

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA pRb NA MUCOSA ESOFÁGICA  
DE INDIVÍDUOS SOB RISCO PARA CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO**

**SIMONE SANTANA CONTU**

**ORIENTADOR: PROF. LUIS FERNANDO MOREIRA**

**CO-ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO CARLOS PROLLA**

**Porto Alegre**

**2001**

**C765e** Contu, Simone Santana

Expressão imunohistoquímica da proteína pRb na mucosa esofágica de indivíduos sob risco para carcinoma epidermóide de esôfago / Simone Santana Contu ; orient. Luis Fernando Moreira ; co-orient. João Carlos Prolla. – 2003.  
82 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina : Cirurgia, Porto Alegre, BR-RS, 2001.

1. Neoplasias esofágicas 2. Carcinoma de células escamosas 3. Imunohistoquímica 4. Proteína Rb I. Moreira, Luis Fernando II. Prolla, João Carlos III. Título.

NLM: WI 250

Classificação Biblioteca FAMED/HCPA

**Este trabalho segue as normas preconizadas pelo sistema Vancouver.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA pRb NA MUCOSA ESOFÁGICA  
DE INDIVÍDUOS SOB RISCO PARA CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO**

**SIMONE SANTANA CONTU**

**ORIENTADOR: PROF. LUIS FERNANDO MOREIRA**

**CO-ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO CARLOS PROLLA**

**Porto Alegre**

**2001**

**“Não conheço nenhum caminho  
seguro para o sucesso, só um para  
o insucesso: agradar a todos.”**

**Platão**

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Luis Fernando Moreira**, do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), por sua orientação na realização deste trabalho, por acreditar na validade deste experimento, pela sua seriedade e amizade.

Ao **Prof. João Carlos Prolla**, da UFRGS, Departamento de Citologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), por ter me dado a grande honra de sua co-orientação nesta dissertação, pelo estímulo, por suas valiosas sugestões e postura inspiradora de pensador e cientista.

Ao **Prof. Carlos Thadeu Cerski**, patologista do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFRGS e do Serviço de Patologia do HCPA, pelas inúmeras horas de trabalho e pelo seu incansável auxílio na análise imunohistoquímica das lâminas, microfotografias e presteza no acompanhamento deste trabalho.

Aos **Drs. Cláudio Rollim Teixeira, Júlio Pereira Lima, Gerso A. Martinelli, Ítalo de Mamman Jr. e Marcelo O. Menezes** pelas sugestões e auxílio valioso na obtenção das amostras para o grupo controle.

À **Sra. Estela Maris Araripe**, secretária do Programa de Pós-Graduação, sempre atenciosa e solícita.

Aos **coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia**, por possibilitarem a realização de projeto.

Ao **próprio Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia**, pelo financiamento parcial deste trabalho.

### III

Ao **Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA**, pelas orientações e sugestões.

À **Srta. Vânia**, do Grupo GPPG, pela orientação na análise estatística dos dados.

Aos **funcionários do Serviço de Anatomia Patológica HCPA**, em especial à técnica **Flávia**, pela preparação das lâminas.

Às instituições **FAPERGS e CNPq**, pelo financiamento parcial deste projeto.

A todas aquelas pessoas e instituições que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

Aos meus **pais e irmãos**, pelo apoio e compreensão na execução desta obra.

À **minha querida filha, Ana Paula**, pelo seu carinho e inocência que me fez acreditar que a vida é um eterno sonho. Que este trabalho a motive, num futuro próximo, a acreditar na ciência e como a pesquisa traz avanços no mundo.

Ao meu esposo **Paulo Contu**, pelo seu incansável apoio, compreensão, estímulo, crítica e pelo seu entusiasmo contagiante pela pesquisa.

#### IV

#### RESUMO

O câncer de esôfago é a sexta neoplasia maligna mais comum no mundo. No Rio Grande do Sul, Brasil, o carcinoma epidermóide de esôfago apresenta coeficientes de mortalidade elevados e com tendência ascendente com, pelo menos, o dobro dos coeficientes padronizados de mortalidade encontrados em outros estados brasileiros ou em países do cone sul da América latina. O diagnóstico tardio parece ser o principal responsável pelo mau prognóstico. Nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado a possibilidade de identificação das lesões precursoras do câncer esofágico, mas sem repercussão no prognóstico, até o momento. Considera-se, atualmente, que a carcinogênese esofágica está relacionada a uma interação entre fatores ambientais e anormalidades genéticas. Recentemente, estudos em biologia molecular têm demonstrado a influência dos fatores reguladores do ciclo celular no prognóstico de diversas moléstias, inclusive o câncer. O Rb é um gene supressor tumoral envolvido no mecanismo de controle do ciclo celular, cuja expressão tem sido demonstrada no câncer do esôfago. O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência da perda da expressão da proteína pRb na mucosa esofágica de indivíduos sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago, bem como relacionar esta expressão com o consumo de tabaco, álcool e chimarrão, achados histopatológicos e cromosopia com lugol. Foram estudados 170 casos e 20 controles através de reação imunohistoquímica utilizando anticorpo monoclonal anti-pRb em amostras teciduais fixadas em formalina e armazenadas em parafina. Um total de 33 casos demonstrou perda da expressão imunohistoquímica da proteína pRb, determinando uma prevalência de 19,4% na amostra estudada. Não houve associação estatisticamente significativa entre a perda da expressão da proteína pRb e as variáveis idade, raça, exposição ao fumo, álcool e chimarrão, bem como a cromoendoscopia com lugol. Foi demonstrada uma associação significativa entre a perda da expressão da pRb com a história de câncer na família. Da mesma forma, foi demonstrada uma associação linear significativa entre a perda da pRb e o grau histopatológico das lesões. Estes resultados demonstraram uma influência da proteína pRb na evolução da carcinogênese esofágica e permitem sugerir que os indivíduos expostos aos fatores de risco estudados sejam candidatos a uma maior vigilância.

## V

### ABSTRACT

Esophageal cancer is the sixth most frequent malignancy in the world. In Rio Grande do Sul, Brazil, esophageal squamous cell carcinoma is the second most frequent cancer in male with increased and ascending mortality rates, which is the double of mortality rates among other Brazilian states or southern Latin American countries. The late diagnosis seems to be the main reason for the poor prognosis. Recently, several studies have demonstrated the possibility to identify precursor lesions, but without improving prognosis. The esophageal carcinogenesis is related with the interaction between environmental factors and genetic changes, and previous studies in molecular biology have demonstrated the influence of cell cycle regulators in prognosis of many diseases, including cancer. Rb is a tumor suppressor gene involved in the cell cycle control, which expression has been demonstrated in esophageal cancer. The aim of this study was to evaluate the prevalence of Rb protein (pRb) loss in esophageal mucosa of subjects at risk for esophageal squamous cell carcinoma. And secondarily, to determine its association with tobacco, alcohol and “maté” consumption, histopathology and lugol chromoscopy. Immunohistochemistry was performed using a monoclonal antibody anti-pRb on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples from 170 patients and 20 controls. A total of 33 cases demonstrated loss of pRb with a prevalence of 19,4%. We could not demonstrate any association between pRb loss and age, race, tobacco, alcohol and “maté” consumption and lugol chromoscopy. It was demonstrated a significant association between pRb loss and family history of cancer as well as with and histopathology grade. These results suggest the need of closer surveillance of subjects to the risk factors identified.

## VI SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>III</b>
<b>RESUMO</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VI</b>
<b>SUMÁRIO</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>IX</b>
<b>ABREVIACÕES</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE ANEXOS</b>	<b>XI</b>
<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b>	<b>01</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>02</b>
<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>03</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>29</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>34</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
<b>CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>55</b>

**VII**

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 01 – Mortalidade por câncer do esôfago no cone sul da América latina</b>	<b>04</b>
--	-----------

<b>TABELA 02 - Genes supressores tumorais implicados no desenvolvimento do câncer</b>	<b>21</b>
<b>TABELA 03 - Características dos pacientes quanto ao consumo de álcool</b>	<b>34</b>
<b>TABELA 04 - Características dos pacientes quanto ao consumo de fumo</b>	<b>35</b>
<b>TABELA 05 – Características dos pacientes quanto ao consumo de chimarrão</b>	<b>35</b>
<b>TABELA 06 - Relação das áreas não coradas pelo Lugol com os diagnósticos histológicos</b>	<b>36</b>
<b>TABELA 07 - Relação da expressão imunohistoquímica da proteína pRb com idade, raça e história de câncer na família</b>	<b>42</b>
<b>TABELA 08 - Relação da cromoscopia com a expressão de pRb</b>	<b>46</b>
<b>TABELA 09 - Regressão logística com cálculo da razão de chances para a expressão imunohistoquímica da proteína pRb</b>	<b>46</b>
<b>TABELA 10 - Características do grupo controle</b>	<b>47</b>
<b>TABELA 11 - Comparação entre os grupos de casos e controles</b>	<b>47</b>

## VIII

### LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 01 – Cromoscopia com lugol</b>	<b>17</b>
<b>FIGURA 02 – Ciclo celular</b>	<b>19</b>

<b>FIGURA 03 – pRb e cdk</b>	<b>25</b>
<b>FIGURA 04 – pRb e oncoproteínas virais</b>	<b>26</b>
<b>FIGURA 05 – Distribuição da amostra quanto a expressão imunohistoquímica da proteína pRb</b>	<b>36</b>
<b>FIGURA 06 – Esôfago normal pRb negativo</b>	<b>37</b>
<b>FIGURA 07 – Esofagite crônica leve pRb positivo</b>	<b>38</b>
<b>FIGURA 08 – Esofagite crônica leve pRb positivo</b>	<b>39</b>
<b>FIGURA 09 – Displasia de baixo grau do esôfago pRb positivo</b>	<b>40</b>
<b>FIGURA 10 – Carcinoma epidermóide invasivo do esôfago pRb negativo</b>	<b>41</b>
<b>FIGURA 11 – Relação da expressão de pRb com tempo de consumo de álcool</b>	<b>43</b>
<b>FIGURA 12 – Relação da expressão de pRb com o volume médio estimado de álcool consumido por dia</b>	<b>43</b>
<b>FIGURA 13 – Relação da expressão de pRb com o tempo de tabagismo</b>	<b>43</b>
<b>FIGURA 14 – Relação da expressão de pRb com a quantidade de cigarros consumida por dia</b>	<b>44</b>
<b>FIGURA 15 – Relação da expressão de pRb com o tempo de consumo de chimarrão</b>	<b>44</b>
<b>FIGURA 16 – Relação da expressão de pRb com a temperatura estimada do chimarrão</b>	<b>44</b>
<b>FIGURA 17 – Relação da expressão de pRb com histologia</b>	<b>45</b>

## ABREVIACES

ABC – avidin-biotin-peroxidase complex (complexo avidina-biotina peroxidase)	Kb – kilobase
°C – graus Celsius	Lab – laboratory (laboratório)
cdk - complexos quinase ciclino-dependentes	µm – micrmetro
CEE – carcinoma epidermóide do esôfago	min – minutos
cm – centímetro	ml – mililitros
CMV – Cytomegalovirus	mm – milímetros
DAB - tetrahydrocloro de diaminobenzedina	NMBA - N-nitrosometilbenzilamina
DNA – cido desoxirribonucléico	pRb – proteína retinoblastoma
dp – desvio padrão	Rb – gene retinoblastoma
EBV – Epstein-Barr Virus	RNA – cido ribonucléico
EUA – Estados Unidos da América	RS – Rio Grande do Sul
HPV – Human Papiloma Virus	seg – segundos
hs – horas	SST – solução salina tamponada
HSV – Herpes Simplex Virus	TGF – tumour growth factor (fator de crescimento tumoral)
INF – insulin-dependent necrosis factor (fator de necrose insulino dependente)	TNF – tumour necrosis factor (fator de necrose tumoral)
IL – interleucina	

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1. Consentimento informado</b>	<b>65</b>
<b>Anexo 2. Questionário aplicado aos pacientes</b>	<b>66</b>
<b>Anexo 3. Consentimento informado do grupo controle</b>	<b>68</b>

## INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas dirigido por mutações em diversos genes, cada um oferecendo uma vantagem seletiva à célula alterada. Estas vantagens foram, até o momento, mais evidentemente demonstradas em câncer colorretal<sup>1</sup>. Todavia, o estudo do câncer esofágico, que também tem relações etiológicas com o meio ambiente, pode proporcionar informações úteis sobre as bases moleculares de seu desenvolvimento. O estabelecimento de uma correlação entre dano genético e prognóstico tem sido objeto de extensas investigações nos últimos anos, assim como os mecanismos de controle do ciclo celular. Índices anormais de proliferação celular, modificações relacionadas à morte celular e a expressão de determinados genes têm sido constatadas em várias neoplasias humanas, incluindo-se o câncer do esôfago<sup>2</sup>.

No processo seqüencial da carcinogênese esofágica, lesões escamosas displásicas de baixo e alto grau são consideradas etapas pré-malignas do carcinoma epidermóide do esôfago<sup>3</sup> (CEE). Diferentes alterações genômicas têm sido reconhecidas no epitélio esofágico, mais frequentemente em oncogenes e genes supressores tumorais. Estas mutações podem servir como marcadores tumorais específicos para cada estágio do desenvolvimento de um tumor, uma vez que são transferidas inalteradamente a cada célula da linhagem tumoral, identificando a origem<sup>4</sup>.

A análise molecular do tecido esofágico tem um papel fundamental na identificação de células displásicas, uma vez que pode detectar malignidade antes das mudanças fenotípicas observadas por métodos convencionais. Demonstra, basicamente, mutações nos genes envolvidos no controle do ciclo celular. Estes marcadores oncogênicos são, principalmente, os oncogenes e genes supressores tumorais, como o c-myc, bcl-2, p53 e Rb, os quais parecem estar implicados no processo carcinogênico esofágico<sup>5</sup>.

O gene Rb pertence à família dos genes supressores tumorais e está localizado no cromossomo 13q14<sup>6</sup>. Seu produto, a proteína pRb, é uma fosfoproteína que se liga ao DNA e parece atuar na regulação da transcrição. Quando há perda de ambos os alelos, este gene ou sua proteína torna-se inativo, permitindo alterações malignas<sup>7</sup>. A inativação do Rb tem sido encontrada em vários tumores, como o retinoblastoma, osteossarcoma, câncer de pulmão, bexiga, mama e esôfago<sup>8</sup>.

O rastreamento das doenças é dependente do binômio da sensibilidade do teste utilizado e prevalência da doença alvo. Como os métodos moleculares são muito sensíveis para processos celulares específicos, a sensibilidade resultante do método depende basicamente da prevalência de cada alteração

molecular específica. A frequência destas alterações pode variar de acordo com o tipo de câncer, fatores de risco envolvidos na carcinogênese e nas características da população.

A compreensão e triagem dos eventos moleculares necessários para a carcinogênese podem ter, em curto prazo, três aplicações clínicas: diagnóstico precoce, marcadores de prognósticos mais acurados e melhor tratamento. Existe um grande esforço na procura de um marcador que nos permita melhorar a caracterização de grupos de risco, o diagnóstico precoce e o seguimento das lesões precursoras do carcinoma esofágico. Sob este aspecto existem poucos estudos e estes precisam ser corroborados. Assim, a incorporação de técnicas para a detecção de alterações com potencial contribuição para a carcinogênese torna-se cada vez mais relevante. A identificação de alterações moleculares no contexto de fatores ambientais predisponentes irá aumentar o entendimento sobre a progressão maligna do CEE e, no futuro, aprimorar o manejo dos pacientes considerados de alto risco para o desenvolvimento desta neoplasia.

Este estudo visa, justamente, proporcionar a obtenção de dados para melhor compreensão da carcinogênese esofágica, bem como fornecer dados que permitam o estabelecimento de critérios que possibilitem uma adequada vigilância dos pacientes sob risco para esta neoplasia.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Determinar a prevalência da perda da expressão imunohistoquímica da proteína pRb na mucosa esofágica de pacientes sob risco para carcinoma epidermóide do esôfago.

### **Objetivos específicos**

- Relacionar a perda da expressão imunohistoquímica da proteína pRb com as alterações histológicas;
- Relacionar a perda da expressão imunohistoquímica da proteína pRb com o tabagismo, consumo de álcool e chimarrão nos indivíduos estudados;
- Relacionar a perda da expressão imunohistoquímica da proteína pRb com as áreas não coradas pelo lugol.

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### O Câncer de Esôfago

O câncer de esôfago é o sexto tumor mais comum no mundo e o quarto nos países em desenvolvimento da Ásia, África e América Latina<sup>9</sup>. Apresenta, como características, uma grande diversidade na distribuição geográfica e incidência, além de alta mortalidade. As razões para tais variações não são absolutamente conhecidas, embora estudos epidemiológicos sugiram influência de fatores ambientais e nutricionais<sup>10,11</sup>. As regiões de alta incidência são geralmente localizadas em áreas pobres do mundo, onde os habitantes apresentam características dietéticas peculiares, como a dieta com alto teor de amido e baixo em frutas e vegetais, mastigação insuficiente e consumo de comidas e bebidas com temperatura elevada. No mundo ocidental, a incidência de CEE varia conforme a raça e grupo sócio-econômico. Nos Estados Unidos (EUA), os negros têm um risco relativo quatro vezes maior do que os brancos<sup>11,12</sup>.

A incidência comumente notificada nos países ocidentais de 3 casos por 100.000 habitantes por ano contrasta com os 140 casos por 100.000 habitantes na Ásia Central, numa região conhecida como o cinturão do câncer esofágico, que se estende desde a Turquia oriental, leste do mar Cáspio, norte do Irã, Rússia, Turcomenistão, Usbequistão e Tadjiquistão, até o norte da China e Índia<sup>13</sup>. Existem vários casos relatados também em certas partes da África e Japão. As maiores incidências registradas, na atualidade, são relatadas em determinadas regiões da China e do Irã<sup>14-16</sup>. No norte da China algumas províncias relatam 120 a 175 casos por 100.000 habitantes, o que representa 50% de todos os carcinomas gastrintestinais daquela região<sup>15</sup>. Na África do Sul, Bombaim (Índia), norte da França, nordeste da Itália e bolsões na porção meridional da América do Sul encontram-se áreas de alta e média incidência<sup>17,18</sup>.

Nos EUA e na Europa ocidental, com exceção da França e nordeste da Itália, a incidência do carcinoma esofágico é relativamente baixa<sup>17</sup>. No Brasil, segundo as estatísticas do Ministério da Saúde, o câncer de esôfago é a sétima neoplasia no sexo masculino, com maior prevalência entre a quinta e sétima décadas. No Rio Grande do Sul (RS), as neoplasias ocupam o segundo lugar na distribuição das causas de mortalidade logo após as doenças cardiovasculares e, dentre elas, o CEE é a quarta mais freqüente em homens e a sexta em mulheres. O RS apresenta elevados coeficientes de mortalidade e com tendência ascendente, tanto no sexo masculino como no feminino, com, pelo menos, o dobro dos coeficientes

padronizados de mortalidade encontrados, por exemplo, no estado de São Paulo ou nas cidades de Fortaleza ou Recife<sup>19,20</sup>. Segundo dados da Secretaria de Saúde e Meio Ambiente do RS, o coeficiente de mortalidade no estado em 1970 foi de 8,5/100.000 para o sexo masculino e 2,3/100.000 para o sexo feminino<sup>20</sup>. Em 2001 estes coeficientes passaram para 12,8 e 3,9 para o sexo masculino e feminino, respectivamente<sup>19</sup>. Estes coeficientes são os mais altos, quando comparados com outros estados brasileiros e com países do cone sul da América Latina<sup>18</sup> (Tabela 1).

O aumento da incidência desse tumor é preocupante. Curiosamente, observa-se uma distribuição geográfica altamente concentrada em certas microrregiões do RS, como, por exemplo, na zona rural, principalmente para o sexo masculino. Essas concentrações elevadas, embora em pequena escala, são semelhantes às encontradas em outros países com alta incidência para o CEE<sup>18</sup>.

**Tabela 1. Mortalidade por Câncer do Esôfago no Cone Sul da América Latina\***

PAÍS	SEXO			
	MASCULINO		FEMININO	
	1977	1987	1977	1987
<b>BRASIL (RS)</b>	15,59	17,27	4,33	4,99
<b>URUGUAI</b>	14,80	12,12	4,00	4,01
<b>ARGENTINA</b>	10,28	8,97	2,99	2,27
<b>CHILE</b>	8,48	8,18	4,39	3,70
<b>PARAGUAI</b>	4,36	5,88	1,51	1,03

\* Modificado de Prolla, 1993<sup>18</sup>.

O tipo histológico mais comum é o carcinoma de células escamosas, correspondendo a 80% a 90%. Cerca de 5% a 10% são de adenocarcinomas e uma porcentagem igual de carcinomas indiferenciados. Os sarcomas e o melanocarcinoma são tão raros a ponto de constituírem curiosidades clínicas.

Os dois tipos mais importantes de câncer do esôfago, o carcinoma epidermóide e o adenocarcinoma, apresentam diferenças epidemiológicas extremamente acentuadas. Uma característica epidemiológica do CEE é apresentar zonas de alto índice de mortalidade próximas geograficamente de

outras de baixo índice, fato que também foi observado no RS, notando-se coeficientes de mortalidade quatro vezes superior de uma microrregião para outra<sup>18,21</sup>. As razões para essas variações regionais são pouco compreendidas. Contudo, parece claro que nenhum fator etiológico isoladamente possa ser responsável por tal variação em áreas geográficas distintas.

Nas últimas décadas, tem ocorrido uma mudança notável na incidência e tipo histológico do câncer do esôfago entre os indivíduos brancos. O adenocarcinoma de esôfago e cárdia, incluindo a junção esofagogástrica, tem aumentado rapidamente, especialmente em homens brancos<sup>10,22</sup>. Atualmente, o adenocarcinoma do esôfago representa quase 50% de todos os casos de câncer esofágico nos EUA. A causa para esse aumento é desconhecida, mas tendência similar tem sido observada na Europa<sup>23</sup>. Existe uma forte associação entre doença do refluxo esofágico e adenocarcinoma. Lagergren et al<sup>24</sup> demonstraram que a frequência, severidade, e duração dos sintomas de refluxo estão positivamente associadas com risco aumentado para o desenvolvimento do esôfago de Barrett e progressão para o adenocarcinoma esofágico. Todavia, no sul do Brasil, um estudo demonstrou taxas de prevalência de 15% para o adenocarcinoma e 81% para CEE<sup>25</sup>.

O CEE é pelo menos três vezes mais comum em homens do que mulheres e apresenta pico de prevalência entre a quinta e sexta décadas enquanto que o adenocarcinoma é aproximadamente sete vezes mais comum em homens<sup>26</sup>. A causa de maior risco em homens é incerta, mas, provavelmente, reflete diferenças dietéticas, consumo de álcool e tabaco. No cinturão asiático, verifica-se uma tendência à igualdade na distribuição entre os gêneros<sup>27</sup>.

Devido à sua evolução assintomática, o CEE costuma ser diagnosticado e tratado tardiamente. Quando os indivíduos tornam-se sintomáticos e procuram os serviços de saúde por queixas como disfagia progressiva, emagrecimento acentuado ou outras menos freqüentes a lesão tumoral já se encontra em fase avançada, comprometendo o plano de tratamento com intenção curativa. Apesar dos avanços que têm ocorrido em técnicas cirúrgicas, quimioterapia, radioterapia e medidas paliativas, como terapia fotodinâmica, ablação por laser e próteses endoscópicas, não foram observadas melhorias significativas no prognóstico desta doença, particularmente em estágios avançados<sup>10,28</sup>. As tentativas de melhorar a sobrevida destes pacientes têm sido prejudicadas pela falta de opções terapêuticas efetivas nos estágios tardios da doença e principalmente pela dificuldade em identificar com precisão pacientes em estágios precoces. Por esta razão, os benefícios do diagnóstico precoce têm sido enfatizados, uma vez que a sobrevida está intimamente ligada ao grau de invasão tumoral.

A detecção precoce do câncer do esôfago num estágio onde a ressecção curativa seja possível pode resultar em melhor prognóstico. A experiência e os resultados obtidos na China, que detém as maiores taxas de incidência para essa neoplasia no mundo, sugerem que a detecção precoce através do rastreamento de populações assintomáticas sob risco para o CEE possa diminuir as taxas de mortalidade. O diagnóstico precoce tem levado a um tratamento também precoce dos pacientes que portam células neoplásicas<sup>29,30</sup>. As taxas de sobrevida relatadas em estudos realizados em rastreamentos populacionais em massa na China utilizando o balão citológico chinês e tratamento cirúrgico atingiram entre 44% e 90% dos indivíduos ao final de cinco anos<sup>15,31-33</sup>. Esta hipótese é sustentada nas observações realizadas por Li e Yao<sup>34</sup>, que mostram em suas revisões da literatura chinesa, melhora significativa da sobrevida quando o câncer do esôfago é ressecado em estágio precoce. Dados semelhantes são reportados pela Universidade Clínica de Hebei<sup>35</sup>. Em ambos trabalhos o carcinoma *in situ* está associado a uma sobrevida em cinco anos de 95% a 100%. A identificação precoce exige que se identifiquem os fatores de risco numa determinada população e os indivíduos ou grupos a eles expostos. Nesses indivíduos então, poder-se-ia proceder a um processo de detecção do carcinoma precocemente ou das suas lesões precursoras.

## **Etiologia**

A grande variação na incidência geográfica sugere que fatores ambientais e, possivelmente, alterações genéticas, contribuem para o surgimento do CEE. Todavia, os fatores de risco identificados em algumas regiões de altas taxas de incidência estão ausentes em outras<sup>21,36</sup>.

A carcinogênese esofágica consiste em um processo complexo de múltiplas etapas e de etiologia multifatorial. Alguns elementos são necessários na iniciação do processo neoplásico enquanto outros parecem atuar na progressão do tumor. Alguns autores sugerem que o câncer de esôfago provém da associação de três fatores carcinogênicos: fatores predisponentes, como deficiências vitamínicas e esofagites, fatores mutagênicos, como os compostos nitrosos, tabaco e bebidas alcoólicas, e fatores promotores, como os ésteres presentes em algumas bebidas alcoólicas<sup>37-38</sup>.

### **Álcool e Fumo**

O papel do fumo e do álcool como fatores de risco para o câncer de esôfago está bem estabelecido. Quando se comparam fumantes com não fumantes, um risco mais elevado tem sido

consistentemente demonstrado entre os tabagistas. Da mesma forma, alcoolistas apresentam maior risco quando comparados com abstêmios<sup>39</sup>. Nos países industrializados, o consumo de tabaco e álcool é considerado o principal fator para o desenvolvimento do CEE. Estima-se que mais do que 80% dos casos são atribuídos à exposição a estes fatores ambientais<sup>39</sup>. Em adição aos seus efeitos como fatores de riscos independentes, álcool e tabaco exercem uma ação sinérgica que potencializa cada fator<sup>40</sup>. No RS, tabagistas e etilistas demonstraram um risco 75 vezes maior para o desenvolvimento de CEE quando comparados com a população geral<sup>41</sup>. O consumo excessivo e freqüente de álcool, por exemplo, é reconhecido em 8,5% a 31,7 % dos homens e em 0% a 18% das mulheres que procuram o serviço de saúde e estimado como presente em 13% da população adulta em Porto Alegre<sup>42,43</sup>. O percentual de fumantes no Brasil é considerado alto, quando comparado com outros países da América Latina. Fuma-se mais na região Sul (42% dos habitantes da região), sendo Porto Alegre a cidade detentora dos maiores índices conhecidos de câncer de pulmão no país. Embora se fume menos na região Nordeste (31% da população), este percentual é ainda considerado muito alto<sup>44</sup>. Quando o álcool e o tabaco são consumidos, pode haver uma relação entre dose e duração da exposição. Um consumo de longa duração de cigarros (>35 anos) tem um risco seis vezes maior de desenvolver um CEE e o consumo de mais de 25 cigarros ou assemelhados por dia representa um risco sete vezes maior na população geral para o desenvolvimento do CEE. Em relação ao álcool, o risco é de seis vezes maior para os consumidores de 35 a 55 drinques e 24,5 para aqueles que consomem 84 ou mais drinques por semana. O uso combinado de álcool e fumo atinge um risco de 23 a 130 vezes maior para o surgimento do CEE e adenocarcinoma de cárdia<sup>45,46</sup>. A presença de lesões como esofagite, atrofia e displasia, parece estar significativamente associada ao álcool e ao fumo<sup>46</sup>.

O mecanismo exato responsável pelo aumento do risco de câncer de esôfago em etilistas é desconhecido<sup>27</sup>. Entretanto, foi postulado que o álcool facilita o desenvolvimento da esofagite, pode interagir com má nutrição e faz aumentar a exposição aos agentes carcinogênicos, talvez por mediar os níveis do citocromo p450 na mucosa esofágica<sup>47</sup>. A presença de alta atividade da enzima álcool desidrogenase, bem como de uma baixa atividade da aldeído desidrogenase na mucosa esofágica humana, sugere que possa haver acúmulo intracelular local de acetaldeído durante a ingestão alcoólica, o que pode estar relacionado à patogênese das alterações esofágicas induzidas pelo álcool<sup>48</sup>. Entretanto, chama a atenção o fato que nas áreas com alta incidência de câncer de esôfago, como no Irã e na China, o consumo de álcool e tabaco não foi considerado significativo<sup>49</sup>.

## Esofagite

A esofagite está presente em até 80% de algumas populações de alto risco para câncer do esôfago<sup>21</sup>. Wahrendorf et al<sup>50</sup> demonstraram sinais histopatológicos de esofagite crônica leve ou moderada em 45,5% dos homens e 35,9% das mulheres estudadas. Estas alterações apresentaram uma associação significativa com a ingestão de bebidas muito quentes, história familiar de CEE, consumo raro de frutas frescas e consumo eventual de cereais dietéticos, e afetava o esôfago médio e inferior, sem sinais sugestivos de refluxo gastro-esofágico, como erosões ou ulcerações. A ingesta de infusões de ervas ou chás, tal como o chimarrão dos gaúchos no Brasil, no Uruguai e na Argentina, tem sido identificada como fator de risco bem definido. Estima-se o consumo de chimarrão em mais de 80% das populações do RS e Uruguai<sup>51</sup>. Vários estudos de caso-controle demonstraram uma forte associação entre o uso dessas infusões, a irritação térmica, a presença de esofagite crônica e o desenvolvimento do CEE<sup>51,52,53</sup>. Apesar da presença de algumas substâncias potencialmente carcinogênicas, acredita-se que o mecanismo da lesão possa ser a temperatura excessiva dessas infusões<sup>54</sup>. No RS e no Uruguai, diversos estudos têm demonstrado que os indivíduos tabagistas, consumidores de álcool e de chimarrão têm maior risco de desenvolver CEE<sup>51,53</sup>. Barros et al<sup>54</sup>, comparando com pacientes de menor risco, encontraram uma presença significativa de esofagite crônica em indivíduos com história de consumo de álcool, fumo e chimarrão, sugerindo que a exposição a estes agentes contribui para esta diferença. Estudo realizado com indivíduos consumidores de mate na área urbana de Taquara (RS), área de alta incidência de CEE no RS, constatou que estes indivíduos ingeriam a infusão a uma temperatura média superior a 60°C e sugeriu que a temperatura elevada pode contribuir para a carcinogênese esofágica<sup>55</sup>.

A irritação mecânica produzida pela estase crônica e inflamação parece desempenhar um papel importante na maior incidência de CEE que ocorre com a acalasia de longa duração. A acalasia do esôfago é uma doença benigna causada por discinesia do esôfago distal e cárdia supondo ser uma lesão pré-maligna conduzindo para um risco aumentado para o desenvolvimento do CEE. O risco parece ser mais alto durante o primeiro ano depois do diagnóstico da acalasia, provavelmente devido à inclusão de casos prevalentes, ocorrendo, posteriormente, uma estabilização desse risco<sup>56</sup>.

A doença do refluxo gastro-esofágico, considerada amplamente como um fator etiológico no surgimento do esôfago de Barrett e do adenocarcinoma esofágico, só raramente foi implicada como um

risco para o CEE<sup>21</sup>. Ceconello et al<sup>57</sup> demonstraram índices de 12,8% de neoplasia em pacientes portadores de esôfago de Barrett, mas, nestes casos, o tipo histológico era adenocarcinomas.

Outras causas de esofagite, tais como ingestão de soda cáustica e irradiação, também são fatores de risco para o câncer do esôfago, sendo relatado na esofagite por cáusticos a ocorrência em 4,6% dos casos. Estima-se que o risco de desenvolvimento do câncer esofágico em pacientes com estenose cáustica, pode ser de até 1000 vezes maior do que na população geral, sendo o intervalo entre a lesão cáustica e o desenvolvimento do câncer em média entre 20 e 40 anos<sup>58</sup>.

Alguns trabalhos têm associado a irradiação torácica ou mediastinal ao CEE. O CEE se desenvolve 10 anos ou mais após o tratamento radioterápico. A exposição à radiação é geralmente substancial e a lesão actínica é demonstrável histologicamente na mucosa adjacente ao câncer<sup>59</sup>.

Foi relatado que o câncer do esôfago ocorre após escleroterapia endoscópica das varizes de esôfago. A relação é obscura, porém a vigilância em longo prazo desses pacientes já foi recomendada<sup>60</sup>.

#### Má nutrição

Estudos realizados nas regiões de alta incidência do Irã e da China referem dietas pobres em frutas, vegetais, carne, vitaminas A e C e riboflavina<sup>61</sup>. O baixo consumo de frutas frescas e vegetais, provavelmente associado à deficiência de vitaminas ou micronutrientes, foi também identificado no Brasil (RS)<sup>54</sup>. A vitamina A e certas vitaminas B são importantes no controle da proliferação e da integridade da mucosa esofágica. As deficiências poderiam resultar em epitélios pré-cancerosos<sup>14,21</sup>.

Os estudos epidemiológicos implicam os fatores dietéticos no risco de CEE seja pela presença ou ausência de certos componentes. As baixas concentrações de oligoelementos e minerais, tais como o selênio, molibdênio, zinco e ferro, também estão associadas ao surgimento do câncer do esôfago, sendo sugerida a possibilidade dessas substâncias apresentarem efeitos protetores<sup>61</sup>. A deficiência de zinco, em associação a uma restrição dietética e exposição a nitrosaminas, como a N-nitrosometilbenzilamina (NMBA), tem sido implicada como agente causal na etiologia do CEE em áreas de alta incidência, como em partes da África, norte da China, e Irã<sup>62</sup>.

#### Consumo de outros agentes carcinogênicos

Em algumas áreas de alta incidência, alimentos e água contaminados com fungos e bactérias, que convertem nitratos dietéticos em compostos N-nitrosos, têm sido implicados no desenvolvimento do

câncer de esôfago<sup>10</sup>. Foram elaboradas técnicas para determinar o impacto dos compostos nitrosos no surgimento do câncer esofágico. Entre os produtos químicos testados, a N-nitrosamina foi o único composto químico considerado com potente ação carcinogênica para o esôfago<sup>62</sup>. Foi demonstrado desenvolvimento de carcinogênese química esofágica, em modelo experimental em camundongos, induzida pela dietilnitrosamina<sup>63</sup>. Estudo na mesma linha, utilizando nitrosamina, álcool e N-nitrososnornicotina, demonstrou uma incidência de carcinoma esofágico superior a 80% não tendo sido possível determinar o efeito do álcool e da N-nitrososnornicotina como indutores do carcinoma esofágico<sup>64</sup>. Existem dados que sugerem que o consumo ou a produção endógena de nitrosamina é a causa da formação do câncer esofágico. Entretanto, parece haver uma variação individual significativa que pode ser afetada por fatores dietéticos como as vitaminas C e E e o ácido retinóico, exercendo um efeito protetor<sup>65</sup>.

#### Fungos e vírus

Estudos realizados em áreas de alto risco para câncer de esôfago na China mostraram que grãos e alimentos que são freqüentemente contaminados com fungos, principalmente do gênero *Fusarium* e *Alternaria*, podem, além de reduzir nitratos a nitritos, decompor proteínas e aumentar a quantidade de aminas nos alimentos, determinando formação de nitrosaminas<sup>66</sup>.

Os vírus Human papiloma virus (HPV), Herpes simplex virus (HSV), Cytomegalovirus (CMV) e Epstein-Barr virus (EBV), principalmente o primeiro, têm sido associados à patogênese de uma variedade de carcinomas humanos. Eles têm a propriedade de produzir tumores em animais e transformar células *in vitro* e tem sido comprovado que infectam o epitélio esofágico, sendo assim candidatos em potencial a agentes etiológicos do CEE. Diferentemente dos fungos que estão indiretamente envolvidos na oncogênese por produzirem compostos carcinogênicos ou co-carcinogênicos ou por estimularem o processo inflamatório, as viroses usualmente causam cânceres específicos por agirem diretamente nas células hospedeiras<sup>66</sup>. Os HPV podem ser classificados como de alto risco (tipos 16, 18, 31 e 33) ou de baixo risco (tipos 6, 11 e 30), dependendo da sua associação com tumores benignos ou malignos. Tem sido descrita a associação dos tipos 16 e 18 com CEE<sup>67</sup>, mas os dados a esse respeito têm gerado controvérsias, havendo vários estudos sugerindo que a infecção pelo HPV não apresenta um papel definido na etiologia dessa neoplasia<sup>68</sup>.

## Fatores genéticos e familiares

Foi relatado que pacientes com câncer de esôfago tinham uma história familiar positiva para a mesma doença em áreas de alto risco do Cazaquistão, na Ásia Central<sup>49</sup>. Egashira et al<sup>69</sup> evidenciaram uma ocorrência de 39% e um risco duas vezes maior de desenvolver o CEE em pacientes com história familiar de câncer do esôfago ou câncer de cabeça e pescoço contra 11% no grupo sem história familiar. Estudos com migração de populações na China revelaram que pessoas que migraram de áreas de alta incidência de CEE para áreas de baixa incidência continuaram a apresentar alta taxa de mortalidade pela doença<sup>70</sup>. Apesar desses estudos sugerirem um agrupamento familiar para a doença, é difícil diferenciar ou excluir fatores ambientais comuns e, embora o câncer de esôfago tenha, provavelmente, importante participação de fatores exógenos na sua etiologia, estudos recentes sugerem que uma suscetibilidade genética não pode ser excluída e que fatores genéticos podem estar envolvidos na sua patogênese<sup>36</sup>.

Também foi observado que o câncer de esôfago ocorre mais frequentemente entre as famílias afetadas por Tilose, uma síndrome genética rara com hiperqueratose palmo-plantar, havendo, nas séries publicadas, incidência de CEE em até 37% dos membros familiares<sup>3</sup>.

Estudos em biologia molecular de tumores esofágicos têm revelado uma frequência de várias alterações genéticas, como perda da heterozigocidade, deleção, mutação, rearranjos cromossômicos e alterações pontuais, levando a alterações em genes supressores tumorais, como o p53 e o Rb<sup>71</sup>. Existem pesquisas que mostram perda da heterozigocidade nos locos 13q (gene Rb), 17p (gene p53), 5q (gene APC e gene MCC) e 18q (gene DCC) em relação ao carcinoma de esôfago<sup>71,72</sup>. Nos adenocarcinomas de esôfago de Barrett ocorrem perdas nos cromossomos 17p (gene p53) e 5q (gene MCC) em 94% e 75% dos casos respectivamente<sup>73</sup>. A alteração do cromossomo 17p surge em 94% dos casos já na metaplasia da mucosa de Barrett, evidenciando a precocidade das alterações cromossômicas<sup>74</sup>. A instabilidade de microsátélites no carcinoma de esôfago foi observada em 7% dos casos de metaplasia em esôfago de Barrett, em 22% dos adenocarcinomas e em apenas 2% dos carcinomas epidermóides<sup>75</sup>. A amplificação de c-myc também foi observada em tumores nas áreas com alta incidência de carcinoma de esôfago associado a compostos N-nitrosos, sendo que em 23% dos casos também ocorreu na mucosa adjacente não neoplásica<sup>76</sup>.

## Malignidade preexistente

A história de carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço e pulmão constitui um fator de risco conhecido para o surgimento de CEE. Os tumores podem ocorrer simultaneamente ou a lesão esofágica manifestar-se após a terapia do tumor primário<sup>77</sup>.

#### Fatores de outra natureza

Algumas outras condições estão associadas ao CEE. A síndrome de Plummer-Vinson, que envolve anemia ferropriva, glossite e membranas esofágicas, levando à disfagia, está associada a 15% de incidência de câncer na faringe ou no esôfago cervical, principalmente em mulheres<sup>3,78</sup>. A doença celíaca foi sugerida como um possível fator de risco e o câncer de esôfago parece estar relacionado a distúrbios cutâneos bolhosos<sup>21</sup>.

Indivíduos com estreitamento cáustico do esôfago têm uma alta frequência de CEE anos após a ingestão cáustica. O risco de câncer é estimado em, no mínimo, 1000 vezes maior do que aquele da população geral<sup>58</sup>. Os tumores aparecem 15 a 50 anos após a ingestão (média 40 anos), tendem a ocorrer no esôfago médio e produzem sintomas precocemente, provavelmente pelo fato de que o lúmen esofágico já está comprometido pela fibrose de longa duração. O prognóstico após a ressecção é relativamente bom para estes pacientes, com sobrevivência em cinco anos de aproximadamente 33%<sup>79</sup>.

#### Lesões precursoras

As informações disponíveis a respeito de lesões precursoras do esôfago humano são poucas e, por vezes, desconhecidas. Somente a displasia tem sido proposta como uma lesão provavelmente pré-maligna<sup>4</sup>, existindo, contudo, a sugestão de que a história natural do câncer de esôfago possa seguir uma seqüência evolutiva iniciada com a esofagite crônica, passando a atrofia que evolui para a displasia que por sua vez, culminará em carcinoma<sup>14,35</sup>.

Estudos conduzidos na China e no Irã<sup>14,50</sup> em populações sob alto risco para câncer de esôfago demonstraram uma prevalência muito alta de esofagite crônica, a qual geralmente não determina sintomas, sendo caracterizada, na endoscopia, por uma mucosa friável e irregular com graus variáveis de edema, hiperemia e leucoplasia, mas sem ulcerações e envolvendo, geralmente, os terços médio e inferior do esôfago sem comprometimento da região pré-cárdica. Em contraste, a esofagite em populações de baixo risco na Europa é caracterizada por erosões e ulcerações, as quais quase sempre comprometem a

região pré-cárdica, já que a condição é, via de regra, determinada pelo refluxo gastro-esofágico. A chamada acantose de células claras que, frequentemente, acompanha a esofagite é quase sempre a lesão correspondente às placas brancas ou mucosa esbranquiçada descritas endoscopicamente, e pode ser o resultado da injúria térmica, uma vez que o hábito de ingerir bebidas muito quentes é disseminado, tanto na China como no Irã. Em ambos os lugares, a atrofia é a segunda lesão epitelial mais comum, acompanhando a esofagite e seguida pela displasia. Dawsey et al<sup>33</sup>, utilizando critérios histológicos mais rígidos, demonstraram uma distribuição diferente dos diagnósticos previamente observados nesta mesma população. Tais resultados sugeriram que a maior razão para a discrepância encontrada foi conseqüente às diferenças nos critérios histológicos<sup>80</sup>. Aparentemente, diferenças nos critérios poderiam causar grandes diferenças na prevalência dos achados. Pelos critérios estabelecidos, esofagite histológica e atrofia foram achados incomuns, originando dúvidas sobre a significância destes achados como lesões precursoras do câncer de esôfago nessa população.

Em Porto Alegre, estudo comparativo entre indivíduos do sexo masculino com fatores de risco para CEE (alcoolistas, tabagistas e consumidores de chimarrão) e indivíduos sem estes fatores de risco encontrou uma elevada presença de esofagite crônica (70%) em vários graus significativamente mais marcada no grupo de maior risco do que no grupo considerado de menor risco (45,5%). Este estudo sugeriu que a exposição intensa a bebidas alcoólicas, ao fumo e ao chimarrão contribui para essa diferença. A presença de displasia em 3% do grupo considerado de menor risco, contra 3,4% do grupo de maior risco, sugeriu que estes pacientes poderiam também estar expostos a outros fatores de risco. Em nenhum grupo foi identificada atrofia epitelial, ao contrário das freqüências relativamente altas observadas no Irã e na China em indivíduos sob risco. Os achados histopatológicos observados neste estudo colocaram tanto os pacientes do grupo de menor risco quanto o de maior risco como portadores de lesões precursoras (esofagites crônicas e displasias) potencialmente evolutivas ao câncer de esôfago. A acantose de células claras foi encontrada numa freqüência de 12% no grupo de menor risco e 26 % no de maior risco, taxas bem inferiores às observadas no Irã (66% e 65% - homens e mulheres, respectivamente) e na China (80,8 % e 72,4 % adultos e 26 % e 17,9% adolescentes, respectivamente do sexo masculino e feminino)<sup>54</sup>.

Observações realizadas em ratos tratados com nitrosaminas demonstraram anormalidades esofágicas similares às observadas no Irã e na China, precedendo o desenvolvimento de tumores esofágicos<sup>62</sup>. Kruef<sup>63</sup>, em modelo experimental com camundongos, identificou histologicamente, de forma

seqüencial, alterações na mucosa esofágica (esofagite aguda e crônica, displasias leves, moderadas e acentuadas, carcinoma *in situ* e carcinoma invasor), com resultados altamente sugestivos da natureza precursora e evolutiva das displasias e carcinoma *in situ* para CEE.

Em estudo realizado em Linxian, China, onde 682 participantes de um inquérito endoscópico foram seguidos por 3,5 anos e tiveram seus diagnósticos histológicos iniciais comparados com a ocorrência de CEE, mostrou que displasia moderada e acentuada e carcinoma *in situ* foram as únicas lesões histológicas associadas com risco significativo do desenvolvimento de carcinoma invasivo. Naquele período de acompanhamento graus crescentes de displasia foram associados com risco aumentado, mas displasia acentuada e carcinoma *in situ* tiveram graus similares de risco<sup>81</sup>.

Resultados de estudos conduzidos na África do Sul indicam prevalência similar de esofagite e atrofia em vários grupos populacionais sob risco para o CEE e sugerem que a classificação de esofagite e atrofia da mucosa como lesões precursoras é questionável<sup>82</sup>.

Jacob et al<sup>83</sup> estudaram 255 pacientes alcoolistas e tabagistas com idade média de 60 anos através de estudos citológicos obtidos com um tipo de balão esofágico. Foi diagnosticada displasia epitelial atribuída ao esôfago em 37 pacientes. Vinte e oito pacientes foram acompanhados com intervalos de seis a 36 meses, com exames citológicos obtidos com balão esofágico, esofagoscopia com lugol e biópsias. Durante este seguimento, a citologia foi repetidamente normal em 16 (57%), apresentou características inflamatórias em 8 (29%) e persistiu como displasia em dois pacientes (7%) que continham evidência endoscópica e histológica de esofagite e progrediu para carcinoma em dois outros pacientes (7%), um de esôfago e outro de laringe. Carcinoma intraepitelial foi diagnosticado erroneamente em dois pacientes nos quais biópsias endoscópicas subseqüentes demonstraram apenas esofagite. Os autores concluíram que a diferenciação entre inflamação acentuada, displasia e carcinoma intraepitelial pode ser muito difícil e que esofagites e displasias podem envolver e chamam a atenção de que estas observações podem ser particularmente relevantes em populações com baixa prevalência para CEE.

Recentes estudos realizados no Japão em lesões displásicas do esôfago revelaram que lesões atípicas podem conter pequenos focos de carcinoma e muitas espécimes de biópsias previamente diagnosticadas como displasia eram, na realidade, carcinomas, não sendo encontradas diferenças entre lesões neoplásicas intraepiteliais e porções intraepiteliais de carcinoma invasivo. Estes achados confirmam a dificuldade de se diferenciar displasia de alto grau do carcinoma<sup>29</sup>.

Concluindo, pode-se dizer que, em todos os trabalhos citados, as esofagites crônicas são um achado comum, não somente em populações de alto risco como em grupos de baixo risco. Este achado parece questionar o conceito de que esofagite seja uma lesão precursora do câncer esofágico. Contudo, graus moderados e acentuados de esofagite foram achados mais freqüentes entre habitantes de áreas de alto risco do que em áreas de baixo risco. A incidência de esofagite moderada e acentuada foi mais alta em homens do que em mulheres. Em decorrência, pode-se postular que a esofagite crônica é a condição patológica mais comum do esôfago, mas graus moderados ou acentuados podem determinar um ambiente propício para o desenvolvimento do CEE. A atrofia e a “acantose de células claras” são de difícil identificação e têm um caráter precursor duvidoso. Embora ainda existam autores que questionem se a displasia é ou não uma lesão pré-cancerosa, tem sido demonstrado que a mesma tem estreita relação com CEE e que não existem diferenças substanciais entre a atividade celular proliferativa da displasia e do carcinoma intraepitelial<sup>84</sup>.

### **Diagnóstico precoce**

Os carcinomas esofágicos precoces são classificados em intraepiteliais, intramucosos e submucosos. No carcinoma intraepitelial (carcinoma *in situ*) as células neoplásicas ocupam toda a extensão do epitélio esofágico, mas a lâmina basal está preservada. Da situação intraepitelial, o carcinoma avança além da lâmina basal e estende-se para a lâmina própria (carcinoma intramucoso). Neste nível os tumores raramente apresentam metástases. Com a penetração através da muscular da mucosa até a submucosa (carcinoma submucoso) a disseminação lateral é mais comum e maior é a possibilidade de metástases linfáticas. O carcinoma cuja infiltração é limitada à mucosa e à submucosa é definido como câncer superficial. A Sociedade Japonesa de Estudos das Doenças Esofágicas define como câncer precoce se não houver metástases<sup>85,86</sup>. A média de sobrevida estimada em cinco anos do câncer superficial sem metástases (câncer precoce) foi de 75% a 88 %, enquanto que, na vigência de metástases, foi de 40% a 50%. Foi observada uma sobrevida de 94% nos casos de câncer superficial e carcinomas diminutos do esôfago (menos de 10mm na maior dimensão)<sup>85</sup>. Assim, a tendência atual é de se considerar como precoce apenas as neoplasias limitadas à mucosa, uma vez que a invasão da submucosa já determina metástases linfáticas e vasculares em 50% a 70% dos casos<sup>86</sup>.

No exame endoscópico a alteração da cor é o primeiro sinal que pode indicar a presença de um carcinoma epitelial. Pode ser branca, a leucoplasia, ou vermelha, a eritroplasia. Posteriormente surgem as alterações de superfície, classificadas como elevadas, planas e deprimidas<sup>86</sup>. Como a maior parte destas lesões é assintomática, a sua detecção só é possível em programas de rastreamento ou como achados incidentais em exames endoscópicos e, mesmo assim, os casos chamados precoces, quando reconhecidos à endoscopia, apresentam-se, freqüentemente, com invasão vascular e linfática, diminuindo a expectativa de sobrevida. Essa situação sugere que a detecção e a monitorização das chamadas lesões precursoras com potencial evolutivo para câncer de esôfago poderiam determinar o reconhecimento do câncer esofágico em seu estágio mais inicial, contribuindo para a melhoria nas taxas de sobrevida<sup>54</sup>. A prevenção do CEE ainda é uma possibilidade remota, entretanto a cura ou a maior sobrevida poderá ser possível se o diagnóstico precoce for realizado em indivíduos reconhecidamente sob risco.

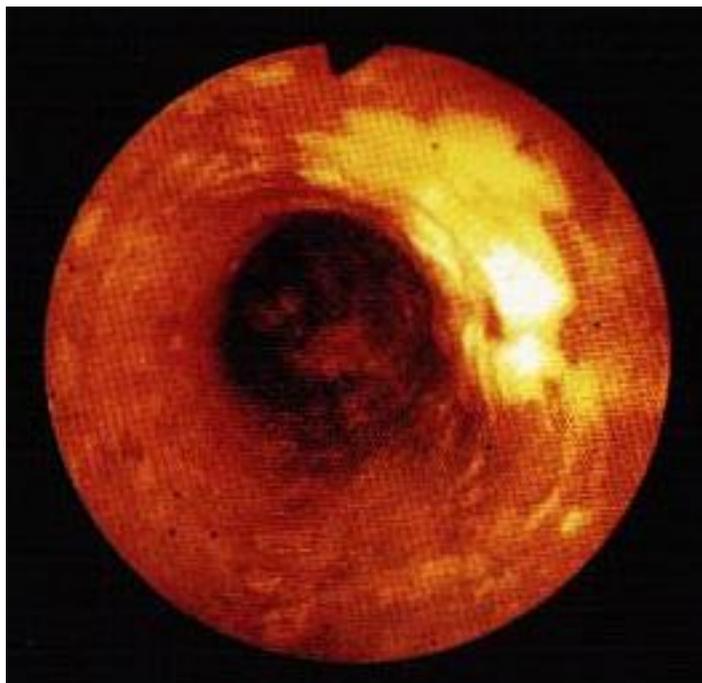
#### Rastreamento através da Citologia

A citologia com balão esofágico é uma técnica de rastreamento para detecção precoce do câncer esofágico que tem sido utilizada extensivamente na China, Irã e África do Sul<sup>32,33</sup> e no RS<sup>54</sup> com resultados promissores. É um procedimento seguro, facilmente realizado, bem tolerado e proporciona material adequado em mais de 90% dos exames. Entretanto, há evidências de que o diagnóstico citológico obtido com o balão parece não apresentar uma correlação estreita com o exame histopatológico de espécimes de biópsias obtidos por endoscopia. A citologia por balão, quando utilizada em países de baixa prevalência, mesmo quando são estudados indivíduos com alto risco para CEE, tem um uso limitado como método de rastreamento, uma vez que as atipias detectadas pela citologia parecem estar mais relacionadas às esofagites<sup>16</sup>.

#### Cromoendoscopia

Para tentar melhorar o rendimento da endoscopia no diagnóstico das lesões precoces ou precursoras do câncer do esôfago utiliza-se a cromoendoscopia, que consiste no uso de corantes como a solução de lugol, azul de toluidina e azul de metileno durante o exame endoscópico<sup>41,87</sup>. O corante mais utilizado tem sido o lugol e a sua aplicação resulta em uma coloração do epitélio escamoso do esôfago em castanho escuro. Esta propriedade se deve à reação entre o iodo e o glicogênio no citoplasma das células escamosas maduras do epitélio esofágico. O epitélio escamoso lesado ou o epitélio colunar metaplásico

não se cora ou se cora fracamente, na dependência da severidade da lesão (Figura 1). Tem sido demonstrado que a cromoendoscopia com lugol é efetiva no diagnóstico das alterações pré-malignas e do câncer esofágico precoce, uma vez que a presença das lesões é claramente identificada e espécimes de biópsia podem ser obtidas seletivamente. Freitag et al<sup>87</sup> demonstraram uma sensibilidade de 83,3%, especificidade de 70,2%, valor preditivo positivo de 26,3% e valor preditivo negativo de 97% da cromoendoscopia com lugol no diagnóstico de displasia. Com o mesmo método, Fagundes et al<sup>88</sup> demonstraram uma sensibilidade de 46%, especificidade igual a 90%, valor preditivo positivo de 26 % e valor preditivo negativo igual a 96% para a identificação de displasias em indivíduos alcoolistas e tabagistas. Foi demonstrado, nessa amostra, que as áreas não coradas pelo lugol apresentaram um risco oito vezes maior para a ocorrência de displasias quando comparadas com áreas coradas. Estas por sua vez apresentaram uma baixa probabilidade (4%) de ocorrência de lesões displásicas.



**Figura 1 . Cromoendoscopia com lugol com área não corada correspondente a CEE precoce<sup>89</sup>**

### **O ciclo celular**

O ciclo celular divide-se em duas fases distintas: a mitose (fase M), com duração aproximada de uma a duas horas, e a interfase, com duração de 22 a 23 horas. É na interfase que se realiza a duplicação

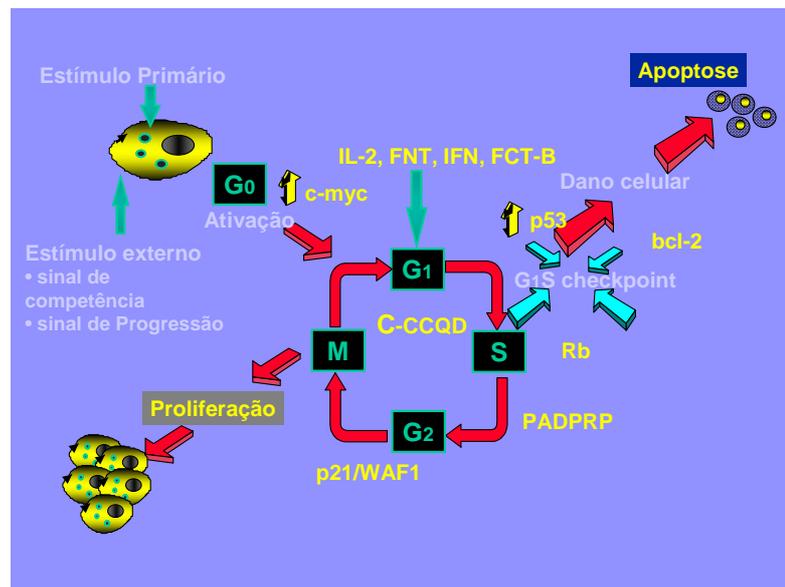
do DNA (fase S) e as fases G1 e G2, que correspondem aos intervalos que se seguem do final de uma fase M ao início de uma fase S e do final de uma fase S ao início da mitose, respectivamente. O ponto no qual a célula interrompe o seu ciclo (fase G0) é também denominado de ponto de restrição. As fases S, G2 e M são relativamente constantes, sendo que as variações do ciclo parecem depender mais especificamente da fase G1<sup>90</sup>.

A passagem de uma fase para outra é determinada, dentre outros fatores, pela interação entre os sinais controladores do crescimento e desenvolvimento celular e o maquinário protéico do ciclo celular, as ciclinas, que são proteínas resultantes da transcrição de genes especificamente implicados no ciclo celular, e das modificações do estado de fosforilação dos complexos formados pelas ciclinas e suas enzimas específicas, as quinases ciclino-dependentes<sup>90</sup>. Se algum defeito intrínseco ocorrer nestes complexos pode haver proliferação descontrolada ou desenvolvimento de células tumorais. Alguns genes, como o c-myc, bcl-2, Rb, p53 e p21, atuam no controle do ciclo celular como pontos de checagem nas suas diversas fases e, desta forma, interferindo na progressão celular.

Boa parte da regulação do ciclo celular origina-se de sinais do meio extracelular que são transmitidos às células através dos fatores de crescimento. Fatores de crescimento são proteínas que estabelecem ligações químicas com estruturas da membrana celular, os receptores de fatores de crescimento. Estes, por sua vez, são compostos protéicos que apresentam um segmento no meio intracelular e outro no extracelular. A ligação química entre o fator de crescimento e seu receptor específico promove alterações bioquímicas no receptor em sua porção citoplasmática, ativando uma cascata de reações entre proteínas. Esta reação em cadeia é chamada de transdução de sinal e irá ativar os fatores responsáveis pela atividade intranuclear. O principal objetivo dos fatores de transdução é a ativação dos fatores de transcrição. Estes são proteínas reguladoras intranucleares que visam à ativação da expressão dos genes codificadores das proteínas atuantes no ciclo celular. Se estes fatores funcionarem de maneira autônoma como estimuladores da mitose, então teremos as oncoproteínas.

O ciclo celular, funcionalmente, é desencadeado por um estímulo primário, ao qual a célula deve responder através de dois sinais: o sinal de competência, demonstrando a sua capacidade para cumprir os processos de crescimento e desenvolvimento, e o sinal de progressão, evidenciando a sua capacidade de progredir no ciclo celular<sup>91</sup>. Neste ponto há expressão do gene c-myc. O c-myc é um fator de transcrição que, em condições normais, auxilia a célula a passar do estado G1 para a fase S. A proteína c-myc é reconhecida como importante fator na carcinogênese humana, sendo responsável pelos primeiros

controles, onde a inadequação celular em situação de estresse faz com que haja um aumento considerável da sua expressão e inicie o processo de apoptose<sup>92</sup>. Este controle depende, porém, de uma regulação exercida pelo bcl-2, que atua como inibidor da apoptose. Caso o controle pelo bcl-2 considere a célula apta a progredir, esta, agora em G1, prossegue o ciclo preparando-se para os processos de transcrição e tradução gênicos necessários. No ponto de checagem G1-S, em face de alguma anormalidade do DNA, o gene Rb bloqueia o mecanismo de transcrição do DNA, impedindo a progressão da célula à fase S. Em uma etapa mais avançada, o gene p53 exerce novo controle no ponto G1-S, antes da síntese e duplicação do DNA iniciarem e, caso alguma alteração ou dano do DNA seja evidenciado e não houver reparo, ocorre um aumento na expressão do p53 intracelular e é desencadeada a apoptose. Outros fatores estão envolvidos no controle do ciclo celular e apoptose, como o gene apo-1 ou Fas, fatores de diferenciação e crescimento, como a TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , as citocinas, TNF, INF e IL-2, as ciclinas (A, B, D e E), os complexos quinase ciclino-dependentes (cdk 2, 4, 5,6), o p34<sup>cdc2</sup>, p16<sup>ink4a</sup>, as endonucleases, o cálcio, dentre outros<sup>90,92</sup> (Figura 2).



**Figura 2. Ciclo celular**

### **Instabilidade genética e câncer**

A transformação maligna é um processo que se desenvolve em múltiplas etapas e que, na maioria das vezes, resulta do acúmulo de várias mutações envolvendo diferentes genes. O crescimento tumoral é determinado por três fatores principais: o ciclo celular, a porcentagem de células proliferativas e a quantidade de perda celular. Este crescimento não é constante e a dinâmica do ciclo celular nos tumores pode ser diferente da homeostase normal, sendo que a variação ocorre provavelmente em função da heterogeneidade intratumoral. A manutenção da homeostase em tecido normal, em muitos aspectos, reflete uma simples equação equilibrada de proliferação e renovação celular contra morte celular. Tanto o aumento da proliferação quanto a diminuição da morte celular resulta em expansão do número de células. O câncer, portanto, se desenvolve quando as alterações no DNA causam um acúmulo anormal de células. As taxas comparativas de divisão e morte celular determinam o quão rápido o tumor cresce. Algumas células neoplásicas se dividem mais lentamente do que as células normais, mas o câncer pode continuar se expandindo em função do prolongamento da vida das suas células<sup>90</sup>.

Muitos agentes carcinogênicos danificam o DNA ou interferem com enzimas necessárias à sua replicação. Uma célula pode responder a estas agressões adiando a divisão celular até o reparo do dano, promovendo a morte celular ou progredindo no ciclo sem interrupção<sup>91</sup>. As células neoplásicas costumam apresentar danos adquiridos nos genes reguladores do ciclo celular e, se as mutações não forem reconhecidas pelos pontos de checagem, as células com DNA danificado permanecem no conjunto de células do ciclo e, se não forem eliminadas, podem replicar com conseqüências deletérias.

Os genes envolvidos no controle do ciclo celular, quando apresentam mutações, podem contribuir com o surgimento e desenvolvimento do câncer. Assim, os oncogenes, inicialmente identificados em células neoplásicas, são versões mutantes dos proto-oncogenes implicados na regulação do ciclo celular. Todavia, a conceituação destes genes mutantes não encontra consenso na literatura em decorrência da diferença entre a denominação e função dos mesmos em células normais. Funcionalmente podem ser divididos em classes distintas, segundo propôs Korsmeyer<sup>93</sup>. Os primeiros genes classificados, chamados de categoria I ou oncogenes, promovem o crescimento celular e a proliferação. Quando um oncogene é anormalmente ativado, impulsiona a célula pelo ciclo celular facilitando a proliferação do clone. Estes genes, numa analogia com um automóvel, atuam como o acelerador, elevando a velocidade. Muitos destes genes podem ser classificados como fatores de transcrição ou moléculas envolvidas nos sinais de transdução. Os exemplos clássicos incluem o c-myc e o ras. Em geral, estes genes contribuem para o desenvolvimento do câncer após uma alteração que resulta em incremento de função. Eles

usualmente exibem um mecanismo autossômico dominante no qual um único alelo alterado é suficiente para produzir o efeito. O gene de proliferação normal é chamado de proto-oncogene. A categoria II representa os genes supressores tumorais que, na sua forma natural ou “selvagem”, inibem o crescimento e a proliferação. Uma característica desta categoria, cujos principais representantes são o Rb e o p53, é sua contribuição para o crescimento desenfreado por perda de função (Tabela 2). Os genes supressores tumorais atuam de maneira recessiva e, portanto, promovem o câncer somente quando são inativados em ambos os alelos, por mutação ou perda. Atuam como o sistema de freios das rodas de um automóvel. Korsmeyer<sup>93</sup> propôs uma terceira categoria: a que regula a morte celular programada, representada pelo bcl-2.

**Tabela 2. Genes supressores tumorais implicados no desenvolvimento do câncer**

<b>GENE</b>	<b>CODIFICA / LOCAL DE AÇÃO</b>	<b>TIPO DE CÂNCER</b>
<b>APC</b>	Proteína citoplasmática	Cólon e estômago
<b>DPC4</b>	Proteína citoplasmática que inibe divisão celular	Pâncreas
<b>NF-1</b>	Proteína citoplasmática inibidora do ras	Neurofibroma e feocromocitoma
<b>NF-2</b>	Proteína citoplasmática	Câncer cerebral e schwanoma
<b>MTS1</b>	Proteína p16 (nuclear), bloqueio do ciclo celular	Vários
<b>RB</b>	Proteína pRB (nuclear), bloqueio do ciclo celular	Retinoblastoma, pulmão, ossos, bexiga, esôfago e mama
<b>P53</b>	Proteína p53 (nuclear)	Esôfago, ovário e maioria dos cânceres
<b>WT1</b>	Proteína nuclear	Tumor de Wilms
<b>BRCA1</b>	Indefinido	Mama e ovário
<b>BRCA2</b>	Indefinido	Mama
<b>VHL</b>	Indefinido	Rim

Adaptado de Weinberg RA. How cancer arises. Scientific American, Sep 1996, 32-40.

### **O gene Rb**

O gene Rb, cuja denominação advém do retinoblastoma, foi identificado originalmente em estudos sobre a predisposição herdada geneticamente ao desenvolvimento desta neoplasia<sup>94</sup>. Está localizado no loco 14 do braço longo do cromossomo 13 (13q14), é constituído de 27 exons dispersos sobre uma molécula de DNA com 200 Kb e pertence à família dos genes supressores tumorais<sup>6</sup>. Knudson et al<sup>94</sup>, em 1971, postularam que a herança do retinoblastoma é causada pelo fenômeno de perda ou deleção de ambas bandas específicas do gene. Este evento mutagênico inativa o gene Rb, que parece ser crítico para o desenvolvimento deste câncer. Alguns indivíduos que apresentam retinoblastoma hereditário possuem cariótipo visivelmente anormal, com deleção de uma banda específica do cromossomo 13. Deleções do mesmo loco também são encontradas nas células tumorais de pacientes com a doença não-hereditária.

Nas amostras de tumores contendo perda da heterozigocidade do gene Rb, 90% mostra baixa ou ausência da expressão da proteína pRb, enquanto que em amostras sem perda da heterozigocidade somente 20% têm a expressão de pRb alterada. Existe uma forte associação entre a perda da heterozigocidade do gene Rb e alteração da expressão da proteína pRb, sugerindo que a perda da heterozigocidade é o principal evento que conduz à inativação do Rb. Além disso, evidenciou-se que a perda da heterozigocidade do Rb foi mais freqüente em tumores com mutação do p53<sup>95</sup>. Aproximadamente 50% dos cânceres de esôfago exibem uma perda da heterozigocidade do gene Rb, mas só 20% destas neoplasias são deficientes da expressão da proteína pRb<sup>96</sup>. No estudo de Huang et al<sup>97</sup>, a ocorrência de perda da heterozigocidade do gene Rb foi observada em 40% dos casos de CEE, mas mutações ou deleções do Rb não foram evidenciadas. Horowitz et al<sup>98</sup> revelaram alterações no gene Rb em mais de 30% de retinoblastomas e osteossarcomas hereditários e sugeriram que o gene Rb pode sofrer alterações sutis na sua estrutura do tipo que escapa da detecção pela análise por *Southern blotting*. Quando células tumorais de retinoblastomas de diferentes pacientes são analisadas, uma perda da heterozigocidade na região do gene Rb é observada em cerca de 70% dos casos<sup>4</sup>. Outros autores descrevem a perda em aproximadamente 30% a 50% dos casos de CEE e em 36% dos adenocarcinomas de esôfago. Este evento corrobora a hipótese de que a inativação do gene Rb exerce uma determinada ação na patogênese e progressão da malignidade<sup>7,99</sup>.

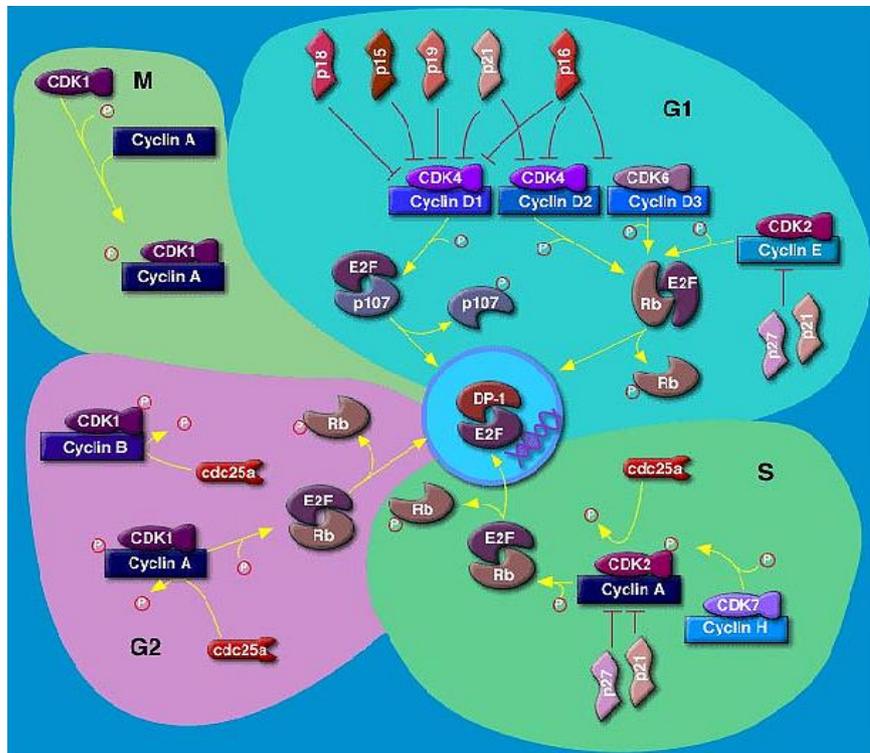
O gene Rb é habitualmente expresso em quase todas as células do corpo e sua função está relacionada com a regulação do crescimento em uma variedade de tecidos normais e neoplásicos. Seu produto, a proteína retinoblastoma (pRb), é uma fosfoproteína nuclear composta de 928 aminoácidos. Sua

função fisiológica nas células normais é permitir que estas, quando em G1 progridam para a fase S. Na vigência de algum dano celular, a pRb bloqueia o mecanismo de transcrição do DNA, impedindo a progressão da célula à fase S, atuando, desta forma, como um dos principais freios da progressão do ciclo celular<sup>4</sup>. Foram identificadas várias proteínas semelhantes à pRb, como a p105, p107, p110 e pRb2/p130, cada uma atuando por um objetivo comum na cooperação de regular a progressão do ciclo celular. O mecanismo pelo qual a pRb bloqueia a transcrição do DNA no ponto de checagem G1-S está na dependência direta do seu estado de fosforilação que, na realidade, caracterizará sua atividade. Este aspecto da pRb é determinado pela sua função de proteína receptora, que tem capacidade de ligar-se, através da sua terminação carboxila, com fatores de transcrição, como o E2F e c-myc, que são conhecidos na regulação de genes promotores da fase S<sup>100</sup>. Nas células em repouso a pRb está presente na sua forma hipofosforilada, forma funcionalmente ativa, que atua em G1 como parte de um mecanismo de freio para inibir a passagem pelo ponto restrição. Pode também possibilitar que a célula entre em G0, interrompendo a produção de componentes-chaves do sistema de controle do ciclo celular, assim como outras proteínas, quando o ambiente se torna desfavorável para a proliferação. Na fase de proliferação rápida, a proteína pRb está hiperfosforilada, correspondendo à sua forma inativa, e mais lenta de mobilidade do que a forma mínima de fosforilação<sup>101</sup>. No seu estado hiperfosforilado, a pRb é incapaz de ligar-se ao fator de transcrição, permitindo a progressão da célula no ciclo celular. Em inúmeros experimentos a quantidade total da proteína pRb nas células não varia entre o repouso e a proliferação. Chen et al<sup>102</sup> demonstraram que a pRb é progressivamente fosforilada durante a fase G1 e que a fosforilação máxima ocorre no ponto G1-S.

Outros resultados demonstraram a importância da fosforilação da pRb na regulação de suas funções e sugerem que a supressão tumoral pelo Rb pode requerer a assistência de outras proteínas, como as quinases, fosfatases, ciclinas e fatores de crescimento. Os fatores de crescimento anulam a inibição exercida pelo Rb pela fosforilação de múltiplas serinas e treoninas desta proteína. Além dos fatores de crescimento que estimulam a divisão celular existem outros fatores, como é o caso de alguns membros da família do TGF- $\beta$ , que atuam em algumas células para estimular a proliferação celular. Os receptores de fatores de crescimento ativam as cascatas de fosforilação intracelular que levam à mudança na expressão dos genes. Estes genes pertencem a duas classes: os genes de resposta inicial, conhecidos como myc, fos e jun e os genes de resposta tardia<sup>6</sup>. Entre os produtos dos genes de resposta tardia estão alguns dos

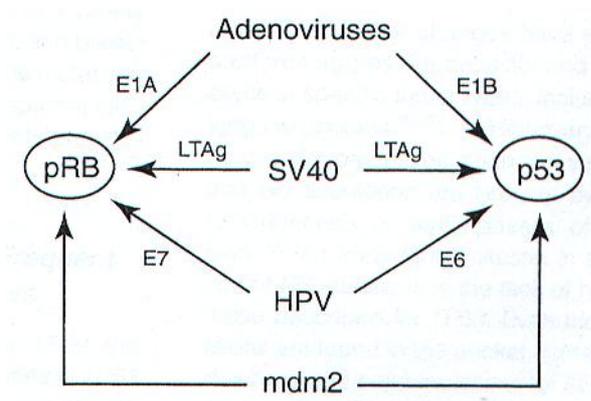
componentes essenciais do sistema de controle do ciclo celular, incluindo proteínquinases dependentes da ciclina (cdk), as quais induzem processos dependentes pela fosforilação em proteínas selecionadas. Diversas ciclinas são ativadoras especializadas e se ligam às moléculas de cdk, controlando sua habilidade de fosforilar proteínas-alvo apropriadas. A formação, ativação e separação dos complexos ciclina-cdk estão entre os eventos fundamentais que coordenam o ciclo celular, levando a célula a ultrapassar o ponto G1 e iniciar a síntese de DNA<sup>4</sup>. Na pRb existem no mínimo dez sítios de substrato para a fosforilação pelas cdk. Tanto a ciclina E como a ciclina A, a qual é sintetizada novamente no início da fase S em combinação com sua cdk correspondente, podem fosforilar a pRb. Outro controle da pRb é facilitado pela ciclina D1, uma ciclina G1, que participa no controle da progressão do ciclo celular pela interação com a pRb. A fosforilação da proteína pRb pelo complexo ciclina D1/cdk4 e cdk6 libera o E2F, possibilitando a transcrição em G1-S<sup>100</sup>. A proteína p16/CDKN2, uma cdk, inibe a interação da cdk4 e cdk6 com a ciclina D1, deixando livre a pRb para ligar-se com E2F e bloquear a transcrição. Em muitos tumores, a expressão da ciclina D1 está aumentada e este evento pode resultar na inibição do controle da supressão do crescimento do Rb, prevenindo a transição em G1-S. A proteína pRb é um bom substrato para a fosforilação por cdk, sugerindo a possibilidade de haver mecanismo onde o estado de fosforilação de pRb na fase G1 pela inibição seletiva de cdk4, cdk6 e cdk2, que ciclinas tipo D endógenas, agindo com cdk4 e cdk6, são capazes de fosforilar parcialmente, um processo que é provavelmente complementado pelo complexo ciclina E-cdk2 (Figura 3). Além disto, o complexo ciclina E-cdk2 é incapaz de fosforilar a pRb na ausência de fosforilação anterior pelo complexo ciclina D-cdk4 e cdk6. Então quando a pRb está fosforilada, resulta liberação do fator de transcrição E2F, gene de transcrição da fase S, e subsequentemente entra na fase S, sendo considerada como forma inativada, pois não consegue bloquear o crescimento celular<sup>100</sup>. Schrupp et al<sup>103</sup> demonstraram uma relação recíproca entre a expressão de pRb e mutações envolvendo a ciclina D1 e p16 nas células do câncer de esôfago. Uma vez que a expressão da proteína pRb está presente em 60% a 80% dos carcinomas esofágicos, o controle do ponto de restrição está envolvido nestas neoplasias através do aumento da expressão da ciclina D1, perda de p16 ou ambos, freqüentemente na presença de mutações de p53. Busatto et al<sup>104</sup> detectaram uma baixa freqüência de alterações do gene p16/CDKN2. Neste estudo ocorreu uma relação inversa com marcado aumento da p16/CDKN2 em células deficientes de pRb no CEE. Num estudo com 50 casos de tumor esofágico de origens geográficas variáveis, Jian et al<sup>105</sup> encontraram ampliação e alta expressão da ciclina D1 em 32% e perda da expressão da proteína Rb em 17% dos tumores. Os tumores com alteração na ciclina

Dlexibiam níveis normais de expressão da pRb, enquanto que aqueles sem expressão da pRb não mostraram ampliação ou alta expressão da ciclina D1. Isto reforça a idéia de que aberrações da pRb parece ser um importante passo no desenvolvimento do CEE.



**Figura 3. pRb liga-se ao E2F e impede a progressão da célula à fase S<sup>106</sup>.**

No epitélio esofágico normal, a expressão de pRb nuclear está restrita à lâmina basal. Entretanto, nas regiões onde ocorrem alterações como displasia grave e carcinoma in situ, a expressão de pRb está aumentada. Este processo maligno pode ser devido a alguns fatores, como alguns vírus, tais como o HPV-16, adenovírus humano e SV40 e suas oncoproteínas E7 / E6, E1A e SV40 grande antígeno T, respectivamente, que formam complexos com a pRb da célula hospedeira, incapacitando o vital mecanismo de supressão do crescimento celular<sup>100</sup> (Figura 4). Esta inativação pode ser conseqüente à similaridade entre muitas proteínas estruturais ou oncoproteínas, diminuindo a atividade da pRb na supressão do crescimento, provavelmente causado pela deficiência de pRb ligadas aos sítios normais<sup>106</sup>. O mecanismo de ação é aparentemente simples: estas proteínas virais se ligam aos produtos protéicos dos dois genes supressores tumorais (pRb e p53) essenciais da célula do hospedeiro, colocando-os fora de ação e permitindo à célula replicar o seu DNA e completar a divisão celular.



**Figura 4. As oncoproteínas virais (E1A, E1B, LTAg, E6, E7) e celular (mdm2) ligam-se e inativam as proteínas pRb e p53<sup>100</sup>.**

A conexão entre a p53 e a pRb na regulação do ciclo celular é sugerida com base na ação de dois novos genes regulados pela p53: o mdm2 e o p21 (WAF1). O produto do gene mdm2 tem um sítio de ligação identificado no terminal carboxila que interage com a pRb e retém sua função por alterar a conformação da região receptora que se liga com o fator de transcrição. Outra via alternativa da interação p53-pRb é mediada pelo gene p21. O gene p21 pertence à nova família de reguladores negativos do ciclo celular, atuando como uma molécula inibidora de cdk. O p21 inativa o complexo ciclina-cdk que é necessário para a fosforilação da pRb. Estes genes estão fortemente implicados na relação entre o p53 e o Rb na regulação do ciclo celular, apoptose e progressão tumoral<sup>100</sup>.

A inativação do gene Rb tem sido encontrada em outros tumores além do retinoblastoma, como o osteossarcoma, câncer de pulmão, bexiga, esôfago, próstata e mama<sup>2,4,99</sup>.

Wunder et al<sup>107</sup> detectaram alterações do gene Rb em 26% dos casos de sarcoma. Alterações no DNA foram detectadas em 6 de 14 osteossarcomas esporádicos e 5 de 29 outros sarcomas ósseos e de tecidos moles, pela análise com imunoprecipitação em gel (*Southern* e *Northern blot*). Apenas alguns eventos genéticos responsáveis pela inativação do gene Rb podem ser detectados pelo *Southern blot*. As pequenas alterações na estrutura do DNA como pequenas deleções e rearranjos de seqüências ou mutações de ponto, que representam eventos capazes de inativar o gene Rb podem escapar da detecção com este método<sup>108</sup>. Todavia, estas alterações podem conduzir a mudanças na expressão do gene que podem ser detectáveis como uma deficiência de RNAm ou tamanho alterado ou quantidade de transcrição nestes tumores. Em 19 sarcomas onde foi avaliado o total celular de RNA, todos tumores examinados

tinham RNA indetectável ou alterado. As alterações do DNA foram associadas com o grau histológico do tumor, ocorrendo predominância nos tumores de alto grau. A frequência aumentada de grandes deleções do gene Rb nos tumores de alto grau quando comparados com os de baixo grau pode ser relacionada com a extensa instabilidade genética nestas neoplasias mais agressivas<sup>109</sup>.

Yamamoto et al<sup>110</sup> analisaram a expressão imunohistoquímica da pRb em carcinomas colorretais evidenciando que a incidência de células pRb positivas foi aumentando paradoxalmente durante os vários estágios da carcinogênese. Estes achados sugerem que o aumento da expressão da pRb nas células do carcinoma colorretal pode produzir um mecanismo homeostático na tentativa de proteger as células da inibição do crescimento e apoptose, talvez pelo contrabalanço dos efeitos tóxicos da excessiva atividade do fator de transcrição.

Geradts et al<sup>111</sup> avaliaram a expressão imunohistoquímica da pRb e p16 em tumores sólidos. Aproximadamente 30% dos casos de tumor de bexiga e pulmão foram pRb negativo. Em 43% de todos os tumores avaliados, incluindo 24% de câncer de pulmão, a imunorreatividade para pRb e p16 pôde ser detectada, indicando que a perda da expressão destas duas proteínas nestas neoplasias parece ser um evento incomum.

Xu et al<sup>112</sup> examinaram 36 casos de carcinoma de pulmão usando a imunohistoquímica com confirmação pelo *Western blot*. A expressão da pRb estava presente em 24 casos e, nos casos com pRb alterada, a neoplasia era significativamente de estágios mais altos (estágios III e IV), sugerindo que a ausência da expressão da pRb pode estar associada com a iniciação ou progressão dos tumores de pulmão. Outro trabalho realizado pelo mesmo autor num estudo imunohistoquímico realizado com 101 casos de tumor de pulmão evidenciou alteração da expressão da pRb em 24%. Nestes casos a expressão alterada da pRb foi considerada um marcador prognóstico independente para diminuição da sobrevida em estágios iniciais.

Em adenocarcinoma de pulmão, Dosaka-Akita et al<sup>113</sup> associaram o estado da pRb com resultados prévios de p21 e p53 e compararam o prognóstico entre os indivíduos com o melhor padrão da expressão do gene no seus tumores e aqueles com pior padrão de expressão, isto é, pRb+/p21- versus pRb-/p21+ e pRb +/p53- versus pRb-/p53+. Nos indivíduos com tumores com expressão pRb-/p21+ a sobrevida foi de 13% em cinco anos, enquanto que naqueles tumores pRb+/p21- a sobrevida foi de 82% em cinco anos. Esta diferença foi significativamente menor ( $p=0,01$ ). Os pacientes com tumores pRb-/p53+ apresentaram uma sobrevida de 20% em cinco anos, enquanto os pacientes com tumores que

expressavam pRb+/p53- apresentaram uma sobrevida de 73% em cinco anos. Da mesma forma, esta diferença foi significativa ( $p=0,008$ ).

A inativação do gene Rb nos carcinomas de células renais e de bexiga foi observada em 6 de 16 casos (38%) de carcinoma de bexiga, sendo que um tinha uma mutação de ponto que produzia um RNAm truncado, três apresentavam grosseira deleção do gene Rb e dois mostravam perda da expressão sem qualquer dano grosseiro no DNA<sup>98</sup>. Ishikawa et al<sup>114</sup> obtiveram resultados semelhantes, com inativação do gene em 28% dos casos, embora só nos tumores invasivos. Isto pode sugerir que a perda da função do Rb está mais envolvida na progressão do câncer da bexiga do que na sua iniciação. Cordon-Cardo et al<sup>109</sup> observaram que os paciente afetados com câncer de bexiga invasivo e com expressão pRb positiva tinham uma sobrevida maior do que aqueles com a expressão alterada da pRb ( $p<0,001$ ). E só um caso de câncer superficial de bexiga (10%) tinha expressão pRb negativa. Estes resultados sugerem que os tumores com expressão pRb diminuída tem potencial biológico mais agressivo do aqueles que apresentam a expressão pRb normal em todas suas células.

Poucos trabalhos existem referentes à expressão da pRb em lesões precursoras do câncer de esôfago. Hausen et al<sup>115</sup>, em estudo de lesões esofágicas, demonstraram que todos os casos de displasia de alto grau foram pRb positivas e 13 de 14 casos de carcinoma *in situ* foram pRb positivos, ambos com expressão aumentada em relação ao epitélio normal. Apenas 11 de 172 casos de carcinoma epidermóide invasivo foram pRb negativos e estão associados com resultados relativamente pobres após ressecção potencialmente curativa.

O estudo da pRb, bem como de outras oncoproteínas, pode promover uma melhor compreensão a respeito da carcinogênese esofágica ou pode ajudar a diferenciar aqueles indivíduos de maior risco, dentre aqueles sob risco para o desenvolvimento de câncer de esôfago.

## METODOLOGIA

O delineamento utilizado para este estudo foi um corte transversal, onde os fatores em estudo foram idade, raça, história familiar de câncer, diagnóstico histológico, cromoscopia com lugol, hábito tabágico (tempo e número de cigarros ou semelhantes consumidos por dia), consumo de álcool (tempo de alcoolismo e doses diárias estimadas em gramas de etanol) e consumo de chimarrão (tempo de consumo e temperatura estimada). O desfecho considerado foi a expressão imunohistoquímica da proteína pRb.

### **Seleção dos pacientes**

Este estudo faz parte do programa de otimização do diagnóstico precoce e estudo do processo carcinogênico de tumores esofágicos da linha de pesquisa de carcinogênese gastrointestinal na área de cirurgia oncológica deste Programa de Pós-Graduação. Foram estudados os casos de 170 pacientes oriundos do banco de dados da tese de doutorado do Dr. Renato Fagundes do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, apresentada em 2000<sup>116</sup>. Naquele trabalho foram estudados 190 pacientes do sexo masculino, com idade igual ou superior a 35 anos, internados na Unidade de Dependentes Químicos do Hospital Psiquiátrico da Universidade Federal de Santa Maria e pacientes em tratamento nos chamados “grupos de apoio” a alcoolistas da cidade de Santa Maria, com período de abstinência menor que um ano. Os pacientes internados foram incluídos no estudo após o desaparecimento dos sinais e sintomas de abstinência do álcool.

Os critérios de inclusão foram:

1. consumo maior do que 80 g de etanol/dia por mais de 10 anos;
2. consumo regular maior do que 10 cigarros ou semelhantes/dia por mais de 10 anos;
3. consumo de chimarrão por mais de 10 anos.

Os critérios de exclusão foram:

1. sinais de encefalopatia de qualquer etiologia;
2. sinais de hepatopatia descompensada (ascite, icterícia);
3. história de hemorragia digestiva alta nos últimos 30 dias;

4. varizes esofágicas;
5. esôfago de Barrett;
6. disfagia;
7. história de alergia ou hipersensibilidade a substâncias iodadas.

No presente estudo, foi utilizada uma amostra controle constituída por 20 pacientes de ambos gêneros, sem limites de faixa etária e que não apresentavam história familiar de câncer, hábito tabágico, uso de álcool ou chimarrão e doenças neoplásicas ou esofágicas prévias. Esta amostra foi selecionada aleatoriamente dentre os indivíduos que foram submetidos a esofagogastroduodenoscopia na Fundação Universitária de Gastroenterologia (FUGAST), de Porto Alegre, e no Hospital Geral de Porto Alegre, mediante concordância e após assinatura de consentimento informado (Anexo nº 3).

### **Exames endoscópicos**

Inicialmente os pacientes foram esclarecidos a respeito da importância do programa. Foram obtidos seus consentimentos (Anexo nº 1) e submetidos a questionário (Anexo nº 2).

Para a realização dos exames endoscópicos, os pacientes foram previamente sedados com midazolam sublingual e tiveram a orofaringe borrifada com aerossol, contendo xilocaína 10%. O instrumental utilizado foi um vídeo-endoscópio Fujinon (EG350HR), pinças de biópsia endoscópica e cânulas de teflon. Foi realizada a inspeção convencional do esôfago, estômago e duodeno. Após, o endoscópio foi retirado até 20 cm da arcada dentária superior, sendo realizada nova inspeção do esôfago com dois movimentos sucessivos de progressão e retirada, tendo como limite inferior a linha Z. As áreas suspeitas foram biopsiadas. Logo após, com o endoscópio posicionado na linha Z e retirado no sentido cranial, foi realizada a cromoscopia com 20 ml de lugol a 3% instilado através da cânula de teflon de forma a cobrir inteiramente o epitélio esofágico, sendo, então, realizada nova inspeção do esôfago. As áreas nitidamente não coradas com tamanho igual ou maior a cinco mm foram biopsiadas. Foram realizadas regularmente duas biópsias no terço médio do esôfago, a 10 e 15 cm da linha Z respectivamente em áreas homogeneamente coradas pelo lugol, obtendo-se dois fragmentos de cada área (controles). Após a esofagoscopia, o estômago e o duodeno foram regularmente examinados e biópsias foram obtidas, sempre que fossem identificadas alterações que necessitassem complementação

diagnóstica anatomopatológica. Todas as biópsias obtidas do esôfago foram estendidas em papel filtro, com o auxílio de dois palitos e, logo após, fixadas em formol a 10 % e coradas pelo método da Hematoxilina & Eosina.

### **Exames histológicos**

O material foi considerado adequado para o estudo histopatológico quando o fragmento estava bem orientado permitindo um corte perpendicular à superfície da mucosa e alcançando, pelo menos, a lâmina própria da mesma. Aqueles considerados inadequados foram excluídos do estudo. Os achados histológicos foram classificados nas seguintes categorias:

1. Achados normais.
2. Esofagite crônica: presença de infiltrado de células mononucleares ou linfoplasmocitárias no epitélio ou na lâmina própria da mucosa, associado com elevação das papilas além do terço superior do epitélio e espessamento da lâmina basal maior do que 15% da espessura epitelial. As esofagites foram classificadas como leves, moderadas e acentuadas, de acordo com o grau de infiltrado linfoplasmocitário encontrado no epitélio ou na lâmina própria.
3. Displasia: presença de células com núcleos hiper cromáticos e aumentados em volume em relação ao restante da célula. As displasias em grau mais leve estariam restritas à lâmina basal do epitélio e as mais acentuadas estender-se-iam por toda a espessura do epitélio, com presença freqüente de mitoses, havendo preservação da lâmina própria. Procurando minimizar a variabilidade inter e intra-observadores, as displasias foram graduadas em baixo e alto grau. As displasias leves foram classificadas como displasias de baixo grau e as displasias moderadas e acentuadas como displasias de alto grau<sup>81</sup>.
4. Carcinoma: presença de células com acentuado pleomorfismo, núcleos volumosos ocupando a maior parte da célula com contornos irregulares e hiper cromasia. Presença freqüente de mitoses e invasão através da lâmina própria.

### **Análise imunohistoquímica**

A análise imunohistoquímica do material fixado em formalina tamponada foi efetuada utilizando os anticorpos monoclonais anti-pRb (DAKO Lab New York, USA) que reconhecem a proteína pRb. Para

determinar a positividade destes anticorpos foi utilizado o método ABC (complexo avidina-biotina-peroxidase) (kit LSAB DAKO). Os anticorpos foram diluídos em 1:25 e o procedimento foi executado no laboratório do Departamento de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre seguindo a sua rotina técnica, que será detalhada a seguir.

Os cortes de 3 a 4  $\mu\text{m}$  foram colocados sobre uma lâmina previamente embebida em solução de organoselano a 3%, permanecendo por, pelo menos, 18 hs em estufa a 40 °C. Após este período as lâminas foram identificadas na sua extremidade esmerilhada (marcadores, controles e numeração), e colocadas na estufa por mais 30 min. Para desparafinização, as lâminas foram colocadas em estufa a 37°C por 24 hs e a 56°C por três a 12 hs. A seguir, foram banhadas seqüencialmente em xilol por dez, cinco e cinco min respectivamente. Para reidratação dos cortes as lâminas foram colocadas em etanol 100%, etanol 95%, etanol 70%, água corrente e água destilada por cinco min em cada. A seguir as lâminas foram lavadas em solução salina tamponada (SST) por cinco min. A fim de realizar a recuperação antigênica, as lâminas foram colocadas em tampão citrato com pH 6,0 e levadas ao microondas por três sessões de cinco min intercaladas por dois min em temperatura ambiente. Após a terceira sessão, as lâminas foram deixadas em temperatura ambiente por 20 min. A seguir, foram lavadas com água corrente, água destilada e em SST por cinco min. Para bloquear a peroxidase endógena as lâminas foram tratadas com peróxido de hidrogênio 5% em água destilada por 20 min em câmara escura, com uma repetição. Depois as lâminas foram lavadas em SST por cinco min. Para bloquear a atividade inespecífica de outras proteínas as lâminas foram deixadas em solução de leite em pó desnatado 5% em SST, em câmara escura por 40 min e, após, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada. Os cortes foram circulosados com caneta Dako Pen (DAKO lab. Inc., New York, NY, USA) e incubados em câmara úmida e escura por 12 a 24 hs com o anticorpo primário anti-pRb (DAKO) diluído em 1:25, em SST. A seguir, foram lavadas com SST por cinco min com uma repetição. As lâminas foram então encubadas com o primeiro reagente do kit LSAB (DAKO) em câmara úmida durante 30 min. Estes passos foram intercalados por duas ou três lavagens das lâminas em SST por cinco min e logo foram encubadas com a streptavidina do kit LSAB em câmara úmida por 30 min após terem sido novamente lavadas em SST por cinco min com duas repetições. O agente cromogênico tetrahidrocloro de diaminobenzedina (DAB) foi pipetado nas lâminas para colorir a reação e quando esta estava adequada, foi bloqueada em água destilada. Em seguida foram

encubadas por 30 seg em hematoxilina de Harris e lavadas em água corrente. Por fim, foram mergulhadas em água amoniacal e lavadas em água corrente, álcool e xilol, e posterior montagem.

A reação imunohistoquímica da proteína pRb fornece uma imagem de forte granulação nuclear de coloração acastanhada produzida pelo DAB com intensidade diversa. Foram considerados positivos os casos em que houve mais de 5% de células coradas por campo microscópico de 400 aumentos<sup>104</sup> na área total da lâmina, através de contagem manual (média de 3500 células). A análise de lâminas de carcinoma de mama foi usada para controles positivos. Os controles negativos foram obtidos através da omissão do anticorpo primário, também em lâminas de carcinoma de mama. Para fins diagnósticos, as lâminas foram analisadas por dois autores. Na vigência de discordância diagnóstica, um patologista foi eleito para confirmação do resultado.

### **Análise estatística**

As variáveis quantitativas foram inicialmente descritas através da média aritmética, desvio padrão e mediana e as variáveis qualitativas através de percentuais. A relação entre a expressão imunohistoquímica da proteína pRb e as variáveis idade, raça, história familiar de câncer, consumo de álcool, tabaco e chimarrão, cromoendoscopia com lugol e achados histológicos foi avaliada em tabelas de contingência, calculando-se percentuais e estimando a razão de chances e seu intervalo de confiança. Para controlar possíveis fatores de confusão, foi utilizada uma análise de regressão logística (incluindo as variáveis idade, raça, história de câncer na família, consumo médio diário de cigarros e semelhantes, tempo de tabagismo, consumo médio diário de álcool e tempo de alcoolismo, tempo de consumo de chimarrão e temperatura estimada do chimarrão). Assim foram obtidas estimativas ajustadas da razão de chances para a relação da expressão imunohistoquímica de pRb e as alterações histológicas. Adicionalmente, foram calculadas medidas de desempenho diagnóstico para a cromoendoscopia com lugol na identificação de áreas com pRb expresso. Foram calculadas a sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo. As decisões sobre a significância da associação entre as variáveis qualitativas foram determinadas pela aplicação do teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando adequados. O teste t foi utilizado para testar a significância das variáveis quantitativas. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. O processamento e a análise dos dados foram executados com o auxílio dos programas EPI-INFO 2000 v 1.0, SPSS v 6.0 e STATA v 5.

## RESULTADOS

### Características da amostra

Foram estudados 170 casos segundo os critérios de elegibilidade descritos anteriormente. Foram excluídos 20 casos do banco de dados original decorrentes de material insuficiente para análise imunohistoquímica. Todos pacientes do gênero masculino com idade variando entre 35 e 69 anos, média (dp) de 45,12 (7,76) e mediana de 44, predominando a raça branca (91%). Todos os pacientes eram usuários de álcool por um período superior a 10 anos, média (dp) de 24 (7,38) anos, com doses diárias variando entre 80 e 800 g de etanol, sendo de 317 g a média de consumo diário. Todos os indivíduos eram tabagistas por mais de 10 anos, sendo que a maioria (92,3%) fumava cigarros e assemelhados há mais de 15 anos, com um consumo médio de 20 ou mais cigarros por dia em 99,4 % dos casos. Todos os pacientes tinham o hábito de tomar chimarrão há, pelo menos, dez anos, sendo que a maioria (80%) fazia a ingestão com água quente.

**Tabela 3. Características dos pacientes quanto ao consumo de álcool (n=170)**

<b>Período de consumo</b>			
Anos	10 – 15	16 – 20	mais de 20
N	20 (11,8%)	35 (20,6%)	115 (67,6%)
<b>Quantidade</b>			
G/dia	80 – 200	201 – 400	mais de 400
N	70 (41,2%)	65 (38,2%)	35 (20,6 %)

O exame endoscópico foi considerado normal em 164 pacientes (96,5%). Em um paciente (0,6%) foi constatada uma lesão elevada cujo exame anatomopatológico definiu como carcinoma epidermóide. Este paciente foi operado e o estudo anatomopatológico da peça cirúrgica demonstrou invasão da mucosa e submucosa, sem comprometimento linfático. Os cinco pacientes restantes (2,9%) apresentavam erosões na mucosa esofágica distal.

**Tabela 4. Características dos pacientes quanto ao consumo de fumo (n=170).**

<b>Período de consumo</b>			
Anos	10 – 15	16 – 20	mais de 20
N	12 (7,1%)	24 (14,1%)	134 (78,8%)

<b>Cigarros/dia</b>			
nº cigarros/dia	10-20	20	mais de 20
N	1 (0,6%)	74 (43,5 %)	95 (55,9%)

**Tabela 5. Características dos pacientes quanto ao consumo de chimarrão (n=170).**

<b>Período de consumo</b>			
Anos	10 – 15	16 – 20	mais de 20
N	32 (18,8%)	24 (14,1%)	114 (67,1%)

<b>Temperatura</b>			
ºC	1	2	3
N	8 (4,7%)	136 (80%)	26 (15,3%)

A cromoendoscopia com lugol demonstrou 25 pacientes (14,7%) com áreas não coradas. Com relação aos achados histopatológicos, a maioria dos pacientes (80,6%) apresentou diagnóstico normal ou de esofagite crônica leve. A relação das áreas não coradas pelo lugol com a histologia está demonstrada na Tabela 6.

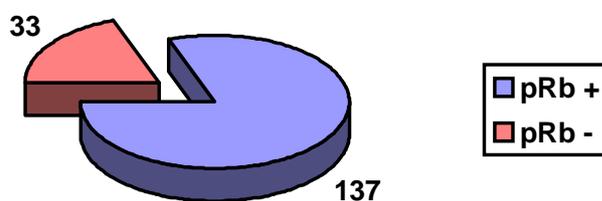
**Tabela 6. Relação das áreas não coradas pelo Lugol com os diagnósticos histológicos.**

Histologia	N	Áreas não coradas pelo lugol	
		F	%
Normal	97	3	3
Esofagite crônica leve	40	9	22
Esofagite crônica moderada	17	4	23
Esofagite crônica severa	3	1	33
Displasia de baixo grau	10	5	50
Displasia de alto grau	2	2	100
Carcinoma	1	1	100
<b>Total</b>	<b>170</b>	<b>25</b>	<b>14,7</b>

p<0,001 ( $\chi^2$  para tendência linear)

#### Expressão imunohistoquímica da proteína pRb

A reação imunohistoquímica produzida pelo anticorpo monoclonal anti-pRb foi considerada positiva em 137 (80,6%) e negativa em 33 (19,4%) dos 170 casos analisados (Figura 5). As figuras de 6 a 10 ilustram alguns dos casos analisados.



**Figura 5. Distribuição da amostra quanto a expressão imunohistoquímica da proteína pRb.**

**Figura 6. Biópsia de esôfago normal com expressão imunohistoquímica negativa para a proteína pRb. As células da lâmina basal e parabasal apresentam núcleos sem a coloração acastanhada característica da imunorreatividade (200 x).**

**Figura 7. Biópsia de esôfago com esofagite crônica leve pRb positivo. Os núcleos das células da lâmina basal e parabasal apresentam a pigmentação acastanhada que indica a imunorreatividade à proteína pRb (100 x).**

**Figura 8. Biópsia de esôfago com esofagite crônica leve. As células da lâmina basal e parabasal apresentam seus núcleos com a pigmentação acastanhada que indica a imunorreatividade à proteína pRb (400 x).**

**Figura 9. Biópsia de esôfago com displasia de baixo grau. As células displásicas apresentam seus núcleos com a pigmentação acastanhada que indica a imunorreatividade à proteína pRb (400 x).**

**Figura 10. Biópsia de esôfago com carcinoma epidermóide invasivo. Os núcleos das células neoplásicas não apresentam a pigmentação acastanhada que indica a imunorreatividade à proteína pRb (400 x).**

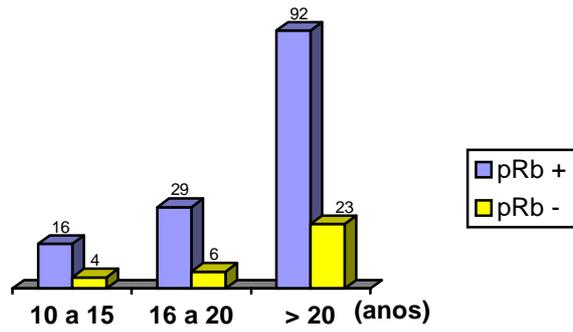
Na análise univariada, não foi demonstrada associação entre a expressão imunohistoquímica da proteína pRb e as variáveis idade e raça. No entanto, foi observado um maior percentual de casos pRb negativo entre os pacientes com histórico de câncer na família (30%) do que entre os pacientes sem a mesma história familiar (12%). Esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0,005$ ) (Tabela 7).

**Tabela 7. Relação da expressão imunohistoquímica da proteína pRb com idade, raça e história de câncer na família**

Variável	pRb – (%)	pRb + (%)	Total
<b>Idade (em anos)</b>			
≥ 50	10 (22,7)	34 (77,3)	44 (25,9)
< 50	23 (18,3)	103 (81,7)	126 (74,1)
			$p = 0,52$
<b>Raça</b>			
branca	31 (20)	124 (80)	155 (91,2)
outras	2 (13,3)	13 (86,7)	15 (8,8)
			$p = 0,74$
<b>Histórico de câncer na família</b>			
negativo	12 (11,9)	89 (88,1)	101 (59,4)
positivo	21 (30,4)	48 (69,6)	69 (41,6)
			$p = 0,005$

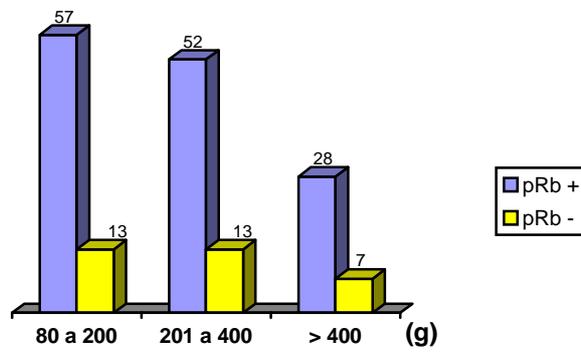
**Relação da expressão imunohistoquímica de pRb com o consumo de álcool, fumo e chimarrão**

Não foi demonstrada relação entre a expressão imunohistoquímica de pRb e o tempo de alcoolismo ( $p=0,93$ ), a quantidade estimada de álcool ingerida por dia ( $p=0,97$ ), o tempo de tabagismo ( $p=0,42$ ), o número de cigarros fumados por dia ( $p=0,86$ ), o tempo de consumo do chimarrão ( $p=0,22$ ) e a temperatura estimada do chimarrão ( $p=0,80$ ) (Figuras 11 a 15).



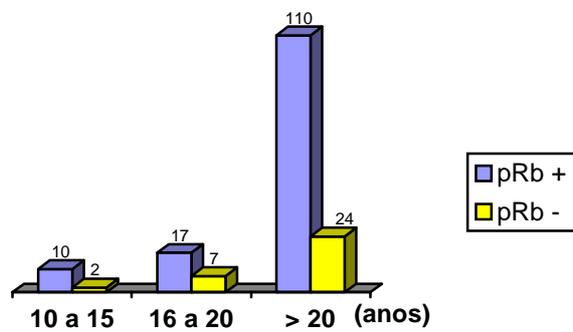
p=0,93

Figura 11. Relação da expressão de pRb com tempo de consumo de álcool.



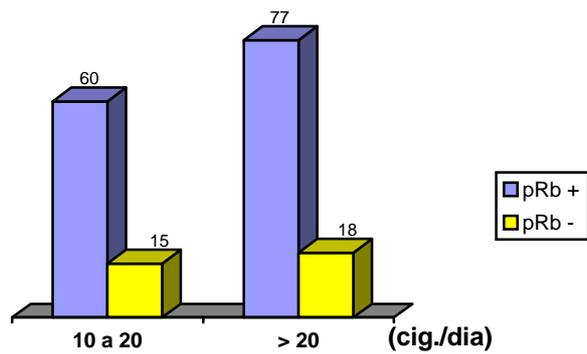
p=0,97

Figura 12. Relação da expressão de pRb com o volume médio estimado de álcool consumido por dia.



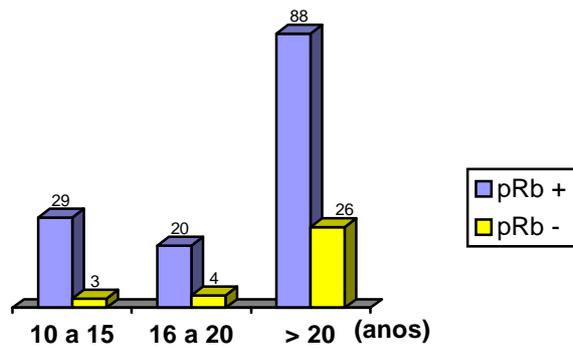
p=0,42

Figura 13. Relação da expressão de pRb com o tempo de tabagismo.



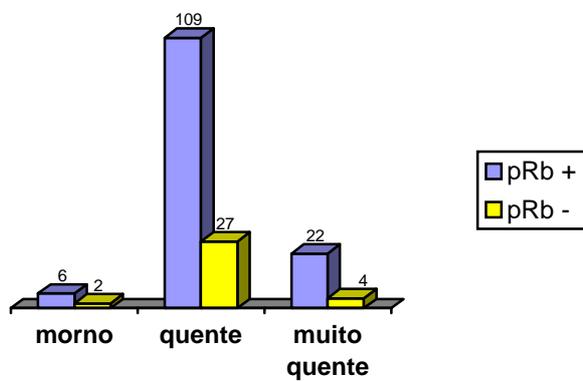
p=0,86

Figura 14. Relação da expressão de pRb com a quantidade de cigarros consumida por dia.



p=0,22

Figura 15. Relação da expressão de pRb com o tempo de consumo de chimarrão.



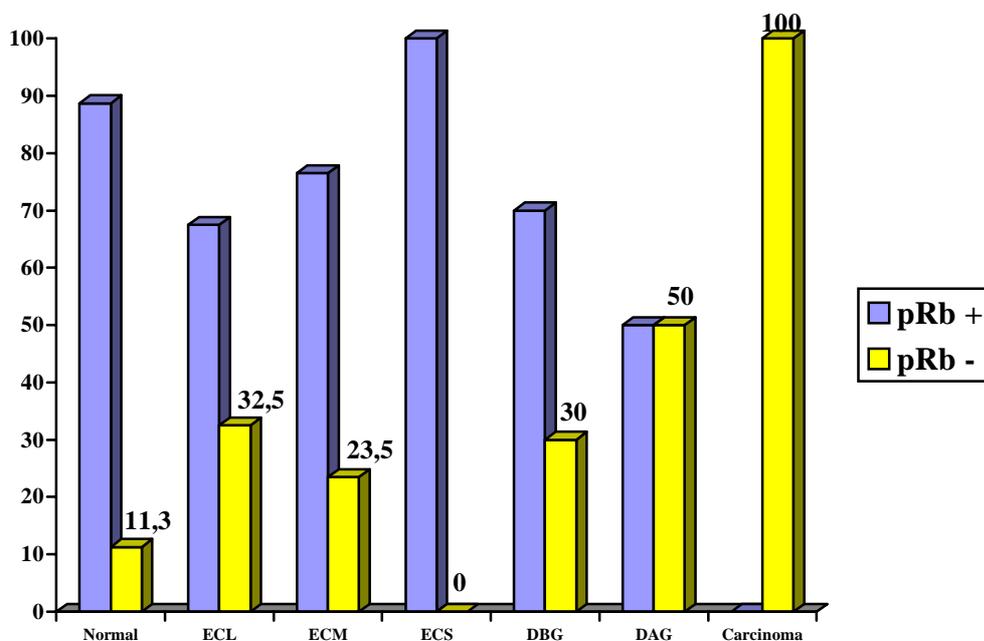
p=0,80

Figura 16. Relação da expressão de pRb com a temperatura estimada do chimarrão.

## Relação da expressão imunohistoquímica da proteína pRb com a cromoendoscopia e a histologia

Foi observada uma associação linear entre os achados histológicos e a expressão de pRb (Figura 17).

Foi utilizada uma tabela de contingência 2X2, para se calcular a sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos das áreas não coradas à cromoendoscopia com lugol para a determinação da expressão imunohistoquímica de pRb (Tabela 8). Os valores obtidos foram: sensibilidade = 24%, especificidade = 87%, valor preditivo positivo = 28% e valor preditivo negativo = 82%.



$p=0,009$  ( $\chi^2$  para tendência linear)

Figura 17. Relação da expressão de pRb com histologia

**Tabela 8. Relação da cromoscopia com a expressão de pRb**

<b>Lugol</b>	<b>pRb – (%)</b>	<b>pRb + (%)</b>	<b>Total</b>
<b>Áreas não coradas</b>	7 (28)	18 (72)	25
<b>Áreas coradas</b>	26 (17,9)	119 (82,1)	145

p=0,24

A razão de chances para a ocorrência de expressão imunohistoquímica da perda de pRb em áreas não coradas pelo lugol é de 1,78 (IC95% = 0,60 – 5,13).

Com o objetivo de controlar potenciais fatores de confusão, foi desenvolvido um modelo de regressão logística com as variáveis pRb, idade, raça, história de câncer na família, exposição ao álcool, fumo e chimarrão e histologia. O indivíduo com história familiar de câncer apresentou uma razão de chances de 3,83 para expressão imunohistoquímica de pRb (Tabela 9). As demais variáveis não apresentaram diferenças significativas.

**Tabela 9. Regressão logística com cálculo da razão de chances para a expressão imunohistoquímica da proteína pRb.**

<b>Variável</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
<b>História de câncer na família</b>	3,83	1,62 –9,04	0,0021

### **Grupo controle**

A amostra utilizada para controle foi constituída de 20 casos, todos da raça branca, sendo a maioria (70%) do gênero feminino e com idade média (dp) de 45 (16) anos. Nenhum integrante do grupo controle apresentava exposição ao álcool, fumo ou chimarrão. Não apresentavam história familiar de câncer e os exames endoscópicos foram considerados normais em todos os componentes. Os achados histopatológicos foram divididos entre mucosa normal (75%) e a presença de esofagite crônica leve (25%). Todas as reações imunohistoquímicas foram positivas para a proteína Rb (Tabela 10).

**Tabela 10. Características do grupo controle.**

Variável	N	%
<b>Gênero</b>		
Masculino	6	30
Feminino	14	70
<b>Idade (anos) *</b>		
Até 50	12	60
> 50	8	40
<b>Raça branca</b>		
	20	100
<b>História de câncer na família</b>		
	0	0
<b>Álcool</b>		
	0	0
<b>Fumo</b>		
	0	0
<b>Chimarrão</b>		
	0	0
<b>Endoscopia normal</b>		
	20	100
<b>Achados anatomopatológicos</b>		
Normal	15	75
Esofagite leve	5	25
<b>Rb positivo</b>	20	100

\* média 45 ± 16 anos

Comparando os grupos de casos e controles, foram constatadas diferenças significativas em relação às variáveis pRb, achados anatomopatológicos (Tabela 11). Não foram encontradas diferenças entre os grupos em relação à variável idade.

**Tabela 11. Comparação entre os grupos de casos e controles**

Variável	Casos (%)	Controles (%)
<b>PRb</b>		
Negativo	33 (19,4)	Zero
Positivo	137 (80,6)	20 (100)
		p = 0,027
<b>Achados anatomopatológicos</b>		
Normal/esofagite leve	137 (80,6)	20 (100)
Alterado	33 (19,4)	NA
		p = 0,027

NA: não aplicável

## DISCUSSÃO

As tentativas de melhorar a sobrevida dos pacientes com CEE têm esbarrado na dificuldade em identificar os pacientes em estágios iniciais e na falta de opções terapêuticas efetivas nos estágios tardios da doença. A baixa frequência de diagnóstico na fase precoce do CEE pode ser atribuída tanto à ausência de sintomas quanto ao difícil reconhecimento das lesões em suas formas precursoras<sup>41</sup>. Uma vez que a sobrevida está intimamente ligada ao grau de invasão tumoral, os benefícios do diagnóstico precoce têm sido enfatizados. Para tentar melhorar o rendimento do método endoscópico no diagnóstico das lesões precursoras ou precoces do câncer do esôfago, tem-se utilizado a cromoscopia que, através do uso de corantes como o lugol ou azul de toluidina, coloca em evidência lesões que não seriam percebidas ao exame endoscópico convencional<sup>41</sup>. As observações realizadas por Li e Yao<sup>34</sup> indicam uma melhora significativa na sobrevida quando o câncer de esôfago é ressecado no estágio precoce. Pacientes com carcinoma *in situ* obtiveram uma taxa de sobrevida em cinco anos de 85 a 100%. A ressecção endoscópica da mucosa alterada pode proporcionar aos pacientes um estilo de vida normal e de alta qualidade<sup>29,47</sup>.

A etiopatogênese do CEE é caracterizada por sua natureza multifatorial. Agentes biológicos, químicos e físicos têm sido identificados como mecanismos de iniciação e progressão neoplásica. Estudos epidemiológicos têm fornecido confiável evidência que o forte consumo de álcool e tabaco isoladamente ou combinados são importantes fatores de risco para o carcinoma do esôfago no Japão e países ocidentais<sup>47</sup>. O risco relativo associado ao uso de tabaco é de 2,4 ( IC 95% 3,0- 76,2) e na população geral é de 54,2%<sup>117</sup>. Quando o tabaco está associado com o uso de álcool foi mostrado um aumento de duas a sete vezes no risco para o desenvolvimento do câncer esofágico<sup>40</sup>. No RS, a exposição da população aos fatores de risco conhecidos para o CEE é muito alta. O consumo excessivo e freqüente de álcool é reconhecido em 8,5 a 31,7% dos homens e em até 18% das mulheres que utilizam os serviços de saúde<sup>41</sup>. O tabagismo é um hábito disseminado mundialmente e isso não é diferente no RS, atingindo 41,8% da população de Porto Alegre<sup>41</sup>. Também o hábito do chimarrão no sul do Brasil parece contribuir para uma maior incidência de CEE nesta área, em comparação com as outras regiões brasileiras. No RS e no Uruguai, diversos estudos têm demonstrado que os indivíduos tabagistas, consumidores de álcool e de chimarrão têm um risco relativo de 1,5 a 12,2 para desenvolver CEE<sup>53</sup>. É possível que o traço hereditário seja um risco que influencia o desenvolvimento do CEE. Influências genéticas têm sido sugeridas uma

vez que se constatou um aumento na incidência de carcinoma esofágico em pacientes com múltiplas neoplasias, principalmente carcinoma do trato gastrointestinal superior, cujo risco é de 3,7% a 30%<sup>10</sup>. Na realidade a associação do CEE com outros carcinomas, como o de cavidade oral, língua, orofaringe e estômago, sugere que a exposição de agentes ambientais comuns como o tabaco pode atuar na gênese de todos estes tumores<sup>99</sup>.

Muitas lesões têm sido descritas na transformação maligna do epitélio esofágico, incluindo a esofagite crônica, o papiloma, a atrofia, a displasia e o carcinoma *in situ*. A alta prevalência destas lesões está associada a uma alta incidência nos membros mais jovens de grupos de alto risco e à presença de lesões multicêntricas e de outros tumores sincrônicos. Os grupos de alto risco de diferentes países têm demonstrado a presença de esofagite crônica em 42% a 84%, atrofia em 3,8% a 10,8% e displasia em 2,4% a 8% dos casos rastreados. Em estudos de rastreamento em zonas de alta incidência, como na província de Henan na China, muitos casos de CEE foram detectados, e sua história natural difere do câncer do esôfago avançado. A média de tempo de evolução do CEE até o estágio avançado é de 32,5 meses, sendo que estes progridem até a morte em 10,5 meses. Estes autores demonstraram que o CEE tem uma razão de crescimento lento e que o tempo de evolução de quatro a cinco anos é comumente observado na progressão do carcinoma *in situ* ao câncer invasivo<sup>15,16</sup>.

No carcinoma de esôfago, tanto a progressão da doença quanto a recorrência precoce estão associadas com o rápido crescimento das células tumorais. Este fenômeno está fortemente relacionado com as expressões de oncoproteínas e a deficiência de oncoproteínas supressoras<sup>100</sup>. No câncer do esôfago inúmeras alterações genéticas têm sido descritas. Estas alterações incluem ampliação de proto-oncogenes, da ciclina D1, bem como perda de alelos ou mutações dentro dos locos dos genes supressores tumorais e de uma variedade de outros genes reguladores do ciclo celular<sup>36,115</sup>. O CEE exhibe múltiplas aberrações dos genes supressores tumorais<sup>71,118</sup>. Um número limitado de estudos evidenciou a perda de alelos e mutações do gene e da proteína Rb. Anormalidades coexistentes em mais de um gene supressor tumoral são encontradas e a função cooperativa de p53 e Rb tem sido proposta<sup>97</sup>. Os mecanismos que inativam o gene Rb incluem mutação de ponto, rearranjos e deleções que podem ser intragênicas ou mais extensivas. Alternativamente, pode ocorrer inativação dos alelos através de outros mecanismos, além da perda. Em amostras tumorais contendo perda da heterozigocidade, 90% dos casos mostram baixa ou ausência da expressão da pRb, embora em amostras sem perda de heterozigocidade Rb, só 20% têm a expressão da pRb alterada. Xing et al<sup>95</sup> evidenciaram uma associação entre perda da heterozigocidade do

gene Rb e alteração da pRb em câncer de esôfago ( $p < 0,0001$ ), sugerindo que a perda da heterozigocidade do gene Rb é um dos principais eventos que conduz à inativação do gene Rb. Além disso, a perda da heterozigocidade foi mais freqüente em tumores com mutações do p53 ( $p < 0,05$ ), confirmando que o efeito sinergista do p53 e pRb na regulação do ciclo celular e apoptose são os maiores mecanismo para a carcinogênese esofágica. No epitélio esofágico normal, a presença de pRb restringe-se à lâmina basal e parabasal, que são consideradas o compartimento proliferativo, suportando a noção que a regulação da pRb está associada à proliferação da célula<sup>104</sup>.

A associação da proteína pRb com o câncer já foi evidenciada em diversos estudos, mas a discussão a respeito do seu valor prognóstico permanece controversa. Horowitz et al<sup>98</sup>, em estudo de carcinoma de bexiga observaram que 38% apresentavam inativação do gene Rb. Ishikawa et al<sup>114</sup> demonstraram uma perda da função do gene Rb em 25% dos carcinomas de bexiga, embora a inativação foi encontrada somente em tumores invasivos. Isto pode sugerir que a perda da função do Rb está mais envolvida na progressão do carcinoma de bexiga do que na sua iniciação. Cordon-Cardo et al<sup>109</sup>, em estudo de câncer de bexiga, demonstraram pior prognóstico nos casos com expressão diminuída da pRb. Xu et al<sup>112</sup> obtiveram resultados semelhantes na análise de carcinoma pulmonar não de pequenas células. Em contraste, no câncer colorretal, não houve nenhuma associação com o prognóstico<sup>110</sup>.

O intuito deste trabalho foi de colaborar na elucidação da carcinogênese esofágica através do estudo da participação do gene Rb, bem como estabelecer estratégias de rastreamento, identificação e controle dos indivíduos sob risco para o desenvolvimento desta neoplasia a fim de alcançar, desta forma, melhores índices de diagnóstico precoce. Além de determinar a prevalência da ausência de expressão imunohistoquímica da proteína pRb, procurou-se identificar alguma associação desta expressão com a idade, raça, história familiar de câncer, exposição ao tabaco, álcool e chimarrão, bem como com os achados histológicos e com a cromoscopia na mucosa esofágica da amostra estudada. Na análise univariada foi constatada uma associação significativa entre imunorreatividade negativa à pRb e história familiar de câncer, confirmada na análise multivariada. No entanto, não há relatos a este respeito na literatura, até o presente momento.

O relato da expressão imunohistoquímica da pRb em indivíduos assintomáticos e sob risco para o CEE é raramente encontrado na literatura. Fagundes<sup>116</sup> realizou um trabalho na mesma população avaliada pelo presente estudo, determinando a expressão imunohistoquímica da proteína p53 na mucosa esofágica. Seus resultados permitem especular que na esofagite crônica e mesmo no epitélio considerado

normal poderia estar ocorrendo uma proliferação acelerada das células escamosas em resposta à agressão genotóxica proporcionada pelo fumo e álcool e, possivelmente, por outros fatores ambientais. No presente estudo a exposição ao álcool, tabaco e chimarrão, não foram fatores significantes para determinar a perda de expressão da pRb, sugerindo que estes fatores isoladamente não poderiam determinar o risco para o CEE. Existe, provavelmente, um mecanismo genético envolvido na resposta do ciclo celular aos potenciais agentes carcinogênicos.

A expressão da pRb em lesões esofágicas tem sido apresentada em diversos trabalhos, principalmente em relação ao câncer do esôfago. Kato et al realizaram um estudo imunohistoquímico em câncer de esôfago no qual a expressão foi positiva em 71,4%<sup>119</sup>. Jian et al<sup>105</sup> demonstraram perda da expressão da pRb em 17% dos casos de carcinoma epidermóide de esôfago, enquanto outros pesquisadores relataram perda da pRb em mais de 31%<sup>104,114</sup>. Hausen et al<sup>115</sup> demonstrou que a proteína pRb pode ser detectada em alta percentagem no carcinoma epidermóide de esôfago e nas lesões precursoras e que os tumores sem expressão de pRb estão associados a pior prognóstico, mas sem impacto significativo. Já Ikeguchi et al<sup>7</sup> demonstraram perda da função da pRb em 43% dos casos e concluíram que a expressão de pRb anormal parece estar fortemente associada com o desenvolvimento do CEE. No nosso estudo, foi constatada uma proporção linear de imunorreatividade negativa à pRb com os achados histológicos, indicando uma maior proporção de casos pRb negativos na medida em que se verifica a evolução do epitélio normal até o carcinoma, passando pela esofagite crônica e displasia. Isto permite sugerir que, de fato, a inativação do gene Rb atua na carcinogênese esofágica.

A utilização da cromoendoscopia com lugol tem mostrado ser um método útil na abordagem diagnóstica dos pacientes sob risco para o CEE<sup>87,99</sup>. No presente estudo foi avaliada a cromoendoscopia com lugol na detecção de lesões precursoras e determinada a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo. A cromoendoscopia com lugol apresenta baixa sensibilidade e alta especificidade para identificação de áreas que expressem a perda da proteína pRb. Esta associação não foi significativa. No entanto, a linearidade da ocorrência de áreas não coradas relacionadas com a gravidade das alterações histológicas<sup>89</sup> sugere ser a cromoendoscopia com lugol de grande auxílio na identificação endoscópica de áreas alteradas na mucosa esofágica que possam apresentar alterações histológicas de maior gravidade. A combinação de métodos parece ser essencial na identificação de lesões precursoras nos indivíduos sob risco para o CEE, já que nenhum dos métodos atualmente utilizados preenche os requisitos de um teste ideal. Dentro desta proposta de combinação de métodos parece estar também o

estudo de outros marcadores moleculares além do Rb, como o bcl-2, o p53, a ciclina D1 e o c-myc. Porém, não existem, até o momento, dados que avaliem a prevalência conjunta de todas as mutações genéticas. Faz-se necessário obter um mapeamento amplo e conjunto destas alterações moleculares para predizer de forma adequada o papel das mesmas.

Os padrões de imunorreatividade da proteína pRb apresentam relativa variação e isto pode ser decorrente de formas distintas de interpretação do resultado da reação imunohistoquímica, além da técnica utilizada. Diferenças técnicas podem ser observadas nos vários tipos de fixação, anticorpos, métodos de recuperação antigênica, escores e critérios de positividade. A ausência de imunorreatividade, isto é, a pRb negativa, pode variar de menos de 20% até próximo de 60 % dos casos, dependendo da amostra estudada, material examinado e, principalmente, dos critérios para interpretação da reação. Alguns autores<sup>113,114</sup> consideraram positiva a lâmina onde apenas uma célula neoplásica apresentou a reação. Outros<sup>109,114,115</sup> adotaram um escore semiquantitativo baseado no percentual de células imunorreativas, enquanto que Gerardts et al<sup>111</sup> adotaram uma classificação dependente da intensidade da coloração. É necessário observar, porém, que em todos os relatos pesquisados a análise foi feita em tumores. Entretanto, conforme registrado anteriormente, no epitélio esofágico normal a presença da pRb está restrita à lâmina basal e parabasal. Portanto, no presente estudo, considerou-se positivo o teste em que mais do que 5% das células da lâmina basal do epitélio apresentaram imunorreatividade.

Há outro aspecto a ser considerado na análise imunohistoquímica da proteína pRb. Nesta técnica, o anticorpo monoclonal anti-pRb não pode diferenciar uma proteína íntegra, truncada ou mutada<sup>104</sup>. Reconhece apenas a proteína pRb nas suas formas hipofosforilada e hiperfosforilada, mas sem distingui-las<sup>7</sup>. Como a pRb hiperfosforilada corresponde à sua forma inativa e permite a progressão da célula alterada no ciclo celular, seguindo à fase S, sua detecção pela imunohistoquímica representa um achado falso positivo no grupo pRb positivo. Conseqüentemente, na técnica de imunohistoquímica para avaliação da funcionalidade do gene Rb, os casos de pRb positivos são superestimados, uma vez que a proteína, na sua forma inativa, não é diferenciada. Bookstein, em estudo sobre carcinoma de próstata, demonstrou que 90% dos casos foram pRb positivos, sendo que em um dos casos as células tumorais foram pRb negativas. Entretanto, o núcleo das células endoteliais adjacentes apresentava-se corado, atuando como controle interno. A falha na coloração da pRb foi considerada como conseqüência a uma mutação no gene Rb. Nas células onde houve perda da pRb foi usado o método imunohistoquímico para confirmar que as células tumorais não apresentavam o núcleo corado. Este método também serve para distinguir as

células benignas das malignas e identificar qual delas está positiva para a pRb. Já nos casos pRb negativos utilizou-se método de análise genômica. Um estudo mais detalhado do gene Rb no nível de seqüenciamento do DNA seria requerido para confirmar a perda da função da proteína. A análise por *immunoblot*, demonstrando a perda da expressão da proteína Rb ou encurtamento da mesma, provou ser um indicador sensível de mutação do gene Rb em vários tipos de cultura de células tumorais<sup>120</sup>. Também a análise molecular por PCR pode mostrar-se mais sensível, uma vez que detecta as mutações do gene Rb enquanto que a imunohistoquímica detecta somente o acúmulo celular da proteína alterada. No entanto, a técnica da PCR tem custo elevado e é pouco apropriada para rastreamento, enquanto que a imunohistoquímica é menos onerosa e de realização mais fácil, podendo ser efetuada na maioria dos laboratórios de patologia, além de apresentar uma alta correlação com os métodos que utilizam a PCR.

Neste estudo ficou demonstrado que pacientes expostos ao álcool, fumo e chimarrão, considerados sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago, apresentaram ausência da expressão da pRb em 17,5% dos casos cuja análise histopatológica demonstrou epitélio normal ou esofagite leve, em 20% dos casos de esofagite moderada e severa e em 38,5% das displasias de baixo e alto grau e carcinoma *in situ*. Estes achados permitem sugerir que estes indivíduos possam ser candidatos a uma maior vigilância ou mesmo a intervenções na tentativa de sustar o processo evolutivo por meio de quimioprevenção, já que em diversos trabalhos ficou demonstrado que pacientes com carcinoma pRb negativo apresentam menor sobrevida, maior risco de invasão e metástases e, portanto, pior prognóstico<sup>7,113</sup>. Além disso, nos casos em que a expressão da pRb é positiva, ainda pode ocorrer resultado falso positivo pelo método empregado, pois anormalidades como pequenas deleções e desarranjos de seqüência ou mutações de ponto, como proteína truncada ou proteína no estado hiperfosforilado não são diferenciadas pela imunohistoquímica<sup>98,104</sup>. Possivelmente o seguimento destes indivíduos, em um estudo dinâmico, possa trazer maiores esclarecimentos relacionados a este tema.

## **CONCLUSÕES**

A prevalência da expressão imunohistoquímica da proteína pRb negativa na amostra estudada foi de 19,4%.

Foi demonstrada uma associação linear entre a expressão da pRb negativa e os achados histopatológicos.

Não foi demonstrada associação entre a expressão da pRb negativa com idade, raça e exposição ao tabagismo, álcool e chimarrão.

Não foi demonstrada associação entre a expressão da pRb negativa com as áreas não coradas pelo lugol.

## **PERSPECTIVAS**

Melhores investigações esclarecerão o papel dos oncogenes e genes supressores tumorais na patogênese de numerosas doenças. Os produtos destes genes, que estão envolvidos na regulação e execução do ciclo celular, são potenciais alvos para diagnóstico e intervenção terapêutica nas doenças, e oferecem renovadas esperanças para tratamentos de uma variedade de enfermidades. Novos agentes terapêuticos para o câncer que visam induzir apoptose especificamente em células neoplásicas são fontes de animosidade e esperança renovadas para se chegar às curas. As terapias em potencial estão contidas em duas categorias: terapia gênica e moléculas reguladoras dos genes envolvidos com o ciclo celular. A compreensão do processo fisiológico do ciclo celular em nível molecular também abre novos caminhos para o desenvolvimento de fatores diagnósticos, prognósticos, além dos já comentados terapêuticos. Os métodos de detecção das mutações gênicas ou perdas protéicas permitirão um diagnóstico precoce das doenças que estão envolvidas com anomalias do ciclo celular. A avaliação de mutações nos genes relacionados com a apoptose já está em uso para uma série de tumores, reformulando os conceitos prognósticos. No futuro, estas aferições permitirão uma melhor seleção de terapias oncológicas específicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FEARON ER, VOLGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67.
2. FACCINI FP, TONETO JE, MOREIRA LF. Molecular screening in esophageal cancer. *South-American J Cancer* 1997; 1: 272-280.
3. TYGAT GNJ. Benign and malignant tumors of the esophagus. *Gastroenterologic Endoscopy* 1987; 56: 373-400. WB Saunders, Philadelphia.
4. BRUCE A . *Biologia molecular da célula* 3<sup>th</sup>edition 1997; 17: 863-911.
5. GASSON AG, TAMMEMAGI M, ESKANDARIAN S, REDSTON M, MC LAUGHLIN J, OZCELIK H. p53 alterations in esophageal cancer: association with clinicopathological features, risk factors, and survival. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1998; 51: 71-79.
6. WEINBERG RA. Tumor Suppressor Genes. *Science* 1991; 254(22): 1138-45.
7. IKEGUCHI M, OKA S, TSUJITANI S. Clinical significance of retinoblastoma protein expression in esophageal squamous cells carcinoma. *J Surg Oncol* 2000; 73(2): 104-108.
8. TEICH NM. *Oncogenes and cancer*. 3<sup>rd</sup> edition. Cellular and molecular biology of cancer. Oxford University press 1997; 186-90.
9. HENNESSY TPJ. Cancer of the esophagus. *Post Med J* 1996; 72: 458-463.
10. RIBEIRO JR U, POSNER MC, SAFATLE-RIBEIRO AV, REYNOLDS JC. Risk factor for squamous cell carcinoma of the esophagus. *Br J Surg* 1996; 86: 1174-1185.
11. ROTH JA. Cancer of the esophagus. *Principles and practice of Oncology*. 5<sup>th</sup> edition, De Vita VT, Hellmam S, Rosemberg S. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997. pp 980-998.
12. POTTERN LM, MORRIS LE, BLOT WJ, ZIEGLER RG, FRAUMENI JR F. Esophageal cancer among black men in Washington, D. C. 1. Alcohol, tobacco, and other risk factors. *J. Natl. Cancer Inst* 1981; 67: 777-83.
13. JOINT IRAN-INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER STUDY GROUP. Esophageal cancer studies in the Caspian littoral of Iran: results of population studies- a prodome. *J Natl Cancer Inst* 1977; 59: 1127-1138.
14. MUÑOZ N, CRESPI M, GRASSI A, QING WG, QIONG S, CAI LZ. Precursor lesions of oesophageal cancer in high-risk populations in Iran and China. *Lancet* 1982; 17: 876-879.

15. CHANG-CLAUDE JC, WAHRENDORF J, LIANG QS, GUANREI Y, MUÑOZ N, CRESPI M, et al. An epidemiological study of precursor lesions of esophageal cancer among young persons in high-risk population in Huixian, China. *Cancer Res* 1990; 50: 2268-2274.
16. CHEN ZF, HOU J, LIN PS. A study survey of esophagus cancer in Lixian of Hebei. *Chin J Cancer Prev Treat Res* 1998; 25:73-75.
17. SIMONATO L, FRANCESCHI S, ZAMBON P. A population at high risk for esophageal cancer in the northeast of Italy. *Mutat Res* 2000; 462: 355-63.
18. PROLLA JC, DIETZ J, COSTA LA . Diferenças geográficas na mortalidade por câncer de esôfago no Rio Grande do Sul. *Rev Assoc Med Bras* 1993; 39(4): 217-20.
19. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER: Estimativa de Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil (2001). Disponível na Internet em 17/03/2001: <http://www.inca.org.br/>.
20. PROLLA JC, FURTADO JD, BARCELOS LB. Alguns aspectos da epidemiologia do câncer do esôfago no Rio Grande do Sul, Brasil, 1970-1979. Porto Alegre, *Revista Ass Med AMRIGS* 1983; 27(1): 26-32.
21. MOSES MF. Carcinoma de células escamosas do esôfago. História natural, incidência, etiologia e complicações. *Gastroenterol Clin N Am* 1991; 20(4): 725-737.
22. BLOT WJ, MC LAUGHLIN JK The changing epidemiology of esophageal cancer. *Seminars in Oncology* 1999; 26(5 suppl): 2-8.
23. SPECHLER SJ. Adenocarcinoma and Barrett's Esophagus. *Gastrointestinal Disease Today* 1996; 5(2):11-18.
24. LAGERGREN J., BERGSTROM R., LINDGREN A, et al. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine* 1999; 340 (11): 825-831.
25. BARROS SG, VIDAL RM, LUZ LP, BARLEM GG, KRUEL CD, PROLLA JC, et al. Prevalence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction in a 10-year period at a referral center in Southern Brazil. *Arq Gastroenterol* 1999; 36(1): 32-6.
26. DALY JM, FRY WA, LITTLE A.G, WINCHESTER DP. Esophageal cancer: results of an College of Surgeons Patient Care Evaluation Study. *J Am Coll Surg* 2000; 190(5): 562-72.
27. SCHOTTENFELD D. Epidemiology of cancer of the esophagus. *Semin Oncol* 1984; 11: 92-100.

28. BRENTANO L, SCHIRMER CC, GURSKI R. Curability of epidermoid carcinoma of esophagus: Experience of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre 1990, XXVII World Congress of International College of Surgeons (abstract).
29. MOREIRA LF, KAMIKAMA Y, NAOMOTO Y, HAISA M, ORITA K. Endoscopic mucosal resection for superficial carcinoma and high-grade dysplasia of the esophagus. *Surgical Laparoscopic & Endoscopy* 1995; 5(3): 171-175.
30. TEIXEIRA CR, INOUE K, HARUMA K, et al. Strip biopsy for the diagnosis and treatment of superficial esophageal dysplasia in: *Recent advances in disease of the esophagus*, 1<sup>st</sup> ed. Berlin: Springer- Verlag 1993; 564-7.
31. GUANREI Y, SONGLIANG Q, HE H, GUIZEN F. Natural history of early esophageal carcinoma and early adenocarcinoma of the gastric cardia in the people's Republic of China. *Endoscopy* 1988; 20: 95-8.
32. DAWSEY SM, LEWIN KJ, WANG GQ, LIU FS, NEIEBERG RK, YU Y et al. Squamous esophageal histology and subsequent risk squamous cell carcinoma of the esophagus. A prospective follow up study from Linxian, China. *Cancer* 1994; 74(6): 1686-1692.
33. DAWSEY SM, YU Y, TAYLOR PR, SHEN Q, SHU YJ, WANG G, et al. Esophageal cytology and subsequent risk of esophageal cancer: A prospective follow-up study from Linxian, China. *Acta Cytol* 1994; 38(2): 183-192.
34. LI H, YAO SC. Surgical treatment for carcinoma of the oesophagus in chinese language publications. *Br J Surg* 1997; 84 (6): 855-857.
35. ADACHI W, KOIKE S, NIMURA Y, et al. Clinicopathologic characteristics and postoperative outcome in Japanese and Chinese patients with thoracic esophageal cancer. *World J. Surg* 1996; 20: 332-36.
36. MONTESANO R, HOLLSTEIM M, HAINAUT P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer* 1996; 69:225-235.
37. CORREA P. Precursors of gastric and esophageal cancer. *Cancer* 1982; 50 suppl 11: 2554-65.
38. DOWLATSHANI K, DANESHBOOD A , MOBARHAN S. Early detection of cancer of oesophagus along Caspian littoral. Report of a pilot project. *Lancet* 1978; 21: 125-6.
39. YU MC, GARABRANT DH, PETERS JM, MACK TM. Tobacco, alcohol, diet, occupation and carcinoma of the esophagus. *Cancer Res* 1988; 48(13): 3843-3848.

40. SIEMIATYCKI J, KREWSKI D, FRANCO E, et al. Associations between cigarette smoking and each of 21 types of cancer: a multi-site case-control study. *International Journal of Epidemiology* 1995; 24(3): 504-514.
41. FAGUNDES RB, BARROS SGS, PÜTTEN ACK, MELO ES, FREITAG CPF, et al. Carcinoma epidermóide e displasia do esôfago em indivíduos sob risco. *GED* 1998; 17(4): 129-34.
42. BUSNELLO E, LIMA BR, BERTOLOTE JM, GOMES R. Psychiatric disorders in primary health care settings: incidence or prevalence? In: *Who Int. Conference on classification on diagnosis of mental disorders and alcohol and drugs-related problems*. Demark 1982; 13-1.
43. DUNCAN B. As desigualdades sociais na distribuição de fatores de risco para as doenças não transmissíveis. Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica. Faculdade de medicina da Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.
44. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. COORDENAÇÃO NACIONAL DE CONTROLE DE TABAGISMO E PREVENÇÃO PRIMÁRIA - CONTAPP. "Falando Sobre Tabagismo". Rio de Janeiro, 1996. Disponível na internet em 30/08/2001: [www.inca.org.br/](http://www.inca.org.br/)
45. ZAMBON P, TALAMINI R, LA VECCHIA C, DAL MASO L, NEGRI E, TOGNAZZO S, et al. Smoking, type of alcoholic beverage and squamous-cell cancer in northern Italy. *Int. J. Cancer* 2000; 86(1): 144-9.
46. LAGERGREN J, BERGRSTRÖM R, LINDREN A., NYRÉN O. The role of tobacco, snuff and alcohol use in the etiology of cancer of the esophagus and gastric cardia. *Int J Cancer* 2000; 85(3): 340-46.
47. YOKOYAMA A, OHMORI T, MAKUUCHI H, MACHIMURA T, MIZUTANI K, MARUYAMA K, et al. Successful screening for early esophageal cancer in alcoholics using endoscopy and mucosa iodine staining. *Cancer* 1995; 76(6): 928-933.
48. YIN SJ, CHOU FJ, CHAO SF, TSAI SF, LIAO CS, WANG SL, et al. Alcohol and dehydrogenase in human esophagus: Comparison with the stomach enzyme activities. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17(2): 376-81.
49. GHADIRIAN P. Family History of Esophageal Cancer. *Cancer* 1985; 56: 2111-2116.

50. WAHRENDORF J, CHANG-CLAUDE J, LIAN QS, GUANREY Y, MUNÓZ N, CRESPI M, et al. Precursor lesions of oesophageal cancer in Young people in high-risk population in China. *Lancet* 1989; 2: 1239-41.
51. DE STEFANI E, MUNÓZ N, ESTEVE J, et al. Mate drinking, alcohol, tobacco, diet, and esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Research* 1990; 50(2): 426-431.
52. MUNÓZ N, VICTORA CG, CRESPI M, SAUL C, BRAGA NM, CORREA P. Hot mate drinking and precancerous lesions of the oesophagus: an endoscopic survey in southern Brazil. *Int J Cancer* 1987; 39(6): 708-9.
53. VICTORA CG, MUNÓZ N, DAY NE, BARCELOS LB, PECCIN D, BRAGA NM. Hot beverages and oesophageal cancer in southern Brazil: a case control study. *Int J Cancer* 1987; 39: 710-6.
54. BARROS SGS. Detecção de lesões precursoras em indivíduos sob risco para o carcinoma epidermóide do esôfago. Tese de Doutorado da UFRGS – Pós-graduação em Medicina: Clínica Médica – 1992.
55. BARROS SGS, GHISOLFI ES, DIETZ J, GRUBER AC, KRUEL CD, PROLLA JC, et al. High temperature mate infusion drinking in a population at risk for squamous cell carcinoma of the esophagus. *Arq Gastroenterol* 2000; 37(1): 25-30.
56. SANDLER RS, NYRÉN O, EKBOM A, EISEN GM, YUEN J, JOSEFSSON S. The risk of esophageal cancer in patients with achalasia. A population-based study. *JAMA* 1995; 274(17): 1359-62.
57. CECONELLO I, ZILBERSTEIN B, ISHIOKA A , POLLARA W, LEMOS AM, VENÇO FE. Precancerous esophageal lesions. *Dig Dis Sci* 1986; (suppl): 80.
58. APPLEQVIST P, SALMO M. Lye corrosion carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1980; 45: 2655.
59. VANAGUNAS A, JACOB P, OLINGER E. Radiation-induced oesophageal injury: a spectrum from esophagitis to cancer. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 808-12.
60. KOKUDO N, SANJO K, UMEKITA N, HARIHARA Y, TADA Y, IDEZUKI Y. Squamous cell carcinoma after endoscopic injection sclerotherapy for esophageal varices. *Am J Gastroenterol*, 1990; 85: 861-63.
61. TAYLOR PR, LI B, DAWSEY SM, LI J, YANG CS, GUO W, et al. The Lixian nutrition intervention trials study group. *Cancer Res* 1994; 54: 2029-31 (suppl).

62. FONG LYY, PEGG AE, MAGEE PN. Difluoromethylornithine inhibits N-nitroso-methylbenzylamine-induced esophageal carcinogenesis in zinc-deficient rats: effects on esophageal cell proliferation and apoptosis. *Cancer Res* 1998; 58: 5380-5388.
63. KRUEL CDP. Classificação citopatológica das lesões precursoras do carcinoma escamoso do esôfago: modelo experimental em camundongos. Tese de doutorado da Escola Paulista de Medicina, São Paulo 1992.
64. SUGIMACHI K, SUMIYOSHI K, NOZOE T, YYASUDA M, WATANABE M, KITAMURA K, et al. Carcinogenesis and histogenesis of esophageal carcinoma. *Cancer* 1995; 75(6): 1440-45.
65. CHEN LH, BOISSONNEAULT GA, GLAUERT HP. Vitamin C, vitamin E and cancer (review) *Anticancer Res* 1989; 8(4): 739-48.
66. CHANG F, SYRJÄNEN S, SYRJÄNEN K. Infectious agents in the etiology of esophageal cancer. *Gastroenterology* 1992; 103: 1336-48.
67. FIDALGO PO, CRAVO MLL, CHAVES PP, LEITÃO CN, MIRA FC. High prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma and matched normal esophageal mucosa: assessment by polimerase chain reation. *Cancer* 1995; 76(9): 1522-28.
68. WESTON AC. Associação entre o carcinoma epidermóide do esôfago e a presença do papilomavírus humano detectado pelo método da captura híbrida II. Tese de Doutorado em Clínica Médica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Janeiro de 2001.
69. EGASHIRA A, KAWAGUCHI M, KITAMU RK, SUMINACHI K. Family aggregation of carcinoma of the Hipopharynx and cervical Esophagus: special reference to multiplicity of cancer in aerodigestive tract. *Int J Cancer* 1998; 76(4): 468-71.
70. WEISER HF, LANGE R, FEUSSNER H. How can we diagnose the early stage of esophageal cancer? *Endoscopy* 1986; 18: 2-10.
71. HUANG Y, MELTZER SJ, YIN J, TONG Y, CHANG EH, SIRVASTAVA S, et al. Altered messenger RNA and a unique mutational profiles of p53 and RB in human esophageal carcinomas. *Cancer Res* 1993; 53: 1889-94.
72. JIAN W, KAHN SM, TOMITA N, ZHANG YJ, LU SH, WEINSTEIN IB. Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 2980-83.
73. LEVINE DS. Barrett's esophagus and p53. *Lancet* 1994; 344:212-213.

74. REID BJ, GALIPEAU PC. The cell cycle, genomic instability, and clonal evolution in Barrett's esophagus. In Fortner JG, Sharp PA. Accomplishments in cancer research. Philadelphia: Lippincott 1994; 99-112.
75. MELTZER SJ, YIN J, MANIN M, RHYU MG, COTTRELL J, HUDSON E, et al. Microsatellite instability occurs frequently and in both diploid and aneuploid cell population of Barrett's-associated esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 1997; 54: 3379-82.
76. LU SH, SHIEH LL, LUO FC, WEINSTEIN IB. Amplification of the EGF receptor and c-myc genes in human esophageal cancer. *Int J Cancer* 1988; 45: 502-505.
77. RIBEIRO Jr U, CECCONELLO I, SAFATLE-RIBEIRO AV, ZILBERSTEIN B, PINOTTI HW. Squamous cells carcinoma of the esophagus and multiple primary tumors of the upper aerodigestive tract. *Arq Gastroenterol* 1999; 36(4): 195-200.
78. GUARNEI Y, SONLIANG O. Endoscopic surveys in high-risk and low-risk populations for esophageal cancer in China with especial reference to precursor of esophageal cancer. *Endoscopy* 1987; 19: 91-5.
79. HOPKINS RA, POSTLEWAIT RW. Caustic burns and carcinoma of the esophagus. *Ann Surg* 1982; 144-146.
80. SCHLEMPER RJ, DAWSEY SM, ITABASHI M, IWASHITA A, KATO Y, KOIKE M, et al. Differences in diagnostic criteria for esophageal squamous cell carcinoma between Japanese and Western pathologists. *Cancer* 2000; 85(5): 996-1006 (abstract)
81. DAWSEY SM, LEVIN KJ. Histologic precursors of squamous esophageal. *Pathol Annu* 1995; 30 (pt1): 209- 226.
82. JASKIEWICK K, BANACH L, MAFUNGO V, KNOBEL GJ. Oesophageal mucosa in a population at risk of esophageal cancer: Post-mortem studies. *Int J Cancer* 1992; 50: 32-5.
83. JACOB P, KAHRILAS PJ, DESAI T, HIDVEGI D, WALLOCH J, YOKOO H, et al. Natural history and significance of esophageal squamous cell dysplasia. *Cancer* 1990; 65: 2731-9.
84. KITAMURA K, KUWANO H, YASUDA M, SONODA K, SUMIYOSCHI K, TSUTSUI S, et al. What is the earliest malignant lesion in the esophagus? *Cancer* 1996; 77: 1614-19.
85. BOND JH. Screening, detection and early diagnosis of gastrointestinal cancer. In Wanebo HJ. Ed. *Surgery for Gastrointestinal Cancer: Multidisciplinary approach*. Lippincott-Raver publishers, Philadelphia 1997 pp. 23-30.

86. ENDO M, TAKESHITA K, YOSHIDA M. How can we diagnose the early stage of esophageal cancer? *Endoscopy* 1986; 18: 11-8.
87. FREITAG CPF, BARROS SGS, KRUEL CDP, PUTTEN ACK, FAGUNDES RB, PROLLA JC, et al. Esophageal dysplasias are detected by endoscopy with lugol in patients at risk for squamous cell carcinoma in southern Brazil. *Diseases of the esophagus* 1999; 12: 191-5.
88. FAGUNDES RB, BARROS SGS, PÜTTEN ACK, MELLO ES, WAGNER MB, BASSI LAP, et al. Occult dysplasia is disclosed by lugol chromoendoscopy in alcoholics at high risk for squamous cell carcinoma of the esophagus. *Endoscopy* 1999; 31(4): 281-5.
89. KUMAGAI Y, MAKUUCHI H. *Practical Fiberoptic Esophagoscopy*. 1<sup>st</sup>ed. Tokyo: Igaku-Shoin; 1987: 95.
90. LICHTENFELS P, BARRIOS CH, MOREIRA LF. Apoptose: morte celular programada. In: Lerner L. ed. *Acta Medica* 1999. EDIPUCRS. Porto Alegre, RS, 298 – 311.
91. CARSON DA, RIBEIRO JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993; 341: 1251-1254.
92. STEWART BW. Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1286-1296.
93. KORSMEYER SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992; 80: 879-886.
94. KNUDSON JR, AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Nat Acad Sci USA* 1971; 68(4): 820-823.
95. XING EP, YANG G-Y, WANG L-D, SHI ST, YANG CS. Loss of heterozygosity of the rb gene correlates with p16 protein expression and associates with p53 alteration in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1231-1240.
96. SCHRUMP DS, MATTHEWS W, CHEN GA, MIXON A, ALTORKI NK. Flavopiridol mediates cell cycle arrest and apoptosis in esophageal cancer cells. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2885-2890.
97. HUANG Y, BOYTON RF, BLOUNT PL, SILVESTEIN J, YIN J. Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancers. *Cancer Res* 1992; 52: 6525-6530.
98. HOROWITZ JM, PARK S-H, BOGENMANN E, CHENG J-G, YANDELL DW, KAYE FJ, et al. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2775-79.

99. STEMMERMANN G, HEFFELFINGER SC, NOFFSINGER A, HUI YZ, MILLER MA, FENOGLIO-PREISER CM. The molecular biology of esophageal and gastric cancer and their precursors: oncogenes, tumor suppressor genes, and growth factors. *Hum Pathol* 1994; 25: 968-981.
100. CORDON-CARDO C. Mutation of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for Human Neoplasia. *Am J Pathology* 1995; 147(3): 545-55.
101. DECAPRIO JA, LUDLOW JW, LYNCH D, FURUKAWA Y, GRIFFIN J, PIWNICA-WORMS H, et al. The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a regulatory element. *Cell* 1989; 58: 1085-1095.
102. CHEN P-H, SCULLY P, SHEW J-Y, WNAG JYJ, LEE W-H. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 1989; 58: 1193-1198.
103. SCHRUMP DS, NGUYEN DM. Strategies for molecular intervention in esophageal cancers and their precursor lesions. *Dis Esoph* 1999; 12: 181-185.
104. BUSATTO G, SHIAO Y-H, PARENTI AR, BAFFA R, RUOL A, PLEBANI M, et al. p16/cdkn2 alterations and pRb expression in oesophageal squamous carcinoma. *Mol Pathol* 1998; 51: 80-84.
105. JIANG H, ZHANG YJ, KAHN SM, HOLLSTEIN MC, SANTELLA RM, et al. Altered expression of the cyclin D1 and retinoblastoma genes in human esophageal cancer. *Proc Nat Acad Sci (Wash.)* 1993; 90: 9026-30.
106. Cyclins and Cell Cycle Regulation Pathway. Disposable at [http://www.biocarta.com/pathfiles/h\\_cellcyclePathway.asp](http://www.biocarta.com/pathfiles/h_cellcyclePathway.asp) .
107. WUNDER JS, CZITROM AA, KANDEL R, ANDRULIS IL. Analysis of alterations in the retinoblastoma gene and tumor grade in bone and soft-tissue sarcomas. *Journal Natl Cancer Inst* 1991; 83: 194-200.
108. FRIEND SH, HOROWITZ JM, GERBER MR, WANG X-F, BOGENMANN E, LI FP, et al. Deletions of DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9059-9063.
109. CORDON-CARDO C, WARTINGER D, PETRYLAK D, DALBAGNI G, FAIR WR, FUKS Z, et al. Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1251-1256.

110. YAMAMOTO H, SOH J-W, MONDEN T, KLEIN MG, ZHANG LM, SHIRIN, H, et al. Paradoxical increase in retinoblastoma protein in colorectal carcinomas may protect cells from apoptosis. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1805-1815.
111. GERALDS J, KRATZKE RA, NIEHAMS GA, LINCOLN CE. Immunohistochemical detection of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2/ multiple tumor suppressor gene 1 ( CDKN2/MTS1) product p16<sup>INK4A</sup> in archival human solid tumors: correlation with retinoblastoma protein expression. *Cancer Res* 1995; 55: 6006-6011.
112. XU HJ, HU SX, CAGLE PT, MOORE GE, BENEDICT WF. Absence of retinoblastoma protein expression in primary non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1991; 51: 2735- 39.
113. AKITA-DOSAKA H, HU S-H, FUJINO M, HARADA M, KINOSHITA I, XU H-J, et al. Altered retinoblastoma protein expression in nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 1997; 79: 1329-1337.
114. ISHIKAWA J, XU H, HU S, YANDELL DW, MAEDA S, KAMIDONO S, et al. Inactivation of the retinoblastoma gene in human bladder and renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1991; 51: 5736-5743.
115. HAUSEN A, SARBIA M, HEEP H, WILLERS R, GABBERT HE. Retinoblastoma protein (pRb) expression and prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer* 1999 ; 84(6): 618-622.
116. FAGUNDES RB. Expressão imunohistoquímica da proteína p53 em mucosa esofágica de indivíduos sob alto risco para o carcinoma epidermóide do esôfago. Tese de doutorado (2000). Porto Alegre, UFRGS.
117. PERA M. Epidemiology of esophageal cancer, especially adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Cancer Res* 2000; 155: 1-14.
118. MASEAWA C, TAMURA G, SUZUKI Y, OGASAWARA S, ISHIDA K, SAITO K, et al. Aberrations of tumor-suppressor genes (p53, apc, mcc and Rb) in esophageal squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1994; 57: 21-25.
119. KATO H, YOSHIKAWA M, FUKAI Y, TAJIMA K, MASUDA N, TSUKADA K, et al. An immunohistochemical study of p16, p16, p21 and p53 proteins in human esophageal cancers. *Anticancer Res* 2000; 20(1A): 345-349.
120. BOOKSTEIN R, RIO P, MADREPERLA SA, HONG F, ALLRED C, GRIZZLE WE, et al. Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7762-66.

## **Anexo 1. Consentimento Informado**

### **Lesões precursoras de Câncer de Esôfago em pacientes sob alto risco para Câncer de Esôfago**

O Rio Grande do Sul é uma das regiões do mundo aonde mais se encontra o Câncer de Esôfago. Sabemos que as pessoas que bebem ou fumam e/ou bebem chimarrão “pelando”, como você tem um risco maior para isto. Caso encontrarmos alguma alteração em seu esôfago (esofagite crônica< atrofia da mucosa ou displasia) que possa levar ao aparecimento desse câncer no futuro, poderemos orientá-lo para a melhor conduta possível.

Queremos examinar o seu esôfago através de uma sonda endoscópica. Antes do exame você receberá um comprimido, que será colocado sob sua língua, que lhe deixará levemente sonolento e lhe permitirá tolerar melhor o exame. A sonda será introduzida pela boca, após o borrifamento da sua garganta com um spray anestésico. A maioria das pessoas tolera muito bem este exame, que dura aproximadamente de 10 a 15 minutos. Entretanto algumas pessoas podem sentir vontade de vomitar, tossir ou mesmo um mal-estar na garganta. Será coletado material (biópsias) para pesquisa das alterações já mencionadas. Após o exame você poderá ficar com a garganta irritada por um a dois dias. Existe também um risco, muito pequeno, de complicações pelos exames, tais como sangramento ou perfuração do esôfago, podendo nesses casos ser necessário transfusões de sangue e/ou cirurgias e, também reações alérgicas.

O resultado do exame estará pronto em, aproximadamente 7 a 10 dias e você será informado e orientado para tratamento se necessário.

Eu,..... fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre cada procedimento, no qual estarei envolvido, dos desconfortos ou dos riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face a estas informações.

O profissional....., certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Santa Maria,...../...../.....

-----  
Assinatura do Paciente

-----  
Assinatura do Pesquisador

**Anexo 2. Questionário aplicado aos pacientes (modificado de Barros, 1992).**

Questionário n.º:.....Entrevistador:.....

Data: \_\_/\_\_/\_\_

Nome:.....Idade.....

Sexo:Masc-1Fem-2..... Data nascimento.....

Endereço:.....

Telefone:.....( ) 1-Próprio 2- Contatos

Bairro:..... Cidade:.....Estado:.....

Profissão que exerceu durante mais tempo:.....

Local de Residência: zona urbana(1)zona rural (2).....

Onde viveu mais tempo: zona urbana (1) zona rural (2).....

Fuma? nunca (1) agora não, mas fumou no passado (2) sim (3).....

Idade que começou a fumar.....

Durante quanto tempo fuma ou fumou?.....anos.....meses

Há quanto tempo parou de fumar?.....anos.....meses.....dias.....

Quantidade de cigarros consumidos por dia:.....ou por semana.....

Consumo de álcool: nunca (1).....agora não, mas sim no passado (2).....

diariamente (1).....fins de semana (2).....

menos que uma vez por semana (3) .....

Idade em que iniciou a tomar bebidas alcoólicas.....

Durante quanto tempo toma ou tomou bebidas alcoólicas: anos.....meses.....

Há quanto tempo parou de tomar bebidas alcoólicas: anos.....meses.....dias.....

**BEBIDA ALCOÓLICA**

TIPO DE BEBIDA	RECIPIENTE	QUANTIDADE/DIA	QUANTIDADE/SEM.
CACHAÇA			
CERVEJA			
VINHO			
OUTRA			

Recipiente: Martelo=100ml(1)Copo = 250 ml(2) Cálice = 100ml(3) 1/2 garrafa = 300 ml Garrafa = 600 ml(5)

**CHIMARRÃO:** Sim (1).....Nunca(2).....Agora não mas sim no passado (3).....

Diariamente.....2 - 3 vezes/sem.....fins de semana.....

Idade em que iniciou a tomar chimarrão:.....

Durante quanto tempo toma ou tomou chimarrão:.....anos .....meses