

EXPRESSÃO CITOFOTOMÉTRICA DO MARCADOR CD34 NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO

Citophotometric expression of CD34 in squamous cell carcinoma of the esophagus

Olimpia Alves Teixeira LIMA¹, Jurandir Marcondes RIBAS-FILHO², Nicolau Gregori CZECZKO²,
Oswaldo MALAFAIA², Sonia Maria Scheneider AOKI², Ulrich Andreas DIETZ²,
Ubirajara Rutilio Mendes e Ferreira de ARAÚJO², Fernanda Marcondes RIBAS²

ABCDDV/570

Lima OAT, Ribas-Filho JM, Czczko NG, Malafaia O, Aoki SMS, Dietz UA, Araújo URMF, Ribas FM. Expressão citofotométrica do marcador CD34 no carcinoma epidermóide de esôfago. ABCD Arq Bras Cir Dig 2007;20(4):254-60

RESUMO – Racional - O câncer de esôfago está entre as seis neoplasias malignas mais comuns do mundo. Devido à sua grande agressividade clínica, o subtipo carcinoma epidermóide constitui um dos tumores de pior prognóstico, com alto índice de morbi-mortalidade. Marcadores de biologia molecular tem sido apontados como forte coadjuvante no diagnóstico e gradação de tumores. A angiogênese, evento essencial para a progressão tumoral, pode ser estudada pelo marcador CD34. **Objetivo** - Determinar por citofotometria, usando o sistema SAMBA 4000, a expressão do marcador CD34 no carcinoma epidermóide de esôfago e, correlacioná-los com dados clínico-patológicos (idade, sexo, grau de diferenciação do tumor, estadio, tamanho, localização, profundidade e acometimento de linfonodos). **Métodos** - Avaliaram-se 29 amostras teciduais de carcinoma epidermóide de esôfago utilizando-se coloração imunistoquímica com marcador anti-CD34. A quantificação da expressão deste marcador foi realizada por citometria de imagem, pelo sistema SAMBA 4000 nas variáveis índice de marcação e densidade óptica. A correlação entre subgrupos e análise estatística dos resultados foi realizada com o programa SPSS. **Resultados** - A expressão média do marcador CD34 foi de 73,40% + 15,20 no índice de marcação e 56,10 + 23,54 na densidade óptica. O CD34 não apresenta correlação estatisticamente significativa com as características clínico-histopatológicas estudadas (idade, sexo, grau de diferenciação do tumor, estadio, tamanho, localização, profundidade e acometimento de linfonodos). **Conclusão** - O marcador CD34 apresenta expressão no carcinoma epidermóide de esôfago, com maior valor no índice de marcação em relação à densidade óptica. Ele não apresenta correlação com as características clínico-histopatológicas estudadas.

DESCRIPTORIOS - CD34. Citofotometria, SAMBA. Carcinoma epidermóide de esôfago.

INTRODUÇÃO

O câncer de esôfago está entre as seis neoplasias malignas mais comuns no mundo, e é considerado pela Organização Mundial de Saúde importante problema de saúde pública. Devido a sua grande agressividade clínica, constitui um dos tumores de pior prognóstico, com alto índice de morbi-mortalidade⁶.

Sua incidência varia em diferentes regiões do mundo, alcança seus maiores índices em países asiáticos como a China, sendo também freqüente no Japão, sudeste da África e América do Sul⁹. No Brasil, de acordo com a estimativa de incidência de câncer para 2006⁷, devem ocorrer cerca de 10.580 novos casos (7.970 entre os homens e 2.610 entre as mulheres) neste ano. O Estado do Rio Grande do Sul apresenta um dos maiores índices mundiais, com 21,17 casos para cada 100 000 homens e 7,88 para cada 100 000 mulheres⁷.

Dentre os diferentes tipos de tumores que podem acometer o esôfago, o mais freqüente, e que responde por mais da metade dos tumores deste órgão na estatística mundial,

é o carcinoma epidermóide, também chamado espinocelular, pois origina-se do epitélio normal de revestimento do esôfago¹².

O estudo da biologia molecular dos tumores tem despertado o interesse de grande número de pesquisadores, uma vez que possibilita maior compreensão da gênese tumoral, abrindo grande número de linhas de pesquisas na busca de melhor manejo tanto na prevenção, quanto no diagnóstico, prognóstico e, conseqüentemente na conduta em relação ao câncer⁹.

Ainda em investigação, técnicas de biologia molecular parecem ter futuro promissor no diagnóstico patológico e gradação de tumores. Estudos de marcadores de angiogênese são exemplos de um importante coadjuvante na pesquisa do câncer, e têm demonstrado forte correlação com a intensidade da carcinogênese^{5,8}.

Os biomarcadores que modulam a formação de novos vasos pela angiogênese, como o C34, uma glicoproteína transmembrana expressa em todas as células progenitoras hematopoéticas, têm sido avaliados em diversos tipos de tumores como marcador de grande potencial prognóstico¹, uma vez que a angiogênese é reconhecida como pré-requisito fundamental para o crescimento e metastatização tumoral⁴.

Associado à imunistoquímica, a citofotometria de

Trabalho realizado na ¹União Educacional do Planalto Central – UNIPLAC – Brasília, DF e ²Hospital Universitário Evangélico de Curitiba – HUEC – Curitiba, PR, Brasil.
Endereço para correspondência: Ronaldo Mafia Cuenca,
e-mail: rmcuenca@uol.com.br

imagem computadorizada representa grande contribuição na análise de marcadores tumorais. Com a informatização dos resultados, a análise quantitativa pode ser realizada de forma mais acurada; o caráter subjetivo dado pelos olhos do patologista observador é excluído com a padronização dos resultados. O sistema SAMBA 4000 (Sistema de Análise Microscópica por Busca Automática), um sistema informatizado para análise citomorfométrica de imagens, foi desenvolvido para análise citomorfométrica de imagens, foi desenvolvido com esta finalidade e exerce importante papel na análise de marcadores tumorais imunomarcados^{2,3}. Assim, este estudo tem por objetivos: 1. determinar por citofotometria (pelo sistema SAMBA 4000) a expressão imunistoquímica do marcador CD-34 no carcinoma epidermóide de esôfago nas variáveis índice de marcagem e densidade óptica; 2. avaliar a correlação do marcador CD34 nas variáveis índice de marcagem (IM) e densidade óptica (DO), com sexo, idade, grau de diferenciação do tumor, estágio, tamanho, localização, nível de profundidade (T) e acometimento de linfonodos.

MÉTODOS

A amostra constituiu-se de 30 blocos de parafina contendo carcinoma epidermóide de esôfago. Eles eram provenientes de pacientes diagnosticados e tratados com esofagectomia, entre os anos de 1995 e 2005. Cada amostra foi submetida à avaliação histológica prévia para inclusão no estudo. Todos os tumores estavam identificados e processados de acordo com técnicas histológicas de rotina, conservados em solução de formol, tamponados e fixados em parafina.

Para melhor uniformidade da amostra, foram estabelecidos critérios de inclusão e exclusão dos blocos. Os critérios de inclusão foram: pacientes portadores de carcinoma epidermóide de esôfago confirmado por histopatologia; material biológico proveniente de peça cirúrgica; amostra tumoral representativa no bloco de parafina para que pudesse ser obtido pelo menos três cortes; material de boa qualidade e em bom estado de preservação. Os critérios de exclusão foram: pacientes com tratamentos prévios (quimioterapia e/ou radioterapia); prontuários de pacientes não qualificados, com dados incompletos; análise histopatológica não definida.

De cada paciente foi extraído um conjunto de informações que incluíram: dados clínicos (idade < 55 anos / > 55 anos); sexo; dados histológicos (grau de diferenciação tumoral segundo a OMS em bem diferenciado, moderadamente diferenciado, pouco diferenciado); classificação TNM do caso; tamanho tumoral (< 3 cm / > 3 cm); localização do tumor (segmento superior, médio ou inferior).

Processamento histológico

Os tumores estudados foram previamente emblocados em parafina seguindo normas técnicas do serviço de origem. Na avaliação histológica, cada bloco foi submetido à nova microtomia para obtenção de novos cortes com espessura de 3µm. A seguir, foram corados com a técnica de hema-

toxilina e eosina (HE) e reavaliados, independentemente, por dois patologistas para se obter a confirmação do laudo histológico efetuado previamente. Os casos em que não houve concordância total entre os dois observadores foram submetidos à avaliação por um terceiro patologista. As lâminas de diagnóstico discordante ou com material tumoral escasso, foram repetidas a partir dos blocos de parafina ou excluídas. Todas as lâminas foram analisadas segundo os critérios histológicos para o diagnóstico de carcinoma epidermóide de esôfago e seu grau de diferenciação.

Procedimento imunistoquímico

As expressões imunistoquímicas do antígeno CD34 foram obtidas através do método da streptoavidina-biotina-peroxidase. Ele é realizado em duas etapas, em apenas um dia, ou em dois dias com intervalo de 2 horas entre as etapas.

Na primeira etapa, os procedimentos se iniciaram pela obtenção de cortes histológicos de 3 a 5 µm do material emblocado em parafina. Estes cortes foram estendidos em lâminas previamente limpas, desidratadas e silanizadas. Em seguida, foi colocado em estufa a 37°C pelo período noturno para fragmentação da parafina. O passo seguinte constituiu na desparafinização da lâmina com dois banhos de xilol com duração de dez minutos cada. Seguiu-se a isso, a hidratação do material com 2 banhos de etanol absoluto com duração de 3 minutos cada e, na seqüência, 2 banhos de um minuto cada em água destilada.

A segunda etapa foi a de recuperação antigênica. Os cortes foram colocados em solução tampão de citrato, obtida através de diluição de ácido cítrico e citrato de sódio em água destilada. As lâminas depois de secas foram colocadas uma a uma nos frascos da solução tampão e todo o conjunto colocado em banho-maria. Esperou-se a temperatura atingir 97° C e contado o tempo de 20 minutos. Retiraram-se os frascos e os mesmos esfriados por período de 30 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente e, então, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3%.

Para não ocorrer alterações significativas de pH, os cortes foram submetidos à rápida incubação em solução tampão PBS na concentração de 0,2 M, obtido pela diluição de fostato disódico monobásico e fosfato disódico bibásico juntamente com o detergente "tween" 20. Utilizando uma caneta hidrofóbica, formou-se um círculo envolvendo o corte histológico, como se fosse uma barreira. As lâminas foram colocadas nas bandejas com bastante água e a seguir incubadas com anticorpo primário contra o CD34 durante 18 horas.

Nesta fase, os procedimentos se iniciavam pela lavagem das lâminas em água destilada, seguida por banho em tampão PBS por 5 minutos. A seguir procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário biotinylated link universal-biotina por 30 minutos e novo banho por 5 minutos, em tampão PBS. Seguiu-se a incubação com Streptoavidina-HRP por 30 minutos. Realizou-se novo banho com tampão PBS por 5 minutos e colocou-se o

cromógeno DAB sobre as lâminas, usando tempo de 5 a 20 minutos. Procedeu-se com a coloração com hematoxilina, finalizando com a montagem das lâminas e a colocação das etiquetas identificadoras.

Os anticorpos para antígenos CD34 foram anticorpo monoclonal de camundongo, clone QBEnd/10, Cat347660, peso molecular de 105-120 kDa e com reatividade específica para humanos, do Lab Vision Corporation.

Para a análise qualitativa da expressão do CD34 foram selecionados cortes histológicos após o procedimento imunohistoquímico, devidamente corados pela HE e representativos da neoplasia, sem artefatos técnicos.

Os 29 casos submetidos ao estudo foram preparados pelo mesmo pesquisador, de acordo com os antígenos estudados e avaliados da mesma forma pelos mesmos observadores.

A análise das células imunopositivas para o anticorpo contra CD34 foi realizada utilizando a citofotometria pelo método SAMBA, em campos definidos como "hot spots" em microscópio óptico.

Citofotometria pelo Sistema SAMBA 4000 (Systeme D'analyse Microscopique à Balayage Automatique ou Sistema de Análise Microscópica de Busca Automática)

O sistema SAMBA 4000 é composto por "hardware" capaz de captar imagens microscópicas e por "software" com capacidade para interpretar e analisar matematicamente as imagens por ele captadas. O hardware é composto por microscópio, vídeo-câmera, microcomputador e impressora. O microscópio utilizado foi o tipo Zeiss-Axioskop. O fluxo luminoso, oriundo da lâmpada de Xenon, era controlado por potenciômetro capaz de avaliar com precisão a quantidade de luz; ele atravessava o condensador, a lâmina e a objetiva. Em seguida era separado em duas partes: a via destinada a permitir a observação visual por meio das oculares e a de captação de imagem por meio da câmera, que vai compor a imagem no monitor do computador.

A captura das imagens foi feita por meio de uma câmera colorida do tipo Sony Dxc-970md 3ccd, capaz de padronizar as cores verde, azul e vermelha, de forma que trabalhe com o mesmo nível de captação determinado. A imagem captada por fotodiodos, foi transformada em pontos de imagem (pixel), com área equivalente a $0.16\mu\text{m}^2$ por ponto-imagem e enviada ao computador.

O software utilizado foi o Imunno 4.00. Inicialmente realizou-se a calibração e padronização do sistema. As imagens analógicas - tais como são percebidas ao microscópio -, foram captadas através da câmera e enviadas ao computador, que utilizando o software Imunno, digitalizou-as em pixels, transformando-as em imagens numéricas. Este processo conferiu valor para cada ponto-imagem (pixel). A luz absorvida pelo tecido em cada segmento foi quantificada.

Esta quantificação foi expressa através de uma escala de variações de níveis de cinza que vai do 0 (preto) a 255 (branco). Este processo correspondeu à numerização da imagem envolvendo duas etapas: geração da matriz em tons

de cinza e transformação dela em matriz numérica binária.

O procedimento de leitura foi feito por campos visuais para localização dos "hot spots" em sentido de barra grega.

Foi utilizada objetiva com aumento de 20 X em 10 campos, para identificar e quantificar os marcadores para angiogênese e assim também identificar e quantificar os marcadores de proliferação celular. O total de superfícies examinadas variou de 60.000 a 120.000 μm^2 . O tempo de leitura para cada lâmina foi de aproximadamente 40 minutos.

Parâmetros analisados pelo sistema SAMBA 4000

O sistema informatizado Immuno 4000 analisa duas variáveis para caracterizar quantitativamente, as expressões dos marcadores: índice de marcagem e densidade óptica média.

O índice de marcagem (IM), descreve o percentual de área tecidual especificamente marcado pela prova histoquímica. A densidade óptica média (DO) denota a intensidade de coloração. A heterogeneidade de concentração expressa a distribuição da concentração do marcador nos campos individuais analisados.

A padronização do sistema para análise microscópica computadorizada é realizada por uma lâmina considerada controle-negativo, na qual o marcador contra CD34 é omitido e os parâmetros acima descritos são analisados. A análise estatística foi feita pelo próprio software.

RESULTADOS

A mediana das idades foi de 58 anos (idade mínima de 40 e máxima de 70 anos), sendo que 79% dos pacientes foram pacientes maiores de 50 anos e 25 (86%) do gênero masculino.

A maioria das lesões tumorais foram maiores de 3 cm (68%). Vinte (71%) foram classificadas com grau histopatológico de moderadamente diferenciado, e somente 5 (18%) lesões bem diferenciadas. Vinte e sete (96%) pacientes estavam localizadas no segmento médio ou inferior do esôfago. A maioria dos pacientes apresentou metástases linfonodais (79%), e 14 (48%) foram classificados no estágio T3N1M0 (Tabela 1).

Medidas descritivas dos marcadores

Na Tabela 2 são apresentadas a média, mediana, valor mínimo, valor máximo e desvio-padrão da expressão do índice de marcagem e densidade óptica do marcador CD34, considerando-se as lâminas incluídas no estudo

Correlação entre IM e DO

Foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson para verificar se existia correlação entre as medidas do IM e da DO que mostrou coeficiente de correlação de 0,409 ($P=0,028$ - Gráfico 1).

TABELA 1 - Características das lesões de 29 pacientes com neoplasia de esôfago

Características	Número de pacientes	%
Tamanho da lesão *		
Maior de 3 cm	19	68
Menor de 3 cm	9	32
Grau histopatológico *		
Bem diferenciado	5	18
Moderadamente diferenciado	20	71
Pouco diferenciado	3	11
Nível esofágico da lesão *		
Superior	1	4
Médio	14	50
Inferior	13	46
Linfonodos positivos		
Não	12	41
Sim	17	59
Estadio (TNM)		
T2N0M0	6	21
T2N1M0	3	10
T3N0M0	6	21
T3N1M0	14	48

TABELA 2 - Medidas descritivas do índice de marcagem e densidade óptica do marcador CD34

Expressão	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio-padrão
Índice de marcagem	29	73,40	71,12	46,79	98,74	15,20
Densidade óptica	29	56,10	54,29	36,96	82,87	13,54

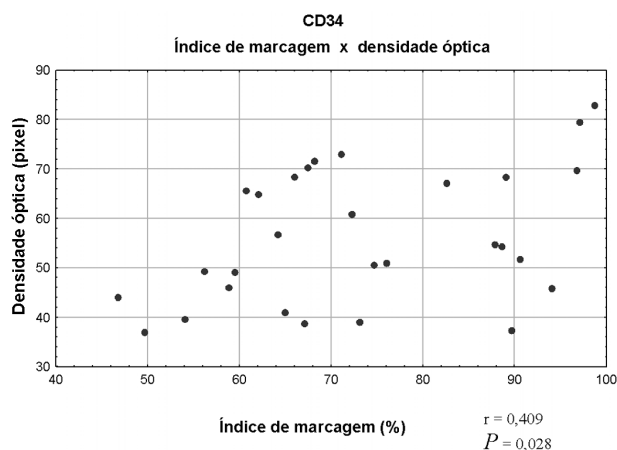


GRÁFICO 1 - Correlação entre o índice de marcagem e densidade óptica do marcador CD34

Diferenciação do carcinoma e expressão do marcador cd34

Na Tabela 3 são apresentadas as medidas descritivas (média, mediana, valor mínimo, valor máximo e desvio-padrão), considerando-se as classificações de diferenciação do carcinoma.

TABELA 3 - Medidas descritivas das expressões do CD34 (IM e DO) em diferentes níveis histológicos

Expressão	Carcinoma	n	Média ± DP	Valor de P*
Índice de marcagem	Pouco	3	57,23±9,72	0,072
	Moderado	20	77,04±14,79	
Densidade óptica	Bem	6	69,33±13,99	0,490
	Pouco	3	52,75±13,56	
	Moderado	20	57,97±14,61	
	Bem	6	51,57±9,85	

(*) Teste de Kruskal-Wallis

Comparação do marcador segundo o estágio do carcinoma (IIa/IIb versus III)

Não houve diferença significativa, conforme demonstrado na Tabela 4.

TABELA 4 - Medidas descritivas das expressões do CD34 (IM e DO) e estágio do carcinoma

Expressão	Estagio do carcinoma	n	Média ± DP	Valor de P*
Índice de marcagem	IIA IIB	15	70,16±13,79	0,217
	III	14	76,86±16,37	
Densidade óptica	IIA IIB	15	57,08±13,46	0,847
	III	14	55,06±14,06	

(*) Teste não-paramétrico de Mann-Whitney

Idade e sexo segundo a expressão do marcador

Não foram observadas diferenças estatisticamente significante entre os grupos. Nas Tabelas 5 e 6 são apresentados as estatísticas descritivas (média, valor mínimo, valor máximo e desvio-padrão) e os valores de P

TABELA 5 - Medidas descritivas das expressões do CD34 (IM e DO) pela idade

Expressão	Idade	n	Média ± DP	Valor de P*
Índice de marcagem	Até 60	15	74,3±15,1	0,78
	Mais que 60	14	72,43±15,82	
Densidade óptica	Até 60	15	55,1±13,71	0,683
	Mais que 60	14	57,18±13,8	

(*) Teste não-paramétrico de Mann-Whitney

TABELA 6 - Medidas descritivas das expressões do CD34 (IM e DO) e sexo

Expressão	Sexo	n	Média ± DP	Valor de P*
Índice de marcagem	Masculino	24	74,83±15,52	0,201
	Feminino	5	66,51±12,72	
Densidade óptica	Masculino	24	55,70±14,30	0,674
	Feminino	5	58,02±10,13	

(*) Teste não-paramétrico de Mann-Whitney

Tamanho do tumor segundo a expressão dos marcadores

A Tabela 7 contém as medidas descritivas (média, valor mínimo, valor máximo e desvio padrão) e o valor de P do teste estatístico.

TABELA 7 - Medidas descritivas das expressões do CD34 (IM e DO) pelo tamanho tumoral

Expressão	Tamanho	n	Média ± DP	Valor de P*
Índice de marcagem	≤ 3	9	74,75±14,57	0,962
	> 3	19	73,07±16,19	
Densidade óptica	≤ 3	9	59,29±12,30	0,263
	> 3	19	53,85±14,02	

(*) Teste não-paramétrico de Mann-Whitney

Localização do tumor segundo a expressão dos marcadores

Comparando-se a expressão dos marcadores em relação a porção esofágica acometida pelo tumor não foram encontradas diferenças significativas quanto ao índice de marcagem e densidade óptica do CD34 (Tabela 8).

TABELA 8 - Medidas descritivas das expressões do CD34 (IM e DO) pela localização tumoral

Expressão	Localização	n	Média ± DP	Valor de P*
Índice de marcagem	Inferior	15	70,00±13,88	0,234
	Médio ou superior	14	77,04±16,21	
Densidade óptica	Inferior	15	58,37±13,76	0,505
	Médio ou superior	14	53,68±13,38	

(*) Teste não-paramétrico de Mann-Whitney

Invasão de linfonodos segundo a expressão dos marcadores

Em relação à presença ou ausência de linfonodos acometidos, não houve diferença estatística para o marcador nas duas variáveis analisadas (Tabela 9).

TABELA 9 - Medidas descritivas das expressões do CD34 (IM e DO) por linfonodos positivos

Expressão	Inv linf	n	Média ± DP	Valor de P*
Índice de marcagem	N0	13	68,86±13,78	0,121
	N1 ou N2	16	77,08±15,72	
Densidade óptica	N0	13	55,10±13,38	0,589
	N1 ou N2	16	56,92±14,06	

(*) Teste não-paramétrico de Mann-Whitney apenas um caso apresentou classificação "superior"

Profundidade segundo a expressão dos marcadores

Não foram encontradas diferenças significativas conforme mostra a Tabela 10.

TABELA 10 - Medidas descritivas das expressões do CD34 (IM e DO) pela profundidade tumoral

Expressão	Profundidade	n	Média ± DP	Valor de P*
Índice de marcagem	T2	8	65,84±12,06	0,114
	T3	21	76,28±15,53	
Densidade óptica	T2	8	59,43±12,32	0,518
	T3	21	54,84±14,06	

(*) Teste não-paramétrico de Mann-Whitney

DISCUSSÃO

Embora muitos autores reportem o declínio da incidência do carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) e o aumento da incidência do adenocarcinoma, o CEE permanece o tipo histológico predominante na estatística mundial conforme relatado por Takedo et al.¹⁵. Ainda, a despeito de novas terapias combinando cirurgia, radioterapia e quimioterapia, o tratamento permanece com prognóstico desfavorável e com baixa sobrevida. O diagnóstico precoce e terapia adequada parecem ser as únicas chances de tratamento eficaz desta neoplasia. Em contrapartida, sabe-se que o tumor exibe comportamento altamente agressivo e silencioso, o que torna um desafio a busca do diagnóstico precoce desta doença.

Os avanços da medicina moderna têm contribuído para o melhor entendimento da tumorigênese. Com o reconhecimento dos mecanismos genético-moleculares implicados na gênese e na progressão do câncer, novos métodos de diagnóstico e de acompanhamento prognóstico, com melhor caracterização do tumor, têm sido propostos. A aplicação destes conhecimentos na progressão do câncer epidermóide de esôfago poderia permitir melhor adequação da terapêutica no intuito de melhorar a sobrevida.

A correlação do marcador CD34 com a angiogênese, eventos indispensáveis na progressão do câncer, já estão estabelecidas. Este poderia então ser utilizado como marcador bioquímico, e a análise de sua correlação com o comportamento tumoral utilizada como fator prognóstico.

O comportamento biológico dos CEE é variável, havendo tumores em um mesmo estágio com evolução discrepante. Takedo et al.¹⁵ reportam, em estudo realizado com 71 pacientes, longa sobrevida mesmo encontrando-se no estágio III ou IV da classificação TNM. Com o uso de marcadores tumorais analisados por imunistoquímica, o prognóstico foi mais acurado e o comportamento biológico do tumor pôde ser analisado de forma individualizada.

Com o propósito de melhor avaliar e padronizar a expressão dos marcadores foi utilizada a citometria de imagem pelo método SAMBA 4000, que traz a possibilidade de mensurar tanto a expressão do marcador pelo índice de marcagem (IM), quanto pela densidade óptica (DO) que avalia a concentração ou a intensidade de expressão. Além disto, importante contribuição deste método está na não dependência da subjetividade do observador. A expressão é quantificada com o uso de um software e não mais graduada pelos olhos do patologista, de forma subjetiva.

Analisando-se a expressão do marcador de forma independente, ele apresentou expressão positiva para todas as lâminas analisadas, refletindo a presença de angiogênese dos tumores epidermóides de esôfago.

Muitos autores afirmam ser o comprometimento linfonodal o principal fator prognóstico para o CEE. Em estudo realizado por Tajima et al.¹⁴, em série de 240 pacientes, 54 apresentavam linfonodos negativos. O índice de sobrevida em 5 anos destes pacientes foi

de 100%, após ressecção mucosa endoscópica. Stein et al.¹³ relataram grande queda no índice de sobrevida de pacientes com CEE precoce quando eles apresentavam linfonodos acometidos, não recomendando técnicas de ressecções limitadas ou linfadenectomia individualizada para o CEE, o que não foi válido para o adenocarcinoma. Entretanto, sabe-se que a esofagectomia tem alto índice de morbi-mortalidade. Assim, adequado estadiamento e avaliação mais acurada de metástases linfonodais seria fundamental para escolha do tratamento apropriado. Exames de imagem, como a tomografia computadorizada e a ultrasonografia endoscópica, dependem do tamanho anatômico do linfonodo como previsor de malignidade, mas não podem diferenciar entre hiperplasia linfonodal e doença metastática. O exame histológico do linfonodo é freqüentemente a avaliação padrão. A correlação de marcadores tumorais com a presença de doença linfonodal tem sido estudada na tentativa de reduzir a margem de erro.

Existem ainda controvérsias acerca do marcador CD34 e sua correlação prognóstica com a presença de metástases linfonodais. Neste estudo não foi encontrada correlação corroborando com pesquisas feitas por Okuno et al.¹¹. Já em estudos realizados por Tanigawa et al¹⁶ para o CD34, eles foram significativamente correlacionados com a

presença de linfonodos positivos.

Em relação à profundidade do tumor (estadiamento T) e estágio comparando-se os grupos de pacientes encontrados nos estádios II e III também não foram encontradas diferenças significativas. Como parte do estadiamento TNM, o grau de profundidade do tumor também é considerado forte fator prognóstico.

A localização do tumor também não apresentou significância tanto na variável densidade óptica quanto no índice de marcação para o CD34.

Apesar de ser a angiogênese evento linear e proporcional, o que foi evidente neste estudo, é que não foram encontradas correlações clínico-histopatológicas estatisticamente significantes com o uso do marcador CD34, o que seria de se esperar tendo em vista os resultados encontrados com outros marcadores na literatura³.

CONCLUSÃO

O marcador CD34 apresenta expressão no CEE, com maior valor no índice de marcação em relação à densidade óptica e não apresenta correlação com as características clínico-histopatológicas estudadas.

Lima OAT, Ribas-Filho JM, Czczeko NG, Malafaia O, Aoki SMS, Dietz UA, Araújo URMF, Ribas FM. Cytophotometric expression of CD34 in squamous cell carcinoma of the esophagus. ABCD Arq Bras Cir Dig 2007;20(4):254-60

ABSTRACT – Background – Esophagus carcinoma is rated among the six more common malignant neoplasias in the world. Due to its aggressive clinical presentation, squamous cell carcinoma of the esophagus is well known to have one of the poorest prognoses, exhibiting high morbid-mortality rates. Molecular biology markers have been pointed out as great predictors in tumors diagnoses and staging. Angiogenesis, an essential event for tumor progression, can be studied using CD34 marker. **Aim** – To determine, by computerized image cytophotometric study, using SAMBA 4000, the expression of CD34 in squamous cell carcinoma of the esophagus and correlate the results with the clinical-pathological data (age, gender, differentiation tumor graduation, staging, size, tumor localization, depth, and lymph node metastases). **Methods** – Twenty-nine recovery of sampled-tissue squamous cell carcinoma of the esophagus were evaluated using immunohistochemistry staining with anti-CD34 marker. Analysis of tumor expression marker was submitted to SAMBA reading using the following parameters: labeling index and optical density. Correlations among samples and statistical analysis were possible using SPSS program. **Results** – The average labeling index for CD34 was 73,40% + 15,20 and as for optical density was 56,10 + 23,54 pixels. CD34 does not show significant statistical correlation with clinical-pathological features considered (age, gender, differentiation tumor graduation, staging, size, tumor localization, depth, and lymph node metastases). **Conclusion** – CD34 marker demonstrates expression in squamous cell carcinoma of the esophagus, presenting a greater labeling index value than optical density. The respective tumor marker does not show correlation with the clinical-pathological features considered in the study.

HEADINGS – CD34. Cytophotometry. SAMBA. Carcinoma, squamous cell

REFERÊNCIAS

- Banerjee AG, Liu J, Yuan Y. Expression of biomarkers modulating prostate cancer angiogenesis: Diferencial expression of annexin II in prostate carcinomas from Índia and USA. *Mol. Cancer.*, v. 8, n 2, p 34, 2003
- Brugal G, Garbay C, Giroud G, Adhel D. A double scanning microphotometric for image analysis: hardware, software and biomedical applications. *J Histochem Cytochem*, v. 27, p. 144-152, 1979.
- Cuenca R. Estudo citofotométrico comparativo do ADN entre o carcinoma gástrico da pequena e grande curvaturas do estômago. Tese (Doutorado)/Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2000
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. v.86, n.3, p.353-64, 1996
- Huang JX, Song ZX, Qian RY, Xu GW. Expression of cell cycle-regulatory proteins in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Ai Zheng*. v.22, n.3, p.277-81, 2003
- 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*. v.11, n.19, p 2956-59, 2005
- Instituto Nacional de Câncer – Ministério da Saúde. Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2005
- Koide N, Nishio, Kono T, Yazawa K, Igarashi J, Watanabe H, Nimura Y, Hanazaki K, Adachi, Amano J. Histochemical study of vascular endothelial growth factor in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hepatogastroenterology* v.46, n.26, p.952-8, 1999
- Lehbach DM, Nita ME, Ceconello I, Carvalho MFP, Ab'Saber AM, Alves AF, Gama-Rodrigues J. Molecular Aspects of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Carcinogenesis. *Arq Gastroenterol* v. 40 n.4, p. 256-261, 2003
- Nakajima Y, Nagai K, Miyake S, Ohashi K, Kawano T, Iwai T. Evaluation of

- an indicator for lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma invading the submucosal layer. *Jpn J. Cancer Res.* v.93 n.3 p.305-12, 2002
11. Okuno Y, Nishimura Y, Kashu I, Ono K, Hiraoka M. Prognostic values of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 for radiotherapy of oesophageal squamous cell carcinomas. *Br J Cancer* v. 80, n.3-4 .p.387-95, 1999
 12. Roh MS, Lee JI, Choi PJ. Tumor budding as a useful prognostic marker in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus.* v.17 n.4 p.333-7, 2004
 13. Stein HJ, Feith M, Bruecher BL, Naehrig J, Sarbia M, Siewert J. R. Early esophageal cancer: pattern of lymphatic spread and prognostic factors for long-term survival after surgical resection. *Ann Surg.* v. 242 n.4 p.566-73, 2005
 14. Tajima Y, Nakanish IY, Ochiai A, Tachimori Y, Kato H, Watanabe H, Yamaguchi H, Yoshimura K, Kusano M, Shimoda T. Histopathologic findings predicting lymph node metastasis and prognosis of patients with superficial esophageal carcinoma: analysis of 240 surgically resected tumors. *Cancer* v.88, n.6. p.1285-93, 2000
 15. Takeno S, Noguchi T, Takahashi Y, Fumoto S, Shibata T, Kawahara K. Assessment of Clinical Outcome in Patients With Esophageal Squamous Cell Carcinoma Using TNM Classification Score and Molecular Biological Classification. *Ann Surg Oncol.* v.14 p. 1431-8, 2007
 16. Tanigawa N, Matsumura M, Amaya H, Kitaoka A, Lu C, Muraoka R, Tanaka T. Tumor vascularity correlates with the prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* v.79 n.2 p.220-5. 1997.

Conflito de interesse: não há

Fonte financiadora: não há

Recebido para publicação em: 30/06/2007

Aceito para publicação em: 27/09/2007