

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA  
MESTRADO E DOUTORADO

***ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOCITOQUÍMICA DA PROTEÍNA  
p53 NA IDENTIFICAÇÃO DE LESÕES PRECURSORAS DO  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO UTILIZANDO O  
BALÃO CITOLÓGICO EM INDIVÍDUOS SOB RISCO***

Dissertação de Mestrado apresentada à banca  
examinadora e ao Programa de Pós-Graduação:  
Ciências em Gastroenterologia. Faculdade de  
Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Autor: Antônio de Barros Lopes**

**Orientador: Profº. Dr. Renato Borges Fagundes**

**2008**

**L864a** Lopes, Antônio de Barros

Análise da expressão imunocitoquímica da proteína p53 na identificação de lesões precursoras do carcinoma epidermóide de esôfago utilizando o balão citológico em indivíduos sob risco / Antônio de Barros Lopes ; orient. Renato Borges Fagundes. – 2008. 85 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia. Porto Alegre, BR-RS, 2008.

1. Neoplasias esofágicas 2. Carcinoma de células escamosas 3. Marcadores biológicos de tumor 4. Proteína supressora de tumor p53 5. Histocitoquímica I. Fagundes, Renato Borges II. Título.

NLM: WI 250

**Dedico esta dissertação àqueles que me são realmente caros:**

Minha esposa, Vanessa, que me dá suporte em todos os momentos. Esta catarinense agitada e produtiva que, com sua energia e carinho, me estimula a tentar ser sempre melhor.

Meus pais, Antonio Cesar e Lídia Maria, que são paz e bem no meu caminho.

À minha irmã, Clarissa, que me ensinou a somar e dividir afeto, parceria e bons momentos.

“Seja tudo que deseja  
Até não haver desejo  
Que já não seja”

Alexandre Brito (poeta gaúcho e primo)

### AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Renato Borges Fagundes, meu orientador-parceiro, que mesmo na adversidade, foi disponível e presente. Serei sempre grato pelos horizontes que me mostrastes nesta jornada.

Ao Professor Doutor Sérgio S.G. de Barros, meu grande mestre e conselheiro na medicina. Agradeço pelo estímulo à pesquisa e assistência qualificada, praticando a medicina e a ciência com arte e paixão.

Ao Professor Doutor João Carlos Prolla, pelo grande auxílio na avaliação de inúmeras lâminas de citologia e por ter lançado sementes frutíferas da pesquisa no diagnóstico precoce de câncer do esôfago.

À Doutora Ada R. Diehl, pela contribuição na avaliação de lâminas de citologia.

À Professora Doutora Luise Meurer, que com muita paciência e bom humor me revelou alguns dos mistérios microscópicos do esôfago.

Ao Doutor Sanford Dawsey pelos ensinamentos e conselhos em diagnóstico precoce de Câncer do Esôfago.

À Médica Cristina Arruda, que me presenteia com amizade e conhecimento nas lides da gastroenterologia e das doenças do esôfago.

Ao Médico Leandro Müller, pelo companheirismo e disponibilidade em fazer ciência.

À acadêmica de medicina Roberta Reichert, cuja disciplina e presteza na coleta e avaliação dos dados, foram fundamentais para realização deste estudo.

Ao Médico Jorge Manfrin e aos Médicos Residentes do Serviço de Otorrinolaringologia do HCPA, pela colaboração no recrutamento de pacientes para este estudo.

À Doutora Melissa Premaor, pelos momentos de discussão de pesquisa.

À Técnica de Serviço de Patologia do HCPA, Flávia Grossmann, que trabalha como a formiguinha, mas conversa como a cigarra, agradeço pelo auxílio indispensável na confecção das lâminas de imunocitoquímica e imunoistoquímica.

À Prática do Laboratório de Citopatologia do HCPA, Leda Teresinha dos Santos, pelo zelo e atenção no cuidado e organização das lâminas de citologia. Sem sua colaboração seria impossível a realização deste mestrado.

À Médica Cláudia Carvalho de Moraes e ao estudante de medicina Anderson M. Cappra, pelo auxílio precioso na coleta dos dados de pacientes no HUSM.

Aos integrantes do Grupo de Pesquisa em Doenças do Esôfago (GEPE), pelo incentivo à discussão e ao pensamento científico.

Às secretárias da PPG: Ciências em Gastroenterologia, Jamile Ladeira e Moema Goulart, pela colaboração e auxílio constantes.

Ao Serviço de Patologia do HCPA e HUSM, pelo apoio na confecção e avaliação das lâminas de biópsia.

À enfermagem do Centro Cirúrgico Ambulatorial do HCPA, que emprestou tempo e assistência nas tardes de sexta-feira.

Ao Professor Doutor Luis Antônio Nasi, pelo apoio ao crescimento pessoal e coletivo dos médicos do serviço de emergência do HCPA. Agradeço pela confiança e compreensão.

Aos médicos contratados do serviço de emergência, que com a camaradagem transformam um ambiente hostil em um bom ambiente de trabalho e convivência.

À Médica Helenice Breyer, pela disponibilidade e comportamento ético em fazer e ensinar boa medicina.

Ao Secretário Fernando Augusto Soares, que, sem sombra de dúvida, faz o Serviço de Gastroenterologia andar.

Ao Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Maria, pelo apoio e infra-estrutura fundamentais na realização deste estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia, pelo apoio na produção de pesquisa séria e engajada.

Aos pacientes avaliados neste estudo, que foram disponíveis e pacientes, colaborando com a pesquisa e criação de conhecimento.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. O Câncer de Esôfago	5
2.2. Epidemiologia	5
2.2.1. Fumo e álcool	7
2.2.2. Malignidades preexistentes	8
2.2.3. Consumo de bebidas quentes	9
2.2.4. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP)	9
2.2.5. Aspectos nutricionais	10
2.2.6. Fatores socioeconômicos e história familiar	10
2.3. Aspectos moleculares	10
2.3.1. Alterações no gene <i>p53</i> e sua repercussão na carcinogênese do CEE	11
2.4. Lesões precursoras e diagnóstico precoce	14
2.4.1. Rastreamento com balão citológico	14
2.4.2. Cromoendoscopia	17
2.4.3. Detecção de mutações e expressão imunoistoquímica da proteína p53	17

3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo Geral	21
3.2. Objetivos Específicos	21
4. METODOLOGIA	22
4.1. Delineamento	23
4.2. Seleção de pacientes	23
4.2.1. Inclusão	23
4.2.2. Exclusão	23
4.3. Coleta de dados	24
4.3.1. Esfregaço citológico	24
4.3.2. Cromoendoscopia com Lugol	25
4.4. Exame citológico – critérios	26
4.5. Exame histológico – critérios	29
4.6. Imunocitoquímica – preparação do material	29
4.7. Imunoistoquímica – preparação do material	30
4.8. Interpretação da imunocitoquímica e imunoistoquímica	32
4.9. Considerações éticas	33
4.10. Estatística	34
4.10.1. Cálculo amostral	34
4.10.2. Análise de dados	34
4.10.3. Análise estatística	35
5. RESULTADOS	36
5.1. Características dos pacientes estudados	37
5.2. Resultados da coleta com o <i>Balão RS</i> e citologia convencional	40
5.3. Resultados de esofagoscopia e cromosendoscopia com solução de Lugol	40
5.4. Resultados das biópsias do esôfago e sua relação com a citologia convencional	41

5.5. Resultados de imunoistoquímica p53	43
5.6. Resultados de imunocitoquímica p53	47
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÕES	54
8. SUGESTÕES PARA FUTUROS ESTUDOS	56
9. ANEXOS	58
Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os indivíduos sob risco – Rastreamento e prevenção do Carcinoma do Esôfago	59
Anexo 2. Questionário a ser aplicado aos pacientes	60
Anexo 3. Mapa esquemático do Esôfago	61
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADS: arcada dentária superior

AE: adenocarcinoma do esôfago

ASCUS: *atypical squamous cells of undetermined significance* (alterações escamosas de significado indeterminado)

CEE: carcinoma epidermóide do esôfago

HAP: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

DAB: diaminobenzidina

EBV: *Epstein-Barr Virus* (vírus Epstein-Barr)

EGFR: *epidermal growth factor receptor* (receptor do fator de crescimento epidérmico)

HAP: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HE: Hematoxilina/Eosina

HPV: *Human Papiloma Virus* (Papiloma Vírus Humano)

HSIL: *high grade squamous intraepithelial lesion* (lesão intra-epitelial de alto grau)

HUSM: Hospital Universitário de Santa Maria

IARC: *International Agency for Cancer Research* (Agência Internacional para Estudo do Câncer)

INCA: Instituto Nacional do Câncer

LOH: *loss of heterozygosity* (perda de heterozigosidade)

LSIL: *low grade squamous intraepithelial lesion* (lesão intra-epitelial de baixo grau)

p53-PBS: *p53 protein binding site* (sítio de ligação da proteína p53)

PBS: *phosphate buffer solution* (solução tampão de fosfato)

PCR: *protein chain reaction* (reação da cadeia da polimerase)

RS: Rio Grande do Sul

TADS: Trato aéreo-digestivo superior

TGI: trato gastrointestinal

TP53: gene *p53*

USP: Universidade de São Paulo

**LISTA DE TABELAS**

	Página
1. Fatores de risco para o Câncer do Esôfago	6
2. Características dos indivíduos quanto ao consumo de fumo	38
3. Características dos indivíduos quanto ao uso de álcool	38
4. Características dos indivíduos quanto ao consumo de chimarrão	38
5. Comparação de características demográficas e hábitos de pacientes avaliados no HCPA e HUSM	39
6. Relação das áreas não coradas pelo Lugol com os diagnósticos histológicos	41
7. Comparação do diagnóstico citopatológico de material coletado pelo balão RS com biópsia do esôfago guiada por cromendoscopia com Lugol	42
8. Comparação de citologia positiva e biópsia	42
9. Relação da cromoendoscopia com a expressão imunoistoquímica da proteína p53	45
10. Relação da expressão imunoistoquímica da proteína p53 com os diagnósticos histológicos	45

## LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Seqüência proposta de eventos genéticos para o desenvolvimento do carcinoma epidermóide do esôfago	11
2. Esquema simplificado das vias da proteína p53	12
3. O <i>Balão RS</i>	16
4. Fluxograma do estudo	24
5. Endoscopia convencional e cromoendoscopia com Lugol	26
6. Painel de imagens citopatológicas conforme classificação de Bethesda	28
7. Painel de exames anatomopatológicos de biópsias coradas pela Hematoxilina/Eosina (a, c, e) e após imunistoquímica p53 (b, d, f)	33
8. Relação de freqüências da expressão imunistoquímica de p53 em pacientes com diagnóstico prévio de carcinoma do TADS	44
9. Relação de freqüências da expressão imunistoquímica de p53 com os diagnósticos histológicos	46

## RESUMO

O Carcinoma Epidermóide do Esôfago (CEE) é uma das neoplasias malignas mais agressivas e letais do trato digestivo. Seu diagnóstico frequentemente ocorre em indivíduos com doença avançada, sendo baixas as possibilidades de cura. O Rio Grande do Sul é o estado brasileiro com maior número de diagnósticos, com estimativa de contribuir com 10% dos casos do país em 2008, atingindo uma incidência de 19,73 casos novos/100.000 habitantes do sexo masculino e 7,58 novos casos/100.000 habitantes do sexo feminino. O CEE permanece o tipo mais comum com mais de 80% dos casos. Tentativas de diagnóstico precoce do CEE em indivíduos sob risco têm sido feitas utilizando-se citologia coletada com balões abrasivos. Porém, tal técnica tem demonstrado que, apesar de obter boas amostras de células da mucosa esofágica, apresenta sensibilidade abaixo do esperado para sua aplicação na rotina.

No presente estudo os autores se propõem estudar a prevalência da expressão da proteína p53 em material citológico coletado pelo *Balão RS* em indivíduos sob risco para CEE, além de verificar sua acurácia diagnóstica para rastreamento de CEE.

Foram incluídos indivíduos assintomáticos que apresentassem ao menos um dos fatores de risco: a) consumo de mais de 40 gramas de etanol/dia por mais de 10 anos; b) consumo de mais de 10 cigarros/dia por mais de 10 anos; c) uso diário de chimarrão por mais de 10 anos; d) diagnóstico prévio de carcinoma epidermóide do trato aéreo-digestivo superior (TADS). Foram excluídos indivíduos com: a) recusa em participar do estudo; b) agitação psicomotora que impossibilitasse a passagem do balão; c) varizes esofágicas; d) disfagia progressiva; e) hepatopatia crônica descompensada; f) hemorragia digestiva alta nos últimos 30 dias; g) sinais de encefalopatia metabólica; h) diagnóstico de divertículo de Zenker.

Entre março de 2006 e dezembro de 2007, 171 indivíduos foram avaliados com citologia esfoliativa pelo *Balão RS* e as biópsias esofágicas guiadas pela cromoendoscopia com solução de Lugol. O material citológico foi analisado após coloração de Papanicolaou e imunocitoquímica p53. O material de biópsia foi corado pela Hematoxilina/Eosina e imunistoquímica p53. Oito sujeitos foram excluídos (4,7%) por apresentarem material citológico inadequado coletado pelo *Balão RS*. A amostra de 163 pacientes consistiu de 150 homens (92%), com idade entre 28 e 84 anos (média= 52,6 ± 12 anos). Tabagismo ativo foi observado em 141 pacientes (86,5%), com mediana de carga tabágica de 39,5 maços/ano.

Alcoolismo ativo foi observado em 114 indivíduos, com consumo de destilados em 78,1% dos casos e quantidade mediana de 320 gramas de álcool/dia. Alcoolismo e tabagismo ativos concomitantes foram observados em 63,8% da amostra estudada (104 sujeitos). Consumo de chimarrão diário foi observado em 69,9% no grupo estudado. Tabagismo, consumo de álcool e consumo de chimarrão em bases regulares foram identificados de maneira concomitante em 77 indivíduos (47,2%). Carcinoma do TADS foi o fator de inclusão em 42 pacientes (25,8%).

A utilização do *Balão RS* foi fácil e rápida, sendo bem tolerado sem complicações. Os resultados dos exames citológicos foram os seguintes: 147 normais (90,2%), 10 alterações celulares reativas (6,1%), 3 alterações escamosas de significado indeterminado (ASCUS) (1,8%), 1 lesão intra-epitelial de baixo grau (LISL) (0,6%), 1 lesão intra-epitelial de alto grau (HSIL) (0,6%) e 1 carcinoma escamoso (0,6%).

A cromoendoscopia com Lugol apresentava áreas descoradas em 65 indivíduos (40,1%). As áreas coradas apresentaram diagnóstico histopatológico normal em 110 (67,5%) e esofagite em 53 indivíduos (32,5%). Dos 65 pacientes com áreas descoradas foi atribuído diagnóstico anatomopatológico normal em 23 (35,4%), esofagite em 39 (60%), displasia de alto grau em 1 (1,5%), carcinoma *in situ* em 1 (1,5%) e carcinoma invasivo em 1 (1,5%).

A citologia positiva (ASCUS, LSIL, HSIL, Carcinoma) coletada pelo *Balão RS* obteve sensibilidade de 66,7% (IC95% 22,0 – 93,6), especificidade de 97,5% (IC95% 96,7 – 98,0), acurácia de 96,9% (IC95% 95,3 – 97,9), valor preditivo positivo de 33,3% (IC95% 11,0 – 46,8) e negativo de 99,4% (IC95% 98,5 – 99,9) para identificação de lesões neoplásicas histológicas.

A imunistoquímica com p53 foi executada em 161 indivíduos, sendo que a expressão desta proteína foi positiva em 38 indivíduos (23,6%), com acometimento da camada basal em 29 (76,3%), camada média em 8 (21,1%) e camada superficial em 1 (2,6%).

Não houve expressão imunocitoquímica da proteína p53 no material citológico obtido com *Balão RS* nesta amostra de indivíduos sob risco de CEE.

Podemos concluir que, apesar do *Balão RS* ter apresentado um bom desempenho na coleta de amostras citológicas do esôfago, a negatividade da expressão da imunocitoquímica da proteína p53 em todas as amostras sugere que seu uso não contribui para a melhora da efetividade diagnóstica da citologia.

## ABSTRACT

Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus (SCCE) is one of the most aggressive and lethal digestive cancers. Unfavorable prognosis is common due to late diagnosis, resulting in low chances of curative treatment. Rio Grande do Sul is the leading Brazilian state in new cases, with an estimated 2008 prevalence of 19.73 new cases/100,000 male inhabitants and 7.58 new cases/100,000 female inhabitants. SCCE remains the most frequent histological type, contributing with 80% of the cases. Exfoliative cytology obtained with abrasive balloons has been used to attempt early diagnosis of SCCE. Although this technique collects good cytological samples from the esophageal mucosa, the low sensitivity of cytology precludes its use in clinical practice.

In the current work the author studied the prevalence of p53 expression in cytologic smear collected by the *RS Balloon* in high risk individuals, and tested its yield in the cytological screening of SCCE and its precursor lesions.

Asymptomatic individuals with at least one of the following risk factors for SCCE were included: a) current alcohol drinking (more than 40 g of alcohol/day); b) tobacco smoking (>10 cigarettes/day); c) maté drinking for more than 10 years; d) previous head and neck cancer. Exclusion criteria were: a) refusal to participate in the study; b) agitation that precludes the collection of cytologic material with the *RS Balloon*; c) esophageal varices; d) progressive dysphagia; e) unstable cirrhosis; f) upper digestive tract hemorrhage in the previous 30 days; g) metabolic encephalopathy; h) previous diagnosis of Zenker's diverticulum.

Between march/2006 and december/2007, 171 individuals were recruited and submitted to exfoliative cytology with *RS Balloon*, and esophageal biopsies guided by Lugol chromoendoscopy. Cytology samples were analyzed after Papanicolaou staining and p53 immunostaining. Biopsy samples were analyzed after Hematoxylin/Eosin staining and p53 immunostaining. *RS Balloon* cytological samples were inadequate in eight (4.7%) individuals who were excluded from the analysis. The final sample consisted of 163 individuals where 150 were male (92%), with ages ranging between 28 and 84 years old (mean  $52.6 \pm 12.0$ ). Current tobacco smoke was observed in 141 patients (86.5%), with a median of 39.5 pack/year. Current alcoholism was found in 114 individuals, who consumed mainly distilled beverages, (median = 320 g of alcohol/day). Concomitant alcoholism and tobacco smoking were observed in 104

(63.8%) subjects. Daily *Maté* consumption was observed in 69.9%. Current smoking, daily *Maté* and alcohol drinking were observed in 77 individuals (47.2%). Previous head and neck cancer was the inclusion criterion in 42 patients (25.8%).

Using the *RS Balloon* was quick, easy and well tolerated by patients (no complications observed). The cytological results were: 147 normal (90.2%), 10 benign reactive cellular changes (6.1%), 3 atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) (1.8%), 1 low grade squamous intraepithelial lesion (LISL) (0.6%), 1 high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) (0.6%) and 1 squamous carcinoma (0.6%).

Lugol chromoendoscopy showed unstained areas in 65 patients (40.1%). Biopsies from normally stained areas were diagnosed as normal in 110 (67.5%) and esophagitis in 53 (32.5%) individuals. Biopsies from unstained areas were diagnosed as normal in 23 (35.4%), esophagitis in 39 (60%), high grade dysplasia in 1 (1.5%), carcinoma *in situ* in 1 (1.5%), and invasive carcinoma in 1 (1.5%).

Positive cytology (ASCUS, LSIL, HSIL, Carcinoma) collected by the *RS balloon* had a sensitivity of 66.7% (IC95% 22.0 – 93.6), a specificity of 97.5% (IC95% 96.7 – 98.0), a positive predictive value of 33.3% (IC95% 11 – 46.8), a negative predictive value of 99.4% (IC95% 98.5 – 99.9) and accuracy of 96.9% (IC95% 95.3 – 97.9) for the diagnosis of histopathological neoplastic lesions.

Immunohistochemical expression of p53 protein was analyzed in 161 individuals, out of which 38 (23.6%) were positive, with basal layer expression in 29 (76.3%), middle layer expression in 8 (21.1%) and superficial layer in 1 (2.6%).

Immunocytochemical expression of p53 protein in cytologic smear was negative in all cytology samples.

In summary, even though the *RS Balloon* collected adequate samples, the negative results of immunocytochemical expression of p53 protein suggest that its use does not contribute to improving the performance of conventional cytology of the esophagus in the screening for SCCE and its precursor lesions.

# 1. INTRODUÇÃO



O Câncer de Esôfago é uma das neoplasias malignas mais agressivas e letais do trato digestivo. Seu diagnóstico frequentemente ocorre em indivíduos com doença avançada, sendo baixas as possibilidades de tratamento curativo. Banco de dados da *International Agency for Cancer Research* (IARC) relata que, mundialmente, em 2002 ocorreram 462.117 novos casos de câncer de esôfago e que a mortalidade no mesmo ano foi de 385.892 pessoas (83,5%). Estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) sugerem que no Brasil no ano de 2008 as neoplasias do esôfago ocuparão o 8<sup>o</sup> lugar no ranking das neoplasias mais comuns, com o total de 10.550 novos casos. O Rio Grande do Sul é o estado com maior número de diagnósticos, com estimativa de contribuir com aproximadamente 10% dos casos (n= 1.510), atingindo uma incidência de 19,73 casos novos/100.000 habitantes do sexo masculino e 7,58 novos casos/100.000 habitantes do sexo feminino.

Os tipos histológicos mais comuns de câncer de esôfago são o carcinoma epidermóide (CEE) e o adenocarcinoma (AE). A incidência de AE tem aumentado em países da Europa Ocidental e nos Estados Unidos sendo mais freqüentemente diagnosticado do que o tipo epidermóide, porém em países como China, Irã, Quênia, Uruguai e Brasil o CEE permanece o tipo mais comum com mais de 80% dos casos.

As neoplasias do esôfago apresentam alta letalidade por serem diagnosticadas com mais freqüência em pacientes sintomáticos que já apresentam doença avançada. Tentativas de se diagnosticar precocemente o CEE em indivíduos sob risco têm sido realizadas como rastreamento populacional na China e no Rio Grande do Sul utilizando-se citologia coletada por balões abrasivos. Porém, tal técnica tem demonstrado que, apesar de obter amostras adequadas de células da mucosa esofágica, apresenta sensibilidade abaixo do esperado para sua aplicação na rotina. A literatura sugere que a incorporação de novos marcadores moleculares poderia qualificar a análise do material de citologia esfoliativa do esôfago.

Em estudos anteriores, Fagundes e colaboradores demonstraram que a determinação imunistoquímica da proteína p53 é um marcador encontrado em lesões precoces e avançadas do CEE. Baseado nestes dados, supomos que a incorporação de métodos de imunocitoquímica com a proteína p53 no material coletado pelo balão citológico (*Balão RS*) poderia selecionar de maneira mais acurada os indivíduos sob risco para CEE que deveriam ser submetidos à investigação endoscópica.

No presente estudo os autores se propõem a estudar a prevalência da expressão da proteína p53 em material citológico coletado pelo *Balão RS* em indivíduos sob risco para CEE, além de verificar sua acurácia diagnóstica para rastreamento desta neoplasia.

Este estudo tem como objetivo geral estudar a expressão imunocitoquímica da proteína p53 em material obtido pelo balão citológico na identificação de lesões precursoras do CEE em pacientes com fatores de risco; e como objetivos específicos: a) estudar o desempenho do balão esofágico na coleta de material para realização de exame citológico e imunocitoquímica com p53; b) comparar os achados citopatológicos com a identificação imunocitoquímica da proteína p53; c) comparar os achados da imunocitoquímica com p53 com os achados histológicos de material de biópsia coletada com auxílio da cromoendoscopia com Lugol; d) comparar a expressão imunocitoquímica da proteína p53 com sua expressão imunoistoquímica; e) estudar a expressão imunoistoquímica da proteína p53 e sua associação com os achados histopatológicos coletada com auxílio da cromoendoscopia com Lugol; f) comparar os achados citopatológicos coletados pelo *Balão RS* com os achados histopatológicos de biópsias coletadas com auxílio da cromoendoscopia com Lugol.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2.1. O Câncer de Esôfago

O câncer de esôfago apresenta dois tipos histológicos de importância clínica: o carcinoma epidermóide (CEE) e o adenocarcinoma (AE)<sup>1</sup>. O CEE tem sua origem no epitélio escamoso do esôfago e se apresenta mais frequentemente no terço médio do órgão. O CEE tem sua incidência estável ao longo dos anos e uma distribuição mundial caracteristicamente heterogênea, com zonas de alta e baixa incidências em áreas geográficas muito próximas<sup>2</sup>. As zonas de maior incidência são encontradas na região que envolve algumas províncias da China, nordeste de Irã, o litoral do mar Cáspio, planícies do Turquistão e o norte do Afeganistão. Outras áreas com média incidência são a África Oriental (Quênia, Zimbábue, Etiópia), o sul da África, o Japão, a porção setentrional do Brasil e o norte da França<sup>3</sup>.

O AE tem sua origem na metaplasia intestinal especializada do esôfago (Esôfago de Barrett), acomete frequentemente o terço distal do órgão e é mais freqüente no mundo ocidental. Sua incidência costumava ser baixa, totalizando 10% das neoplasias malignas do esôfago, porém, nos últimos 30 anos, tem aumentado nos Estados Unidos e Europa Ocidental, sendo responsável por mais de 50% dos casos nas áreas citadas<sup>4-7</sup>. A causa deste fenômeno ainda não foi totalmente elucidada, porém a alta prevalência de obesidade e doença do refluxo gastroesofágico nestes países pode ser responsável pelo aumento de casos do AE<sup>5, 8-11</sup>. Contrariando as estatísticas européias e norte-americanas descritas, Barros e colaboradores, ao descreverem a casuística de 349 neoplasias do esôfago no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) diagnosticados entre 1987 e 1996, demonstraram que o CEE persiste como o mais comum no nosso meio, totalizando 81% dos casos contra 15% de adenocarcinoma<sup>12</sup>.

## 2.2. Epidemiologia

Nesse item da revisão bibliográfica serão abordados dados epidemiológicos e os fatores de riscos gerais do carcinoma epidermóide, que é mais freqüente em nosso meio e o foco principal da avaliação desse protocolo.

O sexo masculino está associado a uma maior incidência de câncer de esôfago, numa razão de aproximadamente 2,4:1 quando comparado com o sexo feminino<sup>3</sup>. Homens têm uma chance 2 vezes maior de desenvolverem carcinoma epidermóide<sup>13</sup> e 7 vezes maior de desenvolverem adenocarcinoma de esôfago do que mulheres do mesmo grupo etário<sup>6, 14</sup>. A

idade maior do que 40 anos também aumenta a chance de desenvolvimento de câncer de esôfago, sendo a maioria dos casos diagnosticados em indivíduos com mais de 60 anos<sup>15, 16</sup>. Os fatores de risco para o câncer de esôfago estão sumarizados na tabela 1.

**Tabela 1- Fatores de risco para o Câncer do Esôfago**

<b>Fatores de Risco</b>	<b>Carcinoma Epidermóide</b>	<b>Adenocarcinoma</b>
Consumo de cigarro	+++	++
Consumo de álcool	+++	–
Esôfago de Barrett	–	++++
Doença do refluxo gastroesofágico	–	+++
Obesidade	–	++
Baixo nível socioeconômico	++	–
Deficiências nutricionais	+	–
Estenose cáustica	++++	–
Acalásia	+++	–
História de Câncer do TADS/ pulmão	++++	–
História de Câncer de Mama submetida à radioterapia	+++	+++
Ingesta de bebidas quentes	+	–
Síndrome de Plummer-Vinson	++++	–
Tilose	++++	–

Adaptado de Enzinger, 2003<sup>1</sup>

+ = aumento do risco de até 2 vezes; ++ = aumento de risco de 2 a 4 vezes; +++ = aumento de risco de 4 a 8 vezes; ++++ = aumento de risco de mais de 8 vezes; – = sem aumento de risco

A distribuição mundial do CEE é heterogênea, com zonas de alta e baixa incidência em áreas geográficas próximas, como vemos na China onde são observadas as maiores taxas de incidência global do câncer de esôfago no sexo masculino de 24 casos/100.000 habitantes<sup>15</sup>. Porém, estas taxas subestimam as estatísticas de algumas de suas províncias como Linxian, Cixian e Henan onde as estimativas no sexo masculino são de até 115 casos/100.000 habitantes e no sexo feminino são de 80 casos/100.000 habitantes<sup>17</sup>. Tal fenômeno também é

observado no Irã onde a incidência no sexo masculino na província de Golestan supera os 100 casos/100.000 habitantes, enquanto a incidência global de câncer do esôfago no sexo masculino neste país é de 17,6 casos/100.000 habitantes<sup>18</sup>.

É importante observar que as áreas de maior incidência são observadas em países em desenvolvimento, onde fatores locais, nutricionais, genéticos, tabagismo e alcoolismo têm grande influência<sup>2, 4</sup>. Os Estados Unidos e outros países desenvolvidos da Europa Ocidental (exceto a França) permanecem com incidências baixas de câncer do esôfago apesar do fenômeno recente de crescimento da incidência do adenocarcinoma<sup>2, 4</sup>.

Estatísticas brasileiras<sup>13</sup> colocam as neoplasias malignas do esôfago como o 6º câncer mais comum entre os homens e o 9º entre as mulheres com taxas de 8,3 e 2,7 casos/100.000 habitantes, respectivamente. Seu diagnóstico é frequentemente tardio e os tratamentos são geralmente paliativos. Isto gera uma média anual de 11.549 internações, além de mais de 11 milhões de reais gastos por ano somente com despesas hospitalares<sup>19</sup>. O Rio Grande do Sul é o estado com maior incidência, com estimativa para o ano de 2008 de 19,7 novos casos/100.000 entre os homens e 7,6 casos/100.000 habitantes entre as mulheres<sup>13</sup>, com franca predominância do CEE sobre o AE<sup>12</sup>. Prolla e colaboradores<sup>20</sup> observaram que algumas microrregiões do Rio Grande do Sul, como Taquara e a Fronteira com o Uruguai apresentavam taxas de mortalidade até 4 vezes maior que as microrregiões de menor incidência, refletindo o fenômeno já descrito em outros países do mundo, da heterogeneidade de incidência do CEE em áreas geograficamente próximas<sup>2, 3</sup>.

### **2.2.1. Fumo e álcool**

O tabagismo é considerado um fator de risco independente tanto para adenocarcinoma quanto para o carcinoma epidermóide de esôfago<sup>14, 21-23</sup>. Estudo realizado na cidade de Pelotas/RS<sup>24</sup> demonstra que o risco atribuível ao tabagismo ativo como causa de câncer do esôfago foi de 54%. Seu papel na carcinogênese esofágica ainda não está bem esclarecido, mas parece estar relacionado com a deglutição de compostos nitrogenados do tabaco acumulados na saliva<sup>25</sup>. A presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na fumaça do cigarro parece estar envolvida na patogênese do câncer do esôfago<sup>26</sup>.

Diversos estudos relatam relação direta do risco de neoplasia com a quantidade de cigarros fumados e o tempo de exposição ao tabaco<sup>25, 27-33</sup>. Estudos recentes de Lubin<sup>34</sup> e

Pandeya<sup>21</sup>, que analisaram o impacto do tabagismo em diferentes neoplasias relacionadas ao cigarro, sugerem que o tempo de exposição prolongada ao hábito do tabagismo parece ter mais importância no surgimento de câncer que o número absoluto de cigarros.

A ingestão abusiva de bebidas alcoólicas, principalmente destiladas, foi associada a risco aumentado de carcinoma epidermóide de esôfago<sup>23, 32</sup>, mas não de adenocarcinoma<sup>22, 35</sup>. Estudo clássico realizado na França por Tuyns e colaboradores<sup>36</sup> demonstrou que tal risco é potencializado pelo tabagismo concomitante. Tal conclusão foi confirmada em estudos posteriores<sup>18, 23, 27, 29, 31, 37-39</sup>. Em nosso meio o uso concomitante de álcool e cigarro determinou aumento do risco de desenvolvimento de CEE em 75 vezes<sup>31</sup>.

O mecanismo pelo qual o álcool faz aumentar a incidência de CEE é desconhecido. Entretanto, foi postulado que o álcool facilita a esofagite, pode contribuir com má nutrição e aumenta a exposição aos carcinogênicos, talvez por mediar os níveis de citocromo P-450 na mucosa esofágica<sup>40</sup>. Estudos recentes têm descrito polimorfismos na álcool-desidrogenase e na aldeído-desidrogenase em populações orientais que desenvolveram CEE<sup>41</sup>. A análise de atividade das enzimas sugere que a álcool-desidrogenase apresenta atividade aumentada e gera acetaldeído na mucosa esofágica. Por outro lado, a aldeído-desidrogenase apresenta menor atividade, metabolizando mais lentamente a grande quantidade de acetaldeído que fica em contato com a mucosa esofágica, aumentando a possibilidade de dano.

É relevante a constatação de que a abstenção do cigarro e álcool parece diminuir a chance de desenvolvimento de câncer do esôfago mesmo em indivíduos previamente expostos<sup>42, 43</sup>.

Tanto o alcoolismo quanto o tabagismo têm sido apontados como grandes fatores de risco para CEE, no entanto é digno de observação que a exposição a tais agressores é mais relevante em zonas de baixa e moderada incidência do que em zonas de alta incidência como a China<sup>27, 44</sup> e o norte do Irã<sup>18, 45</sup>, onde fatores genéticos e ambientais podem ter mais impacto.

### **2.2.2. Malignidade preexistente**

As neoplasias malignas do trato aéreo-digestivo superior (TADS) e pulmão são fatores de risco para desenvolvimento de CEE provavelmente por compartilharem os mesmos potenciais fatores etiológicos: alcoolismo e tabagismo<sup>38, 46-50</sup>. Baseada nos dados de aumento

de prevalência de CEE em pacientes com diagnóstico prévio de neoplasias da TADS, a literatura tem mostrado estudos que reforçam a necessidade de rastreamento de CEE nestes pacientes<sup>51-53</sup>.

A associação de radioterapia e neoplasias do TADS, mama ou tórax aumenta em até 5 vezes o risco de neoplasia de esôfago no grupo tratado, principalmente a partir de 10 anos após a exposição a tal modalidade terapêutica<sup>54, 55</sup>.

### **2.2.3. Consumo de bebidas quentes**

Bebidas quentes, como o chimarrão e o chá dos países asiáticos foram implicadas como fatores de risco pela alta temperatura de ingestão e/ou por carcinógenos nelas contidas, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos recentemente detectados na erva mate e na urina de consumidores de chimarrão<sup>26, 56-58</sup>.

Dados epidemiológicos sugerem que o consumo diário de mais de 1 litro de chimarrão quente por dia aumenta o risco de CEE em mais de 2,5 vezes, mesmo quando controladas as variáveis alcoolismo e tabagismo<sup>57, 59, 60</sup>. Tal risco que não se reproduziu com o mate frio tomado no Paraguai<sup>59</sup> concorda com dados experimentais que consideraram que temperaturas maiores de 60°C são promotoras de neoplasia de esôfago<sup>61</sup>.

Estudos realizados na região de Taquara<sup>62</sup> e Pelotas<sup>63</sup> (RS) demonstram que as populações destas cidades estão expostas a grandes volumes e altas temperaturas de chimarrão, com média de consumo de chimarrão de mais de 1,2 litros e com temperatura média da água maior que 63°C.

### **2.2.4. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP)**

Os HAP são considerados carcinógenos para a mucosa esofágica<sup>64-66</sup>. Os HAP são encontrados na fumaça do cigarro e são resultado da queima do carvão e da madeira<sup>67</sup>. A exposição a este composto pode ocorrer por inalação, deglutição de compostos do tabaco/fumaça acumulados na saliva, ou por alimentos preparados em fornos a lenha como acontece com a população de zonas de alto risco<sup>68</sup> e com a erva mate e o churrasco gaúchos<sup>56</sup>. Fagundes e colaboradores<sup>26</sup>, em estudo recente realizado em indivíduos sadios em Santa Maria/RS, demonstraram que os níveis urinários de glicuronato de 1-hidroxipireno (metabólito dos HAP) se encontravam elevados em indivíduos tabagistas e tomadores de chimarrão, não havendo diferença nos níveis encontrados nos expostos a qualquer um dos



hábitos. Cabe ressaltar que os níveis encontrados são equivalentes aos níveis aferidos na província de Linxian na China e no Norte do Irã, e são significativamente mais altos que os níveis encontrados em indivíduos norte-americanos não tabagistas.

### **2.2.5. Aspectos nutricionais**

Carências nutricionais de vitaminas A, D, riboflavina, selênio têm sido observadas em áreas da China e Irã<sup>69</sup>. A ingestão de frutas e verduras tem sido implicada como fator protetor para o desenvolvimento de câncer de esôfago<sup>70</sup>, enquanto que dietas ricas em carnes gordurosas e carboidratos estão sendo consideradas fatores de risco<sup>71</sup>.

### **2.2.6. Fatores socioeconômicos e história familiar**

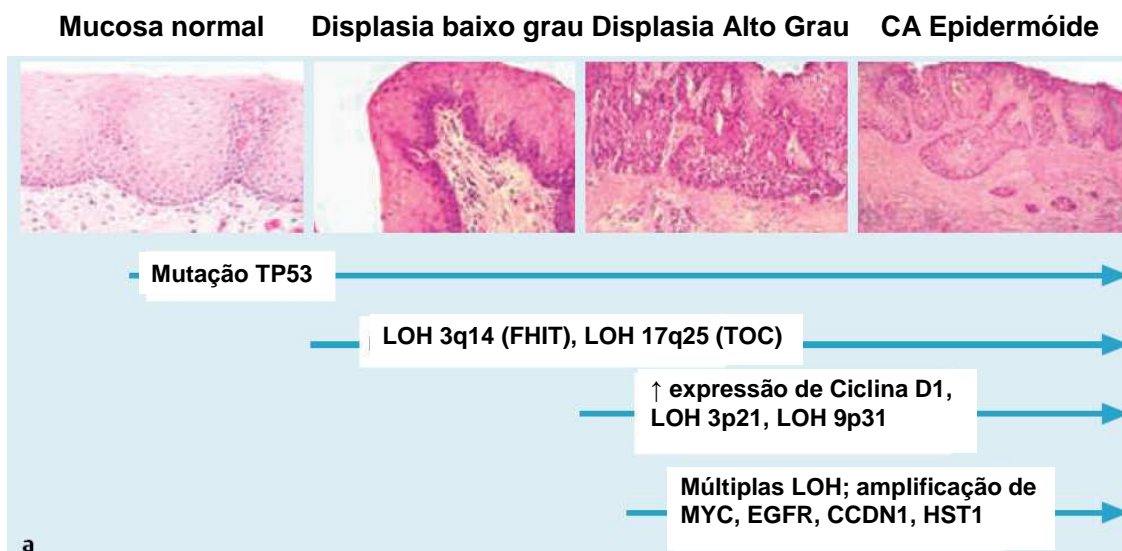
Baixo nível socioeconômico representado por baixa renda familiar, muitos habitantes na mesma casa<sup>27, 44</sup> e menor número de peças dentárias<sup>72, 73</sup> tem sido associado a maior risco de desenvolvimento de CEE.

Morita e colaboradores<sup>74</sup> descreveram que indivíduos com história familiar de câncer de esôfago e TADS têm um risco 2,6 vezes maior de apresentarem câncer de esôfago, além de apresentarem o diagnóstico 6 anos mais cedo que pacientes com CEE sem história familiar. Garavello e colaboradores<sup>75</sup>, em estudo de casos e controles, descreveram que história familiar de CEE foi fator de risco independente para CEE (razão de chances= 3,2; IC95%= 1,7 – 6,2). A história familiar de CEE em indivíduos com alcoolismo e tabagismo ativos aumenta a chance de CEE em 107 vezes (IC95%= 13,0 – 880,2). Também houve aumento de risco para indivíduos com história familiar de neoplasia do TADS e estômago.

## **2.3. Aspectos moleculares**

O desenvolvimento do câncer do esôfago tem sido amplamente estudado, porém sua carcinogênese ainda não foi completamente esclarecida. No entanto, o papel da interação dos múltiplos carcinógenos envolvidos e o genoma de cada indivíduo apresenta reflexos moleculares de agressão ao DNA, que envolvem alterações de mecanismos que incluem genes supressores, oncogenes e genes promotores de apoptose<sup>76</sup>. Tais reflexos moleculares já estão presentes mesmo em mucosa morfológicamente normal, e se acumulam ao longo da sua evolução para o câncer (Figura 1)<sup>77</sup>. A identificação das alterações moleculares nos tecidos

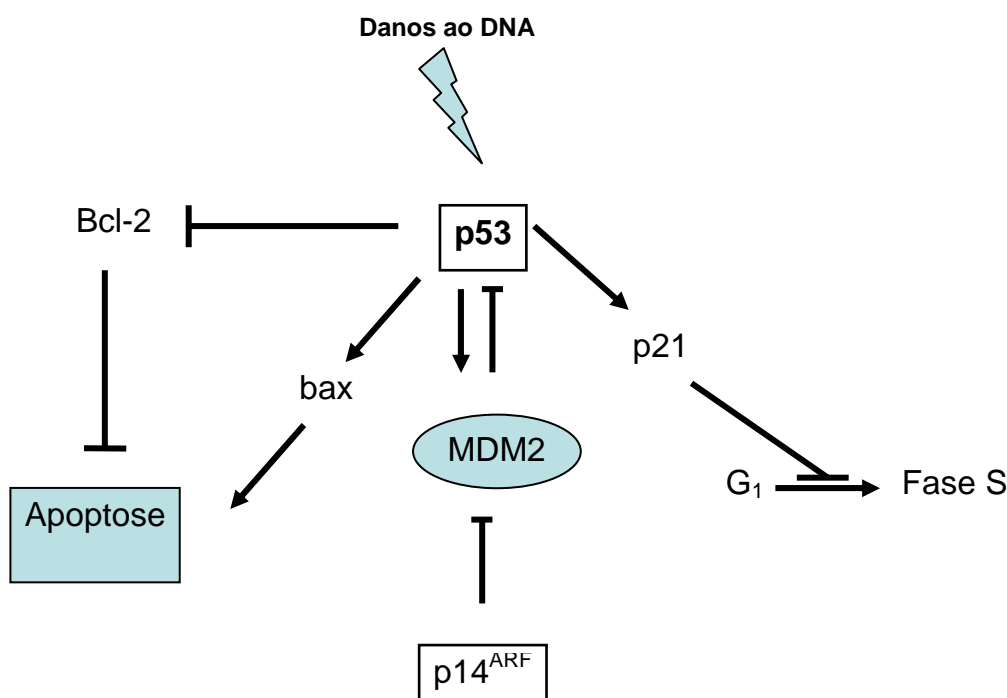
com técnicas de biologia molecular tem sido cada vez mais estudada com intuito de se obter melhora na prevenção, diagnóstico, prognóstico e tratamento de várias neoplasias<sup>78</sup>.



**Figura 1- Seqüência proposta de eventos genéticos para o desenvolvimento do carcinoma epidermóide do esôfago<sup>77</sup>:** É importante observar que algumas das alterações moleculares são identificadas em epitélio morfologicamente normal ou com alterações inflamatórias (esofagite). LOH= *loss of heterozygosity* (perda da heterozigosidade); EGFR= *epidermal growth factor receptor* (receptor do fator de crescimento epidérmico); TP53= gene *p53*.

### 2.3.1. Alterações no gene *p53* e sua repercussão na carcinogênese do CEE

Entre os genes de supressão tumoral o gene *p53*, localizado no cromossomo 17q, tem papel central no controle da divisão celular, codificando a proteína *p53* que é expressa quando são detectadas alterações estruturais no DNA. Ao detectar tais alterações a proteína *p53* se liga ao DNA e estimula a expressão dos genes *p21*, *bax*, *PIG3*, que servem como efetores da proteína *p53*, interrompendo o ciclo de divisão celular na transição da fase de transição G1/S e G2/M e promovendo o reparo do DNA ou apoptose das células lesadas (Figura 2)<sup>79-81</sup>.



**Figura 2- Esquema simplificado das vias da proteína p53<sup>89</sup>:** as setas ( → ) indicam indução de atividade ou da transcrição das proteínas envolvidas na via da proteína p53, enquanto as barras ( —| ) indicam inibição da transcrição ou da atividade das proteínas

Perda da função normal de p53 pode ocorrer por 2 mecanismos: a) alterações no gene *p53* que determinam a ocorrência de proteína alterada e resultam na perda da propriedade da proteína p53 em formar tetrâmeros que se ligam ao sítio de ligação da p53 (p53-PBS) promovendo expressão dos seus efetores; b) inativação funcional da proteína p53 por formação de complexos protéicos com oncoproteínas virais ou celulares, ou por deslocamento da proteína para o citoplasma<sup>76</sup>.

Mutações somáticas no gene *p53* ocorrem em aproximadamente 50% das neoplasias malignas humanas, e em especial no esôfago<sup>82, 83</sup>. Suas mutações ocorrem mais comumente nos éxons 5 e 8 nos códons 175, 248 e 273. As alterações genéticas no gene *p53* ocorrem por 5 mecanismos<sup>76</sup>:

- 1) Mutações *missense*: é a mais freqüente das alterações genéticas dos cânceres humanos, representando mais de 50% das alterações. É comum em neoplasias de cólon, cérebro, pulmão, mama, pele, esôfago e bexiga. O tipo de mutação mais freqüente é a mutação de ponto na sequência de código do gene *p53*;

- 2) Mutações *nonsense*: encontrada em 5% dos carcinomas de pulmão, CEE e outros;
- 3) Rearranjos genéticos: frequentemente associados com osteosarcomas, sarcomas de tecidos moles, linfomas e leucemias mielóides crônicas;
- 4) Perdas alélicas: perda de um ou ambos os alelos podem ser observadas em neoplasias de cólon, mama, esôfago, linfomas e osteossarcomas;
- 5) Mutações em linhas germinativas: associadas à síndrome de Li-Fraumeni e a um pequeno número de pacientes com sarcomas, leucemias em crianças e câncer de mama.

A inativação funcional da proteína p53 pode ocorrer pelos mecanismos abaixo citados:

- 1) Ligação à oncoproteína E6 do HPV (papilomavirus humano): ocorre em carcinomas ligados ao HPV, particularmente o câncer de colo de útero;
- 2) Ligação ao EBNA-5 e BZLF1 do vírus Epstein-Barr (EBV) envolvendo o Linfoma de Burkitt
- 3) Ligação à proteína HBx encontrado nos carcinomas hepatocelulares primários associados à infecção pelo Vírus da Hepatite B;
- 4) Ligação à oncoproteína MDM2: a perda do p14 ou amplificação da MDM2 causa, por ligação direta da proteína p53 com a oncoproteína MDM2, sua inativação e degradação. Encontrado em sarcomas;
- 5) Polimorfismo da MDM2 e interação com p53: aumenta inativação da p53<sup>84</sup>
- 6) Seqüestro ou deslocamento da proteína p53 no citoplasma celular: até um terço dos carcinomas de mama e um pequeno número de carcinomas colo-rectais com gene *p53* íntegro, tem a proteína localizada no citoplasma das células malignas onde ela é incapaz de exercer sua função.

As alterações acima descritas parecem contribuir de maneira importante na carcinogênese humana. As mutações no gene *p53*, bem como o acúmulo de sua proteína alterada na mucosa esofágica, têm sido relatadas tanto nas lesões avançadas<sup>82, 85, 86</sup> como em estágios precoces na carcinogênese esofágica<sup>87, 88</sup>. Sua expressão genética e imunoistoquímica tem sido demonstrada com progressivo aumento com a evolução dos

estágios seqüenciais de mucosa normal → esofagite → displasia → carcinoma (Figura 1), em indivíduos expostos a fatores de risco para CEE<sup>82, 88, 89</sup>.

## **2.4. Lesões precursoras e diagnóstico precoce**

O diagnóstico tardio das neoplasias de esôfago costuma ser a regra. Em pacientes sintomáticos a detecção de lesões já avançadas determina uma evolução clínica desfavorável, com taxas de sobrevivência limitadas<sup>2</sup>. O diagnóstico precoce tem sido tentado com aplicação de métodos que identifiquem lesões precursoras antes que a presença de neoplasia estabelecida seja observada.

As lesões histopatológicas precursoras e sua capacidade evolutiva foram determinadas por Wang e colaboradores<sup>90</sup> em estudo observou que as alterações estruturais que apresentam risco aumentado de transformação maligna são as displasias de baixo, moderado e alto grau e os carcinomas *in situ*, apresentando riscos relativos, respectivamente, de 2.9, 9.8, 28.3, 34.4. Os riscos relativos ascendentes demonstram um aumento progressivo na probabilidade de evolução destas lesões para o carcinoma invasor e sugerem que as alterações histológicas acima citadas devam realmente ser consideradas lesões precursoras para o CEE. No entanto, estas lesões são encontradas em indivíduos assintomáticos e a sua detecção só é possível em programas de rastreamento ou como achado incidental em exames endoscópicos. Portanto é de suma importância que estratégias de avaliação dos indivíduos assintomáticos sob risco sejam realizadas de maneira sistemática, com métodos custo-efetivos, e que atinja populações.

Métodos como a cromoendoscopia com Lugol<sup>31, 51, 52, 83, 91, 92</sup> e esfregaço citológico com balão esofágico<sup>91, 93-98</sup> têm por finalidade coletar material esofágico diagnosticando casos de displasia ou atipias celulares, respectivamente, buscando o diagnóstico de lesões pré-malignas, possibilitando melhores condições terapêuticas e prognósticas para os pacientes sob risco para neoplasias esofágicas.

### **2.4.1. Rastreamento com balão citológico**

A análise do esfregaço citológico da mucosa esofágica tem sido um dos métodos testados para atingir o diagnóstico em fases iniciais da doença<sup>99</sup>. No final da década de 1950

foi desenvolvida na China uma técnica de coleta de material citológico do esôfago com a utilização de um balão revestido por rede de tecido ligado a ponta de um cateter plástico<sup>97</sup>. Tal conjunto era deglutido e tracionado gentilmente exfoliando o esôfago e obtendo células da mucosa esofágica. Com este material eram realizados esfregaços em lâminas de vidro e corados pelo método de Papanicolaou. Os balões eram reutilizados em dezenas de pacientes. Sua execução era fácil, seu preço era baixo e a acurácia do exame citológico parecia boa, porém naquele momento ainda não havia consenso na classificação citológica a ser empregada, sendo comum a discordância diagnóstica entre os citopatologistas chineses e norte-americanos<sup>98</sup>.

No final da década de 1980, um grupo de médicos e engenheiros do HCPA desenvolveu um cateter balão para coleta de material esofágico baseado no conceito balão chinês. Tal balão era de uso único, continha ranhuras que deixavam sua superfície abrasiva facilitando a coleta de células esofágicas e foi denominado *Balão RS*. Em Taquara/RS, Barros e colaboradores<sup>100</sup>, utilizando o *Balão RS* (Figura 3), encontraram atipias de baixo grau, ao exame citopatológico, mais freqüentemente em pacientes sob risco, quando comparados com grupos de menor risco. A técnica se mostrou de fácil execução, foi bem tolerada pelos pacientes e permitiu coleta adequada de material celular. Entretanto, o exame citopatológico do material colhido apresentou baixa sensibilidade quando comparados com os resultados do exame histopatológico, além de apresentar grande variação intra e interobservador.



**Figura 3- O Balão RS:** O Balão RS desinflado (abaixo) e após insuflação com 20 ml de ar (acima).

Tais achados de baixa concordância da citologia com a histologia foram também relatados por Jacob e colaboradores<sup>93</sup>. Estes mesmos autores observaram que, ao avaliar etilistas e tabagistas nos Estados Unidos, o esfregaço com balão citológico não acrescentou vantagens no rastreamento do CEE. A diferenciação entre inflamação e displasia foi a maior dificuldade do estudo, causando grande número de falsos positivos. Tal dado pode se dever a baixa incidência de neoplasia e alta prevalência de esofagite na população estudada.

Com o seguimento de uso de citologia esfoliativa e o aprimoramento da avaliação do esfregaço cervical, passou a ser consensual que a classificação de Bethesda de 1988 e suas atualizações posteriores (2001)<sup>101</sup> seriam as classificações universais a serem seguidas e as mesmas têm sido empregadas em estudos subsequentes.

Outros estudos realizados na China pelo grupo norte-americano liderado por Dawsey com balão citológico chinês, esponja<sup>95</sup> e um novo balão mecânico<sup>94</sup> demonstraram a adequação das amostras coletadas, porém apresentaram baixa sensibilidade dos achados citológicos em relação à histologia (47 e 46%, respectivamente). Estudos de grupos chineses

descrevem boa acurácia e predição de prognóstico, porém não foram realizadas endoscopias em todos os pacientes para aferição de sensibilidade<sup>96, 102</sup>. Pan e colaboradores<sup>94</sup>, em artigo acima citado, sugerem que critérios citológicos específicos para a mucosa esofágica ou a associação destes com marcadores imunocitoquímicos deveriam ser estudados a fim de facilitar a interpretação dos dados citológicos com critérios mais objetivos, favorecendo a correta diferenciação entre inflamação, displasia e neoplasia esofágicas.

#### **2.4.2. Cromoendoscopia**

A cromoendoscopia consiste na aplicação de corantes em diferentes áreas do trato gastrointestinal (TGI) e proporciona uma maior acurácia no diagnóstico de muitas doenças gastrointestinais, acrescentando uma variedade de novos achados e informações que não podem ser obtidas pela endoscopia convencional.

O corante mais amplamente utilizado para rastreamento de lesões esofágicas tem sido a solução de Lugol 1 – 5%, e pode ser considerado o método de escolha para complementação da investigação desencadeada pelo esfregaço citológico com balão na suspeita de CEE. Essa solução iodada fica impregnada em áreas de epitélio normal que é rico em glicogênio, que por sua vez é ávido por iodo e isto determina coloração marrom da mucosa esofágica. Nas áreas com inflamação, displasia ou carcinoma epidermóide, que são carentes de glicogênio, não há impregnação pelo iodo e estas áreas não coradas orientam as biópsias para diagnóstico histológico, aumentando a chance de diagnóstico precoce de lesões neoplásicas<sup>31, 91, 92</sup>. A solução de Lugol é usada com bom rendimento para avaliação de pacientes com fatores de risco como neoplasia do trato aerodigestivo<sup>51-53</sup>, alcoolismo e tabagismo<sup>31</sup>. Em estudo recente realizado na Universidade de São Paulo (USP), Hashimoto e colaboradores<sup>52</sup> demonstraram que a cromoendoscopia com Lugol 2% apresentou boa acurácia na detecção de neoplasias intraepiteliais e invasivas do esôfago em pacientes com tumores primários de cabeça e pescoço. Foi observado que áreas descoradas ou hipocoradas de menos de 5 mm de diâmetro não apresentaram nenhum caso de neoplasia, e que houve aumento da incidência de alterações neoplásicas com o aumento progressivo de diâmetro das áreas Lugol negativas. Outro artigo recente de Dubuc<sup>53</sup> reforça tal achado em pacientes com diagnóstico prévio de neoplasia de TADS e pulmão.

#### **2.4.3. Detecção de mutações e expressão imunoistoquímica da proteína p53**



Wang e colaboradores<sup>103</sup>, em estudo publicado em 1993, observaram a expressão imunistoquímica da proteína p53 em material proveniente de esofagectomias realizadas em zona de alto prevalência de CEE na China, tanto em epitélio normal quanto em áreas com displasia e carcinoma. Em 1994, o mesmo grupo<sup>89</sup> estudou as mutações no gene *p53* e observou que elas poderiam ser detectadas já em lesões precoces e sua frequência aumentava à medida que as lesões evoluíam. Estes achados têm sido frequentemente reproduzidos na literatura<sup>80, 84, 86, 104, 105</sup>.

A observação de que a mutação do gene *p53* expressa uma proteína com meia vida mais longa, permanecendo nos tecidos em concentrações mais elevadas e por períodos mais prolongados, possibilitou a realização de estudos com imunistoquímica do tecido esofágico. Parenti e colaboradores<sup>106</sup>, analisaram a expressão imunistoquímica da proteína p53 em peças de esofagectomia e observaram que a positividade aumentava de acordo com o grau de lesão anatomopatológica. Fagundes e colaboradores<sup>88</sup>, no ano de 2001, em avaliação endoscópica de indivíduos sob risco de CEE, descreveram que a expressão imunistoquímica da proteína p53 era encontrada em alterações precoces da mucosa e que a probabilidade de apresentar expressão da p53 era maior à medida que as lesões histológicas se tornavam mais acentuadas. A imunistoquímica p53 foi mais frequentemente positiva em pacientes que apresentavam áreas descoradas à cromoscopia com Lugol. Observação posterior dos mesmos autores<sup>87</sup> demonstrou que indivíduos assintomáticos sem fatores de risco para CEE raramente apresentavam expressão imunistoquímica da proteína p53 na mucosa esofágica. Ohbu<sup>82</sup> também observou o aumento da frequência de positividade da imunistoquímica p53 em lesões mais avançadas. Kaneko e colaboradores<sup>83</sup> também observaram, em população japonesa, a associação de áreas descoradas a cromoendoscopia com Lugol com a presença de mutações *missense* do gene *p53*.

A avaliação da expressão imunistoquímica da proteína p53 em biópsias de Esôfago de Barrett tem sugerido que a positividade da proteína p53 no momento do diagnóstico da metaplasia intestinal pode indicar quais pacientes evoluirão para adenocarcinoma de esôfago<sup>107, 108</sup>. Não há estudos deste tipo em CEE nas bases de dados da literatura médica.

Apesar do vasto material publicado sobre expressão imunistoquímica da proteína p53 em biópsias ou peças cirúrgicas, não há estudo nas bases de dados da literatura médica que

tenha avaliado a expressão da proteína p53 em amostras de citologia esfoliativa do esôfago. Estudo em material citológico de líquidos serosos e punção com agulha fina de diferentes neoplasias<sup>109</sup> e outro com neoplasias de mama<sup>110</sup> e imunexpressão da proteína p53 em material citológico foram realizados e demonstram que a técnica é factível e contribui na confirmação de casos duvidosos e no esclarecimento diagnóstico de casos previamente considerados normais, com melhora diagnóstica sobre a avaliação citológica convencional.

Poucos estudos avaliam a expressão imunocitoquímica da proteína p53 no esôfago e TADS. Tsai e colaboradores<sup>111</sup> avaliaram a expressão da proteína p53 em escovado de esôfago de Barrett e observaram que o método era equivalente a imunistoquímica de biópsias da mesma região. Um único estudo contempla a avaliação molecular de mutação do gene *p53* em material citológico coletado por esponja para o diagnóstico de neoplasias do TADS<sup>112</sup>. Foram utilizadas técnicas de cromatografia líquida de alta performance e a reação da cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa de mutações do gene *p53*, sendo observado melhora no diagnóstico de TADS sobre a citopatologia convencional.

### **3. OBJETIVOS**

### 3.1. Objetivo geral

Estudar a expressão imunocitoquímica da proteína p53 em material obtido pelo *Balão RS* em indivíduos com fatores de risco para CEE.

### 3.2. Objetivos específicos:

- a) Estudar o desempenho do *Balão RS* na coleta de material para realização de exame citológico e imunocitoquímico com p53;
- b) Comparar os achados citopatológicos com a identificação imunocitoquímica da p53;
- c) Comparar os achados da imunocitoquímica com p53 com os achados histológicos de biópsias coletadas com auxílio da cromoendoscopia com Lugol;
- d) Comparar a expressão imunocitoquímica da proteína p53 com sua expressão imunoistoquímica;
- e) Estudar a expressão imunoistoquímica da proteína p53 e sua associação com os achados histopatológicos em biópsias coletadas com auxílio da cromoendoscopia com Lugol;
- f) Comparar os achados citopatológicos coletados pelo *Balão RS* com os achados histopatológicos de biópsias coletadas com auxílio da cromoendoscopia com Lugol;
- g) Estudar a acurácia da citologia na identificação de displasia/carcinoma;
- h) Estudar a acurácia da imunoexpressão citológica de p53 na identificação de displasia/carcinoma.

## **4. METODOLOGIA**

#### 4.1. Delineamento

O delineamento utilizado para este estudo foi um corte transversal, onde o fator de estudo foi a citologia esofágica tendo como desfecho a expressão imunocitoquímica da proteína p53 comparada com sua expressão imunoistoquímica e o diagnóstico histológico.

Dentro do mesmo delineamento foi estudada a efetividade do *Balão RS* em: a) coletar amostra citológica adequada da mucosa esofágica; b) identificar carcinoma epidermóide do esôfago e lesões precursoras (displasia) através da citologia. O desfecho esperado foi o diagnóstico anatomopatológico de displasia/carcinoma epidermóide do esôfago

#### 4.2. Seleção de pacientes

Foram estudados indivíduos maiores de 18 anos, capazes de assinar termo de consentimento livre e esclarecido, que apresentavam fatores de risco para carcinoma epidermóide do esôfago. Os participantes foram recrutados em grupos de apoio a alcoolistas da cidade de Porto Alegre (Alcoólicos Anônimos), na Unidade de Dependentes Químicos do Hospital Psiquiátrico do HUSM, na Equipe de Álcool e Drogas da Unidade de Psiquiatria do HCPA, e nos ambulatórios de Otorrinolaringologia e de Doenças do Esôfago do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os critérios de inclusão e exclusão foram os seguintes:

##### 4.2.1. Inclusão:

Foram incluídos indivíduos que apresentavam um ou mais dos fatores de risco para carcinoma epidermóide do esôfago abaixo listados:

- a) consumo de mais de 40 gramas de etanol/dia por mais de 10 anos;
- b) consumo de mais de 10 cigarros/dia por mais de 10 anos;
- c) Uso diário de chimarrão por mais de 10 anos;
- d) Diagnóstico prévio de carcinoma epidermóide do TADS;

##### 4.2.2. Exclusão:

- a) recusa em participar do estudo;
- b) agitação psicomotora que impossibilitasse a passagem do balão e coleta de material;
- c) varizes esofágicas;

- d) hepatopatia crônica descompensada com classificação de Child-Pugh B ou C;
- d) hemorragia digestiva alta nos últimos 30 dias;
- e) sinais de encefalopatia de qualquer etiologia;
- f) diagnóstico de divertículo de Zenker;

#### 4.3. Coleta de dados

Os pacientes se apresentaram ao Centro Cirúrgico Ambulatorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) ou ao Serviço de Endoscopia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) em jejum de no mínimo 6 horas, receberam explicações sobre os procedimentos do estudo e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). Os pacientes responderam a questionário para coleta de dados clínicos e demográficos relevantes (Anexo 2) e foram submetidos ao protocolo de pesquisa conforme fluxograma descrito abaixo (Figura 4):

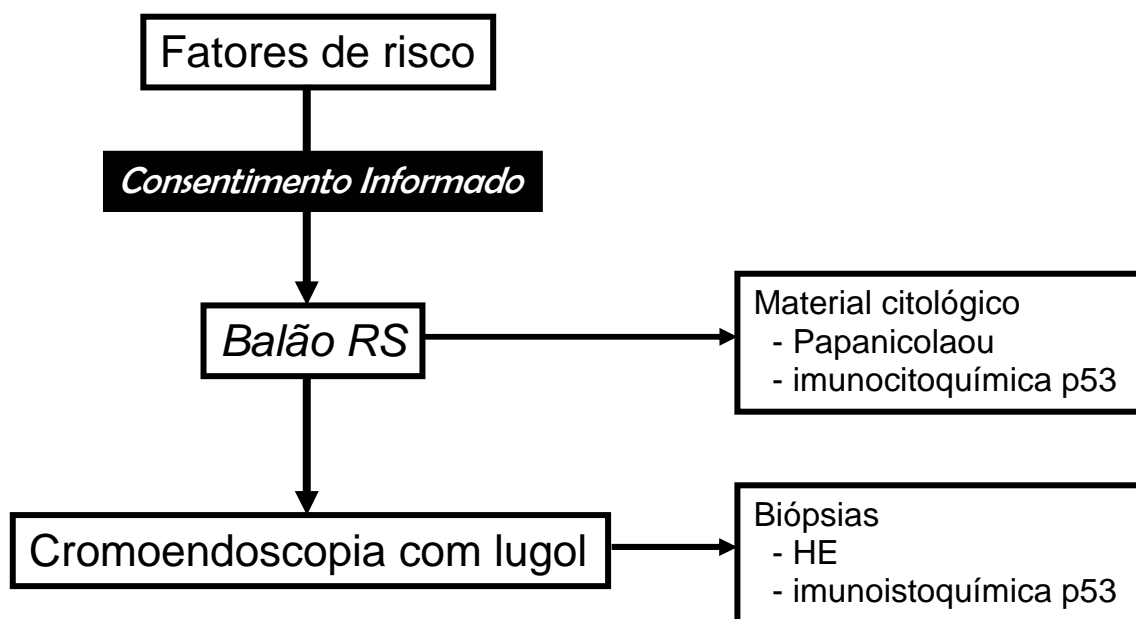


Figura 4- Fluxograma do estudo

##### 4.3.1. Esfregaço citológico:

O material citológico do esôfago foi coletado com auxílio do *Balão RS*, que consiste de um balão de silicone com aproximadamente 0,6 cm de diâmetro e 2 cm de extensão ligado à sonda de 65 cm com lúmen único conectado a uma seringa descartável de 20 ml (Figura 3). É importante observar não há tecido ou malha metálica no balão, e que as ranhuras presentes no

balão são responsáveis pela obtenção do material celular do esôfago. O procedimento de abrasão citológica do esôfago foi realizado com os pacientes sentados. Após a aplicação de 2 jatos de lidocaína spray 10%, o cateter-balão foi introduzido pela boca até a orofaringe e os indivíduos eram orientados a deglutirem o conjunto, que era gentilmente introduzido no esôfago até a cárdia, aproximadamente aos 45 cm abaixo da arcada dentária superior (ADS). Depois de inflado com 20 ml de ar o *Balão RS* com diâmetro de 2,5 cm era tracionado lentamente e desinflado parcialmente se alguma resistência fosse encontrada. Quando o balão alcançava o esfíncter esofágico superior (aproximadamente aos 15 cm da ADS) era desinflado completamente e retirado com o cuidado de evitar sua contaminação com secreção oral.

Após a retirado, o balão era deslizado sobre 3 lâminas de vidro silanizadas seguindo-se distensão do material com auxílio de outra lâmina de vidro. Duas lâminas eram depositadas em recipiente contendo álcool 96% e enacaminhadas para preparação com o método de Papanicolaou. A restante, mantida à fresco, era destinada para imunocitoquímica com anticorpo anti-p53. O balão era agitado em frasco de formol para estocagem dos restos celulares e posterior confecção de bloco de parafina (*cell block*).

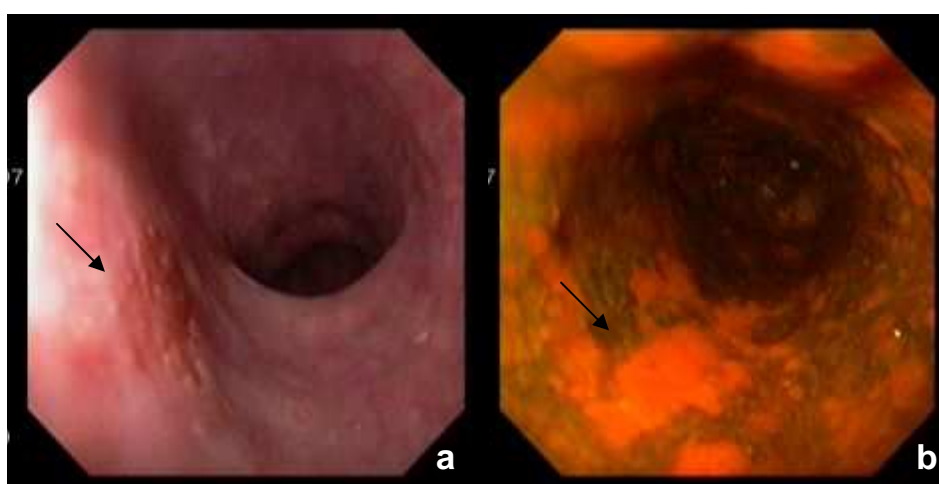
#### **4.3.2. Cromoendoscopia com Lugol**

Foram utilizados vídeo-endoscópios Olympus (GIF-Q150) e Fujinon (EG350HR), pinças de biópsia endoscópica (K2416RP e K2418HP, Fujinon) e cânula de teflon (Olympus PW-1LE). Após a retirada do *Balão RS* os pacientes eram posicionados em decúbito lateral esquerdo e sedados com midazolam 0,007 mg/kg e petidina (20 – 60 mg) endovenosas. Após a inspeção minuciosa do esôfago, estômago e duodeno, a extremidade distal do endoscópio era colocada no esôfago proximal, aos 20 cm da ADS, e a cânula de teflon introduzida pelo canal de trabalho. Vinte a 60 ml da solução de Lugol 3% (12 g I + 24 g KI em 1000ml de água) eram instiladas pela cânula enquanto o endoscópio era introduzido lentamente até a junção esofagogástrica, de modo que toda a mucosa esofágica ficasse recoberta pela solução iodada. O endoscópio era novamente tracionado até o esôfago proximal e era realizada nova inspeção do órgão. Áreas com alterações macroscópicas do esôfago ou áreas nitidamente descoradas com diâmetros igual ou maior de 5 mm foram biopsiadas (Figura 5). Foram coletadas biópsias de áreas normalmente coradas aos 25 e 30 cm da ADS em todos os indivíduos estudados. As alterações



da mucosa esofágica e as áreas biopsiadas foram registradas no mapa esquemático do esôfago (Anexo 3).

Os fragmentos de biópsia foram estendidos em papel filtro, com a face cruenta em contato com o papel para proporcionarem cortes perpendiculares na confecção das lâminas, e processados para coloração pelo método da Hematoxilina/Eosina (HE).



**Figura 5- Endoscopia convencional e cromoendoscopia com Lugol:** a) Esofagoscopia convencional com área deprimida (seta); b) Cromoendoscopia com Lugol demonstrando a área iodo negativa coincidente com área deprimida, realçando tal área (seta). O diagnóstico anatomopatológica desta área foi de displasia de alto grau.

#### 4.4. Exame citológico - critérios

O material coletado pelo balão foi espalhado nas lâminas pela técnica do esfregaço ou do deslizamento. As lâminas foram colocadas em álcool 96% e coradas pelo método de Papanicolaou. O material coletado foi considerado adequado quando mais de 75% das células dispostas nas lâminas apresentavam condições de análise. As lâminas foram avaliadas por dois citopatologistas experientes (JCP, ARD) e os achados citológicos de células escamosas foram classificados nas seguintes categorias, adaptados do Sistema Bethesda (Figura 6)<sup>94, 101</sup>:

- a. *Normal* – ausência de alterações;
- b. *Alterações celulares reativas* – núcleo de tamanho normal ou aumentado até  $2^{1/2}$  o tamanho de uma célula escamosa intermediária, sem aumento da cromatina, uniformemente

distribuída ou acumulada ao longo da membrana nuclear. A membrana nuclear lisa e nucléolos não visualizados. Halo perinuclear irregular e paraceratose também podem ser observados. Células usualmente em camadas achatadas e coesas;

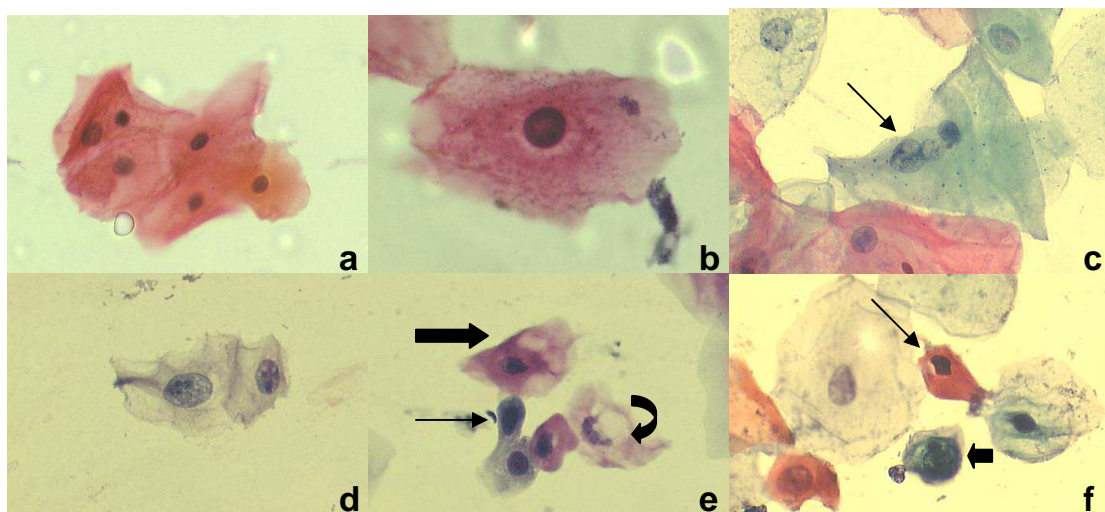
c. *Alterações escamosas de significado indeterminado – ASCUS* – núcleos com aproximadamente  $2^{1/2}$  a 3 vezes o tamanho da área do núcleo de uma célula escamosa intermediária normal. Proporção núcleo/citoplasma ligeiramente aumentada. Hiperchromasia nuclear mínima e irregularidade na distribuição da cromatina ou da forma nuclear;

d. *Lesão intra-epitelial de baixo grau – LSIL* – Células isoladas ou em grupos. Tamanho celular global grande, com citoplasma abundante e bem definido. Núcleo pelo menos 3 vezes maior que o núcleo de uma célula intermediária normal, resultando num aumento da relação núcleo/citoplasma. Graus variáveis de hiperchromasia nuclear acompanhados por variações no tamanho nuclear, número e formato, com binucleação ou multinucleação. Células usualmente únicas com núcleo aumentado e de tamanho variável. Cromatina aumentada e distribuída uniformemente, porém com aspecto granular variando de fino a grosseiro. Membrana nuclear lisa ou ligeiramente irregular. Nucléolos não visualizados e relação núcleo/citoplasma aumentada;

e. *Lesão intra-epitelial de alto grau – HSIL* – Células menores e menos maduras do que as células na LSIL. Células isoladas, em grupos ou em agregados do tipo sincicial. Tamanho celular global variável, desde células similares no tamanho às observadas na LSIL até células do tipo basal pequenas. A hiperchromasia é acompanhada por variações no tamanho e na forma nuclear. O grau de aumento nuclear é mais variável do que na LSIL. Algumas células na HSIL apresentam o mesmo grau de aumento nuclear como na LSIL, mas a área citoplasmática está diminuída, levando a um aumento acentuado na relação núcleo/citoplasma. A cromatina pode ser fina ou grosseiramente granular e com distribuição regular. A membrana nuclear apresenta contorno bastante irregular e freqüentemente demonstra entalhes proeminentes. Os nucléolos estão geralmente ausentes, mas podem ser vistos. O aspecto do citoplasma é variável;

f. *Carcinoma escamoso* – Relativamente poucas células, geralmente únicas e raramente em agregados. Variação acentuada no tamanho celular e forma típica, com células fusiformes, que frequentemente contêm citoplasma orangeófilico. O núcleo se apresenta aumentado com

forma irregular e de tamanho variável. Há aumento da cromatina que se apresenta irregularmente distribuída, com aspecto granular grosseiro. A membrana nuclear se apresenta irregular em espessura e contornos. Nucléolos estão geralmente presentes. O citoplasma pode ser abundante ou escasso e também pode estar queratinizado. A relação núcleo/citoplasma está aumentada e se observam sangue, fibrina ou restos necróticos.



**Figura 6. Painel de imagens citopatológicas conforme classificação de Bethesda:** **a)** *normal* - placa de células escamosas superficiais bem queratinizadas com relação núcleo/citoplasma normal (500x); **b)** *alterações celulares reativas* - célula intermediária com halo perinuclear mal definido com muitas bactérias supracitoplasmáticas aderidas (1000x); **c)** *ASCUS* - célula intermediária (seta) com aumento de relação núcleo/citoplasma e cromatina granular (500x); **d)** *LSIL* - células poligonais grandes com núcleos muito aumentados, cromatinas levemente irregulares e nucléolos ostensivos; **e)** *HSIL* - presença de células pequenas, poligonais ou ovaladas, com queratinização e núcleos densos e hiper Cromáticos (seta fina). Células poligonais grandes com vacúolos degenerativos, uma delas com núcleo vesicular volumoso (seta grossa) e a outra com núcleo picnótico irregular, talvez apoptótico (seta curva); **f)** *carcinoma escamoso* - células poligonais com citoplasma denso e eosinofílico (queratinização) e núcleo pequeno, angular e hiper Cromático (seta fina). Grande célula ovalada com núcleo volumoso, hiper Cromático, com cromatina grosseira (seta grossa).

#### 4.5. Exame histológico - critérios

Os fragmentos de biópsia foram estendidos em papel filtro, processados para coloração pelo método da HE e examinados por patologista com experiência em patologia gastrointestinal (LM). A classificação dos achados histológicos foi adaptado de Wang e colaboradores<sup>90</sup>:

a. *Normal*: epitélio escamoso estratificado não queratinizado sem características das categorias descritas abaixo;

b. *Esofagite* – um ou mais dos seguintes critérios deveriam estar presentes: presença de denso infiltrado mononuclear ou neutrofílico na lâmina própria; infiltração neutrofílica ou eosinofílica no epitélio; com elevação na altura das papilas (>67%) e espessamento da camada basal do epitélio (>15%).

c. *Displasia* - presença de atipias nucleares (núcleos hipercromáticos, pleomórficos ou aumentados em volume em relação ao restante da célula), perda de polaridade celular normal e maturação tecidual anormal acometendo o 1/3 inferior (displasia leve), 1/3 médio (displasia moderado) ou 1/3 superior (displasia acentuada) sem envolvimento de toda espessura do epitélio. As displasias foram graduadas em baixo e alto grau. As displasias leves foram classificadas como displasias de baixo grau e as displasias moderadas e acentuadas, como displasias de alto grau;

d. *Carcinoma in situ*: células displásicas escamosas distribuídas por toda a espessura do epitélio, sem evidência de invasão da lâmina própria;

e. *Carcinoma* - células com acentuado pleomorfismo, com núcleos volumosos, ocupando a maior parte da célula com contornos irregulares e hipercromasia. Presença freqüente de mitoses e invasão através da lâmina própria.

#### 4.6. Imunocitoquímica – preparação do material

A preparação das lâminas de imunocitoquímica e imunoistoquímica foi efetuada pela técnica da *streptavidina-biotina*, conforme a recomendação do fabricante dos anticorpos monoclonais anti-p53 (DAKO, Carpinteria, CA, 93013, EUA, clone DO-7, código M7001).

*Técnica de preparação da imunocitoquímica:*

Os esfregaços foram aplicados sobre lâminas previamente embebida em solução de organossilano a 8% (3-aminopropyltriethoxilano-99% 40mL em 500 mL de acetona) e fixados ao ar livre em temperatura ambiente. Após lavagem das lâminas em solução tampão de fosfato (PBS), pH = 7,2, os esfregaços foram colocados em solução tampão de citrato (pH = 6), e aquecidos em forno de microondas durante 7 minutos, na potência máxima, por três ciclos, para recuperação antigênica. Na primeira e segunda paradas foram verificados os níveis de citrato e se necessário completados com água destilada. Após o terceiro ciclo as lâminas foram deixadas esfriar por 20 minutos. A seguir foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 5%, lavadas com 2 banhos de água destilada, sendo então colocadas por 5 minutos em solução tampão de fosfato (PBS). No final do processo, o material foi deixado em temperatura ambiente por 10 minutos para resfriamento.

Para evitar colorações de fundo e reações inespecíficas, após serem retiradas da solução tampão de fosfato e secadas cuidadosamente, as lâminas foram incubadas em imersão com solução de leite desnatado (5%) em PBS por 20 minutos à temperatura ambiente. Realizada lavagem com 2 banhos de água destilada, as lâminas eram colocadas por 5 minutos em PBS. O material foi, então, submetido à incubação com anticorpo primário para p53 (DAKO, Carpinteria, CA, 93013, EUA, clone DO-7, código M7001) por 1 hora, à temperatura ambiente na diluição de 1: 50. Depois, foram submetidos à incubação com anticorpo secundário (LSAB K0690) por 30 minutos e incubação com o complexo streptavidina por 30 minutos. A revelação da reação foi feita com diaminobenzidina (DAB) (DAKO, Carpinteria, CA, 93013, EUA, ref K3468, Lot 10015184), contracorada com hematoxilina de Harris e azulada com água amoniacal a 2%. As lâminas foram desidratadas com álcool absoluto, clarificada com xilol e receberam lamínula fixada com bálsamo.

**4.7. Imunoistoquímica – preparação do material***Técnica de preparação da imunoistoquímica:*

Cada bloco de parafina das biópsias endoscópicas foi cortado com espessuras de 3 a 4 µm. Os cortes foram colocados sobre lâminas previamente embebida em solução de

organosilano a 8% (3-aminopropyltriethoxilano-99% 40mL em 500 mL de acetona). Realizada identificação de cada lâmina com número de anatomopatológico do paciente fonte, não sendo descrito nome dos indivíduos. As lâminas permaneceram por 12 horas em estufa a 60 °C, para adesão dos cortes à superfície da lâmina. Logo após, foram desparafinizadas por meio de 2 banhos em xilol por 5 minutos em temperatura ambiente.

A seguir as lâminas foram submetidas ao processo de desidratação em seqüências de imersões, com duração de dois minutos, em álcool absoluto (96GL), álcool 90GL, 80GL e 70GL. Após, as lâminas foram lavadas em 2 banhos de água destilada, seguido de imersão em PBS por 5 minutos.

Após a desidratação as lâminas seguiram para o bloqueio da peroxidase endógena, imersas em soluções de peróxido de hidrogênio a 5% (três sessões de 10 minutos). Posteriormente, foram lavadas em água destilada.

O passo seguinte consistiu na recuperação antigênica em forno de microondas. As lâminas, imersas em solução de citrato (pH 6), foram submetidas a 3 ciclos de 7 minutos em potência máxima. Na primeira e segunda paradas foram verificados os níveis de citrato e se necessário completados com água destilada. Após o terceiro ciclo as lâminas foram deixadas esfriar por 20 minutos temperatura ambiente, lavadas com 2 banhos de água destilada, sendo então colocadas por 5 minutos em PBS.

Para evitar colorações de fundo e reações inespecíficas, após serem retiradas da solução tampão de fosfato e secadas cuidadosamente, as lâminas foram incubadas em imersão com leite desnatado (5%) em PBS por 20 minutos à temperatura ambiente. Realizada lavagem com 2 banhos de água destilada, sendo então colocadas por 5 minutos em PBS. A seguir as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários para o p53 (DAKO, Carpinteria, CA, 93013, EUA, clone DO-7, código M7001) na diluição de 1:50, por 1 hora, em câmara úmida em temperatura ambiente. Após este período as lâminas foram lavadas com 3 banhos de 10 minutos em PBS 7,2. Na seqüência foram submetidas à incubação com anticorpo secundário (LSAB K0690) por 30 minutos e incubação com o complexo streptavidina por 30 minutos. A revelação da reação foi feita com DAB (DAKO, Carpinteria, CA, 93013, EUA, ref K3468, Lot 10015184). Finalmente, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina previamente filtrada

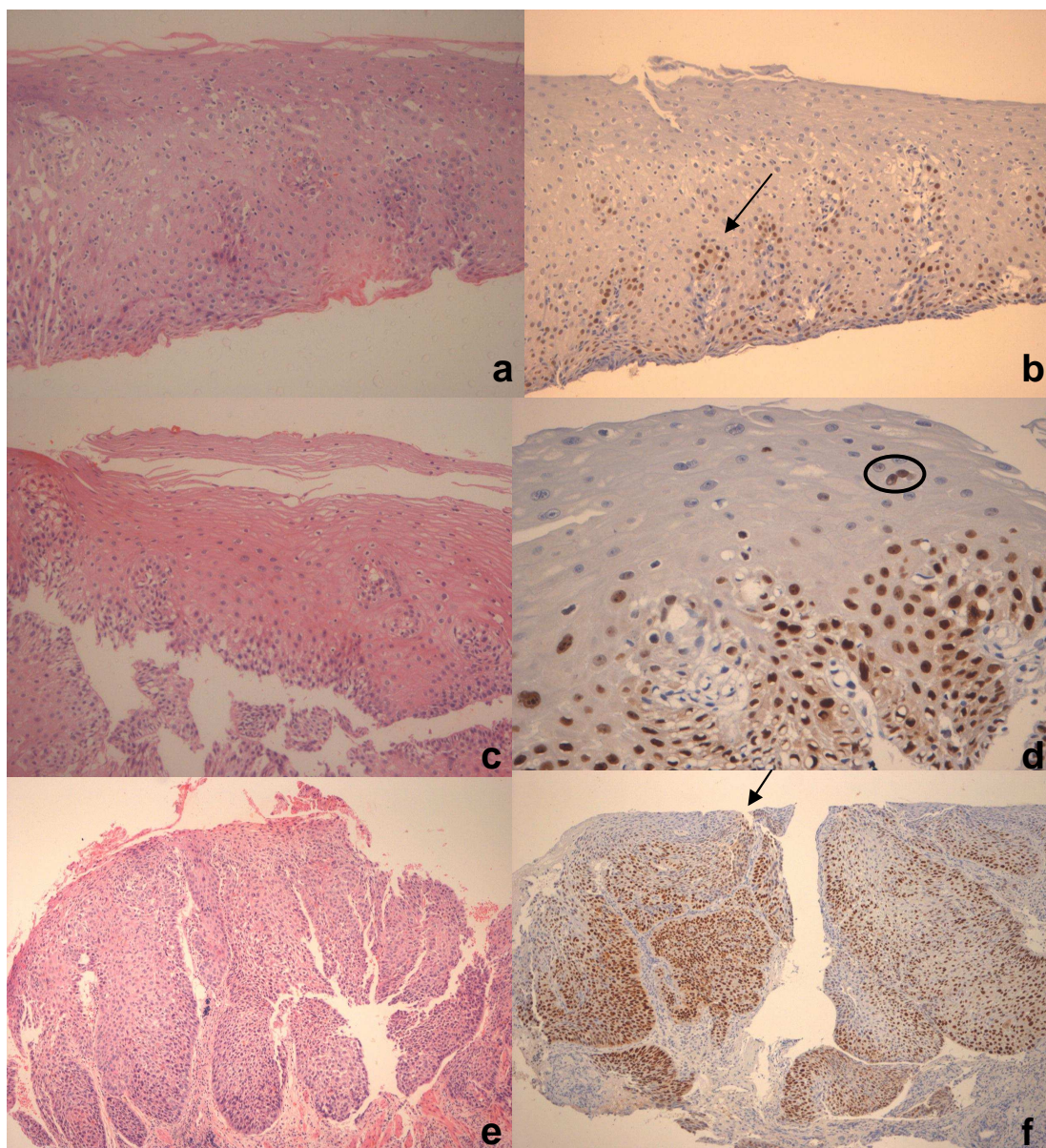
por 15 segundos. Este procedimento foi realizado no escuro, seguido de lavagem com água corrente por 3 minutos e com água destilada por 2 minutos. As lâminas foram desidratadas por 3 imersões de 2 minutos cada, em álcool absoluto e colocadas imersas em xilol em duas sessões de 2 minutos. Secado o excesso de xilol, foi colocado selante e fixada a lamínula.

#### **4.8. Interpretação da imunocitoquímica e imunoistoquímica**

Todas as lâminas foram interpretadas de maneira cega por 2 examinadores (LM e ABL) sem conhecimento das informações clínicas dos pacientes estudados. Na imunocitoquímica, foram considerados positivos para p53 os casos onde se observaram, por campo microscópico de 400 aumentos, mais de 5% das células com núcleos com cor marrom.

Na análise de imunoistoquímica foram considerados positivos os casos que apresentaram mais de 5% de núcleos celulares de coloração marrom, por campo microscópico de 400 aumentos, com células esparsas acima da camada basal. Os casos positivos para expressão imunoistoquímica de p53 foram estratificados em 3 grupos de acordo com a distribuição das células com núcleos corados na espessura do epitélio: 1) acometimento da camada basal; 2) acometimento da camada média; 3) acometimento da camada superficial (Figura 7).





**Figura 7-** Painele de exames anatomopatológicos de biópsias coradas pela Hematoxilina/Eosina (a, c, e) e após imunoistoquímica p53 (b, d, f): a) esofagite; b) positiva para p53 na camada basal (seta); c) esofagite; d) positivo para p53 até camada média (circulo); e) carcinoma epidermóide; f) positivo para p53 até camada superficial (seta).

#### 4.9. Considerações éticas

Os procedimentos foram realizados em ambiente cirúrgico ambulatorial com as devidas condições para sedação e recuperação dos pacientes. Os balões citológicos, por serem de uso único, foram descartados. O material endoscópico foi lavado com água e solução enxaguante, e desinfetado com glutaraldeído. Os esfregaços com balão citológico e as endoscopias foram



realizados por gastroenterologistas (ABL, LBM, RBF), com auxílio de técnicos de enfermagem do HCPA e HUSM. Todos os pacientes selecionados foram informados do curso e objetivos da pesquisa. Os pacientes foram avaliados somente após concordância e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). Foi respeitada a recusa do paciente, não sendo omitido para o mesmo, no âmbito assistencial, qualquer procedimento diagnóstico ou terapêutico. Os riscos da pesquisa foram os riscos decorrentes dos procedimentos que podem ser classificados como riscos médios e os benefícios resultantes da pesquisa incluíram o diagnóstico de lesões não evidentes com o tratamento adequado das mesmas.

#### **4.10. Estatística**

##### **4.10.1. Cálculo amostral**

Os indivíduos estudados foram selecionados por conveniência, de forma prospectiva. A amostra calculada foi de aproximadamente 160 pacientes para que os dados apresentassem intervalo de confiança de 95% e poder de 80% para detectar 7% de neoplasias intraepiteliais ou avançadas em pacientes com fatores de risco para carcinoma epidermóide de esôfago<sup>31, 52,</sup>

88

##### **4.10.2. Análise de dados**

###### *Dados demográficos:*

Foram avaliados idade, sexo e fatores de risco para neoplasias do esôfago como história prévia de carcinoma epidermóide de TADS, renda mensal, alcoolismo, tabagismo e consumo de chimarrão. Foram considerados alcoolistas ativos os indivíduos com consumo atual ou com abstenção alcoólica há menos de 10 anos. Foram considerados tabagistas ativos os indivíduos com fumo atual ou com abstenção há menos de 10 anos. Tais critérios de alcoolismo e tabagismo ativos se baseiam na observação de diminuição de risco de carcinoma epidermóide de esôfago somente com períodos de 5 anos para abstenção dos dois hábitos ou 10 anos para a abstenção de um dos hábitos<sup>42</sup>.

###### *Dados endoscópicos:*

Os achados endoscópicos foram descritos de acordo com o exame convencional do esôfago e após cromoendoscopia com solução de Lugol 3%. A cromoendoscopia foi

considerada positiva quando havia uma ou mais áreas descoradas com diâmetros maiores de 5 mm. O número e o diâmetro das áreas descoradas maiores de 5 mm foram registrados.

*Avaliação citopatológica e anatomopatológica do esôfago:*

Os achados citopatológicos e anatomopatológicos foram inicialmente classificados conforme descrição detalhada nos itens **4.4.** e **4.5.**. Os achados citopatológicos foram dicotomizados em citologia negativa para achados normais e reativos e citologia positiva para pacientes com ASCUS, LSIL, HSIL e carcinoma<sup>94</sup>. Resultados anatomopatológicos de esofagite ou normalidade foram descritos como não-neoplasia, enquanto que displasias, carcinomas *in situ* e carcinomas invasivos foram descritos como neoplasia<sup>90</sup>.

#### **4.10.3. Análise Estatística**

As variáveis qualitativas foram descritas em percentuais. As variáveis quantitativas foram expostas à avaliação de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis que apresentaram distribuição normal foram descritas em termos de média e desvio padrão, enquanto que as de distribuição assimétrica foram descritas pela mediana e pela diferença entre o percentil 25 e 75.

Foram calculadas, com auxílio de tabela 2x2, a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos, e acurácia  $[(a + d)/total]$  da citologia para diagnóstico de displasia/CEE. Cabe ressaltar que a avaliação do desempenho diagnóstico das lâminas coletadas pelo *Balão RS* foi realizado confrontando o pior resultado citológico (teste) com o pior resultado anatomopatológico coletado com auxílio da cromoendoscopia (padrão ouro).

O desempenho diagnóstico da imunocitologia com p53 (teste) também foi avaliado, sendo considerado padrão-ouro a avaliação anatomopatológica de amostras de biópsia de áreas não coradas de esôfago após a aplicação de Lugol 3%.

Para inferência estatística de variáveis quantitativas foi utilizado o teste t de Student. Quando foram observadas assimetrias acentuadas na distribuição dos dados, foi utilizado o teste U de Mann-Whitney. Na comparação de variáveis qualitativas foi aplicado o teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, quando necessário. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

O processamento e análise dos dados foram executados com o auxílio do pacote estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 13.0.

## **5. RESULTADOS**

### 5.1. Características dos pacientes estudados

Entre março de 2006 e dezembro de 2007 foram recrutados 176 indivíduos. Cinco pacientes foram excluídos do estudo por apresentarem: disfagia progressiva (um paciente); acalásia (dois indivíduos) que não foram submetidos à cromoendoscopia por apresentarem grande quantidade de resíduos alimentares no esôfago e 2 indivíduos que não consentiram em participar do estudo. Restaram 171 indivíduos que passaram por todas as etapas do protocolo de pesquisa. Após a conclusão de todas as etapas oito indivíduos foram excluídos, pois as amostras citológicas coletadas não foram adequadas para o estudo citológico e imunocitoquímico (4,7%). A amostra final estudada nesta dissertação foi constituída, portanto de 163 indivíduos.

A amostra de 163 pacientes consistiu de 150 homens (92%), com idade entre 28 e 84 anos (média= 52,6 ± 12 anos). Cento e dezessete indivíduos (71,9%) foram avaliados no HCPA e 46 no HUSM (28,1%). Tabagismo ativo foi observado em 141 pacientes (86,5%), com mediana de carga tabágica de 39,5 maços/ano, e consumo de cigarros e semelhantes por 10 a 71 anos (Tabela 2). Alcoolismo ativo foi observado em 114 indivíduos (69,9%), com consumo de destilados em 78,1% dos casos e quantidade mediana de 320 gramas de álcool/dia (Tabela 3). Alcoolismo e tabagismo ativos concomitantes foram observados em 63,8% da amostra estudada (104 sujeitos). Consumo de chimarrão diário foi observado em 69,9% no grupo estudado (Tabela 4). Tabagismo, alcoolismo e consumo de chimarrão em bases regulares foram identificados de maneira concomitante em 77 indivíduos (47,2%).

Carcinoma do TADS foi o fator de inclusão em 42 pacientes (25,8%), além de uma paciente tabagista ativa com carcinoma epidermóide de pulmão tratado (0,6%).

A mediana de moradores por domicílio foi de 2 com mínimo de 1 e máximo de 8 indivíduos por domicílio (percentil 25= 2, percentil 75= 4). A mediana de peças dentárias observadas no grupo de estudo foi de 12 (percentil 25= 2, percentil 75= 25,2). A grande maioria dos indivíduos avaliados (77,3%) relatava renda familiar de 1 a 3 salários mínimos por mês.

**Tabela 2- Características dos indivíduos quanto ao consumo de fumo (n=141)**

<b>Período de consumo</b>	
≤15 anos – n(%)	5(3,9)
15 – 20 anos – n(%)	8(5,7)
≥ 20 anos – n(%)	128(90,4)
Anos de consumo – média ± desvio padrão	33,7 ± 12,7
<b>Quantidade de cigarros consumidos</b>	
cigarros/dia – mediana(percentil 25 – 75)	20(20 – 30)
Carga tabágica em maços/ano – mediana(percentil 25 – 75)*	39,5 (25 – 55,3)
<b>Alcoolismo concomitante – n(%)</b>	<b>104(73,8)</b>

\* Carga tabágica em maços/ano= (número de cigarros consumidos x tempo de consumo em anos)/20

**Tabela 3- Características dos indivíduos quanto ao uso de álcool (n=114)**

<b>Período de consumo</b>	
≤15 anos – n(%)	14(12,3)
15 – 20 anos – n(%)	10(8,8)
≥ 20 anos – n(%)	90(78,9)
Anos de consumo – mediana (percentil 25 – 75)	27 (20 – 33)
<b>Quantidade de álcool consumido</b>	
gramas de álcool/dia – mediana (percentil 25 – 75)	320 (180 – 360)
<b>Frequência de consumo</b>	
Diário – n(%)	98(86)
2 – 3x/semana – n(%)	16(14)
<b>Tipo de bebida</b>	
Destilados – n(%)	89(78,1)
Cerveja – n(%)	8(7)
Vinho – n(%)	1(0,9)
Todas as acima – n(%)	16(14)

**Tabela 4- Características dos indivíduos quanto ao consumo de chimarrão (n=114)**

<b>Período de consumo</b>	
Anos de consumo – média ± desvio padrão	28,9 ± 15,3
<b>Quantidade de chimarrão consumido</b>	
Litros de chimarrão/dia – mediana (percentil 25 – 75)	1 (0,5 – 1)
<b>Uso concomitante de chimarrão, álcool e cigarro – n(%)</b>	<b>77(67,5)</b>

Quando comparamos os indivíduos avaliados no HUSM com os indivíduos examinados no HCPA (Tabela 5) podemos observar que os primeiros eram mais jovens, com predomínio do sexo masculino, alcoolistas ativos e havia menor número de habitantes por domicílio. O grupo do HCPA foi onde se observou a grande maioria dos pacientes com diagnóstico prévio de carcinoma epidermóide do TADS. A carga tabágica observada no grupo do HCPA foi maior, no entanto a média de cigarros consumidos foi semelhante.

**Tabela 5- Comparação das características demográficas e hábitos de pacientes avaliados no HCPA e HUSM (n=163)**

	<b>HCPA (n=117)</b>	<b>HUSM (n=46)</b>	<b>Total (n=163)</b>	<b>p</b>
<b>Idade em anos</b>				
média ± DP*	55,7±11,4	44,7±9,7	52,6±12,0	<0,001
Mínimo – máximo	28 – 84	28 – 80	28 – 84	
<b>Sexo masculino – n(%)</b>	104(88,9)	46(100)	150(92)	0,02
<b>Tabagismo</b>				
Tabagismo ativo – n(%)	100(85,4)	41(89,1)	141(86,5)	0,20
Maços/ano				
Mediana (percentil 25 – 75)	40/27,5 – 60	29/12,6 – 41	39 / 25 – 55	0,005
Cigarros/dia				
Mediana (percentil 25 – 75)	27,53 ± 16,2	24,24 ± 13,9	20/ 20 – 30	0,25
<b>Alcoolismo</b>				
Alcoolismo ativo – n(%)	69(59,5)	45(97,8)	114(69,9)	<0,001
G de álcool/dia				
Mediana (percentil 25 – 75)	252/175 – 360	320 (205 – 460)	300 (180 – 360)	0,09
Anos de hábito				
Mediana (percentil 25 – 75)	27 (18 – 35)	26 (20 – 31,5)	27 (20 – 33)	0,67
<b>Chimarrão</b>				
Consumo ativo – n(%)	75(64,1)	39(84,8)	114(69,9)	0,09
Consumo em litros/dia				
Mediana (percentil 25 – 75)	1/0,5 – 1	1/0,5 – 1,2	1 / 0,5 – 1	0,63
Anos de uso – média ± DP*	29,5 ± 14,9	26,7 ± 14,5	28,5 ± 14,8	0,35
<b>História câncer TADS – n(%)</b>	41(35,0)	1(2,2)	42(25,7)	<0,001
<b>Moradores por domicílio</b>				
Mediana (percentil 25 – 75)	3 (2 – 4)	2 (1 – 3)	2 (2 – 4)	0,02
<b>Renda Mensal</b>				
1 – 3 SM**/mês – n(%)	86(73,5)	40(87)	126(77,3)	0,09

\*DP= desvio padrão

\*\*SM= salário mínimo

Para variáveis com apresentação normal – média ± desvio, comparação de médias com teste t de Student

Para variáveis com apresentação assimétrica – mediana e intervalo entre percentil 25 – 75, comparação com teste U Mann-Whitney

## 5.2. Resultados da coleta com o *Balão RS* e citologia convencional

A utilização do *Balão RS* foi fácil e rápida, com duração máxima de 2 minutos da deglutição do balão até a aplicação do material nas lâminas. Os indivíduos apresentaram boa tolerância ao procedimento com queixas de náuseas leves e tosse durante a deglutição e retirada do balão. Em 2 indivíduos o balão se desconectou do cateter plástico, sendo necessária passagem de novo balão. Durante a endoscopia os 2 balões perdidos foram recuperados na cavidade gástrica.

Os resultados dos exames citológicos foram os seguintes: 147 normal (90,2%), 10 alterações celulares reativas (6,1%), 3 ASCUS (1,8%), 1 LISL (0,6%), 1 HSIL (0,6%) e 1 carcinoma escamoso (0,6%).

## 5.3. Resultados de esofagoscopia e cromoendoscopia com solução de Lugol

As esofagoscopias foram consideradas normais em 130 indivíduos (79,8%). Achados endoscópicos sugestivos de doença do refluxo gastroesofágico como esofagite e mucosa compatível com esôfago de Barrett foram observados em 23 (14,1%) e 3 (1,8%) indivíduos, respectivamente. Os casos suspeitos de esôfago de Barrett foram confirmados com biópsias que demonstravam metaplasia intestinal especializada com células calciformes, sem evidência de displasias.

Foram observados os seguintes achados endoscópicos sugestivos de neoplasia esofágica: a) lesão vegetante com biópsia confirmando carcinoma epidermóide de esôfago; b) 2 áreas deprimidas com uma delas confirmada como displasia de alto grau e outra diagnosticada como esofagite; c) pequena nodularidade isolada com estudo anatomopatológico compatível com esofagite; d) úlcera esofágica com biópsia confirmando esofagite. Um dos indivíduos apresentava varizes esofágicas de pequeno calibre e outro apresentava monilíase esofágica confirmada por avaliação de escovado.

A cromoendoscopia com solução de Lugol 3% foi realizada em 162 indivíduos e demonstrou áreas descoradas em 65 (40,1%), com no mínimo 1 e no máximo 10 áreas identificadas (mediana= 1; intervalo entre percentil 25 e 75= 1 – 2). Os diâmetros das áreas descoradas foram de 0,5 a 4,0 centímetros de diâmetro (mediana= 1; intervalo entre percentil 25 e 75= 1 – 2). Um paciente não foi submetido à cromoendoscopia com Lugol por relatar

alergia a iodo, seu exame se apresentou dentro dos critérios endoscópicos da normalidade e foram realizadas biópsias no esôfago médio a 25 e 30 cm da arcada dentária superior.

Foi observado que pacientes com história prévia de carcinoma epidermóide de TADS apresentaram cromoendoscopia com áreas descoradas mais frequentemente que os demais indivíduos estudados (razão de prevalência= 2,46; IC95% 1,7 – 3,4;  $p < 0,001$ ).

#### 5.4. Resultados das biópsias do esôfago e sua relação com a citologia convencional

As áreas descoradas iguais ou maiores que 5 mm e 2 áreas normalmente coradas no esôfago médio (25 e 30 cm da ADS) dos indivíduos avaliados foram biopsiadas (Tabela 6). As áreas coradas apresentaram diagnóstico histopatológico normal em 110 (67,5%) e esofagite em 53 indivíduos (32,5%). Dos 65 pacientes com áreas descoradas foi observado diagnóstico anatomopatológico normal em 23 (35,4%), esofagite em 39 (60%), displasia de alto grau em 1 (1,5%), carcinoma *in situ* em 1 (1,5%) e carcinoma invasivo em 1 (1,5%).

**Tabela 6- Relação das áreas não coradas pelo Lugol com os diagnósticos histológicos**  
(n= 163)

Histologia	N	Cromoendoscopia com áreas descoradas	
		f	%
Mucosa Normal	99	23	23,2
Esofagite	61	39	63,9
Neoplasia*	3	3	100
<b>Total</b>	<b>163</b>	<b>65</b>	<b>40,1</b>

\* Neoplasia= 1 displasia, 1 carcinoma *in situ*, 1 carcinoma invasor

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

Quando cada sujeito teve seu resultado de citologia comparado com o pior resultado histopatológico obtido, foi observado que os 3 casos de ASCUS apresentavam resultados anatomopatológico de esofagite, o caso de LSIL apresentava biópsia compatível com displasia de alto grau e o caso de carcinoma ocorreu no indivíduo com diagnóstico histopatológico de carcinoma invasivo. Houve 1 caso de falso negativo da citologia que foi considerada normal no indivíduo que apresentava carcinoma *in situ* (Tabela 7).



**Tabela 7- Comparação dos diagnósticos citopatológicos de materiais coletados pelo Balão RS com biópsias de esôfago guiadas por cromoendoscopia com Lugol (n= 163)**

Citologia Balão RS	Biópsia – pior diagnóstico histológico						Total n(%)
	Normal	Esofagite	Displasia		CA* <i>In situ</i>	CA* invasivo	
			Baixo grau	Alto grau			
Normal	98	49	0	0	1	0	148(90.8)
Reativa	1	8	0	0	0	0	9(5.5)
ASCUS	0	3	0	0	0	0	3(1.8)
LSIL	0	0	0	1	0	0	1(0.6)
HSIL	0	1	0	0	0	0	1(0.6)
Carcinoma	0	0	0	0	0	1	1(0.6)
<b>Total n(%)</b>	<b>99 (60.7)</b>	<b>61(37.4 )</b>	<b>0(0)</b>	<b>1(0.6)</b>	<b>1(0.6)</b>	<b>1(0.6)</b>	<b>163(100)</b>

\*CA= carcinoma

A prevalência de achados “positivos” na citopatologia (ASCUS, LSIL, HSIL ou carcinoma) foi de 3,6%, enquanto que a histologia identificou 1,8% de casos “positivos” (displasia de baixo grau, displasia de alto grau, carcinoma *in situ* e carcinoma invasor). Quando a citologia (teste) foi comparada com o pior diagnóstico histológico (padrão ouro) a citologia esfoliativa com o Balão RS teve sensibilidade de 66,7% (IC95% 22,0 – 93,6), especificidade de 97,5% (IC95% 96,7 – 98,0), valor preditivo positivo de 33,3% (IC95% 11 – 46,8), valor preditivo negativo de 99,4% (IC95% 98,5 – 99,9) e acurácia de 96,9% (IC95% 95,3 – 97,9) (Tabela 8).

**Tabela 8 - Comparação citologia versus histologia (n= 163)**

Citologia*	Histologia**		
	Positive	negativa	
positiva	2	4	6
negativa	1	156	157
	3	160	163

\*Citologia: positiva = ASCUS, LSIL, HSIL, carcinoma; negativa: normal ou alterações celulares reativas \*\*

Histologia: positiva= displasia de baixo grau, displasia de alto grau, carcinoma *in situ*, carcinoma invasor; negativo: normal ou esofagite

Todos os três sujeitos com diagnóstico de displasia/carcinoma escamoso foram avaliados no HCPA. O indivíduo com displasia era tabagista e alcoolista ativo, além de ter diagnóstico recente de carcinoma de TADS tratado com radioterapia. Sua displasia acometia

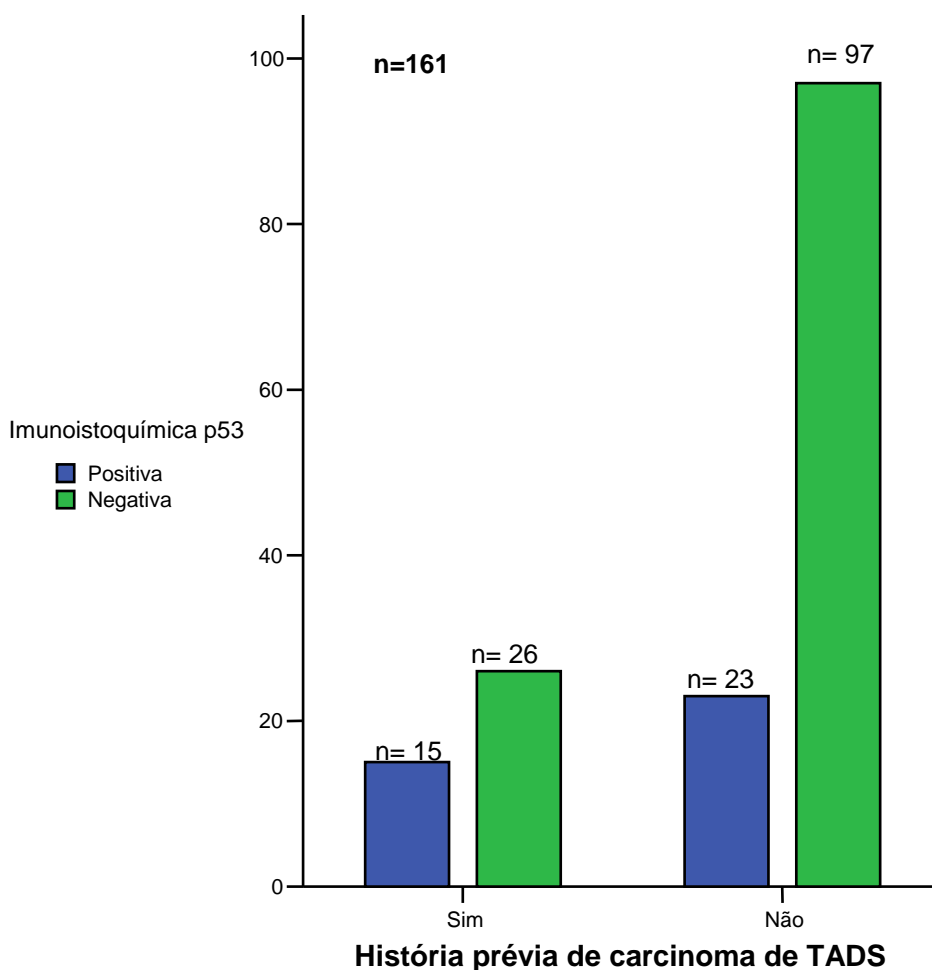
uma área de 1,0 cm de diâmetro no esôfago distal que foi tratada com mucosectomia endoscópica e o paciente segue acompanhamento. O indivíduo com carcinoma *in situ* também era alcoolista e tabagista ativo e foi encaminhado pelo serviço de otorrinolaringologia do HCPA após tratamento cirúrgico de neoplasia do TADS. Em virtude do carcinoma *in situ* acometer quase toda circunferência do esôfago e apresentar 2 cm de extensão crânio-caudal, foi optado por submetê-lo a esofagectomia com ressecção completa da neoplasia e avaliação anatomopatológica da peça cirúrgica confirmando que a lesão era restrita à mucosa. A evolução pós-operatória foi satisfatória e o paciente permanece em acompanhamento ambulatorial. O paciente com carcinoma invasivo optou por não realizar tratamento e não seguiu acompanhamento no HCPA.

### **5.5. Resultados de imunistoquímica p53**

A imunistoquímica com p53 foi executada em 161 indivíduos pois houve perda dos blocos de parafina de 2 pacientes avaliados. A expressão imunistoquímica da proteína p53 foi positiva em 38 indivíduos (23,6%), com acometimento da camada basal em 29 (76,3%), camada média em 8 (21,1%) e camada superficial em 1 (2,6%). O tabagismo ativo ( $p=0,6$ ) ou alcoolismo ativo ( $p=0,89$ ) não apresentaram relação significativa com a positividade para p53.

Foi observado que pacientes com história prévia de carcinoma epidermóide de TADS apresentaram imunistoquímica p53 positiva mais frequentemente que os demais indivíduos estudados (razão de prevalência= 1,9; IC95% 1,1 – 3,3;  $p<0,04$ ) (Figura 8).

**Figura 8- Relação de freqüências da expressão imunistoquímica de p53 em pacientes com diagnóstico prévio de carcinoma do TADS.**



A positividade para imunistoquímica p53 foi observada em áreas descoradas a cromoendoscopia com Lugol em 28 indivíduos (73,7%) comparado a 10 indivíduos (26,3%) sem áreas iodonegativas à cromoendoscopia. A cromoendoscopia apresentou sensibilidade de 73,7% (IC95% 60,2 – 84,2), especificidade de 71,5% (IC95% 67,4 – 74,8), valor preditivo positivo de 44,4% (IC95% 36,3 – 50,8), valor preditivo negativo de 89,8% (IC95% 84,6 – 93,9) e acurácia de 72,0% (IC95% 65,7 – 77,0) para revelar áreas com imunistoquímica positiva para p53 (Tabela 9).

**Tabela 9- Relação da cromoendoscopia com a expressão imunoistoquímica da proteína p53 (n= 161)**

		Expressão de p53		
		positiva	negativa	
Cromoendoscopia com Lugol	Áreas não coradas	28	35	63
	áreas coradas	10	88	98
		38	123	161

p<0,01

A razão de prevalência para a ocorrência de expressão imunoistoquímica p53 em áreas não coradas pelo Lugol foi de 4,4 (IC95% 2,4 – 8,3; p<0,01).

A relação da imunoistoquímica p53 e os diagnósticos histológicos está descrita na tabela 10 e figura 9.

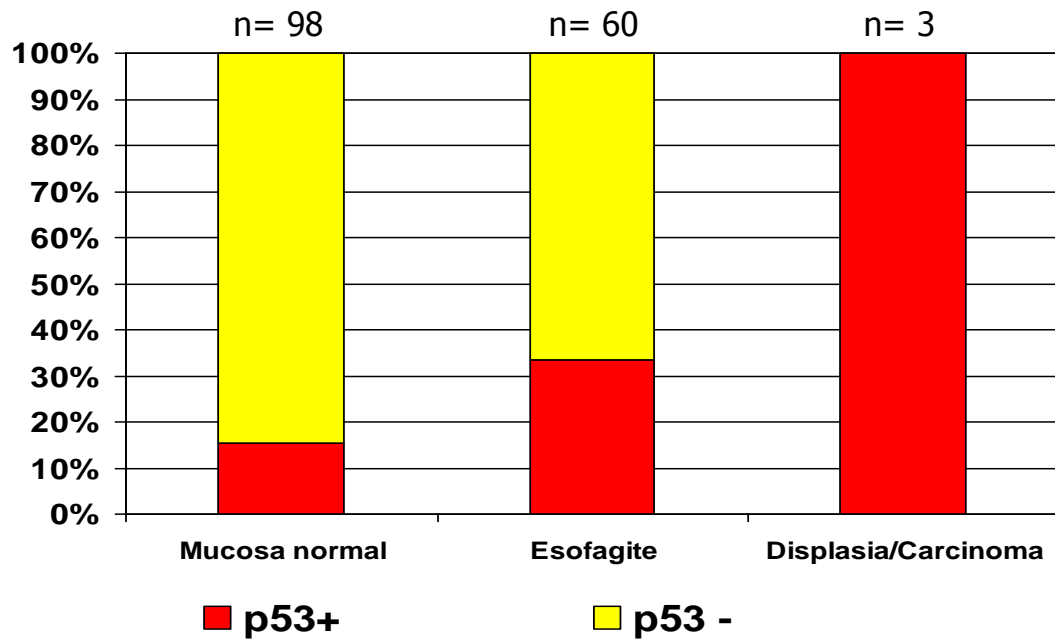
**Tabela 10- Relação da expressão imunoistoquímica da proteína p53 com os diagnósticos histológicos (n= 161)**

Histologia	N	p53 positiva	
		f	%
Mucosa Normal	98	15	15,3
Esofagite	60	20	33,3
Neoplasias*	3	3	100
<b>Total</b>	<b>161</b>	<b>38</b>	<b>23,6</b>

\* Neoplasias= 1 displasia , 1 carcinoma *in situ*, 1 carcinoma invasor

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

Figura 9- Relação de frequências da expressão imunohistoquímica de p53 com os diagnósticos histológicos



### **5.6. Resultados de imunocitoquímica p53**

As amostras de citologia dos 163 pacientes foram adequadas para a realização da técnica da imunocitoquímica, porém a expressão da proteína p53 foi negativa em todas as amostras de material citológico dos indivíduos estudados.

## **6. DISCUSSÃO**

A alta incidência de CEE no estado do Rio Grande do Sul tem sido amplamente observada em levantamentos prévios. Foi descrita uma taxa cumulativa de 1,84% (IC95% 1,42 – 2,26) de um indivíduo de Porto Alegre desenvolver CEE ao longo de sua vida, entre os 0 e 74 anos de idade<sup>113</sup>. A alta prevalência de CEE descrita em nosso meio, associada ao seu mau prognóstico em lesões avançadas, estimula o estudo de métodos de rastreamento de indivíduos assintomáticos sob risco para realização de diagnóstico precoce. Com intuito de melhorar as técnicas de citologia disponíveis no diagnóstico precoce de CEE, o presente estudo tinha como objetivo estudar a expressão imunocitoquímica da proteína p53 em material obtido pelo balão citológico na identificação de lesões precursoras ou lesões precoces de CEE em indivíduos com fatores de risco para este câncer.

Foram avaliados indivíduos sob risco de CEE com exame citopatológico e análise da expressão da proteína p53 no material citológico do esôfago coletado pelo *Balão RS*. Os dados obtidos foram comparados com a cromoendoscopia com Lugol e a expressão imunoistoquímica da proteína p53 em biópsias esofágicas. O grupo em estudo foi constituído de 163 indivíduos assintomáticos com predominância do sexo masculino (92%), com idade média de  $52,6 \pm 12$  anos. Foi observado, tabagismo ativo em 86,5%, alcoolismo ativo em 69,9% e consumo de chimarrão diário em 69,9%. Alcoolismo e tabagismo ativos concomitantes foram observados em 63,8% da amostra estudada (104 sujeitos). Carcinoma do TADS foi o critério de inclusão em 25,8% da amostra. Os consumos de álcool, cigarro e chimarrão observados foram expressivos, podendo contribuir com aumento de risco de CEE no grupo estudado.

Foram incluídos 117 indivíduos no HCPA e 46 no HUSM. Quando comparamos os indivíduos avaliados no HUSM com os examinados no HCPA pudemos observar diferenças significativas na idade, sexo, alcoolismo, carcinoma de TADS e tabagismo entre os grupos (Tabela 5). No entanto tais diferenças foram consideradas irrelevantes na avaliação dos dados, pois simplesmente refletem que a amostra foi coletada em centros diferentes, mas continha somente indivíduos expostos a fatores de risco de CEE.

A utilização do *Balão RS* foi fácil, rápida e bem tolerada pelos indivíduos estudados. As amostras coletadas pelo balão foram adequadas em 163 dos 171 sujeitos que foram submetidos à esfoliação do esôfago (95,3%). A citopatologia convencional revelou 6 casos



suspeitos de neoplasia com 3 ASCUS, 1 LSIL, 1 HSIL e 1 carcinoma. Houve 1 caso de carcinoma *in situ* nas biópsias endoscópicas que apresentou citopatologia normal.

Quando a citologia (teste) foi comparada com o pior diagnóstico histológico (padrão ouro) a citologia esfoliativa com o *Balão RS* teve sensibilidade de 66,7% (IC95% 22,0 – 93,6), especificidade de 97,5% (IC95% 96,7 – 98,0), valor preditivo positivo de 33,3% (IC95% 11 – 46,8), valor preditivo negativo de 99,4% (IC95% 98,5 – 99,9) e acurácia de 96,9% (IC95% 95,3 – 97,9). Apesar da sensibilidade e especificidade da citologia obtida com o *Balão RS* serem maiores que as relatadas por Roth<sup>95</sup> que utilizou o balão chinês tradicional (47%/81%) e que as observadas por Pan<sup>94</sup> que comparou o balão chinês (46%/84%) com um novo balão mecânico (39%/85%), a baixa prevalência de casos de displasia/CEE no presente estudo não permite conclusões precisas sobre sua sensibilidade (IC95%– 22,0 – 93,6).

Foram diagnosticados somente 3 casos de displasia/CEE na amostra avaliada (1,8%), com 1 caso em indivíduo tabagista, alcoolista e tomador de chimarrão e os outros 2 casos em indivíduos com carcinoma de TADS prévio. A prevalência de lesões neoplásicas foi abaixo do esperado com base em dados da literatura. Fagundes e colaboradores, em 2 estudos que avaliaram alcoolistas e tabagistas ativos<sup>31, 88</sup> obtiveram prevalências de 6,9% e 8,24% de displasias/CEE. A discrepância entre os achados prévios e do estudo atual pode ser atribuída aos critérios de inclusão mais complacentes no protocolo empregado que permitia inclusão de indivíduos com somente um fator de risco enquanto que Fagundes e cols. avaliaram indivíduos com uso concomitante de álcool (> 80g/dia), fumo (> 10 cigarros/dia) e chimarrão (>500 ml/dia) por mais de 10 anos. Todos os fatores citados são independentes em aumentar o risco de CEE, porém é conhecido que eles possuem efeitos carcinogênicos sinérgicos sendo maior a chance de diagnosticar displasia/CEE em indivíduos com múltiplos fatores de risco<sup>23, 114</sup>.

A opção de incluir indivíduos com somente 1 fator de risco aproxima a amostra da população geral, aumentando a validade externa do protocolo de rastreamento de lesões precursoras e precoces para desenvolvimento de CEE e testa se indivíduos da população geral poderiam ser rastreados para CEE. A observação de poucos casos de displasia/CEE neste estudo sugere que programas de rastreamento direcionados para população geral não apresentam boa relação custo-benefício e que os esforços deveriam dar enfoque em indivíduos com maior risco. É evidente que indivíduos que reúnam múltiplos fatores de risco estão mais

expostos, mas mesmo dentre estes expostos existem aqueles que apresentarão uma maior suscetibilidade para o desenvolvimento de CEE. Provavelmente incrementaríamos a prevalência de CEE e/ou lesões precursoras com a abordagem de indivíduos que apresentassem simultaneamente todos os fatores de risco conhecidos. O desenvolvimento de um escore de risco que pudesse selecionar de maneira mais correta os indivíduos candidatos a rastreamento provavelmente determinaria uma relação custo-benefício efetiva, como podemos observar nos indivíduos com carcinoma do TADS.

O subgrupo de pacientes com carcinoma de TADS avaliado neste estudo foi de 42 indivíduos. Neste grupo foram encontrados 2 casos de displasia/CEE (4,76%). Estudos recentes empregando o rastreamento de CEE com cromoendoscopia com Lugol em indivíduos com diagnóstico prévio de carcinoma de TADS em São Paulo<sup>52</sup> e França<sup>53</sup> obtiveram, respectivamente, 7,36% (24/326) e 9,9% (39/217) de displasias/CEE. Em seguimento do estudo paulistano acima citado, Rossini e colaboradores<sup>38</sup> observaram que os indivíduos que iniciaram hábito do alcoolismo mais cedo, com tempo de exposição ao álcool mais prolongada, com maiores quantidades por semana, e com tabagismo concomitante apresentaram risco maior de desenvolverem CEE. A maioria dos casos neste estudo apresentava CEE sincrônico (28/36). Em nossa casuística os 2 pacientes com diagnóstico de displasia/CEE também apresentaram-se com neoplasia sincrônicas e eram alcoolistas e tabagistas ativos. Hábitos de alcoolismo e tabagismo do grupo em avaliação foram semelhantes aos descritos por Rossini, no entanto, sua amostra é maior, podendo ser este o motivo da menor prevalência de casos no presente estudo.

A cromoendoscopia com solução de Lugol 3% demonstrou áreas descoradas em 40,1% dos indivíduos avaliados. Todos os casos de displasia/CEE diagnosticados foram resultantes de biópsias de áreas descoradas, concordando com a literatura que sugere sensibilidade maior que 80% da cromoendoscopia com Lugol na identificação de lesões precoces e avançadas na esofagoscopia<sup>91, 92</sup>. Pacientes com história prévia de carcinoma epidermóide de TADS apresentaram áreas descoradas mais frequentemente que os demais indivíduos estudados (razão de prevalência= 2,46; IC95% 1,7 – 3,4; p<0,001), o que pode ser a causa do grande número de indivíduos com áreas descoradas quando comparados com estudos prévios em grupos de alcoolistas e tabagistas que observaram aproximadamente

12,1% de áreas descoradas<sup>31, 88</sup>. Muto e colaboradores<sup>51</sup>, ao avaliarem indivíduos com carcinoma de TADS também encontraram um grande número de indivíduos com áreas iodonegativas (65,5%), porém o estudo incluía indivíduos com áreas descoradas menores que 5 mm. O protocolo empregado no estudo atual previa descrição e realização de biópsias somente de áreas maiores de 5 mm, baseado em evidência recente de que áreas menores não costumam conter lesões histológicas precursoras ou neoplásicas<sup>52</sup>.

A expressão imunoistoquímica da proteína p53 foi positiva em 23,6% dos indivíduos, com predominância de positividade na camada basal e média (97,4%). A positividade da expressão da proteína p53 foi maior à medida que os achados histológicos pioraram, com 100% de positividade nos casos de displasia/CEE encontrados. Os dados do estudo atual reproduzem os achados de Fagundes<sup>88</sup> e Ohbu<sup>82</sup> que observaram aumento da expressão imunoistoquímica da proteína p53 à medida que as lesões histológicas pioram, com positividade em carcinoma invasivo em, respectivamente, 100% e 80% dos casos.

A positividade para imunoistoquímica p53 foi observada em áreas descoradas a cromoendoscopia com Lugol em 28 indivíduos (73,7%) comparado a 10 indivíduos (26,3%) sem áreas iodonegativas. A razão de prevalência para a ocorrência de expressão imunoistoquímica p53 em áreas não coradas pelo Lugol foi de 4,4 (IC95% 2,4 – 8,3;  $p < 0,01$ ). Kaneko e colaboradores<sup>83</sup> avaliaram biópsias de áreas iodonegativas sem displasia e parearam com áreas vizinhas normalmente coradas. Foi observado que mutações do gene *p53* ocorreram somente em áreas descoradas, sugerindo que estas mutações poderiam ser marcadores precoces de transformação maligna destas áreas.

O grupo de pacientes com carcinoma de TADS apresentou uma razão de prevalência de 1,9 (IC95% 1,1 – 3,3;  $p < 0,04$ ) para positividade para a expressão imunoistoquímica p53 em suas biópsias. Tal associação pode refletir a teoria do campo carcinogênico que envolve o TADS, pulmão e esôfago. Estudo francês de Dubuc e colaboradores<sup>53</sup>, reforça esta teoria, demonstrando que o grupo de pacientes com história prévia de carcinoma de pulmão ou TADS apresentava uma prevalência significativamente maior de displasia/carcinoma de esôfago quando comparados com grupos de alcoolistas com pancreatite alcoólica, alcoolistas e tabagistas, e cirróticos por álcool.

As amostras de citologia dos 163 pacientes avaliados foram adequadas para a realização do estudo, mas a expressão imunocitoquímica da proteína p53 foi negativa em todos os indivíduos estudados. Frente a total negatividade da expressão da proteína p53 na amostra avaliada, surgem algumas perguntas: 1) a imunocitoquímica p53 pode ser utilizada em material citológico? 2) Quais motivos justificam a negatividade imunocitoquímica em uma amostra de 38 pacientes com expressão imunoistoquímica positiva?

A resposta ao primeiro questionamento é positiva. A imunocitoquímica pode ser utilizada em material celular como foi demonstrado por estudo com líquidos serosos e punção de agulha fina realizado por Flens e colaboradores<sup>109</sup>. Neste estudo foram avaliados materiais de adenocarcinoma (ovário, pulmão, próstata, renal, cólon, vesícula biliar), mesotelioma, neoplasias linforreticulares (linfoma, mieloma múltiplo), sarcomas, teratomas e carcinomas escamosos. Foram utilizados 21 tipos diferentes de marcadores celulares como CEA, CA125 e outros que contribuíram para a resolução de dúvidas e identificaram diagnósticos novos. Tsai *et al.*<sup>111</sup> utilizando escovado de mucosa de Barrett obteve uma boa correlação dos achados imunocitoquímicos com os achados imunoistoquímicos para expressão da proteína p53.

Quanto à segunda questão, no presente estudo a distribuição dos núcleos identificados pela expressão imunoistoquímica da proteína p53 foi predominantemente observado nas camadas médias e basais do epitélio esofágico (97,4%). É provável que as células amostradas pelo *Balão RS*, que vem da camada superficial, não tenham apresentado expressão positiva por serem de uma camada pouco corada, impondo-se a procura de outro marcador molecular que seja expresso na camada superficial.

## **7. CONCLUSÕES**

O *Balão RS* apresentou um bom desempenho na coleta de amostras citológicas do esôfago.

Não houve expressão da proteína p53 nas amostras citológicas, e esta negatividade não permitiu comparação com os achados citopatológicos, histológicos e imunoistoquímicos.

Os achados citopatológicos apresentaram sensibilidade moderada para a detecção de lesões histopatológicas precursoras, porém a baixa prevalência de displasia/CEE na amostra determinou um intervalo de confiança muito amplo para que o cálculo das medidas de desempenho diagnóstico seja acurado.

Neste grupo de indivíduos com fatores de risco para CEE aproximadamente um quarto apresentou positividade imunoistoquímica de p53 na camada basal e intermediária do epitélio esofágico. Esta expressão ocorreu em alterações histológicas mínimas e aumentou de maneira significativa com a piora das alterações histopatológicas, porém o mesmo não foi observado no material citológico. Se considerarmos os indivíduos com expressão imunoistoquímica positiva como indivíduos de maior risco dentro desta amostra os achados do presente estudo sugerem que a expressão de p53 em material citológico esofágico não é útil para identificar grupos de maior risco entre os indivíduos expostos a fumo, álcool, chimarrão e com diagnóstico prévio de carcinoma de TADS.

## **8. SUGESTÕES PARA FUTUROS ESTUDOS**

1. Reavaliação dos indivíduos que não apresentaram displasia/CEE, para estudar a evolução das alterações citológicas, histológicas e imunoistoquímicas após 3 anos de acompanhamento, com objetivo de formação de uma coorte.
2. Reavaliação endoscópica e imunoistoquímica dos indivíduos estudados por Fagundes e colaboradores após 10 anos do estudo inicial<sup>88</sup>, com objetivo de estudar a evolução das alterações histológicas e imunoistoquímicas.
3. Avaliação dos *cell blocks* com a coloração de Hematoxilina/Eosina e com a aplicação de diferentes marcadores imunocitoquímicos (p16, pRB, ciclina D1, p63).
4. Estudar o desempenho do *Balão RS* na identificação de lesões precursoras ou câncer esofágico precoce em uma amostra maior de pacientes concentrando-se naqueles com história prévia de carcinoma de TADS.



## **9. ANEXOS**

## Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os indivíduos sob risco

### Rastreamento e prevenção do Carcinoma do Esôfago

O Rio Grande do Sul é uma das regiões do mundo onde mais se encontra o Câncer de Esôfago. O esôfago é um tubo que liga a boca ao estômago. As pessoas que bebem ou fumam e/ou tomam chimarrão, como você, têm um risco maior para desenvolverem câncer do esôfago, assim como as pessoas que já tiveram algum câncer de boca ou garganta.

Estamos realizando uma pesquisa tentando identificar as lesões que aparecem antes que se desenvolva o câncer, para prevenir ou tratar bem no início, aumentando com isso as chances de cura. Caso encontremos alguma alteração em seu esôfago que possa levar ao aparecimento desse câncer no futuro, poderemos orientá-lo (a) para a melhor conduta possível.

Para realizar esta pesquisa queremos examinar o seu esôfago através de duas sondas. Uma tem um pequeno balão na ponta e é introduzida pela boca até o estômago onde o balão é então inflado com ar. Com o balão cheio a sonda é retirada e o balão fará um raspado da parte interna do seu esôfago. A outra é uma sonda endoscópica, que permite olhar dentro do esôfago e retirar pequenos pedaços (biópsias) do seu esôfago. Tanto o raspado como as biópsias serão examinados no laboratório.

Antes da passagem das sondas você receberá uma injeção na veia, que lhe deixará levemente sonolento e lhe permitirá tolerar melhor o exame. A sonda será introduzida pela boca, após o borrifamento da sua garganta com um anestésico. A maioria das pessoas tolera muito bem estes exames, que duram de 10 a 15 minutos. Entretanto algumas pessoas podem sentir vontade de vomitar, tossir ou mesmo um mal-estar na garganta. Após o exame você poderá ficar com a garganta irritada por algumas horas. Existe também um risco, muito pequeno, de complicações pelos exames, tais como reações alérgicas, sangramento ou perfuração do esôfago, podendo nesses casos ser necessárias transfusões de sangue e/ou cirurgias. O resultado dos exames estará pronto em, aproximadamente 7 a 10 dias e você será informado e orientado para os cuidados necessários.

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

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

Local,...../...../.....

-----  
Assinatura do Paciente

-----  
Assinatura do Pesquisador

*Como localizar o pesquisador:*

*Dr. Antônio de Barros Lopes – (51) 2101-8307 e (51) 9991-2021 – Porto Alegre*

**Anexo 2. Questionário a ser aplicado aos pacientes**

Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_ Prontuário:..... Registro protocolo:.....

Nome:.....

Data Nasc: : \_\_/\_\_/\_\_\_\_ Idade..... Sexo: masc (1) fem (2)

Endereço:.....

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

Cidade:..... Profissão:.....

Fuma → sim (1) não (2) no passado (3)

Tempo de tabagismo:.....anos

Tempo de abstenção: &lt; 1 ano (1) &lt;10 anos (2) &gt; 10 anos (3)

Cigarros consumidos/dia:.....

Álcool → sim (1) não (2) no passado (3)

diário (1) 2 – 3 x/sem (2) semanal (3)

Tempo de consumo:.....anos

Tempo de abstenção: &lt; 1 ano (1) &lt;10 anos (2) &gt; 10 anos (3)

Quantidade/dia:..... gramas (percentual x 0,8 x volume/100)

Tipo: destilados (1) cerveja (2) vinho (3)

Chimarrão → sim (1) não (2) no passado (3)

Tempo de consumo:.....anos

Tempo de abstenção: &lt; 1 ano (1) &lt;10 anos (2) &gt; 10 anos (3)

Quantidade/dia:..... ml

Consumo de verduras e frutos diário → sim (1) não (2)

Câncer → Pessoal: sim (1) não (2)

Sítio: TADS (1) Outros (2).....

H Familiar sim (1) não (2) qual:.....

Sítio: TADS (1) Esôfago (2) Outros (3):.....

Avaliação socioeconômica →

Salários mínimos/mês: 1 – 3 (1) 4 – 6 (2) &gt;6 (3)

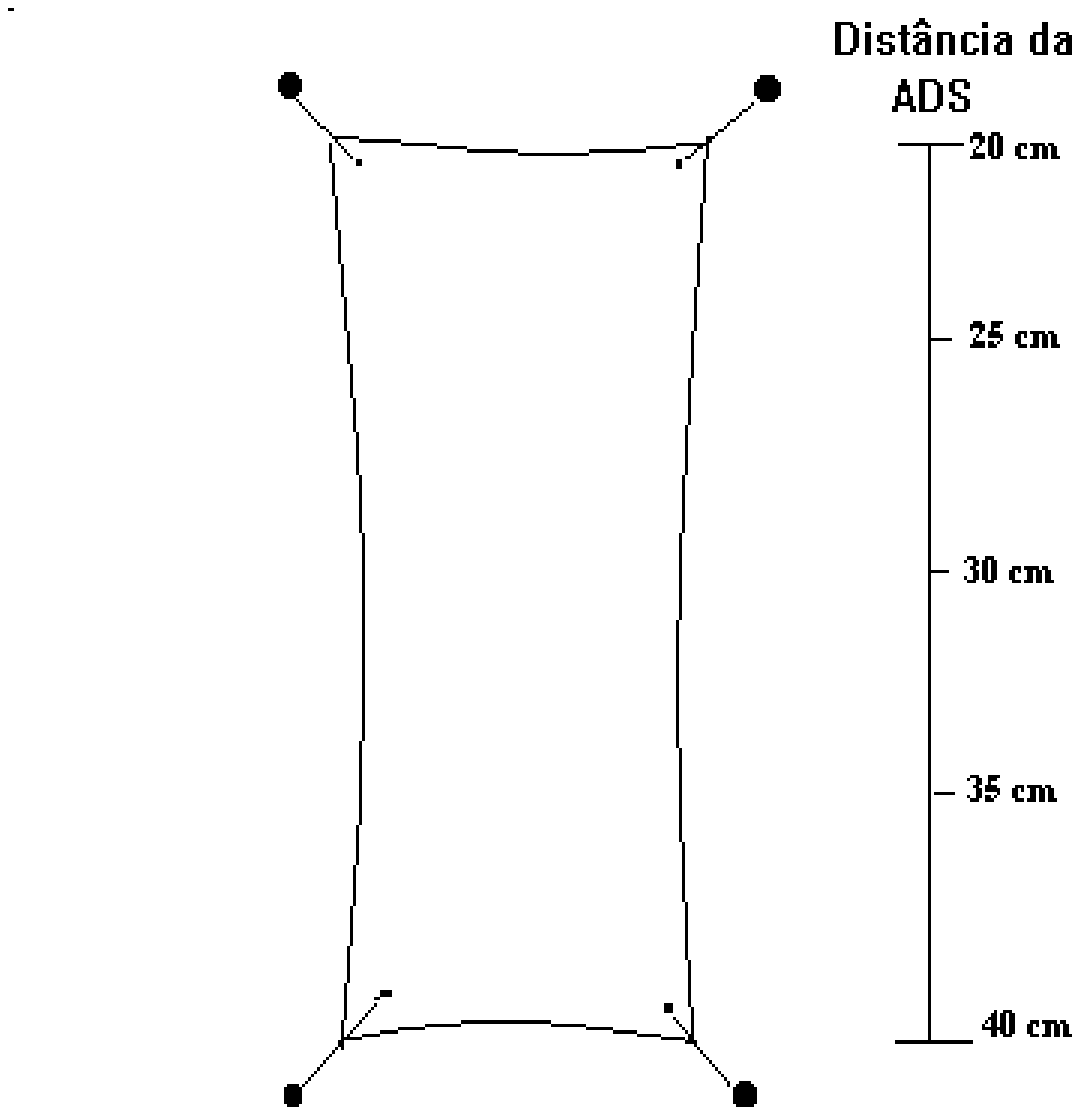
Peças dentárias:..... Moradores na casa:.....

Doenças associadas →

Estenose cáustica (1) Acalásia (2) Outras (3).....

## Anexo 3

## Mapa esquemático do Esôfago



- 2 Área Avermelhada      ● Área biopsiada sem lesão macroscópica à endoscopia  
5 Nódulo  
1 Área esbranquiçada  
3 Área não corada pelo Lugol

O número no interior da figura define o maior diâmetro da alteração em milímetros.

## **10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. *N Engl J Med* 2003;349:2241-2252.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
3. CANCERmondial.Globocan 2002;<http://www-dep.iarc.fr/> ; última consulta em 15/10/2008. 2008.
4. Vizcaino AP, Moreno V, Lambert R, Parkin DM. Time trends incidence of both major histologic types of esophageal carcinomas in selected countries, 1973-1995. *Int J Cancer* 2002;99:860-868.
5. Wei JT, Shaheen N. The changing epidemiology of esophageal adenocarcinoma. *Semin Gastrointest Dis* 2003;14:112-127.
6. Brown LM, Devesa SS, Chow WH. Incidence of Adenocarcinoma of the Esophagus Among White Americans by Sex, Stage, and Age. *J Natl Cancer Inst* 2008.
7. Orengo MA, Casella C, Fontana V, Filiberti R, Conio M, Rosso S, Tumino R, Crosignani P, De L, V, Falcini F, Vercelli M. Trends in incidence rates of oesophagus and gastric cancer in Italy by subsite and histology, 1986-1997. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006;18:739-746.
8. Lagergren J, Bergstrom R, Adami HO, Nyren O. Association between medications that relax the lower esophageal sphincter and risk for esophageal adenocarcinoma. *Ann Intern Med* 2000;133:165-175.
9. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999;340:825-831.
10. Brown LM, Devesa SS. Epidemiologic trends in esophageal and gastric cancer in the United States. *Surg Oncol Clin N Am* 2002;11:235-256.
11. Hampel H, Abraham NS, El-Serag HB. Meta-analysis: obesity and the risk for gastroesophageal reflux disease and its complications. *Ann Intern Med* 2005;143:199-211.
12. de Barros SG, Vidal RM, Luz LP, Ghisolfi ES, Barlem GG, Komlos F, Wolff FH, Breyer HP, Putten AC, Dietz J, Krueel CD, Gruber AC, Prolla JC. [Prevalence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction in a 10 year period at a cancer referral center in southern Brazil]. *Arq Gastroenterol* 1999;36:32-36.
13. 2008 Estimates of Brazilian Cancer Incidence;  
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=tabelaestados.asp&UF=RS>. 2008.
14. Pera M. Trends in incidence and prevalence of specialized intestinal metaplasia, barrett's esophagus, and adenocarcinoma of the gastroesophageal junction. *World J Surg* 2003;27:999-1008.

15. Yang L, Parkin DM, Ferlay J, Li L, Chen Y. Estimates of cancer incidence in China for 2000 and projections for 2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:243-250.
16. Gholipour C, Shalchi RA, Abbasi M. A histopathological study of esophageal cancer on the western side of the Caspian littoral from 1994 to 2003. *Dis Esophagus* 2008;21:322-327.
17. Qiao YL, Hou J, Yang L, He YT, Liu YY, Li LD, Li SS, Lian SY, Dong ZW. [The trends and preventive strategies of esophageal cancer in high-risk areas of Taihang Mountains, China]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2001;23:10-14.
18. Islami F, Kamangar F, Aghcheli K, Fahimi S, Semnani S, Taghavi N, Marjani HA, Merat S, Nasser-Moghaddam S, Pourshams A, Nouraie M, Khatibian M, Abedi B, Brazandeh MH, Ghaziani R, Sotoudeh M, Dawsey SM, Abnet CC, Taylor PR, Malekzadeh R. Epidemiologic features of upper gastrointestinal tract cancers in Northeastern Iran. *Br J Cancer* 2004;90:1402-1406.
19. Boing AF, Vargas SA, Boing AC. [The burden of neoplasm in Brazil: mortality and hospital morbidity from 2002 to 2004]. *Rev Assoc Med Bras* 2007;53:317-322.
20. Prolla JC, Dietz J, da Costa LA. [Geographical differences in esophageal neoplasm mortality in Rio Grande do Sul]. *Rev Assoc Med Bras* 1993;39:217-220.
21. Pandeya N, Williams GM, Sadhegi S, Green AC, Webb PM, Whiteman DC. Associations of duration, intensity, and quantity of smoking with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am J Epidemiol* 2008;168:105-114.
22. Wu AH, Wan P, Bernstein L. A multiethnic population-based study of smoking, alcohol and body size and risk of adenocarcinomas of the stomach and esophagus (United States). *Cancer Causes Control* 2001;12:721-732.
23. Castellsague X, Munoz N, De Stefani E., Victora CG, Castelletto R, Rolon PA, Quintana MJ. Independent and joint effects of tobacco smoking and alcohol drinking on the risk of esophageal cancer in men and women. *Int J Cancer* 1999;82:657-664.
24. Menezes AM, Horta BL, Oliveira AL, Kaufmann RA, Duquia R, Diniz A, Motta LH, Centeno MS, Estanislau G, Gomes L. [Attributed risk to smoking for lung cancer, laryngeal cancer and esophageal cancer]. *Rev Saude Publica* 2002;36:129-134.
25. De Stefani E., Barrios E, Fierro L. Black (air-cured) and blond (flue-cured) tobacco and cancer risk. III: Oesophageal cancer. *Eur J Cancer* 1993;29A:763-766.
26. Fagundes RB, Abnet CC, Strickland PT, Kamangar F, Roth MJ, Taylor PR, Dawsey SM. Higher urine 1-hydroxy pyrene glucuronide (1-OHPG) is associated with tobacco smoke exposure and drinking mate in healthy subjects from Rio Grande do Sul, Brazil. *BMC Cancer* 2006;6:139.
27. Wu M, Zhao JK, Hu XS, Wang PH, Qin Y, Lu YC, Yang J, Liu AM, Wu DL, Zhang ZF, Frans KJ, van 't, V. Association of smoking, alcohol drinking and dietary factors with esophageal cancer in high- and low-risk areas of Jiangsu Province, China. *World J Gastroenterol* 2006;12:1686-1693.

28. Brown LM, Hoover R, Silverman D, Baris D, Hayes R, Swanson GM, Schoenberg J, Greenberg R, Liff J, Schwartz A, Dosemeci M, Pottern L, Fraumeni JF, Jr. Excess incidence of squamous cell esophageal cancer among US Black men: role of social class and other risk factors. *Am J Epidemiol* 2001;153:114-122.
29. Lee CH, Lee JM, Wu DC, Hsu HK, Kao EL, Huang HL, Wang TN, Huang MC, Wu MT. Independent and combined effects of alcohol intake, tobacco smoking and betel quid chewing on the risk of esophageal cancer in Taiwan. *Int J Cancer* 2005;113:475-482.
30. De Stefani E., Munoz N, Esteve J, Vasallo A, Victora CG, Teuchmann S. Mate drinking, alcohol, tobacco, diet, and esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Res* 1990;50:426-431.
31. Fagundes RB, de Barros SG, Putten AC, Mello ES, Wagner M, Bassi LA, Bombassaro MA, Gobbi D, Souto EB. Occult dysplasia is disclosed by Lugol chromoendoscopy in alcoholics at high risk for squamous cell carcinoma of the esophagus. *Endoscopy* 1999;31:281-285.
32. Dietz J, Pardo SH, Furtado CD, Harzheim E, Furtado AD. [Risk factors related to esophageal cancer in Rio Grande do Sul, Brazil]. *Rev Assoc Med Bras* 1998;44:269-272.
33. Jiang JM, Zeng XJ, Chen JS, Li JY, Zhang KL, Wu YP, Liu BQ. Smoking and mortality from esophageal cancer in China: a large case-control study of 19,734 male esophageal cancer deaths and 104,846 living spouse controls. *Int J Cancer* 2006;119:1427-1432.
34. Lubin JH, Alavanja MC, Caporaso N, Brown LM, Brownson RC, Field RW, Garcia-Closas M, Hartge P, Hauptmann M, Hayes RB, Kleinerman R, Kogevinas M, Krewski D, Langholz B, Letourneau EG, Lynch CF, Malats N, Sandler DP, Schaffrath-Rosario A, Schoenberg JB, Silverman DT, Wang Z, Wichmann HE, Wilcox HB, Zielinski JM. Cigarette smoking and cancer risk: modeling total exposure and intensity. *Am J Epidemiol* 2007;166:479-489.
35. Freedman ND, Abnet CC, Leitzmann MF, Mouw T, Subar AF, Hollenbeck AR, Schatzkin A. A prospective study of tobacco, alcohol, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes. *Am J Epidemiol* 2007;165:1424-1433.
36. Tuyns AJ, Pequignot G, Jensen OM. [Esophageal cancer in Ille-et-Vilaine in relation to levels of alcohol and tobacco consumption. Risks are multiplying]. *Bull Cancer* 1977;64:45-60.
37. Vassallo A, Correa P, De SE, Cendan M, Zavala D, Chen V, Carzoglio J, eo-Pellegrini H. Esophageal cancer in Uruguay: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 1985;75:1005-1009.
38. Rossini AR, Hashimoto CL, Iriya K, Zerbini C, Baba ER, Moraes-Filho JP. Dietary habits, ethanol and tobacco consumption as predictive factors in the development of esophageal carcinoma in patients with head and neck neoplasms. *Dis Esophagus* 2008;21:316-321.
39. Brown LM, Hoover R, Gridley G, Schoenberg JB, Greenberg RS, Silverman DT, Schwartz AG, Swanson GM, Liff JM, Pottern LM. Drinking practices and risk of



- squamous-cell esophageal cancer among Black and White men in the United States. *Cancer Causes Control* 1997;8:605-609.
40. Moses MF. Carcinoma de células escamosas do esôfago. História natural, incidência, etiologia e complicações. *Gastroenterol Clin N Am* 1991;20:725-737.
  41. Jelski W, Szmitkowski M. Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the cancer diseases. *Clin Chim Acta* 2008;395:1-5.
  42. Castellsague X, Munoz N, De Stefani E., Victora CG, Quintana MJ, Castelletto R, Rolon PA. Smoking and drinking cessation and risk of esophageal cancer (Spain). *Cancer Causes Control* 2000;11:813-818.
  43. Bosetti C, Gallus S, Peto R, Negri E, Talamini R, Tavani A, Franceschi S, La VC. Tobacco smoking, smoking cessation, and cumulative risk of upper aerodigestive tract cancers. *Am J Epidemiol* 2008;167:468-473.
  44. Wei WQ, Abnet CC, Lu N, Roth MJ, Wang GQ, Dye BA, Dong ZW, Taylor PR, Albert P, Qiao YL, Dawsey SM. Risk factors for oesophageal squamous dysplasia in adult inhabitants of a high risk region of China. *Gut* 2005;54:759-763.
  45. Nasrollahzadeh D, Kamangar F, Aghcheli K, Sotoudeh M, Islami F, Abnet CC, Shakeri R, Pourshams A, Marjani HA, Nourai M, Khatibian M, Semnani S, Ye W, Boffetta P, Dawsey SM, Malekzadeh R. Opium, tobacco, and alcohol use in relation to oesophageal squamous cell carcinoma in a high-risk area of Iran. *Br J Cancer* 2008;98:1857-1863.
  46. Ribeiro JU, Cecconello I, Safatle-Ribeiro AV, Zilberstein B, Pinotti HW. Squamous cell carcinoma of the esophagus and multiple primary tumors of the upper aerodigestive tract. *Arq Gastroenterol* 1999;36:195-200.
  47. Morita M, Kuwano H, Ohno S, Sugimachi K, Seo Y, Tomoda H, Furusawa M, Nakashima T. Multiple occurrence of carcinoma in the upper aerodigestive tract associated with esophageal cancer: reference to smoking, drinking and family history. *Int J Cancer* 1994;58:207-210.
  48. Morita M, Saeki H, Mori M, Kuwano H, Sugimachi K. Risk factors for esophageal cancer and the multiple occurrence of carcinoma in the upper aerodigestive tract. *Surgery* 2002;131:S1-S6.
  49. Morita M, Araki K, Saeki H, Sakaguchi Y, Baba H, Sugimachi K, Yano K, Sugio K, Yasumoto K. Risk factors for multicentric occurrence of carcinoma in the upper aerodigestive tract-analysis with a serial histologic evaluation of the whole resected-esophagus including carcinoma. *J Surg Oncol* 2003;83:216-221.
  50. Do KA, Johnson MM, Doherty DA, Lee JJ, Wu XF, Dong Q, Hong WK, Khuri FR, Fu KK, Spitz MR. Second primary tumors in patients with upper aerodigestive tract cancers: joint effects of smoking and alcohol (United States). *Cancer Causes Control* 2003;14:131-138.
  51. Muto M, Hironaka S, Nakane M, Boku N, Ohtsu A, Yoshida S. Association of multiple Lugol-voiding lesions with synchronous and metachronous esophageal squamous cell carcinoma in patients with head and neck cancer. *Gastrointest Endosc* 2002;56:517-521.

52. Hashimoto CL, Iriya K, Baba ER, Navarro-Rodriguez T, Zerbini MC, Eisig JN, Barbuti R, Chinzon D, Moraes-Filho JP. Lugol's dye spray chromoendoscopy establishes early diagnosis of esophageal cancer in patients with primary head and neck cancer. *Am J Gastroenterol* 2005;100:275-282.
53. Dubuc J, Legoux JL, Winnock M, Seyrig JA, Barbier JP, Barrioz T, Laugier R, Boulay G, Grasset D, Sautereau D, Grigoresco D, Butel J, Scoazec JY, Ponchon T. Endoscopic screening for esophageal squamous-cell carcinoma in high-risk patients: a prospective study conducted in 62 French endoscopy centers. *Endoscopy* 2006;38:690-695.
54. Ahsan H, Neugut AI. Radiation therapy for breast cancer and increased risk for esophageal carcinoma. *Ann Intern Med* 1998;128:114-117.
55. Levi F, Randimbison L, Te VC, La VC. Increased risk of esophageal cancer after breast cancer. *Ann Oncol* 2005;16:1829-1831.
56. Kamangar F, Schantz MM, Abnet CC, Fagundes RB, Dawsey SM. High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:1262-1268.
57. Castellsague X, Munoz N, De Stefani E., Victora CG, Castelletto R, Rolon PA. Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. *Int J Cancer* 2000;88:658-664.
58. De Stefani E., Munoz N, Esteve J, Vasallo A, Victora CG, Teuchmann S. Mate drinking, alcohol, tobacco, diet, and esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Res* 1990;50:426-431.
59. Rolon PA, Castellsague X, Benz M, Munoz N. Hot and cold mate drinking and esophageal cancer in Paraguay. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:595-605.
60. De Stefani E., Munoz N, Esteve J, Vasallo A, Victora CG, Teuchmann S. Mate drinking, alcohol, tobacco, diet, and esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Res* 1990;50:426-431.
61. Krueel CD, Gurski RR, Cavazzola LT, Krueel CRP, Madruga G, Sfair JA. Hot-water effect in the esophageal carcinogenesis experimental model in mice. 1995:199.
62. de Barros SG, Ghisolfi ES, Luz LP, Barlem GG, Vidal RM, Wolff FH, Magno VA, Breyer HP, Dietz J, Gruber AC, Krueel CD, Prolla JC. [High temperature "mate" infusion drinking in a population at risk for squamous cell carcinoma of the esophagus]. *Arq Gastroenterol* 2000;37:25-30.
63. Victora CG, Munoz N, Horta BL, Ramos EO. Patterns of mate drinking in a Brazilian city. *Cancer Res* 1990;50:7112-7115.
64. Kamangar F, Strickland PT, Pourshams A, Malekzadeh R, Boffetta P, Roth MJ, Abnet CC, Saadatian-Elahi M, Rakhshani N, Brennan P, Etemadi A, Dawsey SM. High exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons may contribute to high risk of esophageal cancer in northeastern Iran. *Anticancer Res* 2005;25:425-428.
65. van Gijssel HE, Schild LJ, Watt DL, Roth MJ, Wang GQ, Dawsey SM, Albert PS, Qiao YL, Taylor PR, Dong ZW, Poirier MC. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts

determined by semiquantitative immunohistochemistry in human esophageal biopsies taken in 1985. *Mutat Res* 2004;547:55-62.

66. van Gijssel HE, Divi RL, Olivero OA, Roth MJ, Wang GQ, Dawsey SM, Albert PS, Qiao YL, Taylor PR, Dong ZW, Schragger JA, Kleiner DE, Poirier MC. Semiquantitation of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human esophagus by immunohistochemistry and the automated cellular imaging system. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:1622-1629.
67. Wornat MJ, Ledesma EB, Sandrowitz AK, Roth MJ, Dawsey SM, Qiao YL, Chen W. Polycyclic aromatic hydrocarbons identified in soot extracts from domestic coal-burning stoves of Henan Province, China. *Environ Sci Technol* 2001;35:1943-1952.
68. Roth MJ, Strickland KL, Wang GQ, Rothman N, Greenberg A, Dawsey SM. High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons present within food from Linxian, China may contribute to that region's high incidence of oesophageal cancer. *Eur J Cancer* 1998;34:757-758.
69. Zou XN, Taylor PR, Mark SD, Chao A, Wang W, Dawsey SM, Wu YP, Qiao YL, Zheng SF. Seasonal variation of food consumption and selected nutrient intake in Linxian, a high risk area for esophageal cancer in China. *Int J Vitam Nutr Res* 2002;72:375-382.
70. De Stefani E., Brennan P, Boffetta P, Ronco AL, Mendilaharsu M, eo-Pellegrini H. Vegetables, fruits, related dietary antioxidants, and risk of squamous cell carcinoma of the esophagus: a case-control study in Uruguay. *Nutr Cancer* 2000;38:23-29.
71. De Stefani E., Boffetta P, Fagundes RB, eo-Pellegrini H, Ronco AL, Acosta G, Mendilaharsu M. Nutrient patterns and risk of squamous cell carcinoma of the esophagus: a factor analysis in Uruguay. *Anticancer Res* 2008;28:2499-2506.
72. Abnet CC, Qiao YL, Dawsey SM, Dong ZW, Taylor PR, Mark SD. Tooth loss is associated with increased risk of total death and death from upper gastrointestinal cancer, heart disease, and stroke in a Chinese population-based cohort. *Int J Epidemiol* 2005;34:467-474.
73. Dye BA, Wang R, Lashley R, Wei W, Abnet CC, Wang G, Dawsey SM, Cong W, Roth MJ, Li X, Qiao Y. Using NHANES oral health examination protocols as part of an esophageal cancer screening study conducted in a high-risk region of China. *BMC Oral Health* 2007;7:10.
74. Morita M, Kuwano H, Nakashima T, Taketomi A, Baba H, Saito T, Tomoda H, Egashira A, Kawaguchi H, Kitamura K, Sugimachi K. Family aggregation of carcinoma of the hypopharynx and cervical esophagus: special reference to multiplicity of cancer in upper aerodigestive tract. *Int J Cancer* 1998;76:468-471.
75. Garavello W, Negri E, Talamini R, Levi F, Zambon P, Dal ML, Bosetti C, Franceschi S, La VC. Family history of cancer, its combination with smoking and drinking, and risk of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1390-1393.
76. Lehrbach DM, Nita ME, Cecconello I. Molecular aspects of esophageal squamous cell carcinoma carcinogenesis. *Arq Gastroenterol* 2003;40:256-261.

77. Lambert R, Hainaut P. Esophageal cancer: the precursors (Part II). *Endoscopy* 2007;39:659-664.
78. Dey A, Verma CS, Lane DP. Updates on p53: modulation of p53 degradation as a therapeutic approach. *Br J Cancer* 2008;98:4-8.
79. Silva RLA. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: Ferreira CG and Rocha JC, eds. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Atheneu, 2004:29-42.
80. Robert V, Michel P, Flaman JM, Chiron A, Martin C, Charbonnier F, Paillot B, Frebourg T. High frequency in esophageal cancers of p53 alterations inactivating the regulation of genes involved in cell cycle and apoptosis. *Carcinogenesis* 2000;21:563-565.
81. McCabe ML, Dlamini Z. The molecular mechanisms of oesophageal cancer. *Int Immunopharmacol* 2005;5:1113-1130.
82. Ohbu M, Kobayashi N, Okayasu I. Expression of cell cycle regulatory proteins in the multistep process of oesophageal carcinogenesis: stepwise over-expression of cyclin E and p53, reduction of p21(WAF1/CIP1) and dysregulation of cyclin D1 and p27(KIP1). *Histopathology* 2001;39:589-596.
83. Kaneko K, Katagiri A, Konishi K, Kurahashi T, Ito H, Kumekawa Y, Yamamoto T, Muramoto T, Kubota Y, Nozawa H, Makino R, Kushima M, Imawari M. Study of p53 gene alteration as a biomarker to evaluate the malignant risk of Lugol-unstained lesion with non-dysplasia in the oesophagus. *Br J Cancer* 2007;96:492-498.
84. Hong Y, Miao X, Zhang X, Ding F, Luo A, Guo Y, Tan W, Liu Z, Lin D. The role of P53 and MDM2 polymorphisms in the risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:9582-9587.
85. Rosa AR, Schirmer CC, Gurski RR, Meurer L, Edelweiss MI, Krueel CD. Prognostic value of p53 protein expression and vascular endothelial growth factor expression in resected squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esophagus* 2003;16:112-118.
86. Ikeguchi M, Saito H, Katano K, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N. Clinicopathologic significance of the expression of mutated p53 protein and the proliferative activity of cancer cells in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *J Am Coll Surg* 1997;185:398-403.
87. Fagundes RB, Melo CR, Putten AC, Moreira LF, de Barros SG. p53 immunoexpression: an aid to conventional methods in the screening of precursor lesions of squamous esophageal cancer in patients at high-risk? *Cancer Detect Prev* 2005;29:227-232.
88. Fagundes RB, Mello CR, Tollens P, Putten AC, Wagner MB, Moreira LF, Barros SG. p53 protein in esophageal mucosa of individuals at high risk of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esophagus* 2001;14:185-190.
89. Gao H, Wang LD, Zhou Q, Hong JY, Huang TY, Yang CS. p53 tumor suppressor gene mutation in early esophageal precancerous lesions and carcinoma among high-risk populations in Henan, China. *Cancer Res* 1994;54:4342-4346.
90. Wang GQ, Abnet CC, Shen Q, Lewin KJ, Sun XD, Roth MJ, Qiao YL, Mark SD, Dong ZW, Taylor PR, Dawsey SM. Histological precursors of oesophageal squamous cell

carcinoma: results from a 13 year prospective follow up study in a high risk population. *Gut* 2005;54:187-192.

91. Freitag CP, Barros SG, Kruel CD, Putten AC, Dietz J, Gruber AC, Diehl AS, Meurer L, Breyer HP, Wolff F, Vidal R, Arruda CA, Luz LP, Fagundes RB, Prolla JC. Esophageal dysplasias are detected by endoscopy with Lugol in patients at risk for squamous cell carcinoma in southern Brazil. *Dis Esophagus* 1999;12:191-195.
92. Dawsey SM, Fleischer DE, Wang GQ, Zhou B, Kidwell JA, Lu N, Lewin KJ, Roth MJ, Tio TL, Taylor PR. Mucosal iodine staining improves endoscopic visualization of squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the esophagus in Linxian, China. *Cancer* 1998;83:220-231.
93. Jacob P, Kahrilas PJ, Desai T, Hidvegi D, Walloch J, Yokoo H, Gurley AM, Ostrow JD. Natural history and significance of esophageal squamous cell dysplasia. *Cancer* 1990;65:2731-2739.
94. Pan QJ, Roth MJ, Guo HQ, Kochman ML, Wang GQ, Henry M, Wei WQ, Giffen CA, Lu N, Abnet CC, Hao CQ, Taylor PR, Qiao YL, Dawsey SM. Cytologic detection of esophageal squamous cell carcinoma and its precursor lesions using balloon samplers and liquid-based cytology in asymptomatic adults in Llinxian, China. *Acta Cytol* 2008;52:14-23.
95. Roth MJ, Liu SF, Dawsey SM, Zhou B, Copeland C, Wang GQ, Solomon D, Baker SG, Giffen CA, Taylor PR. Cytologic detection of esophageal squamous cell carcinoma and precursor lesions using balloon and sponge samplers in asymptomatic adults in Linxian, China. *Cancer* 1997;80:2047-2059.
96. Wang LD, Yang HH, Fan ZM, Lu XD, Wang JK, Liu XL, Sun Z, Jiang YN, He X, Zhou Q. Cytological screening and 15 years' follow-up (1986-2001) for early esophageal squamous cell carcinoma and precancerous lesions in a high-risk population in Anyang County, Henan Province, Northern China. *Cancer Detect Prev* 2005;29:317-322.
97. Dawsey SM, Yu Y, Taylor PR, Li JY, Shen Q, Shu YJ, Liu SF, Zhao HZ, Cao SG, Wang GQ, . Esophageal cytology and subsequent risk of esophageal cancer. A prospective follow-up study from Linxian, China. *Acta Cytol* 1994;38:183-192.
98. Dawsey SM, Shen Q, Nieberg RK, Liu SF, English SA, Cao J, Zhou B, Wang GQ, Lewin KJ, Liu FS, Roth MJ, Taylor PR. Studies of esophageal balloon cytology in Linxian, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:121-130.
99. Frantz MA, Prolla JC. Correlation of endoscopic cytology and histology in oesophageal cancer: results in Porto Alegre, RS--Brazil. *Cytopathology* 1996;7:38-53.
100. Barros SG, Prolla JC, Kruel CD, Diehl AR, Dietz J. Population screening for esophageal cancer in southern Brazil: Preliminary results. Unpublished data 1996.
101. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T, Jr., Young N. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002;287:2114-2119.
102. Yang H, Berner A, Mei Q, Giercksky KE, Warloe T, Yang G, Cui J, Suo Z, Zhang S, Nesland JM. Cytologic screening for esophageal cancer in a high-risk population in Anyang County, China. *Acta Cytol* 2002;46:445-452.

103. Wang LD, Hong JY, Qiu SL, Gao H, Yang CS. Accumulation of p53 protein in human esophageal precancerous lesions: a possible early biomarker for carcinogenesis. *Cancer Res* 1993;53:1783-1787.
104. Hu N, Li WJ, Su H, Wang C, Goldstein AM, Albert PS, Emmert-Buck MR, Kong LH, Roth MJ, Dawsey SM, He LJ, Cao SF, Ding T, Giffen C, Taylor PR. Common genetic variants of TP53 and BRCA2 in esophageal cancer patients and healthy individuals from low and high risk areas of northern China. *Cancer Detect Prev* 2003;27:132-138.
105. Hu N, Huang J, Emmert-Buck MR, Tang ZZ, Roth MJ, Wang C, Dawsey SM, Li G, Li WJ, Wang QH, Han XY, Ding T, Giffen C, Goldstein AM, Taylor PR. Frequent inactivation of the TP53 gene in esophageal squamous cell carcinoma from a high-risk population in China. *Clin Cancer Res* 2001;7:883-891.
106. Parenti AR, Rugge M, Frizzera E, Ruol A, Noventa F, Ancona E, Ninfo V. p53 overexpression in the multistep process of esophageal carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 1995;19:1418-1422.
107. Skacel M, Petras RE, Rybicki LA, Gramlich TL, Richter JE, Falk GW, Goldblum JR. p53 expression in low grade dysplasia in Barrett's esophagus: correlation with interobserver agreement and disease progression. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2508-2513.
108. Murray L, Sedo A, Scott M, McManus D, Sloan JM, Hardie LJ, Forman D, Wild CP. TP53 and progression from Barrett's metaplasia to oesophageal adenocarcinoma in a UK population cohort. *Gut* 2006;55:1390-1397.
109. Flens MJ, van d, V, Tadema TM, Huysmans AC, Risse EK, van Tol GA, Meijer CJ. The contribution of immunocytochemistry in diagnostic cytology. Comparison and evaluation with immunohistology. *Cancer* 1990;65:2704-2711.
110. Briffod M, Hacene K, Le D, V. Immunohistochemistry on cell blocks from fine-needle cytopunctures of primary breast carcinomas and lymph node metastases. *Mod Pathol* 2000;13:841-850.
111. Tsai TT, Bongiorno PF, Orringer MB, Beer DG. Detection of p53 nuclear protein accumulation in brushings and biopsies of Barrett's esophagus. *Cancer Detect Prev* 1997;21:326-331.
112. Temam S, Trassard M, Leroux G, Bosq J, Luboinski B, Lenoir G, Benard J, Janot F. Cytology vs molecular analysis for the detection of head and neck squamous cell carcinoma in oesopharyngeal brush samples: a prospective study in 56 patients. *Br J Cancer* 2003;88:1740-1745.
113. Corley DA, Buffler PA. Oesophageal and gastric cardia adenocarcinomas: analysis of regional variation using the Cancer Incidence in Five Continents database. *Int J Epidemiol* 2001;30:1415-1425.
114. De Stefani E., Munoz N, Esteve J, Vasallo A, Victora CG, Teuchmann S. Mate drinking, alcohol, tobacco, diet, and esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Res* 1990;50:426-431.