

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE PROTEÍNA p53 E
RECEPTORES DE ESTROGÊNIO E PROGESTERONA EM
ESPÉCIMES CIRÚRGICOS DE VESÍCULA BILIAR**

ANDRÉA OXLEY DA ROCHA

Orientadora: Prof^ª Dra. Lígia Maria Barbosa Coutinho

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2003

R672a Rocha, Andréa Oxley da

Avaliação da presença de proteína p53 e receptores de estrogênio e progesterona em espécimes cirúrgicos de vesícula biliar / Andréa Oxley da Rocha ; orient. Lígia Maria Barbosa Coutinho – 2003.

121f. il.color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2003.

1. Neoplasias da vesícula biliar 2. Carcinoma 3. Vesícula biliar : Patologia 4. Proteínas p53 5. Receptores estrogênicos 6. Receptores de progesterona I. Coutinho, Lígia Maria Barbosa. II. Título.

NLM: WI 735

Ao Renato, companheiro de todos os momentos, incansável no incentivo e colaboração de todos meus projetos.

A minha filha Marília, compreensiva e carinhosa, a quem dedico todo o meu esforço.

Agradecimentos

À prof^a Dra. Lígia Maria Barbosa Coutinho, minha orientadora, profissional exemplar, que com toda sua paciência, dedicação e compreensão, me ensinou o que é perseverança.

Ao Departamento de Patologia da FFFCMPA que me possibilitou a pesquisa e utilização do material de seus arquivos, em especial ao Dr. João Grigoletti Scholl.

Aos funcionários do Laboratório do Departamento de Pós-graduação em Patologia da FFFCMPA, pelo imprescindível auxílio na realização da técnica imunoistoquímica.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro indispensável a qualquer pesquisa.

Aos meus colegas de trabalho, em especial Luís Foergens, Marcos Tang e Hilel Levin que se mostraram amigos, me possibilitando horários de trabalho mais flexíveis.

A Laís Leboutte, colega e grande amiga, que sempre me incentivou e muito contribuiu para conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, que desde criança, ensinaram a mim e meus irmãos as possibilidades e perspectivas que o conhecimento nos proporciona.

Aos meus irmãos, Filipe e Alexandre, que me mostraram que a determinação é a essência para a realização de nossos sonhos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	06
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 - Câncer de vesícula biliar.....	12
2.1.1 Quadro clínico e diagnóstico.....	12
2.1.2 Classificação histológica.....	13
2.1.3 Histopatologia e diagnóstico.....	14
2.1.4 Fatores de risco.....	19
2.1.4.1 Câncer de vesícula e cálculos biliares.....	19
2.1.4.2 Metaplasia do epitélio da vesícula.....	24
2.1.4.3 Pólipos.....	24
2.1.4.4 Adenomiomatose.....	25
2.1.4.5 Vesícula em porcelana.....	26
2.1.4.6 Anomalia da junção bílio-pancreática.....	26
2.1.4.7 Infecção bacteriana.....	26
2.1.4.8 Colangite esclerosante primária.....	27
2.1.4.9 Carcinógenos.....	27
2.1.4.10 Hormônios sexuais.....	28
2.1.4.11 Miscelânea.....	28
2.1.5 Tratamento.....	29
2.2 - Vesícula biliar e hormônios esteróides.....	32
2.3 - Receptores estrogênicos e progesterônicos no câncer de vesícula biliar.....	34
2.4 - Proteína p53 no câncer de vesícula biliar.....	37

3 - OBJETIVOS.....	43
3.1 - Principal.....	43
3.2 - Secundário.....	43
4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
5 – ARTIGO-1 REDIGIDO EM INGLÊS.....	55
6 – ARTIGO- 2 REDIGIDO EM INGLÊS	74
7- ARTIGO-1 REDIGIDO EM PORTUGUÊS.....	88
8 – ARTIGO – 2 REDIGIDO EM PORTUGUÊS.....	108

1 - INTRODUÇÃO

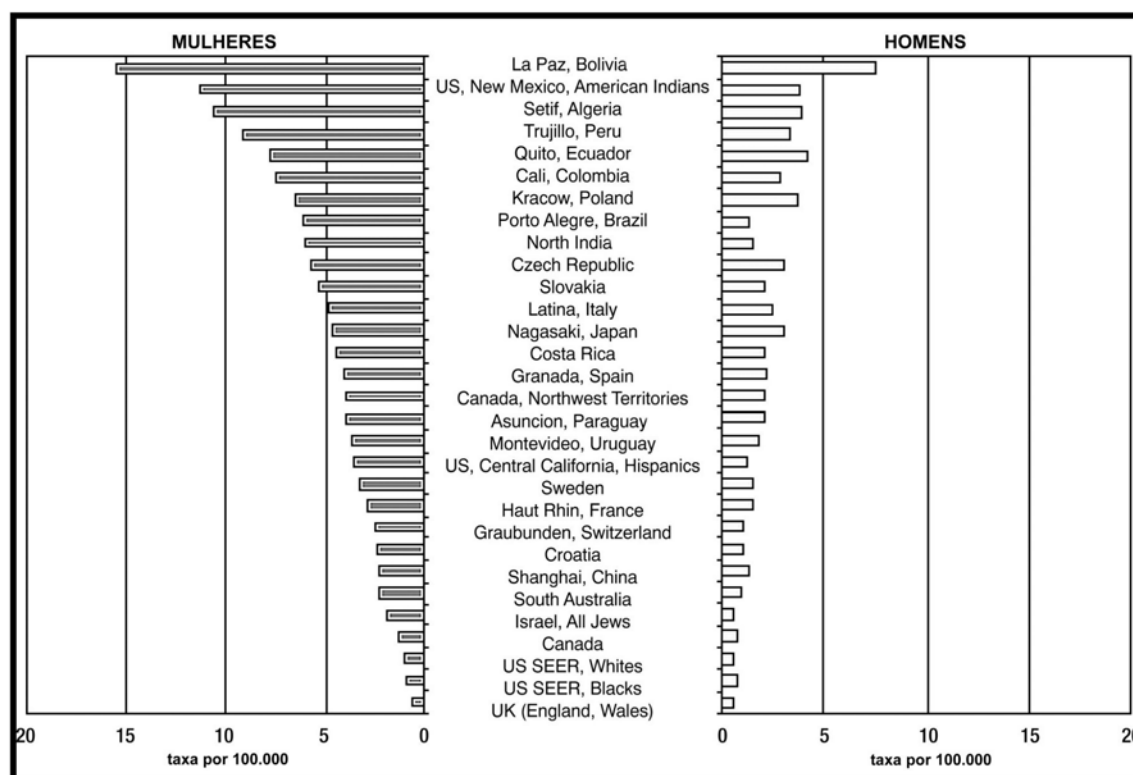
A neoplasia de vesícula biliar é considerada uma afecção pouco freqüente, e ainda hoje associada a um curso rapidamente letal^{44,81,89,105}. Apesar do grande progresso atingido, recentemente, no tratamento dos tumores malignos do trato digestivo, o carcinoma de vesícula biliar (CaVB) persiste sendo uma exceção¹⁰⁵. O prognóstico deste tumor é pobre e, na maioria das séries^{44,105,107}, a taxa de sobrevivência desta neoplasia é de no máximo 5% em 5 anos. Menos de 10% dos pacientes apresentam-se com tumor ressecável no momento do diagnóstico, sendo a média de sobrevivência inferior a 6 meses¹⁰⁷.

Apesar da baixa freqüência do CaVB em relação a outros tumores com diferentes localizações no organismo, representa 0,7% a 1,2% de todos os carcinomas⁷⁷, e ocupa o 5o. lugar entre as neoplasias do trato digestivo^{6,8,21}. Além disso, o CaVB é o tumor maligno mais comum do trato biliar, correspondendo a aproximadamente 1 a 3% das peças de colecistectomia^{6,84}. Séries brasileiras^{74,79} confirmam estes dados, tendo Ziliotto et al¹²⁵ relatado uma incidência de 1,02% de CaVB como achado incidental em 885 colecistectomias realizadas por colecistite.

A incidência do carcinoma de vesícula biliar varia amplamente nas diferentes partes do mundo, sendo mais freqüente em alguns países da América Latina e Índia. No Chile esta afecção encontra-se em terceiro lugar como causa de óbito quando comparada a todas as neoplasias, sendo a segunda entre os tumores do trato digestivo. Neste país, é a causa mais freqüente de morte por doença maligna entre as mulheres, com elevada incidência, em torno de 13 casos por 100.000 habitantes. Na Índia incide em cerca de 4,5 por 100 000 habitantes na população masculina, atingindo níveis de 10,1 por 100 000 habitantes em mulheres do norte deste país. Altas incidências também são relatadas em Israel, Polônia, México e Bolívia. Esta variação também pode ser observada entre grupos étnicos dentro de um mesmo país. Nos Estados Unidos esta é uma neoplasia incomum, com uma incidência de 1,1 por 100 000 habitantes para o sexo masculino e 2,2 para o sexo feminino, sendo duas vezes mais freqüente

entre brancos do que entre os negros de ambos os sexos, e entre os americanos de origem indiana, que apresentam índices duas vezes maior do que aqueles de origem hispânica^{4,44,56,64,70,77,104,105}.

Quadro 1. Incidência de câncer de vesícula por 100 000 habitantes em áreas selecionadas da população mundial, 1988-1992.



* Adaptado de Lazcano-Ponce EC et al⁶⁴.

No Brasil, a incidência do carcinoma primário da vesícula biliar varia nos diferentes estados da federação entre 0,5 e 0,8% em relação às demais neoplasias. No Rio Grande do Sul é responsável por 4,09 óbitos por 100.000 habitantes, tendo sido demonstrada uma tendência ascendente em relação à mortalidade por carcinoma de vesícula biliar e vias biliares extra-hepáticas na série temporal de 1970 a 1986 (significativa para $p < 0,001$) tanto para o sexo feminino como para o masculino, conforme dados da Secretaria de Saúde¹². Em Porto Alegre

é responsável por 3,09 óbitos por 100.000 habitantes⁶⁴ (quadro 1). Este padrão tem se modificado nas últimas décadas, universalmente, com a demonstração de taxas de mortalidade por CaVB, inversamente proporcionais às taxas de colecistectomia²⁶.

O CaVB acomete, principalmente, mulheres idosas, aumentando sua incidência com a idade: acima de 90% dos pacientes apresentam idade superior a 50 anos ao diagnóstico, sendo mais freqüente entre os 70 e 75 anos. Jukemura²¹, em estudo recente realizado na Universidade de São Paulo, observou um aumento significativo na incidência do CaVB, proporcionalmente à idade, atingindo valores de 5,7% nos pacientes com mais de 60 anos.

A predominância do sexo feminino em relação ao masculino está demonstrada na literatura^{6,14,21,27,104}, porém com proporções que variam de 3:1 a 7:1, representando 8,1% dos tumores malignos nas mulheres.

Embora um agente etiológico determinante implicado na gênese do CaVB permaneça obscuro, vários aspectos têm sido citados como fatores de risco para o surgimento deste tumor, entre eles a colelitíase, a colecistite, fatores raciais e étnicos, grupo sanguíneo, carcinógenos, tumores benignos, produtos da peroxidação lipídica e ácidos biliares secundários⁸⁴. A reposição hormonal em pacientes em pós-menopausa também tem sido considerada como possível fator envolvido na gênese deste tumor³⁶, entretanto esta reposição parece estar realmente relacionada com a patogênese da colelitíase, que por sua vez está associada ao CaVB²⁵.

A elevada incidência desta afecção em mulheres, bem como a sua associação freqüente à presença da doença vesicular calculosa, também comum no sexo feminino, tornou plausível a hipótese de que a vesícula biliar seja um órgão sensível a ação dos hormônios sexuais¹⁴. A presença de vários receptores para hormônios sexuais tem sido bem documentada em neoplasias de órgãos hormônio-dependentes como a mama e a próstata. O sucesso obtido com a manipulação hormonal, na terapia destes tumores, estimulou o estudo do papel destes hormônios em outros tumores, especialmente aqueles com pior prognóstico, com o intuito de encontrar outras opções terapêuticas.

Receptores específicos para estrogênio têm sido detectados nas células de 60 a 70% de todos os carcinoma primários de mama, como demonstrado por McGuire⁶⁹ e Lecereq⁶⁵. A presença destes receptores nesta neoplasia está associada a uma terapia hormonal freqüentemente efetiva como tratamento anti-tumoral, com significativo aumento da sobrevida^{50,59}. Além disso, já foram identificados receptores hormonais sexuais em tumores malignos de outros órgãos, tais como o câncer gástrico^{41,61}, colônico⁴³, pancreático⁶³ e de rim¹⁷.

O conhecimento atual da prevalência da doença vesicular, principalmente carcinoma e colelitíase, maior em mulheres do que em homens, associada à comprovação do efeito da progesterona sobre a dinâmica vesicular^{29,95}, deixa em aberto a questão referente ao papel dos hormônios sexuais na neoplasia de vesícula biliar e, mais especificamente, sobre o crescimento tumoral. Claramente, o valor crucial dos testes para a detecção dos receptores hormonais sexuais, nesta neoplasia, é para verificar se eles podem prever a resposta a terapia hormonal, e então afetar diretamente as decisões acerca do tratamento a ser instituído.

Singleton et al.¹⁰² em 1986 demonstraram, pela primeira vez, a presença de receptores estrogênicos (RE) e progesterônicos (RP) em vesículas biliares humanas. A partir deste momento, diversos estudos^{8,14,22,60,70,76,102,121} foram realizados no intuito de confirmar a presença e definir o real papel destes receptores, e conseqüentemente, dos hormônios sexuais no CaVB.

Observa-se que os melhores resultados do tratamento do CaVB estão relacionados com os pacientes tratados em estágios mais precoces, sendo estes pacientes, em geral, aqueles cujo diagnóstico foi obtido por um achado incidental durante uma colecistectomia por colelitíase. Devido a este fato, houve, nas últimas décadas, um crescente interesse pelo estudo das lesões metaplásicas encontradas nas colecistites e sua relação com a gênese do CaVB⁵³.

Atualmente, já está estabelecido na literatura que o carcinoma invasivo de vesícula biliar é precedido por lesões pré-malignas – displasia e carcinoma *in situ* – e este fato fornece um bom modelo para o estudo das anormalidades genéticas e da progressão neoplásica¹¹⁶. Estas anormalidades epiteliais têm sido bem caracterizadas como um “continuum” de modificações citológicas, refletindo alterações gênicas importantes na patogênese desta neoplasia¹¹⁷. No

entanto, apesar dos recentes avanços na carcinogênese molecular de várias neoplasias malignas, o mecanismo patogênico envolvido na progressão de uma lesão pré-maligna para carcinoma invasivo de vesícula biliar, ainda não está completamente esclarecido.

O câncer de maneira geral, resulta em alterações gênicas múltiplas ocorrendo, com frequência, rearranjos genéticos variados, que podem ativar ou inativar genes. Vários estudos^{55,38,108} têm mostrado que anormalidades do gene p53 estão envolvidas na gênese de muitas neoplasias humanas, incluindo o CaVB. Um dos mecanismos mais comuns descritos para ativação deste proto-oncogene na carcinogênese é a mutação deste gene, com conseqüente expressão de uma proteína defeituosa funcional e morfologicamente, e que é imunistoquimicamente detectável³⁸.

A ativação de proto-oncogenes em oncogenes, de atuação estimuladora da proliferação celular, foi identificada em apenas 15-30% de todos os tumores humanos. Existem genes que atuam impedindo o aparecimento de tumores e, por isso, são chamados de genes supressores de tumores ou antioncogenes. O gene p53 é um antioncogene importante, cujo produto é uma proteína relacionada com a inibição da proliferação celular.

A proteína p53 foi descrita originalmente por DeLeo et al. em 1979, como uma proteína nuclear com peso molecular de 53-kd, expressa em sarcoma de ratos induzidos por metilcolantreno, mas não observada em células normais de rato.

O gene p53, em humanos, se localiza no braço curto do cromossoma 17, atuando como inibidor da proliferação celular¹¹⁶. Este gene p53 pode ser alterado por mutações variadas que ocorrem em vários locais de sua extensão. Por este motivo, muitos agentes mutagênicos podem levar a sua modificação. A mutação de um alelo do gene p53 é muitas vezes acompanhada por uma deleção do outro alelo, resultando na formação de um produto protéico inativo, que não se liga mais ao DNA³³. Esta proteína mutante p53 inativa a proteína p53 normal causando perda da função de supressão tumoral, permitindo a atividade oncogênica¹¹⁶. A proteína p53 está presente em pequenas quantidades em células de tecidos normais, pois é metabolicamente lábil, sendo rapidamente degradada no núcleo, e provavelmente por este motivo, usualmente, indetectável. A forma mutante desta proteína exibe um aumento de sua

meia-vida podendo ser detectada por técnicas imunoistoquímicas, estando presente em muitos tumores e linhagens de células tumorais^{110,116}.

A mutação do gene p53 está entre as alterações genéticas mais freqüentes entre os cânceres humanos e parece desempenhar um importante papel na patogênese de muitas neoplasias malignas^{110,116}, incluindo o CaVB^{55,108}. Completa perda da proteína p53 funcional parece ocorrer em 50% dos tumores malignos¹¹⁰.

A superexpressão da proteína p53 detectada pela técnica imunoistoquímica (IHQ), tem sido correlacionada com a presença desta mutação gênica, conforme demonstrado em recente estudo realizado por Fujii et al.³³ em 1996 e Itoi et al.⁴⁹ em 1997. Neste último estudo, os autores avaliaram a correlação da expressão da proteína p53 com a mutação gênica no CaVB e observaram uma sensibilidade da mutação deste gene de 56,3%, especificidade de 90% e validade de 1,47. A partir destes resultados, estes autores demonstraram que a superexpressão desta proteína correlaciona-se bem com a mutação de gene p53. Fujii et al.³³ avaliaram a presença de mutação do gene p53, através da análise da seqüência de desoxinucleotídeos deste gene, em 23 casos de CaVB, verificando a presença desta mutação em 70% (16 casos). Neste último estudo, a análise da presença de expressão da proteína p53, avaliada em 65 casos de CaVB, demonstrou imunorreatividade em 55% (36 casos).

A proteína p53 é observada, freqüentemente, em muitos tumores malignos humanos como o câncer de estômago³³, cólon¹²⁰, colo uterino¹²⁴, mama¹¹¹, pulmão⁴⁸ e esôfago⁹⁴, entretanto, é incomum em tumores benignos⁴⁸. Baseado nestas observações, Hall et al. em 1991, propôs o uso do teste imunoistoquímico do p53 como um marcador de malignidade para uso de rotina⁴⁰.

Poucas publicações^{1,23,33,49,55,58,73,80,92,108,113,116,123,124} têm avaliado a superexpressão da proteína p53 no CaVB, com incidências que variam entre 39,6 e 95%, sendo a primeira publicação realizada em 1993 por Kamel et al.⁵⁵.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Câncer de vesícula biliar

2.1.1 – Quadro clínico e diagnóstico

Além das dificuldades de reconhecimento dos fatores envolvidos na gênese do carcinoma de vesícula biliar, o próprio quadro clínico inespecífico dificulta o diagnóstico precoce desta afecção⁵³. Assim, apesar de ser, o carcinoma de vesícula biliar, a mais comum das doenças malignas do trato biliar, é sempre diagnosticada em estágios avançados da doença, na maioria das vezes já com invasão à órgãos adjacentes⁵⁶.

A apresentação clínica do CaVB não é diferente daquela que ocorre na doença benigna da vesícula biliar, ou seja, dor em hipocôndrio direito e sintomas dispépticos, entretanto a presença de massa palpável, hepatomegalia, icterícia, anorexia, náuseas, vômitos e perda de peso podem sugerir a possibilidade de CaVB.

Antes da ultra-sonografia e da tomografia computadorizada de abdome, a taxa de diagnóstico pré-operatório era de somente 8,6%. A partir de 1980, com o desenvolvimento da tomografia computadorizada de abdome e da melhor resolução da ultra-sonografia, houve um incremento na acurácia e na sensibilidade da detecção do CaVB, resultando em um aumento do diagnóstico pré-operatório para 50 a 80% dos casos. A ultra-sonografia endoscópica tem sido descrita como método de maior acurácia para o estadiamento desta afecção, no entanto não é recurso disponível de forma rotineira, em nosso meio. Entretanto, a ocorrência de resultados falso-negativos é ainda alta, existindo portanto a necessidade de outros métodos diagnósticos com maior sensibilidade, para possibilitar um diagnóstico precoce desta lesão^{52,56}.

A angiografia tem sido método auxiliar no intuito de verificar-se a invasão de órgãos e estruturas com o objetivo de se avaliar a ressecabilidade da lesão.

Parâmetros hematológicos e bioquímicos não apresentam valor no diagnóstico do CaVB, entretanto, um número variável de marcadores, incluindo genes mutantes, têm sido identificados no tecido tumoral e no epitélio displásico da vesícula biliar. Mesmo estes marcadores não sendo de auxílio na detecção precoce do CaVB, possivelmente, poderão apresentar algum valor na avaliação do prognóstico desta patologia⁵⁶.

2.1.2 – Classificação histológica

Avanços no entendimento das displasias, carcinoma *in situ* e das várias linhas de diferenciação entre os carcinomas determinaram, em 1992, a revisão da primeira edição do WHO (World Health Organization) ***Histological Classification of Tumors of the Gallbladder***³ publicada em 1978 como parte da monografia *Histological Typing of Tumors of the Liver, Biliary Tract and Pancreas*. Esta classificação é a mais utilizada mundialmente, e pode ser observada no tabela 1.

Tabela 1. WHO Classificação Histológica do Carcinoma de Vesícula Biliar

-
1. Carcinoma *in situ*
 2. Adenocarcinoma
 3. Adenocarcinoma papilar
 4. Adenocarcinoma tipo intestinal
 5. Adenocarcinoma mucinoso
 6. Adenocarcinoma de células claras
 7. Carcinoma com células em anel-de-sinete
 8. Carcinoma adenoescamoso
 9. Carcinoma de células escamosas
 10. Carcinoma de pequenas células (oat cell carcinoma)
 11. Carcinoma indiferenciado
-

2.1.3 – Histopatologia e prognóstico

O câncer da vesícula biliar geralmente se origina na região fúndica ou no infundíbulo da vesícula e, ocasionalmente, junto ao ducto cístico. Durante sua evolução, este tumor infiltra localmente a parede vesicular, determinando seu espessamento e enrijecimento, podendo invadir a totalidade do órgão. Frequentemente a parede encontra-se contraída sobre o grande número de cálculos biliares. Este tumor pode crescer para dentro da luz da vesícula na forma de massa e, em algumas situações, a própria lesão neoplásica, ou os cálculos podem obstruir o ducto cístico ou o infundíbulo, constituindo o quadro de hidropsia de vesícula biliar.

Nos estágios precoces da doença, a inspeção macroscópica da mucosa vesicular pode mostrar espessamento da parede e crescimentos papilares multicêntricos envolvendo a superfície mucosa. Nos estágios avançados, observa-se a invasão do fígado por contigüidade ou metástases.

A disseminação do câncer de vesícula é, predominantemente, local ou regional através da rede linfática pericística e pericoledociana⁸⁹, ou ocorre por invasão direta ao fígado. O comprometimento dos gânglios paraduodenais posteriores ocorre mais tardiamente e a ocorrência de metástases para linfonodos do hilo hepático e disseminação hematogênica são menos frequentes. A disseminação linfonodal do adenocarcinoma de vesícula pode ocorrer de forma descontínua, caracterizada pelo acometimento de grupos de linfonodos não contíguos. O fato do câncer precoce da vesícula biliar, ou seja, aquele limitado à mucosa da vesícula biliar, não apresentar disseminação linfonodal, apresenta importante valor na estratégia terapêutica.

Como é reconhecido clinicamente, a pobre sobrevida do CaVB é normalmente associada com a extensão deste tumor ao fígado e órgãos adjacentes, sendo, a invasão hepática, a principal causa de morte na maioria dos pacientes. Esta extensão hepática é, possivelmente, facilitada por fatores anatômicos. A vesícula biliar apresenta uma fina parede, composta por uma única camada de células musculares para limitar a penetração intra-mural. Muitas vezes o crescimento tumoral ocorre para dentro dos sinusóides de Rokitansky-Aschoff que, nos casos de colecistite crônica, penetram para o interior da camada muscular da vesícula biliar. Além

disso, o tecido conectivo perimuscular da vesícula apresenta continuidade com o tecido conectivo do fígado, o que permite a disseminação por continuidade deste tumor⁴⁴.

Estudos realizados por Henson et al.⁴⁴ em 1992 validaram fatores prognósticos para o CaVB que incluem o tipo histológico (tabela 1), o grau histológico da lesão (tabela 2), a invasão vascular e o estágio do tumor (tabela 4).

Mais de 80% dos tumores malignos de vesícula são adenocarcinomas, em torno de 6% são carcinomas indiferenciados, 3% carcinoma de células escamosas e 11% correspondem a outros tipos histológicos menos freqüentes^{45,56}.

Do ponto de vista histológico, o tipo de tumor tem influência na sobrevida. Os pacientes portadores de adenocarcinoma papilar, geralmente, apresentam sobrevida média de 20 meses após o diagnóstico, enquanto portadores de outros tipos histológicos sobrevivem em torno de 03 meses. Entretanto, embora este tumor esteja associado a um melhor prognóstico, não é um tipo histológico freqüente, correspondendo a aproximadamente 5,8% dos CaVB. O carcinoma de pequenas células têm um péssimo prognóstico, e corresponde a aproximadamente 4% dos carcinomas de vesícula e o tipo indiferenciado a 10% desta neoplasia. O carcinoma com células em anel-de-sinete também é pouco freqüente e apresenta um prognóstico bastante reservado⁴⁴.

O grau histológico (tabela 2) do tumor também influencia a sobrevida dos pacientes, sendo que portadores de tumor grau 1 sobrevivem, em média, 7 meses após o diagnóstico, enquanto pacientes com adenocarcinoma grau 3 e os carcinomas indiferenciados sobrevivem, geralmente, somente até 3 meses após o diagnóstico⁴⁴.

Tabela 2. Grau Histológico dos tumores de vesícula biliar

Grau X - Grau não pode ser avaliado

Grau 1 - Bem diferenciado : adenocarcinomas compostos de mais de 95% de glândulas

Grau 2 - Moderadamente diferenciado: carcinomas compostos de 50 a 95% de glândulas

Grau 3 - Pouco diferenciado: carcinomas compostos de 5 a 49% de glândulas

A presença de invasão vascular identificada ao exame histológico é um indicativo de prognóstico menos favorável, com índices de sobrevida em 5 anos em torno de 13%, enquanto este índice pode alcançar 31% nos pacientes em que a invasão vascular não está presente⁴⁴. Esta invasão pode resultar em envolvimento direto de grandes vasos adjacentes ou pode ocasionar o surgimento de metástases no fígado, pulmões, pleura e outros órgãos⁵⁶.

Em 1976 Nevin et al.⁷⁸ propuseram um sistema de estadiamento para o câncer de vesícula biliar. Conforme esta classificação o estágio I representa as lesões intramucosas; o estágio II define o envolvimento das camadas mucosa e muscular; o estágio III indica a extensão do tumor até a serosa; no estágio IV existe comprometimento da 3 túnicas da parede vesicular com envolvimento linfonodal regional e no estágio V ocorre extensão do tumor para o leito hepático e/ou comprometimento de outros órgãos por invasão direta ou metastática (tabela 3).

Tabela 3. Estadiamento do câncer de vesícula biliar segundo

Nevin e col⁷⁸ 1976

Estágio	comprometimento
I	Mucosa vesicular
II	Mucosa e túnica muscular
III	Túnica serosa
IV	Túnica serosa e gânglios linfáticos regionais
V	Fígado e/ou outros órgãos

A classificação TNM possibilita um melhor estadiamento da doença e facilita a avaliação dos resultados do tratamento cirúrgico e, de certa forma, a avaliação do prognóstico dos pacientes portadores desta neoplasia maligna, podendo ser vista detalhadamente na tabela 4. Existe relação direta entre a extensão do comprometimento da parede vesicular, definido nas classificações de Nevin⁷⁸ e TNM (tabelas 3 e 4), e o grau de disseminação do tumor.

Tabela 4. Classificação TNM do Carcinoma de Vesícula Biliar (*American Joint Committee on Cancer/International Union Against Cancer 1997*).

Tumor Primário (T)	<p>T0 - Não há evidência de tumor primário</p> <p>Tis - Carcinoma <i>in situ</i></p> <p>T1 - Tumor invade lâmina própria ou camada muscular</p> <p>T1a- Tumor invade lâmina própria</p> <p>T1b- Tumor invade camada muscular</p> <p>T2- Tumor invade tecido conectivo perimuscular; não há extensão para serosa ou para o fígado</p> <p>T3- Tumor ultrapassa serosa, invasão de 2 cm ou menos do fígado e/ou direta à órgãos adjacentes</p> <p>T4- Tumor se estende por mais de 02 cm dentro do fígado e/ou para 02 ou mais órgãos adjacentes</p>			
Linfonodos regionais (N)	<p>N0- Nenhum linfonodo metastático</p> <p>N1- Metástase ducto cístico, linfonodos pericoledocianos e linfonodos hilares</p> <p>N2- Metástases peripancreáticas, periduodenais, periportal, celíacas e/ou linfonodos da mesentérica superior.</p>			
Metástases à distância (M)	<p>M0- Não existem metástases à distância</p> <p>M1- Metástases à distância</p>			
Estadiamento	Estágio 0	Tis	N0	M0
	Estágio I	T1	N0	M0
	Estágio II	T2	N0	M0
	Estágio III	T1,T2	N1	M0
		T3	N0,N1	M0
	Estágio IVA	T4	N0,N1	M0
	Estágio IVB	qualquer T	N2	M0
		Qualquer T	qualquer N	M1

Embora o tipo histológico e o grau sejam fatores prognósticos úteis, o estágio (tabela 4) da doença é, provavelmente, o mais confiável fator prognóstico na opinião da maioria dos autores^{34,44,78}. Pacientes nos quais o tumor está confinado a vesícula no momento do diagnóstico apresentam melhor prognóstico do que aqueles nos quais o tumor tenha se propagado ao fígado ou linfonodos regionais. Os melhores resultados, em termos de sobrevida, são observados em pacientes com carcinoma *in situ* ou precoce cujo diagnóstico é feito em espécimes retiradas por coledocotomia⁴⁴.

Estas observações claramente demonstram o benefício da detecção precoce deste carcinoma. Infelizmente, um método para a detecção precoce do CaVB ainda não é disponível. A citologia da bile parece ser um método útil na diagnóstico precoce em alguns pacientes, porém não é um procedimento disponível de rotina. Estudos recentes têm sido realizados no intuito de identificar marcadores tumorais circulantes para esta neoplasia, mas com resultados pouco alentadores. Sem dúvida, o estudo dos fatores de risco parece ser, ainda, o instrumento disponível mais acessível para identificação dos pacientes de risco potencial para desenvolvimento desta neoplasia, embora a prevenção primária para o carcinoma de vesícula não seja esperada em um futuro próximo⁶⁴.

2.1.4 – Fatores de risco

Sendo o CaVB uma doença de mau prognóstico basicamente decorrente da impossibilidade do diagnóstico precoce, uma vez que seus sintomas são inespecíficos, menos de 10% dos pacientes se apresentam com tumor ressecável no momento do diagnóstico. A identificação exata dos fatores de risco para esta neoplasia torna-se premente e a prevenção ou a detecção precoce são as melhores alternativas para evitar a morte por esta neoplasia^{96,107}.

Neste sentido, serão detalhados, a seguir, os fatores claramente definidos como de risco para esta neoplasia e as patologias e condições associadas a este tumor que servirão de base para a nossa pesquisa.

2.1.4.1 - Câncer de Vesícula e Cálculos Biliares

Cálculos de vesícula biliar são comuns, com incidência de 10 a 20% na população mundial. Esta incidência aumenta com a idade sendo mais elevada entre mulheres idosas (alguns estudos tem demonstrado que 10 a 15% dos homens e 40% das mulheres apresentam cálculos biliares aos 60 anos)^{54,107}.

Cálculos biliares são identificados em 70 a 98% dos casos de CaVB^{6,56}. Embora esta associação esteja claramente estabelecida na literatura^{6,8,54,107} e seja bem definida como um fator de risco para a neoplasia maligna de vesícula, o mecanismo patogênico ainda não está completamente esclarecido^{8,84,107}.

A hipótese desta associação baseou-se em dados coletados por Diehl²⁵, que demonstrou uma diminuição da taxa de mortalidade por CaVB a partir de 1968, mesmo período em que ocorreu um aumento no número de cirurgias para remoção da vesícula biliar. Estes achados não comprovam uma relação causal entre estas duas patologias podendo, a associação, ser apenas coincidental. Além disto, a maioria dos pacientes com cálculos biliares

não desenvolve carcinoma, conforme demonstrado em estudo⁸⁶ realizado em necrópsias, onde o risco estimado de CaVB em pacientes com cálculos, foi de apenas 1 a 3%.

Dados publicados por Wanebo¹¹² demonstram que 1% dos pacientes submetidos à colecistectomia por colelitíase sintomática apresentaram diagnóstico de carcinoma de vesícula (incidental).

Na experiência de Cetta et al.¹³ a incidência de CaVB em indivíduos acima de 50 anos e com cálculos maiores que 15mm foi de 8%. Esse autor relatou que mais de 40% de pacientes com CaVB associado à litíase desconheciam a presença de cálculos ou estavam assintomáticos por mais de 15 anos. Além disso, alguns estudos demonstraram incidência de 13,5% de atipia celular e 3,5% de carcinoma *in situ* em pacientes com colelitíase. Carcinomas *in situ* adjacentes a carcinomas invasivos de vesícula podem ser encontrados em quase 80% dos casos de CaVB, sugerindo provável efeito precursor da litíase de longa duração⁹⁶.

Jukemura⁵³, pesquisando prospectivamente vesículas biliares obtidas de pacientes submetidos a colecistectomia por colelitíase, correlacionou dados clínicos e informações relativas aos cálculos com a frequência de carcinoma incidental e de lesões consideradas como pré-neoplásicas. De todos os fatores estudados, a idade foi o que mais fortemente se correlacionou com o CaVB. A incidência desta neoplasia subiu, neste estudo, de 1,68% para 3,96% nos pacientes acima dos 50 anos, 4,16% nos pacientes acima dos 55 anos e 5,71% acima dos 60 anos.

Análises epidemiológicas^{24,25,54,72,115} de alguns subgrupos da população norte americana, incluindo americanos nativos e americanos de origem mexicana, chilena, indiana e hispânica, observaram a presença de cálculos sintomáticos, em sua maioria, de colesterol (70 a 80%) ocorrendo especialmente em mulheres obesas e que pareciam carrear genes litogênicos. Estes subgrupos também apresentaram elevada prevalência de CaVB no mundo, indicando a possibilidade de associação entre genes litogênicos e CaVB. Estes mesmos autores, devido ao elevado risco de CaVB nesta população, têm proposto a colecistectomia profilática quando a presença de cálculos biliares é detectada.

Embora estes dados não permitam estabelecer uma relação etiológica direta entre litíase e CaVB, a associação existente entre as duas entidades sugere, pelo menos, um papel facilitador. Um outro estudo epidemiológico²¹ multicêntrico demonstrou que a presença de sintomas biliares que motivaram a consulta médica constituíram o principal fator de risco, de 4,4 vezes, para carcinoma de vesícula biliar. A possibilidade de agentes carcinógenos endógenos ou exógenos terem sua ação facilitadora determinada pela lesão da mucosa vesicular ocasionada pelos cálculos, também deve ser considerada.

A bile normal é uma solução complexa composta primariamente de água, eletrólitos e solutos orgânicos. Os principais solutos são os sais biliares, pigmentos biliares, colesterol e fosfolípídeos, que são normalmente solúveis em bile. A produção diária da bile é de 500-1000 ml/dia. A alteração primária que causa a formação de todos os tipos de cálculos biliares é o aumento do colesterol (cálculos de colesterol) ou de bilirrubinato (cálculos pigmentares) acima da solubilidade da bile (bile supersaturada ou litogênica). Entretanto, esta não é a única condição necessária, já que mais de 50% dos indivíduos normais secretam bile supersaturada em colesterol (litogênica) após uma noite de jejum. Outras alterações, como estase e secreção de muco, parecem ser importantes na formação dos cálculos biliares. Excesso de muco na vesícula biliar pode servir como núcleo para formação do cálculo e a estase pode levar a cristalização²¹.

Todos estes fatos reforçam a hipótese de que a formação dos cálculos é de origem multifatorial, ou seja, pelo menos 3 fatores são necessários para a formação dos cálculos de colesterol: a supersaturação da bile com colesterol, a estase da bile e a desestabilização da bile. A utilização da terapia com estrogênio oral diminui a síntese e secreção de ácidos biliares, alterando a composição da bile, resultando em aumento das concentrações de colesterol (bile litogênica). Este efeito não é observado no uso de estrógeno transdérmico¹⁰¹.

Os cálculos de colesterol são os mais comuns e representam 70 a 90% dos cálculos biliares nos Estados Unidos, Europa e América Latina, enquanto os cálculos pigmentares representam 10 a 30% dos cálculos biliares, sendo mais comuns nos países asiáticos²¹.

Os cálculos biliares também podem ser constituídos a partir do metabolismo do pigmento biliar, sendo seu principal componente o bilirrubinato de cálcio e menos de 20% composto de colesterol. Cálculos de pigmento negro são mais comuns em pacientes com cirrose hepática ou doença hemolítica e os de pigmento marron, geralmente associados a processo infeccioso biliar. Pacientes portadores de cálculos de pigmento são usualmente mais velhos que os portadores de cálculos de colesterol, em sua maioria homens e geralmente do grupo sanguíneo A⁵⁴.

Embora a colelitíase possa ser associada a patologias como a anemia hemolítica, cirrose hepática e diabetes e possa ocorrer em pacientes submetidos à gastrectomia, cirurgia cardíaca de prótese valvular, em uso de contraceptivos orais ou agentes hipolipêmicos, estes fatores, isoladamente, não estão associados à neoplasia de vesícula biliar.

Maringhini et al.⁶⁸ realizaram estudo epidemiológico prospectivo para avaliar o risco de CaVB em pacientes com colelitíase. Um total de 2583 moradores de Minnesota, portadores de colelitíase foram seguidos durante várias décadas, havendo surgimento de CaVB em 5 pacientes depois de um seguimento médio de 13,3 anos. Baseado nestes resultados, este autor não recomenda a colecistectomia profilática em pacientes portadores de cálculos biliares assintomáticos. Observa-se que não houve relato da origem étnica dos pacientes e do tamanho dos cálculos nos pacientes seguidos. Em contrapartida, um estudo recente¹⁶ de coorte, realizado na população da Dinamarca, relatou 42 casos de CaVB em 17.715 pacientes com colelitíase, com idade média de 70 anos e seguimento de 6,1 anos. O risco estimado para CaVB foi significativamente elevado neste grupo, observando-se risco de 4,6 entre 1 a 4 anos e de 2,7 em seguimento acima de 5 anos.

O tamanho e a duração dos cálculos (tempo de colelitíase) parecem desempenhar um papel importante no surgimento do CaVB, e o conceito de que os cálculos iniciam essa transformação neoplásica tem sido proposto⁹⁶. Investigações epidemiológicas^{24,25,115} têm sugerido que os cálculos agiriam iniciando diretamente uma transformação neoplásica tal como o carcinoma *in situ*, no epitélio da vesícula biliar.

Diehl²⁶ observou que cálculos relativamente grandes, com diâmetro de 3 cm ou mais foram detectados com maior frequência em paciente com CaVB do que naqueles sem malignidade, sugerindo que características físicas, tal como o tamanho dos cálculos, possam desempenhar um papel na oncogênese e transformação inicial da mucosa da vesícula. Além disso, modificações metaplásicas do epitélio da vesícula, consideradas como lesões pré-malignas, são observadas no processo inflamatório crônico que ocorre na colecistite e são, freqüentemente, associadas com a presença de cálculos. Estas modificações incluem a presença de células calciformes, células de Paneth, presença de células endócrinas e produtoras de muco no corpo da vesícula. Uma lisosima imunorreativa, que não está presente no epitélio da vesícula normal, pode ser encontrada nas glândulas mucosas metaplásicas da vesícula.

A nível celular, a inflamação crônica da vesícula biliar parece conduzir a uma mutação alelo-específica: perda da heterozigosidade do gene p53 e superexpressão da proteína p53 inativa. Esta mutação pode resultar na transformação maligna da mucosa da vesícula^{114,117}.

Em recente revisão sobre fatores de risco para CaVB realizada por Seth et al.⁹⁶, estes autores observaram que cálculos maiores ou iguais a 3 centímetros foram detectados em aproximadamente 40% dos pacientes com CaVB e em apenas 7-12% dos pacientes sem neoplasia de vesícula. O *odds ratio*, nestes estudos, para o desenvolvimento de CaVB em pacientes com cálculos maiores ou iguais a 3 cm foi de 10,1, o que sugere que uma propriedade física do cálculo desempenhe um papel na oncogênese. Estes cálculos maiores, parecem ser mais efetivos no desencadeamento desta transformação maligna, o que torna possível a hipótese de que o risco de CaVB simplesmente reflita o tempo de duração da colelitíase. Assim, concluem, estes autores, que pacientes portadores de colelitíase por mais de 40 anos apresentam, significativamente, maior chance de desenvolver o CaVB do que aqueles que possuem cálculos por menor período e embora tenha sido sugerido que 1% dos pacientes com idade acima de 65 anos e com cálculos biliares apresentem maior risco de desenvolver CaVB, este fato pode estar relacionado mais ao tempo que o paciente apresenta colelitíase do que propriamente à idade do paciente.

Entretanto, outros autores^{5,93}, em estudos que acompanharam pacientes portadores de colelitíase durante décadas, observaram índices reduzidos (0,01-0,02% por ano) de risco de desenvolvimento de neoplasia nestes pacientes, e que têm dado suporte a não indicação de colecistectomia profilática em pacientes com colelitíase assintomática.

Na maioria dos países, as taxas de mortalidade por CaVB são inversamente proporcionais às taxas de colecistectomia. Estes dados têm sugerido que modificações nas taxas de colecistectomia afetam a prevalência de colelitíase que, em decorrência, gera um impacto nas taxas de mortalidade por CaVB²⁶.

A possibilidade de prevenção de morte por CaVB em pacientes com cálculos assintomáticos deve ser avaliada em relação ao risco cirúrgico. Assim, alguns autores afirmam que se o risco de CaVB em pacientes com cálculos maiores que 3 cm de diâmetro está em torno de 4% em 20 anos e a mortalidade do procedimento cirúrgico (colecistectomia laparoscópica) é de 0,5%, a colecistectomia profilática pode ser indicada⁹⁶.

2.1.4.2 - Metaplasia do Epitélio da Vesícula

A metaplasia intestinal e pilórica do epitélio vesicular são consideradas condições precursoras do CaVB. Yamagiwa et al.¹¹⁹ em 1986 sugeriram a seqüência metaplasia intestinal, displasia e carcinoma invasor, baseados na associação significativa desses achados em vesículas removidas por colelitíase, porém outros autores²¹ não observaram evidências dessa seqüência.

2.1.4.3 - Pólipos

Pólipos solitários e com tamanho maior que 1 cm são reconhecidamente fatores predisponentes para o CaVB. A prevalência de pólipos de vesícula biliar identificados à ultrasonografia é de 3-6%. O tamanho, número, forma e ecogenicidade do pólipo são

características importantes usadas para distinguir malignidade^{8,96}. Pólipos de colesterol correspondem a aproximadamente 53% das lesões polipóides ressecadas, são sempre benignas e não requerem intervenção cirúrgica, sendo em sua maioria menores que 10mm. Entretanto, quando estes pólipos de colesterol são maiores que 10mm e solitários tornam difícil a distinção com adenocarcinomas polipóides. A prevalência do carcinoma aumenta diretamente com o tamanho do pólipo: em pólipos com menos de 10mm a prevalência de câncer é de 0-5%; para pólipos entre 10-15mm, entre 11 e 13%; maiores que 15mm a prevalência é de 46-70%. A maioria das lesões malignas são solitárias (80-100%) e 1/3 dos pólipos sésseis correspondem a carcinoma.

Em relação à ecogenicidade dos pólipos malignos, estes são freqüentemente isoecóicos em relação ao parênquima hepático, acometem pacientes acima de 50 anos e estão, com freqüência, associados a cálculos. Assim, pacientes com pólipos maiores que 10mm, sésseis, ecopênicos, apresentam elevado risco de malignidade. Este grupo requer acompanhamento freqüente e deve ser considerada a possibilidade de colecistectomia profilática^{96,107}.

2.1.4.4 - Adenomiomatose

A adenomiomatose é caracterizada histologicamente por diminutas invaginações da mucosa que formam estruturas semelhantes a cistos na camada muscular da vesícula biliar. O diagnóstico é, muitas vezes, sugerido por ultra-sonografia abdominal que identifica espessamento focal da parede da vesícula, especialmente no fundo. Embora a magnitude do risco de CaVB em pacientes com estes achados não seja claramente estabelecido, a colecistectomia deve ser considerada, se o risco cirúrgico não é impeditivo, já que o diagnóstico diferencial das lesões malignas não é facilmente realizado por exames de imagem. Em geral lesões localizados no fundo da vesícula com diâmetro de 10-20mm ou com uma pequena ulceração central, tendem a ser malignas^{96,107}.

2.1.4.5 - Vesícula em Porcelana

A calcificação da parede da vesícula biliar denominada de “vesícula em porcelana” foi descrita pela primeira vez na França em 1831 e é uma condição pré-maligna bem reconhecida. Esta é mais comum na sexta década de vida e em mulheres. Estima-se que 22% das vesículas biliares com extensa calcificação desenvolvam CaVB. Em geral, a colecistectomia profilática está indicada quando o diagnóstico radiográfico é feito, desde que não haja risco operatório proibitivo. A relação fisiopatológica entre a calcificação e a oncogênese permanece obscura^{53,96,107}.

2.1.4.6 - Anomalia da junção bílio-pancreática

A anomalia da junção bílio-pancreática é um defeito congênito no qual a união dos ductos pancreático e biliar está localizada fora da parede duodenal formando um longo canal comum. Aproximadamente 10% dos pacientes com CaVB apresentam anomalia desta junção e 15-40% dos pacientes com esta anomalia desenvolvem doença maligna do trato biliar. O mecanismo exato ainda é desconhecido, porém acredita-se que o refluxo de enzimas pancreáticas para a vesícula biliar associado a propriedades irritativas desta secreção, às concentrações alteradas de sais biliares e ao maior índice mitótico das células da mucosa da vesícula contribuam para a carcinogênese^{53,96,107}.

2.1.4.7 - Infecção bacteriana

Em estudo recente realizado no Chile¹⁹ em 211 pacientes com cálculos biliares sintomáticos, 71 pacientes (33,7%) tinham cultura de bile positiva (para presença de bactérias). Em contraste, 81% (47 de 58 pacientes) com CaVB, todos com colelitíase, apresentaram cultura de bile positiva, sendo a bactéria identificada mais comumente a *Escherichia coli* (45%).

A partir dessas observações foi sugerido que as bactérias poderiam estar envolvidas no desenvolvimento do CaVB pela produção de um carcinógeno. Portadores de *Salmonella Typhi* ou *Paratyphi* também parecem ter risco aumentado para CaVB^{96,107}. Estudos realizados por Pandey et al.⁸⁵ sugerem que a degradação bacteriana dos ácidos biliares primários na vesícula possa ser responsável pela carcinogênese no CaVB.

2.1.4.8 - Colangite esclerosante primária

A colangite esclerosante primária é uma doença hepática progressiva, que determina colestase intra-hepática e, com frequência, está associada à doença inflamatória intestinal. Alguns relatos^{28,51} têm sugerido a associação desta patologia ao CaVB, no entanto, na maioria dos estudos observa-se a presença concomitante de colelitíase, que por sua vez, é fator de risco claramente estabelecido para esta neoplasia⁹⁶.

2.1.4.9 - Carcinógenos

A bile é um veículo comum para eliminação de metabólitos tóxicos. A excreção de carcinógenos na bile e sua concentração na vesícula biliar sugerem que carcinógenos ambientais possam estar envolvidos na gênese do CaVB. Estudos realizados em animais sugerem uma associação entre cálculos e carcinógenos como a dimetilnitrosamina na produção do câncer de vesícula, entretanto carcinógenos vesiculares humanos ainda não foram identificados. Análogos químicos dos sais biliares e outros agentes químicos têm sido avaliados como indutores do CaVB em animais. Especulações ainda existem quanto ao papel de outros fatores como radiação e toxinas industriais^{6,96}.

2.1.4.10 - Hormônios esteróides

Serão abordados em separado adiante.

2.1.4.11 - Miscelânea

Pandey⁸³ demonstrou um aumento da freqüência de CaVB em pacientes do grupo sangüíneo A e AB.

O efeito do fumo, do álcool e de alguns alimentos da dieta na carcinogênese do CaVB ainda não estão definidos, embora já tenham sido realizados alguns estudos neste sentido^{96,104}.

2.1.5 - Tratamento

Sem dúvida, não só o tipo histológico está associado ao mau prognóstico deste tumor. Além das dificuldades de reconhecimento dos fatores envolvidos na gênese do CaVB, o próprio quadro clínico inespecífico dificulta o diagnóstico precoce desta lesão⁵³.

Os resultados do tratamento cirúrgico do CaVB, quando analisados de uma maneira global, não são nada alentadores, apesar do fato de que em cerca de um quarto destes, os tumores sejam ressecados com intenção curativa⁵³. Independente do tipo de tratamento cirúrgico realizado, observa-se que os melhores resultados são obtidos em pacientes que apresentam tumor precoce e, na maior parte dos pacientes, as lesões constituíram achados incidentais após colecistectomia por colelitíase^{3,74}.

A dificuldade do diagnóstico precoce pode ser ilustrada pelos achados de Shirai et al.⁹⁹ que estudando 89 pacientes com carcinoma precoce de vesícula biliar, sendo 78 pacientes T1a e 11 em estágio T1b, observaram que 34 (38%) foram submetidos à intervenção cirúrgica com diagnóstico pré-operatório de câncer de vesícula, dois (2%) com diagnóstico de pólipos vesiculares e 53 (60%) foram operados com diagnóstico pré-operatório de colecistite calculosa.

A cirurgia constitui a única possibilidade de cura para os pacientes portadores desta doença. O resultado deste tratamento cirúrgico depende, basicamente, do estágio da neoplasia por ocasião da cirurgia e do tipo de procedimento adotado^{21,53,56,89}. Estes procedimentos incluem a colecistectomia simples, a colecistectomia alargada com linfadenectomia e a colecistectomia associada à ressecção hepática maior.

Os tumores *in situ* e T1a podem ser curados pela colecistectomia simples, com índices de sobrevivência em 5 anos de até 100%. Entretanto, tumores em estágios iniciais, ou seja T1a e T1b, geralmente só são diagnosticados de forma incidental naqueles pacientes submetidos à colecistectomia para tratamento de pólipos ou litíase biliar⁸².

Nos casos em que o exame anátomo-patológico da vesícula biliar removida demonstra tratar-se de lesão em estágio 1b (invade a muscular) ou estágio II (tumor invade tecido

conjuntivo perimuscular) a reintervenção é indicada para ressecção do leito hepático associada ou não à linfadenectomia. O encontro de 76% de doença residual em reoperações com finalidade curativa, indicadas no pós-operatório de colecistectomias simples para tumores T2 e T3, justifica esta conduta, pois ela representa a única possibilidade de cura destes pacientes^{21,56,62}.

Considerando-se que há identificação histológica de focos metastáticos nos segmentos hepáticos IV e V em 70% dos tumores com invasão subserosa, a ressecção desses segmentos têm sido proposta nos tumores de estágio II³⁵.

Operações mais radicais como a hepatopancreatoduodenectomia, indicada por alguns autores, visando a remoção dos linfonodos peripancreáticos, não demonstraram melhora da sobrevida, além de acarretarem a maior mortalidade operatória⁶³.

Torna-se interessante observar que o resultado do tratamento cirúrgico do CaVB têm sido variável nos diferentes continentes. Trabalhos americanos^{34,112}, relatam sobrevida média de 6 meses seguindo colecistectomia simples e 14 meses após colecistectomia associada à ressecção hepática parcial, sendo a sobrevida em 5 anos de 5% e 13%, respectivamente. As taxas de sobrevida observadas, em 5 anos, de acordo com o estágio da doença têm sido de 88% para o carcinoma *in situ*, 60% para o estágio I, 24% para o estágio II, 9% para o estágio III e 1% para o IV.

Estudo multicêntrico realizado na França, consistindo de 724 pacientes portadores de CaVB, demonstrou sobrevida de 20 a 22 meses, respectivamente, em pacientes com tumores T1 e T2 e em portadores de tumores T3 e T4 menor que 7 meses, mesmo quando a ressecção ampliada foi realizada. A média de sobrevida nesta série foi de 8,1 meses seguindo ressecções radicais²⁰.

Contrário às experiências anteriormente descritas, resultados para cirurgia radical no Japão são muito melhores. Embora as ressecções radicais sejam possíveis somente em torno de 21% dos casos, a sobrevida em cinco anos em uma série de 2567 pacientes com CaVB foi relatada ser de 97% para o estágio I, 58% para estágio II, 25% para estágio III e 20% para estágio IV. Segundo estes autores há necessidade de se estender a dissecação linfonodal^{98,106}.

A maioria dos relatos da literatura, em termos de sobrevida em cinco anos do tratamento cirúrgico do câncer avançado de vesícula biliar, varia entre zero e 20%, sendo raros relatos, no mundo ocidental, de sobrevivência igual ou maior que 50%. Alguns autores sugerem ser estes maus resultados devido a um tratamento cirúrgico insuficiente ou pouco uniforme, entretanto estes argumentos são contestados^{53,56}.

Somente 15 a 25% dos adenocarcinomas avançados de vesícula biliar são ressecados com margem cirúrgica livre de neoplasia²¹. Os demais pacientes devem ser tratados paliativamente para controle da icterícia obstrutiva, do prurido a ela associada e da colangite. As alternativas constituem as derivações bílio-digestivas, colocação de próteses em via biliar ou drenagem biliar percutânea, estas últimas associadas a altos índices de morbidade e mortalidade.

Esta neoplasia é reconhecidamente pouco responsiva aos diferentes tratamentos quimioterápicos, entretanto há relatos de alguma eficácia da quimioterapia com mitomicina C e 5-fluoracil no tratamento das metástases linfonodais^{42,97}. Existem também alguns relatos mais recentes de resposta positiva à radioterapia, embora este tumor seja considerado pela maioria dos estudos, como radorresistentes^{21,56}.

2.2 – Vesícula biliar e hormônios esteróides

É razoável postular que o efeito dos hormônios esteróides no câncer de vesícula possa ser grande, visto que esta doença tem maior predileção por mulheres, e estrógenos exógenos têm sido associados à presença de colelitíase que, por sua vez, ocorre em 70 a 90% dos casos de CaVB^{6,14,86}.

Diversos estudos *in vitro*^{9,109,118} e em humanos^{29,95} têm comprovado que a progesterona influi na motilidade da vesícula biliar retardando o esvaziamento desta, bem como alterando a composição da bile através do aumento do índice de colesterol, tornando-a mais litogênica, embora existam complexas interações entre fatores locais e mecanismos de controle neural e hormonal que interferem na dinâmica vesicular^{14,57,70,88,102}. A progesterona também evidencia sua influência sobre estes mecanismos, já que na gravidez, quando os níveis deste hormônio estão marcadamente elevados, o volume vesicular de jejum está aumentado e a fração de ejeção em resposta a teste pós-alimentar está reduzida^{10,32,109,118}. No entanto, estes estudos não identificam o mecanismo de ação deste hormônio, permanecendo ainda controverso se este atua diretamente através de receptores presentes na vesícula, ou se age alterando a sensibilidade da vesícula biliar à ação da colecistoquinina e carbacol, como sugerido por Messa et al.⁷⁰, ou ainda interferindo com a ativação de receptores da proteína G e, conseqüentemente com o sinal subsequente transferido através da membrana celular, alterando a contratilidade da musculatura lisa da vesícula biliar⁵⁷.

Estudos experimentais têm demonstrado que a progesterona exerce efeito inibitório na atividade da musculatura lisa em uma variedade de tecidos do trato gastrointestinal^{9,32,57,118,122}, reduzindo também a sensibilidade da vesícula à estimulação neural. Em última análise, esta lenta motilidade vesicular induzida pela progesterona conduz à estase da bile, acarretando a formação de cálculos. Entretanto, é aceito que a patogênese da litíase vesicular é de origem multifatorial¹⁰⁰. Hulley et al.⁴⁷ em 1998, em estudo clínico randomizado, observaram que as mulheres em pós-menopausa que receberam estrogênio e progesterona combinados para a

prevenção de doença coronariana, apresentaram maiores taxas de doenças da vesícula biliar. Estes dados também foram confirmados em outros recentes estudos publicados por Barrett-Connor et al.⁷ e Eliakim et al.³⁰.

Grodstein et al.³⁹ relata, em estudo realizado em mulheres recebendo reposição hormonal na pós-menopausa, um risco relativo para colecistectomia de 2,1 (IC 95%: 1.9-2.4), ocorrendo aumento deste risco com o aumento do tempo de reposição: acima dos 10 anos aumenta para 2,6, e com altas doses de estrógeno para 2,4. Pequeno risco relativo persistiu após descontinuação do tratamento de reposição (RR=1,3).

Gallus et al.³⁶ publicaram, em 2002, estudo de caso-controle no qual avaliaram a relação entre a terapia de reposição hormonal pós-menopausa e o CaVB. Foram avaliadas 31 mulheres portadoras de carcinoma incidental de vesícula (diagnóstico de neoplasia realizado após retirada da vesícula, sem suspeita prévia) e 3702 controles (mulheres de faixa etária semelhante, entre 45-79 anos, sem doença neoplásica). Observaram que 16% das pacientes portadoras de CaVB realizaram terapia de reposição hormonal, enquanto no grupo controle apenas 6%. O *odds ratio* foi de 3.2 (intervalo de confiança de 95% entre 1.1 - 9.3) tendendo a aumentar conforme o tempo de uso da terapia. A partir destas observações, estes autores consideraram ser a reposição hormonal um fator de risco envolvido na carcinogênese do CaVB, entretanto, admitem que a colelitíase seja o possível elo de associação entre a reposição hormonal e o CaVB, já que os hormônios esteróides interferem na motilidade da vesícula biliar, podendo tornar estes cálculos sintomáticos. Este fato poderia determinar o diagnóstico precoce de CaVB em portadores de colelitíase.

Estas observações são de certa forma contestadas em estudo duplo-cego randomizado realizado por Simon et al.⁸⁰ em 2001, em que foi avaliado o efeito da terapia com estrogênio e progesterona combinados no risco para cirurgia biliar em mulheres em pós-menopausa, com doença coronariana conhecida. O risco para eventos cirúrgicos no trato biliar entre as participantes deste estudo, foi mínimo, em torno de 0,5% por ano, em um seguimento médio de 4,1 anos.

2.3- Receptores de progesterona e estrogênio no carcinoma de vesícula biliar

Estudo realizado por Singletary et al.¹⁰² em 1986 identificou pela primeira vez a presença de receptores estrogênicos (RE) e progesterônicos (RP) em vesículas biliares humanas. Este autor utilizou técnica bioquímica (avalia a presença de RE e RP indiretamente, através da dosagem de citosol) a partir da congelação de fragmentos de tecido de vesículas obtidas de colecistectomia por colelitíase ou de vesículas normais retiradas de fígados transplantados. A presença de RP na parede da vesícula de 60% dos pacientes foi relatada por Daignault et al.²² em 1988, em estudo de 42 pacientes submetidos a colecistectomia por colelitíase.

Em 1989 Nakamura et al.⁷⁶, através de técnica imunoistoquímica (utilizando imunohistokits), identificaram RE e RP em 52.4% e 0%, respectivamente, nas células tumorais de 21 pacientes portadores de câncer de vesícula.

Em 1990, Yamamoto et al.¹²¹ testaram a presença de RE em 189 pacientes portadores de diversas afecções da vesícula biliar, apresentando resultados positivos em 19% dos casos de colelitíase, 33% em pólipos epiteliais, 53,8% dos adenomas e 22,8% dos 114 portadores de neoplasia maligna deste órgão. Nos casos positivos, estes receptores foram identificados em número pequeno de células (núcleos). Não houve diferença na presença de RE no que se refere ao sexo, não havendo também, relação entre a sobrevivência dos pacientes com doença maligna e a positividade ou negatividade dos RE. Entretanto, estes autores não relatam a utilização da solução com H₂O₂ e metanol no preparo dos tecidos, antes da utilização do anticorpo primário. Esta solução é utilizada para bloqueio da peroxidase endógena presente nos tecidos, sendo fundamental para o controle da especificidade da técnica, garantindo a ausência de resultados falso-positivos¹⁸.

Messa et al.⁷⁰ em 1990 também demonstraram a presença de RE e RP em vesículas humanas, com a mesma técnica bioquímica utilizada por Singletary et al.¹⁰², sugerindo que os hormônios sexuais atuam na motilidade da vesícula biliar por modulação da afinidade dos receptores da vesícula ao carbacol e colecistoquinina. Chen et al.¹⁴ em 1991, em estudo piloto

detectaram, através de técnica bioquímica, positividade dos RE em 3 dos 4 pacientes portadores de colelitíase estudados e RP foram negativos em todos os casos.

Ranelletti et al.⁸⁸ também no ano de 1991, ainda com técnica bioquímica, avaliaram 50 casos de vesículas de portadores de colelitíase e demonstraram positividade de RE em 19% dos homens e 69% das mulheres. RP estavam presentes em proporções similares em vesículas de homens (72,2%) e mulheres (86%), relatando haver correlação positiva entre a presença de RE e RP, e que mesmo na ausência de RE, a vesícula de homens expressam RP em níveis similares aqueles observados em mulheres.

Ao contrário dos demais autores, Ko et al.⁶⁰ em 1995, usando técnica imunoistoquímica (IHQ), detectaram 88% de negatividade em relação à presença de RE em 25 espécimes de CaVB, obtidas de casos de arquivo (blocos de parafina), sendo que os demais (12%) foram fracamente positivos, no que se refere à quantidade de núcleos corados. Segundo este autor, esta baixa positividade em relação aos achados dos demais autores se deve a melhor metodologia da técnica IHQ utilizada por ele. Diferente dos demais estudos, incluíram um pré-tratamento do tecido com pronase, que expõe (“desmascara”) melhor os RE antigênicos. Destacam ainda, que os estudos prévios de RE, em peças de arquivo (blocos de parafina), utilizando “histokits” (kit imunoistoquímico), demonstram a presença de RE indiretamente, através da detecção de estradiol por IHQ, como realizado no trabalho de Nakamura⁷⁶. Embora esta técnica já tenham sido considerada como padrão no passado, hoje é vista com pouca especificidade, em virtude do inaceitável número de falso-positivos associados ao método.

Malik et al.⁶⁷ em 1998, avaliaram através de técnica IHQ (universal immunoperoxidase staining kit) 30 espécimes provenientes de colecistectomias ou punções aspirativas de massas tumorais da vesícula de pacientes portadores de adenocarcinoma deste órgão. Dezoito pacientes (60%) apresentaram RE positivos no tecido maligno, não havendo qualquer correlação entre a presença de cálculos, grau histológico ou sobrevida e positividade destes receptores. Bhaskaran⁸ em estudo realizado na Índia no ano de 2000 observou melhor índice de sobrevida em pacientes portadores de CaVB que apresentavam RP positivos e uma

análise multivariada destes pacientes mostrou que a expressão do RP foi um importante fator prognóstico independente.

De fato, uma revisão minuciosa da literatura não mostra estudos clínicos usando tamoxifen ou outra forma de manipulação hormonal⁸ que possa ratificar a presença destes receptores e de sua significância como ocorre na neoplasia mamária e, embora pareça haver consistência entre os vários tipos de detecção e testes para estes receptores, estes resultados devem ser analisados com parcimônia (fig. 1).

2.4 - Proteína p53 no câncer de vesícula biliar

As evidências encontradas de que a mutação do gene p53 está entre as alterações genéticas mais freqüentes entre as neoplasias malignas humanas^{110,116} motivaram pesquisas em diversas neoplasias, sendo que em 1993, Kamel et al.⁵⁵ publicaram estudo evidenciando a presença de expressão da proteína p53 no CaVB. Estes autores, usando técnica imunistoquímica com anticorpos policlonais, avaliaram a presença desta proteína em 30 casos de CaVB, 8 casos de displasia de vesícula e 1 caso de carcinoma *in situ*, além de 4 casos de colecistite crônica. Dos 30 casos avaliados, 47% (14 casos) apresentavam positividade além de 2 das 8 displasias. Nenhum dos casos de colecistite crônica apresentaram positividade para a proteína p53. A partir destes resultados estes autores sugeriram ser a mutação do gene p53 um evento precoce no desenvolvimento do CaVB, uma vez que este evidenciou positividade em alguns casos de displasias. Entretanto o número de casos avaliados foi pequeno.

Deve se salientar que os testes disponíveis para identificação de anticorpos em tecidos embebidos em parafina são incapazes de diferenciar entre a proteína p53 normal e a proteína p53 produzida pelo gene mutante e é provável que expressão da proteína alterada ou do complexo estável, incluindo a proteína normal, possam ser imunistoquimicamente detectáveis, particularmente com técnicas mais sensíveis¹¹⁶. Por esta razão, muitos autores utilizam o termo **superexpressão** (“overexpression”) para referir-se ao acúmulo de proteína p53 detectável por imunistoquímica, sem se referir ao mecanismo pelo qual o acúmulo ocorre.

Já em 1984, Albores-Saavedra et al.² relataram que adenocarcinomas bem diferenciados de vesícula biliar, incluindo o tipo papilar, exibem várias anormalidades morfológicas que variam desde mínima atipia nuclear até grandes anaplasias. Seguindo esta mesma linha de investigação, em 1995, Oohashi et al.⁸⁰ observaram que 55% dos adenocarcinomas intramucosos de vesícula iniciavam com atipia celular de baixo grau e que, a maioria deles desenvolvia atipia de alto grau durante a progressão do tumor. Neste estudo, em avaliação da expressão da proteína p53 em 41 adenocarcinomas bem diferenciados de vesícula, 6 casos de

colecistite aguda e 23 casos de colecistite crônica, constataram que esta proteína ocorria como um evento precoce em 70% destes tumores e esta alteração era mantida durante a progressão de tumor intramucoso para carcinoma invasivo. Além disso, propuseram, como Hall et al.⁴⁰ que a proteína p53 possa ser utilizada para distinguir entre tumores benignos e malignos, porém especificamente para a neoplasia de vesícula biliar, uma vez que não observaram positividade em vesículas tumorais.

Wistuba et al.¹¹⁷ em 1995 demonstraram que a perda da heterozigossidade do alelo pode ser observada previamente à mutação do gene p53 em lesões pré-neoplásicas e no carcinoma de vesícula.

Roa et al.⁹¹ em 1996, observaram uma relação direta entre o grau de diferenciação do tumor primário e o nível de infiltração na parede da vesícula. Relatam que tumores que infiltram apenas as camadas muscular e mucosa da vesícula são, usualmente, bem diferenciados não tendo, praticamente, observado tumores pouco diferenciados neste grupo. Em novo estudo publicado por este mesmo autor⁹² em 1997, relata encontrar uma relação significativa entre o nível de infiltração na parede da vesícula e a expressão da proteína p53. Nesta última publicação⁹², Roa et al. avaliaram a expressão do gene p53 imunoistoquimicamente em 191 tumores de vesícula (157 tumores primários e 34 metástases) e 25 controles, observando positividade em 86 tumores (45%) e negatividade de todos os controles. A proteína p53 foi positiva em 23,5% dos carcinomas precoces e 48,2% dos carcinomas avançados com diferença estatisticamente significativa. A partir destes resultados, estes autores sugeriram ser este teste útil para diferenciação entre atipia do epitélio da vesícula, como pode ocorrer na colecistite aguda, e lesões neoplásicas. Ao contrário dos demais autores^{80,117}, na observação de Roa et al, a expressão desta proteína pode corresponder a um evento tardio na oncogênese do CaVB. Entretanto, deve-se observar que o número de vesículas sem acometimento neoplásico é pequeno (25 colecistites crônicas), assim como o número de casos de tumor precoce (24 casos).

Ajiki et al¹. (1996) analisaram 48 casos de CaVB, com detecção de p53 em 39,6% (19 casos). Não houve positividade nos 7 casos de adenoma e 11 displasias avaliadas. Além

disso, relataram haver correlação entre CaVB sem cálculos e positividade do p53, a partir da observação de superexpressão da proteína p53 em 10 dos 17 casos de CaVB sem cálculos e em 9 dos 31 casos de neoplasia associados à colelitíase. Este fato sugere, segundo estes autores, a possível existência de diferentes caminhos da carcinogênese da vesícula, influenciada ou não pela presença de cálculos. Muto et al.⁷⁵ em 1985 sugeriram a existência de padrões histológicos diferentes para a neoplasia de vesícula associada ou não a cálculos, porém estes achados não foram confirmados por outros autores.

Teh et al.¹⁰⁸ em 1994, observaram imunorreatividade da proteína p53 diferente no CaVB e no carcinoma de via biliar extra-hepática (com diferença estatisticamente significativa, embora com pequena amostra - 24 casos - no primeiro grupo), sugerindo que estes possam ser distintos tumores com diferentes etiologias e diferentes mecanismos patogênicos. Estes autores avaliaram 24 casos de CaVB com 92% de positividade, sendo 50% destes, fortemente positivos. Dos 36 casos de neoplasia de via biliar extra-hepática, apenas 34% foram fortemente positivos. Este fato é ilustrado por situação peculiar que ocorre no adenocarcinoma de pulmão em que a expressão da proteína p53 está relacionada com a exposição ao tabaco, sendo limitada apenas aos pacientes com história de fumo¹⁰⁸. A exposição ao benzopireno, um potente mutágeno e carcinógeno encontrado no fumo do cigarro, produz mutação em três códons específicos do gene p53. Assim, o exame do tipo de mutação em p53 visto em um tumor pode fornecer indícios para a identificação de agente causador da carcinogênese.

Washington et al.¹¹³ (1996) observaram a superexpressão desta proteína em 58% dos 12 casos estudados, não observando correlação entre estes resultados e a sobrevida dos pacientes.

Itoi et al.⁴⁹ (1997) estudando 33 casos de CaVB observaram 69,6% (23 casos) de positividade do p53, sendo, a positividade, similar em casos de carcinoma intramucoso ou invasivo.

Yanagisawa et al.¹²³ (2000) avaliaram, em 108 peças de colecistectomia por colecistite crônica e 54 vesículas com CaVB, a proliferação celular, apoptose e a expressão de p53 e p21, em relação ao grau do processo inflamatório crônico. Estes autores observaram diferença

estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) na média de idade entre os dois grupos de pacientes, sendo de 57,1 anos, nos portadores de colecistite crônica e 66,6 anos nos casos de CaVB. Baseado nestes dados, estes autores sugerem que a diferença na média de idade destes pacientes, no momento da intervenção cirúrgica, possa explicar as possíveis modificações no epitélio vesicular desencadeadas pelo contínuo processo inflamatório crônico que ocorre na colecistite (ao longo do tempo). Além disso, observaram a presença de expressão da proteína p53, com elevada frequência, na colecistite crônica com intenso processo inflamatório, porém com um padrão esporádico. Este padrão difere completamente daquele identificado na neoplasia maligna, onde o padrão de reatividade imunohistoquímica é difuso ou em uma porcentagem pequena de casos pode ser focal. Concluem, a partir destas observações, que na mucosa da vesícula em que ocorre o processo inflamatório crônico, há um aumento da renovação celular (“turnover”), sendo as células danificadas eliminadas por apoptose, e embora o dano do DNA devido a colecistite crônica não seja diretamente identificado, o achado de elevada expressão de p53 e p21 sugerem que a injúria possa ocorrer freqüentemente nesta patologia, podendo estar envolvida na oncogênese vesicular.

Estas mesmas observações também foram relatadas por Oohashi et al.⁸⁰ que observaram expressão da proteína p53 nos 6 casos de colecistite aguda estudados e em 5 de 23 colecistites crônicas, também com padrão de imunorreatividade esporádico.

Misra et al.⁷³ (2000) avaliando 20 casos de CaVB, relataram 70% de imunorreatividade para proteína p53 (14 de 20 casos) e observaram significativa correlação entre o CaVB associado com cálculos e a superexpressão de proteína p53 (apenas 1 caso negativo do total de 12) comparado ao CaVB sem esta associação (5 casos com p53 negativo de 7 sem cálculos).

Kamel et al.⁵⁵ também relataram que os casos de CaVB que apresentavam positividade da proteína p53 eram, em sua maioria, acompanhados de cálculos, embora esta associação não fosse estatisticamente significativa (apenas 30 casos estudados). Da mesma forma, Teh et al.¹⁰⁸ sugerem que a diferente imunorreatividade do p53 no CaVB associado a colelitíase (92%

de positividade) e o carcinoma de via biliar não associado a presença de cálculos (66% de positividade), poderia explicar seus diferentes mecanismos patogênicos.

Quan et al.⁸⁷, em 2001, avaliaram a presença do gene mutante p53 por técnica IHQ, em 24 casos de carcinoma de vesícula biliar, 20 adenomas e 18 colecistites crônicas, verificando presença de maior expressão da proteína p53 nas lesões malignas (63,5%), quando comparada às demais lesões, sendo 25% nos adenomas e 16,7% nas colecistites crônicas, sugerindo que este gene esteja correlacionado com a progressão do CaVB, podendo estimar prognóstico. Estes autores, assim como Yanagisawa et al.¹²³, observaram um padrão esporádico na imunorreatividade do p53 nos casos de colecistite crônica e sugerem, também, um provável envolvimento do processo inflamatório crônico na carcinogênese do CaVB.

Kim et al.⁵⁸ em 2001 avaliaram a expressão do P53 em afecções da vesícula biliar comparando com fatores prognósticos e observaram 67,6% de positividade (48 de 71 casos) em CaVB e negatividade nos demais casos (20 adenomas e 02 displasias), além de observar também negatividade na mucosa normal destes mesmos casos de CaVB. Para estes autores, a expressão desta proteína está fortemente associada à progressão tumoral na neoplasia da vesícula biliar. No entanto, não observaram associação entre a imunorreatividade da proteína p53 e a sobrevida destes pacientes, identificando período médio de sobrevida semelhante nos pacientes com proteína p53 positiva ou negativa (34 e 35 meses, respectivamente).

Estas discrepâncias, em relação a detecção da proteína p53, podem ser devidas a diferenças entre os anti-corpos para p53 utilizados nestes estudos, como foi analisado minuciosamente por Kim et al.⁵⁸. Kamel et al.²⁰ e Ajiki et al.³⁵ utilizaram anti-corpo policlonal CM1 e apresentaram menor imunorreatividade que os demais autores que utilizaram anti-corpos monoclonais D07 e Pab1801, que reconhecem epítopos diferentes daqueles reconhecidos pelo CM1.

Ao contrário dos resultados expostos por Roa et al.⁹² e Kim et al.⁵⁸, Ajiki et al.¹ observaram que a alteração do gene p53 pode desempenhar papel crucial na carcinogênese do CaVB, mas não está relacionada à progressão tumoral ou à disseminação metastática, concluindo não haver relação entre a imunorreatividade da proteína p53 e o prognóstico deste

pacientes.

Atualmente, a hipótese proposta para esta associação entre a presença de colelitíase e o CaVB é que a nível molecular, o processo inflamatório crônico desencadeado pela presença dos cálculos, possa determinar, ao longo do tempo, a ocorrência de uma mutação alelo-específica, ou seja, perda da heterozigosidade do gene p53 e superexpressão da proteína p53 mutante (inativa)¹⁰⁷. A partir desta mutação considera-se que possa resultar a transformação maligna da mucosa da vesícula .

Experimentos laboratoriais recentes têm demonstrado que a inserção de um gene p53 normal em células tumorais pode resultar em uma diminuição significativa da gênese tumoral. Isto sugere que a inserção de p53 normal em tumores de pacientes portadores de neoplasias que demonstram esta mutação, utilizando abordagem de terapia gênica, pode, a princípio, tornar-se uma opção de tratamento⁵².

3- OBJETIVOS

3.1 - OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar a expressão da proteína p53 e a presença de receptores de estrogênio e progesterona em espécimes cirúrgicos de vesículas normais, vesículas de portadores de colelitíase e nas células tumorais de pacientes portadores de neoplasia maligna de vesícula biliar.

3.2 - OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Avaliar a presença de p53 nos diferente tipos e graus histológicos do carcinoma de vesícula biliar e sua relação com o prognóstico e tempo de sobrevida destes pacientes.

4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ajiki T, Onoyama H, Yamamoto M, et al. p53 protein expression and prognosis in gallbladder carcinoma and premalignant lesions. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 521-26.
2. Albores-Saavedra J, Angeles-Angeles A, Manrique JJ, et al. Carcinoma in situ of the gallbladder. A clinic Pathologic study of 18 cases. *Am J Surg Pathol* 1984;8: 323-331.
3. Albores-Saavedra J, Henson DE & Sobin LH. The WHO Histological Classification of Tumors of the Gallbladder and Extrahepatic Bile Ducts. A comentary on the second edition. *Cancer* 1992; 70(2):410-414.
4. Aretxabala X, Roa I, Burgos L, et al. Gallbladder cancer in Chile. A report on 54 potentially resectable tumors. *Cancer* 1992; 69(1): 60-65.
5. Attili AF, DeSantis A, Capri R, et al. The natural history of gallstones: The GREPCO experience. The GREPCO group. *Hepatology* 1995; 21:665-60.
6. Barbosa-Coutinho LM, Arnt RA, Rocha JL & Ossanai R. Carcinoma de vesícula biliar: estudo de 26 casos. *R. AMRIGS* 1992; 36(1): 9-14.
7. Barret-Connor E, Grady D. Hormone replacement therapy, heart disease and other considerations. *Ann Rev Public Health* 1998; 19:55-72.
8. Bhaskaran V. Hormonal receptors in carcinoma of the gallbladder. *Trop Gastroenterol* 2000; 21(2): 48-50.
9. Bird NC, Ahmed R, Chess-Williams R, Johnson AG. Active relaxation of human gallbladder. Muscle is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Digestion* 2002; 65:220-26.
10. Braverman DZ, Johnson ML, Kern F. Effects of pregnancy and contraceptive steroids on gallbladder. *Function. N. Engl J Med* 1980; 302(7): 362-4.
11. Briscoe D, Ni K, Wied GL, et al. Comparison of estrogen receptor immunocytochemical assay in frozen and paraffin sections. *Analyt Quant Cytol Histol* 1992; 14: 105-12.
12. Brumini R, Torloni H, Henson DE, Gotieb SLD, Souza JMP. Câncer no Brasil - Dados Histopatológicos - 1976—1980, Rio de Janeiro, Ministério da Saúde, 1982.

13. Cetta F, Lombardo F, Baldi C et al. More than 40 percent of patients with gallbladder carcinoma associated with gallstones. *Digestive Disease Week (summary)*. San Francisco, 1996.
14. Chen A, Huminer D. The role of estrogen receptors in the development of gallstones and gallbladder cancer. *Medical Hypotheses* 1991; 36(3): 259-60.
15. Cheng L, Binder S, Fu Y, Lewin K. Demonstration of estrogen receptors by monoclonal antibody in formalin-fixed breast tumors. *Lab Invest* , 1988; 3:346-53.
16. Chow WH, Johnson C, Gridley G, et al. Gallstones, cholecystectomy, and risk of cancers of the liver, biliary tract, and pancreas. *Br J Cancer* 1999; 79:640-4.
17. Concolino G, Marochi A, Conti A, et al. Human renal cell carcinoma as a hormone dependent tumor. *Cancer Res* 1978; 38: 4340-44.
18. Cote RJ and Taylor CR. Immunohistochemical detection of steroid hormone receptors. In Taylor CR & Cote RJ. *Major problems in pathology immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologists*. 2nd. Ed. W.B.Saunders Co 1994; 277-290.
19. Csendes A, Becerra M, Burdiles P, et al. Bacteriological studies of bile from the gallbladder in patients with carcinoma of the gallbladder, cholelithiasis, common bile duct stones, and no gallstones. *Eur J Surg* 1994; 160:363-7.
20. Cubertafond P, Gainant A, Cucchiario G. Surgical treatment of 724 carcinomas of gallbladder. *Ann Surg* 1994; 219: 275-80.
21. Cunha JE, Penteadó S, Jukemura J. Neoplasias da Vesícula biliar. In: Kalil AN, Coelho J, Strauss E . *Fígado e Vias Biliares- Clínica e Cirurgia*. Ed, Rio de Janeiro: Editora Revinter R Ltda, 2001. p.650-57.
22. Daignault PG, Fazekas AS, Rosenthal L, et al. Relationship between gallbladder contraction and progesterone receptor in patients with gallstones. *Am J Surg* 1988; 155: 147-51.
23. Diamantis I, Karamitopoulou E, Perentes E, et al. P53 protein immunoreactivity in extrahepatic bile duct and gallbladder cancer: correlation with tumor grade and survival. *Hepatology*, 1995; 22(3):774 –79.

24. Diehl AK, Stern MP. Special health problems of Mexican Americans: obesity, gallbladder disease, diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Adv. Int Med*, 1989; 34:73-76.
25. Diehl AK. Epidemiology of gallbladder cancer: a synthesis of recent data. *J Natl Cancer Inst* 1980; 65:1209-1214.
26. Diehl AK. Gallstone size and risk of gallbladder cancer. *JAMA* 1983; 250:2323-6.
27. Donhauser JL. Primary carcinoma of the gallbladder. An analysis of fifty-two cases. *AMA Arch Surg*, 1958; 77:918-24.
28. Dorudi S, Chapman RW, Kettlewell MGW, et al. Carcinoma of the gallbladder in ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. Report of two cases. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 827-8.
29. Down RHL, Whiting MJ, Watts JM, Jones W. Effect of synthetic oestrogens and progestagens in oral contraceptives on bile lipid composition. *Gut* 1983; 24: 253-59.
30. Eiakim R, Abulafia O, Sherer DM. Estrogen, Progesterone and Gastrointestinal tract. *J Reprod Med* 2000; 45(10): 781-88.
31. Everson GT, McKinley C, Lawson M, et al. Gallbladder function in the human female: effect of the ovulatory cycle, pregnancy and contraceptive steroids. *Gastroenterology* 1982; 82(4): 711-9.
32. Everson GT. Gastrointestinal motility in pregnancy. *Gastroenterol Clin North Am* 1992; 21(4): 751-76.
33. Fujii K, Yokozaki H, Yasui W, et al. High frequency of p53 gene mutation in adenocarcinomas of the gallbladder. *Cancer epidemiology, Biomarkers & prevention* 1996; 5: 461-66.
34. Gagner M, Rossi R. Radical operations for carcinoma of the gallbladder: present status North America. *World J Surg* 1991; 15: 344-7.
35. Gall FP, Kockerling F, Scheider C, et al. Radical operations for carcinoma of the gallbladder: present status in Germany. *World Surg* 1991; 15: 328-36.
36. Gallus S, Negri E, Chatenoud L, et al. Post-menopausal hormonal therapy and gallbladder

- cancer risk. *Int J Cancer*, 2002; 99(5): 762-63.
37. Geisler JP, Wiemann MC, Miller GA, et al. Estrogen and progesterone receptors in malignant mixed mesodermal tumors of the ovary. *J Surg Oncol* 1995; 59(1):45-7.
 38. Greenblatt MS, Bennet WT, Hollstein M, et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-78.
 39. Grodstein F, Colditz GA, Stampfer MJ. Postmenopausal hormone use and cholecystectomy in a large prospective study. *Obstet Gynecol* 1994; 83:5-11.
 40. Hall PA, Assim R, Lemoine NR, et al. p53 immunostaining as a marker of malignant disease in diagnostic cytopathology (letter). *Lancet* 1991; 338: 513.
 41. Harrison JD, Morris DL, Ellis IO, et al. The effect of tamoxifen and estrogen receptor status on survival in gastric carcinoma. *Cancer* 1989; 64(5):1007-10.
 42. Hasegawa H, Veo H, Nanbara S, et al. Effective preoperative chemoimmunotherapy regimen against advanced gallbladder carcinoma: a case report. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1369-42.
 43. Hendrickse CW, Jones CE, Donovan IA, et al. Oestrogen and progesterone receptors in colorectal cancer and human colonic cancer cell lines. *Br J Surg* 1993; 80(5): 636-40.
 44. Henson DE, Albores-Saavedra J and Corle D. Carcinoma of the gallbladder. Histologic types, stage of disease, grade, and survival rates. *Cancer* 1992; 70(6): 1493-97.
 45. Henson DE, Albores-Saavedra J and Compton CC. Protocol for the examination of specimens from patient with carcinomas of the gallbladder, including those showing focal endocrine differentiation. A basis for checklists. *Arch Pathol Lab Med*, 2000; 124(1):37-40.
 46. Hould FS, Fried GM, Fazekas AG, et al. Progesterone receptors regulate gallbladder motility. *J Surg Res* 1988; 45(6): 505-12.
 47. Hulley S, Grady D, Bush T, et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in post menopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Jama* 1998; 280(7):605-13.

48. Iggo R, Gatter K, Bartek J, et al. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990; 335: 675-79.
49. Itoi T, Watanabe H, Yoshida M, et al. Correlation of p53 protein expression with gene mutation in gallbladder carcinomas. *Pathol Int* 1997; 47(8): 525-30.
50. Jakson IM, Litherland S, Wakeling AE. Tamoxifen and other antioestrogens. In: Powles TJ & Smith IA. Ed Medical management of breast cancer. 1st ed, London, Martin Dunitz 1991; cap 9: 95-103.
51. Joffe N, Antonioli DA. Primary carcinoma of the gallbladder associated with chronic inflammatory bowel disease. *Clin Radiol* 1987; 32: 319-24.
52. Jorde LB, Carey JC, et al. Genética do câncer. In: Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ & White RL Eds. *Genética Médica*. 2^a ed, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000. p. 197-212.
53. Jukemura J. Câncer de vesícula biliar. In: Gayotto LCC, Alves VAF eds. *Doenças do Fígado e Vias Biliares*. Ed, São Paulo: Editora Atheneu, 2001. p. 1039-1047.
54. Juvonen T. Pathogenesis of gallstones. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 577-82.
55. Kammel D, Paakko P, Nuorva K, et al. P53 and c-erbB-2 protein expression in adenocarcinomas and epithelial dysplasias of the gall bladder. *J Pathol* 1993; 170:67-72.
56. Kaushik SP. Current perspectives in gallbladder carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16(8): 848-54.
57. Kiaii B, Xu Q-W and Shaffer EA. The basis for impairment of gallbladder contractility in Male Guinea pigs in vitro. *J Surg Res* 1998; 79(2): 97-102.
58. Kim YW, Huh SH, Park YK, et al. Expression of the c-erb-B2 and p53 protein in gallbladder carcinomas. *Oncol Rep* 2001; 8(5): 1127-32.
59. Knight WA-III, Osborne CK and McGuire WL. Hormone receptors in primary and advanced breast cancer. *Clin Endocrinol Metab*, 1980; 9: 361-8.
60. Ko CY, Schmit P, Cheng L and Thompson JE. Estrogen receptors in gallbladder cancer: detection by an improved immunohistochemical assay. *Am Surg*, 1995; 61(10): 930-3.

61. Kojima O, takahashi T. Endocrine therapy of scirrhous carcinoma of the stomach. *Gan Tokagaku Ryoho* 1986; 13(8):2526-31.(summary)
62. Kondo S, Nimura Y, Hayakawa N, et al. Extensive surgery for carcinoma of the gallbladder. *Br J Surg* 2002; 89(2): 179-84.
63. Kuramoto M, Yamashita J, Ogawa M. Tissue type plasminogen activator predicts carcinoma cells. *Cancer* 1995; 75: 1263-72.
64. Lazcano-Ponce EC, Miquel JF, Muñoz N, et al. Epidemiology and molecular pathology of gallbladder cancer. *Cancer J Clin* 2001; 51: 349-364.
65. Lecereq g, Heuson JC, Deboel MC, Matteiem WH. Oestrogen receptors in breast cancer: a changing concept. *Br Med J* 1975;2: 185-189.
66. Lowengels AB, Walker AM, Althaus PP, et al. Gallstone growth, size and risk of gallbladder cancer. *Hepatology* 1996; 23:1402-11.
67. Malik IA, Abbas Z, Shamsi Z, Daudi I, et al. Immuno-histochemical analysis of estrogen receptors on the malignant gallbladder tissue . *J Park Med Assoc*, 1998; 48(5):123-6.
68. Maringhini A, Morcan JA, Meltan LJIII, et al. Gallstones, gallbladder cancer and other gastrointestinal malignancies. An epidemiologic study in Rochester, Minnesota. *Ann Intern Med* 1987; 107:30-5.
69. McGuirre WL, et al. Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer 1977; 39: 2934-47.
70. Messa C, Maselli MA, Cavallini A, et al. Sex steroid hormone receptors and human gallbladder. Motility in vitro. *Digestion* 1990; 46: 214-19.
71. Mimura H, Takakura N, Kim H, et al. Block Resectin of the hepatoduodenal ligament for carcinoma of the bile duct and gallbladder. Surgical technique and a report of 11 cases. *Hepato-gastroenterology* 1991; 38: 561-67.
72. Miquel JF, Covarrubias C, Villroel L, et al. Genetic epidemiology of cholesterol cholelithiasis among Chilean Hispanics, Amerindians, and Maoris. *Gastroewnterology* 1998; 115: 937-46.

73. Misra S, Chatuverdi A, Goel MM, et al. Overexpression of p53 protein in gallbladder carcinoma in North India. *Eur J Surg Oncol* 2000; 26:164-67.
74. Monteiro MC. Câncer da vesícula biliar. Análise de 100 casos operados. *Arq Bras Med* 1985; 59: 337-44.
75. Muto Y, Sho Y, Kurihara K, et al. Morphological study of carcinoma of the gallbladder: its differences between calculous and acalculous carcinoma. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1985;86(7): 846-52. (summary)
76. Nakamura S, Muro H, Suzuki S. Estrogen and progesterone receptors in gallbladder cancer. *Jpn j Surg* 1989; 19(2): 189-94.
77. Nakayama F. Recent progress in the diagnosis and treatment of carcinoma of the gallbladder - Introduction. *World J Surg* 1991; 15: 313-14.
78. Nevin JE, Moran TJ, Kay S, et al. Carcinoma of the gallbladder: staging, treatment and diagnosis. *Cancer* 1976; 37: 141-8.
79. Nigro AJT, Pugliesi JrWJ, Wechi SL, et al. Câncer da vesícula biliar. *An Paul Med Cir* 1978; 105: 63-70.
80. Oohashi Y, Watanabe H, Ajioka Y, et al. P53 Immunostaining distinguishes malignant from benign lesions of the gall-bladder. *Pathol Int*, 1995; 45(1):58-65.
81. Ouchi K, Matsuno S, Sato T. Long-term survival in carcinoma of the biliary tract. Analysis of prognostic factors in 146 resections. *Arch Surg* 1989; 124: 248-52.
82. Ouchi K, SugawaraT, Ono H, et al. Diagnostic capability and rational resectional surgery for early gallbladder cancer. *Hepato-Gastroenterology* 1999; 46:1557-60.
83. Pandey M, Gautam A, Shukla UK. ABO and Rh blood groups in patients with cholelithiasis and carcinoma of the gallbladder. *BMJ* 1995; 310:1639.
84. Pandey M, Pathak AK, Amitabh G. Carcinoma of the gallbladder. A retrospective review of 99 cases. *Dig Dis Sci* 2001; 46(6): 1145-51.
85. Pandey M, Vishwakarma RA, Khatri AK, et al. Bile, bacteria, and gallbladder carcinogenesis. *J Surg Oncol* 1995; 58(4): 282-83.

86. Piehler JM, Crichlow RW. Primary carcinoma of gallbladder. *Surg Gynecol Obstet* 1978; 147: 929-942.
87. Quan ZW, Wu K, Wang J, et al. Association of p53, p16, and vascular endothelial growth factor protein expressions with the prognosis and metastasis of gallbladder cancer. *J Am Coll Surg* 2001; 193(4) 380-3.
88. Ranelletti FO, Piantelli M, Farinon AT, et al. Estrogen and progesterone receptors in gallbladders from patients with gallstones. *Hepatology* 1991; 14(4): 608-12.
89. Rhode L. Contribuição ao estudo do tratamento cirúrgico dos tumores malignos da vesícula biliar. Porto Alegre 1975. Tese de Livre Docência de Cirurgia Geral; Fundação Faculdade Católica de Medicina de Porto Alegre.
90. Roa I, Araya J, Villaseca M, et al. Gallbladder cancer: immunohistochemical expression of p29 estrogen receptor associated protein and ps2 estrogen induced protein. *Rev Med Chile* 1995; 123: 1333-34
91. Roa I, Araya JC, Villaseca M, et al. Preneoplastic lesions and gallbladder cancer: An estimate of period required for progression. *Gastroenterology* 1996; 111:232-6.
92. Roa I, Villaseca M, Araya J, et al. P53 tumor suppressor gene protein expression in early and advanced gallbladder carcinoma. *Histopathology*, 1997; 31:226-30.
93. Sama C, Moreselli-Labate AM, Venturoli N, et al. The natural history of asymptomatic gallstones: 10 year follow-up in the sirmione study. *Hepatology* 1992; 16:87A
94. Sasano H, Miyazaki S, GouKon Y, et al. Expression of p53 in human esophageal carcinoma. Na immunihistochemical study with correlation to proliferating cell nuclear antigen expression. *Hum Pathol* 1992; 23: 1238-43.
95. Scagg RKR, McMichael AJ, Seamark RF. Oral contraceptives, pregnancy, and endogenous oestrogenous in gallstone disease – a case control study. *Br Med J* 1984; 288: 1795-99.
96. Sheth S, Bedford A, Chopra S. Primary gallbladder cancer: recognition of risk factors and role of prophylatic cholecystectomy. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(6):1402-10.
97. Shirai Y, Ohtani T, Tsukada K, et al. Lymphonode recurrence of gallbladder carcinoma

- successfully managed by systemic chemotherapy with 5-fluoracil and mitomycin C: report of a 5-year survivor. *Eur J Oncol* 1997; 23:457-8.
98. Shirai Y, Yoshida K, Tsukada K, et al. Radical surgery for gallbladder carcinoma. Long-term results. *Ann Surg* 1992; 216 (5): 565-568.
99. Shirai Y, Yoshida K, Tsukada K, et al. Early carcinoma of the gallbladder. *Eur J Surg* 1992; 158: 545-48.
100. Shyr-Ming S-C, Hsin-Tsung H, Wein-Jen C, et al. Progesterone receptor in patients with hepatolithiasis. *Dig Dis Sci* 2001; 46(11): 2374-77
101. Simon JA, Hunninghake DB, Agarwal SK, et al. Effect of estrogen plus progestin on risk for biliary tract surgery in postmenopausal women with coronary artery disease. The Heart and Estrogen/Progestin (HERS) Replacement Study. *Ann Intern Med* 2001; 135(7):493-501.
102. Singletary BK, Thiel DHV, Eagon PK. Estrogen e progesterone receptors in human gallbladder. *Hepatology* 1986; 6(4): 574-79.
103. Stedman KE, Moore GE, Morgan RT. Estrogen receptor proteins in diverse human tumor. *Arch Surg* 1980; 115:244-48.
104. Strom BL, Soloway RD, Rios-Dalenz JL, et al. Risk factors for gallbladder cancer. An International collaborative case-control study. *Cancer* 1995; 76(10): 1747-56.
105. Sumiyoshi K, Nagai E, Chijjiwa F. Pathology of carcinoma of the gallbladder. *World J surg* 1991; 15: 315-21.
106. Tashiro S, Konno T, Mochinaga M, et al. Treatment of carcinoma of the gallbladder in Japan. *Jpn J Surg* 1982; 12:98-104
107. Tazuma S & Kajiyama G. Carcinogenesis of malignant lesion of the gallbladder. *Langenbeck's Arch Surg* 2001; 386(3): 224-9.
108. Teh M, Wee A, Path MCR, et al. Immunohistochemical study of p53 protein in gallbladder and extrehepatic bile duct/ampullary carcinomas. *Cancer* 1994; 74(5): 142-45.
109. Tierney S, Nakeeb A, Wong O, et al. Progesterone alters biliary flow dynamics. *Ann Surg*

- 1999; 229(2): 205-9.
110. Tobias ES and Black DM. The Molecular biology of cancer. In: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE & Korf BR eds. In Principles of Medical Genetics. 4th. ed. London: Harcourt Publishers Limited, 2002. p. 533-37.
 111. Walker RA, Dearing SJ, Lane DP, et al. Expression of p53 protein in infiltrating and in situ breast carcinomas. *J Pathol* 1991; 165: 203-211.
 112. Wanebo HJ. Carcinoma of gallbladder. *J Surg Oncol* 1993; 3 (supl.): 134-9.
 113. Washington K & Gottfried MR. Expression of p53 in adenocarcinoma of the gallbladder and bile ducts. *Liver* 1996; 16: 99-104.
 114. Wee A, Teh M, Raju GC. Clinical importance of p53 protein in gallbladder carcinoma and its precursor lesions. *J Clin Pathol*, 1994; 47:453-456.
 115. Weiss KM, Ferrel RE, Harris CL, Styne PN. Genetics and epidemiology of gallbladder disease. *Am J Hum Genet* 1984; 38:1259-87.
 116. Wistuba II, Gazdar AF, Roa I, et al. p53 protein overexpression in gallbladder carcinoma and its precursor lesions: an immunohistochemical study. *Hum Pathol*, 1996; 27(4):360-65.
 117. Wistuba II, Sugio K, Hung J, et al. Allele specific mutations involved in the pathogenesis of endemic gallbladder carcinoma in Chile. *Cancer Res* 1995; 55:2511-15.
 118. Xiao Z-L, Chen Q, Biancani P & Behar J. Mechanisms of gallbladder hypomotility in pregnant guinea pigs. *Gastroenterology* 1999; 116(2): 411-19.
 119. Yamagiwa H, Tomiyama H. Intestinal metaplasia-displasia-carcinoma sequence of the gallbladder. *Acta Pathol Jpn* 1986;36: 989-97.
 120. Yamaguchi A, Kurosaka Y, Fushida S, et al. Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short-term prognosis. *Cancer* 1992; 70: 2778-84.
 121. Yamamoto M, Nakajo S, Tahara E. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in human gallbladder. *Acta Pathol Jpn* 1990; 40(1): 14-20.
 122. Yamamura T, Takahashi T, Ishikawa Y, et al. Progesterone inhibits the contractive motility of the guinea pig gallbladder. *Jpn J Surg* 1987; 17(5): 388-94.

123. Yanagisawa N, Mikami T, Koike & Okayasu I. Enhanced cell kinetics, p53 accumulation and high p21 expression in chronic cholecystitis: comparison with background mucosa of gallbladder carcinomas. *Histopathology* 2000;36(1): 54-61.
124. Zetler CG. Detecção imuno-histoquímica do p53 no carcinoma epidermóide do colo do útero e sua associação com o papiloma viral humano e vírus Herpes simples tipo 2. Porto alegre 1996. Tese de Doutorado - FFFCMPA.
125. Ziliotto JA, Kunzle JE, Sgarbi EC. Carcinoma primário de vesícula biliar. *Rev Bras Cancerol* 1985; 31: 103-106.

ARTIGO-1 REDIGIDO EM INGLÊS

The value of p53 protein expression in gallbladder carcinoma: Analysis of 60 cases.

Andréa Oxley da Rocha M.D. , Lígia Maria Barbosa Coutinho M.D, PhD. , João Grigoletti Scholl M.D., Laís Leboutte M.D.

Pathology Department, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

ABSTRACT

Background/aims: few studies, with small samples and diverging results, have been performed to evaluate the p53 protein expression in gallbladder carcinoma and its relationship to different clinico-pathological parameters. Based on these facts, we performed a study for the purpose of assessing p53 expression in this disease and its association to prognostic factors.

Material and methods: sample of 141 gallbladders, with 60 cases of carcinoma, 62 cholelithiasis and 19 without gallstones were assessed to evaluate immunohistochemically the expression of p53 protein, and correlates the p53 expression with prognosis, survival and other clinicopathological parameters in the cases of gallbladder cancer.

Results: p53 expression was positive in 58.3% of carcinomas of the gallbladder, 9.7% of the chronic cholecystitis and 10.5% of the gallbladders not associated to stones. In cases of carcinoma of the gallbladder no association was found between p53 protein overexpression and the prognostic factors, histological type or grade, presence of gallstones and survival.

Conclusion: the mutation of gene p53 is involved in the pathogenesis of carcinoma of the gallbladder, and the intense chronic inflammatory process associated or not with cholelithiasis, appears to be one of the factors involved in the genesis of this process. Our data does not show an association between p53 protein expression and patient's survival prognosis.

Key words: gallbladder, gallbladder cancer, immunohistochemical, p53

Abbreviations: GCa = gallbladder cancer

INTRODUCTION

Gallbladder cancer is considered an infrequent disease, and even today still associated with a rapidly lethal course. Despite the great progress achieved in the treatment of malignant tumors of the digestive tract, gallbladder carcinoma (GCa) is still an exception. The prognosis of this tumor is poor and, in most series, presents a 5-year survival rate of at most 5%, since less than 10% of the patients have a resectable tumor at the time of diagnosis, and mean survival is less than 6 months¹⁻⁴.

Despite the low frequency, this neoplasm represents 0.76% to 1.2% of all carcinomas⁵, and is 5th among the neoplasms of the digestive tract^{6,7}, with an average of 3%⁸. Furthermore, GCa is the most common malignant tumor of the biliary tract, corresponding to approximately 1 to 3% of the cholecystectomy specimens^{7,9}. Brazilian series^{10,11} confirm these data, and Ziliotto et al.¹² reported an incidence of 1.02% of GCa as an incidental finding in 885 cholecystectomies performed for cholecystitis.

The rate of gallbladder carcinoma varies widely throughout the world^{3,7,13}, and it is most frequent in a few countries in Latin America and India. In Chile, this disease is the third main cause of death as compared to all neoplasms, and the second among the digestive tract tumors, corresponding to a high rate of 13 per 100,000 inhabitants. In India it occurs in approximately 4.5 per 100,000 inhabitants in the male population, reaching levels of 10.1 among women in the north of that country. High rates are also reported in Israel, Poland, Mexico and Bolivia. In the United States, this is a rare neoplasm, with a rate of 1.1 per 100,000 inhabitants for males and 2.2 for females^{3,5,13-16}. In Porto Alegre, Brazil, it accounts for 3.09 deaths per 100,000 inhabitants¹⁷.

Currently, it has already been established in the literature that invasive carcinoma of the gallbladder is preceded by pre-malignant lesion -- dysplasia and carcinoma in situ -- and this fact supplies a good model for the study of genetic anomalies and the progression of neoplasms¹⁸. These epithelial abnormalities have been well characterized as a continuum of

cytological modifications, reflecting gene changes that are important in the pathogenesis of this neoplasm¹⁹. However, despite recent advances in the molecular carcinogenesis of several malignant neoplasms, the pathogenic mechanism involved in the progression of a premalignant lesion to invasive carcinoma of the gallbladder has not yet been fully explained.

Cancer in general results in multiple gene changes, and often various genetic rearrangements occur which may activate or inactivate genes. Several studies²⁰⁻²² have shown that p53 gene abnormalities are involved in the genesis of approximately 50% of the malignant neoplasms²³. The p53 gene is located on the short arm of chromosome 17, and acts as an inhibitor of cell proliferation¹⁸. This gene may be altered by various mutations that occur at several sites of its extension. For this reason, many mutagenic agents may lead to its modification. The mutation of a p53 gene allele is often accompanied by a deletion of the other allele, resulting in the formation of an inactive protein product²⁴. This mutant p53 protein inactivates the normal p53 protein, causing loss of the tumor suppression function of this gene, and enabling oncogenic activity. The p53 protein is present in small amounts in normal tissue cells, since it is metabolically labile, and rapidly degraded in the nucleus and, probably for this reason, is usually undetectable. The mutant form of this protein has an increased half-life and can be detected by immunohistochemistry in many tumors^{18,23}. This mutation appears to play an important role in the pathogenesis of many malignant neoplasms such as gastric²⁴, colon²⁵, breast²⁶, lung²⁷ and esophageal cancer²⁸, and it is unusual in benign tumors²⁷.

The correlation of p53 protein expression with the gene mutation in GCa was assessed in a recent study performed by Itoi et al.²⁹ which showed a 56.5% sensitivity of the p53 mutation, 90% specificity and 1.47 validity. Since the first publication by Kammel et al.²⁰ in 1993 to evaluate the presence of p53 protein expression immunohistochemically in GCa, there have been few publications^{18,20,21,24,29-38}, with very variable positivity findings (between 36.9 and 95%) which are conflicting regarding the prognostic value of this mutation.

Therefore, we performed this study to evaluate immunohistochemically the presence of p53 protein expression in gallbladder carcinomas and studied its relationship with survival and prognostic factors, using the Nevin classification³⁹ and TNM staging system (*American Joint*

Comitte on Cancer 1997)⁴⁰. In addition, we evaluate the p53 protein expression in non-neoplastic mucosa of the gallbladder with and without stones.

METHODOLOGY

Surgical specimens from 141 gallbladders were collected from the files in the Department of Pathology. The specimens included 60 consecutive cases of gallbladder cancer, 62 from cholecystectomies performed for cholelithiasis and 19 gallbladders without stones, obtained from cases in which they were resected for other pathologies that did not involve them. The hospital records of these patients were reviewed to obtain the pertinent clinical information.

Based on the paraffin blocks, the histological diagnosis was once again confirmed in the cases of neoplasm, and the immunohistochemical technique was performed to identify the p53 protein reactivity in the 3 groups. The technique used was streptoavidin-biotin-peroxidase. The sections made were deparaffinized in xylol and rehydrated with alcohol. Preliminary treatment is applied by heating the slides in the microwave in a sodium citrate solution, in order to revert the effect of fixation in formalin. Endogenous peroxidase activity was blocked by immersing the slides in a solution with H₂O₂ 0,3% and methanol for 30 min. Then the slides were washed twice with a phosphate-buffered solution (PBS), at 4°C for 20 min and then in normal saline solution for 20 min. Next the sections are covered with primary monoclonal antibody anti-protein p53 produced in rats (Dako Corporation, D0-7) at a 1:500 concentration, and remain in the refrigerator during the night. After another washing with PBS, the sections were incubated with secondary antibody anti-immunoglobulin of rats for 30 min and then in a streptoavidine-biotine-peroxidase complex for 30 min at a 1:200 dilution and then washed with PBS. The antigen-antibody connection was visualized with DAB (diamine benzidine-tetrachloride) and counter-stained with hematoxylin. As positive control we used sections of breast tumor (previously confirmed as positive for p53) and as negative control, slides of this same tumor using saline solution instead of primary antibody.

To analyze p53 reactivity, we considered positive only those cases in which there was an unequivocal homogeneous brown staining of the nucleus of the gallbladder epithelium or of the tumor. The evaluation used was the same proposed by Teh²¹, based on the amount of nuclei stained in the slides examined, and it was divided into three categories: less than 10%, 10% to 50% and over 50% of the tumor cell nuclei stained. The intensity of staining was also divided into categories of mild/moderate and intense. The case was considered positive only when there was intense staining of over 10% of the nuclei cells or moderate staining of over 50% of the cells.

The evaluation of the relationship between the p53 protein expression and the prognosis of this neoplasm was performed using the prognostic factors validated by Henson³ in 1992, with the Nevin classification³⁹ (1976) and the TNM staging system⁴⁰ to assess the stage of the disease, besides the study of grade and histological type of the lesions. For purposes of statistical analysis we divided the GCa cases in two categories: early (Nevin stages I and II) and advanced (Nevin stages III, IV and V), according to the criteria of Sato et al⁴¹.

The statistical analysis used to assess the association between the clinic-pathological parameters and p53 reactivity was the Chi-square test and Fisher's exact test. The analysis of survival was performed using the Kaplan-Meier curve.

RESULTS

In the 60 cases studied, the mean age was 62 years, and 86.7% of the patients presented for diagnosis over the age of 50. There was no statistically significant difference in mean age between patients with cholelithiasis (mean age 59.7) and those with neoplasm. Eighty-six percent (52) of the patients with GCa were female.

The presence of p53 reactivity occurred in 58.3% (35) of the cases of GCa, 9.7% (6) of the cases without cholelithiasis and 10.5% (2) cases of gallbladder cholelithiasis. Gallstones were found in 83.3% of the patients with GCa (52 patients), but no statistically significant difference was found as to the positivity of p53 in the absence or presence of gallstones, in patients with this neoplasm (fig.1). All the results of the clinic-pathological parameters assessed can be seen in table 1.

As to histological type, 53 (88.3%) were adenocarcinomas, 6 (10%) adenosquamous carcinomas and 1 (1.7%) undifferentiated. Reactivity for p53 was positive in 58.55% of the adenocarcinomas, 50% of the adenosquamous ones and the undifferentiated tumor also presented an expression of this protein.

Thirty-seven per cent of the cases considered early (Nevin classification) presented p53 protein expression and 61.5% of the invasive carcinoma and there was no statistically significant difference between these two groups. Similarly, in the TNM staging system there was no significance in the differences found in the early cases (stage I and II) and advanced disease (stage III and IV) to the expression of the p53 protein. The same can be observed in relation to histological grade and the other clinic-pathological parameters (table 1).

Since these were cases from the files, survival could only be evaluated for 42 patients (70%). The mean survival of patients with GCa was 9.9 months (standard error 2.56) and median 3.97months. No association was found between p53 protein expression and the time of survival of these patients (fig.2).

DISCUSSION

Besides the difficulty in recognizing the factors involved in the genesis of gallbladder carcinoma, the unspecific clinical presentation itself makes it difficult to early diagnose this disease. Although the carcinoma of the gallbladder is the most common biliary tract malignancy, it is always diagnosed at advanced stages^{13,42}. These facts have led to a constant attempt to understand the carcinogenesis of this neoplasm, which is not yet clear.

Few studies^{18,20,21,24,29-38} were performed to assess the expression of p53 protein in GCa, and there is a conflict in the results, both as to its positivity, and as to the association between immunoreactivity and prognosis of this neoplasm, a fact that is considered due partly to the small samples associated with the low frequency of this neoplasm. Furthermore, the discrepancies observed as to p53 positivity may also be related to the different antibodies used in the studies. Kamel et al²⁰ and Ajiki et al³⁵ used polyclonal CM1 antibody and presented less immunoreactivity than most authors who used monoclonal D07 and Pab1801 antibody, which recognizes epitopes that are different from those recognized by CM1. These differences may be observed in table 2.

Although we observed a difference in the mean age of cholelithiasis patients (59.7 years) and patients with GCa (62 years), there was no statistical difference, to the contrary of findings published in a recent study performed by Yanagisawa et al⁴³, who found means of 57.1 and 66.6 years, respectively, suggesting that this difference in age among the patients (at the time of surgery) could account for the possible modifications in the gallbladder epithelium triggered by the chronic inflammatory process that occurs over time in cholecystitis, and which may give rise to the neoplasm.

Our data, in a sample of 60 cases of the gallbladder cancer, showed that there was no association between the p53 protein expression and the presence or absent of gallstones (table 1). Recently, Misra et al³⁷, evaluating 20 cases of GCa reported 70% of immunoreactivity for the p53 protein, observing a significant correlation between GCa associated with gallstones and

overexpression of p53. An inverse relationship was observed by Ajiki et al³⁵ in 48 cases studied, suggesting an association between GCa without gallstones and the mutation of the p53 gene, implying different pathways to the carcinogenesis of this neoplasm, whether this is or not influenced by the stimuli of the gallstones. Kamel et al²⁰ evaluated 30 cases of GCa and did not observe a statistical significance in the difference found in the presence or absence of stones.

It should be pointed out that the cases of p53 protein positivity that we observed in the group of cholelithiasis patients in all cases (6) corresponded to acute cholecystitis (fig.1). Among the gallbladders without stones (2), both were associated to a chronic inflammatory process of the gallbladder as a result of obstruction of the main bile duct, in one case due to chronic pancreatitis and in the other because of gastric neoplasm invasion. Similarly to our observations, on the contrary of the other authors, Oohashi et al³² observed the expression of p53 protein in the 6 cases of acute cholecystitis studied, and in 5 of 23 chronic cholecystitis, but with a sporadic immunoreactivity pattern, completely different from the one observed in the GCa, which mostly presented a diffuse or sometimes focal pattern. Yanagisawa et al⁴³ studying 108 gallbladders from cholecystectomies due to cholecystitis, observed the expression of this protein in the mucous membrane of gallbladders with severe chronic cholecystitis, with the same sporadic pattern, and found that this process is associated with increased cell renewal, the damaged cells being eliminated by apoptosis, and concluded that, although the damage to DNA due to chronic cholecystitis has not yet been fully explained, the finding of high p53 protein expression suggests that genome injury may often occur in the epithelial cells in chronic cholecystitis. This fact, associated with proliferation, may contribute to carcinogenesis, although unknown co-factors require identification.

We did not observe an association between the immunoreactivity of p53 and the prognostic indexes assessed (table 1), which suggests that the expression of this protein is not related to tumor progression or to metastatic dissemination, similar to the observations by Ajiki et al³⁵ (in 48 patients). However, Roa et al³⁴ reported 45% of positivity of p53 in 191 carcinomas of the gallbladder, all of the controls (25 chronic cholecystitis) being negative, greater positivity

being observed in the invasive carcinomas (122) than in the early lesions (24), but due to the small number of early lesions, these data must be assessed very sparingly.

We also did not observe an association between time of survival in patients with absence or presence of p53 immunoreactivity, which agrees with the findings of Kim³⁰ and Ajiki³⁵.

Statistically significant differences were not found in the analyzed parameters. Although the differences observed are magnificent (for instance in the Nevin classification: 38% Vs 62%), they could be considered not significant as to the statistic view, due to small sample (few case numbers of early cancer) what can lead to a low statistic power.

The high rate of patients with a late diagnosis together with the short survival observed in these patients, shows the advantage of early detection of this carcinoma and, certainly, the study of the risk factors still appears to be the most accessible information available to identify the patients with a potential risk for developing this neoplasm, although primary prevention for gallbladder carcinoma is not expected in the near future⁴⁴. The histological type and grade are useful prognostic factors, but the stage of the disease is probably the most reliable prognostic factor according to most authors^{3,39}. Patients in whom the tumor is confined to the gallbladder at the time of diagnosis have a better prognosis than those in whom the tumor has propagated to the liver or regional lymph nodes. The best results in terms of survival have been observed in patients with carcinoma in situ or early carcinoma whose diagnosis is performed in specimens removed due to cholelithiasis³.

Despite the diverging observations, there appears to be a consensus that the mutation of the p53 gene could play a crucial role in the carcinogenesis of GCa, but, based on our observations and the broad review of the pertinent literature, there really appears to be no association with sex, age, histological grade and type and prognostic factors.

Currently, the hypothesis proposed for the association between the presence of cholelithiasis and GCa is that at the molecular level, the chronic inflammatory process triggered by the presence of the stones may determine, over time, the occurrence of an allele-specific mutation, i.e., loss of heterozygosity of gene p53, and overexpression of the mutant p53 protein (inactive)⁴. Based on this mutation, it is considered that a malignant change in the gallbladder

mucosa may result. However, in the absence of gallstones it should be assumed that the other factors that could trigger this mutation might exist, suggesting the occurrence of different mechanisms involved in its pathogenesis. Although this association is plausible and accepted, the prevention of this neoplasm by prophylactic cholecystectomy in asymptomatic cholelithiasis, in high risk populations, is still a controversial subject¹⁶.

Recent laboratory experiments⁴⁵ have shown that the insertion of a normal p53 gene in tumor cells results in a significant reduction of oncogenesis. This suggests that the insertion of normal p53 in tumors of patients with p53 mutation using a gene therapy approach may, in principle, become a possibility of treatment for this neoplasm.

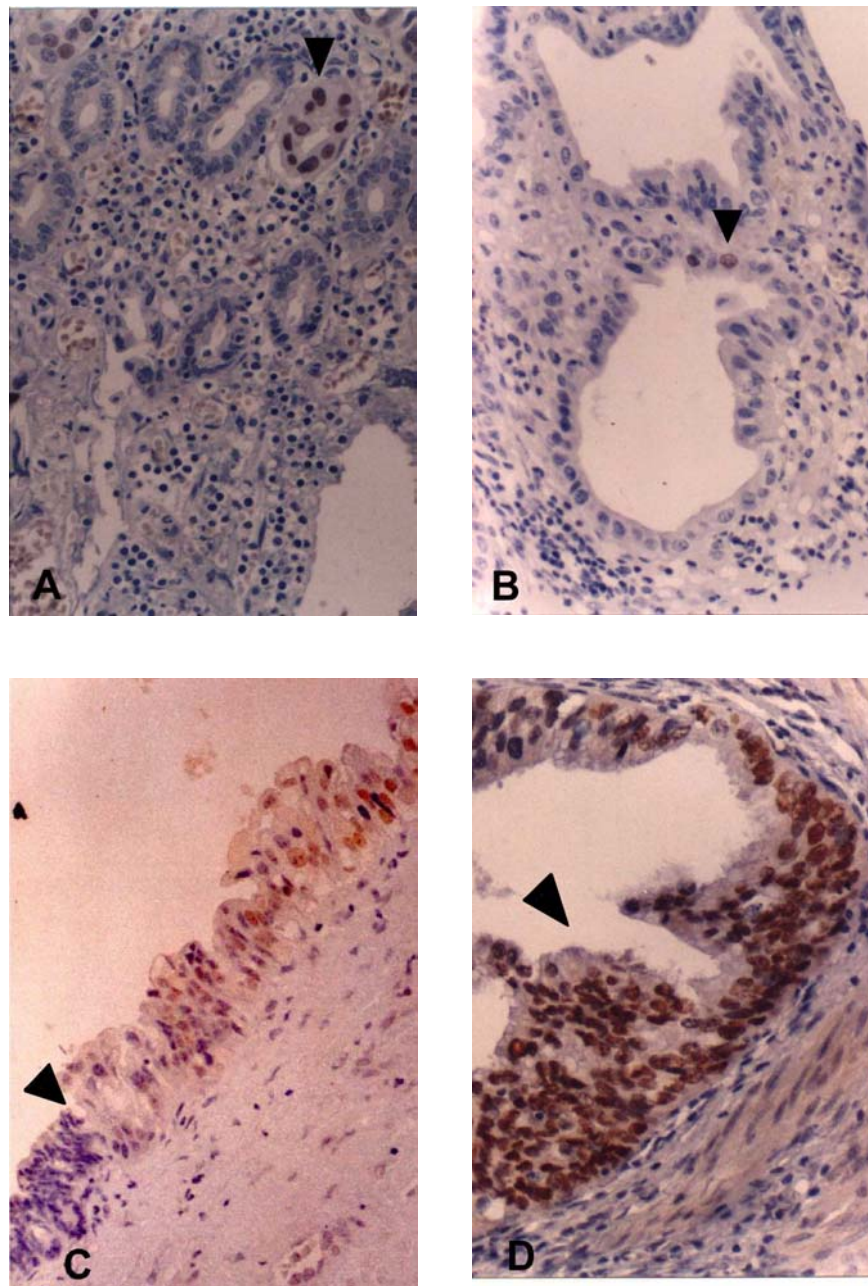


Figure 1. (A) Gallbladder without stones with chronic inflammatory process showing a sporadic immunoreactive pattern (immunoperoxidase 20x). (B) Acute cholecystitis with sporadic pattern p53-positive nuclei (immunoperoxidase 20x). (C) Adjacent area from gallbladder carcinoma showing abrupt transition between the p53-positive (dysplastic) epithelium and the non-staining residual normal gallbladder (immunoperoxidase 20x). (D) Gallbladder carcinoma showing extensive p53 staining: diffuse pattern (immunoperoxidase 20x).

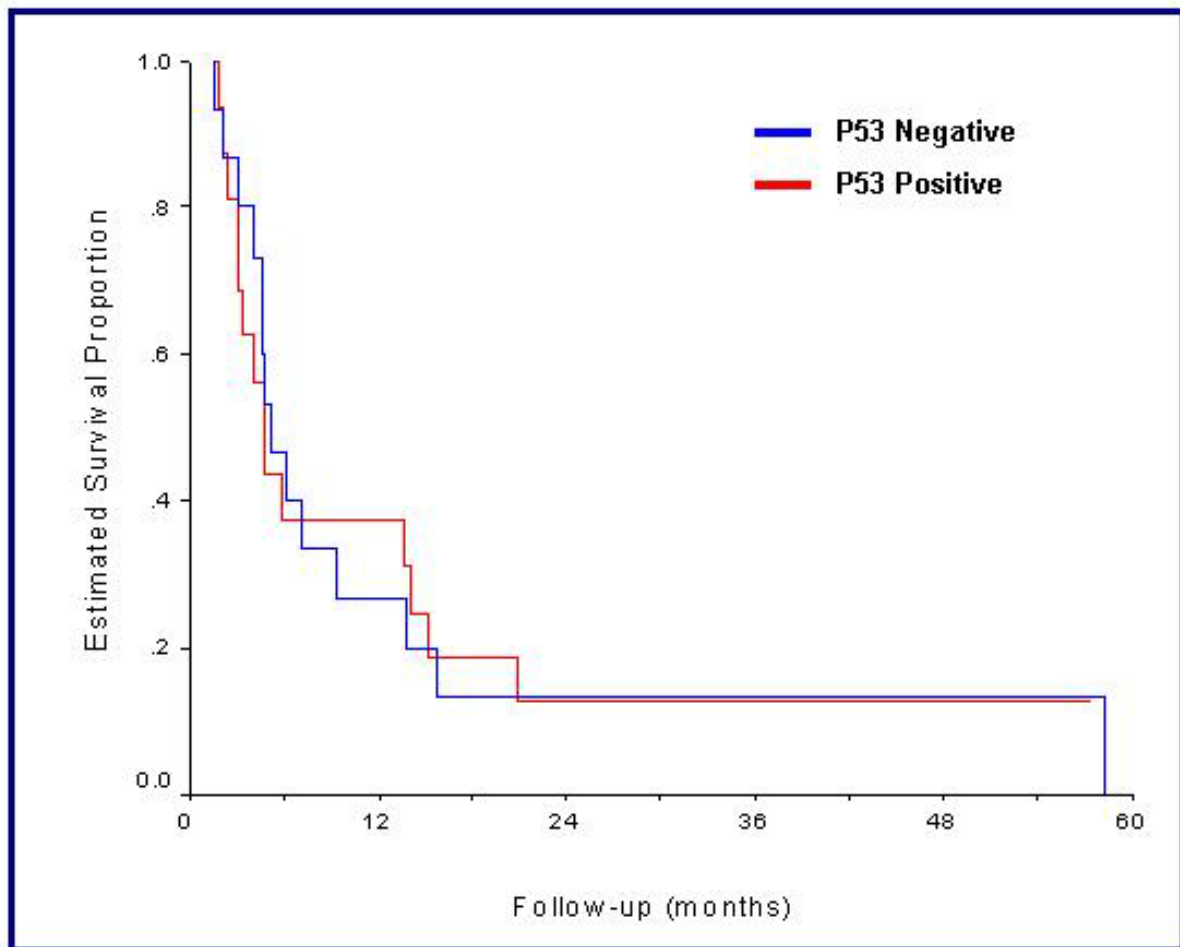


Figure 2. Patients survival in accord with the p53 expression

Table 1. Association of p53 immunoreactivity with clinical-pathological aspects and prognostic factors in carcinoma of the gallbladder

Parameter	No. of cases	No. positive p53 cases (%)	value of p
Age			0,70*
<50 years	8	4 (40%)	
≥50 years	52	31 (59,6%)	
Sex			0,44*
Female	52	29 (55,8%)	
Male	8	6 (75%)	
Association with gallstones			1,0*
Present	50	29 (55,6%)	
Absent	10	6 (60%)	
Histological grade [†]			0,71*
Well differentiated	13	8 (61,5%)	
Moderately differentiated	28	15 (53,6%)	
Poorly differentiated	12	8 (66,7%)	
TNM stage			0,14*
I and II	9	3 (33%)	
III and IV	51	32 (62,7%)	
Nevin classification			0,26*
I and II	8	3 (37,5%)	
III, IV and V	52	32 (61,5%)	

* Non-significant p values

† referring to the 53 cases of adenocarcinoma

Table 2. Immunohistochemical studies of p53 in carcinoma of the gall bladder

Author	No. cases	p53 positivity(%)	antibody
Kamel et al ²¹ 1993	30	14 (47%)	polyclonal CM1
Teh et al ²² 1994	24	22 (92%)	monoclonal D07
Wee et al ³² 1994	24	22 (92%)	monoclonal D07
Diamantis et al ³⁴ 1995	11	8 (72,7%)	polyclonal CM1, monoclonal D07
Oohashi et al ³³ 1995	41	35 (85,4%)	monoclonal PAb1801
Wistuba et al ¹⁹ 1996	52	34 (65,4%)	monoclonal Ab-6
Ajiki et al ³⁶ 1996	48	19 (39,6%)	polyclonal CM1
Washington et al ³⁷ 1996	12	7 (58%)	monoclonal Ab-2
Fujii et al ²⁵ 1996	65	36 (55%)	monoclonal D07
Roa et al ³⁵ 1997	191	86 (45%)	monoclonal Ab-6
Itoi et al ³⁰ 1997	33	23 (69,6%)	monoclonal PAb 1801
Misra et al ³⁸ 2000	20	14 (70%)	monoclonal D07
Kim et al ³¹ 2001	71	48 (67,6%)	monoclonal D07
Quan et al ³⁹ 2001	24	15 (65%)	monoclonal D07
This study	60	35 (58,3%)	monoclonal D07

REFERENCES

- 1 Sumiyoshi K, Nagai E, Chijiwa F: Pathology of carcinoma of the gallbladder. *World J surg* 1991; 15:315-21.
- 2 Ouchi K, Matsuno S, Sato T: Long-term survival in carcinoma of the biliary tract. Analysis of prognostic factors in 146 resections. *Arch Surg* 1989; 124:248-52.
- 3 Henson DE, Albores-Saavedra J, Corle D: Carcinoma of the gallbladder. Histologic types, stage of disease, grade, and survival rates. *Cancer* 1992; 70(6):1493-97.
- 4 Tazuma S, Kajiyama G: Carcinogenesis of malignant lesion of the gallbladder. *Langenbeck's Arch Surg* 2001; 386(3):224-9.
- 5 Nakayama F: Recent progress in the diagnosis and treatment of carcinoma of the gallbladder. *World J Surg* 1991; 15:313-14.
- 6 Bhaskaran V: Hormonal receptors in carcinoma of the gallbladder. *Trop Gastroenterol* 2000; 21(2):48-50.
- 7 Barbosa-Coutinho LM, Arnt RA, Rocha JL, Ossanai R: Carcinoma de vesícula biliar: estudo de 26 casos. *Rev. AMRIGS* 1992; 36(1):9-14.
- 8 Cunha JE, Penteadó S, Jukemura J: Neoplasias da Vesícula biliar. In Kalil AN, Coelho J, Strauss E eds. *Fígado e Vias Biliares-Clinica e Cirurgia*. Editora Revinter R Ltda, Rio de Janeiro 2001:650-57.
- 9 Pandey M, Pathak AK, Amitabh G: Carcinoma of the gallbladder. A retrospective review of 99 cases. *Dig Dis Sci* 2001; 46(6):1145-51.
- 10 Nigro AJT, Pugliesi JrWJ, Wechi SL, et al: Câncer da vesícula biliar. *Ann Paul Med Cir* 1978; 105:63-70.
- 11 Monteiro MC: Câncer da vesícula biliar. Análise de 100 casos operados. *Arq Bras Med* 1985; 59:337-44.
- 12 Ziliotto JA, Kunzle JE, Sgarbi EC: Carcinoma primário de vesícula biliar. *Rev Bras Cancerol* 1985; 31:103-106.

- 13 Kaushik SP: Current perspectives in gallbladder carcinoma: J Gastroenterol Hepatol 2001; 16(8):848-54.
- 14 Aretxabala X, Roa I, Burgos L, et al: Gallbladder cancer in Chile. A report on 54 potentially resectable tumors. Cancer 1992; 69(1):60-65.
- 15 Strom BL, Soloway RD, Rios-Dalenz JL, et al: Risk factors for gallbladder cancer. An International collaborative case-control study. Cancer 1995; 76(10):1747-56.
- 16 Sheth S, Bedford A, Chopra S: Primary gallbladder cancer: recognition of risk factors and role of prophylactic cholecystectomy. Am J Gastroenterol 2000; 95(6):1402-10.
- 17 Brumini R, Torloni H, Henson DE, Gotieb SLD, Souza JMP: Câncer no Brasil - Dados Histopatológicos - 1976—1980, Rio de Janeiro, Ministério da Saúde 1982.
- 18 Wistuba II, Gazdar AF, Roa I, et al: P53 protein overexpression in gallbladder carcinoma and its precursor lesions: an immunohistochemical study. Hum Pathol 1996; 27(4):360-65.
- 19 Wistuba II, Sugio K, Hung J, et al: Allele specific mutations involved in the pathogenesis of endemic gallbladder carcinoma in Chile. Cancer Res 1995; 55:2511-15.
- 20 Kammel D, Paakko P, Nuorva K, et al: P53 and c-erbB-2 protein expression in adenocarcinomas and epithelial dysplasias of the gall bladder. J Pathol 1993; 170:67-72.
- 21 Teh M, Wee A, Path MCR, et al: An immunohistochemical study of p53 protein in gallbladder and extrahepatic bile duct/ampullary carcinomas. Cancer 1994; 74(5): 142-45.
- 22 Greenblatt MS, Bennet WT, Hollstein M, et al: Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res 1994; 54:4855-78.
- 23 Tobias ES and Black DM: The Molecular biology of cancer. In Rimon DL, Connor JM, Pyeritz RE & Korf BR eds. In Principles of Medical Genetics. 4th. Ed. Harcourt Publishers Limited, London 2002, 533-37.
- 24 Fujii K, Yokozaki H, Yasui W, et al: High frequency of p53 gene mutation in adenocarcinomas of the gallbladder. Cancer epidemiology, Biomarkers & prevention 1996; 5:461-66.
- 25 Yamaguchi A, Kurosaka Y, Fushida S, et al: Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short-term prognosis. Cancer 1992; 70:2778-84.

- 26 Walker RA, Dearing SJ, Lane DP, et al: Expression of p53 protein in infiltrating and *in situ* breast carcinomas. J Pathol 1991; 165:203-211.
- 27 Iggo R, Gatter K, Bartek J, et al: Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. Lancet 1990; 335:675-79.
- 28 Sasano H, Miyazaki S, GoouKon Y, et al: Expression of p53 in human esophageal carcinoma: an immunohistochemical study with correlation to proliferating cell nuclear antigen expression. Hum Pathol 1992; 23: 1238-43.
- 29 Itoi T, Watanabe H, Yoshida M, et al: Correlation of p53 protein expression with gene mutation in gallbladder carcinomas. Pathol Int 1997; 47(8):525-30.
- 30 Kim YW, Huh SH, Park YK, et al: Expression of the c-erb-B2 and p53 protein in gallbladder carcinomas. Oncol Rep 2001; 8(5): 1127-32.
- 31 Wee A, Teh M, Raju GC: Clinical importance of p53 protein in gallbladder carcinoma and its precursor lesions. J Clin Pathol, 1994; 47:453-456.
- 32 Oohashi Y, Watanabe H, Ajioka Y, et al: P53 Immunostaining distinguishes malignant from benign lesions of the gall-bladder. Pathol Int, 1995; 45(1):58-65.
- 33 Diamantis I, Karamitopoulou E, Perentes E, et al: P53 protein immunoreactivity in extrahepatic bile duct and gallbladder cancer: correlation with tumor grade and survival. Hepatology 1995; 22(3):774 –79.
- 34 Roa I, Villaseca M, Araya J, et al: P53 tumor suppressor gene protein expression in early and advanced gallbladder carcinoma. Histopathology 1997; 31: 226-30.
- 35 Ajiki T, Onoyama H, Yamamoto M, et al: P53 protein expression and prognosis in gallbladder carcinoma and premalignant lesions. Hepatogastroenterology 1996; 43:521-26.
- 36 Washington K, Gottfried MR: Expression of p53 in adenocarcinoma of the gallbladder and bile ducts. Liver 1996; 16:99-104.
- 37 Misra S, Chatuverdi A, Goel MM, et al: Overexpression of p53 protein in gallbladder carcinoma in North India. Eur J Surg Oncol 2000; 26:164-67.

- 38 Quan ZW, Wu K, Wang J, et al: Association of p53, p16, and vascular endothelial growth factor protein expressions with the prognosis and metastasis of gallbladder cancer. *J Am Coll Surg* 2001; 193(4): 380-3.
- 39 Nevin JE, Moran TJ, Kay S, et al: Carcinoma of the gallbladder: staging, treatment and diagnosis. *Cancer* 1976; 37: 141-8.
- 40 Albores-Saavedra J, Henson DE, Sobin LH: The WHO Histological Classification of Tumors of the Gallbladder and Extrahepatic Bile Ducts. A comentary on the second edition. *Cancer* 1992; 70(2): 410-414.
- 41 Sato T, Koyama K, Yamaguchi H, et al: Early carcinoma of gallbladder. *Gastroenterol Jpn* 1981; 16:459-64.
- 42 Jukemura J: Câncer de vesícula biliar. In Gayotto LCC, Alves VAF eds. *Doenças do Fígado e Vias Biliares*. Editora Atheneu, São Paulo 2001: 1039-1047.
- 43 Yanagisawa N, Mikami T, Koike, Okayasu I: Enhanced cell kinetics, p53 accumulation and high p21 expression in chronic cholecystitis: comparison with background mucosa of gallbladder carcinomas. *Histopathology* 2000; 36(1): 54-61.
- 44 Lazcano-Ponce EC, Miquel JF, Muñoz N, et al: Epidemyology and molecular pathology of gallbladder cancer. *Cancer J Clin* 2001; 51:349-364.
- 45 Jorde LB, Carey JC: Genética do câncer. In Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ & White RL Eds. *Genética Médica*. 2^a ed, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2000; 197-212.

ARTIGO 2 - REDIGIDO EM INGLÊS

CONTROVERSIES ON THE PRESENCE OF ESTROGEN AND PROGESTERONE RECEPTORS IN GALLBLADDER CARCINOMA

Andrea Oxley da Rocha, M.D., Ligia Maria Barbosa-Coutinho, M.D., PhD. , Lais Dal’Pino
Leboutte, M.D. , João Grigoletti Scholl. M.D.

Pathology Department, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre,
Porto Alegre, Brazil.

ABSTRACT

Background/Aims: Several studies have been performed with small samples and divergent results, in order to assess the presence of estrogen and progesterone receptors in different gallbladder disorders, using different methods. Based on these facts we performed a study using an immunohistochemical technique on a significant sample, to evaluate the presence of these receptors.

Methods: a sample of 141 gallbladders, with 60 carcinoma, 62 cholelithiasis and 19 cases of normal gallbladders was evaluated using the immunohistochemical streptavidin-biotin-peroxidase technique for the presence of estrogen and progesterone receptors.

Results: estrogen receptors were found in 6.7% of the gallbladder carcinomas, 4.8% of the gallbladders with cholelithiasis and 15.8% of the normal gallbladders. Progesterone receptors were observed in 6.7% of the malignant neoplasms of the gallbladder, 6.5% of the gallbladders with cholelithiasis and 26.3% of the normal gallbladders.

Conclusion: based on our results, we concluded that there is only a small presence of estrogen and progesterone receptors, and this is similar in the case of gallbladders with carcinoma and cholelithiasis, then it is possible that cholelithiasis acts as a connection between the action of these hormones and the malignant neoplasm of the gallbladder.

Key words: gallbladder cancer, receptors, progesterone

INTRODUCTION

Gallbladder neoplasm is considered a rare disorder, and is still associated with a rapidly lethal course[1-3]. Despite the great progress achieved recently in treating malignant tumors of the digestive tract, the carcinoma of the gallbladder (GCa) is still an exception[1]. This tumor has a poor prognosis and, in most series[1,3,4] it presents a survival rate of at most 5% in 5 years. Less than 10% of the patients present with a resectable tumor at the time of diagnosis, and the mean survival is less than 6 months[4].

Despite the low frequency, this neoplasm represents 0.7 to 1.2% of all carcinomas[5], and is the fifth most frequent among digestive tract neoplasms[6,7], with an average of 3%[8]. Moreover, GCa is the most common malignant tumor of the biliary tract, corresponding to approximately 1 to 3% of the cholecystectomy specimens[7,9]. Brazilian series[10,11] confirm these data, and Ziliotto et col[12] reported a 1.02% rate of GCa, as an incidental finding in 885 cholecystectomies performed for cholecystitis.

The gallbladder cancer mainly affects aged women, and the rate increases with age: over 90% of the patients are aged over 50 at diagnosis, and it is most frequent between the ages of 70 and 75. The predominance of females over males is shown in the literature[7,8,13-15], but at proportions ranging from 3:1 to 7:1, and it represents 8.1% of malignant tumors in women.

The high rate of this disorder in women, as well as its frequent association with the presence of gallstones, also common among women, has given plausibility to the hypothesis that the gallbladder is sensitive to the action of sex hormones[14]. The presence of sex hormone (estrogen and progesterone) receptors has been well-documented in neoplasms of hormone-dependent organs, such as the breast and prostate, and the success achieved by hormone manipulation in treating these tumors has encouraged the study of the role of these hormones in GCa, hoping to obtain a new therapeutic alternative to treat this disorder. However, the very diverging results regarding the presence of these receptors, probably due to using

small samples and detection methods that are not very specific, did not provide a good answer to this question.

Singletary et al[16] ,in 1986, showed for the first time the presence of estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors in human gallbladders. From this time on, several studies[6,14,16-21] were performed to confirm the presence and define the true role of these receptors and, consequently, of sex hormones in GCa.

Based on these findings, we performed a study to assess the presence of estrogen and progesterone receptors in a sample of 141 gallbladders.

METHODS

One hundred and forty-one gallbladders were obtained from the files in the department of pathology, 60 consecutive cases of GCa, 19 normal gallbladders obtained from cases in which they were resected for other diseases that did not involve them, and 62 from cholecystectomies performed for cholelithiasis. The hospital records of these patients were reviewed to obtain the pertinent clinical data.

The histological diagnosis was confirmed again with paraffin embedded neoplasm specimens, and the immunohistochemical technique was performed to identify the presence of estrogen and progesterone receptors in the 3 groups. The technique used was streptavidin-biotin-peroxidase. The sections were deparaffinized in xylol, and rehydrated with alcohol and water. Preliminary treatment was performed by heating the slides in the microwave appliance, in a sodium citrate solution, in order to revert the effect of formalin-fixation. The activity of endogenous peroxidase was blocked by immersion of the slides in a solution with H₂O₂ 0,3% and methanol for 30 min. Then the slides were washed twice in a phosphate-buffered solution (PBS) at 4°C for 20 min, and after this for 30 min in normal saline. Following this, the slides were covered in primary monoclonal antibody anti-human estrogen receptor from rats (Dako

Corporation, 1D5) at a 1:100 dilution, and kept in a refrigerator overnight. Similarly, for the progesterone receptors we used monoclonal antibody anti-human progesterone (Novocastra Ltda) at a 1:40 dilution. After washing again with PBS, the sections were incubated with secondary antibody anti-immunoglobulin from rats (Vector Laboratories, BA-2000) 1:600 for 30 min and then in a streptoavidin-biotin-peroxidase complex (Dako corporation) for 30 min and then washed with PBS. The antigen-antibody connection was visualized with DAB (diamine benzidine-tetrachloride) and counterstained with hematoxilin. As a positive control we used breast tumor sections (positive for estrogen and progesterone receptor), and as a negative, sections of the same tumor using saline solution instead of primary antibody.

In order to analyze receptor positivity we considered positive only the cases in which there was an unmistakably homogeneous brown staining of the nucleus of the vesicular epithelial cell or of the tumor. The evaluation used was the same proposed by Teh[22], based on the number of stained nuclei in the slide examined, divided into three categories: less than 10%, between 10% and 50% and more than 50% of the nuclei of stained cells. Staining intensity was also divided into moderate and high. The case was considered positive only when there was intense staining of over 10% of the cells or moderate staining of over 50%.

For statistical analysis, we used the Chi-square test and to analyze survival the Kaplan-Meier curve.

RESULTS

The presence of estrogen receptors was observed in 6.7%(4 out of 60) of the gallbladders with carcinoma, 4.8% (3 out of 62) of the gallbladders with cholelithiasis, and in 15.8% (3 out of 19) of the normal gallbladders and statistically significant difference was not found in the result among the three groups.

Progesterone receptors were observed in 6.7% (4 out of 60) of the cases of Gca, in 6.5% (4 out of 62) of the gallbladders with cholelithiasis and 26.3% (5 out of 19) of the normal gallbladders. Statistically significant difference was observed for this receptor in the normal gallbladder group when compared to the other two groups ($p<0,02$).

As to histological type, 53 (88,3%) were adenocarcinomas, 6 (10%) adenosquamous carcinomas and e 1 (1.7%) undifferentiated.

In the cases of gallbladder carcinoma 52 of the 60 patients were female, 51 of the 62 of the cholelithiasis cases and 11 of the 19 with normal gallbladders. The mean age was similar in the three groups (58.2 years).

Furthermore, no correlation was observed between the presence of these receptors and histological type or gender.

Survival could be assessed in 42 patients (70%) out of the 60 patients with GCa. The mean survival was 9.9 months (standard deviation of 2.56 and confidence intervals of 95% between 4.96 and 15.01 months), and no correlation was found between the positivity of these receptors and survival time.

DISCUSSION

It is reasonable to assume that the effects of steroid hormones on gallbladder cancer may be great, since this disease has greater predilection for women, and exogenous estrogens have been associated to the presence of cholelithiasis which, in turn, occurs in 70% to 90% of the cases of GCa[7,14].

Several studies have assessed the presence of estrogen and progesterone receptors in GCa, using techniques ranging from biochemical to immunohistochemical, with very variable results. In 1989 Nakamura et al[18], using a immunohistochemical technique (immuno-histokits) identified ER and PR in 52.4% and 0% , respectively, in the tumor cells of 21 patients with GCa. In 1990, Yamamoto et al[19] tested the presence of ER in 189 patients with different gallbladder disorders, presenting positive results in 19% of the cases of cholelithiasis, 33% in epithelial polyps, 53.8% of the adenomas and 22.8% of the 114 patients with malignant neoplasms of this organ. However, this author did not use a H₂O₂ and methanol solution to block the endogenous peroxidase of the tissues, which was essential to ensure method specificity, and to eliminate the possibility of false-positives. Messa et al[20] used the same biochemical technique used by Singletary et al[16] which evaluates the presence of PR and ER indirectly, by cytosol detection. Chen et al[14] in 1991, as well as Ranelletti et al[23], the same year, who also used a biochemical technique to detect positivity in the ER and PR of cholelithiasis patients at variable percentages. Malik et al[24] in 1998 (using a immunohistochemical kit, evaluated 30 gallbladder carcinomas, and 18 patients (60%) presented positive ER in the malignant tissue.

On the contrary of the other authors, Ko et al[21] in 1995, using a immunohistochemical technique, detected 88% negativity as to the presence of ER in 25 specimens of GCa obtained from paraffin blocks, the others (12%) having been weakly positive. This low positivity, as compared with the findings of the other authors, is probably due to the different technique used to identify the receptors. These authors included a pre-treatment of the tissue with pronase, which appears to provide a better exposure (“unmask”) of the antigen ER.

It should also be stressed that other studies, such as the one performed by Malik et al[24] and Nakamura et al[18], to assess the presence of ER, used immunohistochemical techniques that demonstrate the presence of these receptors indirectly through the immunohistochemical detection of estradiol bound to the ER. Although this technique was formerly considered standard, currently it is considered only weakly specific, due to the unacceptable number of false-positives associated to the method. The method used by Yamamoto et al[19] was similar to the immunohistochemical technique used by Ko et al[21], with a monoclonal antibody, but during pre-treatment with enzymes, the former used trypsin, while the latter used pronase. Cheng et al[25] compared the two methods and showed that pronase was superior to trypsin due to the better “unmasking” of the antigenic ER and PR present in the cell nucleus, conferring greater sensitivity on this method.

As in Ko et al[21], in our study we observed small number of bladders with estrogen and progesterone receptors, both in the gallbladders with tumor and in those with cholelithiasis. We used an immunohistochemical technique of avidin-biotin-peroxidase, with antigen recovery (pre-treatment) by heating in a microwave appliance, increasing the exposure of antigenic sites (epitopes) which are not exposed (masked) in paraffin-treated tissues, this being the pre-treatment method that provides the best result, as compared to other methods, including the enzymatic one (with trypsin or pronase)[26].

In 2002, Gallus et al[27] published a case-control study in which they assessed the relationship between post-menopausal hormone replacement therapy and GCa and observed that 16% of the patients with neoplasm had hormone replacement therapy, while only 6% did in the control group[28]. Several studies, *in vitro*[29,30] and in humans[31,32] have proved that progesterone influences gallbladder motility, retarding its emptying, and also changing the composition of bile by increasing the cholesterol level, rendering it more lithogenic, although there are complex interactions between local factors and neural and hormonal control mechanisms which interfere in gallbladder dynamics[14,16,20,23,33]. Progesterone also shows its influence on these mechanisms, since in pregnancy, when the levels of this hormone are markedly raised, the fasting gallbladder volume is rising and the ejection fraction in response to

the post-alimentary test is lower[29,30,34,35]. However, these studies do not identify the action mechanism of this hormone, and it is still a matter of controversy whether it acts directly through the specific receptors that are present in the gallbladder.

Based on the results obtained in this study, using the appropriate histochemical technique, we concluded that the gallbladders of patients with malignant neoplasms did not present receptor positivity different from that found in those with cholelithiasis. Furthermore, the number of positive cases, both for estrogen and progesterone receptors, in these groups, was very small, suggesting that the hormone action in the gallbladder may not occur by direct mechanisms.

The statistically significant difference found for the presence of progesterone receptors among normal gallbladder when compared to those with cholelithiasis and cancer is, apparently, paradoxical. Concerning the biologic possibilities, it would be acceptable to find a higher proportion of cases with progesterone receptors in side the cholelithiasis group, where the effect of this hormone seems to be more evident.

Thus, we believe that neoplasms of the gallbladder are a much more frequent disease in women, because it is in this sex that cholelithiasis occurs most frequently[7,36,37]. Although cholelithiasis has been clearly established in literature as a risk factor for GCa, the pathogenic mechanism by which this process occurs has not been completely elucidated [4,6,9]. It is known that gallstone formation is multifactorial in origin [36], and that the influence of sex hormones, estrogen and progesterone, is definite, but our observations supply further information for the hypothesis that the effect of these hormones on the gallbladder is not direct, via specific receptors. It is possible that cholelithiasis acts as a connection between the action of these hormones and the malignant neoplasm of the gallbladder.

Recent studies in animals and humans have proposed [29,30,33, 38] that this action may occur indirectly, through interference in the action of cholecystokinin (CCK) or changing the contractility of the smooth muscles of the gallbladder, by interfering in the activation of G protein receptors and, consequently, in the subsequent signal transmitted through the cell membrane.

In summary, further studies to evaluate the action mechanism of progesterone and estrogen on the gallbladder will be required to elucidated this effect.

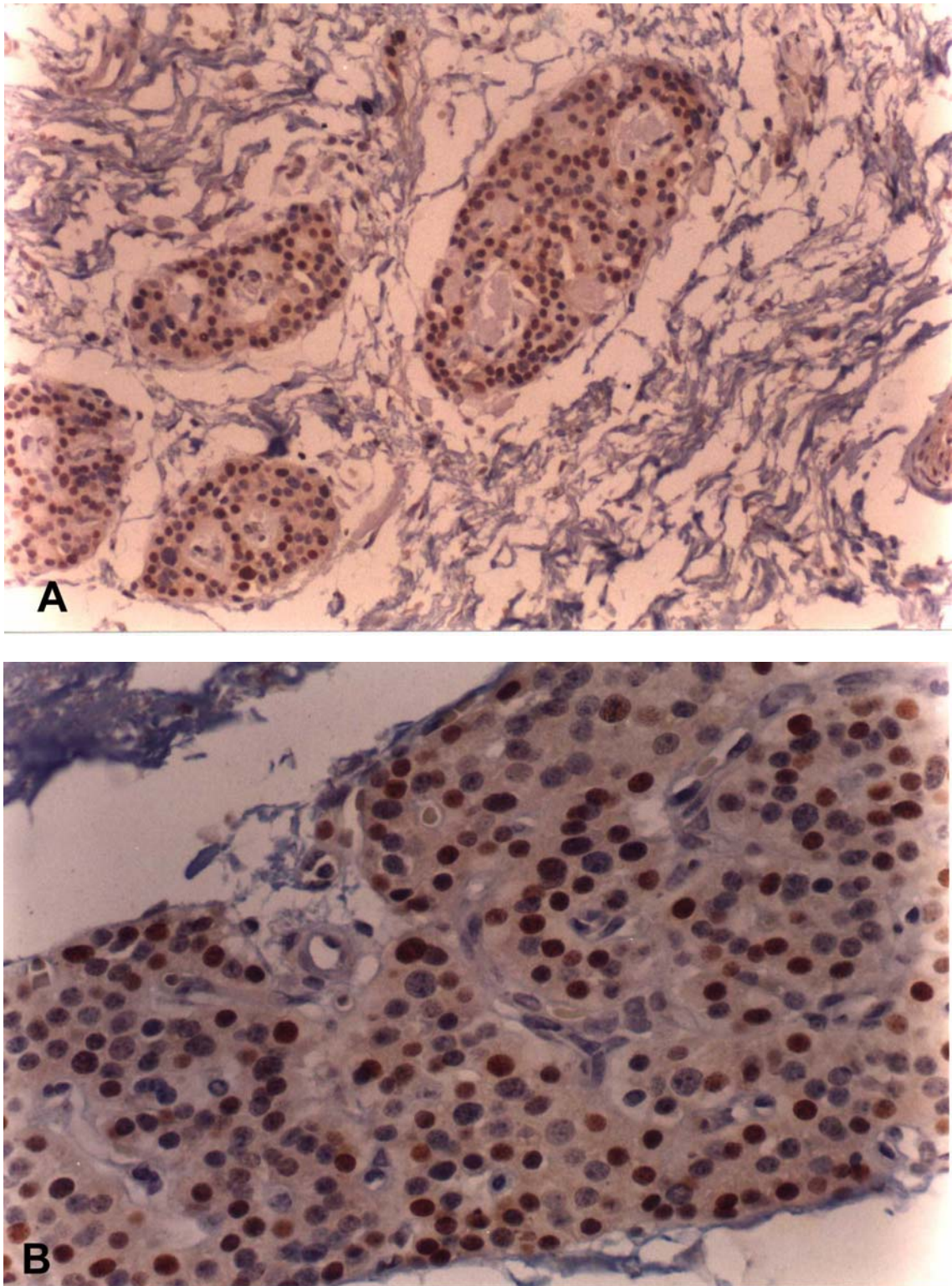


Figure 1. (A and B) Evidency of progesterone receptors in gallbladder carcinoma (immunoperoxidase, 20 and 40x)

BIBLIOGRAPHY

1. Sumiyoshi K, Nagai E, Chijiwa F: Pathology of carcinoma of the gallbladder. *World J surg* 1991; 15: 315-21.
2. Ouchi K, Matsuno S, Sato T: Long-term survival in carcinoma of the biliary tract. Analysis of prognostic factors in 146 resections. *Arch Surg* 1989; 124: 248-52.
3. Henson DE, Albores-Saavedra J and Corle D: Carcinoma of the gallbladder. Histologic types, stage of disease, grade, and survival rates. *Cancer* 1992; 70(6): 1493-97.
4. Tazuma S, Kajiyama G: Carcinogenesis of malignant lesion of the gallbladder. *Langenbeck's Arch Surg* 2001; 386(3): 224-9.
5. Nakayama F: Recent progress in the diagnosis and treatment of carcinoma of the gallbladder - Introduction. *World J Surg* 1991; 15: 313-14.
6. Bhaskaran V: Hormonal receptors in carcinoma of the gallbladder. *Trop Gastroenterol* 2000; 21(2): 48-50.
7. Barbosa-Coutinho LM, Arnt RA, Rocha JL, Ossanai R: Carcinoma de vesícula biliar: estudo de 26 casos. *R. AMRIGS* 1992; 36(1): 9-14.
8. Cunha JE, Penteadó S, Jukemura J: Neoplasias da Vesícula biliar. In Kalil AN, Coelho J, Strauss E Eds. *Fígado e Vias Biliares-Clinica e Cirurgia*. Editora Revinter R Ltda, Rio de Janeiro 2001:650-57.
9. Pandey M, Pathak AK, Amitabh G: Carcinoma of the gallbladder. A retrospective review of 99 cases. *Dig Dis Sci* 2001; 46(6): 1145-51.
10. Nigro AJT, Pugliesi JrWJ, Wechi SL, et al: Câncer da vesícula biliar. *An Paul Med Cir* 1978; 105: 63-70.
11. Monteiro MC: Câncer da vesícula biliar. Análise de 100 casos operados. *Arq Bras Med* 1985; 59: 337-44.
12. Ziliotto JA, Kunzle JE, Sgarbi EC: Carcinoma primário de vesícula biliar. *Rev Bras Cancerol* 1985; 31: 103-106.

13. Strom BL, Soloway RD, Rios-Dalenz JL, et al: Risk factors for gallbladder cancer. An International collaborative case-control study. *Cancer* 1995; 76(10): 1747-56.
14. Chen A, Huminer D: The role of estrogen receptors in the development of gallstones and gallbladder cancer. *Medical Hypotheses* 1991; 36(3): 259-60.
15. Donhauser JL: Primary carcinoma of the gallbladder. An analysis of fifty-two cases. *AMA Arch Surg*, 1988; 77:918-24.
16. Singletary BK, Thiel DHV, Eagon PK: Estrogen e progesterone receptors in human gallbladder. *Hepatology* 1986; 6(4): 574-79.
17. Daignault PG, Fazekas AS, Rosenthal L, et al: Relationship between gallbladder contraction and progesterone receptor in patients with gallstones. *Am J Surg* 1988; 155: 147-51.
18. Nakamura S, Muro H, Suzuki S: Estrogen and progesterone receptors in gallbladder cancer. *Jpn j Surg* 1989; 19(2): 189-94.
19. Yamamoto M, Nakajo S, Tahara E: Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in human gallbladder. *Acta Pathol Jpn* 1990; 40(1): 14-20.
20. Messa C, Maselli MA, Cavallini A, et al: Sex steroid hormone receptors and human gallbladder. *Motility in vitro. Digestion* 1990; 46: 214-19.
21. Ko CY, Schmit P, Cheng L, Thompson JE: Estrogen receptors in gallbladder cancer: detection by an improved immunohistochemical assay. *Am Surg*, 1995; 61(10): 930-3.
22. Teh M, Wee A, Path MCR, et al: An immunohistochemical study of p53 protein in gallbladder and extrehepatic bile duct/ampullary carcinomas. *Cancer* 1994; 74(5): 142-45.
23. Ranelletti FO, Piantelli M, Farinon AT, et al: Estrogen and progesterone receptors in gallbladders from patients with gallstones. *Hepatology* 1991; 14(4): 608-12.
24. Malik IA, Abbas Z, Shamsi Z, Daudi I, et al: Immuno-histochemical analysis of estrogen receptors on the malignant gallbladder tissue. *J Park Med Assoc*, 1998; 48(5): 123-6.
25. Cheng L, Binder S, Fu Y, Lewin K: Demonstration of estrogen receptors by monoclonal antibody in formalin-fixed breast tumors. *Lab Invest*, 1988; 3:346-53.

26. Oliver RK, Heavens RP, Sirinathsinghji DJS: Quantitative comparison of pretreatment used to sensitize in situ hybridization using oligonucleotide probes on paraffin-embedded brain tissue. *J Histochem Cytochem* 1997;45(12): 1707-13.
27. Gallus S, Negri E, Chatenoud L, et al: Post-menopausal hormonal therapy and gallbladder cancer risk. *Int J*, 2002; 99(5): 762-63.
28. Simon JA, Hunninghake DB, Agarwal SK, et al: Effect of estrogen plus progestin on risk for biliary tract surgery in postmenopausal women with coronary artery disease. The Heart and Estrogen/Progestin (HERS) Replacement Study. *Ann Intern Med* 2001; 135(7):493-501.
29. Tierney S, Nakeeb A, Wong O, et al: Progesterone alters biliary flow dynamics. *Ann Surg* 1999; 229(2): 205-9.
30. Xiao Z-L, Chen Q, Biancani P, Behar J: Mechanisms of gallbladder hypomotility in pregnant guinea pigs. *Gastroenterology* 1999; 116(2): 411-19.
31. Down RHL, Whiting MJ, Watts JM, Jones W: Effect of synthetic oestrogens and progestagens in oral contraceptives on bile lipid composition. *Gut* 1983; 24: 253-59.
32. Scagg RKR, McMichael AJ, Seamark RF: Oral contraceptives, pregnancy, and endogenous oestrogenous in gallstone disease – a case control study. *Br Med J* 1984; 288: 1795-99.
33. Kiaii B, Xu, Q-W, Shaffer EA: The basis for impairment of gallbladder contractility in Male Guinea pigs in vitro. *J Surg Res* 1998; 79(2): 97-102.
34. Braverman DZ, Johnson ML, Kern F: Effects of pregnancy and contraceptive steroids on gallbladder function. *N Engl J Med* 1980; 302(7): 362-4.
35. Everson GT: Gastrointestinal motility in pregnancy. *Gastroenterol Clin North Am* 1992; 21(4): 751-76.
36. Juvonen T: Pathogenesis of gallstones. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 577-82.
37. Kaushik SP: Current perspectives in gallbladder carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16(8): 848-54.
38. Bird NC, Ahmed R, Chess-Williams R, Johnson AG: Active relaxation of human gallbladder. Muscle is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Digestion* 2002; 65:220-226.

ARTIGO-1 REDIGIDO EM PORTUGUÊS

Valor da expressão da proteína p53 no carcinoma de vesícula biliar:

Análise de 60 casos.

Andréa Oxley da Rocha, M.D., Lígia M. Barbosa-Coutinho, M.D.,PhD., Jorge G. Sholl,M.D.

Laís Leboutte, M.D.

Departamento de Patologia, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

RESUMO

BASE TEÓRICA/OBJETIVO: poucos estudos, com pequenas amostras e resultados divergentes têm sido realizados para avaliar a expressão da proteína p53 no carcinoma de vesícula biliar e sua relação com diferentes parâmetros clínico-patológicos. Baseados nestes fatos, realizamos um estudo com objetivo de avaliar a expressão da proteína p53 nesta afecção e sua associação com fatores prognósticos.

METODOLOGIA: amostra de 141 vesículas biliares, sendo 60 casos de carcinoma de vesícula, 62 vesículas de portadores de colelitíase e 19 vesículas não associadas a cálculos foram avaliadas imunistoquimicamente quanto à expressão da proteína p53. A associação entre a imunorreatividade p53 no câncer de vesícula, o prognóstico, sobrevida e outros parâmetros clínico-patológicos foram analisados.

RESULTADOS: a expressão p53 foi positiva em 58,3% dos carcinomas de vesícula, 9,7% das vesículas com colelitíase e 10,5% das vesículas não associadas à cálculos. Nos casos de carcinoma de vesícula não houve associação estatisticamente significativa entre a expressão desta proteína, os fatores prognósticos, tipo ou grau histológico, presença de cálculos e sobrevida.

CONCLUSÃO: a mutação do gene p53 está envolvida na patogênese do carcinoma de vesícula biliar, e o intenso processo inflamatório crônico associado ou não a colelitíase, parece

ser um dos fatores envolvidos na gênese deste processo. Não parece haver, de acordo com nossos dados, associação entre a expressão da proteína p53 e o prognóstico ou sobrevida dos pacientes portadores desta afecção.

Palavras-chave: câncer de vesícula, p53, mutação.

INTRODUÇÃO

A neoplasia de vesícula biliar é considerada uma afecção pouco freqüente, e ainda hoje, associada a um curso rapidamente letal. Apesar do grande progresso atingido no tratamento dos tumores malignos do trato digestivo, o carcinoma de vesícula biliar (CaVB) persiste sendo uma exceção. O prognóstico deste tumor é pobre e, na maioria das séries, apresenta taxa de sobrevivência de no máximo 5% em 5 anos, já que menos de 10% dos pacientes se apresentam com tumor ressecável no momento do diagnóstico, sendo a média de sobrevivência inferior a 6 meses¹⁻⁴.

Apesar da baixa freqüência, esta neoplasia representa 0,7% a 1,2% de todos os carcinomas⁵, e ocupa o 5º lugar entre as neoplasias do trato digestivo^{6,7,8}. Além disso, o CaVB é o tumor maligno mais comum do trato biliar, correspondendo a aproximadamente 1 a 3% das peças de colecistectomia^{7,9}. Séries brasileiras^{10,11} confirmam estes dados, tendo Ziliotto et al.¹² relatado uma incidência de 1,02% de CaVB como achado incidental em 885 colecistectomias realizadas por colecistite.

A incidência do carcinoma de vesícula biliar varia amplamente nas diferentes partes do mundo^{3,7,13}, sendo mais freqüente em alguns países da América Latina e Índia. No Chile esta afecção encontra-se em terceiro lugar como causa de óbito quando comparada a todas as neoplasias, sendo a segunda entre os tumores do trato digestivo, correspondendo a uma elevada incidência de 13 por 100.000 habitantes. Na Índia incide em cerca de 4,5 por 100.000 habitantes na população masculina, atingindo níveis de 10,1 entre as mulheres do norte deste país. Altas incidências também são relatadas em Israel, Polônia, México e Bolívia. Nos Estados Unidos esta é uma neoplasia incomum, com uma incidência de 1,1 por 100.000 habitantes para o sexo masculino e 2,2 para o sexo feminino^{3,5,13-16}. Em Porto Alegre, Brasil, é responsável por 3,09 óbitos por 100.000 habitantes¹⁷.

Atualmente, já está estabelecido na literatura que o carcinoma invasivo de vesícula biliar é precedido por lesões pré-malignas – displasia e carcinoma *in situ* – e este fato fornece um bom modelo para o estudo das anormalidades genéticas e da progressão neoplásica¹⁸. Estas

anormalidades epiteliais têm sido bem caracterizadas como um “continuum” de modificações citológicas, refletindo alterações gênicas importantes na patogênese desta neoplasia¹⁹. No entanto, apesar dos recentes avanços na carcinogênese molecular de várias neoplasias malignas, o mecanismo patogênico envolvido na progressão de uma lesão pré-maligna para carcinoma invasivo de vesícula biliar, ainda não está completamente esclarecido.

O câncer, de maneira geral, resulta de alterações gênicas múltiplas, ocorrendo, com frequência, rearranjos genéticos variados que podem ativar ou inativar genes. Vários estudos²⁰⁻²² têm demonstrado que anormalidades do gene p53 estão envolvidas na gênese de aproximadamente 50% das neoplasias malignas²³. O gene p53 se localiza no braço curto do cromossoma 17, atuando como inibidor da proliferação celular¹⁸. Este gene pode ser alterado por mutações variadas que ocorrem em vários locais de sua extensão. Por este motivo, muitos agentes mutagênicos podem levar a sua modificação. A mutação de um alelo do gene p53 é muitas vezes acompanhada por uma deleção do outro alelo, resultando na formação de um produto protéico inativo²⁴. Esta proteína mutante p53 inativa a proteína p53 normal causando perda da função de supressão tumoral deste gene, permitindo a atividade oncogênica. A proteína p53 está presente em pequenas quantidades em células de tecidos normais, pois é metabolicamente lábil, sendo rapidamente degradada no núcleo e, provavelmente, por este motivo é usualmente indetectável. A forma mutante desta proteína exibe um aumento de sua meia-vida podendo ser detectada por técnicas imunistoquímicas em muitos tumores^{18,23}. Esta mutação parece desempenhar um importante papel na patogênese de muitas neoplasias malignas como o câncer gástrico²⁴, de cólon²⁵, mama²⁶, pulmão²⁷ e esôfago²⁸, sendo incomum em tumores benignos²⁷.

A correlação da expressão da proteína p53 com a mutação gênica no CaVB foi avaliada em estudo recente realizado por Itoi et al.²⁹ que demonstrou uma sensibilidade de 56,5% da mutação p53, especificidade de 90% e validade de 1.47.

Desde a primeira publicação realizada por Kammel et al.²⁰ em 1993 para avaliar imunistoquimicamente a presença de expressão da proteína p53 no CaVB, poucos

estudos^{18,20,21,24,29-38} têm sido feitos, com achados de positividade bastante variáveis (entre 36.9 e 95%) e conflitantes em relação ao valor prognóstico desta mutação.

Neste sentido, realizamos este estudo para avaliar imunoistoquimicamente a presença de expressão da proteína p53 em vesículas normais, vesículas com colelitíase e no CaVB. Além disso avaliamos a associação da presença desta mutação com a sobrevida e fatores prognósticos do CaVB, através da classificação de Nevin³⁹ e sistema de estadiamento TNM (*American Joint Committee on Cancer 1997*)⁴⁰.

METODOLOGIA

Espécimes cirúrgicos de 141 vesículas foram coletadas dos arquivos do departamento de patologia, sendo 60 casos consecutivos de carcinoma de vesícula biliar, 62 provenientes de colecistectomias realizadas por colelitíase e 19 vesículas sem cálculos obtidas a partir de casos em que a mesma foi ressecada por outras patologias que não a envolviam. Os prontuários hospitalares destes pacientes foram revisados para obtenção de dados clínicos pertinentes.

A partir dos blocos de parafina, o diagnóstico histológico foi novamente confirmado nos casos de neoplasia, e realizada a técnica imunoistoquímica para identificação da reatividade da proteína p53 nos 3 grupos. A técnica utilizada foi a estreptoavidina-biotina peroxidase. Os cortes realizados eram desparafinados em xilol e reidratados com etanol e água. Um tratamento preliminar foi aplicado por aquecimento das lâminas no microondas em solução de citrato de sódio a fim de reverter o efeito de fixação pelo formol. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por imersão dos cortes em solução com H₂O₂ 0,3% e metanol por 30 min. A seguir as lâminas foram lavadas duas vezes com solução tampão de fosfato (PBS) a 4°C por 20 min e após em soro normal por 20 min. Os cortes foram, então, cobertos com anti-corpo primário monoclonal anti-proteína p53 produzido em rato (Dako Corporation, D0-7) na concentração de 1:500, permanecendo durante a noite em refrigerador. Após nova lavagem

com PBS, os cortes foram encubados com anticorpo secundário anti-imunoglobulina de rato por 30 min e a seguir em complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase por 30 min na diluição de 1:200 e após lavados com PBS. A ligação antígeno-anticorpo foi visualizada com DAB (diamino benzidine-tetracloro) e contra-corada com hematoxilina. Utilizamos como controle positivo cortes de tumor de mama (previamente confirmados positivos para p53) e negativo lâminas deste mesmo tumor utilizando soro ao invés do anticorpo primário.

Para análise da reatividade do p53, consideramos como positivos somente aqueles casos nos quais houve inequívoca coloração homogênea do núcleo da célula do epitélio vesicular ou do tumor em marron. A avaliação utilizada foi a mesma proposta por Teh²¹, baseada na quantidade de núcleos corados na lâmina examinada, sendo dividida em três categorias: com menos de 10%, entre 10% e 50% e com mais de 50% dos núcleos das células tumorais ou do epitélio da vesícula, corados. A intensidade da coloração também foi dividida em moderada e forte. O caso foi considerado positivo somente quando havia forte coloração de mais de 10% das células ou moderada coloração de mais de 50% das células.

A avaliação da relação entre a expressão da proteína p53 e o prognóstico desta neoplasia foi realizada utilizando-se os fatores prognósticos validados por Henson³ em 1992, através da classificação Nevin³⁹ (1976) e do sistema de estadiamento TNM⁴⁰ para avaliação do estágio da doença, além do estudo do grau e tipo histológico das lesões. Para fins de análise estatística dividimos os casos de CaVB em duas categorias: precoces (estágios I e II de Nevin) e avançados (estágios III, IV e V de Nevin) de acordo com os critérios de Sato et al⁴¹.

A análise estatística utilizada para avaliar a associação entre parâmetros clínico-patológicos e a reatividade do p53 foi o teste do qui-quadrado e o teste exato de Fisher. A análise da sobrevida foi realizada através da curva de Kaplan-Meier.

RESULTADOS

Nos 60 casos estudados a média de idade foi de 62 anos, sendo que 86,7% dos pacientes se apresentavam com mais de 50 anos ao diagnóstico. Não houve diferença estatisticamente significativa na média de idade entre os paciente portadores de colelitíase (média de 59,7 anos) e os portadores de neoplasia. Oitenta e seis por cento (52) dos pacientes portadores de CaVB eram do sexo feminino.

A presença de reatividade p53 ocorreu em 58,3% (35) dos casos de CaVB, 9,7% (6) dos casos de colelitíase e em 10,5% (2) casos de vesículas sem colelitíase (fig.1).

A presença de cálculos biliares foi observada em 83,3% dos portadores de CaVB (50 pacientes). Não foi observada diferença estatisticamente significativa, em relação a positividade do p53 na ausência ou presença de cálculos, nos portadores desta neoplasia. Os resultados dos parâmetros clínico-patológicos avaliados podem ser observados na tabela 1.

Em relação ao tipo histológico, 53 (88,3%) eram adenocarcinomas, 6 (10%) carcinomas adenoescamosos e 1 (1,7%) tumor indiferenciado. A reatividade para o p53 foi positiva em 58,5% dos adenocarcinomas, 50% dos adenoescamosos e o tumor indiferenciado também apresentou expressão desta proteína.

Trinta e sete por cento dos tumores considerados precoces (classificação de Nevin) apresentaram expressão da proteína p53 bem como 61,5% dos carcinomas invasivos, não havendo diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos. Similarmente, no sistema de estadiamento TNM não houve significância nas diferenças encontradas nos casos de doença inicial (estágios I e II) e doença avançada (estágios III e IV) em relação à expressão da proteína p53. O mesmo observou-se em relação ao grau histológico e demais parâmetros clínico-patológicos analisados (tabela 1).

Apesar de se tratar de casos de arquivo, foi possível avaliar a sobrevida de 42 pacientes (70%). A média de sobrevida dos pacientes portadores de CaVB foi de 9,9 meses

(desvio padrão de 2,56) e mediana de 3,97 meses. Não houve associação entre a expressão da proteína p53 e o tempo de sobrevida (figura 2).

DISCUSSÃO

Além das dificuldades de reconhecimento dos fatores envolvidos na gênese do carcinoma de vesícula biliar, o próprio quadro clínico inespecífico dificulta o diagnóstico precoce desta afecção⁴². Mesmo sendo o carcinoma de vesícula biliar a mais comum malignidade do trato biliar, ele é usualmente diagnosticado em estágios avançados¹³. Estes fatos têm motivado a constante busca da compreensão, ainda incerta, da carcinogênese desta neoplasia.

Poucos estudos^{18,20,21,24,29-38} foram realizados para se avaliar a presença de expressão da proteína p53 no CaVB, com resultados conflitantes, tanto em relação a positividade desta, quanto à associação entre a imunorreatividade e o prognóstico desta neoplasia, fato atribuído, em parte, a pequenas amostras associadas à baixa frequência desta neoplasia. Além disso, as discrepâncias observadas em relação a positividade do p53 também podem estar relacionadas aos diferentes anticorpos utilizados nos estudos. Kamel et al²⁰ e Ajiki et al³⁵ utilizaram anti-corpo policlonal CM1 e apresentaram menor imunorreatividade que a maioria dos autores que utilizaram anti-corpo monoclonal D07 e PAb1801, que reconhecem epitopos diferentes daqueles reconhecidos pelo CM1. Estas diferenças podem ser observadas na tabela 2.

Embora tenhamos observado diferença na média de idade entre portadores de colelitíase (59,7 anos) e pacientes com CaVB (62 anos), não houve significância estatística, contrariando os achados publicados em recente estudo realizado por Yanagisawa et al⁴³, que encontrou médias de 57,1 e 66,6 anos, respectivamente. Este autor sugere que esta diferença de idade entre os pacientes (no momento da intervenção cirúrgica) possa explicar as possíveis

modificações no epitélio vesicular desencadeadas pelo processo inflamatório crônico que ocorre, ao longo do tempo na colecistite e que poderiam dar origem à neoplasia.

Nossos dados, em uma amostra de 60 casos de neoplasia maligna de vesícula biliar, demonstraram não haver correlação entre a expressão da proteína p53 e a presença ou ausência de cálculos biliares (tabela 1). Recentemente, Misra et al³⁷ avaliando 20 casos de CaVB relataram 70% de imunorreatividade para proteína p53, observando significativa associação entre CaVB associado com cálculos e superexpressão do p53. Relação inversa foi observada por Ajiki et al³⁵ em 48 casos estudados, observando associação entre o CaVB sem cálculos e a mutação do gene p53, sugerindo diferentes caminhos para a carcinogênese desta neoplasia, podendo ser esta influenciada ou não pelo estímulo dos cálculos. Kamel et al²⁰ avaliaram 30 casos de CaVB não observando significância estatística na diferença encontrada na presença ou ausência de cálculos.

Não foram encontradas diferenças que atingissem significância estatística nos parâmetros analisados. A julgar pela magnitude de algumas diferenças observadas (por exemplo na classificação de Nevin: 38% e 62%) poderia se atribuir o achado não significativo, do ponto de vista estatístico, ao pequeno tamanho da amostra (pequeno número de casos de tumor precoce) o que pode acarretar a um baixo poder estatístico.

É importante salientar que os casos de positividade da proteína p53 que observamos no grupo de portadores de colelitíase (6) corresponderam, todos, a casos de colecistite aguda (fig.1). Entre as vesículas sem cálculos positivas para p53 (2), ambas estavam associadas a processo inflamatório crônico da vesícula biliar decorrente de obstrução da via biliar principal, em um caso por pancreatite crônica e outro decorrente de invasão por neoplasia gástrica. De forma similar às nossas observações e contrário aos demais autores, Oohashi et al³² observaram expressão da proteína p53 nos 6 casos de colecistite aguda estudados e em 5 de 23 colecistites crônicas, porém com padrão de imunorreatividade esporádico, completamente diferente daquele observado no CaVB, que em sua maioria apresentam um padrão difuso ou, eventualmente, focal. Yanagisawa et al⁴³ estudaram 108 vesículas provenientes de colecistectomias por colecistite e observaram expressão desta proteína na mucosa de

vesículas com severa colecistite crônica, com o mesmo padrão esporádico. Constataram, também, que este processo está associado à um aumento da renovação celular, sendo as células danificadas eliminadas por apoptose, concluindo que embora o dano no DNA devido à colecistite crônica não esteja completamente esclarecido, o achado de alta expressão da proteína p53 pode sugerir que a injúria genômica ocorra, freqüentemente, nas células epiteliais na colecistite crônica. Este fato associado à proliferação, pode contribuir para a carcinogênese, embora desconhecidos cofatores necessitem identificação.

Não observamos associação entre a imonorreatividade do p53 e os fatores prognósticos avaliados (tabela 1), o que sugere que a expressão desta proteína não esteja relacionada com a progressão tumoral ou a disseminação metastática, semelhante às observações de Ajiki et al³⁵ (em 48 pacientes). No entanto, Roa et al³⁴ relataram 45% de positividade do p53 em 191 carcinomas de vesícula biliar, sendo todos os controles negativos (25 colecistites crônicas), observando maior positividade nos carcinomas invasivos (122) do que nas lesões precoces (24), entretanto em razão do pequeno número de lesões precoces, estes dados devem ser avaliados com parcimônia.

Também não observamos associação entre o tempo de sobrevida nos pacientes com ausência ou presença de imonorreatividade p53, o que concorda com os achados de Kim³⁰ e Ajiki³⁵.

O elevado índice de pacientes em que o diagnóstico é tardio, aliado à curta sobrevida observada nestes pacientes, demonstram o benefício da detecção precoce deste carcinoma e, sem dúvida, o estudo dos fatores de risco parece ser, ainda, o instrumento disponível mais acessível para identificação dos pacientes de risco potencial para desenvolvimento desta neoplasia, embora a prevenção primária para o carcinoma de vesícula não seja esperada em um futuro próximo⁴⁴. Mesmo sendo o tipo e o grau histológico fatores prognósticos úteis, o estágio da doença é, provavelmente, o mais confiável fator prognóstico na opinião da maioria dos autores^{3,39}. Pacientes nos quais o tumor está confinado à vesícula no momento do diagnóstico apresentam melhor prognóstico do que aqueles nos quais o tumor tenha se propagado ao fígado ou linfonodos regionais. Além disso, os melhores resultados, em termos

de sobrevida, são observados em pacientes com carcinoma *in situ* ou precoce cujo diagnóstico é feito em espécimes retiradas por colelitíase³.

Apesar das observações divergentes, parece haver consenso de que a mutação do gene p53 pode desempenhar papel crucial na carcinogênese do CaVB. Entretanto, baseados em nossas observações e na ampla revisão da literatura pertinente, realmente não parece haver associação entre esta mutação e sexo, idade, grau e tipo histológico e fatores prognósticos.

Atualmente, a hipótese proposta para a associação entre a presença de colelitíase e o CaVB é que a nível molecular, o processo inflamatório crônico desencadeado pela presença dos cálculos, possa determinar, ao longo do tempo, a ocorrência de uma mutação alelo-específica, ou seja, perda da heterozigotidade do gene p53 e superexpressão da proteína p53 mutante (inativa)⁴. A partir desta mutação considera-se que possa resultar a transformação maligna na mucosa da vesícula. No entanto, na ausência de cálculos deve-se pressupor a existência de outros fatores que possam desencadear a ocorrência desta mutação, o que sugere a existência de diferentes mecanismos envolvidos na sua patogênese. Muito embora esta associação seja plausível e aceita, a prevenção desta neoplasia através da colecistectomia profilática na colelitíase assintomática, em populações de alto-risco, ainda é assunto controverso¹⁶.

Experimentos laboratoriais recentes⁴⁵ têm demonstrado que a inserção de um gene p53 normal em células tumorais resulta em uma diminuição significativa da oncogênese. Isto sugere que a inserção de p53 normal em tumores de pacientes com mutação do gene p53 usando abordagem de terapia gênica, pode, a princípio, tornar-se uma possibilidade de tratamento para esta neoplasia.

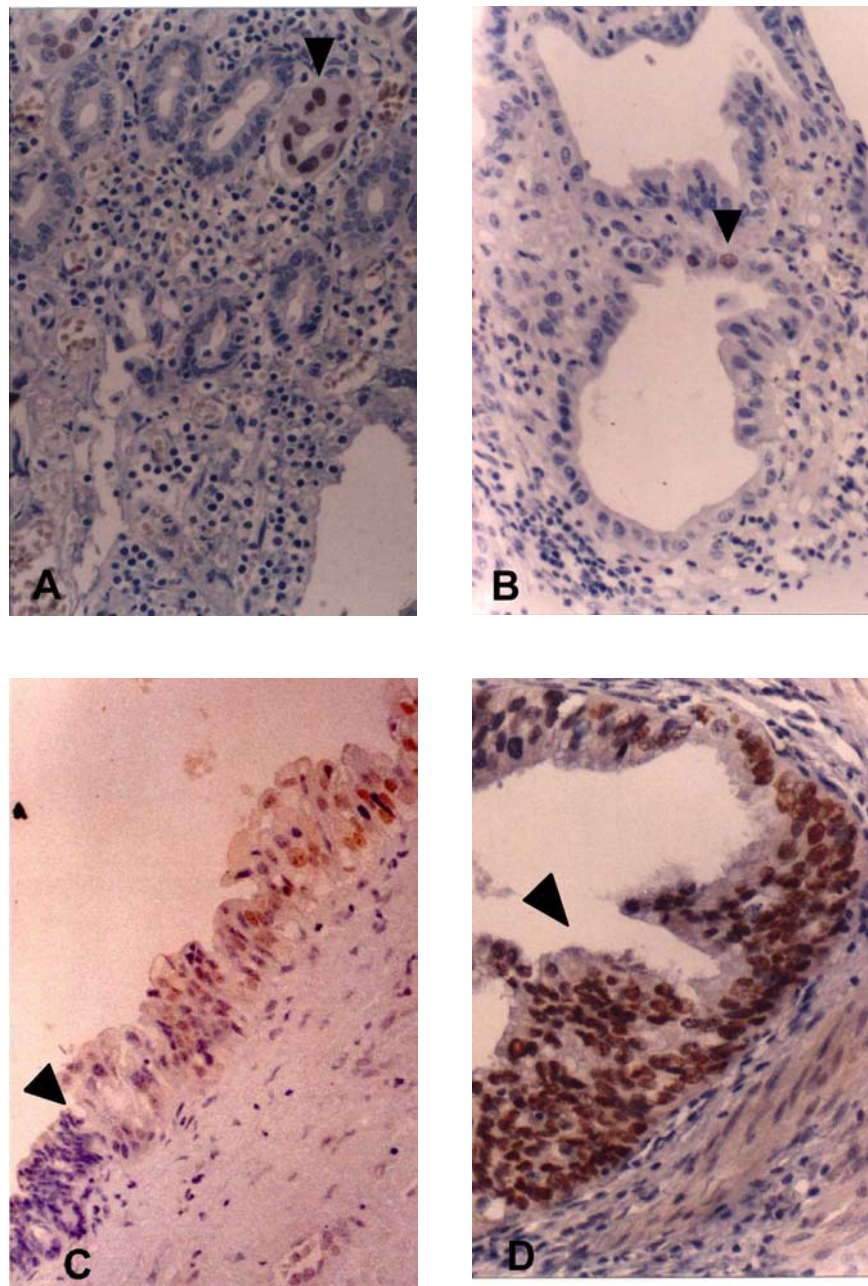


Fig. 1. (A) Vesícula biliar sem cálculos com infiltrado inflamatório crônico e presença de ácino com núcleos positivos para p53 (imunoperoxidase, objetiva 20x). (B) Colecistite aguda com positividade esporádica para p53 (imunoperoxidase, objetiva 20x). (C) Carcinoma de vesícula biliar: epitélio adjacente à neoplasia mostrando a transição entre áreas negativas e positivas (displasia) para o p53 (imunoperoxidase, objetiva 20x). (D) Adenocarcinoma de vesícula positivo para p53 (padrão difuso) (imunoperoxidase, objetiva 20x).

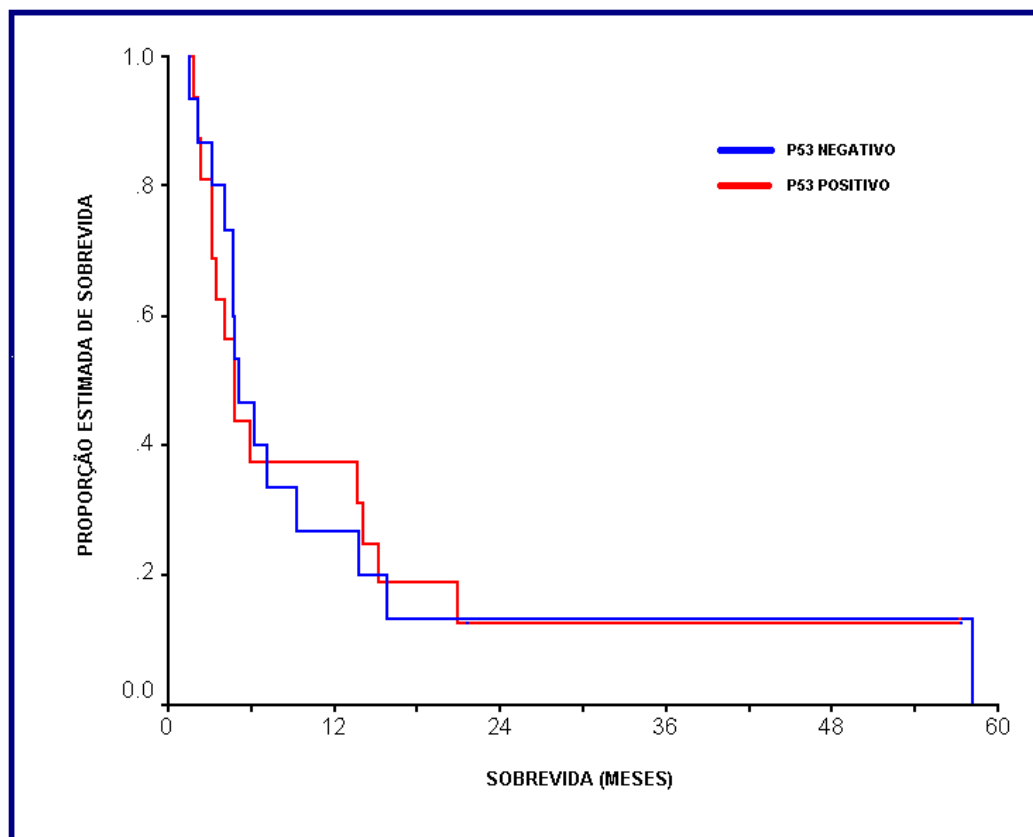


Fig 2. Sobrevida dos pacientes com carcinoma de vesícula biliar conforme a expressão da proteína p53

Tabela 1. Associação da imunorreatividade p53 com aspectos clínico-patológicos e fatores prognósticos no carcinoma de vesícula biliar

Parâmetro	N°. casos	N°. p53 positivos(%)	valor do p
Idade			0,70*
<50 anos	8	4 (40%)	
≥50 anos	52	31 (59,6%)	
Sexo			0,44*
Feminino	52	29 (55,8%)	
Masculino	8	6 (75%)	
Associação c/ cálculos			1,0*
Presente	50	29 (55,6%)	
Ausente	10	6 (60%)	
Grau histológico [†]			0,71*
Bem diferenciado	13	8 (61,5%)	
Moderadamente diferenciado	28	15 (53,6%)	
Pouco diferenciado	12	8 (66,7%)	
Estágio TNM			0,14*
I e II	9	3 (33%)	
III e IV	51	32 (62,7%)	
Classificação de Nevin			0,26*
I e II	8	3 (37,5%)	
III, IV e V	52	32 (61,5%)	

* valores de p não significantes

† referente aos 53 casos de adenocarcinoma

Tabela 2. Estudos imuno-histoquímicos do p53 no carcinoma de vesícula

Autor	n°.casos	positividade p53(%)	anticorpo
Kamel et al ²¹ 1993	30	14 (47%)	policlonal CM1
Teh et al ²² 1994	24	22 (92%)	monoclonal D07
Wee et al ³² 1994	24	22 (92%)	monoclonal D07
Diamantis et al ³⁴ 1995	11	8 (72,7%)	policlonal CM1, monoclonal D07
Oohashi et al ³³ 1995	41	35 (85,4%)	monoclonal PAb1801
Wistuba et al ¹⁹ 1996	52	34 (65,4%)	monoclonal Ab-6
Ajiki et al ³⁶ 1996	48	19 (39,6%)	policlonal CM1
Washington et al ³⁷ 1996	12	7 (58%)	monoclonal Ab-2
Fujii et al ²⁵ 1996	65	36 (55%)	monoclonal D07
Roa et al ³⁵ 1997	191	86 (45%)	monoclonal Ab-6
Itoi et al ³⁰ 1997	33	23 (69,6%)	monoclonal PAb1801
Misra et al ³⁸ 2000	20	14 (70%)	monoclonal D07
Kim et al ³¹ 2001	71	48 (67,6%)	monoclonal D07
Quan et al ³⁹ 2001	24	15 (65%)	monoclonal D07
Este estudo	60	35 (58,3%)	monoclonal D07

REFERÊNCIAS

1. Sumiyoshi K, Nagai E, Chijiwa F. Pathology of carcinoma of the gallbladder. *World J surg* 1991; 15:315-21.
2. Ouchi K, Matsuno S, Sato T. Long-term survival in carcinoma of the biliary tract. Analysis of prognostic factors in 146 resections. *Arch Surg* 1989; 124:248-52.
3. Henson DE, Albores-Saavedra J, Corle D. Carcinoma of the gallbladder. Histologic types, stage of disease, grade, and survival rates. *Cancer* 1992; 70(6):1493-97.
4. Tazuma S, Kajiyama G. Carcinogenesis of malignant lesion of the gallbladder. *Langenbeck's Arch Surg* 2001; 386(3):224-9.
5. Nakayama F. Recent progress in the diagnosis and treatment of carcinoma of the gallbladder. *World J Surg* 1991; 15:313-14.
6. Bhaskaran V. Hormonal receptors in carcinoma of the gallbladder. *Trop Gastroenterol* 2000; 21(2):48-50.
7. Barbosa-Coutinho LM, Arnt RA, Rocha JL, Ossanai R. Carcinoma de vesícula biliar: estudo de 26 casos. *Rev. AMRIGS* 1992; 36(1):9-14.
8. Cunha JE, Penteado S, Jukemura J. Neoplasias da Vesícula biliar. In Kalil AN, Coelho J, Strauss E eds. *Fígado e Vias Biliares-Clinica e Cirurgia*. Editora Revinter R Ltda, Rio de Janeiro 2001:650-57.
9. Pandey M, Pathak AK, Amitabh G. Carcinoma of the gallbladder. A retrospective review of 99 cases. *Dig Dis Sci* 2001; 46(6):1145-51.
10. Nigro AJT, Pugliesi JrWJ, Wechi SL, et al. Câncer da vesícula biliar. *Ann Paul Med Cir* 1978; 105:63-70.
11. Monteiro MC. Câncer da vesícula biliar. Análise de 100 casos operados. *Arq Bras Med* 1985; 59:337-44.
12. Ziliotto JA, Kunzle JE, Sgarbi EC. Carcinoma primário de vesícula biliar. *Rev Bras Cancerol* 1985; 31:103-106.

13. Kaushik SP. Current perspectives in gallbladder carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16(8):848-54.
14. Aretxabala X, Roa I, Burgos L, et al. Gallbladder cancer in Chile. A report on 54 potentially resectable tumors. *Cancer* 1992; 69(1):60-65.
15. Strom BL, Soloway RD, Rios-Dalenz JL, et al. Risk factors for gallbladder cancer. An International collaborative case-control study. *Cancer* 1995; 76(10):1747-56.
16. Sheth S, Bedford A, Chopra S. Primary gallbladder cancer: recognition of risk factors and role of prophylactic cholecystectomy. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(6):1402-10.
17. Brumini R, Torloni H, Henson DE, Gotieb SLD, Souza JMP. Câncer no Brasil - Dados Histopatológicos - 1976—1980, Rio de Janeiro, Ministério da Saúde 1982.
18. Wistuba II, Gazdar AF, Roa I, et al. P53 protein overexpression in gallbladder carcinoma and its precursor lesions: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1996; 27(4):360-65.
19. Wistuba II, Sugio K, Hung J, et al. Allele specific mutations involved in the pathogenesis of endemic gallbladder carcinoma in Chile. *Cancer Res* 1995; 55:2511-15.
20. Kammel D, Paakko P, Nuorva K, et al. P53 and c-erbB-2 protein expression in adenocarcinomas and epithelial dysplasias of the gall bladder. *J Pathol* 1993; 170:67-72.
21. Teh M, Wee A, Path MCR, et al. An immunohistochemical study of p53 protein in gallbladder and extrahepatic bile duct/ampullary carcinomas. *Cancer* 1994; 74(5):142-45.
22. Greenblatt MS, Bennet WT, Hollstein M, et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54:4855-78.
23. Tobias ES and Black DM. The Molecular biology of cancer. In Rimon DL, Connor JM, Pyeritz RE & Korf BR eds. In *Principles of Medical Genetics*. 4th. ed. Harcourt Publishers Limited, London 2002, 533-37.
24. Fujii K, Yokozaki H, Yasui W, et al. High frequency of p53 gene mutation in adenocarcinomas of the gallbladder. *Cancer epidemiology, Biomarkers & prevention* 1996; 5:461-66.
25. Yamaguchi A, Kurosaka Y, Fushida S, et al. Expression of p53 protein in colorectal cancer and its relationship to short-term prognosis. *Cancer* 1992; 70:2778-84.

26. Walker RA, Dearing SJ, Lane DP, et al. Expression of p53 protein in infiltrating and *in situ* breast carcinomas. *J Pathol* 1991; 165:203-211.
27. Iggo R, Gatter K, Bartek J, et al. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990; 335:675-79.
28. Sasano H, Miyazaki S, GoouKon Y, et al. Expression of p53 in human esophageal carcinoma: an immunohistochemical study with correlation to proliferating cell nuclear antigen expression. *Hum Pathol* 1992; 23: 1238-43.
29. Itoi T, Watanabe H, Yoshida M, et al. Correlation of p53 protein expression with gene mutation in gallbladder carcinomas. *Pathol Int* 1997; 47(8):525-30.
30. Kim YW, Huh SH, Park YK, et al. Expression of the c-erb-B2 and p53 protein in gallbladder carcinomas. *Oncol Rep* 2001; 8(5):1127-32.
31. Wee A, Teh M, Raju GC. Clinical importance of p53 protein in gallbladder carcinoma and its precursor lesions. *J Clin Pathol*, 1994; 47:453-456.
32. Oohashi Y, Watanabe H, Ajioka Y, et al. P53 Immunostaining distinguishes malignant from benign lesions of the gall-bladder. *Pathol Int*, 1995; 45(1):58-65.
33. Diamantis I, Karamitopoulou E, Perentes E, et al. P53 protein immunoreactivity in extrahepatic bile duct and gallbladder cancer: correlation with tumor grade and survival. *Hepatology* 1995; 22(3):774 –79.
34. Roa I, Villaseca M, Araya J, et al. P53 tumor suppressor gene protein expression in early and advanced gallbladder carcinoma. *Histopathology* 1997; 31:226-30.
35. Ajiki T, Onoyama H, Yamamoto M, et al. P53 protein expression and prognosis in gallbladder carcinoma and premalignant lesions. *Hepatogastroenterology* 1996; 43:521-26.
36. Washington K, Gottfried MR. Expression of p53 in adenocarcinoma of the gallbladder and bile ducts. *Liver* 1996; 16:99-104.
37. Misra S, Chatuverdi A, Goel MM, et al. Overexpression of p53 protein in gallbladder carcinoma in North India. *Eur J Surg Oncol* 2000; 26:164-67.

38. Quan ZW, Wu K, Wang J, et al. Association of p53, p16, and vascular endothelial growth factor protein expressions with the prognosis and metastasis of gallbladder cancer. *J Am Coll Surg* 2001; 193(4):380-3.
39. Nevin JE, Moran TJ, Kay S, et al. Carcinoma of the gallbladder: staging, treatment and diagnosis. *Cancer* 1976; 37:141-8.
40. Albores-Saavedra J, Henson DE, Sobin LH. The WHO Histological Classification of Tumors of the Gallbladder and Extrahepatic Bile Ducts. A comentary on the second edition. *Cancer* 1992; 70(2):410-414.
41. Sato T, Koyama K, Yamaguchi H, et al. Early carcinoma of gallbladder. *Gastroenterol Jpn* 1981; 16:459-64.
42. Jukemura J. Câncer de vesícula biliar. In Gayotto LCC, Alves VAF eds. *Doenças do Fígado e Vias Biliares*. Editora Atheneu, São Paulo 2001: 1039-1047.
43. Yanagisawa N, Mikami T, Koike, Okayasu I. Enhanced cell kinetics, p53 accumulation and high p21 expression in chronic cholecystitis: comparison with background mucosa of gallbladder carcinomas. *Histopathology* 2000; 36(1):54-61.
44. Lazcano-Ponce EC, Miquel JF, Muñoz N, et al. Epidemyology and molecular pathology of gallbladder cancer. *Cancer J Clin* 2001; 51:349-364.
45. Jorde LB, Carey JC. Genética do câncer. In Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ & White RL eds. *Genética Médica*. 2^a ed, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2000; 197-212.

ARTIGO 2 - REDIGIDO EM PORTUGUÊS

CONTROVÉRSIAS SOBRE A PRESENÇA DE RECEPTORES DE ESTROGÊNIO E PROGESTERONA NO CARCINOMA DE VESÍCULA BILIAR

Andréa Oxley da Rocha, Lígia M. Barbosa-Coutinho, Laís D. Leboutte, João G. Scholl.

Departamento de Patologia, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre.

RESUMO

BASE TEÓRICA/OBJETIVOS: vários estudos com pequenas amostras e resultados divergentes têm sido realizados no intuito de avaliar a presença de receptores de estrogênio e progesterona em diferentes afecções da vesícula biliar, através de diferentes métodos. Baseados nestes fatos, realizamos um estudo com técnica imunoistoquímica para avaliar a presença destes receptores.

MÉTODOS: uma amostra de 141 vesículas biliares, sendo 60 casos de carcinoma, 62 vesículas com colelitíase e 19 vesículas normais, foi avaliada pela técnica imunoistoquímica da estreptoavidina-biotina peroxidase, quanto à presença de receptores de estrogênio e progesterona.

RESULTADOS: a presença de receptores de estrogênio foi observada em 6,7% dos carcinomas de vesícula, 4,8% das vesículas com colelitíase e 15,8% das vesículas normais. Receptores de progesterona foram observados em 6,7% das neoplasias malignas, 6,5% das vesículas com colelitíase e 26,3% das vesículas normais

CONCLUSÃO: baseados em nossos resultados, concluímos que a presença de receptores de estrogênio e progesterona é pouco freqüente, tanto nas vesículas normais como em portadores de colelitíase e em carcinomas de vesícula, o que sugere que a ação dos hormônios estrogênio e progesterona não ocorra de forma direta sobre a vesícula biliar.

Palavras-chave: câncer de vesícula, receptores, progesterona, estrogênio.

INTRODUÇÃO

A neoplasia de vesícula biliar é considerada uma afecção pouco freqüente, e ainda hoje associada a um curso rapidamente letal¹⁻³. Apesar do grande progresso atingido recentemente no tratamento dos tumores malignos do trato digestivo, o carcinoma de vesícula biliar (CaVB) persiste sendo uma exceção¹. O prognóstico deste tumor é pobre e, na maioria das séries^{1,3,4}, a taxa de sobrevivência desta neoplasia corresponde a no máximo 5% em 05 anos. Menos de 10% dos pacientes apresentam-se com tumor ressecável no momento do diagnóstico, sendo a média de sobrevivência inferior a 06 meses⁴.

Apesar da baixa freqüência, esta neoplasia, representa 0,7% a 1,2% de todos os carcinomas⁵, e ocupa o 5o. lugar entre as neoplasias do trato digestivo^{6,7,8}. Além disso, o CaVB é o tumor maligno mais comum do trato biliar, correspondendo a aproximadamente 1 a 3% das peças de colecistectomia^{7,9}. Séries brasileiras^{10,11} confirmam estes dados, tendo Ziliotto e col¹² relatado uma incidência de 1,02% de CaVB como achado incidental em 885 colecistectomias realizadas por colecistite.

O CaVB acomete, principalmente, mulheres idosas, aumentando sua incidência com a idade: acima de 90% dos pacientes apresentam idade superior a 50 anos ao diagnóstico, sendo mais freqüente entre os 70 e 75 anos. A predominância do sexo feminino em relação ao masculino está demonstrada na literatura^{7,8,13-15}, porém com proporções que variam de 3:1 a 7:1, representando 8,1% dos tumores malignos nas mulheres.

A elevada incidência desta afecção em mulheres, bem como a sua associação freqüente à presença da doença vesicular calculosa, também comum no sexo feminino, tornou plausível a hipótese de que a vesícula biliar seja um órgão sensível a ação dos hormônios sexuais¹⁴. A presença de receptores para hormônios sexuais (estrogênio e progesterona) tem sido bem documentada em neoplasias de órgãos hormônio-dependentes como a mama e próstata, e o sucesso obtido com a manipulação hormonal, na terapia destes tumores, estimulou o estudo do papel destes hormônios no CaVB, com a expectativa de obter-se uma nova alternativa

terapêutica para tratamento desta afecção. Entretanto, resultados bastante divergentes, quanto a presença destes receptores, provavelmente por utilizarem pequenas amostras e métodos de detecção pouco específicos, não trouxeram resposta esclarecedora para esta questão.

Singletary et al¹⁶ em 1986 demonstraram, pela primeira vez, a presença de receptores estrogênicos (RE) e progesterônicos (RP) em vesículas biliares humanas. A partir deste momento, diversos estudos^{6,14,16-21} foram realizados no intuito de confirmar a presença e definir o real papel destes receptores, e conseqüentemente, dos hormônios sexuais no CaVB.

Baseados nestes achados, realizamos um estudo para avaliar a presença de receptores de estrogênio e progesterona em uma amostra de 141 vesículas biliares.

MÉTODOS

Cento e quarenta e uma vesículas biliares foram obtidas dos arquivos do departamento de patologia, sendo 60 casos consecutivos de CaVB, 19 vesículas normais obtidas a partir de casos em que a mesma foi ressecada por outras patologias que não a envolviam e 62 provenientes de colecistectomias realizadas por colelitíase. Os prontuários hospitalares destes pacientes foram revisados para obtenção de dados clínicos pertinentes.

A partir dos blocos de parafina, o diagnóstico histológico foi novamente confirmado nos casos de neoplasia, e realizada a técnica imunoistoquímica para identificação da presença de receptores estrogênicos e progesterônicos nos 3 grupos. A técnica utilizada foi a estreptoavidina-biotina peroxidase. Os cortes eram desparafinados em xilol e reidratados com etanol e água. Um tratamento preliminar foi aplicado por aquecimento das lâminas no microondas em solução de citrato de sódio a fim de reverter o efeito de fixação pelo formol. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por imersão das lâminas em solução com H₂O₂ 0,3% e metanol por 30 min. A seguir as lâminas foram lavadas duas vezes com solução tampão de fosfato (PBS) a 4°C por 20 min, e após durante 30 min em soro normal. A seguir foram cobertas com anticorpo primário monoclonal anti-receptor de estrogênio humano

produzido em rato (Dako Corporation, 1D5) na diluição de 1:100, permanecendo durante a noite em refrigerador. De forma semelhante, para os receptores progesterônicos utilizando anticorpo monoclonal anti-receptor de progesterona humana (Novocastra Ltda) na diluição 1:40. Após nova lavagem com PBS, os cortes foram encubados com anticorpo secundário anti-imunoglobulina de rato (Vector Laboratories, BA-2000) 1:600 por 30 min e a seguir em complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase (Dako corporation, streptABComplex K-492) por 30 min e após lavadas com PBS. A ligação antígeno-anticorpo foi visualizada com DAB (diamino benzidine-tetracloro) e contra-corada com hematoxilina. Utilizamos como controle positivo cortes de tumor de mama (positivo para receptor de estrogênio e progesterona) e negativo lâminas deste mesmo tumor utilizando soro fisiológico ao invés do anticorpo primário.

Para análise da positividade dos receptores, consideramos como positivos somente aqueles casos no qual houve inequívoca coloração homogênea do núcleo da célula do epitélio vesicular ou do tumor em marron. A avaliação utilizada foi a mesma proposta por Teh²², baseada na quantidade de núcleos corados na lâmina examinada, sendo dividida em três categorias: com menos de 10%, entre 10% e 50% e com mais de 50% dos núcleos das células coradas. A intensidade da coloração também foi dividida em moderada e forte intensidade. O caso foi considerado positivo somente quando havia forte coloração de mais de 10% dos núcleos celulares ou moderada coloração de mais de 50% das células (figura 1).

Para análise estatística utilizamos o teste do qui-quadrado e para análise da sobrevida a curva de Kaplan-Meier.

RESULTADOS

A presença de receptores de estrogênio foi observada em 6,7% (4 de 60) das vesículas com carcinoma, 4,8% (3 de 62) das vesículas com colelitíase e em 15,8% (3 de 19) das vesículas normais. Não havendo significância estatística nas diferenças observadas entre os 3 grupos.

Receptores de progesterona foram detectados em 6,7% (4 de 60) das neoplasias de vesícula biliar, 6,5% (4 de 62) das vesículas com colelitíase e 26,3% (5 de 19) das vesículas normais. Observou-se diferença estatisticamente significativa em relação a presença de RP no grupo de vesículas normais quando comparado aos demais grupos (p 0,02).

Em relação ao tipo histológico, 88,3% (53) eram adenocarcinomas, 10% (6) carcinomas adenoescamosos e 1,7% (1) tumor indiferenciado.

Em relação ao sexo, 52 dos 60 casos de carcinoma de vesícula eram do sexo feminino, 51 dos 62 portadores de colelitíase e 11 dos 19 com vesículas normais.

Não houve diferença estatisticamente significativa na média de idade entre os três grupos (média 58,2 anos). Também não foi observada associação entre a presença destes receptores e o tipo histológico ou sexo.

Foi possível avaliar a sobrevida em 42 pacientes (70%) dos 60 portadores de CaVB. A média de sobrevida foi de 9,9 meses (desvio padrão de 2,56 e intervalo de confiança de 95% entre 4,96 e 15,01 meses), com mediana de 3,97 meses, não sendo observada associação entre positividade destes receptores e tempo de sobrevida .

DISCUSSÃO

É razoável pressupor que o efeito dos hormônios esteróides no câncer de vesícula possa ser grande, visto que esta doença tem maior predileção por mulheres, e estrógenos exógenos têm sido associados à presença de colelitíase que, por sua vez, ocorre em 70% a 90% dos casos de CaVB^{7,14}.

Diversos estudos têm avaliado a presença de receptores estrogênicos e progesterônicos no CaVB, utilizando desde técnicas bioquímicas até técnicas imunoistoquímicas, com resultados bastante variados. Em 1989 Nakamura et al¹⁸, utilizando técnica imunoistoquímica (imuno-histokits) identificou RE e RP em 52,4% e 0% respectivamente nas células tumorais de 21 pacientes portadores de CaVB. Yamamoto et al¹⁹ (1990) testaram a presença de RE em 189 pacientes portadores de diversas afecções da vesícula biliar, apresentando resultados positivos em 19% dos casos de colelitíase, 33% em pólipos epiteliais, 53,8% dos adenomas e 22,8% dos 114 portadores de neoplasia maligna deste órgão. Entretanto, este autor não utilizou no preparo dos tecidos solução com H₂O₂ e metanol para o bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos, fundamental para garantir a especificidade do método e eliminar a possibilidade de falso-positivos. Messa et al²⁰, utilizaram a mesma técnica bioquímica utilizada por Singletary et al¹⁶, sendo que esta técnica avalia a presença de RP e RE indiretamente, através da detecção de citosol. Chen et al¹⁴ em 1991, assim como Ranelletti et al²³, no mesmo ano, também detectaram por técnica bioquímica, positividade dos RE e RP em pacientes portadores de colelitíase em percentuais variáveis. Malik et al²⁴ em 1998 (imuno-histokit), avaliaram 30 carcinomas de vesícula, sendo que dezoito pacientes (60%) apresentaram RE positivos no tecido maligno.

Ao contrário dos demais autores, Ko et al²¹ em 1995, usando técnica imunoistoquímica, detectaram 88% de negatividade em relação à presença de RE em 25 espécimes de CaVB obtidas a partir de blocos de parafina, sendo que os demais (12%) foram fracamente positivos. Esta baixa positividade, em relação aos achados dos demais autores se deve, provavelmente,

a diferente técnica utilizada para identificação dos receptores. Estes autores incluíram um pré-tratamento do tecido com pronase, que parece expor (“desmascarar”) melhor os RE antigênicos.

É importante salientar ainda, que em outros estudos, como o realizado por Malik et al²⁴ e Nakamura et al¹⁸, utilizaram técnica imunoistoquímica para detectar a presença de RE, porém utilizando imuno-histokits, que demonstravam a presença destes receptores indiretamente, através da detecção de estradiol. Embora esta técnica já tenham sido considerada como padrão, hoje sabe-se que apresenta pouca especificidade em virtude do inaceitável número de falso-positivos associados ao método. O método utilizado por Yamamoto et al¹⁹ foi similar a técnica imunoistoquímica utilizada por Ko et al²¹, com anticorpo monoclonal, entretanto no pré-tratamento com enzimas, o primeiro utilizou tripsina, enquanto este último utilizou pronase. Cheng et al²⁵ compararam os dois métodos e demonstraram ser a pronase superior a tripsina devido ao melhor “desmascaramento” dos RE e RP antigênicos presentes no núcleo das células, conferindo maior sensibilidade para este método.

Assim como Ko et al²¹, em nosso estudo observamos pequeno número de vesículas com receptores de estrogênio e progesterona, tanto nas vesículas com tumor como naquelas com colelitíase. Utilizamos a técnica imunoistoquímica da avidina-biotina peroxidase, com recuperação de antígeno (pré-tratamento) por aquecimento em micro-ondas, o que aumenta a exposição de sítios antigênicos (epitopos) não expostos (mascarados) em tecidos parafinados, sendo este o método de pré-tratamento com melhor resultado, quando comparado a outros métodos, incluindo o enzimático (com tripsina ou pronase)²⁶.

Gallus et al²⁷ publicaram em 2002, estudo de caso-controle no qual avaliaram a relação entre a terapia de reposição hormonal pós-menopausa e o CaVB, e observaram que 16% das portadoras desta neoplasia realizaram terapia de reposição hormonal, enquanto no grupo controle apenas 6%²⁸. Diversos estudos *in vitro*^{29,30} e em humanos^{31,32} têm comprovado que a progesterona influi na motilidade da vesícula biliar retardando o esvaziamento desta, bem como alterando a composição da bile, através do aumento do índice de colesterol, tornando-a mais litogênica³⁶. Além disso, existem complexas interações entre fatores locais e mecanismos

de controle neural e hormonal que interferem na dinâmica vesicular^{14,16,20,23,33}. A evidência da influência da progesterona sobre estes mecanismos citados é percebida na gravidez, quando os níveis deste hormônio estão marcadamente elevados, o volume vesicular de jejum está aumentado e a fração de ejeção em resposta a teste pós-alimentar está reduzida^{29,30,34,35}. No entanto, estes estudos não identificam o mecanismo de ação destes hormônios, permanecendo ainda controverso se estes atuam diretamente através de seus receptores específicos presentes na vesícula.

Baseados nos resultados obtidos no presente estudo, através de técnica imunistoquímica adequada, concluímos que as vesículas de pacientes portadores de neoplasia maligna não apresentam positividade de receptores diferente daquela encontrada nas vesículas com colelitíase. Além disso, o número de casos positivos, tanto para receptores de estrogênio como de progesterona, nestes grupos foi muito pequeno, sugerindo que a ação hormonal na vesícula talvez não ocorra por mecanismos diretos.

O achado de diferença estatisticamente significativa para a presença de receptores progesterônicos entre as vesículas normais quando comparado com os grupos de colelitíase e carcinoma é, aparentemente, paradoxal. Do ponto de vista da possibilidade biológica, seria esperado encontrar-se uma maior proporção de receptores entre os pacientes com colelitíase, onde o efeito deste hormônio é mais evidente.

Desta maneira, acreditamos que a neoplasia de vesícula biliar seja uma afecção mais freqüente em mulheres, porque é neste sexo que a colelitíase tem maior incidência^{7,36,37}. Embora a colelitíase esteja claramente estabelecida na literatura como um fator de risco para o CaVB, o mecanismo patogênico pelo qual este processo ocorre não está completamente elucidado^{4,6,9}. Sabe-se que a formação dos cálculos biliares é de origem multifatorial³⁵, e que a influência dos hormônios sexuais, estrogênio e progesterona, é certa, entretanto nossas observações fornecem subsídio para a hipótese de que o efeito que estes hormônios exercem sobre a vesícula biliar, não ocorrem diretamente, através de receptores específicos. Assim, é possível que a colelitíase funcione como um elo de ligação entre a ação destes hormônios e a neoplasia maligna de vesícula biliar.

Estudos recentes em animais e em humanos têm proposto^{29,30,33,38} que esta ação possa ocorrer de forma indireta, sendo através da interferência na ação da CCK (colecistocinina) ou alterando a contratilidade da musculatura lisa da vesícula, por interferência na ativação de receptores da proteína G e, conseqüentemente, com o sinal subsequente transmitido através da membrana celular, porém mais pesquisas são necessárias para que o mecanismo de ação destes hormônios sobre a vesícula biliar seja totalmente elucidado.

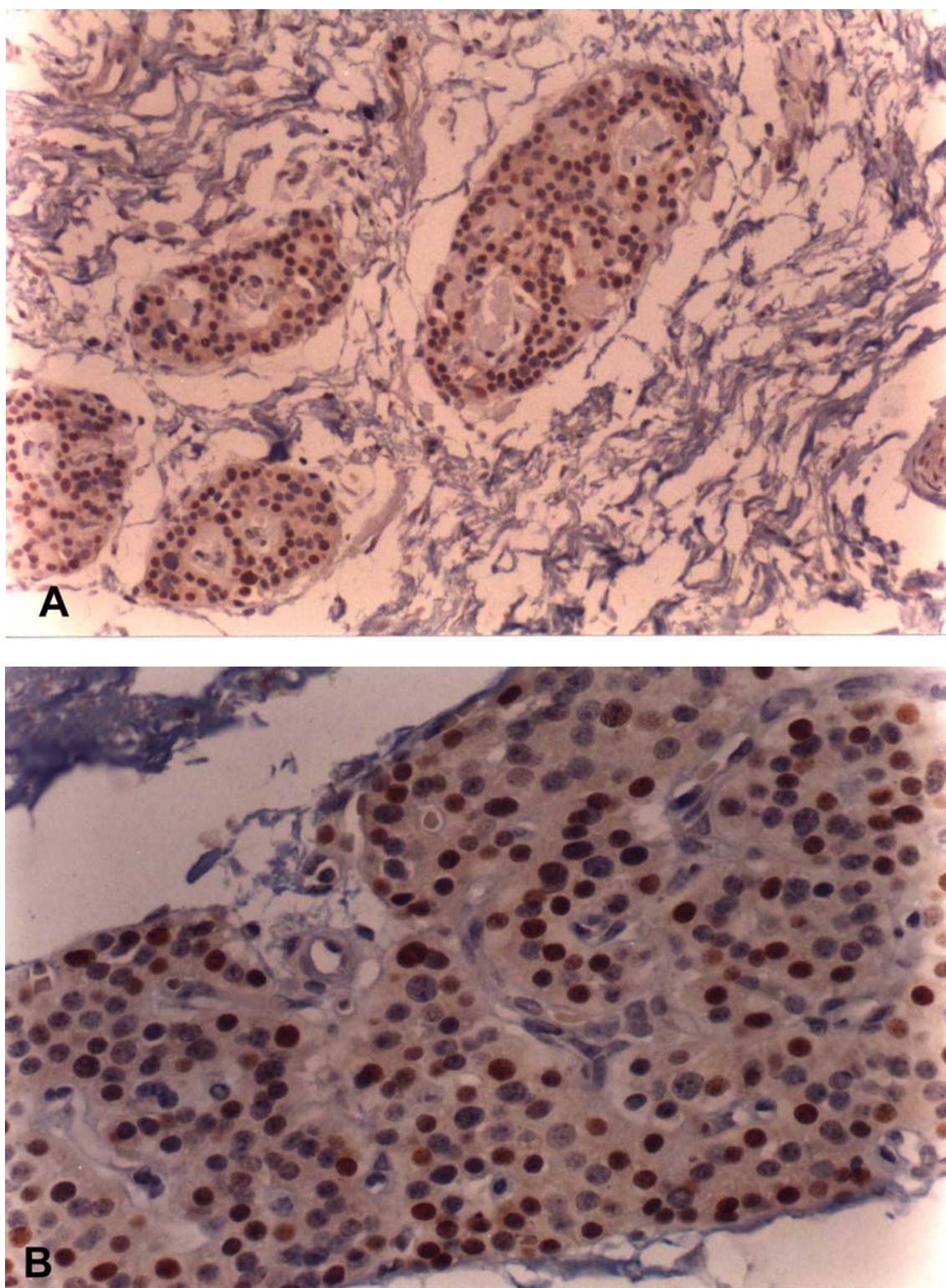


Fig. 1 (A e B) Carcinoma de vesícula biliar mostrando positividade para os receptores de progesterona (IHQ para RP, objetiva 20x e 40x).

BIBLIOGRAFIA

1. Sumiyoshi K, Nagai E, Chijiwa F. Pathology of carcinoma of the gallbladder. *World J surg* 1991; 15: 315-21.
2. Ouchi K, Matsuno S, Sato T. Long-term survival in carcinoma of the biliary tract. Analysis of prognostic factors in 146 resections. *Arch Surg* 1989; 124: 248-52.
3. Henson DE, Albores-Saavedra J and Corle D. Carcinoma of the gallbladder. Histologic types, stage of disease, grade, and survival rates. *Cancer* 1992; 70(6): 1493-97.
4. Tazuma S & Kajiyama G. Carcinogenesis of malignant lesion of the gallbladder. *Langenbeck's Arch Surg* 2001; 386(3): 224-9.
5. Nakayama F. Recent progress in the diagnosis and treatment of carcinoma of the gallbladder - Introduction. *World J Surg* 1991; 15: 313-14.
6. Bhaskaran V. Hormonal receptors in carcinoma of the gallbladder. *Trop Gastroenterol* 2000; 21(2): 48-50.
7. Barbosa-Coutinho LM, Arnt RA, Rocha JL & Ossanai R. Carcinoma de vesícula biliar: estudo de 26 casos. *R. AMRIGS* 1992; 36(1): 9-14.
8. Cunha JE, Penteado S, Jukemura J. Neoplasias da Vesícula biliar. In Kalil AN, Coelho J, Strauss E eds. *Fígado e Vias Biliares-Clinica e Cirurgia*. Editora Revinter R Ltda, Rio de Janeiro 2001:650-57.
9. Pandey M, Pathak AK, Amitabh G. Carcinoma of the gallbladder. A retrospective review of 99 cases. *Dig Dis Sci* 2001; 46(6): 1145-51.
10. Nigro AJT, Pugliesi JrWJ, Wechi SL, et al. Câncer da vesícula biliar. *An Paul Med Cir* 1978; 105: 63-70.
11. Monteiro MC. Câncer da vesícula biliar. Análise de 100 casos operados. *Arq Bras Med* 1985; 59: 337-44.
12. Ziliotto JA, Kunzle JE, Sgarbi EC. Carcinoma primário de vesícula biliar. *Rev Bras Cancerol* 1985; 31: 103-106.

13. Strom BL, Soloway RD, Rios-Dalenz JL, et al. Risk factors for gallbladder cancer. An International collaborative case-control study. *Cancer* 1995; 76(10): 1747-56.
14. Chen A, Huminer D. The role of estrogen receptors in the development of gallstones and gallbladder cancer. *Medical Hypotheses* 1991; 36(3): 259-60.
15. Donhauser JL. Primary carcinoma of the gallbladder. An analysis of fifty-two cases. *AMA Arch Surg*, 1958; 77:918-24.
16. Singletary BK, Thiel DHV, Eagon PK. Estrogen e progesterone receptors in human gallbladder. *Hepatology* 1986; 6(4): 574-79.
17. Daignault PG, Fazekas AS, Rosenthal L, et al. Relationship between gallbladder contraction and progesterone receptor in patients with gallstones. *Am J Surg* 1988; 155: 147-51.
18. Nakamura S, Muro H, Suzuki S. Estrogen and progesterone receptors in gallbladder cancer. *Jpn j Surg* 1989; 19(2): 189-94.
19. Yamamoto M, Nakajo S, Tahara E. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in human gallbladder. *Acta Pathol Jpn* 1990; 40(1): 14-20.
20. Messa C, Maselli MA, Cavallini A, et al. Sex steroid hormone receptors and human gallbladder. Motility in vitro. *Digestion* 1990; 46: 214-19.
21. Ko CY, Schmit P, Cheng L & Thompson JE. Estrogen receptors in gallbladder cancer: detection by an improved immunohistochemical assay. *Am Surg*, 1995; 61(10): 930-3.
22. Teh M, Wee A, Path MCR, et al. An immunohistochemical study of p53 protein in gallbladder and extrehepatic bile duct/ampullary carcinomas. *Cancer* 1994; 74(5):142-45.
23. Ranelletti FO, Piantelli M, Farinon AT, et al. Estrogen and progesterone receptors in gallbladders from patients with gallstones. *Hepatology* 1991; 14(4): 608-12.
24. Malik IA, Abbas Z, Shamsi Z, Daudi I, et al. Immuno-histochemical analysis of estrogen receptors on the malignant gallbladder tissue . *J Park Med Assoc*, 1998; 48(5):123-6.
25. Cheng L, Binder S, Fu Y, Lewin K. Demonstration of estrogen receptors by monocloral antibody in formalin-fixed breast tumors. *Lab Invest* , 1988; 3:346-53.

25. Oliver RK, Heavens RP, Sirinathsinghji DJS. Quantitative comparison of pretreatment used to sensitize in situ hybridization using oligonucleotide probes on paraffin-embedded brain tissue. *J Histochem Cytochem* 1997; 45(12): 1707-13.
27. Gallus S, Negri E, Chatenoud L, et al. Post-menopausal hormonal therapy and gallbladder cancer risk. *Int J Cancer*, 2002; 99(5): 762-63.
28. Simon JA, Hunninghake DB, Agarwal SK, et al. Effect of estrogen plus progestin on risk for biliary tract surgery in postmenopausal women with coronary artery disease. The Heart and Estrogen/Progestin (HERS) Replacement Study. *Ann Intern Med* 2001; 135(7):493-501.
29. Tierney S, Nakeeb A, Wong O, et al. Progesterone alters biliary flow dynamics. *Ann Surg* 1999; 229(2): 205-9.
30. Xiao Z-L, Chen Q, Biancani P & Behar J. Mechanisms of gallbladder hypomotility in pregnant guinea pigs. *Gastroenterology* 1999; 116(2): 411-19.
31. Down RHL, Whiting MJ, Watts JM, Jones W. Effect of synthetic oestrogens and progestagens in oral contraceptives on bile lipid composition. *Gut* 1983; 24: 253-59.
32. Scagg RKR, McMichael AJ, Seamark RF. Oral contraceptives, pregnancy, and endogenous oestrogenous in gallstone disease – a case control study. *Br Med J* 1984; 288: 1795-99.
33. Kiaii B, Xu, Q-W & Shaffer EA. The basis for impairment of gallbladder contractility in Male Guinea pigs in vitro. *J Surg Res* 1998; 79(2): 97-102.
34. Braverman DZ, Johnson ML, Kern F. Effects of pregnancy and contraceptive steroids on gallbladder. Function. *N. Engl J Med* 1980; 302(7): 362-4.
35. Everson GT. Gastrointestinal motility in pregnancy. *Gastroenterol Clin North Am* 1992; 21(4): 751-76.
36. Juvonen T. Pathogenesis of gallstones. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 577-82.
37. Kaushik SP. Current perspectives in gallbladder carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16(8): 848-54.
38. Bird NC, Ahmed R, Chess-Williams R, Johnson AG. Active relaxation of human gallbladder. Muscle is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Digestion* 2002; 65:220-26.