,3%
Cheng et al. (2009)	51,2%
Liu et al. (2010)	49,3%
Taghavi et al. (2010)	56,2%
Yamasaki et al. (2010)	55,8%

4 Apoptose

O processo de disseminação da neoplasia tem como um de seus pressupostos o desbalanço entre proliferação e morte celular. Mesmo entre os teóricos da carcinogênese esofágica, há um senso comum de que as células tumorais do câncer de esôfago evadem a apoptose e têm maior capacidade de proliferar (Lehrbach et al., 2003; McCabe, Dlamini, 2005; Bhutia et al., 2010). Portanto, desde sua descrição quase 40 anos atrás, a apoptose, ou morte celular programada, alargou seu domínio original nos processos inflamatórios e na embriogênese, para atingir um papel importante na tumorigênese (Kerr, 2002).

Em seus primórdios, os estudos sobre a apoptose eram eminentemente descritivos, relatando as alterações morfológicas, ao nível da microscopia eletrônica, que se desenvolvem quando a célula fragmenta-se em seu processo de morte, formando-se os corpos apoptóticos (Kerr, 2002), os quais são visíveis já na clássica coloração de hematoxilina e eosina. Paulatinamente, os estudos morfológicos foram ganhando um cunho cada vez mais molecular, e um número cada vez maior de proteínas foram identificadas e envolvidas numa complexa rede de interligações cujo resultado final é a morte celular, rede esta que oferece inúmeros pontos modulatórios e de inter-relação (Geske, Gerschenson, 2001; Yan, Shi, 2005; Lavrik et al., 2009).

Considerando-se a complexidade dos eventos moleculares relacionados à apoptose, duas vias principais são reconhecidas: a via extrínseca e a via intrínseca (Moffitt et al., 2010). Na via extrínseca, ligantes externos, como o ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral, induzem a apoptose através de sua ligação com receptores da morte localizados nas células alvo (Ashkenaze, 2008; Wiezorek et al. 2010). Na via intrínseca da apoptose, a partir de eventos de estresse intracelular, é acionada a proteína p53 a qual desenvolve um papel central nessa via (Levine, Oren, 2009).

Uma vez acionada, a proteína p53 desenvolve ações pró-apoptóticas tanto ao nível nuclear, quanto ao nível citoplasmático e mitocondrial (Vaseva, Moll, 2009). Ao nível nuclear, a proteína p53 induz a transcrição de proteínas pró-apoptóticas bax, Puma e Noxa, as quais vão atuar a nível citoplasmático e mitocondrial (Shen, White, 2001; Racay et al., 2008; Phillips et al., 2009; Geng et al., 2010). Ao nível citoplasmático e mitocondrial, a proteína p53 interage com membros da família da proteína Bcl-2, a fim de induzir a permeabilização da membrana mitocondrial externa. Assim, a proteína Puma libera a proteína p53 de seu complexo citosólico com a proteína anti-apoptótica bcl-xL, neutralizando os efeitos desta última sobre as proteínas pró-apoptóticas bax e bak. O p53 livre é capaz de induzir a capacidade da proteína bax se oligomerizar e de formar poros lipídicos na membrana externa mitocondrial (Vaseva, Moll, 2009).

Uma vez permeabilizada a membrana mitocondrial externa, o citocromo-c ganha o citosol e induz a formação do apoptossoma através da associação do fator ativador de protease apoptótica-1 (APAF-1) com caspase-9

(Shen, White, 2001; Anichini et al., 2006). Começa então a chamada fase efetora da apoptose onde um grupo de proteases é ativado através de sua clivagem por meio do apoptossoma. Dentre essas proteases encontra-se a caspase 3. Após a clivagem, a caspase 3 clivada pode então lisar inúmeras proteínas celulares, desestabilizando a arquitetura celular por fragmentação e produzindo os efeitos morfológicos da apoptose (Almond, Cohen, 2002; Anichini et al., 2006; Geng et al., 2010).

Essa sequência de eventos pode ser visualizada na figura 1.

Figura 1. Desenho representando aspectos da via intrínseca da apoptose relacionada à proteína p53.

5 Micromatriz tecidual

A tecnologia da micromatriz tecidual (TMA) surgiu há cerca de 10 anos como um ferramenta para o estudo de um número grande de casos ao mesmo tempo (Kononen et al., 1998).

Resumidamente, a partir das lâminas histológicas originais coradas pela hematoxilina e eosina, e seus respectivos blocos de parafina, chamados de blocos doadores, são escolhidas áreas representativas as quais são marcadas sobre as lâminas. Uma vez transportada a marcação da lâmina para o bloco de parafina, uma agulha perfuradora remove um cilindro (“core” pela terminologia de língua inglesa) de cada um dos blocos doadores para um novo bloco de parafina, designado como bloco receptor ou bloco de micromatriz tecidual (bloco de TMA). Pode-se variar a espessura dos cilindros (de 0,6 mm a 1,0 mm) e o número de cilindros alocados por caso estudado (Kononen et al., 1998).

As lâminas histológicas obtidas a partir dos blocos de TMA podem ser utilizadas em qualquer das técnicas *in situ* (histoquímica, imuno-histoquímica, e hibridização *in situ*). O uso de TMAs propiciou a de validação ao nível proteico dos dados obtidos em plataformas de expressão gênica, sendo um instrumento importante para rápida obtenção de informações a respeito de uma população tumoral. Além disso, favorece a uniformidade das condições experimentais às quais as amostras são submetidas (Camp et al., 2008; Hassan et al., 2008).

Quando relacionada ao carcinoma epidermoide esofágico, esta tecnologia já foi utilizada em quinze investigações elencadas na tabela 2.

Tabela 2. Artigos pertinentes à aplicação da tecnologia de micromatriz tecidual em carcinomas epidermóides do esôfago.

Autores	Número de casos	Número de cilindros por caso	Proteínas ou vias estudadas
Chen et al. (2006)	107	não informado	proteína Ets-símile
Liu et al. (2006)	99	não informado	transglutaminase 3
Qi et al. (2006)	60	não informado	p53, p21, Ki67 e ciclina D1
Xue et al. (2006)	205	>2	proteínas da via extrínseca da apoptose
Hu et al. (2007)	116	5	superóxido dismutase do manganês
Liu YS et al. (2007)	86	1	p53, p16, ciclo-oxigenase 2
Boone et al. (2008)	108	3	citoqueratinas, e-caderina, Ki67, p53
Li et al. (2008)	100	2	paxilina
Shou et al. (2008)	313	não informado	validação de genes superexpressos
Yang YL et al. (2008)	180	5	proteína quinase C ι
Boone et al. (2009)	108	3	proteínas com fármacos alvo dirigidos
Sato-Kuwabara et al. (2009)	153	>1	receptor de fator de crescimento epidérmico 2
Takikita et al. (2009)	265	não informado	via extrínseca da apoptose
Chan et al. (2010)	78	não informado	proteína 2 ligadora ao fator de crescimento transformante latente β
Gan SY et al. (2010)	582	1	β -catenina e proteínas de resistência a drogas

Podemos observar uma grande diversidade não apenas na aplicação que foi dada às micromatrizes teciduais contruídas, como nas características da construção dessas micromatrizes. Assim, podemos encontrar casuísticas desde 60 casos até 582 casos. Também é possível constatar que cada caso encontra-se representado desde por 1 cilindro até 5 cilindros, sendo que muitos trabalhos não mencionam o número de cilindros transferidos dos blocos doadores para as micromatrizes teciduais. Observamos ainda que já dois trabalhos dessa literatura investigaram a via extrínseca da apoptose valendo-se de micromatrizes teciduais, e que a via intrínseca da apoptose relacionada à proteína p53 não foi abordada por nenhuma investigação com esta tecnologia.

6 Síntese da introdução

Deste cenário resulta pertinente estudar um grupo de proteínas relacionadas com a via intrínseca da apoptose mediada pela proteína p53 (bax, citocromo-c, APAF-1, caspase 3 clivada e a proteína p53 propriamente dita) em carcinoma epidermoide do esôfago, particularmente em relação aos parâmetros anátomo-patológicos de estadiamento desta neoplasia (pT, pN, pM, grau de diferenciação histológica e localização da neoplasia primária), através da tecnologia da micromatriz tecidual.

OBJETIVOS

Os objetivos desta investigação foram:

- a) Avaliar a imuno-expressão de um grupo de proteínas relacionadas à via intrínseca da apoptose (bax, APAF-1 e citocromo c) e da proteína p53 em uma série de casos de carcinomas epidermoides do esôfago submetidos a esofagectomia;
- b) Confrontar estes resultados com a imuno-expressão da caspase 3 clivada, servindo como indicador genérico da atividade apoptótica e com a atividade proliferativa medida pela imuno-expressão do antígeno Ki67;
- c) Confrontar os resultados de imuno-expressão das proteínas relacionadas à via intrínseca da apoptose (bax, APAF-1 e citocromo c) e da proteína p53, bem como os resultados de imunoexpressão da atividade proliferativa medida pela imuno-expressão do antígeno Ki67 e da atividade apoptótica medida pela imuno-expressão da caspase 3 clivada com o tamanho do tumor e com parâmetros implicados no estadiamento do carcinoma epidermoide do esôfago (pT, pN, grau de diferenciação do tumor primário e local do tumor primário no esôfago).

MÉTODOS

1 Casuística e variáveis patológicas de estadiamento

O universo do estudo incluiu os espécimes cirúrgicos de 91 carcinomas do esôfago seqüenciais dos arquivo da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) oriundos de casos operados pela equipe do Serviço de Cirurgia de Esôfago do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no período entre junho de 2001 e agosto de 2006 . Esse conjunto incluía variados tipos histológicos: carcinoma epidermoide, adenocarcinoma, carcinoma adenoescamoso, e carcinoma sarcomatoide. Dentre esses, os 66 casos de carcinoma epidermoide do esôfago (CEE) foram selecionados para a presente investigação. Todas as lâminas histológicas e respectivos blocos de parafina foram levantados, bem como os respectivos laudos anátomo-patológicos, e foram revistos pelo autor a fim de coletar idade em anos, gênero (masculino ou feminino) e as seguintes variáveis anatomopatológicas, definidas tais como na sétima edição do estadiamento TNM (Edge et al., 2010):

Sítio do tumor primário no esôfago baseado na posição da borda superior do tumor, e abrangendo três terços, sendo o terço proximal localizado até 25 cm contados a partir da arcada dentária superior, o terço médio localizado entre 25 cm e 30 cm da arcada dentária superior e o terço distal localizado além de 30 cm de distância da arcada dentária superior;

Grau de diferenciação do tumor primário subdividido em bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado, de acordo

com a quantidade de diferenciação escamosa sob a forma de pérolas córneas, com mais de 75% de diferenciação escamosa nos tumores bem diferenciados, menos de 10% ou nada de diferenciação escamosa nos tumores pouco diferenciados, ficando os CEE moderadamente diferenciados essas duas classes;

Nível de invasão do tumor primário no esôfago (pT) caracterizado pelas classes pT1 (tumor invadindo a lâmina própria esofágica, a muscular da mucosa ou a submucosa esofágicas); pT2 (tumor invadindo a muscular própria); pT3 (tumor invadindo a adventícia); e pT4 (tumor invadindo estruturas adjacentes);

Estado dos linfonodos regionais (pN) constando de pN0 (ausência de metástases em linfonodos regionais), pN1 (de 1 a 2 linfonodos regionais acometidos por metástases), pN2 (entre 3 e 6 linfonodos regionais acometidos por metástases), e pN3 (7 ou mais linfonodos acometidos por metástases);

Tamanho do tumor primário representada pela medida no maior eixo tumoral expressa em milímetros.

Devido ao fato de casos pT4 não serem usualmente submetidos à cirurgia, o único caso nessa categoria foi agrupado juntamente com os casos pT3. Apenas com relação ao parâmetro pN, foram considerados válidos apenas os casos com mais de 10 linfonodos dissecados, também de acordo com sugestão encontrada no texto de referência do estadiamento TNM (Edge et al., 2010).

Os casos foram designados através do número de seu respectivo laudo anátomo-patológico.

2 Micromatriz tecidual (TMA)

As áreas mais representativas do tumor primário em seu fronte de invasão foram selecionadas pelo autor nas lâminas histológicas coradas pela hematoxilina e eosina levantadas do arquivo. Essas áreas foram marcadas sobre cada lâmina histológica através de pontos com o uso de canetas hidrográficas próprias para marcação não lavável, e as respectivas marcas foram transferidas para blocos de parafina, ora designados blocos de parafina doadores, procedimento ilustrado na figura 2.

Figura 2. Ilustração da técnica de marcação de lâminas histológicas e blocos de parafina, preliminares a confecção dos TMAs.

Os pontos marcados nos blocos de parafina doadores , de agora em diante chamados cilindros ou “spots”, num total de até 3 por caso, foram então transferidos para três blocos de parafina receptores os quais constituem os blocos de TMAs propriamente ditos e designados, utilizando-se para tal de:

a) planilhas contendo a exata localização de cada cilindro dentro do respectivo bloco de TMA, num sistema de coordenadas cartesianas de linhas e colunas, apresentadas no apêndice A.

b) um instrumento mecânico para confecção de TMAs, marca Beecher Instruments™, sendo escolhidas agulhas perfuradoras com diâmetro de 1,0 mm e com distância entre os cilindros de 0,3 mm.

A figura 3 ilustra o processo de confecção dos blocos de TMA através de uma prancha com fotos de suas etapas mais significativas e a figura 4 ilustra os três blocos de TMA confeccionados através de fotos panorâmicas de três lâminas coradas pela hematoxilina e eosina, uma de cada um dos três blocos de TMA.

Figura 3. Etapas significativas na confecção de blocos de TMA, começando na lâmina histológica marcada no canto superior esquerdo e finalizando no bloco de TMA no canto inferior direito.

Figura 4. Lâminas coradas pela coloração de hematoxilina e eosina e provenientes dos três blocos de TMA contendo amostras de carcinoma epidermoide do esôfago.

Após a confecção, os três blocos de TMA foram cortados ao micrótomo, em cortes consecutivos com a espessura de 3 μ m e numerados sequencialmente. Quatro dessas lâminas foram coradas pela hematoxilina-eosina e orientaram a escolha das lâminas que seriam utilizadas para a técnica de imuno-histoquímica. As demais lâminas receberam um banho de parafina e foram acondicionadas em caixas guardadas em freezer a -20 °C até a sua utilização para a técnica imuno-histoquímica.

3 Imuno-histoquímica

Conjuntos de lâminas dos três blocos de TMA foram submetidos a reação imuno-histoquímica, com amplificação por polímeros curtos ligados a peroxidase e recuperação antigênica pelo calor úmido (Shi et al., 1991):

As lâminas histológicas foram desparafinizadas e hidratadas. Realizou-se recuperação antigênica com tampão citrato 10mM pH 6,0 em panela a vapor por 40 minutos a 95 °C. Depois de lavagens com água corrente e água destilada, realizou-se bloqueio da enzima peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 6%, em solução de metanol a 1:1, volume:volume, por 3 vezes de 10 minutos cada à temperatura ambiente. Após novos banhos em água corrente, água destilada, e tampão fosfato pH 7,4, foi efetuado bloqueio de cargas com solução comercial CASBlock™ (Invitrogen/Zymed) por 10 minutos a 37 °C. Após secagem do excesso de bloqueador, cada conjunto de 3 lâminas foi incubado com um dos anticorpos primários descritos na tabela 3, em títulos previamente otimizados para as condições do laboratório LIM14, por 30 minutos a 37 °C, seguidos de incubação por 18 horas a 4 °C. Um conjunto extra de 3 lâminas serviu como controle negativo, com incubação com soroalbumina bovina a 1% e Na₃N a 0,1% em tampão fosfato pH 7,4 em substituição ao anticorpo primário. Lâminas de tecidos sabidamente positivos para cada um dos anticorpos primários utilizados também seguiram em paralelo, servindo como controles positivos das reações. Depois de banhos em tampão fosfato pH 7,4, procedeu-se à incubação com um sistema de polímero curto conjugado a enzima peroxidase do rábano silvestre NovoLink™ (Vision

Biosystems) por 30 minutos a 37 °C. Seguiram-se novos banhos em tampão fosfato pH 7,4, incubação com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina a 60 mg% em tampão fosfato pH 7,4, por 5 minutos a 37 °C e novos banhos em água corrente e água destilada. Contracolorou-se com hematoxilina de Harris por 1 minuto à temperatura ambiente, e, após desidratação, as lâminas foram montadas com resina sintética Entellan™ (Merck).

Tabela 3. Título e fonte dos anticorpos primários.

Anticorpo	Título	Clone	Fonte
anti-Ki67	1:500	MIB1	DAKO
anti-p53	1:1000	DO7	DAKO
anti-citocromo C c	1:20000	A-8	Santa Cruz Biotec.
anti-APAF-1	1:800	24	BD Transduction Lab.
anti-bax	1:300	B9	Santa Cruz Biotec.
anti-caspase 3 clivada	1:100	policlonal de coelho	Calbiochem

4 Avaliação dos achados imuno-histoquímicos

Todas avaliações e contagens foram efetuadas pelo autor, analisando apenas as células epiteliais neoplásicas dos carcinomas epidermóides do esôfago. Cada “spot” de cada caso foi avaliado separadamente, sendo o maior valor obtido escolhido para representar o caso. Só foram considerados válidos os “spots” com pelo menos a metade de sua área disponível para análise. A imunorreatividade foi avaliada inicialmente através de uma escala semiquantitativa de 0 a 100% de células de interesse positivas, com incrementos de 10%, totalizando uma escala com 11 classes possíveis (0, até

10%, até 20%, até 30%, até 40%, até 50%, até 60%, até 70%, até 80%, até 90% e até 100% de células positivas). A seguir, a fim de constituir-se uma semiquantificação mais compacta, os casos foram reagrupados em seis categorias :

0 = negativo;

1+ = até 10% de células neoplásicas positivas;

2+ = acima de 10% a 30% de células neoplásicas positivas;

3+ = acima de 30% a 50% de células neoplásicas positivas;

4+ = acima de 50% a 70% de células neoplásicas positivas;

5+ = acima de 70% a 100% de células neoplásicas positivas.

Apenas a escala semiquantitativa de 0 a 5+ foi utilizada para a realização dos testes estatísticos. A figura 5 ilustra a relação entre os dois sistemas.

Figura 5. Esquema de conversão do sistema de semiquantificação em incrementos percentuais de 10% para o sistema de semiquantificação em seis categorias .

Como percebemos que os valores para a avaliação da imunorreatividade para a caspase 3 clivada encontravam-se em sua grande maioria na categoria de até 10%, consideramos essencial efetuar a contagem de células ou corpúsculos celulares imunorreativos em um total de 1000 células neoplásicas consecutivas. Para tanto o autor efetuou a contagem no primeiro “spot”, e prosseguiu ao segundo e ao terceiro “spots”, caso as 1000 células não fossem atingidas no primeiro spot. Para tanto, as três lâminas com as reações imuno-histoquímicas foram digitalizadas através do “scanner” de

lâminas histológicas Mirax™ (Zeiss) do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) . As imagens digitalizadas foram utilizadas para as contagens, sendo visualizadas através do software Mirax Viewer™. A contagem foi realizada com contador manual (contador hematológico), utilizando 2 botões para contar: o primeiro botão computando as células neoplásicas até um total de 1000, o segundo botão computando as células imunorreativas ou corpúsculos celulares imunorreativos. O número de células ou corpúsculos celulares imunorreativos para caspase 3 clivada por 1000 células neoplásicas foi utilizado então para os testes estatísticos.

Consideramos como imunorreatividade válida a coloração acastanhada observada no núcleo de uma célula neoplásica para a avaliação da proteína p53 e do antígeno Ki67; no citoplasma para a avaliação de bax, citocromo-c e caspase 3 clivada; e no citoplasma e no núcleo para a avaliação de APAF-1.

5 Avaliação estatística

Foram realizados testes estatísticos não-paramétricos, estabelecendo-se $p < 0,05$ como nível de significância estatística. A diferença entre grupos foi avaliada com o teste Kruskal-Wallis. A correlação entre as variáveis imuno-histoquímicas foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Spearman. Utilizou-se a versão 13.0 do software SPSS para as análises estatísticas e para a construção de gráficos.

6 Levantamento bibliográfico

O levantamento bibliográfico foi realizado na base de dados eletrônica PubMed, na página eletrônica <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> utilizando-se as palavras-chave: esophagus, esophageal, squamous, carcinoma, apoptosis, p53, bax, cytochrome c, APAF-1, cleaved caspase 3, fragmented caspase 3, activated caspase 3, Ki67, Ki-67, proliferation. Foram considerados apenas os artigos escritos em inglês ou em português, e aos quais tivéssemos acesso por via eletrônica na íntegra, ou por via reprográfica na íntegra.

7 Aspectos éticos

Esta investigação obteve aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o protocolo de pesquisa número 0266/07, e foi resguardado sigilo quanto à identidade dos pacientes envolvidos.

RESULTADOS

Após a revisão dos casos e avaliação dos parâmetros anátomo-patológicos, um caso foi excluído devido a ausência de linfonodos no espécime cirúrgico, impedindo o adequado estadiamento pTNM. Após a análise imuno-histoquímica nas lâminas de TMA, dois outros casos também foram excluídos devido a ausência de tecido neoplásico representativo nos “spots” (cilindros) que os representavam. Portanto foram considerados válidos para o presente estudo 63 casos de carcinoma epidermóides do esôfago, com 3 spots válidos em 34 casos (54,0%), 2 spots válidos em 22 casos (34,9%), restando apenas um spot válido em 7 casos (11,1%). Os dados individualizados caso a caso encontram-se nos anexos A e B.

1 Achados demográficos e anátomo-patológicos

O sumário das variáveis anátomo-patológicas de estadiamento (pT, pN, grau de diferenciação, e local do tumor primário), assim como das variáveis clínicas idade e gênero encontram-se descritos na tabela 4, e a figura 6 ilustra casos representativos dentre os 63 CEE estudados através da coloração de hematoxilina e eosina.

Tabela 4. Dados anátomo-patológicos, idade e gênero de 63 casos de carcinoma epidermoide do esôfago.

Variável		n	%	média	desvio padrão (±)
Idade (anos)		63		57,7	10,2
Sexo	masculino	49	77,8		
	feminino	14	22,2		
	total	63	100		
Tamanho do tumor (mm)		63		47,9	20,1
Local do tumor	terço proximal	5	7,9		
	terço médio	28	44,4		
	terço distal	30	47,7		
	total	63	100		
Grau de diferenciação do tumor	bem diferenciado	17	27		
	moderadamente diferenciado	35	55,5		
	pouco diferenciado	11	17,5		
	total	63	100		
Invasão local do tumor	pT1	6	9,5		
	pT2	13	20,6		
	pT3	43	68,3		
	pT4	1	1,6		
	total	63	100		
Metástases linfonodais	pN0	24	38,1		
	pN1	15	23,8		
	pN2	18	28,6		
	pN3	6	9,5		
	total	63	100		
Metástases linfonodais (casos com mais de 10 linfonodos dissecados)	pN0	20	36,4		
	pN1	13	23,6		
	pN2	16	29,1		
	pN3	6	10,9		
	total	55	100

Figura 6. Três casos representativos dentre os 63 carcinomas epidermóides desta investigação, corados pela hematoxilina e eosina (100x).

Superior: um exemplo de neoplasia bem diferenciada com diferenciação escamosa difusamente; meio: um exemplo de tumor moderadamente diferenciado com pérolas córneas em cerca de um terço da área; inferior: um exemplo de neoplasia pouco diferenciada sem formação de pérolas córneas.

2 Distribuição semiquantitativa das variáveis imuno-histoquímicas

2.1 Distribuição da imuno-expressão de p53

A imuno-expressão nuclear de p53 foi detectada em 69,8% dos CEE investigados, com mediana de 5+ na semiquantificação agrupada. A distribuição desta variável encontra-se descrita na tabela 3, onde percebe-se o arranjo dos casos nas duas extremidades das escalas de imuno-expressão, ou seja, um grupo de casos com baixa positividade e um segundo grupo com alta positividade. A figura 7 ilustra a imuno-marcação dessa proteína em casos representativos.

Tabela 5. Distribuição da imuno-expressão da proteína p53 em 63 carcinomas epidermoides do esôfago.

Semiquantificação em intervalos de 10%			Semiquantificação agrupada		
Quantidade de células imuno-expressoras	n	% de casos	Classe	n	% de casos
0	19	30,2	0	19	30,2
10%	2	3,2	1+	2	3,2
20%	1	1,6	2+	1	1,6
30%	0	0	3+	0	0
40%	0	0	4+	4	6,3
50%	0	0	5+	37	58,7
60%	0	0	Total	63	100
70%	4	6,3			
80%	5	7,9			
90%	10	15,9			
100%	22	34,9			
Total	63	100

Figura 7. Principais achados imuno-histoquímicos para p53.

Superior à esquerda: Amostra negativa (400x);

Superior à direita: Exemplo de caso com poucos núcleos imunorreativos (menos de 10%, 1+) (200x);

Inferior à esquerda: Aproximadamente 70% dos núcleos deste spot mostram-se positivos (4+) (200x);

Inferior à direita: Caso com imunorreatividade 5+, em 100% dos núcleos (100x).

2.2 Distribuição da imuno-expressão de bax

Houve imuno-expressão citoplasmática de bax em 96,8% dos CEE investigados com mediana de 2+ na semiquantificação agrupada. A distribuição desta variável encontra-se descrita na tabela 6 e ilustrada pela figura 8.

Tabela 6. Distribuição da imuno-expressão da proteína bax em 63 carcinomas epidermoides do esôfago.

Semiquantificação em intervalos de 10%			Semiquantificação agrupada		
Quantidade de células imuno-expressoras	n	% de casos	Classe	n	% de casos
0	2	3,2	0	2	3,2
10%	13	20,6	1+	13	20,6
20%	5	7,9	2+	20	31,8
30%	15	23,9	3+	13	20,6
40%	6	9,5	4+	6	9,5
50%	7	11,1	5+	9	14,3
60%	1	1,6			
70%	5	7,9			
80%	4	6,3			
90%	3	4,8			
100%	2	3,2			
Total	63	100	Total	63	100

Figura 8. Principais achados imuno-histoquímicos para bax.
Superior: Caso com imuno-expressão citoplasmática em cerca de 30% das células (2+) (200x);
Inferior: Outro caso com imuno-expressão citoplasmática na faixa de até 10% das células (1+) (400x).

2.3 Distribuição da imuno-expressão de citocromo c

Houve imuno-expressão citoplasmática de citocromo c em 100% dos CEE investigados com mediana de 5+ na semiquantificação agrupada evidenciando que a maioria dos CEE investigados possuem níveis altos de imuno-expressão dessa proteína. A distribuição desta variável encontra-se descrita na tabela 7 e ilustrada pela figura 9.

Tabela 7. Distribuição da imuno-expressão da proteína citocromo c em 63 carcinomas epidermoides do esôfago.

Semiquantificação em intervalos de 10%			Semiquantificação agrupada		
Quantidade de células imuno-expressoras	n	% de casos	Classe	n	% de casos
0	0	0	0	0	0
10%	0	0	1+	0	0
20%	1	1,6	2+	1	1,6
30%	0	0	3+	5	7,9
40%	3	4,7	4+	2	3,2
50%	2	3,2	5+	55	87,3
60%	2	3,2	Total	63	100
70%	0	0			
80%	8	12,7			
90%	17	27			
100%	30	47,6			
Total	63	100

Figura 9. Principais achados imuno-histoquímicos para citocromo c.
Superior: Padrão de reatividade 3+, achado pouco frequente para este marcador (200x);
Inferior: Cerca de 100% das células reativas no compartimento citoplasmático (5+), classe predominante para citocromo c (200x).

2.4 Distribuição da imuno-expressão de APAF-1

Houve imuno-expressão predominantemente citoplasmática de APAF-1 em 96,8% dos CEE investigados com mediana de 5+ na semiquantificação agrupada, evidenciando que a maioria dos CEE investigados possuem níveis altos de imuno-expressão dessa proteína. A distribuição desta variável encontra-se descrita na tabela 8 e ilustrada pela figura 10.

Tabela 8. Distribuição da imuno-expressão da proteína APAF-1 em 63 carcinomas epidermóides do esôfago.

Semiquantificação em intervalos de 10%			Semiquantificação agrupada		
Quantidade de células imuno-expressoras	n	% de casos	Classe	n	% de casos
0	2	3,2	0	2	3,2
10%	3	4,8	1+	3	4,8
20%	2	3,2	2+	3	4,8
30%	1	1,6	3+	5	7,9
40%	1	1,6	4+	7	11,1
50%	4	6,3	5+	43	68,2
60%	2	3,2	Total	63	100
70%	5	7,9			
80%	4	6,3			
90%	11	17,5			
100%	28	44,4			
Total	63	100

Figura 10. Principais achados imuno-histoquímicos para APAF-1.
Superior: Caso bem diferenciado com 90% de imunorreatividade citoplasmática (5+) (400x);
Inferior: Caso de CEE pouco diferenciado, negativo (400x).

2.5 Distribuição da imuno-expressão de caspase 3 clivada

A avaliação quantitativa da imuno-expressão da proteína caspase3 clivada encontrou valores entre 2 e 184 células ou corpúsculos celulares imunorreativos para caspase 3 clivada por 1000 células neoplásicas (entre 0,2% e 18,4%) com média de 38,2 (3,8%), mediana de 26 (2,6%) e desvio padrão de 36 (3,6%), encontrando-se ilustrada pela figura 11.

Figura 11. Principais achados imuno-histoquímicos para caspase3 clivada. Superior: Um corpúsculo imunorreativo para caspase-3 clivada (círculo) no caso com menor expressão deste marcador (2 eventos /1.000 células) (200x); Meio: Representação média de um campo de caso com 30 células ou corpúsculos celulares positivos / 1.000 células (200x); Inferior: Caso de máxima imuno-expressão da caspase (184 eventos /1.000 células) (200x).

2.6 Distribuição da imuno-expressão do antígeno Ki67

Imuno-expressão nuclear do antígeno Ki67 foi detectada em 100% dos CEE investigados com mediana de 3+ na semiquantificação agrupada evidenciando grande variedade na distribuição da imuno-expressão do antígeno Ki67 nos CEE aqui investigados. A distribuição desta variável encontra-se descrita na tabela 9 e ilustrada pela figura 12.

Tabela 9. Distribuição da imuno-expressão do antígeno Ki67 em 63 carcinomas epidermoides do esôfago.

Semiquantificação em intervalos de 10%			Semiquantificação agrupada		
Quantidade de células imuno-expressoras	n	% de casos	Classe	n	% de casos
0	0	0	0	0	0
10%	8	12,7	1+	8	12,7
20%	10	15,9	2+	22	34,9
30%	12	19	3+	13	20,6
40%	10	15,9	4+	10	15,9
50%	3	4,7	5+	10	15,9
60%	5	7,95	Total	63	100
70%	5	7,95			
80%	7	11,1			
90%	3	4,8			
100%	0	0			
Total	63	100

Figura 12. Principais achados imuno-histoquímicos para antígeno Ki67.
Superior: Caso de CEE com marcação nuclear 2+ (cerca de 30% de células reativas) (200x);
Inferior: Cerca de 70% de células com imuno-marcação nuclear nesta amostra (200x).

3 Distribuição da relação das variáveis imuno-histoquímicas com as variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário

3.1 Distribuição da imuno-expressão de p53 em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário

Não houve associação estatisticamente significativa entre a imuno-expressão da proteína p53 com nenhuma das variáveis de estadiamento (pT, pN, grau de diferenciação, local do tumor primário) nem com o tamanho do tumor primário, pelo teste de Kruskal-Wallis. A distribuição da imunorreatividade dessa proteína pelas classes das variáveis de estadiamento e tamanho do tumor primário e os valores de p é exposta na tabela 10.

Tabela 10. Distribuição da imuno-expressão de p53 em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário em 63 carcinomas epidermoides do esôfago.

Variável		Imuno-expressão de p53						p (teste de Kruskal-Wallis)
		0	1+	2+	3+	4+	5+	total de casos
Invasão local do tumor primário	pT1	2	0	0	0	0	4	6
	pT2	2	1	0	0	0	10	13
	pT3/4	15	1	1	0	4	23	44
	total	19	2	1	0	4	37	63
Metástases linfonodais (casos com mais de 10 linfonodos)	pN0	3	1	1	0	1	14	20
	pN1	3	1	0	0	1	8	13
	pN2	7	0	0	0	0	9	16
	pN3	2	0	0	0	1	3	6
	total	15	2	1	0	3	34	55
Grau de diferenciação do tumor primário	bem diferenciado	5	0	1	0	4	7	17
	moderadamente diferenciado	10	1	0	0	0	24	35
	pouco diferenciado	4	1	0	0	0	6	11
	total	19	2	1	0	4	37	63
Local do tumor primário	terço proximal	1	0	0	0	1	3	5
	terço médio	7	0	0	0	1	20	28
	terço distal	11	2	1	0	2	14	30
	total	19	2	1	0	4	37	63
Tamanho do tumor (média ± desvio padrão)		51,8 ± 25,7	37,5 ± 10,6	50,0 ± 0,0	0	52,5 ± 14,4	45,8 ± 17,9	63
								0,084

3.2 Distribuição da imuno-expressão de bax em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário

Não houve associação estatisticamente significativa entre a imuno-expressão da proteína bax com nenhuma das variáveis de estadiamento (pT, pN, grau de diferenciação, local do tumor primário) nem com o tamanho do tumor primário, pelo teste de Kruskal-Wallis. A distribuição da imunorreatividade dessa proteína pelas classes das variáveis de estadiamento e tamanho do tumor primário e os valores de p encontram-se relatados na tabela 11.

Tabela 11. Distribuição da imuno-expressão de bax em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário em 63 carcinomas epidermoides do esôfago.

Variável		Imuno-expressão de bax						p (teste de Kruskal-Wallis)
		0	1+	2+	3+	4+	5+	total de casos
Invasão local do tumor primário	pT1	0	1	2	0	0	3	6
	pT2	1	2	2	2	3	3	13
	pT3/4	1	10	16	11	3	3	44
	total	2	13	20	13	6	9	63
Metástases linfonodais (casos com mais de 10 linfonodos)	pN0	1	6	4	5	2	2	20
	pN1	1	3	2	3	1	2	13
	pN2	0	2	6	4	1	3	16
	pN3	0	0	3	0	2	1	6
total		2	11	16	12	6	8	55
Grau de diferenciação do tumor primário	bem diferenciado	0	4	6	5	2	0	17
	moderadamente diferenciado	2	9	11	5	1	7	35
	pouco diferenciado	0	0	3	3	3	2	11
	total	2	13	20	13	6	9	63
Local do tumor primário	terço proximal	0	2	1	1	0	1	5
	terço médio	0	6	9	7	2	4	28
	terço distal	2	5	10	5	4	4	30
	total	2	13	20	13	6	9	63
Tamanho do tumor (média ± desvio padrão em mm) primário		36,0 ± 5,6	60,1 ± 24,0	45,4 ± 16,8	47,0 ± 20,8	43,3 ± 17,7	41,8 ± 19,1	63
								0,439

Adicionalmente, o gráfico 1 apresenta a comparação dos valores de imuno-expressão de bax conforme grau histológico, apontando a tendência ($p=0,073$) à maior expressão nos CEE pouco diferenciados (mediana = 3+) quando comparados aos grupos de CEE moderadamente diferenciados (mediana = 2+) e bem diferenciados (mediana = 2+)

Gráfico 1. Relação entre a imuno-expressão de bax e o grau de diferenciação do tumor primário em 63 carcinomas epidermóides do esôfago ($p=0,073$ pelo teste de Kruskal-Wallis).

3.3 Distribuição da imuno-expressão de citocromo c em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário

Não houve associação estatisticamente significativa entre a imuno-expressão da proteína citocromo c com nenhuma das variáveis de estadiamento (pT, pN, grau de diferenciação, local do tumor primário) nem com o tamanho do tumor primário, pelo teste de Kruskal-Wallis. A distribuição da imunorreatividade dessa proteína pelas classes das variáveis de estadiamento e tamanho do tumor primário e os valores de p está exposta na tabela 12.

Tabela 12. Distribuição da imuno-expressão de citocromo c em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário em 63 carcinomas epidermoides do esôfago.

Variável		Imuno-expressão de citocromo c						p (teste de Kruskal-Wallis)	
		0	1+	2+	3+	4+	5+	total de casos	
Invasão local do tumor primário	pT1	0	0	0	0	0	6	6	0,467
	pT2	0	0	0	1	0	12	13	
	pT3/4	0	0	1	4	2	37	44	
	total	0	0	1	5	2	55	63	
Metástases linfonodais (casos com mais de 10 linfonodos)	pN0	0	0	0	1	1	18	20	0,955
	pN1	0	0	0	1	1	11	13	
	pN2	0	0	0	2	0	14	16	
	pN3	0	0	0	1	0	5	6	
	total	0	0	0	5	2	48	55	
Grau de diferenciação do tumor primário	bem diferenciado	0	0	0	3	0	14	17	0,36
	moderadamente diferenciado	0	0	1	2	2	30	35	
	pouco diferenciado	0	0	0	0	0	11	11	
	total	0	0	1	5	2	55	63	
Local do tumor primário	terço proximal	0	0	0	0	0	5	5	0,437
	terço médio	0	0	1	3	1	23	28	
	terço distal	0	0	0	2	1	27	30	
	total	0	0	1	5	2	55	63	
Tamanho do tumor (média ± desvio padrão em mm) primário		0	0	80,0 ± 0,0	45,6 ± 4,3	40,0 ± 0,0	47,8 ± 20,9	63	0,699

Não houve associação estatisticamente significativa entre a imuno-expressão da proteína APAF-1 com as demais variáveis de estadiamento (pT, pN, local do tumor primário) nem com o tamanho do tumor primário, pelo teste de Kruskal-Wallis. A distribuição da imunorreatividade dessa proteína pelas classes das variáveis de estadiamento e tamanho do tumor primário e os valores de p encontra-se relatada na tabela 13.

Tabela 13. Distribuição da imuno-expressão de APAF-1 em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário em 63 carcinomas epidermóides do esôfago.

Variável		Imuno-expressão de APAF-1						p (teste de Kruskal-Wallis)	
		0	1+	2+	3+	4+	5+	total de casos	
Invasão local do tumor primário	pT1	0	0	2	1	1	2	6	0,167
	pT2	1	0	0	2	1	9	13	
	pT3/4	1	3	1	2	5	32	44	
	total	2	3	3	5	7	43	63	
Metástases linfonodais (casos com mais de 10 linfonodos)	pN0	1	0	2	0	0	17	20	0,115
	pN1	0	1	0	0	5	7	13	
	pN2	1	0	1	4	1	9	16	
	pN3	0	2	0	1	1	2	6	
	total	2	3	3	5	7	35	55	
Grau de diferenciação do tumor primário	bem diferenciado	0	0	0	0	1	16	17	<0,001
	moderadamente diferenciado	0	1	1	4	5	24	35	
	pouco diferenciado	2	2	2	1	1	3	11	
	total	2	3	3	5	7	43	63	
Local do tumor primário	terço proximal	0	0	1	0	1	3	5	0,948
	terço médio	2	2	0	2	2	20	28	
	terço distal	0	1	2	3	4	20	30	
	total	2	3	3	5	7	43	63	
Tamanho do tumor (média ± desvio padrão em mm) primário		51,0 ± 5,6	44,0 ± 16,3	51,6 ± 24,6	40,0 ± 27,4	49,0 ± 19,5	48,4 ± 20,4	63	0,15

3.5 Distribuição da imuno-expressão de caspase 3 clivada em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário

Não houve associação estatisticamente significativa entre a quantificação da imuno-expressão da proteína caspase 3 clivada com nenhuma das variáveis de estadiamento (pT, pN, grau de diferenciação, local do tumor primário) nem com o tamanho do tumor primário, pelo teste de Kruskal-Wallis. A distribuição da imunorreatividade dessa proteína pelas classes das variáveis de estadiamento e tamanho do tumor primário e os valores de p encontra-se relatada na tabela 14.

Tabela 14. Distribuição da imuno-expressão de caspase 3 clivada em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário em 63 carcinomas epidermóides do esôfago.

Variável		Imuno-expressão de caspase 3 clivada (número de células e corpúsculos celulares marcados /1000 células contadas)			p (teste de Kruskal-Wallis)
		média	desvio padrão	total de casos	
Invasão local do tumor primário	pT1	33,3	39,4	6	0,686
	pT2	42,5	47,9	13	
	pT3/4	37,6	32,7	44	
	total	38,2	36,3	63	
Metástases linfonodais (casos com mais de 10 linfonodos)	pN0	37	37,2	20	0,656
	pN1	33,5	32,7	13	
	pN2	35,9	31,1	16	
	pN3	58,6	63,9	6	
total		38,8	37,2	55	
Grau de diferenciação do tumor primário	bem diferenciado	34,2	35,6	17	0,157
	moderadamente diferenciado	34,3	30,3	35	
	pouco diferenciado	56,8	50,4	11	
	total	38,2	36,3	63	
Local do tumor primário	terço proximal	23,6	22,4	5	0,582
	terço médio	36,4	30,1	28	
	terço distal	42,3	43	30	
	total	38,2	36,3	63	
Tamanho do tumor (média em mm) primário		47,9	20,1	63	0,573

3.6 Distribuição da imuno-expressão de Ki67 em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário

Não houve associação estatisticamente significativa entre a imuno-expressão do antígeno Ki67 com nenhuma das variáveis de estadiamento (pT, pN, grau de diferenciação, local do tumor primário) nem com o tamanho do tumor primário, pelo teste de Kruskal-Wallis. A distribuição da imunorreatividade dessa proteína pelas classes das variáveis de estadiamento e tamanho do tumor primário e os valores de p encontra-se relatada na tabela 15.

Tabela 15. Distribuição da imuno-expressão do antígeno Ki67 em relação às variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário em 63 carcinomas epidermóides do esôfago.

Variável		Imuno-expressão de Ki67							p (teste de Kruskal-Wallis)
		0	1+	2+	3+	4+	5+	total de casos	
Invasão local do tumor primário	pT1	0	1	0	2	0	3	6	0,132
	pT2	0	1	4	2	3	3	13	
	pT3/4	0	6	18	9	7	4	44	
	total	0	8	22	13	10	10	63	
Metástases linfonodais (casos com mais de 10 linfonodos)	pN0	0	1	5	4	5	5	20	0,093
	pN1	0	2	5	5	1	0	13	
	pN2	0	5	6	0	2	3	16	
	pN3	0	0	3	2	0	1	6	
total		0	8	19	11	8	9	55	
Grau de diferenciação do tumor primário	bem diferenciado	0	3	8	2	2	2	17	0,22
	moderadamente diferenciado	0	4	12	8	6	5	35	
	pouco diferenciado	0	1	2	3	2	3	11	
	total	0	8	22	13	10	10	63	
Local do tumor primário	terço proximal	0	1	1	1	0	2	5	0,121
	terço médio	0	1	9	7	6	5	28	
	terço distal	0	6	12	5	4	3	30	
	total	0	8	22	13	10	10	63	
Tamanho do tumor (média ± desvio padrão em mm) primário		0	54,1 ± 13,4	47,8 ± 22,6	47,6 ± 21,1	51,0 ± 19,8	40,1 ± 18,6	63	0,322

3.7 Síntese da distribuição da relação das variáveis imuno-histoquímicas com as variáveis de estadiamento patológico e tamanho do tumor primário

A tabela 16 apresenta resumidamente as relações entre as imuno-expressões de p53, bax, citocromo c, APAF-1, caspase 3 clivada e antígeno Ki67 e as variáveis de estadiamento patológico pT, pN, grau de diferenciação do tumor primário, local do tumor primário, e tamanho do tumor primário.

Tabela 16. Valores de p para a análise estatística pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para as variáveis proteína p53, bax, citocromo c, APAF-1, caspase 3 clivada e antígeno Ki67 em relação às variáveis pT, pN, grau de diferenciação do tumor primário, local do tumor primário no esôfago e tamanho do tumor primário em 63 carcinomas epidermoides do esôfago (n = 55 para as avaliações a respeito de pN).

Variável	pT	pN	Grau de diferenciação do tumor primário	Local do tumor primário	Tamanho do tumor primário
bax	0,203	0,563	0,073	0,904	0,439
APAF-1	0,167	0,115	<0,001	0,948	0,15
cytochrome c	0,467	0,955	0,36	0,437	0,699
p53	0,318	0,627	0,434	0,233	0,084
Ki67	0,132	0,093	0,22	0,121	0,322
Caspase 3 clivada	0,686	0,656	0,157	0,582	0,573

4 Correlação entre as variáveis imuno-histoquímicas

4.1 Correlação da imuno-expressão de p53 com as demais proteínas avaliadas

Não houve correlação entre a imuno-expressão da proteína p53 com as demais variáveis imuno-histoquímicas avaliadas: bax, citocromo c, APAF-1, caspase 3 clivada e antígeno Ki67 através do teste de correlação de Spearman. A tabela 17 apresenta a distribuição entre cada uma dessas variáveis, bem como os respectivos coeficientes de correlação de Spearman e valores de p.

Tabela 17. Correlação entre a imuno-expressão de p53 e as imuno-expressões de bax, citocromo c, APAF-1, caspase 3 clivada e antígeno Ki67 em 63 carcinoma epidermoides do esôfago.

Variável de imuno-expressão		Imuno-expressão de p53							Coeficiente rho de Spearman	Valor de p
		0	1+	2+	3+	4+	5+	total de casos		
bax	0	1	0	0	0	0	1	2	-0,026	0,84
	1+	3	0	0	0	2	8	13		
	2+	5	0	1	0	2	12	20		
	3+	5	2	0	0	0	6	13		
	4+	2	0	0	0	0	4	6		
	5+	3	0	0	0	0	6	9		
	total	19	2	1	0	4	37	63		
citocromo c	0	0	0	0	0	0	0	0	0,08	0,533
	1+	0	0	0	0	0	0	0		
	2+	1	0	0	0	0	0	1		
	3+	2	0	0	0	1	2	5		
	4+	0	0	0	0	0	2	2		
	5+	16	2	1	0	3	33	55		
	total	19	2	1	0	4	37	63		
APAF-1	0	0	0	0	0	0	2	2	0,138	0,28
	1+	1	0	0	0	0	2	3		
	2+	2	0	0	0	0	1	3		
	3+	3	0	0	0	0	2	5		
	4+	3	1	0	0	0	3	7		
	5+	10	1	1	0	4	27	43		
	total	19	2	1	0	4	37	63		
caspase 3 clivada (número de células ou corpúsculo marcados/1000)	média	32,1	29	8	0	56,7	40,7	38,2	0,077	0,551
	desvio padrão	31,2	12,7	0	0	32,2	39,9	36,3		
	total	19	2	1	0	4	37	63		
Ki67	0	0	0	0	0	0	0	0	0,138	0,282
	1+	4	0	0	0	0	4	8		
	2+	7	1	1	0	2	11	22		
	3+	3	1	0	0	1	8	13		
	4+	1	0	0	0	0	9	10		
	5+	4	0	0	0	1	5	10		
	total	19	2	1	0	4	37	63		

4.2 Correlação da imuno-expressão de bax com as demais proteínas avaliadas

Não houve correlação entre a imuno-expressão da proteína bax com as demais variáveis imuno-histoquímicas avaliadas: citocromo c, APAF-1, caspase 3 clivada e antígeno Ki67 através do teste de correlação de Spearman. A tabela 18 apresenta a distribuição dessas variáveis, com respectivos coeficientes de correlação de Spearman e valores de p.

Tabela 18. Correlação entre a imuno-expressão de bax e as imuno-expressões de citocromo c, APAF-1, caspase 3 clivada e antígeno Ki67 em 63 carcinoma epidermoides do esôfago.

Variável de imuno-expressão		Imuno-expressão de bax							Coeficiente rho de Spearman	Valor de p
		0	1+	2+	3+	4+	5+	total de casos		
citocromo c	0	0	0	0	0	0	0	0	0,08	0,533
	1+	0	0	0	0	0	0	0		
	2+	0	1	0	0	0	0	1		
	3+	0	0	2	1	1	1	5		
	4+	1	1	0	0	0	0	2		
	5+	1	11	18	12	5	8	55		
total		2	13	20	13	6	9	63		
APAF-1	0	0	0	0	1	1	0	2	-0,095	0,458
	1+	0	1	1	0	1	0	3		
	2+	0	1	1	0	0	1	3		
	3+	0	1	2	0	1	1	5		
	4+	0	2	1	2	0	2	7		
	5+	2	8	15	10	3	5	43		
total		2	13	20	13	6	9	63		
caspase 3 clivada (número de células ou corpúsculo marcados/1000)	média	16,5	36,5	33,1	35,9	63,6	43,3	38,2	0,182	0,153
	desvio padrão	4,9	40	29,6	25,2	69,5	32,2	36,3		
	total	2	13	20	13	6	9	63		
Ki67	0	0	0	0	0	0	0	0	-0,033	0,798
	1+	0	1	3	2	1	1	8		
	2+	1	5	6	6	2	2	22		
	3+	0	2	5	3	0	3	13		
	4+	0	4	2	0	2	2	10		
	5+	1	1	4	2	1	1	10		
total		2	13	20	13	6	9	63		

4.3 Correlação da imuno-expressão de citocromo c com as demais proteínas avaliadas

Não houve correlação entre a imuno-expressão da proteína citocromo c com as demais variáveis imuno-histoquímicas avaliadas: APAF-1, caspase 3 clivada e antígeno Ki67 através do teste de correlação de Spearman. A tabela 19 apresenta a distribuição entre essas variáveis, com respectivos coeficientes de correlação de Spearman e valores de p.

Tabela 19. Correlação entre a imuno-expressão de citocromo c e as imuno-expressões de APAF-1, caspase 3 clivada e antígeno Ki67 em 63 carcinoma epidermoides do esôfago.

Variável de imuno-expressão		Imuno-expressão de citocromo c							Coeficiente rho de Spearman	Valor de p			
		0	1+	2+	3+	4+	5+	total de casos					
APAF-1	0	0	0	0	0	0	2	2	-0,173	0,175			
	1+	0	0	0	0	0	3	3					
	2+	0	0	0	0	0	3	3					
	3+	0	0	0	0	0	5	5					
	4+	0	0	0	1	0	6	7					
	5+	0	0	1	4	2	36	43					
total		0	0	1	5	2	55	63					
caspase 3 clivada (número de células ou corpúsculo marcados/1000)	média	0	0	17	26,4	77,5	38,2	38,2	0,003	0,979			
	desvio padrão	0	0	0	11,6	81,3	36,1	36,3					
	total		0	0	1	5	2	55			63		
Ki67	0	0	0	0	0	0	0	0	0,14	0,275			
	1+	0	0	0	1	0	7	8					
	2+	0	0	0	3	1	18	22					
	3+	0	0	1	1	0	11	13					
	4+	0	0	0	0	1	9	10					
	5+	0	0	0	0	0	10	10					
total		0	0	1	5	2	55	63					

4.4 Correlação da imuno-expressão de APAF-1 com as demais proteínas avaliadas

Não houve correlação entre a imuno-expressão da proteína APAF-1 com as demais variáveis imuno-histoquímicas avaliadas: caspase 3 clivada e antígeno Ki67 através do teste de correlação de Spearman. A tabela 20 apresenta a distribuição entre essas variáveis, com respectivos coeficientes de correlação de Spearman e valores de p.

Tabela 20. Correlação entre a imuno-expressão de APAF-1 e as imuno-expressões de caspase 3 clivada e antígeno Ki67 em 63 carcinoma epidermoides do esôfago.

Variável de imuno-expressão		Imuno-expressão de APAF-1							Coeficiente rho de Spearman	Valor de p
		0	1+	2+	3+	4+	5+	total de casos		
caspase 3 clivada (número de células ou corpúsculo marcados/1000)	média	42,5	16	62	61,8	29,8	36,5	38,2	-0,065	0,614
	desvio padrão	9,1	12,7	52,3	73	14,6	33,3	36,3		
	total	63								
Ki67	0	0	0	0	0	0	0	0	0,033	0,797
	1+	0	0	1	1	1	5	8		
	2+	0	2	0	2	4	14	22		
	3+	0	1	1	0	2	9	13		
	4+	1	0	0	0	0	9	10		
	5+	1	0	1	2	0	6	10		
	total	2	3	3	5	7	43	63		

4.5 Correlação da imuno-expressão de caspase 3 clivada com a do antígeno Ki67

Houve correlação positiva entre atividade apoptótica avaliada pela imuno-expressão quantitativa de caspase 3 clivada e a atividade proliferativa avaliada pela imuno-expressão semiquantitativa do antígeno Ki67 (coeficiente rho de Spearman = 0,373 , $p=0,003$), ilustrada no gráfico 3, e cuja distribuição encontra-se descrita na tabela 21.

Gráfico 3. Correlação entre a imunoexpressão do antígeno Ki67 e a imunoexpressão de caspase 3 clivada em 63 carcinomas epidermóides do esôfago (coeficiente rho de Spearman = 0,373, $p=0,003$).

Tabela 21. Correlação entre a imuno-expressão de caspase 3 clivada como medida da atividade apoptótica e a imuno-expressão do antígeno Ki67 como medida da atividade proliferativa em 63 carcinoma epidermóides do esôfago.

Variável de imuno-expressão	Imuno-expressão de caspase 3 clivada (número de células ou corpúsculo marcados/1000 células neoplásicas)			Coeficiente rho de Spearman	Valor de p
		média	desvio padrão		
Ki67	0	0	0	0,373	0,003
	1+	13,8	9,5		
	2+	28	22,6		
	3+	40,6	30,6		
	4+	62,9	42,6		
	5+	52,3	55,3		
	total	38,2	36,3		

4.6 Síntese da correlação entre as variáveis imuno-histoquímicas

A tabela 22 apresenta o resumo das correlações entre as imuno-expressões de p53, bax, citocromo c, APAF-1, caspase 3 clivada e antígeno Ki67 .

Tabela 22. Coeficiente rho de Spearman e valores de p para as correlações entre as imuno-expressões de p53, bax, citocromo c, APAF-1, caspase 3 clivada e antígeno Ki67 em 63 carcinomas epidermóides do esôfago.

Imunoreatividade	Variáveis	bax		APAF-1		citocromo c		p53		Ki67		caspase 3 clivada	
		rs	p	rs	p	rs	p	rs	p	rs	p	rs	p
bax				-0,095	0,458	0,08	0,533	-0,026	0,84	-0,033	0,798	0,182	0,153
APAF-1		-0,095	0,458			-0,173	0,175	0,138	0,28	0,033	0,797	-0,065	0,614
citocromo c		0,08	0,533	-0,173	0,175			0,08	0,533	0,14	0,275	0,003	0,979
p53		-0,026	0,84	0,138	0,28	0,08	0,533			0,138	0,282	0,077	0,551
Ki67		-0,033	0,798	0,033	0,797	0,14	0,275	0,138	0,282			0,373	0,003
caspase 3 clivada		0,182	0,153	-0,065	0,614	0,003	0,979	0,077	0,551	0,373	0,003		

Abreviação: coeficiente rho de Spearman (rs).

DISCUSSÃO

1 Proteína p53 em carcinoma epidermoide do esôfago

1.1 Imuno-expressão de p53 em carcinoma epidermoide do esôfago

No estudo por nós conduzido, a imuno-expressão da proteína p53 superior a 1+ (superior a 10%) ocorreu em 66,6% no compartimento nuclear, com um contingente adicional de 3,2% dos casos imuno-expressão de 1+ (até 10%); a mediana de imuno-expressão dos CEE por nós avaliados foi de 5+ (entre 80 e 100% de células neoplásicas positiva).

Como era de se esperar, devido ao histórico de antigo de investigação sobre a proteína p53, com mais de 30 anos de pesquisa (Levine AJ, Oren M, 2009), pudemos ter acesso a uma vasta literatura endereçando a imuno-expressão de p53 em CEE, e que se encontra tabulada na tabela 23.

Tabela 23. Artigos pertinentes à investigação da proteína p53 por imuno-histoquímica, em carcinomas epidermoides do esôfago.

Autores	Número de casos	Anticorpo anti-p53	Imuno-expressão (% de casos positivos)
Wagata et al. (1993)	29	PAb421	44,8%
Sarbia et al. (1994)	204	DO-1	67,2%
Monges et al. (1996)	76	DO7	51,3%
Chaves et al. (1997)	37	DO7	56,8%
Ribeiro et al. (1998)	42	DO7	59,5%
Ikeda et al. (1999)	53	DO7	71,7%
Kanamoto et al. (1999)	239	RSP53	48,1%
Lam et al. (1999)	153	DO7	64,0%
Nita et al. (1999)	62	DO7	não informado
Mizobuchi et al. (2000)	74	DO7	48,6%
Shimoji et al. (2000)	25	DO7	48,8%
Szumilo et al. (2000)	34	DO7	67,6%
Arora et al. (2001)	64	DO-1	82,8%
Koide et al. (2001)	55	BP53-12	67,2%
Kurabayashi et al. (2001)	76	DO7	40,8%
Ikeguchi et al. (2002)	154	BP53-12	46,0%
Güner et al. (2003)	52	DO7	81,1%
Rosa et al. (2003)	47	DO7	53,0%
Cao et al. (2004)	92	DO7	51,1%
Kimura et al. (2005)	81	DO7	58,0%
Miyazaki et al. (2005)	61	DO7	54,0%
Qi et al. (2006)	60	DO7	60,0%
Han et al. (2007)	40	DO7	50,0%
Kang et al. (2007)	62	DO7	47,0%
Liu et al. (2007)	86	DO7	51,1%
Boone et al. (2008)	108	BP53-12	69,8%
Felin et al. (2008)	31	DO7	48,3%
Cheng et al. (2009)	119	DO7	51,2%
Liu et al. (2010)	74	0418	49,3%
Taghavi et al. (2010)	80	DO7	56,2%
Yamasaki et al. (2010)	77	DO7	55,8%

São 31 trabalhos científicos que compreendem o período de 1993 a 2010, a maioria deles utilizando o anticorpo anti-p53 DO7 (o mesmo utilizado por nós), a maioria estabelecendo 10% como limiar para positividade de um caso particular. O percentual de casos positivos varia amplamente entre 40,8% e 82,8%, com mediana em 53,5%, em casuísticas contendo de 29 a 204 casos,

com mediana de 64 casos estudados. Nossos dados são consonantes com os da literatura, a qual, no trabalho efetuado por Boone et al. (2008), usando 2 “spots” por caso, também valida a utilização da tecnologia de TMA para a investigação da proteína p53 pelo método imuno-histoquímico, uma vez que aqueles autores observaram concordância quase perfeita ($\kappa=0,86$) entre a imuno-expressão de p53 em cortes histológicos convencionais e sua contrapartida nos cilindros de TMA por eles avaliados.

1.2 Proteína p53 e variáveis anátomo-patológicas de estadiamento

Nossa investigação não detectou associação estatisticamente significativa da imuno-expressão de p53 com qualquer das variáveis de estadiamento pesquisadas (pT, pN, grau de diferenciação do tumor primário e local do tumor primário) .

Dezoito trabalhos científicos avaliaram a associação entre imuno-expressão de p53 e algumas das variáveis anátomo-patológicas de estadiamento por nós avaliadas, além do tamanho do tumor primário. Esse conjunto de informações encontra-se condensado na tabela 24.

Tabela 24. Artigos pertinentes à investigação da associação entre a imuno-expressão da proteína p53 e variáveis de estadiamento em carcinomas epidermoides do esôfago.

Autores	Número de casos	Fatores e parâmetros patológicos avaliados	Fatores com significância estatística em relação à imuno-expressão de p53
Sarbia et al. (1994)	204	pT, pN, grau de diferenciação, tamanho	nenhum
Monges et al. (1996)	76	grau de diferenciação	nenhum
Chaves et al. (1997)	37	pT, grau de diferenciação	pT (p=0,01 com pT mais avançados nos casos p53 positivos)
Ikeda et al. (1999)	53	pT, pN, tamanho	nenhum
Kanamoto et al. (1999)	239	pN, grau de diferenciação	nenhum
Lam et al. (1999)	153	grau de diferenciação, local do tumor primário	nenhum
Shimoji et al. (2000)	25	grau de diferenciação, tamanho	nenhum
Koide et al. (2001)	55	pT, pN, grau de diferenciação, tamanho	nenhum
Kurabayashi et al. (2001)	76	pT, pN, grau de diferenciação	nenhum
Güner et al. (2003)	52	pT, pN, grau de diferenciação	nenhum
Cao et al. (2004)	92	pT, pN	pN (p<0,01 com mais casos com metástase nodal nos casos p53 positivos)
Kimura et al. (2005)	81	pT, pN, grau de diferenciação, local do tumor primário	grau de diferenciação (p=0,035 com mais casos pouco diferenciados com p53 positivo)
Miyazaki et al. (2005)	61	pT, pN, grau de diferenciação, local do tumor primário	nenhum
Qi et al. (2006)	60	grau de diferenciação	nenhum
Han et al. (2007)	40	pN, grau de diferenciação, local do tumor primário	pN (p=0,003 com mais casos com metástase nodal nos casos p53 positivos)
Kang et al. (2007)	62	local do tumor primário	a relação com localização não foi avaliada
Liu et al. (2010)	74	grau de diferenciação	grau de diferenciação (p<0,05 com mais tumores bem diferenciados com 53 positivo)
Taghavi et al. (2010)	80	grau de diferenciação, local do tumor primário, tamanho	nenhum

Os dados da tabela 8 evidenciam a ampla concordância entre nossos dados e os obtidos pela grande maioria dos demais estudos abordando CEE, não ficando constatadas associações entre a imuno-expressão da proteína p53 e as variáveis patológicas que refletem o estadiamento da neoplasia. De nove artigos que avaliaram a associação com pT com a imuno-marcação da proteína 53, 8 não detectaram nenhuma. De 10 artigos que o fizeram com pN, 8 não detectaram qualquer associação. Saliente-se ainda que dois dentre os

três artigos evidenciando algum tipo de associação entre pT ou pN e p53 (Chaves et al., 1997; Cao et al., 2004; Han et al., 2007), baseiam-se em duas das menores casuísticas do conjunto.

De 14 artigos que investigaram a associação da proteína p53 com o grau de diferenciação do tumor primário, apenas dois propuseram alguma associação (Kimura et al., 2005; Liu et al., 2010), chegando, surpreendentemente, a conclusões diametralmente opostas, com casos pouco diferenciados predominando entre os p53 positivos no primeiro e com casos bem diferenciados associados a positividade para p53 no segundo. Quanto a localização e tamanho, Nenhum dos trabalhos que pesquisaram relações entre p53 e localização ou tamanho detectou qualquer associação significativa .

Embora não seja o escopo desta investigação avaliar as etapas da carcinogênese do carcinoma epidermoide do esôfago anteriores às lesões invasivas, os autores que o fizeram demonstraram, de forma unânime, a presença d expressão da proteína p53 já nas displasias do epitélio escamoso esofágico (entre 31% e 100% de imuno-expressão), diferindo significativamente com os achados em mucosa normal e esofagites , que exibem reatividade muito menos frequente (entre 11,7% e 32% de imuno-expressão) Parenti et al. (1995), Fagundes et al. (2001), e Kawakubo et al. (2005). Os mesmos autores, acrescidos de Kurabayshi et al. (2001), também são unívocos ao relatar ausência de diferença estatisticamente significativa entre a imuno-expressão da proteína p53 nas displasias do epitélio escamoso quando comparada à imuno-expressão dessa proteína nos carcinomas epidermóides invasivos do esôfago. Analisando conjuntamente nossos dados e os da literatura, parece-nos que o principal achado é que a grande maioria dos CEE em fase invasiva

já exibe imuno-expressão da proteína p53 em numerosas células. Assim, as alterações neste gene supressor de tumores parecem ter importância maior nas etapas iniciais de transformação neoplásica de queratinócitos da mucosa esofágica do que nas fases mais avançadas de progressão dessa neoplasia.

1.3 Proteína p53 e outras variáveis imuno-histoquímicas

Em nossa pesquisa, não foi evidenciada nenhuma correlação estatisticamente significativa entre a imuno-expressão da proteína p53 e a das demais proteínas avaliadas (bax, APAF-1, citocromo c, caspase3 clivada e antígeno Ki67).

Considerando-se os 31 artigos científicos iniciais descritos na tabela 23, apenas 12 também investigaram outras proteínas semelhantes às por nós investigadas, sendo elas: bax, e antígeno Ki67. Para enriquecer a discussão, também consideraremos outras formas de avaliar o índice apoptótico, já que nenhuma dessas investigações utilizou-se da caspase3 clivada. A tabela 25 apresenta os 12 artigos, e também explicita que só foram realizados testes de correlação entre a imuno-marcação de p53 e as demais variáveis imuno-histoquímicas em 7 dos 12 estudos.

Tabela 25. Artigos pertinentes à investigação da associação entre a imuno-expressão da proteína p53 e a imuno-expressão de outras proteínas semelhantes às estudadas no presente estudo em carcinomas epidermóides do esôfago.

Autores	Número de casos	Outras proteínas avaliadas	Fatores com significância estatística em relação à imuno-expressão de p53
Monges et al. (1996)	76	Ki67	nenhum
Ikeda et al. (1999)	53	Ki67	nenhum
Shimoji et al. (2000)	25	bax	a relação com bax não foi avaliada
Koide et al. (2001)	55	Ki67, índice apoptótico pelo TUNEL	Ki67 ($p < 0,001$ com valores maiores nos casos p53 positivos) e índice apoptótico ($p < 0,001$ com valores maiores nos casos p53 positivos)
Kurabayashi et al. (2001)	76	bax, índice apoptótico pelo TUNEL	nenhum (porém a relação com o índice apoptótico não foi avaliada)
Ikeguchi et al. (2002)	154	Ki67	nenhum
Güner et al. (2003)	52	bax	a relação com bax não foi avaliada
Kimura et al. (2005)	81	índice apoptótico com anticorpo anti-ssDNA	nenhum
Miyazaki et al. (2005)	61	bax	a relação com bax não foi avaliada
Qi et al. (2006)	60	Ki67	a relação com Ki67 não foi avaliada
Kang et al. (2007)	62	bax	nenhum
Boone et al. (2008)	108	Ki67	relação com Ki67 não foi avaliada

Kurabayashi et al. (2001), e Kang et al. (2007) apresentam dados semelhantes aos nossos ao relatar ausência de associação entre a imuno-expressão da proteína p53 e a de bax. Considerando-se a via intrínseca da apoptose, mediada pela proteína p53, onde essa proteína teria a função teórica de induzir a transcrição de bax (Shen, White, 2001; Racay et al., 2008; Phillips et al., 2009; Geng et al., 2010), poderíamos supor que a proteína p53 por nós e pelos demais autores detectada acumulando-se no núcleo através do método imuno-histoquímico, ou seria uma proteína não funcional (já que a reatividade de mais de 10% das células pelo anticorpo DO7 é muito mais associada às formas mutadas, conforme Hsia et al., 2000), ou sua ação transcritora seria oposta por outras proteínas não investigadas nem por nós nem pelos outros dois grupos de autores. Anteriormente, Ribeiro et al. (1998) comparando imuno-histoquímica e mutações nos exons 5-8 do gene p53 em 42 CEE encontraram 25 casos com imunorreatividade nuclear e 17 com mutação para

p53. Aqueles autores destacam que, nenhum dentre 8 casos com imunorreatividade fraca apresentava mutação.

Dentre os estudos que testaram estatisticamente a relação entre índice apoptótico e a imuno-expressão de p53, Kimura et al. (2005) trazem dados iguais aos nossos de não correlação, valendo-se da avaliação da apoptose com um anticorpo anti-ssDNA. A ausência de correlação entre a imuno-marcação da proteína bax e a de p53 significaria que, na ausência de um estímulo concatenado para transcrição de bax também não haveria concatenação com a manifestação final através da apoptose. Novamente, entretanto, e talvez pelo mesmo motivo exposto acima, Koide et al. (2001) vão em direção oposta ao afirmarem associação estatisticamente significativa entre as variáveis com valores maiores de índice apoptótico medido pelo método de TUNEL e casos positivos para p53.

O maior número de investigadores (Monges et al., 1996; Ikeda et al., 1999; Ikeguchi et al., 2002) tem resultados concordantes com os nossos ao afirmar ausência de correlação da imunorreatividade para p53 e para Ki67. Afirmam o contrário Koide et al. (2001), que detectaram valores maiores de Ki67 nos casos p53 positivos; entretanto devemos lembrar que aqueles autores são um dos poucos grupos a utilizarem 20% de imuno-expressão para considerar um caso positivo.

2 Bax em carcinoma epidermoide do esôfago

2.1 Imuno-expressão de bax em carcinoma epidermoide do esôfago

Nos CEE desta investigação, a imuno-expressão de bax apresentou algum grau de positividade (>0) em 96,8% dos casos, com expressão superior a 1+ (superior a 10%) em 79,4% dos casos, e com mediana de imuno-marcação no valor de 2+ (entre 20 e 30% de células neoplásicas positivas).

Conforme podemos ver na tabela 26, a taxa de casos com imuno-expressão (em geral os artigos não computam os casos com imunopositividade inferior a 10% nessa taxa) varia entre 40,9% e 82,9%, o que coloca nosso valor de 79,4% em concordância com a literatura.

Tabela 26. Artigos pertinentes à investigação da proteína bax por imuno-histoquímica, em carcinomas epidermóides do esôfago.

Autores	Número de casos	Anticorpo anti-bax	Imuno-expressão (% de casos positivos ou média de positividade)
Sarbia et al. (1997)	172	policlonal	média do escore: 5,9
Shimoji et al. (2000)	25	policlonal	76,0%
Kurabayashi et al. (2001)	76	B9	82,9%
Takayama et al. (2001)	86	policlonal	mediana do escore: 1
Güner et al. (2003)	52	policlonal	59,6%
Miyazaki et al. (2005)	61	B9	40,9%
Kang et al. (2007)	62	policlonal	67,0%

Recorrendo uma vez mais aos estudos que abordaram as etapas iniciais da carcinogênese do carcinoma epidermoide do esôfago, constatamos

que Kurabayashi et al., 2001; Raouff et al., 2003 , evidenciaram positividade imuno-histoquímica para a proteína bax em 80,0% das amostras de mucosa escamosa esofágica normal e em 86,0% das displasias escamosas, ou seja valores bastante próximos aos encontrados nos carcinomas invasores , mostrando, assim como já visto com relação a p53, que muito provavelmente o surgimento das alterações de Bax é especialmente importante nas fases iniciais do CEE.

2.2 Bax e variáveis anátomo-patológicas de estadiamento

No presente estudo, houve tendência de imuno-expressão semi-quantitativamente maior de bax em CEE menos diferenciado ($p=0,073$), não tendo sido detectadas associações com outras variáveis de estadiamento.

A literatura que busca investigar a imuno-expressão de bax em CEE é rica, porém boa parte dela avalia apenas parâmetros de desfecho e de relação com quimioterapia ou radioterapia. Selecionamos apenas os trabalhos em que também fossem avaliados algum dos parâmetros anátomo-patológicos por nós avaliados, encontrando um total de 7 trabalhos científicos , os quais se encontram resumidamente descritos na tabela 27.

Tabela 27. Artigos pertinentes à investigação da associação entre a imuno-expressão da proteína bax e variáveis de estadiamento em carcinomas epidermoides do esôfago.

Autores	Número de casos	Fatores e parâmetros patológicos avaliados	Fatores com significância estatística em relação à imuno-expressão de bax
Sarbia et al. (1997)	172	pT, pN, grau de diferenciação, tamanho	grau de diferenciação (p= 0,001 com escores maiores de bax nos casos bem diferenciados)
Shimoji et al. (2000)	25	grau de diferenciação, tamanho	nenhum
Kurabayashi et al. (2001)	76	pT, pN, grau de diferenciação	nenhum
Takayama et al. (2001)	86	pT, pN, grau de diferenciação	nenhum
Güner et al. (2003)	52	pT, pN, grau de diferenciação	nenhum (grau de diferenciação com tendência de maiores valores de bax nos casos pouco diferenciados, p=0,071)
Miyazaki et al. (2005)	61	pT, pN, grau de diferenciação, localização do tumor primário	nenhum
Kang et al. (2007)	62	localização do tumor primário	nenhum

Todos os parâmetros de estadiamento por nós avaliados (pT, pN, grau de diferenciação do tumor primário, local do tumor primário, bem como a variável tamanho do tumor primário) também foram avaliados em pelo menos um artigo, sendo que alguns (pT, pN e grau de diferenciação) o foram em vários. Tomando-se o conjunto dos dados expostos na tabela 10, é marcante a semelhança entre os resultados descritos na literatura. Exceto o grau de diferenciação, que analisaremos mais detidamente a seguir, a imuno-expressão de bax não apresentou associação estatisticamente significativa com nenhum parâmetro histopatológico. Este conjunto de evidências sugere que a parte inicial da via intrínseca da apoptose relacionada à proteína p53, a qual diz respeito a proteína bax em nosso modelo estudado, não é um fator propulsor na determinação seja do nível de invasão local do CEE, seja de seu poder metastatisante para linfonodos regionais, seja seu tamanho ou localização.

Resta analisarmos as possíveis relações entre a imuno-expressão de bax e o grau de diferenciação do tumor primário. Seis artigos abordaram a relação entre a imuno-expressão de bax e o grau de diferenciação do tumor

primário, todos utilizando-se do método imuno-histoquímico com amplificação pelo sistema avidina-biotina-peroxidase.

À semelhança de nossos achados, Güner et al. (2003) encontraram tendência ($p=0,071$) a valores maiores de imuno-expressão de bax nos casos de CEE pouco diferenciado, utilizando-se de graduação em 3 classes e semiquantificação de 0 a 100% de células imuno-expressoras de bax, com incrementos de 5%, num conjunto de 53 casos.

De outra parte, Sarbia et al. (1997), avaliaram o grau de diferenciação em quatro classes (G1 a G4), e semi-quantificaram a imuno-expressão de bax através de um escore composto do produto entre quantidade de células imuno-positivas e sua intensidade. Através dessa sistemática, em estudo de 172 casos, Sarbia et al. (1997) verificaram uma relação inversa estatisticamente significativa ($p=0,0011$) entre as variáveis, com escores maiores de imuno-expressão de bax nos casos de CEE G1. Já Shimogi et al. (2000), Kurabayashi et al. (2001), Takayama et al. (2001) e Miyasaki et al. (2005) não constataram qualquer relação entre as duas variáveis, com diferentes métodos e semiquantitativos.

Toda esta variação de resultados evidencia a necessidade de trabalhos futuros para a melhor compreensão da relação de alterações em bax nos CEE, preferencialmente prospectivos e multicêntricos, de modo a prevenir tal heterogeneidade de achados. Talvez sejam mais promissores a este respeito estudos de modelos experimentais nos quais possa ser avaliado o efeito de interferência na expressão do gene bax na progressão de CEE em animais, abordando principalmente possibilidades como as levantadas por Kurabayashi

et al. (2001) que encontraram índices apoptóticos significativamente maiores nas displasias escamosas esofágicas positivas para bax, o mesmo não ocorrendo nos CEE por eles avaliados, apesar de não terem evidenciado diferença estatisticamente significativa entre a expressão de bax nos dois grupos quando descontextualizada do índice apoptótico.

2.3 Bax e outras variáveis imuno-histoquímicas

Neste estudo, não houve associação entre a imuno-expressão de bax e a imuno-expressão das demais variáveis imuno-histoquímicas avaliadas (APAF-1, citocromo c, p53, Ki67 e caspase3 clivada).

Como vimos, a literatura aporta dados apenas sobre a relação entre bax e a proteína p53 (Shimoji et al., 2000; Kurabayashi et al., 2001; Güner et al., 2003; Miyazaki et al., 2005; Kang et al., 2007). Adicionalmente, um dos trabalhos construiu um índice apoptótico (Kurabayashiet al., 2001), porém aqueles autores utilizaram-se da marcação de terminação fragmentada com dUTP-biotinilada e mediada pela enzima TdT (TUNEL), contada em pelo menos 1000 células neoplásicas, ou seja nenhum dos trabalhos utilizou-se da caspase 3 clivada. Em nenhuma das situações foi descrita associação estatisticamente significativa em qualquer dos 5 artigos por nós pesquisados, conforme sintetizados na tabela 28.

Tabela 28. Artigos pertinentes à investigação da associação entre a imuno-expressão da proteína bax e a imuno-expressão de outras proteínas semelhantes às estudadas no presente estudo em carcinomas epidermóides do esôfago.

Autores	Número de casos	Outras proteínas avaliadas	Fatores com significância estatística em relação à imuno-expressão de bax
Shimoji et al. (2000)	25	p53	nenhum (porém a relação com p53 não foi avaliada)
Kurabayashi et al. (2001)	76	p53, índice apoptótico pelo TUNEL	nenhum
Güner et al. (2003)	52	p53	nenhum
Miyazaki et al. (2005)	61	p53	nenhum (porém a relação com p53 não foi avaliada)
Kang et al. (2007)	62	p53	nenhum

3 Citocromo c em carcinoma epidermoide do esôfago

Nossa investigação constatou a presença de alta imuno-expressão de citocromo c na casuística de CEE avaliada (100% dos casos expressando citocromo-c em mais de 10% das células, com 87,3% dos casos apresentando expressão 5+), sendo o padrão encontrado o citoplasmático. Talvez por sua onipresença, a imuno-expressão de citocromo c não apresentou correlação com o grau de expressão de bax, APAF-1, p53, antígeno Ki67 ou caspase3 clivada, nem associação entre sua imuno-marcação e as variáveis pT, pN, grau de diferenciação e local do tumor primário. Cabe ressaltar que o padrão citoplasmático de imuno-expressão em microscopia óptica avaliado no presente estudo não tem resolução suficiente para distinguir quanto da proteína encontra-se no citosol, e quanto da proteína encontra-se no interior das mitocôndrias. Em elegante experimento com uma linhagem de células de CEE (KYSE 270), Daigeleret al. (2008) observaram que havia uma expressão aumentada do gene citocromo c nas células dessa linhagem após o tratamento com a taurolidina, quando comparada com a expressão gênica nas células não tratadas. Estudando o efeito do tratamento com o quimioterápico oxiplatina sobre a linhagem celular TE3 de CEE, e constando tanto o aumento de apoptose quanto a existência de nível aumentado de citocromo c mitocondrial, porém sem aumento na fração citoplasmática dessa proteína, Nganet al. (2008) concluíram que a apoptose observada nas células TE3 submetidas à exposição a oxiplatina provavelmente era devida a outras vias que não a via mitocondrial da apoptose. Embora não tenha sido objetivo de nossa investigação

documentar experimentalmente o subcompartimento onde a proteína citocromo c foi visualizada, à luz dos fatos disponíveis na literatura até o presente momento, é lícito propor a hipótese de que a ausência de correlação da imuno-expressão de citocromo c com as demais proteínas da via intrínseca da apoptose relacionada ao p53 estudadas e que a ausência de sua associação com os parâmetros de estadiamento analisados poderia ser justificada pela localização mitocondrial do citocromo c, ou seja por sua não liberação ao citosol.

A riqueza de possibilidades que se abre a uma discussão está intimamente relacionada a quantidade de trabalhos na literatura científica com pontos de contato comuns à investigação discutida. Assim, se o presente trabalho pode ser situado entre os pioneiros a abordar de modo semiquantitativo a imuno-expressão do citocromo c em CEE e sua relação com critérios histológicos do CEE, a carência de referências dirigidas a essas relações impede comparações mais diretas, tornando necessário o exercício de comparações indiretas com abordagens mais distantes e algumas hipóteses de natureza mais especulativa. Em nossa linha de raciocínio, na via intrínseca da apoptose relacionada à proteína p53, o citocromo c encontra-se no meio do caminho entre as ações diretas do p53 e o produto final representado pela clivagem das proteínas celulares estruturais realizada pelas formas ativas das caspases. Uma vez induzida a formação de poros na membrana externa mitocondrial através da ação da proteína bax sensibilizada pela proteína p53, surge o momento para a participação do citocromo c: ele desloca-se de sua localização mitocondrial para uma localização citosólica (Shen, White, 2001; Anichini et al., 2006). Essa mudança de compartimento celular é essencial para

a contextualização de nossos resultados frente aos poucos dados encontrados na literatura pertinente ao CEE. Mais uma vez enfatizamos que tal hipótese é meramente especulativa, mas poderia explicar adequadamente os dados por nós verificados sob a óptica do conhecimento atualmente disponível na literatura sobre a relação entre citocromo c e CEE.

4 APAF-1 em carcinoma epidermoide do esôfago

Nossos achados nos 63 CEE estudados foram de valores altos de expressão de APAF-1 (92,0% dos casos com imuno-expressão em mais de 10% das células, sendo 68,2% com imuno-expressão 5+). Salienta-se aqui a associação estatística entre imuno-expressão de APAF-1 e o grau de diferenciação, com valores mais altos nos CEE bem diferenciados de nossa série ($p < 0,001$), não tendo sido detectada associação com as demais variáveis de estadiamento patológico (pT, pN e local do tumor primário no esôfago).

Assim como relatamos com citocromo c, a literatura é pobre em dados relacionando diretamente a imuno-expressão de APAF-1 e CEE. Por isto, foi necessário buscar alguns artigos sobre carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço para que pudéssemos traçar considerações com certo grau de analogia. Encontramos apenas um artigo investigando a relação entre APAF-1 e CEE. Nele, Daigeler et al. (2008) detectaram expressão aumentada do gene APAF-1 e de citocromo c entre outros, após exporem células da linhagem KYSE 270 de CEE ao tratamento com o antibiótico taurolidina, e concluíram que essa droga pode ativar diferentes vias apoptóticas em CEE. De forma indireta, poderíamos supor que nossos dados de contingente expressivos de CEE de nossa casuística apresentando valores altos de APAF-1 indicariam um grupo de CEE onde a ação de algumas drogas não teria ganho quanto a ativação da via intrínseca da apoptose. Por outro lado, investigando carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, Lo Muzio et al. (2006) puderam demonstrar expressão aumentada de APAF-1 nos tecidos congelados

de 8 desses carcinomas, quando comparada à expressão do mesmo gene na mucosa normal adjacente, o que parece corroborar nossos dados de alta expressão da proteína APAF-1 nos CEE. Indo além, ao estudarem uma linhagem celular de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço resistente à cisplatina e que apresentava expressão do gene APAF-1 diminuída em relação a linhagem parental quimiossensível, Kuwahara et al. (2003) concluíram que poderia haver um subgrupo destes carcinomas em que a inibição da apoptose pela via relacionada a APAF-1 representaria um mecanismo adquirido de resistência à cisplatina. Especificamente tratando-se de CEE, tanto Toshimitsu et al. (2004) quanto Wen et al. (2010) encontraram um contingente total de 88 genes diferencialmente expressos em dois tipos distintos de linhagens celulares de CEE resistentes à cisplatina, entretanto nem o gene APAF-1, nem os genes bax, citocromo c, p53, Ki67 ou caspase 3 encontravam-se nas listagens de expressão diferencial, alertando que a transposição de dados do mesmo tipo histológico, qual seja carcinoma epidermoide, pode não ser imediatamente aplicável quando topografias diferentes são comparadas. Ainda com relação a CEE, ao analisarem um grupo de 58 pacientes, 30 tratados com cirurgia exclusivamente e 28 tratados com cirurgia precedida com quimioterapia (cisplatina e etoposídeo), Nooter et al. (1998) não detectaram relação entre a resistência ao tratamento quimioterápico com o grau de diferenciação nem com o estadiamento dos tumores, o que poderia indicar que essas variáveis patológicas não teriam condição de prever o comportamento tumoral frente à quimioterapia neoadjuvante. Se compararmos esses resultados com nossa observação de imuno-expressão aumentada de APAF-1 em CEE bem diferenciados e imuno-

expressão diminuída de APAF-1 nos CEE pouco diferenciados, poderíamos propor que uma compensação promovida por quimioterapia neoadjuvante em CEE elevaria a expressão do gene APAF-1 nos CEE pouco diferenciados, a ponto de estes não mais se distinguirem dos demais graus de diferenciação histológica para CEE, o que compatibilizaria nossos achados com os achados de Nooter et al. (1998) no plano da especulação teórica a partir dos dados experimentais. No contexto da já referida escassez de artigos científicos investigando a relação entre APAF-1 e CEE, são necessários novos estudos que verifiquem a pertinência do exercício especulativo teórico aqui proposto.

No presente estudo, não detectamos qualquer associação estatisticamente significativa entre a imuno-expressão de APAF-1 seja com bax, com citocromo c, com p53, com o antígeno Ki67 ou com caspase3 clivada, observando-se o valor de p mais baixo (0,175) na comparação entre APAF-1 e citocromo c, com coeficiente rho de Spearman=-0.173, ou seja, sem significância estatística, mas com alguma tendência a valores maiores de APAF-1 nos casos com valores menores expressão de citocromo c . APAF-1 participa como um adaptador para a ativação da molécula de caspase 9, quando na presença de citocromo c liberado da mitocôndria (Shen, White, 2001; Kuwahara et al., 2003; Anichini et al., 2006).

5 Caspase 3 clivada em carcinoma epidermoide do esôfago

5.1 Atividade apoptótica detectada pela imuno-expressão de caspase 3 clivada em carcinoma epidermoide do esôfago

A relativa escassez de imuno-expressão de caspase 3 clivada pelas células de CEE do presente estudo contrastou com o padrão das demais variáveis relacionadas a apoptose, tornando necessária a contagem direta do número de células ou corpúsculos reativos para a caspase-3 clivada, chegando à média de 38,2 células ou corpúsculos celulares imunorreativos em 1000 células de CEE contadas, com desvio padrão de 36,0; transformando esses valores para valores percentuais, teríamos média de 3,8% e desvio padrão de 3,6.

Conseguimos encontrar no PubMed apenas um estudo da imuno-expressão de caspase 3 clivada como medida da atividade apoptótica (Takala et al., 2007). Contando eventos apoptóticos imuno-marcados para caspase 3 clivada e células neoplásicas em 10 campos de grande aumento, aqueles autores encontraram média de imuno-expressão dessa proteína em CEE da ordem de 1,95% com desvio padrão de 1,96. Eles também avaliaram a atividade apoptótica através do método de TUNEL, e encontraram forte correlação entre os valores encontrados por meio desse método e aqueles encontrados através da imuno-expressão de caspase 3 clivada (coeficiente rho de correlação=0,592, com $p<0,001$), comprovando a comparabilidade entre essas duas formas de avaliação da atividade apoptótica e a utilidade da

caspase 3 clivada como alternativa para a quantificação da apoptose em tecidos, conclusão também endossada, em outros contextos por Gown e Willingham (2002) e por Duan et al. (2003).

Já que nosso estudo é um dos primeiros a aplicar a avaliação da caspase 3 clivada como forma de estimar o índice apoptótico, buscamos trabalhos científicos na literatura sobre CEE com outras abordagens para avaliação do índice apoptótico, os quais estão descritos na tabela 29.

Tabela 29. Artigos pertinentes à investigação de um índice de apoptose em carcinomas epidermoides do esôfago.

Autores	Número de casos	Método	Índice apoptótico em %
Sarbia et al. (1996)	150	corpos apoptóticos na coloração de hematoxilina e eosina	média de 0,9%
Okumura et al. (2000)	30	TUNEL	média de 0,4%
Kurabayashi et al. (2001)	76	TUNEL	média de 2,4%
Akamatsu et al. (2003)	34	TUNEL	média de 3,4%
Kimura et al. (2005)	81	anticorpo anti-ssDNA	média de 0,7%
Yamazaki et al. (2005)	43	TUNEL	média de 3,2%
Takala et al. (2007)	54	TUNEL	média de 0,9%

Nessas investigações, houve utilização da técnica TUNEL em 6 artigos e da avaliação imuno-histoquímica com anticorpo anti-ssDNA em um artigo. A média do índice apoptótico calculado para os casos de CEE variou entre 0,4% e 3,4%, com mediana de 0,9%. Calculando o índice apoptótico pela imuno-expressão de caspase 3 clivada, nossos dados são ligeiramente superiores (média de 3,8%), provavelmente porque a investigação com caspase 3 clivada também é capaz de detecção células com as caspases efetoras já ativadas, porém sem DNA fragmentado, enquanto o método de TUNEL detecta apenas células que já possuam DNA fragmentado (Saraste, 1999; Gown, Willingham, 2002).

5.2 Atividade apoptotica e variáveis anátomo-patológicas de estadiamento

Nossa quantificação do índice apoptótico através da caspase 3 clivada não encontrou associação estatisticamente significativa com nenhuma das variáveis de estadiamento investigadas (pT, pN, grau de diferenciação e localização do tumor primário).

Embora quatro grupos de autores tenham estudado algumas das variáveis de estadiamento (Sarbia et al., 1996; Kurabayashi et al., 2001; Kimura et al., 2005; Yamazaki et al., 2005), apenas Yamazaki et al. (2005) aplicaram teste estatístico de associação entre o índice apoptótico pelo método TUNEL (média de 3,2%) e as variáveis pT, pN e grau de diferenciação. Assim como nós, aqueles autores também não encontraram associação estatisticamente significativa entre índice apoptótico e variáveis patológicas de estadiamento.

5.3 Atividade apoptótica e outras variáveis imuno-histoquímicas

Nossos dados são de ausência de correlação entre o índice apoptótico calculado a partir da imuno-expressão de caspase 3 clivada e as demais variáveis imuno-histoquímicas da via intrínseca da apoptose relacionada ao

p53 por nós investigadas (proteína p53, bax, APAF-1 e citocromo c). Nossa análise da literatura permitiu apenas o encontro de 3 trabalhos avaliando índice apoptótico pelo método TUNEL com p53 e bax foram encontrados, conforme já discutido

5.4 Relação da atividade apoptótica detectada pela imuno-expressão de caspase 3 clivada e da atividade proliferativa detectada pela imuno-expressão do antígeno Ki67 em carcinoma epidermoide do esôfago

Com o objetivo de enriquecer a nossa abordagem centrada na via intrínseca da apoptose mediada pela proteína p53 e de suas relações entre si e com os fatores de estadiamento patológico, investigamos adicionalmente a atividade proliferativa nos 63 CEE, semiquantificando-a inicialmente em intervalos de 10% de imuno-expressão nas células neoplásicas e posteriormente agrupando esses intervalos em escala semiquantificativa ordinal em 6 categorias (0-5+). Os valores de imuno-expressão de Ki67 por nós encontrados apresentaram mediana de 3+ (maior que 30% até 50% de imuno-expressão) .

Pesquisando a literatura sobre CEE, encontramos 15 artigos científicos que estimaram a atividade proliferativa através do antígeno Ki67, 3 deles de forma semi-quantitativa e 12 de forma quantitativa através de contagem, a maioria com o mesmo anticorpo primário por nós utilizados (MIB1). Esses trabalhos encontram-se relacionados na tabela 30.

Tabela 30. Artigos pertinentes à investigação de a atividade proliferativa em carcinomas epidermoides do esôfago através do antígeno Ki67.

Autores	Número de casos	Anticorpo anti-Ki67	Imuno-expressão (% de casos positivos ou média de positividade)	Forma de avaliar
Sarbia et al. (1996)	150	MIB1	média de 41,5%	contagem
Chino et al. (1998)	34	MIB1	média de 39,9%	contagem
Ikeda et al. (1999)	53	MIB1	média de 45,0%	contagem
Okumura et al. (2000)	30	MIB1	média de 32,4%	contagem
Ikeguchi et al. (2002)	154	MIB1	média de 62,0%	contagem
Akamatsu et al. (2003)	34	MIB1	média de 57,6%	contagem
Kato et al. (2003)	93	MIB1	média de 62,7%	contagem
Huang et al. (2005)	70	não informado	média de escore de 23,5%	semiquantificação
Yamazaki et al. (2005)	43	MIB1	média de 46,8%	contagem
Qi et al. (2006)	60	SP6	88,3% dos casos positivos	semiquantificação
Takala et al. (2007)	54	MIB1	média de 26,8%	contagem
Boone et al. (2008)	108	MIB1	91,8% dos casos positivos	semiquantificação
Sano et al. (2009)	151	MIB1	média de 39,9%	contagem
Takeyama et al. (2009)	73	MIB1	média de 40,7%	contagem
Shigemasa et al. (2010)	138	MIB1	média de 41,4%	contagem

Dentre os artigos que forneceram média de células de CEE com imuno-marcação para o antígeno Ki67, esse valor ficou entre 26,8% e 62,7% com 44,7% como valor médio, valor este muito próximo ao encontrado por nós com metodologia semiquantitativa (mediana 3+, correspondente a faixa de 30 – 50% das células) evidenciando que, esta abordagem por semiquantificação é bastante razoável para a estimativa da atividade proliferativa em CEE.

Nossa investigação revelou uma correlação estatisticamente significativa entre a atividade apoptótica avaliada pela imuno-marcação com caspase 3 clivada e a atividade proliferativa avaliada pela imuno-expressão com o antígeno Ki67 ($\rho=0,373$, $p=0,003$), com valores maiores do índice apoptótico avaliado pela reação com caspase 3 clivada correlacionados a valores maiores de imuno-expressão de Ki67. Dos 15 artigos inicialmente levantados e que estudaram a imuno-expressão do antígeno Ki67 em CEE, apenas 2 avaliaram estatisticamente sua relação com índice apoptótico. Estudando, em 150 casos, o índice apoptótico pela contagem de corpúsculos apoptóticos na coloração de hematoxilina e eosina e o índice proliferativo pela marcação ao antígeno Ki67,

Sarbia ET AL (1996) chegaram à mesma conclusão de nosso presente estudo , evidenciando correlação positiva entre as duas variáveis ($\rho=0,25$, $p=0,001$). Apenas Yamazaki et al. (2005), em estudo de 43 casos de CEE, não encontraram associação entre essas variáveis.

Adicionalmente, não detectamos associação entre as variáveis de estadiamento estudadas (pT, pN, grau de diferenciação e local do tumor primário) e a estimativa semiquantitativa da imuno-expressão do antígeno Ki67.

A maioria das avaliações encontradas na literatura, e sintetizadas na tabela 31, não detectaram correlação entre a atividade proliferativa medida pela imuno-expressão de Ki67 e fatores de estadiamento. Assim, nenhum dos dois trabalhos que investigam o local do tumor primário evidenciou correlação com imuno-marcação de Ki67 (Kato et al., 2003; Huang et al., 2005). Dos 4 que investigaram associação entre essa proteína e pT, apenas um (Ikeda et al., 1999) detectou valores maiores de imuno-expressão de Ki67 nos tumores mais avançados ($p=0,017$). Dos 5 que analisaram a relação dessa proteína com pN, apenas dois (Ikeda et al., 1999; Kato et al., 2003) detectaram valores maiores de imuno-deteccção de Ki67 nos tumores com metástase nodal ($p=0,001$ e $p=0,006$), ressaltando-se que à na época em que esses autores realizaram suas investigações, apenas era feita a distinção entre CEE sem metástase nodal (pN0) e CEE com metástase nodal (pN1), enquanto no presente trabalho subdividimos os casos com metástase linfonodal em quatro classes, em conformidade com a mais recente versão do estadiamento TNM (Edge et al., 2010). Finalmente, com relação a imuno-expressão de Ki67 e grau de diferenciação do tumor primário, dos 6 estudos pertinentes, 3 (Chino et al., 1998; Kato et al., 2003; Qi et al., 2006) encontraram associação entre as

variáveis com valores maiores de imuno-positividade para Ki67 nos CEE pouco diferenciados ($p < 0,05$, $p = 0,015$ e $p = 0,001$, respectivamente). O conjunto dos dados mostra que, quer quando estimamos de modo semiquantitativo a imuno-expressão do antígeno Ki67, quer quando tal reatividade é quantificada, os atuais achados são ainda conflitantes quanto a possível relação entre essa variável e os fatores de estadiamento. Como as evidências biológicas são claras de que a proliferação celular seja um dos principais propulsores do crescimento e progressão das neoplasias (Hanahan, Weinberg, 2000), parece-nos essencial que estudos futuros abordem tal questão de modo quantitativo, mas busquem a redução da heterogeneidade dos achados mediante controle de qualidade em cada etapa do procedimento, desde a colheita e preservação da amostra, anticorpo com afinidade bem conhecida para epitopo relevante, técnicas de amplificação adequadas, até a quantificação cada vez mais precisa propiciada pelos sistemas de análise de imagem (Taylor, Levenson, 2006; Goldstein et al., 2007; Lim, Dickherber, Compton, 2011).

Tabela 31. Artigos pertinentes à investigação de a atividade proliferativa através do antígeno Ki67, atividade apoptótica, e suas relações com variáveis de estadiamento em carcinomas epidermoides do esôfago.

Autores	Número de casos	Índice apoptótico avaliado	Fatores e parâmetros patológicos avaliados	Fatores com significância estatística
Sarbia et al. (1996)	150	índice apoptótico pela contagem de corpos apoptóticos	pT, pN, grau de diferenciação, tamanho	índice apoptótico pela contagem de corpos apoptóticos em relação a imuno-expressão de Ki67 ($\rho = 0,25$ com $p = 0,001$), sem relação estatisticamente significativa com os fatores de estadiamento
Chino et al. (1998)	34	nenhuma	pN, grau de diferenciação	grau de diferenciação ($p < 0,05$ com valores maiores de Ki67 nos tumores pouco diferenciados)
Ikeda et al. (1999)	53	nenhuma	pT, pN, grau de diferenciação	pT ($p = 0,017$ com valores mais altos de Ki67 nos casos mais avançados), pN ($p = 0,001$ com valores mais altos de Ki67 nos casos com metástase nodal)
Kato et al. (2003)	93	nenhuma	pT, pN, grau de diferenciação, local do tumor primário	pN ($p = 0,006$ com valores maiores de Ki67 nos casos metastáticos), grau de diferenciação (com valores maiores de Ki67 nos casos menos diferenciados)
Huang et al. (2005)	70	nenhuma	grau de diferenciação, local do tumor primário	sem relação estatisticamente significativa com os fatores de estadiamento
Yamazaki et al. (2005)	43	índice apoptótico pelo TUNEL (média de 3,2%)	pT, pN, grau de diferenciação	sem relação estatisticamente significativa com os fatores de estadiamento, nem correlação entre índice apoptótico e Ki67
Qi et al. (2006)	60	nenhuma	grau de diferenciação	grau de diferenciação ($p = 0,001$ com valores maiores de Ki67 nos casos pouco diferenciados)

6 Síntese de avaliação da imuno-expressão de p53 e de proteínas relacionadas a via intrínseca da apoptose (bax, APAF-1, citocromo c) em carcinoma epidermoide do esôfago

Quando analisamos o conjunto dos nossos dados, em que: a) não houve associação entre as proteínas relacionadas à via intrínseca da apoptose através do estudo da imuno-expressão da proteína p53, do citocromo c e da caspase 3 clivada com nenhuma das variáveis de estadiamento anátomo-patológico; b) houve associação inversa entre APAF-1 e grau de diferenciação do tumor primário ($p < 0,001$); c) e houve tendência de associação direta entre bax e grau de diferenciação do tumor primário; observamos que este conjunto de informações pode fazer sentido à luz da teoria da via intrínseca da apoptose associada ao p53, especialmente pelos estudos de Shen, White, 2001; Anichini et al., 2006; Racay et al., 2008; Phillips et al., 2009; Vaseva, Moll, 2009; Geng et al., 2010. Por esse conjunto de informações, podemos perceber que há um estímulo para maior apoptose nos casos pouco diferenciados de CEE por nós avaliados, porém este estímulo não se traduz em apoptose efetiva mais extensa, e isso poderia ser explicado pela interferência de outras moléculas anti-apoptóticas as quais se contraporiam ao efeito de bax, impedindo a liberação do citocromo c mitocondrial e justificando a menor quantidade de APAF-1 por nós verificada nos CEE pouco diferenciados. Além disso, o mesmo conjunto de dados é favorável a que a via intrínseca da apoptose mediada pela proteína p53 não tenha um papel diferencial na etapa invasiva dos CEE onde os fatores de estadiamento pT e pN importam, não estando porém descartada

a sua implicação nas etapas precursoras da carcinogênese própria de CEE, as quais não foram objeto do presente estudo, e portanto instigando o desenvolvimento de novas investigações.

CONCLUSÕES

- 1) A avaliação da imuno-expressão de um grupo de proteínas relacionadas à via intrínseca da apoptose (bax, APAF-1 e citocromo c) e da proteína p53 em carcinomas epidermóides do esôfago permitiu detectar níveis altos de proteína p53 (mediana de 5+), APAF-1 (mediana de 5+) e de citocromo c (mediana 5+) e nível intermediário de imuno-expressão de bax (mediana de 2+);
- 2) Nos carcinomas epidermóides do esôfago avaliados, não houve associação nem com a atividade apoptótica medida pela imuno-expressão de caspase 3 clivada, nem com a atividade proliferativa medida pela imuno-expressão do antígeno Ki67, mostrando que, apesar dos níveis altos a intermediários das proteínas p53, bax, APAF-1 e citocromo c nas células dos CEE, esses níveis de expressão protéica não se associam significativamente com atividade apoptótica diferencial nem com atividade proliferativa diferencial. Portanto, na fase invasiva da carcinogênese dos CEE presentemente investigada, a via intrínseca da apoptose não parece explicar adequadamente a atividade apoptótica observada;
- 3) O confronto do conjunto das imuno-expressões das proteínas p53, bax, APAF-1 e citocromo c relacionadas à via intrínseca da apoptose não se correlacionou com os fatores de estadiamento pesquisados (pT, pN, grau de diferenciação e local do tumor primário), nem com o tamanho do tumor primário, exceto pela associação inversa entre a imuno-expressão de APAF1 e o grau de diferenciação dos tumores primários, o que indica a falta de um papel proeminente da via intrínseca da apoptose na estratificação dos tumores da fase invasiva dos CEE de acordo com características importantes para o estadiamento dessas neoplasias;

4) Apesar de a via intrínseca da apoptose não parecer implicada na estratificação dos tumores da fase invasiva dos CEE de acordo com características importantes para o estadiamento dessas neoplasias, existe uma correlação positiva entre a atividade apoptótica medida pela imuno-expressão de caspase 3 clivada e a atividade proliferativa medida pela imuno-expressão do antígeno Ki67 ; os carcinomas epidermóides esofágicos com maior atividade apoptótica também apresentam maior atividade proliferativa, significando que devam existir outros mecanismos envolvidos no balanço entre morte celular por apoptose e proliferação celular capazes de explicar essa correlação, porém provavelmente localizados fora da via intrínseca da apoptose.

ANEXOS

Anexo A – Variáveis anátomo-patológicas em 63 carcinomas epidermoides do esôfago, caso a caso.

Número	Caso	Idade (anos)	Sexo (masculino=1, feminino=2)	Tamanho (mm)	Local (1 proximal, 2 médio, 3 distal)	Grau de diferenciação (1=bem, 2=moderadamente, 3=pouco diferenciado)	pT	pN (5= casos excluídos, com até 10 linfonodos)
1	06/06681	73	2	80	2	2	3	5
2	525954-1	72	1	70	3	2	3	1
3	534386-0	69	1	70	3	3	2	3
4	544802-6	50	1	65	3	2	3	1
5	547964-9	65	2	40	3	2	2	0
6	551816-4	60	1	35	1	2	1	0
7	552975-1	58	2	60	2	1	2	0
8	556735-1	70	1	50	3	2	3	3
9	557862-0	50	2	80	3	2	3	2
10	561477-5	46	1	30	3	2	3	1
11	569414-0	71	1	50	2	2	3	0
12	572068-0	49	1	30	1	1	3	0
13	573227-1	80	1	40	3	1	3	2
14	576184-0	59	1	70	3	2	3	0
15	577162-5	37	1	70	3	2	3	2
16	577636-8	63	2	25	2	2	1	0
17	578635-5	49	1	30	2	3	3	3
18	583475-9	48	1	55	3	1	3	5
19	584402-9	56	1	100	2	1	4	5
20	585652-3	54	2	25	2	1	3	1
21	588892-1	62	1	20	2	2	2	5
22	597156-0	76	1	45	1	2	1	0
23	599317-2	61	1	55	2	3	2	0
24	601276-0	49	2	25	3	1	2	0
25	603412-8	47	1	80	3	3	1	0
26	605239-8	48	1	35	2	2	3	2
27	606172-9	62	1	60	3	1	3	1
28	607247-0	66	1	43	2	2	3	1
29	610256-5	52	1	45	2	1	3	2
30	613997-3	50	1	35	2	2	3	3
31	614796-8	48	1	25	2	2	2	0
32	618045-0	74	1	25	2	2	3	5
33	619398-6	39	2	40	2	2	2	2
34	619626-8	45	1	50	3	3	3	2
35	623558-1	51	1	60	3	3	3	5
36	635204-9	50	1	23	2	2	2	2
37	642001-0	50	1	40	3	3	3	2
38	650544-9	72	1	62	2	3	3	3
39	654047-3	43	1	50	2	1	3	3
40	655762-7	51	1	47	2	3	3	2
41	658709-7	67	1	43	2	2	3	1
42	660380-7	58	1	70	3	1	3	1
43	667224-8	53	2	70	2	1	3	0
44	667439-9	79	1	40	3	2	3	1
45	668301-0	69	2	25	2	2	3	1
46	669274-5	54	1	30	1	2	1	1
47	672080-3	55	1	100	3	2	3	5
48	685519-9	61	1	60	2	2	3	0
49	689419-4	53	1	17	2	2	1	2
50	691910-3	47	1	75	3	1	3	2
51	696617-9	58	1	40	3	2	3	1
52	705826-8	64	1	45	3	2	3	0
53	706765-8	63	1	32	3	2	2	0
54	708568-0	64	2	40	2	2	3	0
55	711457-5	65	1	90	2	2	3	0
56	713651-0	66	2	35	1	1	3	0
57	726526-3	42	2	50	3	1	3	0
58	728583-3	48	1	50	3	1	3	2
59	732474-0	50	1	20	3	2	3	2
60	484629-0	52	1	40	2	1	3	2
61	491158-0	69	1	50	3	2	2	2
62	647774-7	65	2	30	3	3	2	1
63	719738-1	56	1	25	3	3	2	5

Anexo B – Variáveis de imuno-expressão em 63 carcinomas epidermóides do esôfago, caso a caso (valores expressos em percentual de células neoplásicas imuno-reativas, exceto para caspase 3 clivada, cujos valores são expressos em número de células ou corpúsculos celulares imuno-reativos em 1000 células).

Número	Caso	p53	bax	citocromo c	APAF-1	caspase 3 clivada	Ki67
1	06/06681	0	10	20	100	17	40
2	525954-1	100	30	100	100	5	30
3	534386-0	90	70	100	50	184	80
4	544802-6	0	10	100	70	26	30
5	547964-9	90	90	50	100	36	30
6	551816-4	90	10	100	30	3	10
7	552975-1	90	10	100	100	4	60
8	556735-1	100	30	80	100	69	50
9	557862-0	100	10	100	70	22	20
10	561477-5	0	60	100	100	111	70
11	569414-0	100	50	100	90	67	20
12	572068-0	0	40	90	100	17	30
13	573227-1	90	30	90	90	106	60
14	576184-0	100	10	100	100	20	70
15	577162-5	0	30	80	40	26	10
16	577636-8	100	30	100	100	14	90
17	578635-5	80	70	100	10	27	20
18	583475-9	70	30	90	90	83	20
19	584402-9	0	10	90	100	3	30
20	585652-3	100	40	80	100	12	40
21	588892-1	0	20	90	100	30	90
22	597156-0	100	30	100	100	7	80
23	599317-2	100	70	100	0	36	70
24	601276-0	100	70	90	100	12	20
25	603412-8	0	80	100	20	103	50
26	605239-8	90	40	100	100	20	20
27	606172-9	0	40	90	70	15	10
28	607247-0	100	30	40	70	40	40
29	610256-5	0	40	50	90	19	20
30	613997-3	0	80	100	70	28	30
31	614796-8	100	50	100	80	45	40
32	618045-0	90	20	100	100	36	60
33	619398-6	100	90	100	100	69	60
34	619626-8	0	40	100	100	19	10
35	623558-1	100	100	90	90	63	70
36	635204-9	80	10	90	50	75	30
37	642001-0	0	30	90	20	80	80
38	650544-9	0	30	90	10	19	40
39	654047-3	70	30	40	100	25	30
40	655762-7	100	50	100	0	49	80

41	658709-7	100	30	100	90	27	10
42	660380-7	70	10	90	90	86	40
43	667224-8	90	50	90	100	98	80
44	667439-9	100	10	90	10	2	30
45	668301-0	100	80	100	100	14	40
46	669274-5	100	100	100	60	58	50
47	672080-3	0	50	80	100	48	30
48	685519-9	90	30	90	80	3	40
49	689419-4	0	90	100	50	15	90
50	691910-3	80	20	80	100	5	10
51	696617-9	100	0	60	80	20	20
52	705826-8	10	50	100	100	38	40
53	706765-8	0	0	80	100	13	80
54	708568-0	80	10	60	90	135	60
55	711457-5	80	10	80	100	49	70
56	713651-0	70	10	90	100	33	80
57	726526-3	20	30	80	80	8	30
58	728583-3	0	70	40	90	12	10
59	732474-0	0	20	100	50	9	30
60	484629-0	90	30	100	90	45	20
61	491158-0	100	80	90	90	4	10
62	647774-7	10	50	100	60	20	20
63	719738-1	100	20	100	100	25	40

REFERÊNCIAS

Akamatsu M, Matsumoto T, Oka K, Yamasaki S, Sonoue H, Kajiyama Y, Tsurumaru M, Sasai K. c-erbB-2 oncoprotein expression related to chemoradioresistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003; 57:1323-7.

Arora S, Mathew R, Mathur M, Chattopadhyay TK, Ralhan R. Alterations in MDM2 expression in esophageal squamous cell carcinoma: relationship with p53 status. *Pathol Oncol Res*. 2001; 7:203-8.

Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008; 19:325-31.

Almond JB, Cohen GM. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia*. 2002; 16:433-43.

Anichini A, Mortarini R, Sensi M, Zanon M. APAF-1 signaling in human melanoma. *Cancer Lett*. 2006; 238:168-79.

Boone J, van Hillegersberg R, van Diest PJ, Offerhaus GJ, Rinkes IH, Kate FJ. Validation of tissue microarray technology in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Virchows Arch*. 2008; 452:507-14.

Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editores. *WHO classification of tumours of the digestive system*. 4a ed. Lyon: IARC Press; 2010. Cap. 1, p.1-10.

Bhutia SK, Mallick SK, Maiti TK. Tumour escape mechanisms and their therapeutic implications in combination tumour therapy. *Cell Biol Int*. 2010; 34:553-63.

Camp RL, Neumeister V, Rimm DL. A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers. *J Clin Oncol*. 2008; 26:5630-7.

Cao W, Chen X, Dai H, Wang H, Shen B, Chu D, McAfee T, Zhang ZF. Mutational spectra of p53 in geographically localized esophageal squamous cell carcinoma groups in China. *Cancer*. 2004; 101:834-44.

Chaves P, Pereira AD, Pinto A, Oliveira AG, Queimado L, Gloria L, Cardoso P, Mira FC, Soares J. p53 protein immunoexpression in esophageal squamous cell carcinoma and adjacent epithelium. *J Surg Oncol*. 1997; 65:3-9.

Chen J, Xu R, Hunt GC, Krinsky ML, Savides TJ. Influence of the number of malignant regional lymph nodes detected by endoscopic ultrasonography on survival stratification in esophageal adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006; 4:573-9.

Cheng TH, Hsu PK, Li AF, Hung IC, Huang MH, Hsu HS. Correlation of p53, MDM2 and p14(ARF) protein expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009; 135:1577-82.

Chino O, Makuuchi H, Shimada H, Machimura T, Mitomi T, Osamura RY. Assessment of the proliferative activity of superficial esophageal carcinoma

using MIB-1 immunostaining for the Ki-67 antigen. *J Surg Oncol*. 1998; 67:18-24.

Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. Direct activation of bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*. 2004; 303:1010-4.

Chipuk JE, Green DR. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ*. 2006; 13:994-1002.

Cummings LC, Cooper GS. Descriptive epidemiology of esophageal carcinoma in the Ohio Cancer Registry. *Cancer Detect Prev*. 2008; 32:87-92.

Daigeler A, Chromik AM, Geisler A, Bulut D, Hilgert C, Krieg A, Klein-Hitpass L, Lehnhardt M, Uhl W, Mittelkötter U. Synergistic apoptotic effects of taurolidine and TRAIL on squamous carcinoma cells of the esophagus. *Int J Oncol*. 2008; 32:1205-20.

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

Duan WR, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Blomme EA. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in

histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol.* 2003; 199:221-8.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editores. *AJCC cancer staging manual*. 7a ed. New York: Springer; 2010. Cap. 10, p.103-16: Esophagus and esophagogastric junction.

Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. *N Engl J Med.* 2003; 349:2241-2252.

Eslick GD. Epidemiology of esophageal cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 2009; 38:17-25.

Fagundes RB, Mello CR, Tollens P, Pütten AC, Wagner MB, Moreira LF, Barros SG. p53 protein in esophageal mucosa of individuals at high risk of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esophagus.* 2001; 14:185-90.

Faivre J, Lepage C, Bouvier AM. Données récentes sur l'épidémiologie du cancer de l'oesophage. *Gastroenterol Clin Biol.* 2005; 29:534-539.

Felin IP, Grivicich I, Felin CR, Regner A, Rocha AB. p53, p16 and COX2 expression in esophageal squamous cell carcinoma and histopathological association. *Arq Gastroenterol.* 2008; 45:308-12.

Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell.* 1989; 57:1083-93.

Geng Y, Walls KC, Ghosh AP, Akhtar RS, Klocke BJ, Roth KA. Cytoplasmic p53 and activated Bax regulate p53-dependent, transcription-independent neural precursor cell apoptosis. *J Histochem Cytochem.* 2010; 58:265-75.

Geske FJ, Gerschenson LE. The biology of apoptosis. *Hum Pathol.* 2001; 32: 1029-1038.

Gown AM, Willingham MC. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *J Histochem Cytochem.* 2002; 50:449-54.

Guan XY, Fu JH. Comparative proteomic analysis of the esophageal squamous carcinoma cell line EC109 and its multi-drug resistant subline EC109/CDDP. *Int J Oncol.* 2010; 36:265-74.

Güner D, Sturm I, Hemmati P, Hermann S, Hauptmann S, Wurm R, Budach V, Dörken B, Lorenz M, Daniel PT. Multigene analysis of Rb pathway and apoptosis control in esophageal squamous cell carcinoma identifies patients with good prognosis. *Int J Cancer.* 2003; 103:445-54.

Goldstein NS, Hewitt SM, Taylor CR, Yaziji H, Hicks DG. Recommendations for improved standardization of immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007; 15:124-33.

Han U, Can OI, Han S, Kayhan B, Onal BU. Expressions of p53, VEGF C, p21: could they be used in preoperative evaluation of lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma? *Dis esophagus*. 2007; 20:379-85.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100:57-70.

Hassan S, Ferrario C, Mamo A, Basik M. Tissue microarrays: emerging standard for biomarker validation. *Curr Opin Biotechnol*. 2008; 19:19-25.

Hongo M, Nagasaki Y, Shoji T. Epidemiology of esophageal cancer: Orient to Occident. Effects of chronology, geography and ethnicity. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009; 24:729-35.

Hsia CC, Nakashima Y, Thorgeirsson SS, Harris CC, Minemura M, Momosaki S, Wang NJ, Tabor E. Correlation of immunohistochemical staining and mutations of p53 in human hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*. 2000; 7:353-6.

Huang JX, Yan W, Song ZX, Qian RY, Chen P, Salminen E, Toppari J. Relationship between proliferative activity of cancer cells and clinicopathological factors in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2005; 11:2956-9.

Ikeda G, Isaji S, Chandra B, Watanabe M, Kawarada Y. Prognostic significance of biologic factors in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer*. 1999; 86:1396-405.

Ikeguchi M, Sakatani T, Ueda T, Fukuda K, Oka S, Hisamitsu K, Yamaguchi K, Tsujitani S, Kaibara N. Correlation between cathepsin D expression and p53 protein nuclear accumulation in esophageal squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol.* 2002; 55:121-6.

Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. *Tipos de Câncer, esôfago*. Brasil (Rio de Janeiro). 2010 [1tela] [citado em 12 de dezembro de 2010]. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/esofago/definicao>.

Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 2005; 18:283-93.

Kanamoto A, Kato H, Tachimori Y, Watanabe H, Nakanishi Y, Kondo H, Yamaguchi H, Gotoda T, Muro K, Matsumura Y. No prognostic significance of p53 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol.* 1999; 72:94-8.

Kang SY, Han JH, Lee KJ, Choi JH, Park JI, Kim HI, Lee HW, Jang JH, Park JS, Kim HC, Kang S, Oh YT, Chun M, Kim JH, Sheen SS, Lim HY. Low expression of Bax predicts poor prognosis in patients with locally advanced esophageal cancer treated with definitive chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:4146-53.

Kato H, Miyazaki T, Fukai Y, Nakajima M, Sohda M, Takita J, Masuda N, Fukuchi M, Manda R, Ojima H, Tsukada K, Asao T, Kuwano H. A new proliferation marker, minichromosome maintenance protein 2, is associated with tumor aggressiveness in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol*. 2003; 84:24-30.

Kawakubo H, Ozawa S, Ando N, Kitagawa Y, Mukai M, Ueda M, Kitajima M. Alterations of p53, cyclin D1 and pRB expression in the carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2005; 14:1453-9.

Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science*. 1991; 252:1708-11.

Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*. 2002; 27:181-182:471:474.

Kimura S, Kitadai Y, Kuwai T, Tanaka S, Hihara J, Yoshida K, Toge T, Chayama K. Expression of p53 protein en esophageal squamous cell carcinoma: retalion to hypoxia-inducible factor-1 α , angiogenesis and apoptosis. *Pathobiology*. 2005; 72:179-85.

Koide N, Nishio A, Hiraguri M, Hanazaki K, Adachi W, Amano J. Coexpression of vascular endothelial growth factor and p53 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am J Gastroenterol*. 2001; 96:1733-40.

Kononen J, Rubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998; 4:767-8.

Kurabayashi A, Furihata M, Matsumoto M, Ohtsuki Y, Sasaguri S, Ogoshi S. Expression of Bax and apoptosis-related proteins in human esophageal squamous cell carcinoma including dysplasia. *Mod Pathol.* 2001; 14:741-7.

Kuwahara D, Tsutsumi K, Oyake D, Ohta T, Nishikawa H, Koizuka I. Inhibition of caspase-9 activity and Apaf-1 expression in cisplatin-resistant head and neck squamous cell carcinoma cells. *Auris Nasus Larynx.* 2003; 30 Suppl:S85-8.

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.

Lane D, Levine A. p53 Research: The Past Thirty Years and the Next Thirty Years. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2:a000893.

Lavrik IN, Eils R, Fricker N, Pforr C, Krammer PH. Understanding apoptosis by systems biology approaches. *Mol Biosyst.* 2009; 5:1105-11.

Lehrbach DM, Nita ME, Cecconello I. Molecular aspects of esophageal squamous cell carcinoma carcinogenesis. *Arq Gastroenterol.* 2003; 40:256-61.

Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9:749-758.

Lim MD, Dickherber A, Compton CC. Before you analyze a human specimen, think quality, variability, and bias. *Anal Chem*. 2011; 83:8-13.

Liu YS, Yu CH, Li L, Zhang BF, Fang J, Zhou Q, Hu Y, Li YM, Jun Gao H. Expression of p53, p16 and cyclooxygenase-2 in esophageal cancer with tissue microarray. *J Dig Dis*. 2007; 8:133-8.

Liu WK, Jiang XY, Zhang MP, Zhang ZX. The relationship between HPV16 and expression of cyclooxygenase-2, p53 and their prognostic roles in esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010; 22:67-74.

Lo Muzio L, Santarelli A, Emanuelli M, Pierella F, Sartini D, Staibano S, Rubini C, De Rosa G. Genetic analysis of oral squamous cell carcinoma by cDNA microarrays focused apoptotic pathway. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2006; 19:675-82.

McCabe ML, Dlamini Z. The molecular mechanisms of oesophageal cancer. *Int Immunopharmacol*. 2005; 5:1113-30.

Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*. 2003; 11:577-90.

Mizobuchi S, Furihata M, Sonobe H, Ohtsuki Y, Ishikawa T, Murakami H, Kurabayashi A, Ogoshi S, Sasaguri S. Association between p53

immunostaining and cigarette smoking in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Jpn J Clin Oncol.* 2000; 30:423-8.

Michalovitz D, Havevy O, Oren M. Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell.* 1990; 62:671-80.

Miyazaki T, Kato H, Faried A, Sohda M, Nakajima M, Fukai Y, Masuda N, Manda R, Fukuchi M, Ojima H, Tsukada K, Kuwano H. Predictors of response to chemo-radiotherapy and radiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2005; 25:2749-55.

Moffitt KL, Martin SL, Walker B. From sentencing to execution--the processes of apoptosis. *J Pharm Pharmacol.* 2010; 62:547-62.

Monges GM, Seitz JF, Giovannini MF, Gouvernet JM, Torrente MA, Hassoun JA. Prognostic value of p53 protein expression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer Detect Prev.* 1996; 20:63-7.

Natsugoe S, Yoshinaka H, Shimada M, Sakamoto F, Morinaga T, Nakano S, Kusano C, Baba M, Takao S, Aikou T. Number of lymph node metastases determined by presurgical ultrasound is related to prognosis in patients with esophageal carcinoma. *Ann Surg.* 2001; 234: 613-8.

Ngan CY, Yamamoto H, Takagi A, Fujie Y, Takemasa I, Ikeda M, Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Oxaliplatin

induces mitotic catastrophe and apoptosis in esophageal cancer cells. *Cancer Sci.* 2008; 99:129-39.

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.

Nooter K, Kok T, Bosman FT, van Wingerden KE, Stoter G. Expression of the multidrug resistance protein (MRP) in squamous cell carcinoma of the oesophagus and response to pre-operative chemotherapy. *Eur J Cancer.* 1998; 34:81-6.

Okumura H, Natsugoe S, Nakashima S, Matsumoto M, Sakita H, Nakano S, Kusano C, Baba M, Takao S, Furukawa T, Akiyama SI, Aikou T. Apoptosis and cell proliferation in esophageal squamous cell carcinoma treated by chemotherapy. *Cancer Lett.* 2000; 158:211-6.

Oren M, Levine AJ. Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983; 80:56-9.

Parenti AR, Rugge M, Frizzera E, Ruol A, Noventa F, Ancona E, Ninfo V. p53 overexpression in the multistep process of esophageal carcinogenesis. *Am J Surg Pathol.* 1995; 19:1428-22.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *C. A. Cancer J Clin.* 2005; 55:74-108.

Pennica D, Goeddel DV, Hayflick JS, Reich NC, Anderson CW, Levine AJ. The amino acid sequence of murine p53 determined from a c-DNA clone. *Virology.* 1984; 134:477-82.

Phillips DC, Garrison SP, Jeffers JR, Zambetti GP. Assays to measure p53-dependent and -independent apoptosis. *Methods Mol Biol.* 2009; 559:143-59.

Pinto LFR, Rossini AMT, Albano RM, Felzenszwalb I, Gallo CVM, Nunes RA, Andreollo NA. Mechanisms of esophageal câncer development in Brazilians. *Mutation Research.* 2003; 544:365-373.

Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer.* 1999; 83:18-29.

Qi ZL, Huo X, Xu XJ, Zhang B, Du MG, Yang HW, Zheng LK, Li J, Shen ZY. Relationship between HPV16/18 E6 and 53, 21WAF1, MDM2, Ki67 and cyclin D1 expression in esophageal squamous cell carcinoma: comparative study by using tissue microarray technology. 2006; 28:235-40.

Racay P, Hatok J, Hudecek J, Chudej J, Jurecekova J, Dobrota D. Transcription of genes of p53-dependent apoptosis in acute leukaemia. *Int J Mol Med.* 2008; 22:833-9.

Raouf AA, Evoy DA, Carton E, Mulligan E, Griffin MM, Reynolds JV. Loss of Bcl-2 expression in Barrett's dysplasia and adenocarcinoma is associated with tumor progression and worse survival but not with response to neoadjuvant chemoradiation. *Dis Esophagus*. 2003; 16:17-23.

Rice TW, Blackstone EH, Rybicki LA, Adelstein DJ, Murthy SC, DeCamp MM, Goldblum JR. Refining esophageal cancer staging. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003; 125:1103-13.

Rice TW, Rusch VW, Apperson-Hansen C, Allen MS, Chen LQ, Hunter JG, Kesler KA, Law S, Lerut TE, Reed CE, Salo JA, Scott WJ, Swisher SG, Watson TJ, Blackstone EH. Worldwide esophageal cancer collaboration. *Dis Esophagus*. 2009; 22:1-8.

Rosa AR, Schirmer CC, Gurski RR, Meurer L, Edelweiss MI, Kruel CD. Prognostic value of p53 protein expression and vascular endothelial growth factor expression in resected squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esophagus*. 2003; 16:112-8.

Sano A, Kato H, Sakurai S, Sakai M, Tanaka N, Inose T, Saito K, Sohda M, Nakajima M, Nakajima T, Kuwano H. CD24 expression is a novel prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2009; 16:506-14.

Saraste A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz*. 1999; 24:189-95.

Sarbia M, Porschen R, Borchard F, Horstmann O, Willers R, Gabbert HE. p53 protein expression and prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer*. 1994; 74:2218-23.

Sarbia M, Bittinger F, Porschen R, Dutkowski P, Torzewski M, Willers R, Gabbert HE. The prognostic significance of tumour cell proliferation in squamous cell carcinomas of the oesophagus. *Br J Cancer*. 1996; 74:1012-6.

Sarbia M, Bittinger F, Grabellus F, Verreet P, Dutkowski P, Willers R, Gabbert HE. Expression of Bax, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family, in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1997; 73:508-13.

Shen Y, White E. p53-dependent apoptosis pathways. *Adv Cancer Res*. 2001; 82:55-84.

Shimoji H, Miyazato H, Nakachi A, Kuniyoshi S, Isa T, Shiraishi M, Muto Y, Toda T. Expression of p53, bcl-2, and bax as predictors of response to radiotherapy em esophageal câncer. *Dis Esophagus*. 2000; 13:185-90.

Siewert JR, Stein HJ, Feith M, Bruecher BL, Bartels H, Fink U. Histologic tumor type is an independent prognostic parameter in esophageal cancer: lessons from more than 1,000 consecutive resections at a single center in the Western world. *Ann Surg*. 2001; 234:360-7.

Suzuki S, Miyazaki T, Tanaka N, Sakai M, Sano A, Inose T, Sohda M, Nakajima M, Kato H, Kuwano H. Prognostic significance of CD151 expression in

esophageal squamous cell carcinoma with aggressive cell proliferation and invasiveness. *Ann Surg Oncol*. 2010 [Epub ahead of print].

Szumilo J, Chibowski D, Dbrowski A. Assessment of the predictive value of clinical and histopathological factors as well as the immunoexpression of p53 and bcl-2 proteins in response to preoperative chemotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus*. 2000; 13:191-7.

Taghavi N, Biramijamal F, Sotoudeh M, Moaven O, Khademi H, Abbaszadegan MR, Malekzadeh R. Association of p53/p21 expression with cigarette smoking and prognosis in esophageal squamous cell carcinoma patients. *World J Gastroenterol*. 2010; 16:4958-67.

Takala H, Saarnio J, WiiK H, Soini Y. Claudins 1, 3, 4, 5 and 7 in esophageal câncer: loss of claudin 3 and 4 expression is associated with metastatic behavior. *APMIS*. 2007; 115:838-47.

Takayama T, Nagao M, Sawada H, Yamada Y, Emoto K, Fujimoto H, Ueno M, Hirao S, Nakajima Y. Bcl-X expression in esophageal squamous cell carcinoma: association with tumor progression and prognosis. *J Surg Oncol*. 2001; 78:116-23.

Takeyama D, Miki Y, Fujishima F, Suzuki T, Akahira J, Hata S, Miyata G, Satomi S, Sasano H. Steroid and xenobiotic receptor in human esophageal squamous cell carcinoma: a potent prognostic factor. *Cancer Sci*. 2010; 101:543-9.

Takikita M, Hu N, Shou JZ, Wang QH, Giffen C, Taylor PR, Hewitt SM.

Biomarkers of apoptosis and survival in esophageal squamous cell carcinoma.

BMC Cancer. 2009; 9:310.

Taylor CR, Levenson RM. Quantification of immunohistochemistry: issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology*.

2006; 49:411-24.

Toshimitsu H, Hashimoto K, Tangoku A, Iizuka N, Yamamoto K, Kawauchi S, Oga A, Furuya T, Oka M, Sasaki K. Molecular signature linked to acquired resistance to cisplatin in esophageal cancer cells. *Cancer Lett*. 2004; 211:69-78.

Ribeiro U, Kinkelstein SD, Safatle-Ribeiro AV, Landreneau RJ, Clarke MR, Bakker A, Swalsky PA, Gooding WE, Posner MC. P53 sequence analysis predicts treatment response and outcome of patients with esophageal carcinoma. *Cancer* 1998; 83:7-18.

Vaseva AV, Moll UM. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta*.

2009; 1787:414-20.

Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*.

2009; 137:413-31.

Wagata T, Shibagaki I, Imamura M, Shimada Y, Toguchida J, Yandell DW, Ikenaga M, Tobe T, Ishizaki K. Loss 17p, mutation of the p53 gene, and

overexpression of p53 protein in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 1993; 53:846-50.

Wen J, Zheng B, Hu Y, Zhang X, Yang H, Li Y, Zhang CY, Luo KJ, Zang X, Li YF, Guan XY, Fu JH. Comparative proteomic analysis of the esophageal squamous carcinoma cell line EC109 and its multi-drug resistant subline EC109/CDDP. *Intern J Oncol.* 2010; 36:265-274.

Wiezorek J, Holland P, Graves J. Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer. *Clin Cancer Res.* 2010; 16:1701-8.

Yamasaki M, Miyata H, Fujiwara Y, Takiguchi S, Nakajima K, Nishida T, Yasuda T, Matsuyama J, Mori M, Doki Y. p53 genotype predicts response to chemotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Ann Surg Oncol.* 2010; 17:634-42.

Yamazaki K, Hasegawa M, Ohoka I, Hanami K, Asoh A, Nagao T, Sugano I, Ishida Y. Increased E2F-1 expression via tumour cell proliferation and decreased apoptosis are correlated with adverse prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus. *J Clin Pathol.* 2005; 58:904-10.

Yan N, Shi Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005; 21:35-56.

Yin Y, Tainsky MA, Bischoff FZ, Strong LC, Wahl GM. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell.* 1992; 70:937-48.

Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*. 1991; 352:345-7.

APÊNDICE

Apêndice A – Planilhas dos três blocos de TMA construídos contendo a casuística de carcinomas epidermoides esofágicos desta investigação.

T0079

484629-0 b2	484629-0 b2	491158-0 f	491158-0 c	525954-1 c	525954-1 c	534386-0 a7	534386-0 a7	544110-2 h	544110-2 h	544802-6 t	544802-6 t	547964-9 i2	547964-9 i2
552975-1 mpp	552975-1 mpp	556735-1 a	556735-1 a	557862-0 b	557862-0 b	561477-5 e	561477-5 e	569414-0 a3	569414-0 a3	572068-0 a	572068-0 a	573227-1 d5	573227-1 d5
577162-5 tum	577162-5 tum	577636-8 b5	577636-8 b5	578635-5 a3	578635-5 a3	583475-9 a	583475-9 a	584402-9 b	584402-9 b	585652-3 c5	585652-3 c5	588892-1 a	588892-1 a
597156-0 c1	597156-0 c1	599317-2 f	599317-2 d	601216-0 c1	601276-0 c1	603412-8 c7	603412-8 d6	605239-8 a	605239-8 a	606172-9 a4	606172-9 a4	606172-9 b3	606172-9 b3
610256-5 d	610256-5 d	610256-5 d	610256-5 d	613997-3 b	613997-3 b	614796-8 b	614796-8 b	618045-0 i	618045-0 i	619398-6 b	619398-6 b	619626-8 g4	619626-8 g4
627208-0 c	627208-0 c	635204-9 a	635204-9 a	638006-9 g	638006-9 g	642001-0 a	642001-0 a	645029-6 c3	645029-6 c3	647774-7 a	647774-7 a	650544-9 a	650544-9 a
655762-7 b1	655762-7 b1	658709-7 g	658709-7 g	660380-7 2	660387-7 23	660985-6 c	660985-6 c	667224-8 a	667224-8 a	667439-9 c	667439-9 c	668301-0 c2	668301-0 c2
671118-9 d1	671118-9 d1	671118-9 d7	671118-9 d7	672080-3 c	672080-3 c	685519-9 d	685519-9 c	689419-4 a4	689419-4 a4	691910-3 ev	691910-3 ev	693473-0 a4	693473-0 a4
697677-8 a	697677-8 a	700821-0 a6	700821-0 a6	701301-9 b3	701301-9 b3	703939-5 a	703939-5 a	703939-5 a	703939-5 a	705926-8 a4	705926-8 a4	706765-8 a4	706765-8 a4
711457-5 nt	711457-5 c	713651-0 c	713651-0 c	719738-1 t3	719738-1 t3	719738-1 e	719738-1 e	721904-0 b	721904-0 c	721904-0 f	721904-0 c	726526-3 a	726526-3 a
732474-0 e	732474-0 e	06/2251-56	06/2251-56	06/4639-56	06/4639-56	06/6681-56	06/6681-56	06/4639-61	06/4639-61				
Coluna 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

T0106

484629-0	484629-0												
484629-0	484629-0	491158-0	491158-0	544110-2	544110-2	551816-4	551816-4						
552975-1	552975-1	557862-0	557862-0	576184-0	576184-0	577162-5	577162-5						
577636-8	577636-8	597156-0	597156-0	610256-5	610256-5	635204-9	635204-9						
645029-6	645029-6	645029-6	645029-6	655762-7	655762-7	660985-6	660985-9						
668301-0	668301-0	689419-4	689419-4	693473-0	693473-0	697677-8	697677-8						
701301-9	701301-9	703939-5	703939-5	703939-5	703939-5	719738-1	719738-1						

T0228

525954-1	525954-1	534386-0	534386-0	544802-6	544802-6	547964-9	547964-9	556735-1	556735-1	561477-5	561477-5
569414-0	569414-0	572068-0	572068-0	573227-1	573227-1	578635-5	578635-5	5834758-9	5834758-9	584402-9	584402-9
585652-3	585652-3	588892-1	588892-1	599317-2	599317-2	601276-0	601276-0	603412-8	603412-8	605239-8	605239-8
606172-9	606172-9	607247-0	607247-0	613997-3	613997-3	614796-8	614796-8	618045-0	618045-0	619398-6	619398-6
619626-8	619626-8	623558-1	623558-1	627208-8	627208-8	635204-9	635204-9	638006-9	638006-9	642001-0	642001-0
647774-7	647774-7	650544-9	650544-9	654047-3	654047-3	658709-7	658709-7	660380-7	660380-7	667224-8	667224-8
667439-9	667439-9	668301-0	668301-0	669274-5	669274-5	671118-9	671118-9	672080-3	672080-3	685519-9	685519-9
689419-4	689419-4	691910-3	691910-3	700821-0	700821-0	705826-8	705826-8	706765-8	706765-8	708568-0	708568-0
711457-5	711457-5	713651-0	713651-0	719738-1	719738-1	06/06681	06/06681			624611-7	624611-7
rim	rim	rim	rim	rim	rim	rim	rim	rim	rim	rim	rim
Coluna 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	11