

**MIGUEL ANGELO MARTINS DE CASTRO JUNIOR**

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO p53 E Ki-67 NA CARCINOGENESE  
ESOFÁGICA INDUZIDA PELA DIETILNITROSAMINA: MODELO EXPERIMENTAL  
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre.  
Programa de Pós-Graduação: Ciências em  
Gastroenterologia.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadores:

Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Kruel

Profa. Dra. Luise Meurer

**PORTO ALEGRE**

**2005**

**À Angela, namorada, eterna esposa, pelo apoio,  
comunhão e pelo zelo aos nossos objetivos.**

**À Gládis e Miguel, que são como únicos, incentivam  
e dedicam-se inteiramente a arte de serem Pais.**

**À Guilherme, meu filho, que ensinou-me a ser Junior  
novamente, pelo seu amor e encantos que o ser,  
Filho, é para um Pai.**

## **AGRADECIMENTOS**

*Ao Professor Doutor Cleber Dario Pinto Kruei, pela aposta e orientações iniciais e por compartilhar sua experiência ao longo da pesquisa.*

*À Professora Doutora Luise Meurer, que demonstrou-se como exemplo a ser seguido e foi a responsável por esta conclusão, demonstrando empenho e liderança, com conhecimento irrefutável. Em especial pela análise das lâminas anátomopatológicas e imunohistoquímica e pela realização em seu Laboratório da imunohistoquímica.*

*À Professora Doutora Maria Isabel Edelweiss, pelas críticas durante a evolução do trabalho, mas principalmente pelo apoio em vários pontos da pesquisa como na revisão, também, das lâminas histológicas para os diagnósticos anatomopatológicos.*

*À Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS*

*Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia da UFRGS.*

*As funcionárias da pós-graduação em Ciências em Gastroenterologia pelo eterno carinho e ajuda que o fazem atendendo os pós-graduandos.*

*À Fundação Universidade Federal de Rio Grande – FURG.*

*À todos colegas do Departamento de Cirurgia da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, pelo apoio nos períodos de afastamento e pela grandiosidade no entendimento da necessidade desse.*

*Ao Hospital Universitário de Rio Grande e Direção, nas pessoas do Professor Doutor Vicente Mariano Pias e Doutor Luiz Roberto Paganini, que apoiaram este projeto e principalmente foram sensíveis à ausência em momentos de dedicação exclusiva da pesquisa.*

*Aos funcionários da Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Eduardo Mottola Amaro da Silveira e Marcos Eugênio Soares Duarte pelo cuidado e trato dos animais durante os experimentos.*

*À Professora Roseli de Oliveira Mollerke, médica veterinária, responsável pela Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que sempre se demonstrou disponível as solicitações do experimento.*

*Ao Professor Tabajara Lucas de Almeida pelo auxílio e orientações estatísticas.*

*Ao Centro Integrado de Patologia pela confecção das lâminas de anatomopatologia.*

*Ao Professor Carlos Renan Varela Juliano pela coordenação de seu Laboratório de Patologia, o Centro Integrado de Patologia, na confecção do trabalho anatomopatológico.*

*Ao Engenheiro e Mestre Fábio, às Professoras Cíntia e Cristiane e à Médica Andréia pelo apoio, abraço e orgulho de estarmos unidos neste momento.*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Ciclo Celular.....	3
2.2 p53.....	9
2.3 Ki-67.....	15
2.4 Imunohistoquímica.....	17
2.5 Carcinogênese Química.....	18
2.6 Temperatura.....	22
3 OBJETIVOS.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Aprovação do Conselho de Ética.....	25
4.2 Animais e Ambiente.....	25
4.3 Experimento.....	26
4.4 Sacrifício.....	31
4.5 Necropsia.....	31
4.6 Preparo do Material.....	34
4.7 Avaliação Imunohistoquímica.....	44
4.8 Leitura de Lâminas.....	44
4.9 Análise Estatística.....	47
5 RESULTADOS.....	48
6 DISCUSSÃO.....	63
7 CONCLUSÕES.....	70
8 PERSPECTIVAS DE PESQUISAS.....	71
9 ANEXO.....	72
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Diferentes mecanismos de desativação da proteína p53.....	10
Figura 2	- Representação esquemática do ciclo celular relacionada com os genes reguladores e proteínas. Bcl-2 codifica a proteína reguladora negativa da apoptose. Ciclina D1 está relacionada à progressão da fase G1 para S. Rb codifica proteína que bloqueia o ciclo induzindo a apoptose.....	12
Figura 3	- Camundongo sacrificado, sendo demonstrado o alcance ao terço médio esofágico, da agulha utilizada para gavagem, qual era infundida água quente ou fria, dependente do grupo que o animal pertencia.....	28
Figura 4	- Fluxograma do experimento. DEN, <i>dietilnitrosamina</i> ; Água Quente ou Fria: refere-se a temperatura da água utilizada na entubação esofágica; Dia 30, 60, 90, 120, 150, refere-se ao dia do experimento que cada grupo de animais foi sacrificado e analisado.....	29
Figura 5	- Demonstração da exposição toracoabdominal.....	32
Figura 6	- Seqüência de exposição esofágica (setas), inicialmente com dissecação abdominal (a) e após com acrescento da dissecação torácica (b).....	33
Figura 7	- Peça esofágica seccionada no hipofaringe (a) e pinçada e após secção no pré-estômago (b).....	33
Figura 8	- Tumoração em terço médio esofágico e necrose central. (10x – camundongo do grupo IV).....	35
Figura 9	- Tumoração esofágica em terço inferior com 1mm de extensão. (10x – camundongo do grupo IV).....	36
Figura 10	- Tumoração esofágica em terço inferior associado a outros focos de formação proliferativa.(10x– camundongo do grupo IV)	37
Figura 11	- Tumoração em terço inferior esofágico . (10x – camundongo do grupo IV).....	38
Figura 12	- Lesão tumoral plana com extensão superior a 1mm . (10x – camundongo do grupo IV).....	39

Figura 13	- Fotomicrografia de esôfago normal com disposição de rolo sobre si mesmo. (HE 200x).....	40
Figura 14	- Fotomicrografia normal (a) e de lesão esofágica classificada como intraepitelial de baixo grau (b), camundongo do grupo III (HE, 200x).....	42
Figura 15	- Fotomicrografia de lesão esofágica classificada como intraepitelial de alto grau, camundongo do grupo IV (HE, 200x)..	43
Figura 16	- Fotomicrografia de lesão esofágica classificada como carcinoma, camundongo do grupo IV(HE, 100x).....	43
Figura 17	- Fotomicrografia de esôfago de camundongo demonstrando expressão imunohistoquímica de p53 (a) e Ki-67 (b) negativos, respectivamente.....	46
Figura 18	- Fotomicrografia de esôfago de camundongo demonstrando expressão imunohistoquímica de p53 (a) e Ki-67 (b) positivos, respectivamente.....	46
Figura 19	- Gráfico de barras demonstrando achados histológicos durante o experimento nos animais que receberam administração complementar de água fria por gavagem (com DEN).....	49
Figura 20	- Gráfico de barras demonstrando achados histológicos durante o experimento nos animais que receberam administração complementar de água quente por gavagem (com DEN).....	50
Figura 21	- Gráfico de barras demonstrando achados histológicos durante o experimento nos animais que receberam DEN independente do tipo de gavagem.....	51
Figura 22	- Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imunohistoquímica de p53 considerados positivos, associados ao tempo no grupo que recebeu DEN e gavagem com água fria.	52
Figura 23	- Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imunohistoquímica p53 considerados positivos, associados tempo grupo recebeu DEN e gavagem com água quente.....	53
Figura 24	- Gráfico de barras demonstrando achados de expressão	54

	imunohistoquímica de p53 considerados positivos, associados ao tempo no grupo que recebeu DEN e gavagem com água fria e quente.....	
Figura 25	- Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imunohistoquímica de Ki-67 considerados positivos, associados ao tempo no grupo que recebeu DEN e gavagem com água fria.	55
Figura 26	- Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imunohistoquímica de Ki-67 considerados positivos, associados ao tempo no grupo que recebeu DEN e gavagem com água quente.....	56
Figura 27	- Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imunohistoquímica de Ki-67 considerados positivos, associados ao tempo no grupo que recebeu DEN e gavagem com água fria e quente.....	57
Figura 28	- Gráfico demonstrando aparecimento da expressão imunohistoquímica de p53 na carcinogênese nos grupos gavagem água fria e quente separadamente.....	58
Figura 29	- Gráfico demonstrando aparecimento da expressão imunohistoquímica de p53 na carcinogênese nos grupos que receberam DEN (independente da gavagem).....	59
Figura 30	- Gráfico demonstrando aparecimento da expressão imunohistoquímica de Ki-67 na carcinogênese nos grupos gavagem água fria e quente separadamente.....	60
Figura 31	- Gráfico demonstrando aparecimento da expressão imunohistoquímica de Ki-67 na carcinogênese nos grupos que receberam DEN (independente da gavagem).....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Categorias de genes celulares envolvidos no ciclo celular e o desenvolvimento de câncer.....	7
Tabela 2	- Ocorrência de alterações patológica e de expressão imunohistoquímica.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DEN	Dietilnitrosamina
DNA	Ácido Desoxiribonuclueico
FURG	Fundação Universidade Federal de Rio Grande
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
INCA	Instituto Nacional do Câncer
RNA	Ácido Ribonucléico
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## RESUMO

O carcinoma epidermóide do esôfago é neoplasia com alta taxa de mortalidade e distribuição geográfica peculiar. O estudo da célula tumoral ou suas diferenciações pré-tumorais, demonstraram ter por análise imunohistoquímica e genética, inúmeros determinantes que podem ajudar no tratamento. Neste trabalho foi avaliada a expressão imunohistoquímica de p53 e ki-67 na carcinogênese esofágica induzida quimicamente através do uso de dietilnitrosamina, em um grupo de 100 camundongos fêmeas. O estudo experimental foi realizado com 4 grupos de animais, onde os grupos I e II foram considerados controles, sendo diferenciados por gavagem esofágica, uma vez semana, com água fria (temperatura ambiente) ou quente (60°-70°C). E os grupos III e IV foram considerados estudos, os quais receberam dietilnitrosamina por 3 dias consecutivos semanalmente, também sendo diferenciados por gavagem, uma vez por semana, com água fria ou quente. O estudo apresentou data progressiva de sacrifícios com colheita de peças esofágicas, que iniciava aos 30 dias de experimento e terminava aos 150 dias. Demonstrou-se que não houve diferença na incidência tumoral quando foi acrescida a variável temperatura da água; provavelmente devido ao episódio único semanal que era adicionado ao animal em experimentação. A análise imunohistoquímica do p53 não evidenciou diferença estatística durante a evolução da carcinogênese até 150 dias, porém quando analisado a relação com alterações patológicas demonstra-se que apresenta significância em relação à patologia baixo grau de displasia, alto grau e carcinoma. A análise imunohistoquímica do ki-67 demonstrou diferença estatística durante a evolução da carcinogênese a partir do dia 120 de experimento e quando

analisada a relação com alterações patológicas demonstrou-se que apresenta significância também em relação à lesão intraepitelial de alto grau e carcinoma.

## ABSTRACT

Epidermoid carcinoma of the esophagus is a neoplasia with high mortality rates and a peculiar geographic distribution. The immunohistochemical and genetic study of tumor cells, or of pre-tumor differentiation processes, provides information which may help to establish more efficient therapeutic protocols. In the present work, the expression of p53 and ki-67 was analyzed by immunohistochemistry in a group of 100 mice in which esophageal carcinogenicity had been induced with diethylnitrosamine. The experimental study was performed with 4 groups of animals. Control groups I and II were treated weekly by esophageal gavage with cold (room temperature) or hot (60°-70°C) water. Study groups III and IV were treated weekly, for 3 consecutive days, with diethylnitrosamine, receiving also esophageal gavage with cold or hot water. The mice were sequentially sacrificed, from day 30 until day 150, for collection and analysis of the esophagus. Tumor incidence was not affected by temperature of the water used for gavage, probably due to the fact that the mice were treated only once a week. The immunohistochemical analysis of p53 did not indicate statistically significant differences on its expression during evolution of the carcinogenic process for a period of 150 days. The protein was however associated with pathological alterations, with significant differences related to low-grade pathology or dysplasia, high grade pathology and carcinoma. The immunohistochemical analysis of ki-67 showed significant differences during carcinogenic evolution from day 120 onwards, as well as an association with high grade pathology and carcinoma.

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de esôfago está associado a baixos índices de sobrevivência. É um dos dez tumores sólidos mais freqüentes mundialmente, com característica variação geográfica em relação a sua incidência. Dois tipos histológicos são responsáveis por 95% dos tumores primários de esôfago: o carcinoma epidermóide e o adenocarcinoma (Souza, 2002).

No Brasil, as neoplasias em geral são a segunda causa de morte, seguindo-se as doenças do aparelho circulatório. Dentre as neoplasias, o carcinoma de esôfago foi a sexta causa de óbitos por câncer em 2000, atrás das neoplasias de pulmão, estômago, mama, cólon e próstata (INCA, 2003). A maior incidência está na região Sul, com 17,86 casos por 100 mil habitantes, aproximadamente 76 % maior que a nacional, de 10,14 casos por 100 mil. Nesta região, o Rio Grande do Sul é o estado de maior incidência, com 22,32 casos por 100 mil habitantes - sendo considerada uma zona de incidência média – e com taxa de mortalidade estimada de 16,21 mortes/100 mil habitantes em 2003, a segunda causa de morte por câncer em homens, no Estado (Kruel, 1999; Coral, 2005).

O carcinoma epidermóide do esôfago é neoplasia com alta taxa de mortalidade e distribuição geográfica peculiar. A etiologia dele está comprovadamente ligada ao uso do tabaco e do álcool, em áreas não endêmicas. Outros fatores etiológicos têm sido implicados e estudados: chás em temperaturas elevadas, ervas com carcinógenos e principalmente compostos N-nitrosos (Barret, 1998; Souza, 2002; Barros, 2000).

Aproximadamente 60% dos pacientes com câncer de esôfago apresentam-se com doença avançada e apresentam mortalidade geral de aproximadamente 90%

(Aloia, 2001) e, por longo período, o único tratamento disponível era a ressecção paliativa cirúrgica ou o tratamento clínico paliativo. Com o objetivo de obter melhores resultados, tem-se proposto o uso de multiterapias, tais como quimioterapia neoadjuvante e radioquimioterapia adjuvante (Sarbia, 1998; Krasna, 1999; Shimoji, 2000; Kajiyama, 2002).

Sendo a sobrevida geral pouco influenciada por essas novas modalidades terapêuticas, questiona-se que esta população apresente características diferentes, havendo outros fatores anteriormente não valorizados (Casson, 2003; Dolan, 2003), ou ainda não estudados, que influenciem o prognóstico (Koide, 2001).

A análise da célula tumoral, ou suas diferenciações celulares pré-tumorais, demonstraram haver, por análise imunohistoquímica e genética (Lehrbach, 2003), inúmeros determinantes que podem ajudar o diagnóstico precoce, o prognóstico, a detecção de metástase oculta, a quimiorresistência, entre outras (Lam, 1997; Inada, 1999). Estes são denominados marcadores tumorais, que são produtos (proteínas), ou de alterações de genes, ou de proliferação celular aumentada, entre outros.

O estudo de Aloia (2001) pode servir como exemplo. O autor avaliou, por estudo retrospectivo, a utilidade da expressão imunohistoquímica de 10 marcadores tumorais para prever sobrevida por peças patológicas de carcinoma esofágico. Todos os casos apresentavam estadiamento T1-3N0M0. Demonstrou, por análise multivariada, que, nos 61 pacientes da amostra, houve relação significativa entre evolução para óbito relacionado ao câncer e os marcadores p53 e fatores de proliferação celular. E, principalmente, demonstrou que o número de marcadores tumorais envolvidos correlacionava-se negativamente com o prognóstico ( $p < 0,0001$ ).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Ciclo Celular

O ciclo celular é o conjunto de modificações que uma célula sofre entre sua formação, pela divisão da célula mãe, e o momento em que essa célula termina por dividir-se em duas células filhas, graças à mitose (Maillet, 2003).

É de suma importância definir os elementos envolvidos com o ciclo celular e, secundariamente, com a carcinogênese:

- Gene: é um segmento de DNA, que contém o arquivo completo da seqüência de aminoácidos para fabricar uma cadeia polipeptídica específica, como uma proteína (Bevilacqua, 1997; Farah, 1997; Louro, 2000).
- Proto-oncogenes: são genes reguladores fisiológicos da diferenciação e proliferação celular (Bevilacqua, 1997; Farah, 1997; Louro, 2000).
- Oncogenes: são genes, cujos produtos são reguladores importantes do crescimento e da diferenciação de células, pois estimulam a divisão celular. Nas células normais, codificam proteínas reguladoras do ciclo celular, da diferenciação ou migração celulares, cujos produtos mutantes causam profundas alterações destas funções celulares, podendo levar à transformação maligna. A versão mutante é excessivamente ativa, promovendo continuamente a duplicação celular autonomamente, tendo um caráter dominante, pois um único alelo pode afetar o fenótipo da célula. Entretanto, nenhum oncogene é capaz

de induzir, isoladamente, uma célula normal para o fenótipo maligno (Bevilacqua,1997; Farah, 1997; Louro, 2000).

- Genes supressores tumorais: são genes que codificam proteínas inibidoras da proliferação celular, ou relacionadas com a apoptose. A perda, inativação ou mutação, durante a carcinogênese, leva à proliferação celular “desregulada”, à perda da integridade do DNA ou à inibição da apoptose. Mutações nestes genes têm caráter recessivo, sendo necessária a perda das duas cópias do gene normal para manifestação desta perda de função reguladora que, nestes casos, resulta na ausência da proteína. As alterações mais freqüentes encontradas nos tumores associados a estes genes são deleções, que propiciam a inativação gênica, por perda total ou parcial da seqüência correspondente, ou por mutações de ponto, que resultam em proteína inativa (Bevilacqua,1997; Farah, 1997; Louro, 2000).
- Genes de Reparo do DNA (*mismatch repair genes*): a reprodução fiel de uma célula exige que seus eventos sejam coordenados na seqüência correta, para que a mitose não aconteça antes de todos os cromossomos terem sido replicados, e a célula tenha duplicado de tamanho. Estes genes são responsáveis pela manutenção da integridade do genoma e pela fidelidade da transferência de informações (Bevilacqua,1997; Farah, 1997; Louro, 2000).

O ciclo de divisão celular consiste de quatro fases: G1 (Gap1); S (Síntese do DNA); G2 (Gap2); e M (Mitose) (Louro, 2000).

A proliferação e diferenciação celular dependem de eventos coordenados, que incluem: (1) duplicação precisa do DNA; (2) divisão eqüitativa dos cromossomos

durante a divisão celular; (3) divisões especificamente programadas para cada tipo celular; e (4) controle diferencial da expressão gênica no tempo e no espaço. O equilíbrio necessário para o funcionamento harmônico destes eventos depende, por sua vez, de mecanismos biológicos, que assegurem (1) incorporação correta das bases nitrogenadas na molécula de DNA em replicação; (2) ligação dos cromossomos ao fuso mitótico e segregação das cromátides irmãs na anáfase; e (3) recepção e tradução corretas dos sinais que induzem a proliferação e a diferenciação celulares (Bevilacqua, 1997; Louro, 2000).

Uma alteração genética em uma simples célula, conferindo a qualidade de proliferação, pode dar início à expansão desordenada de clones de células, promovendo seleção natural de populações com maior capacidade de crescimento que as células vizinhas, tão logo, formando-se a massa tumoral (Fagundes, 2000; Fagundes, 2001).

A neoplasia é o resultado de uma seleção natural entre células somáticas e aparece quando alguns controles celulares independentes são perdidos, em decorrência de um número crítico de mutações que irão afetar o crescimento ou a diferenciação celular (Bishop, 1991).

Ocorrem características na transformação das células sadias para as tumorais, e estas são adquiridas sucessivamente e não simultaneamente (Étienne, 2003):

- Imortalização (possibilidade de um número teoricamente ilimitado de divisões).
- Transformação:
  - Perda da “inibição de contato”: as células não param mais sua multiplicação, quando entram em contato entre si. Elas se

encavalam e formam pequenos focos formados por muitas camadas de células, que se empilham em vez de formar camadas mononucleares. A forma das células também é modificada e pode-se ver prolongamentos que se infiltram entre as células vizinhas;

- Perda da “necessidade de ancoragem”: as células não têm mais necessidade de ancorar-se sobre um meio sólido para se dividir.

A perda do controle ocorre em decorrência de alterações envolvendo genes ou seus produtos, que estão relacionados com o sistema de reparo do DNA (*mismatch repair genes*) e com genes relacionados ao controle do ciclo celular e com a tradução dos sinais de diferenciação celular, como os oncogenes e os genes supressores tumorais (Tabela 1). Tais alterações, genericamente chamadas de mutações, decorrem de (Liu, 2002):

- Mudanças discretas na molécula do DNA, que resultam na substituição de bases nitrogenadas, sendo detectadas em nível molecular e chamadas de mutações de Ponto.
- Mudanças mais grosseiras, que comprometem a estrutura do cromossomo ou alteram o número de cariótipo normal, sendo detectadas por análise citogenética (translocações, deleções, fusões cêntricas, duplicações, inversões, ampliações, euploidias e aneuploidias), levando os proto-oncogenes a serem ativados a oncogenes, ou os genes supressores tumorais e de reparo do DNA a ter sua atividade silenciada.

Muitos tumores resultam de múltiplas mutações genéticas, cuja combinação final é responsável pela regulação do crescimento e da diferenciação

celular (Fujiki, 2002). Estas alterações são consideradas a base da carcinogênese em múltiplas etapas. O carcinoma de esôfago encontra-se entre os que apresentam múltiplas alterações cromossômicas progressivas e compreende mutações em oncogenes ou em genes de supressão tumoral (Rosen, 1994). Entretanto, nenhum oncogene, é capaz de induzir isoladamente uma célula normal para o fenótipo maligno. A combinação de pelo menos dois oncogenes tem de estar presente para que ocorra a transformação maligna (Bevilacqua, 1997).

Tabela 1-Categorias de genes celulares envolvidos no ciclo celular e o desenvolvimento de câncer (Peralta-Zaragoza, 1997)

Categoria	Gene*	Função	Alteração
I	c-ras, c-myc, c-abl, c-5rc, c-fos, c-jun, c-ets	Fatores de transcrição e tradução	Aumento de sua função
II	p53, Rb, APC1, MPC1, p16, p21, p27, Wi	Pontos de controle do ciclo celular. Crescimento e proliferação	Degradação ou perda da função
III	A) bcl-2, bax B) p53, c-myc, fatores como TNF e FAZ	Inibe apoptose Induz apoptose	Expressão aumentada da função Degradação ou perda da função

\* Inclui proto-oncogenes, oncogenes e genes supressores

A ocorrência de mutações é significativamente aumentada pela ação de diversos agentes, que são capazes de lesar o DNA, de um modo ou em uma frequência tal, que escapam aos mecanismos de controle e reparo de DNA. Estes agentes são de natureza física, química ou biológica e potencialmente podem levar à transformação maligna, induzindo mutações de ponto ou alterações cromossômicas que envolvam diretamente oncogenes ou genes supressores tumorais ou, de modo indireto, lesando genes de reparo do DNA (Bevilacqua, 1997).

As células cancerosas diferem das células normais em muitas características, incluindo a perda da capacidade de diferenciação, o aumento da invasividade e a diminuição da sensibilidade a drogas citotóxicas (Peralta-Zaragoza, 1997). A alta incidência de câncer, como uma função da longevidade celular, sugere que múltiplas alterações gênicas são necessárias para o processo de carcinogênese (Volgelstein, 1993).

A transformação maligna é um processo que se desenvolve em múltiplas etapas e que, na maioria das vezes, resulta no acúmulo de várias mutações envolvendo diferentes genes. Tem sido proposto que, no decorrer deste processo, uma primeira mutação, a qual não determina mudança fenotípica, confere propriedades que permitem, em cultura, o crescimento celular contínuo (imortalização). Uma segunda mutação determina aumento da proliferação que se torna ainda maior, quando acontece uma terceira mutação, a qual promove também a perda das características estruturais. A quarta, e muitas outras mutações que se sucedem, levam ao fenótipo maligno. Estas diferentes etapas envolvidas no processo da transformação maligna são reguladas por muitos oncogenes relacionados ao processo da carcinogênese, principalmente os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais, os quais também tem um papel importante no controle do crescimento e do ciclo celular (Bevilacqua, 1997; Étienne, 2003).

Os marcadores tumorais são instrumentos para estabelecer diagnóstico, estimar prognóstico, monitorizar tratamento, detectar recorrência e *screening*. Em comparação com outras doenças malignas do trato gastrointestinal, há poucos biomarcadores adequados para carcinoma epidermóide de esôfago (Sugimachi, 1987; Kawaguchi, 2000).

## 2.2 p53

O p53 configura-se como tendo o principal papel nas neoplasias humanas, e mutações foram primeiramente descritas em carcinoma epidermóide de esôfago por Hollstein *et al.* em 1990.

O p53 localiza-se no braço curto do cromossomo 17, mais precisamente na região 17, p.13.1, codificando uma fosfoproteína nuclear de 53kD que contém 393 aminoácidos e que é o principal regulador negativo do ciclo celular, estando envolvido na divisão, diferenciação celular e apoptose (Klumb, 2002; Étienne, 2003).

A perda da função do gene p53 pode ocorrer em duas formas básicas (Chang, 1995) (Figura 1):

- Alterações no gene p53, determinando a ocorrência de proteína alterada;
- Inativação funcional da proteína p53, pela formação de complexos protéicos com oncoproteínas virais ou celulares, ou pelo deslocamento da proteína para o citoplasma.

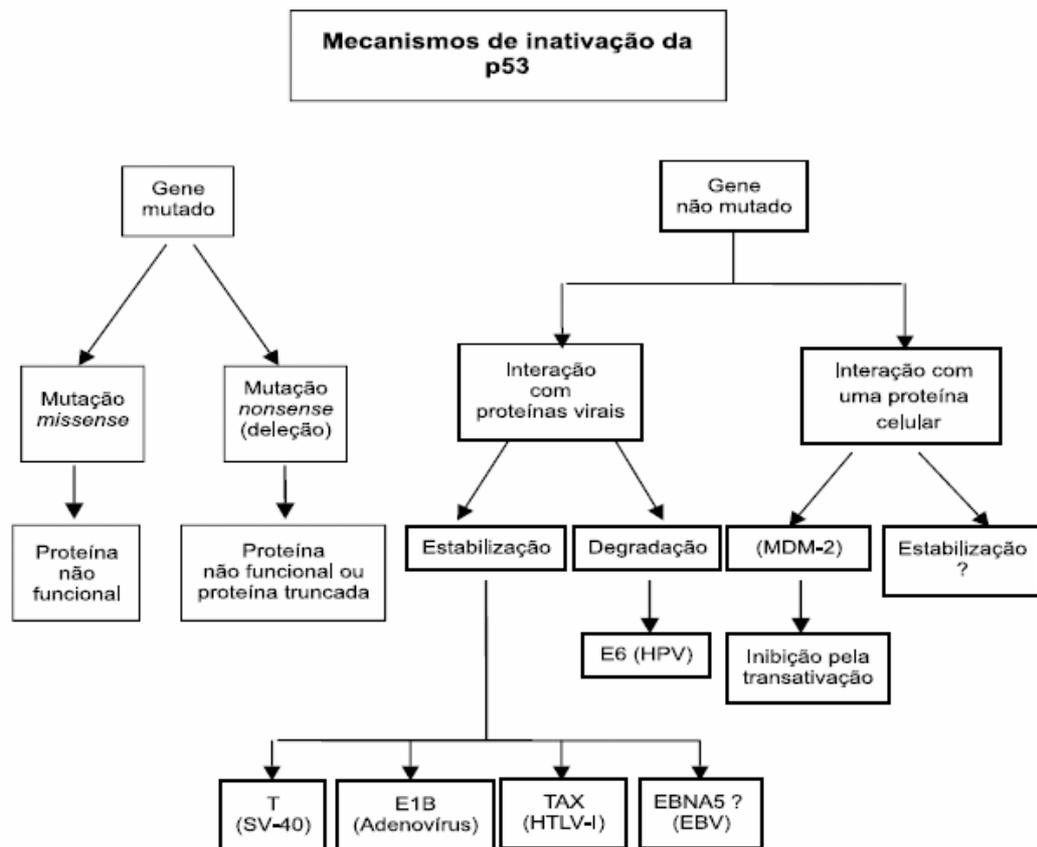


Figura 1 – Diferentes mecanismos de desativação da proteína p53 (Klumb, 2002).

O p53 tem a função de regular o ciclo celular. Com o dano a algum segmento de DNA, há aumento dos níveis de proteína codificada por este gene, o que causa parada deste ciclo e permite que o DNA seja reparado, ou que seja programada a apoptose (Lane, 1992). Esta proteína foi eleita, pela Revista Science, em 1993, como a molécula do ano, devido às importantes funções no mecanismo de proliferação, diferenciação, reparo e morte celular, tendo também considerável importância clínica, uma vez que mutações de p53 induzem maior instabilidade genômica.

O p53 está relacionado com múltiplas funções celulares com real objetivo de manter intacto o genoma através do aprisionamento do ciclo celular nos pontos de restrição (*checkpoints*) G1/S e G2/M de células lesionadas ou sob efeito inibitório

sobre o ciclo celular (Klumb, 2002). O p53 auxilia no processo de mitose por ação de mecanismos de armação do fuso celular e por duplicação dos centrossomos, coordenando segregação cromossômica durante a mitose. Por isso é denominada de gene supressor de tumores (Sherr, 1994).

Ao contrário dos outros genes supressores de tumor, que são inativos por perda hélica, o gene p53 distingue-se pela alta freqüência de mutações. A maioria destas mutações é do tipo *missense* (troca de nucleotídeo) e altera a função normal da proteína p53. Como resultado de mutações pontuais, a proteína tem sua meia vida aumentada e se acumula nas células tumorais. Também, embora em menor freqüência, as mutações podem ser do tipo *nonsense* em virtude de deleções de porções do gene ou inserção de nucleotídeos. Este tipo de mutação pode levar a um *stop códon* (parada da leitura do RNA mensageiro), alterando a proteína e, em última análise, a ocorrência de uma proteína truncada. Em síntese, a inativação da proteína p53 por mutação, perda, seqüestração ou ligação a outras proteínas como proteínas virais, pode levar ao aumento da proliferação, à instabilidade genômica e à perda de importantes mecanismos de controle do ciclo celular. Por outro lado, muitos quimioterápicos, utilizados no tratamento das neoplasias, promovem dano ao DNA e conseqüente indução da apoptose via p53. A perda desta função pode resultar em resistência à apoptose e em falha terapêutica (Klumb, 2002).

Na presença de dano ao DNA, a proteína p53 se acumula e promove a expressão do gene WAF1/Cip1, cujo produto protéico – p21, liga-se as quinases ciclina-dependentes (CDKs) e inibe sua atividade. Desta forma, o ciclo celular é interrompido antes da síntese do DNA. À célula é dada a oportunidade de reparar o DNA lesado (Agarwal, 1998). Se tal reparo não ocorre de forma satisfatória, a presença do p53 íntegro pode, alternativamente, induzir à apoptose (Figura 2),

embora uma via de apoptose independente da p53 tenha sido identificada (Klumb, 2002). É melhor eliminar uma célula com um genoma lesado do que deixá-la multiplicar-se.

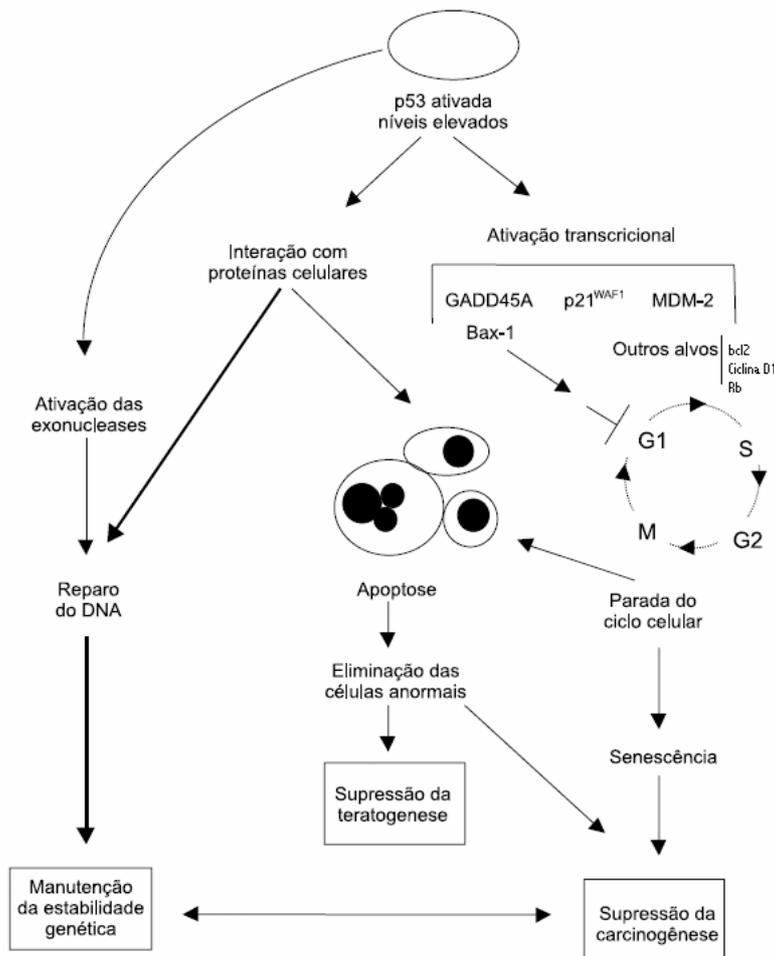


Figura 2 - Representação esquemática do ciclo celular relacionada com os genes reguladores e proteínas. Bcl-2 codifica a proteína reguladora negativa da apoptose. Ciclina D1 está relacionada à progressão da fase G1 para S. Rb codifica proteína que bloqueia o ciclo induzindo a apoptose (modificado de Faccini, 1997; Klumb, 2002)

A expressão do p53 íntegro (*wild-type*) suprime a transformação de células em cultura e o potencial neoplásico de células animais. Deleções ou mutações na forma íntegra do p53 ocorrem em vários tumores, tanto em animais como em

humanos (Baker, 1990). A inibição do crescimento tumoral e sua função essencial na apoptose já foram demonstradas (Fujiwara, 1989).

O p53, portanto, evoluiu de uma classificação de antígeno tumoral para oncogene e atualmente para gene supressor tumoral, o qual determina uma regulação negativa da divisão e ao crescimento celulares, emergindo como um fator essencial em muitos tipos de cânceres humanos. Está relacionado intimamente à resistência à radioterapia e à quimioterapia. O gene normal permite, ou o reparo, ou induz à apoptose em resposta à lesão do DNA. Entretanto, p53 mutado resulta em anormalidades funcionais, levando à radio e quimiorresistência (Brown, 1999).

Alterações no gene conduzem à perda da ação negativa, resultando em rápida proliferação celular. Desenvolve imortalização celular e o desenvolvimento de neoplasias *in vivo*. Isto é observado quando a célula se expõe a agentes que lesam o DNA. A elevação dos níveis de p53 induz as células a se deterem ao final da fase G1 e repararem as lesões de DNA por mecanismos próprios, antes de continuar com a sua replicação na fase S. Entretanto, as células com esta proteína mutada não interrompem o ciclo celular, quando existem evidências de que o DNA sofreu danos (Evans, 1997).

A curta meia vida da proteína normal dificulta a sua detecção, porém a proteína mutante é detectada pelos anticorpos monoclonais, por possuir maior estabilidade e meia-vida mais longa e por acumular-se no núcleo (Souza, 1997).

No esôfago, foi detectada em um terço de tecido normal, em dois terços de displasias de baixo grau, em quatro quintos de amostras de displasias de alto grau, em três quartos de carcinomas epidermóides e em três quartos de espécimes de adenocarcinomas esofágicos e áreas de displasias de alto grau em torno do tumor (Parenti, 1995).

A regulação de p53 é importante no contexto deste trabalho, uma vez que a técnica de detecção por imunohistoquímica é positiva, quando ocorre acúmulo intranuclear de proteína conseqüente de mutações somáticas do gene ou diminuição de degradação, quando ocorre diminuição da ubiquitinação e proteólise da proteína. A mutação desta leva a uma menor capacidade de degradação da proteína, com conseqüente acúmulo intracelular, que pode ser detectado e comparado com tecidos normais ou com quantidade não alterada (Hall, 1994; Harris, 1993).

O gene p53 mutado produz uma proteína mais estável que a do gene normal, configurando que mensurações quantitativas por análise imunohistoquímica, que detectam proteína relacionada a este gene, em várias neoplasias, são freqüentemente devidas ao gene mutado (Iggo, 1990; Levine, 1991).

Pelo estudo de sítios de mutação, pesquisadores têm buscado estabelecer um padrão das alterações carcinogênicas para cada órgão e associá-las aos possíveis fatores etiológicos (Lutz, 1998). Esta mutação torna o DNA mais suscetível a agentes ambientais que atuam nas células com o p53 mutado, tornando-as mais vulneráveis e alterando os mecanismos de reparo do DNA.

Já foi demonstrado, em modelos animais, que a administração de peptídeos, que promoveriam a atividade correta do gene p53 e conseqüentemente da proteína correta, melhoraria a sobrevida em experimentos oncológicos (Lane, 2002).

### 2.3 KI-67

O segundo fator estudado nesta pesquisa, o Ki-67, que tem sido útil na avaliação da proliferação celular em tecidos de animais de experimentação, e é essencial para estudos de toxicologia e carcinogênese, e também para avaliar a eficácia de drogas citotóxicas e quimiopreventivas na pesquisa do câncer (Muskhelishvili, 2003).

O Ki-67 é um antígeno nuclear associado com a proliferação celular, encontrado em todo o ciclo celular (fases G1, S, G2, M) e ausente em G0. Através da análise imunohistoquímica, tem-se buscado correlacionar sua expressão com o comportamento tumoral. É descrita uma correlação positiva no tumor de mama, em tumores de células basais, em lesões vulvares, no tumor de laringe e esôfago (Lam, 2000). Já no carcinoma epidermóide da cavidade oral, no tumor de adrenal, no câncer gástrico e de cólon, esta correlação não foi encontrada.

Por outro lado, o antígeno definido pelo anticorpo monoclonal Ki-67 é uma proteína nuclear humana encontrada em todas as partes ativas do ciclo celular, sendo largamente empregada como marcador de proliferação. O anticorpo monoclonal Ki-67 reconhece a parte lábil do antígeno nuclear, o qual está presente nas células em proliferação (i.e., células nas fases G1, S, G2 e M), mas não em células na fase G0. O uso do Ki-67 está restrito ao tecido a fresco, pois o epítipo não sobrevive à fixação histológica de rotina em formaldeído. MIB-1 é um verdadeiro anti-Ki-67 equivalente, que pode ser empregado em tecidos fixados em formalina e em tecidos rotineiramente processados com recuperação antigênica através de microondas. Uma das técnicas imunohistoquímicas na avaliação da proliferação celular é a detecção do Ki-67 (Xu, 2002; Muskhelishvili, 2003).

É uma proteína não histônica, com peso molecular aparente de 345 a 349 Kd, sendo sua denominação decorrente de sua identificação em Kiel (Alemanha) na 67ª placa de cultura tecidual, tratando-se de uma IgG<sub>1</sub> de camundongo, produzida contra uma fração nuclear da linhagem celular L428 da doença de Hodgkin, alcançando sua maior expressão nas fases G2 e M. De vida média de uma hora, o cromossomo 10 parece ser aquele envolvido na síntese protéica determinante deste antígeno no ciclo celular. Assim, vários trabalhos referenciam o Ki-67 como protetor clínico do comportamento biológico das neoplasias malignas, pois diagnostica a síntese do DNA da neoplasia com o aumento da marcação de células malignas com este antígeno (Zhang, 2001). Outro aspecto que merece ser ressaltado é a definição das margens cirúrgicas pelo Ki-67, pois demonstram a invasão tumoral por vezes não detectadas à microscopia óptica, sendo o aumento de sua positividade determinante de índices de mau prognóstico.

Diante da presença de neoplasias indiferenciadas, o Ki-67 é o melhor marcador de proliferação celular atualmente disponível. Todavia, como não marca as células em G<sub>0</sub>, ao marcar o comportamento de crescimento populacional, permite estabelecer uma relação direta com o prognóstico, o qual deverá, de toda a forma, ser acrescido daquelas células (G<sub>0</sub>) não marcadas. Isto permite prever a utilização do marcador como diagnóstico de diferenciação entre benignos e malignos, nos pacientes onde a dúvida persiste, em situações que a histopatologia não consegue diferenciá-los pela metodologia habitualmente empregada, como a microscopia óptica.

Vale salientar que o emprego do Ki-67 pode ter impacto no prognóstico das neoplasias pouco diferenciadas ou em lesões displásicas, onde o grau de indiferenciação e de displasia seria determinante do prognóstico destas neoplasias

quanto à sua malignidade e ao comportamento ao longo do seguimento destes pacientes submetidos à cirurgia que pode ser associada à radioterapia. Todavia, seriam necessárias amostras de pacientes em número suficiente e que permitissem diferenciar os padrões de citoqueratinas de alto ou baixo peso molecular, os índices mitóticos, bem como o de imunoproliferação do Ki-67.

## **2.4 Imunohistoquímica**

O diagnóstico convencional do câncer tem se apoiado primariamente no exame histopatológico, que é baseado, fundamentalmente, em critérios morfológicos e o julgamento do que é anormal pode ser influenciado pelo treinamento e pela experiência do observador. O diagnóstico molecular é baseado em critérios mais objetivos, tais como presença, ausência ou prevalência de sinais obtidos a partir de uma análise de amostra tecidual. A interpretação de resultados tende a ser menos sujeita à variabilidade do observador (Sander, 2001; Segal, 2002).

Os genes importantes no desenvolvimento do câncer são atingidos por mecanismos bem conhecidos, como mutações de ponto, lesões em porções cromossômicas, ampliações gênicas e interferências por proteínas virais (Krontiris, 1995). Tais alterações levam a uma perda ou um ganho de função da proteína codificada pela seqüência alterada, influenciando no controle da proliferação celular, na diferenciação e na morte das células (Saeki, 2002). As alterações moleculares podem ser estudadas em nível de DNA, RNA e proteínas, sendo que as informações são utilizadas para diagnóstico, prognóstico e tratamento.

O estudo de proteínas oferece informações sobre aumento, diminuição e gera localização celular. No estudo de biópsias, os métodos mais utilizados são imunohistoquímica, imunofluorescência e *westernblot*, sendo que os métodos imunoenzimáticos (ELISA) são os mais utilizados para detecção de proteínas séricas em pacientes com câncer (Nakashima, 2003).

O estudo de proteínas alteradas foi muito simplificado com o desenvolvimento de imunohistoquímica, empregando anticorpos policlonais ou monoclonais e se aplica ao estudo de oncogenes (Krishnadath, 1995).

Aumento de expressão de p53, por exemplo, ocorre por acúmulo intranuclear da proteína após mutações que provocam diminuição da degradação protéica. Anticorpos anti-p53 detectam aumento de proteína que, em trabalhos clínicos, têm sido relacionados com caráter mais agressivo dos tumores, quando hiperexpresso no núcleo celular (Kubba, 1999; Shimada, 2000; Shimada, 2001; Shimada, 2002; Shimada 2003).

## **2.5 Carcinogênese Química**

Na China, a incidência de neoplasia de esôfago é tão elevada que, em algumas áreas, chega a 170 casos por 100.000 habitantes por ano. Pesquisas que se iniciaram neste país em 1972 têm sugerido que os compostos chamados N-nitrosos e seus precursores estão entre os fatores etiológicos envolvidos na incidência elevada do câncer esofágico nas províncias do norte. Tanto compostos N-nitrosos, como nitritos e nitratos, foram detectados em níveis elevados em vários

alimentos e na água potável consumida na região e os resultados comparados com os obtidos de regiões onde a incidência deste tumor é baixa, sendo que a correlação foi altamente significativa (Mirvish, 1983)

Os compostos N-nitrosos são, hoje, considerados um grupo de substâncias orgânicas resultantes da interação entre nitritos e aminas, formando as nitrosaminas, entre nitritos e amidas, formando as nitrosamidas e os nitritos e as uréias, formando as nitrosuréias. Desde a descoberta da ação carcinogênica de uma das mais conhecidas nitrosaminas, em 1956, a nitrosodimetilamina, cerca de 300 nitrosaminas já foram identificadas como carcinogênicas em experimentos com animais, incluídos mamíferos (entre eles os macacos), répteis, pássaros, anfíbios e peixes. Sem dúvida, todas as espécies testadas mostraram vários graus de susceptibilidade e é muito improvável que o homem seja uma exceção (Mirvish, 1983; Lijinsky, 1987; Barret, 1998).

As aminas podem ser encontradas em muitos alimentos e fármacos, e nitratos e nitritos, em alimentos e na água, além de fazerem parte dos conservantes alimentares. Estes agentes químicos exigem ativação pela isoenzima citocromo P450, encontrada nas células hepáticas e epiteliais, para formação do metabólito ativo final capaz de se ligar ao DNA e iniciar o processo carcinogênico (Mori, 2002).

As nitrosaminas podem ser formadas a partir de substâncias comuns, como as aminas secundárias, terciárias e quaternárias, mediante combinação destas com nitritos, reação chamada de nitrosação. Essa reação ocorre sob variadas condições de pH e temperatura, de modo que as nitrosaminas podem formar-se no solo, durante o armazenamento ou o preparo de alimentos ou, endogenamente, por ação de bactérias ou de macrófagos ativados que catalisam a união de aminas e nitritos ou reduzem nitratos a nitritos (Bartsch, 1991).

As aminas não são intrinsecamente ativas e devem ser primeiro ativadas através de enzimas pelos organismos e usualmente produzem tumores distantes dos locais de aplicação. As nitrosaminas, por outro lado, têm sua atividade biológica associada a sua estrutura química e desenvolvem tumores, principalmente nos locais de aplicação. Estes compostos promovem o desenvolvimento de carcinomas mediante mutação celular e comportam-se como agentes alquilantes, reagindo com proteínas e ácidos nucleicos do DNA e RNA celular, promovem modificações nas estruturas de suas bases púricas e pirimídicas, causando profundas alterações, tanto no núcleo como nas demais estruturas celulares (Bartsch, 1991; Krueel, 1992).

Assim, estes compostos mostram notável grau de especificidade orgânica, a qual varia de acordo com suas estruturas químicas e tumores têm sido induzidos na maioria dos órgãos de roedores e outros animais pela administração de seus diferentes tipos, sob as mais variadas condições experimentais (Mori, 2002; Shirai, 2002; Waddell, 2003).

O grande poder carcinogênico de determinadas nitrosamidas sobre o esôfago deriva de sua capacidade de oxidar as longas cadeias de carbonos alfa do epitélio esofágico e liberar íons metildiazônicos capazes de produzir metilação do DNA (Lijinsky, 1983).

Dentre os agentes químicos, as nitrosaminas são uma potente classe de carcinógenos. Estes efeitos, provocados, diretamente ou por meio de metabólitos ativos, se dão tanto sobre a iniciação quanto sobre a promoção tumoral (Miller, 1981).

Embora diferentes fatores etiológicos, já mencionados, possam estar associados com o carcinoma epidermóide, somente as nitrosaminas são capazes de induzir tumores no esôfago de animais de experimentação (Craddock, 1993).

As nitrosaminas são pré-carcinógenos, e somente após uma reação de biotransformação resultam em carcinógenos finais, que irão reagir com o DNA. A biotransformação de nitrosaminas gera compostos instáveis, com uma meia-vida curta e altamente reativas. Estes compostos reativos não conseguem escapar do local em que são formados, reagindo com várias macromoléculas, entre elas o DNA (Ristamäki, 1997). Existem diferentes posições no DNA capazes de sofrer ataques pelos produtos do metabolismo das nitrosaminas, mas a principal base pré-mutagênica formada é a O<sup>6</sup>-alquilguanina que, durante a divisão celular, leva à incorporação errônea de timidina, ao invés de citosina, gerando assim uma mutação transicional de G-C: A-T. Quando esta mutação ocorre em certos codons de determinados genes responsáveis pelo crescimento celular (proto-oncogenes), como no caso do *ras*, ou de genes responsáveis pelo controle do crescimento celular (genes supressores de tumor), como no caso do p53, estes genes podem perder suas respectivas funções, gerando assim uma perda do controle da proliferação celular (Ristamäki, 1997). Portanto, a susceptibilidade do esôfago de ratos a nitrosaminas deve-se principalmente ao fato da conversão de as nitrosaminas em carcinógenos finais ocorrer preferencialmente neste tecido (Lijinsky, 1992).

No presente trabalho, adotou-se a *dietilnitrosamina* (DEN). Trata-se de uma substância química do grupo das nitrosaminas, de peso molecular 102,1, constituída de um radical nitroso ligado a quatro átomos de carbono e dez de hidrogênio – C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O (IARC, 1978). É um carcinógeno completo, produzindo indução e promoção tumoral em vários espécimes animais, com preferência pelo sistema

respiratório, sistema digestivo alto, fígado e rins. Administrada na água de beber, na concentração de 0,04mg/1000ml, durante três dias, tornou-se a dose preconizada em vários modelos experimentais. Tem ela a finalidade de diminuir a mortalidade pela ação hepatotóxica da DEN (Rubio, 1987).

## **2.6 Temperatura**

O hábito da ingestão de substâncias com temperaturas elevadas, por exemplo, chimarrão, seria um dos aspectos relacionados à maior incidência de câncer esofágico no sul do Brasil, Uruguai e nordeste da Argentina (Barros, 2000). Este hábito é comum em áreas com maior incidência de câncer esofágico e não é comum nas outras áreas com menor incidência (Muñoz, 1987). A injúria térmica potencializaria a ação de outros carcinógenos ingeridos.

Investigações epidemiológicas, correlacionadas com temperatura do chá, demonstraram não haver associação entre o ato de beber nas temperaturas consideradas ideais e o câncer de esôfago, porém, ingerir em temperaturas altas (55-67°C) foi associado com um aumento de 2 a 3 vezes o risco de desenvolvimento de câncer esofágico (Yang, 1993).

Kruel (1995) demonstrou, em experimentos com animais de laboratório, que a água em temperatura superior a 60°C pode potencializar o efeito de carcinógenos em contato com a mucosa esofágica. Utilizou a administração de alimentação oral crônica de N-metil-N-nitrosoguanidina (MNNG) e água quente aos animais, e obteve

resultado de desenvolvimento de neoplasia esofágica superior aos grupos controles de animais que receberam água quente cronicamente, ou só MNNG.

Em outro estudo experimental com ratos F344, onde dentre os vários grupos em que foi dividida a amostra, foi demonstrado que a adição de gavagem isoladamente, sem adição de carcinógenos, independentemente da temperatura (ambiental, 55°C e 65°C), não foi demonstrado indução tumoral. Quando, entretanto, nos demais grupos, esta variação das temperaturas foi associada ao carcinógeno N-nitrosometilbezilamina, foi evidenciado que, com o aumento da temperatura, aumentou significativamente o número e o volume dos tumores esofágicos. E ainda, foi demonstrado que a temperatura de 65°C ou superior, foi fator independente para evolução da neoplasia, inibindo a ação de substâncias citoprotetoras (Li, 2003). Os resultados finais foram obtidos a partir de uma amostra de nove a onze animais por grupo, com período de experimento que somou 24 semanas.

Entretanto, estes dados e hipóteses, não foram determinados *in vivo*, especificamente, no grau de variação da temperatura que causa dano e mecanismo potencialmente envolvido, necessitando serem mais amplamente esclarecidos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **Objetivo Geral**

- Avaliar a expressão imunohistoquímica do p53 e Ki-67 em lesões esofágicas induzidas em camundongos pela dietilnitrosamina.

#### **Objetivos Específicos**

- Analisar achados anatomopatológicos durante a carcinogênese esofágica em camundongos induzida pela dietilnitrosamina.
- Avaliar o potencial da água quente na promoção de tumores esofágicos em associação ou não com a dietilnitrosamina em camundongos.
- Comparar achados entre imunohistoquímica e histologia durante a carcinogênese esofágica em camundongos induzida pela dietilnitrosamina.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Aprovação do Conselho de Ética**

Este trabalho foi submetido à análise da Comissão Científica e da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS, como o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e pelo *Office For Human Research Protections* (OHRP)/USDHHS, como o *Institucional Review Board* (IRB0000921), sendo aprovado na data de 13 de outubro de 2003, recebendo o número de protocolo: 03-345.

### **4.2 Animais e Ambiente**

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*, cepa CF1), num total de 100 fêmeas, com 60 dias de vida e peso médio inicial de 30 gramas, provenientes do biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde.

Os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal, do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em condições estáveis de umidade, temperatura (19 ° - 21°C), fluxo contínuo de ar e ciclo de 12 horas de claro e escuro (luz 9:00h - 21:00h). Todos os animais foram adaptados a estas condições,

sete dias antes de entrarem em experimento nesta mesma unidade. Mantidos em gaiolas plásticas, dez por recipiente, com grade metálica servindo de tampa, e fundo forrado com serragem. Estas eram higienizadas conforme rotina da Unidade de Experimentação Animal.

Foram obedecidos todos os princípios éticos no tratamento dos animais, evitando-se dor e desconforto durante os procedimentos (Goldin, 1997). O trabalho enquadrou-se às Normas de Utilização de Animais em Projetos de Pesquisa da Comissão de Ética em Saúde/GPPG/HCPA, Resolução Normativa 04/97. Foram supridas as necessidades básicas de alimentação e conforto, em consonância com os preceitos baseados no NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIRC): *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Research Council. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996.

### **4.3 Experimento**

As gaiolas foram numeradas de acordo com a divisão dos animais entre os grupos de maneira individual, cada uma mostrando etiquetas plastificadas, em que constava o grupo a que pertenciam os animais, os óbitos ocorridos e suas datas, as substâncias administradas na água para beber e a substância correspondente à gavagem esofágica. Os animais permaneceram na mesma gaiola até o óbito ou o sacrifício.

A partir do primeiro dia de experimento, foi acrescentado o carcinógeno DEN (*diethylnitrosamine*) (ANEXO A), na concentração 0,04mg/1000ml, na água dos

animais do Grupo Estudo, e oferecida semanalmente, por três dias consecutivos (terças, quartas e quintas-feiras), para indução de tumores, conforme modelo experimental de Rubio (1987) e Krueel (1992), mantendo-se alimentação padrão. A água para beber e para preparo das soluções foi da rede pública de abastecimento de Porto Alegre. Os animais tiveram livre acesso à ração (ANEXO B) e água potável durante todo o estudo.

A dietilnitrosamina foi fornecida pelo Laboratório de Toxicologia e Biologia Molecular, do Professor Luís Felipe Ribeiro Pinto da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, na cidade do Rio de Janeiro. Todas as soluções foram preparadas no Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Foi administrada aos animais, por gavagem, água quente (60°-70° C) ou fria (temperatura ambiente), conforme cada grupo, utilizando-se uma agulha especialmente para esta finalidade (Figura 3). A gavagem era realizada uma vez por semana, e repetida semanalmente durante todo o experimento (figura 4). Tal escolha baseou-se no estudo prévio, que demonstrou a eficiência da semanalidade da gavagem com intuito de potencializar a carcinogênese (Krueel, 1995)

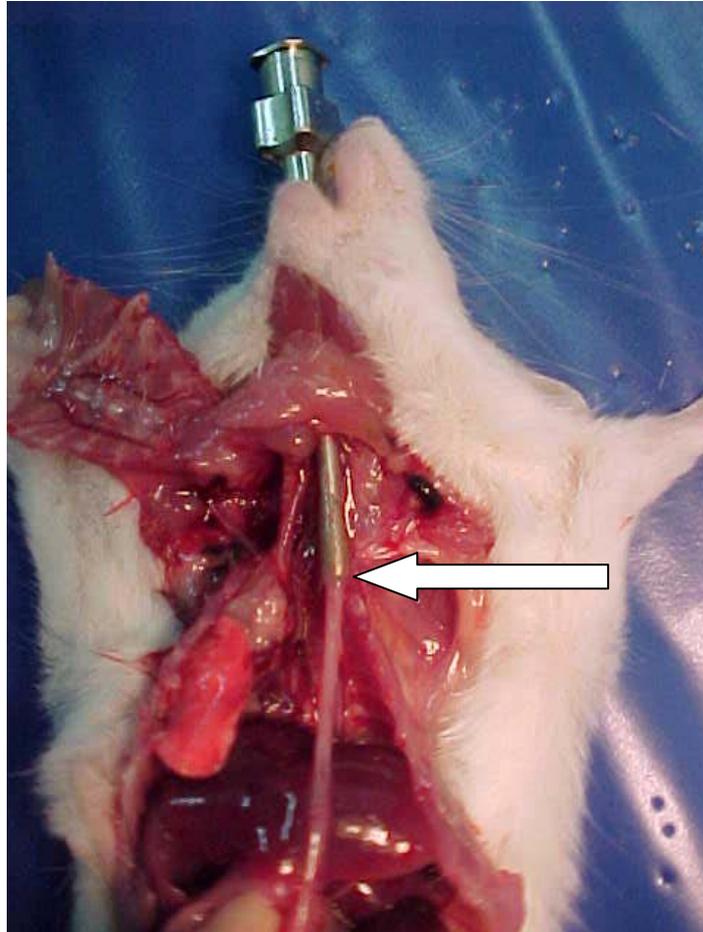


Figura 3 - Camundongo sacrificado, sendo demonstrado o alcance ao terço médio esofágico, da agulha utilizada para gavagem, qual era infundida água quente ou fria, dependente do grupo que o animal pertencia.

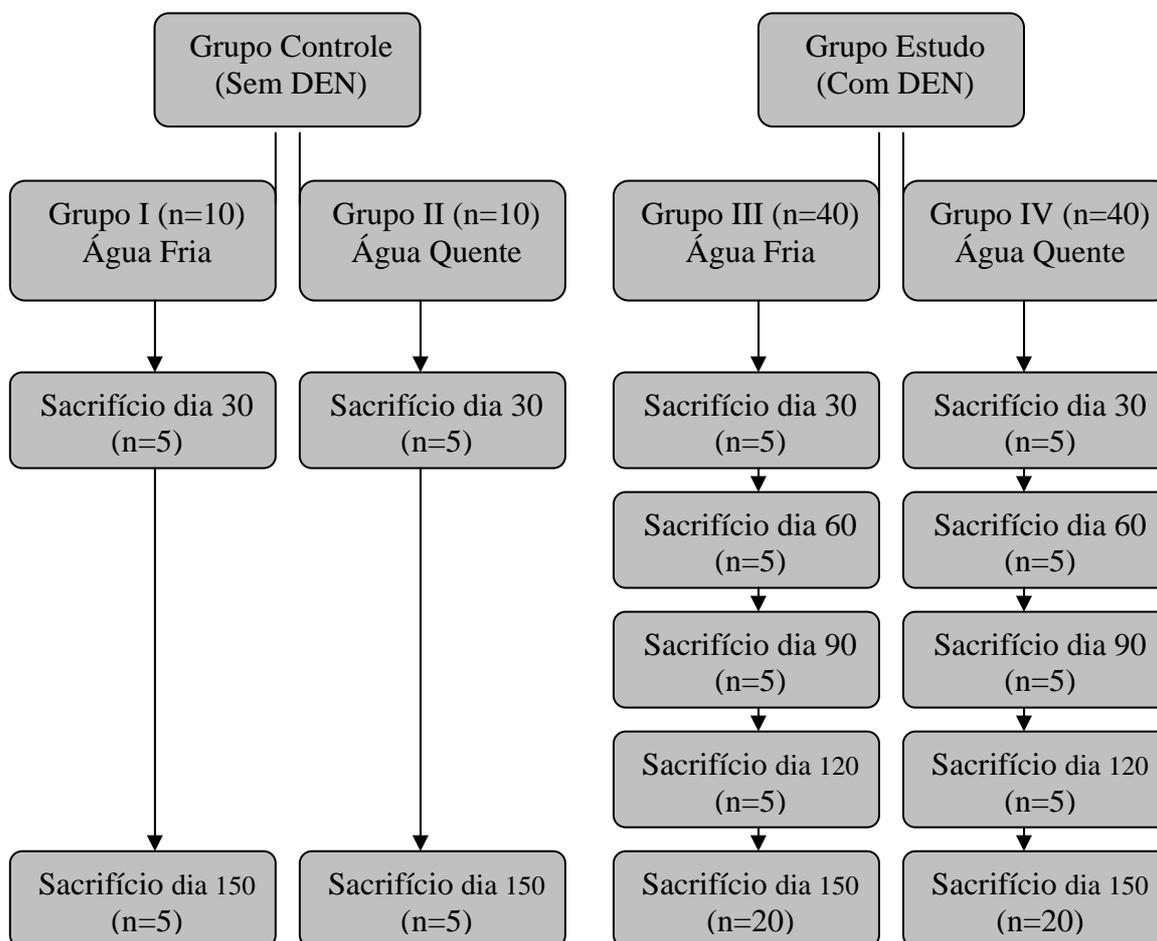


Figura 4 – Fluxograma do experimento. DEN, *dielnitrosamina*; Água Quente ou Fria: refere-se a temperatura da água utilizada na entubação esofágica; Dia 30, 60, 90, 120, 150, refere-se ao dia do experimento que cada grupo de animais foi sacrificado e analisado.

A administração das substâncias líquidas, conforme fluxograma, ocorreu da seguinte forma:

-Grupo I recebeu água *ad libitum*, como única fonte hídrica, durante todo o experimento, renovada às segundas, quartas e sextas-feiras; e gavagem esofágica, uma vez por semana, com água fria.

-Grupo II recebeu água *ad libitum*, como única fonte hídrica, durante todo o experimento, renovada às segundas, quartas e sextas-feiras; e gavagem esofágica, uma vez por semana, com água quente.

-Grupo III recebeu água *ad libitum*, como fonte hídrica, de sextas a terças-feiras; nas terças-feiras, a água era substituída por uma solução de DEN, que permanecia por 72 horas (terças, quartas e quintas-feiras); e gavagem, uma vez por semana, com água fria.

-Grupo IV recebeu água *ad libitum*, como fonte hídrica, de sextas a terças-feiras; nas terças-feiras, a água era substituída por uma solução de DEN, que permanecia por 72 horas (terças, quartas e quintas-feiras); e gavagem, uma vez por semana, com água quente.

Os animais foram sacrificados, conforme diretrizes do fluxograma, em condutas eram diferentes entre grupo controle e grupo estudo:

-Grupo Controle: sacrifícios de metade da amostra do Grupo I e II, no dia 30 de experimento, e cinco restantes da amostra, no dia 150.

-Grupo Estudo: sacrifício de 5 animais de cada amostra dos grupos III e IV, no dia 30, 60, 90,120 de experimento, e dos 20 animais restantes dos grupos, no dia 150.

#### **4.4 Sacrifício**

No dia assinalado, cada animal do grupo foi sacrificado em câmara de CO<sub>2</sub>.

#### **4.5 Necropsia**

O animal era posicionado em decúbito dorsal, sobre uma prancha, procedendo-se a fixação das patas. Abertura da pele foi por incisão mediana da região púbica a submentoniana.

A abertura do peritôneo, deu-se sobre linha média, iniciando ao nível do púbis até o apêndice xifóide, e após, lateralmente, margeando rebordos costais. A ressecção costal bilateral, iniciou nos gradeados costais inferiormente, ascendendo ao manúbrio, incluindo esterno, com conseqüente exposição da região toracoabdominal (Figura 5).

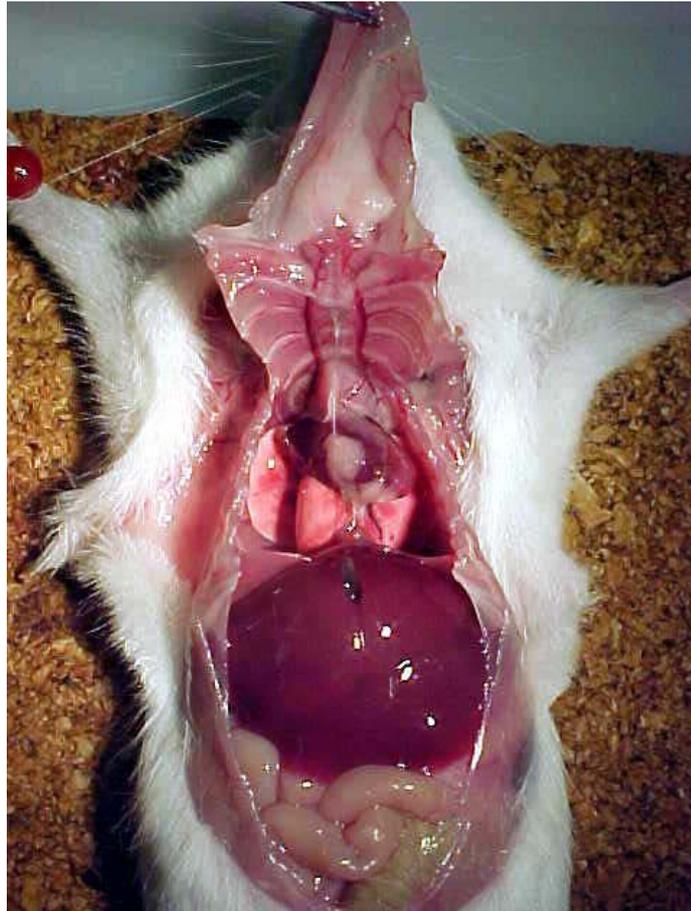


Figura 5 – Demonstração da exposição toracoabdominal.

A dissecação esofágica foi realizada, sendo inicialmente aplicada, sobre o estômago, suave tração e identificação da extremidade inferior deste. Foi iniciada na região da cárdia, extendendo-se cranialmente pelo mediastino posterior (Figura 6). Foi feita dissecação, ora romba, ora com secção de estruturas, incluindo ligamento pulmonar inferior, aorta, ázigos e, já na região cervical, onde traquéia e esôfago tornam-se uma estrutura única formando a hipofaringe, sendo o esôfago seccionado neste ponto. Este, em sua extremidade caudal, foi seccionado na porção diretamente inferior ao pré-estômago (Figura 7).

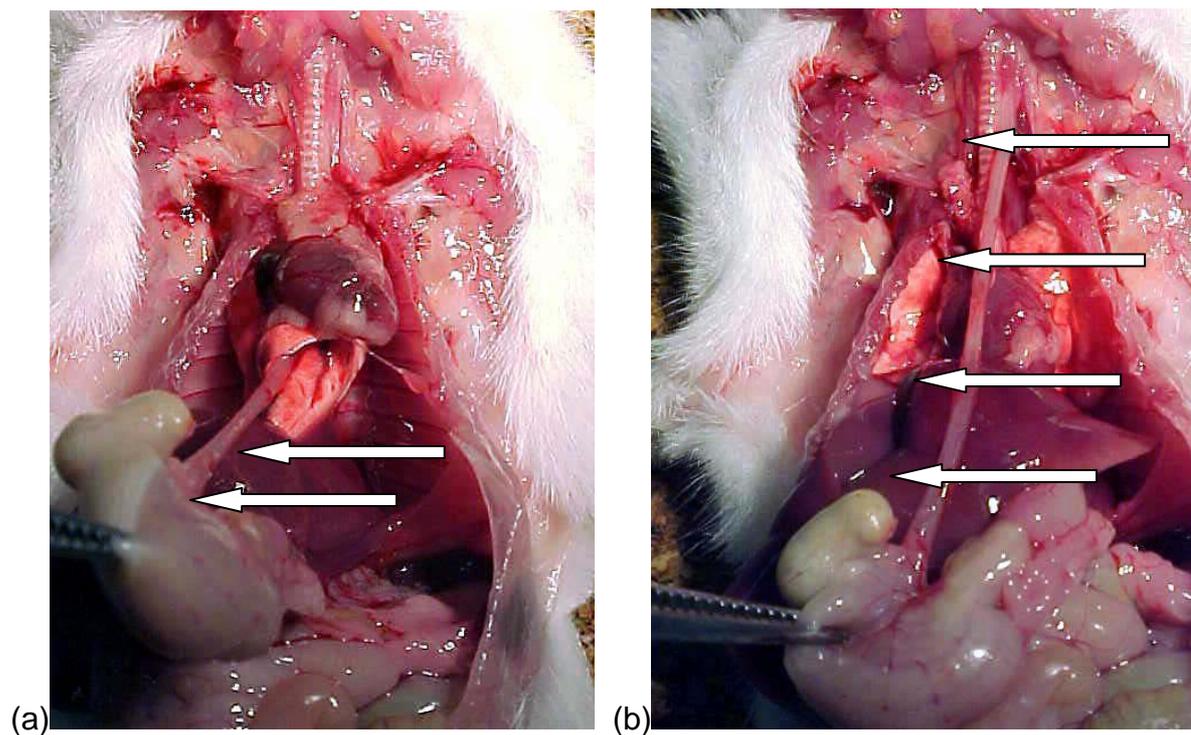


Figura 6 – Seqüência de exposição esofágica (setas), inicialmente com dissecção abdominal (a) e após com acréscimo da dissecção torácica (b).

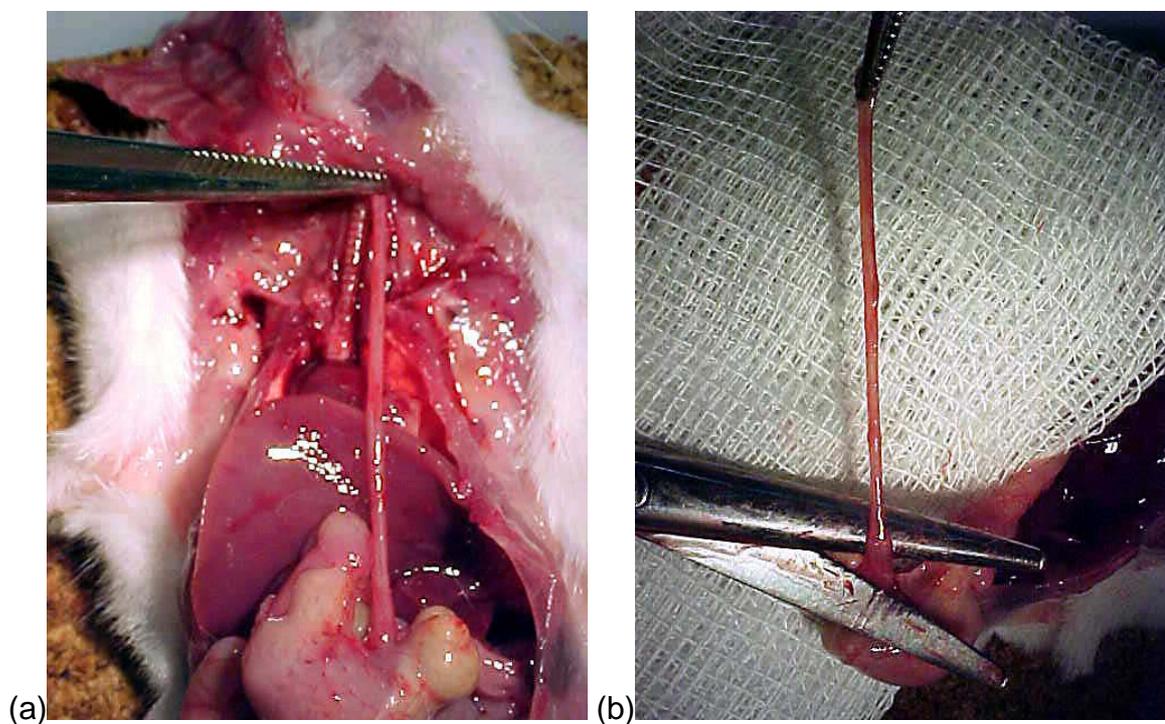


Figura 7 – Peça esofágica seccionada no hipofaringe (a) e pinçada e após secção no pré-estômago (b).

Os corpos dos animais foram recolhidos e acondicionados em freezer, sendo destinados conforme as rotinas do Centro de Experimentação Animal.

#### **4.6 Preparo do Material**

O esôfago era, inicialmente, acomodado sobre um segmento de cortiça, sendo seccionado e aberto longitudinalmente, por sua luz, a partir da introdução de tesoura de ponta fina caudalmente, por toda sua extensão. Suas extremidades eram então fixadas com alfinetes, deixando toda a mucosa à mostra.

O material destinado à patologia era mantido estendido sobre a cortiça e acondicionado em potes plásticos, devidamente identificados pelo grupo, com formol a 10%. Eram mantidos aí até encaminhamento ao Serviço de Patologia.

As peças esofágicas dos 20 animais do grupo estudo (Grupo III e IV), sacrificados aos 150 dias de experimento, foram submetidos ao exame de contagem tumoral e, depois, sorteadas cinco das peças esofágicas destes animais, as quais receberam tratamento semelhante ao descrito acima. Esta metodologia foi adotada para manter padronizado o número de animais por momento de sacrifício e apenas para servir de comparação na contagem tumoral dos Grupos III e IV.

Para a contagem tumoral, os segmentos esofágicos, inicialmente fixados em pequenas placas de cortiça e mantidos totalmente estendidos, possibilitavam abertura de sua luz e exposição da mucosa. Esta era realizada com auxílio de lupa, sendo considerados como tumores, lesões maiores e iguais a 1 mm. (Figuras 8,9,10,11 e 12).

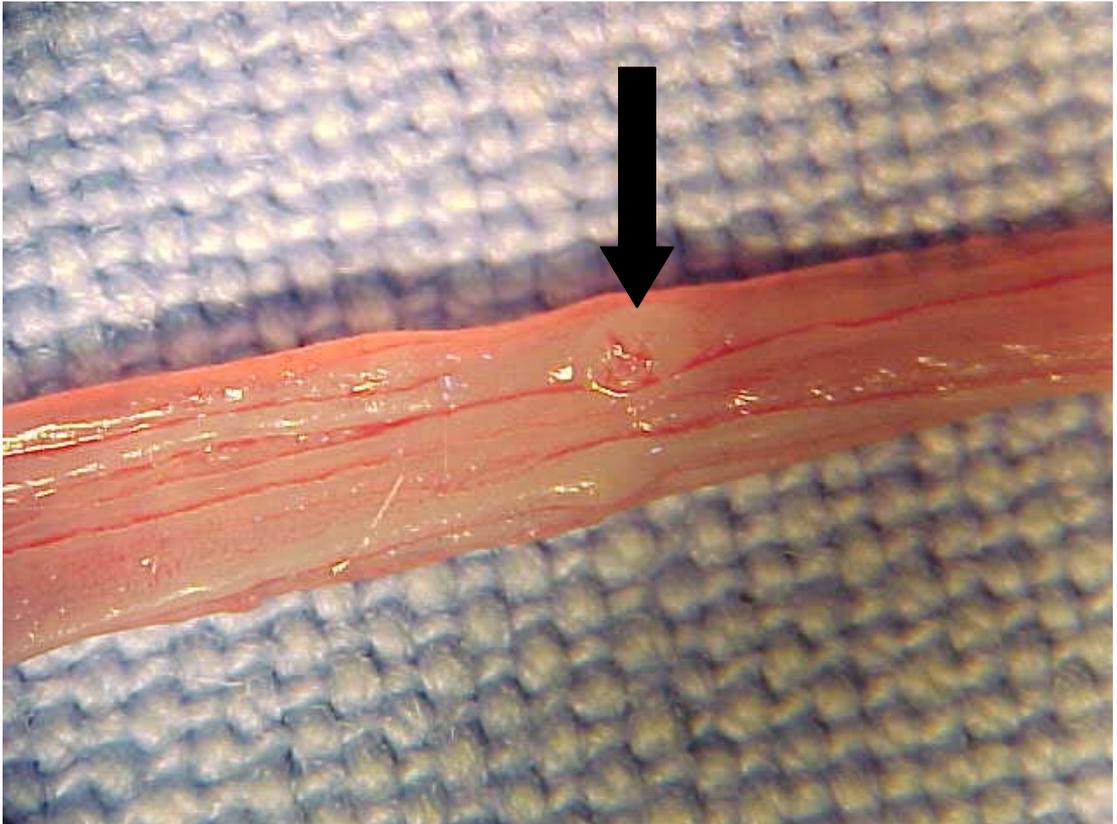


Figura 8 – Tumoração em terço médio esofágico e necrose central. (10x – camundongo do grupo IV)

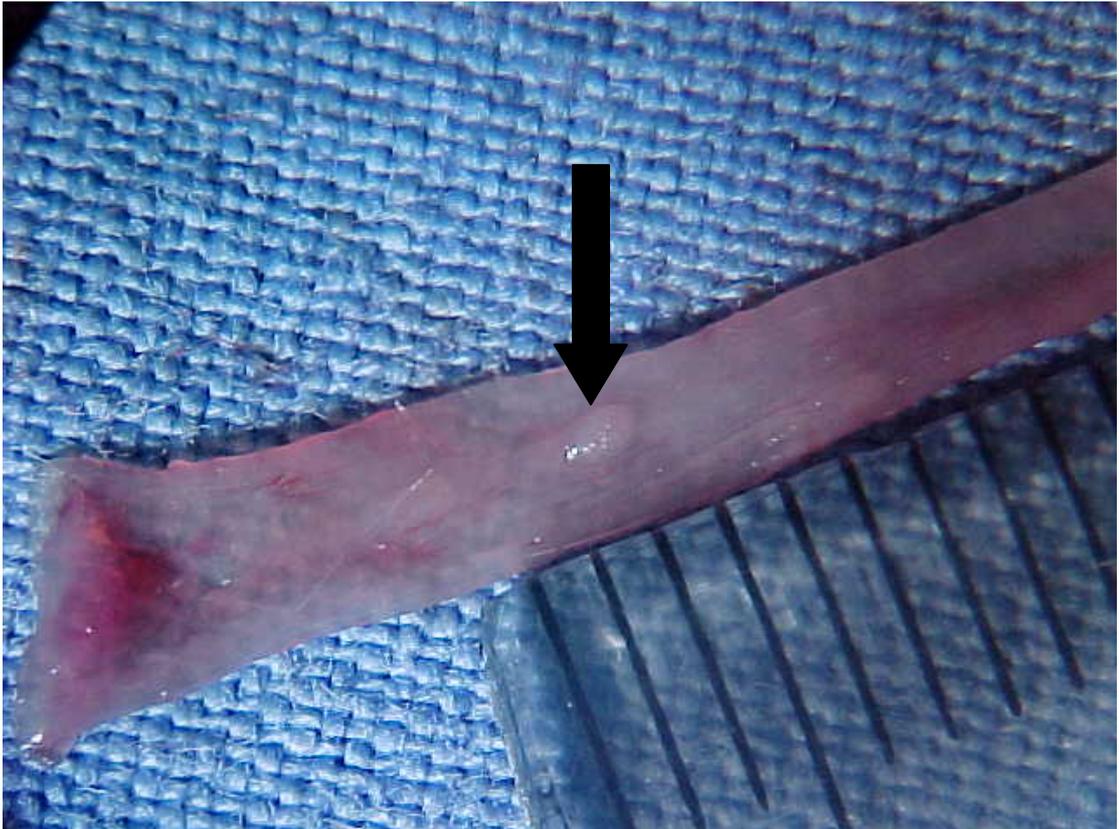


Figura 9 – Tumoração esofágica em terço inferior com 1 mm de extensão.(10x – camundongo do grupo IV)

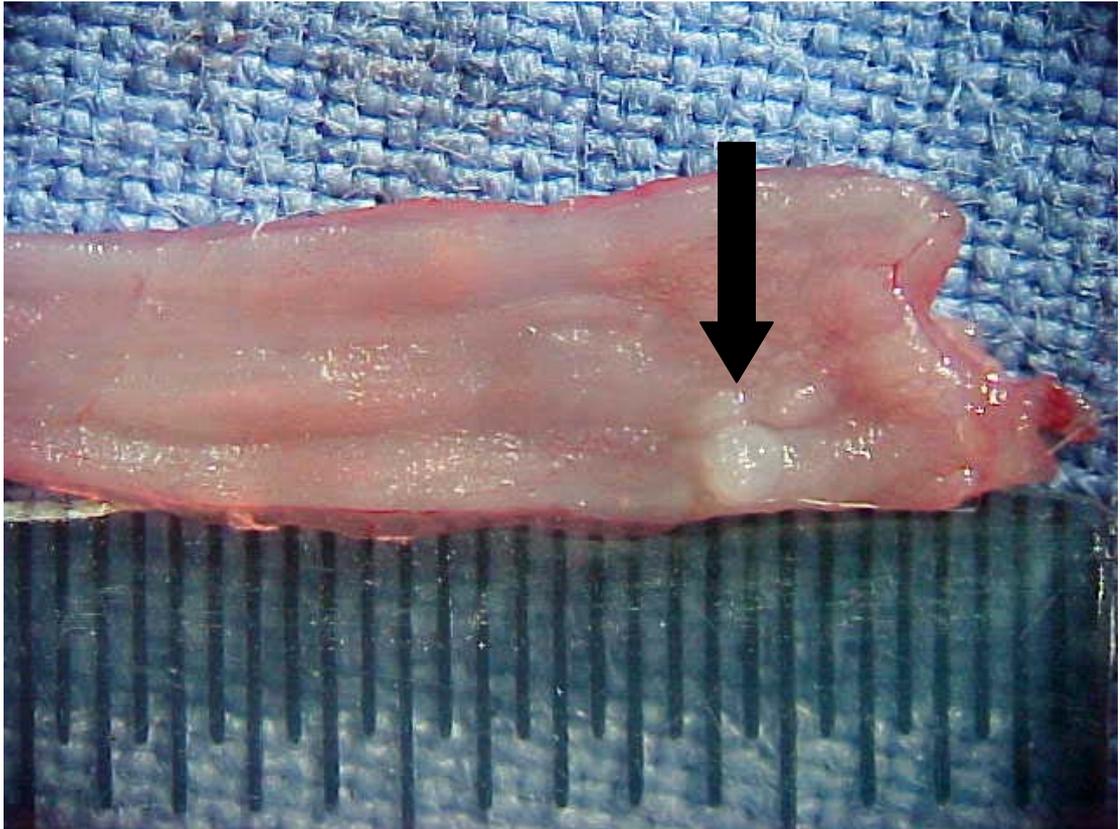


Figura 10 – Tumoração esofágica em terço inferior associado a outros focos de formação proliferativa. (10x – camundongo do grupo IV)



Figura 11 – Tumoração em terço inferior esofágico. (10x – camundongo do grupo IV)

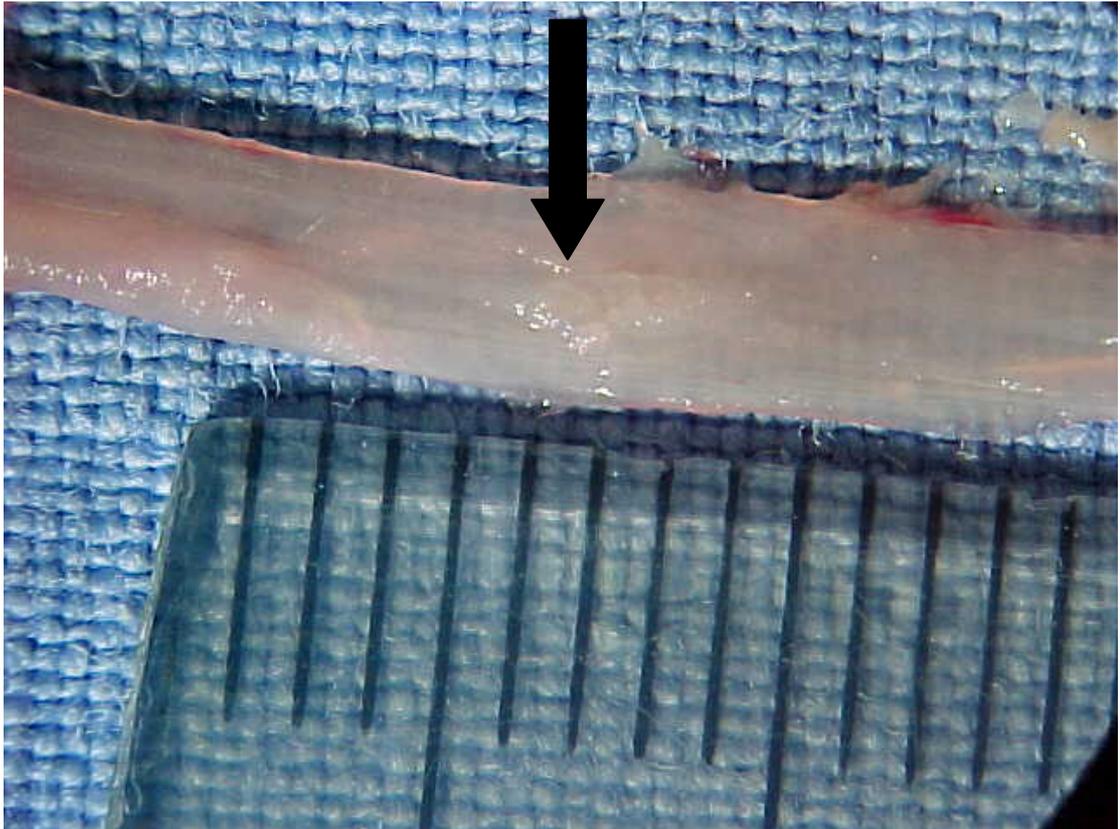


Figura 12 – Lesão tumoral plana com extensão superior a 1mm. (10x – camundongo do grupo IV)

Para o exame histopatológico, a amostra foi mantida em solução de formalina tamponada a 10% e estendida sobre a cortiça. As peças foram inicialmente desidratadas, passando por uma série gradativa de soluções alcoólicas, até 100%, diafanizadas em xilol e impregnadas por parafina. Foram constituídos blocos, na seqüência, realizando-se cortes de 5  $\mu$  em micrótomo modelo Spencer<sup>®</sup>. A inclusão do esôfago em bloco de parafina era feita enrolando o órgão sobre si mesmo, a partir de uma das extremidades, com a finalidade de gerar cortes histológicos, que atingissem todo o perfil longitudinal da víscera (Figura 13). Estes cortes foram lavados com xilol, para remoção da parafina e corados com hematoxilina e eosina. As peças foram montadas com lamínulas, finalmente, com bálsamo sintético. Foi utilizada, especificamente, a parafina Paraplast<sup>®</sup> (ANEXO C).

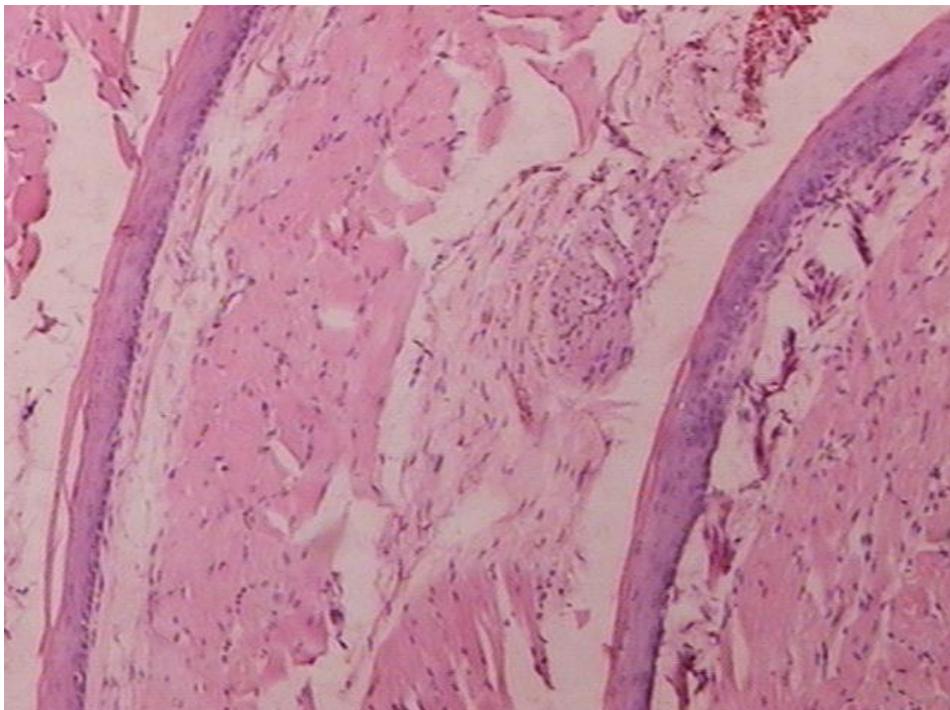


Figura 13 – Fotomicrografia de esôfago normal com disposição de rolo sobre si mesmo. (HE 200x)

Todo o trabalho com as peças, até a montagem das lâminas, foi realizado no Centro Integrado de Patologia, na cidade de Rio Grande, Rio Grande do Sul. As lâminas foram codificadas por funcionário deste serviço, não havendo, inicialmente, conhecimento do autor ou dos patologistas.

As lâminas foram lidas por dois patologistas do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com experiência na avaliação de espécimes experimentais e laudados a partir de consenso diagnóstico.

Os cortes histológicos do esôfago foram analisados em microscópio ótico comum para identificação das alterações histopatológicas e classificados de acordo com W.H.O. (1977) e Kruehl (1992):

- Histologia Normal (Figura 13): numa fileira de células basais, localizadas entre a borda do epitélio e a submucosa, com núcleos ovais ou arredondados. Apresenta um estrato córneo que ocupa um terço ou até a metade da espessura epitelial. Não se define a muscular da mucosa e são vistas algumas papilas rudimentares.
- Esofagite: o epitélio apresenta-se mais espesso, às custas de hiperplasia da camada basilar, hiperplasia papilar, hiperqueratose e infiltrado inflamatório composto por polimorfos nucleares e linfócitos.
- Lesão Intraepitelial de Baixo Grau (Figura 14): aumento das camadas celulares basais, atingindo um terço do epitélio, com células displásicas.
- Lesão Intraepitelial de Alto Grau e Carcinoma *in situ* (Figura 15): as alterações displásicas atingem toda a espessura do epitélio, que é composto de células marcadamente anormais. No entanto, pode ser observada alguma parakeratose na superfície epitelial.

- Carcinoma Invasor (Figura 16): as células malignas são encontradas abaixo da membrana basal, invadindo pelo menos a lâmina própria.

Após coleta dos resultados da análise patológica das lâminas, dois outros cortes de cada caso foram utilizados para estudo imunohistoquímico.

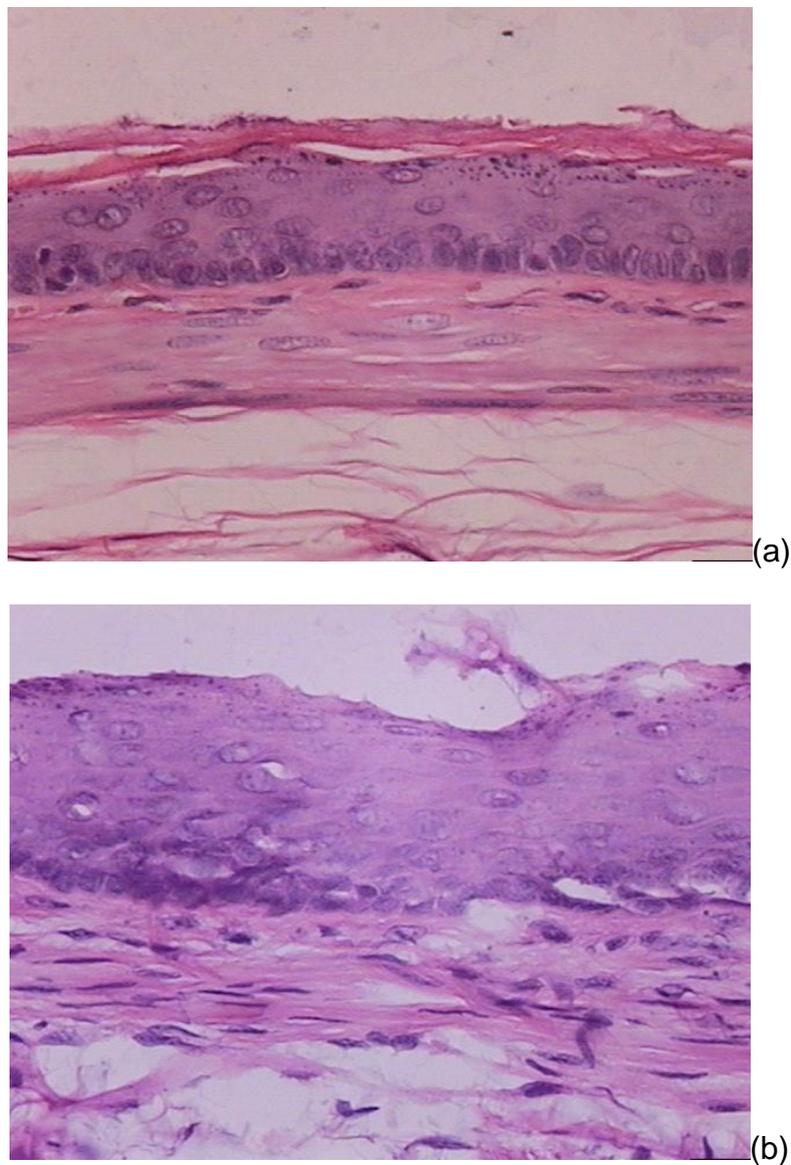


Figura 14 – Fotomicrografia: (a) normal (HE 200x);(b) e de lesão esofágica classificada como intraepitelial de baixo grau, camundongo do grupo III (HE, 200x).

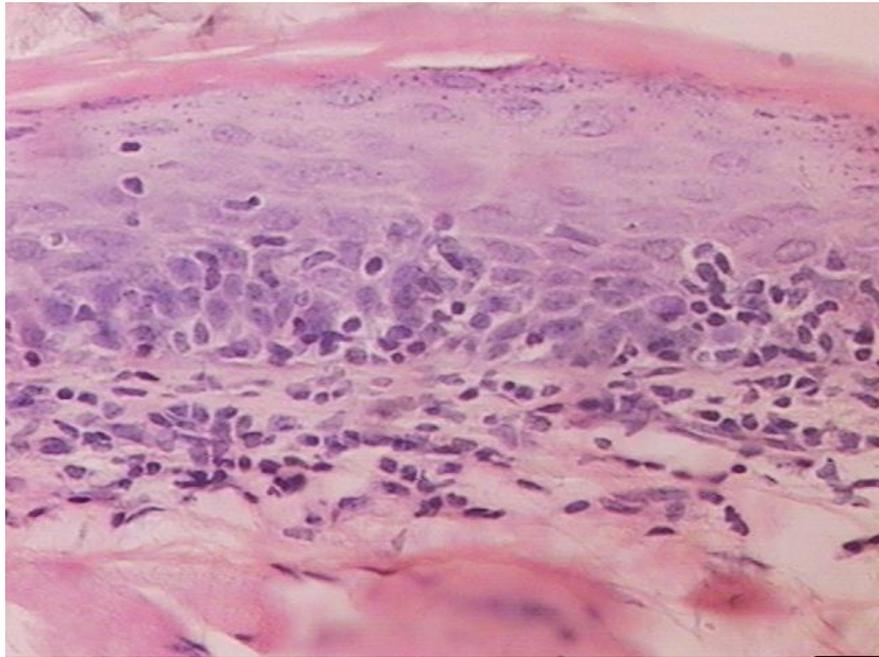


Figura 15 – Fotomicrografia de lesão esofágica classificada como intraepitelial de alto grau, camundongo do grupo IV (HE, 200x).

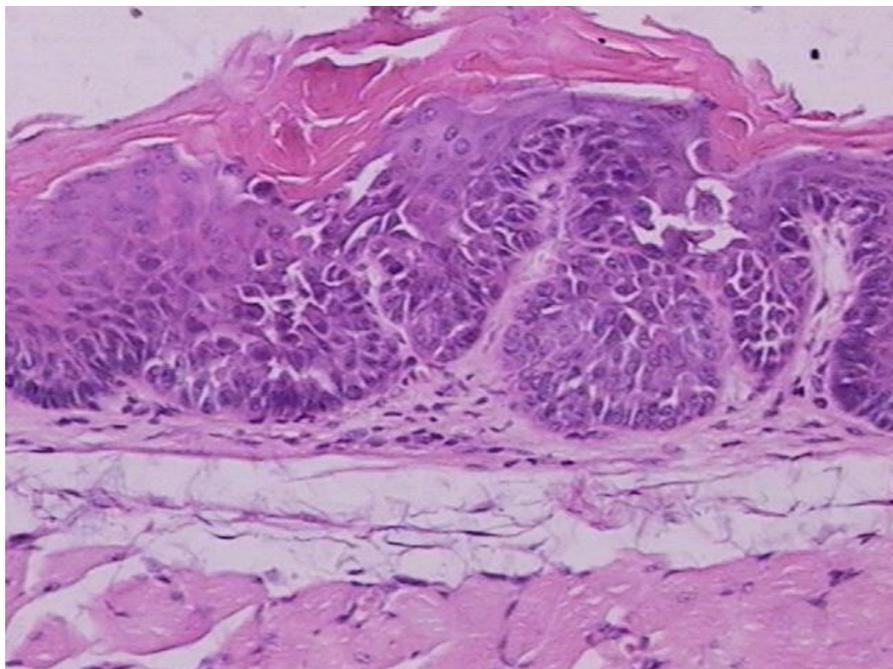


Figura 16 – Fotomicrografia de lesão esofágica classificada como carcinoma, camundongo do grupo IV (HE, 100x).

#### **4.7 Avaliação Imunohistoquímica**

Para a técnica de imunohistoquímica, foi utilizado um anticorpo primário monoclonal de camundongo da marca *DAKO Corporation* antiproteína p53 (Clone Pab240) (ANEXO E) e um anticorpo monoclonal primário de camundongo antiproteína ki-67 (Clone MIB-5) (ANEXO D) da marca *DAKO Corporation*. O procedimento foi executado no Laboratório de Imunohistoquímica Medicina Digital, Porto Alegre, RS.

Cortes com espessura de 5  $\mu$  foram submetidos à rotina de imunohistoquímica, que consiste de desparafinização em estufa e rehidratação em álcool, recuperação antigênica em forno de microondas, inativação da peroxidase endógena através do peróxido de hidrogênio e bloqueio das reações inespecíficas. Os anticorpos primários foram incubados por 12 horas, a 4°C, nas diluições de 1:50 para Ki-67 e 1:50 para p53, seguidos da aplicação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) e revelação com diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako). As reações tiveram como controles positivos, carcinoma de cólon para p53 e linfonodo para Ki-67, sendo o controle negativo realizado sem a utilização do anticorpo primário.

#### **4.8 Leitura das Lâminas**

Para p53 e ki-67 foram considerados como positivos, na análise imunohistoquímica, as lâminas que apresentaram mais de 10% de núcleos celulares

intensamente corados, por campo microscópico de 400 aumentos. As lâminas foram examinadas por patologista com experiência em imunohistoquímica, que procedeu à contagem do total de células nas áreas de interesse, e à contagem das células positivas nesta área, estabelecendo sua proporção em termos de percentuais. Nos casos em que não havia lesão delimitada e para as áreas sem lesão, efetuou-se a contagem de, pelo menos, 300 células, para estabelecer o percentual de positividade.

A imunohistoquímica era considerada negativa, quando demonstrava ausência de coloração imunohistoquímica ou menos de 10% dos núcleos corados, respectivamente, para p53 e Ki-67 (Figura 17). E positiva, havendo mais de 10% dos núcleos corados para p53 e Ki-67 (Figura 18), respectivamente, conforme referência na literatura (Kuwahara, 1999, Shimada, 1999).

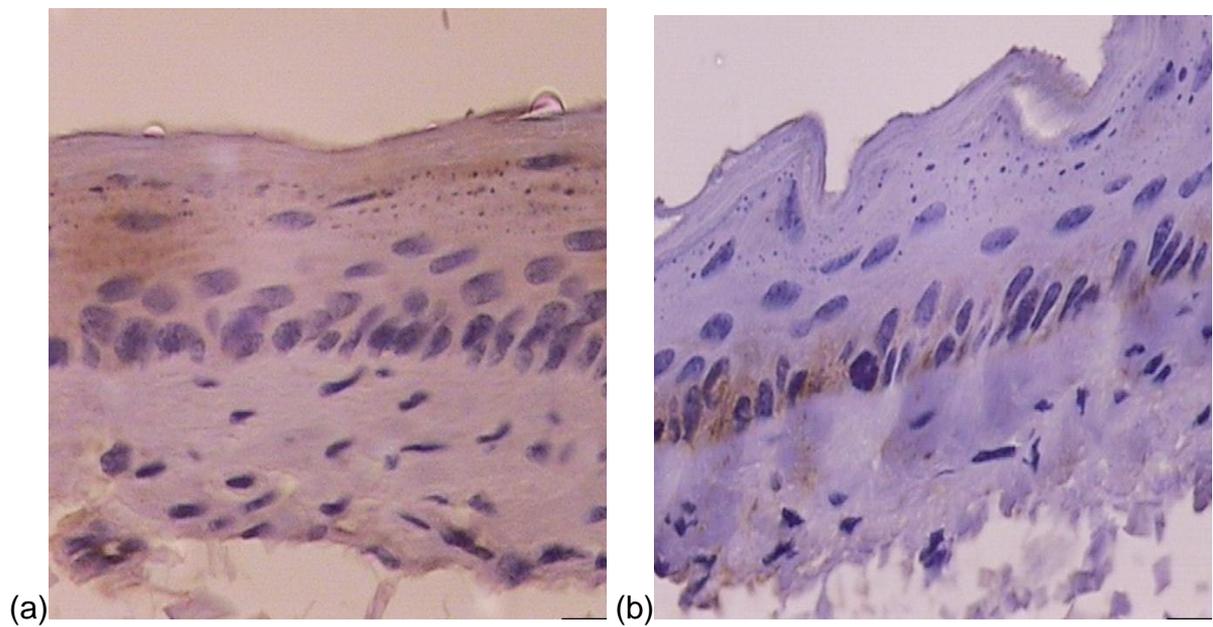


Figura 17 - Fotomicrografia de esôfago de camundongo demonstrando expressão imunohistoquímica de (a) p53 e (b) Ki-67 negativos, respectivamente.

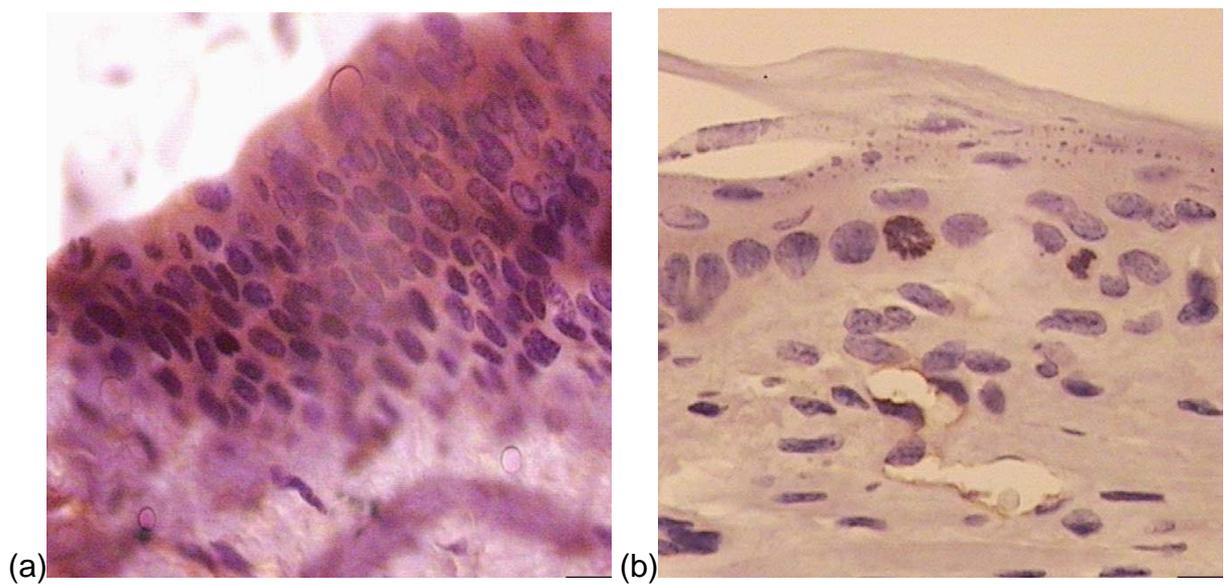


Figura 18 - Fotomicrografia de esôfago de camundongo demonstrando expressão imunohistoquímica de (a) p53 e (b) Ki-67 positivos, respectivamente.

#### **4.9 Análise Estatística**

Os dados coletados foram processados e analisados com o auxílio dos programas Epi Info V6.04 e Statistica. Os grupos foram comparados pelo uso do teste ANOVA, com localização de diferenças significativas pelo teste de TUKEY, Teste t para diferença entre proporções e teste quiquadrado de PEARSON. O nível de significância dos testes foi estabelecido para um valor  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

Não foram observadas manifestações comportamentais de agressividade entre os camundongos em nenhuma fase do experimento.

Foram registrados três óbitos, sendo todos do Grupo IV (perda em torno de 10%), que receberam DEN e gavagem esofágica com água quente. Sendo dois óbitos deram-se com 45 dias de experimento, provavelmente relacionados com aspiração pulmonar e um óbito ao final do experimento por debilidade física, já descrita previamente pela ação da DEN, reduzindo a amostra do Grupo IV para 37 animais e, do universo de animais que integrou todas etapas, para 97.

Não foi evidenciado, conforme descrito por Krueel (2002), Sallet (1996; 2002) e Velho (1998), presença à necropsia, de tumorações em outras localizações de fácil identificação macroscópica.

Não foram detectadas alterações patológicas nos Grupos I e II, cujos esôfagos serviram de padrão de normalidade.

Não houve diferença relevante nas características macroscópica dos tumores nos grupos estudo e, embora não tenham sido objeto especial de atenção, variações na forma e dimensões dos tumores foram comuns aos Grupos III e IV, assim como multiplicidade; a presença de lesões menores de 1 mm não foram consideradas tumores, neste trabalho.

Considerado isoladamente, o número de tumores, contado no grupo estudo no dia 150 de experimento, foi maior no Grupo IV, com 13 tumores em 17 peças esofágicas; seguido do Grupo III, com 14 tumores em 20 peças esofágicas. Estes achados não alcançaram diferença estatística ( $p=0,6854$ ). Não havendo, por este

resultado diferença entre os grupos que receberam DEN com variação entre gavagem água quente ou fria.

Achados patológicos associados ao tempo, nos Grupo III e Grupo IV, e toda amostra do grupo estudo, podem ser vistos nas figura 19, 20 e 21, respectivamente.

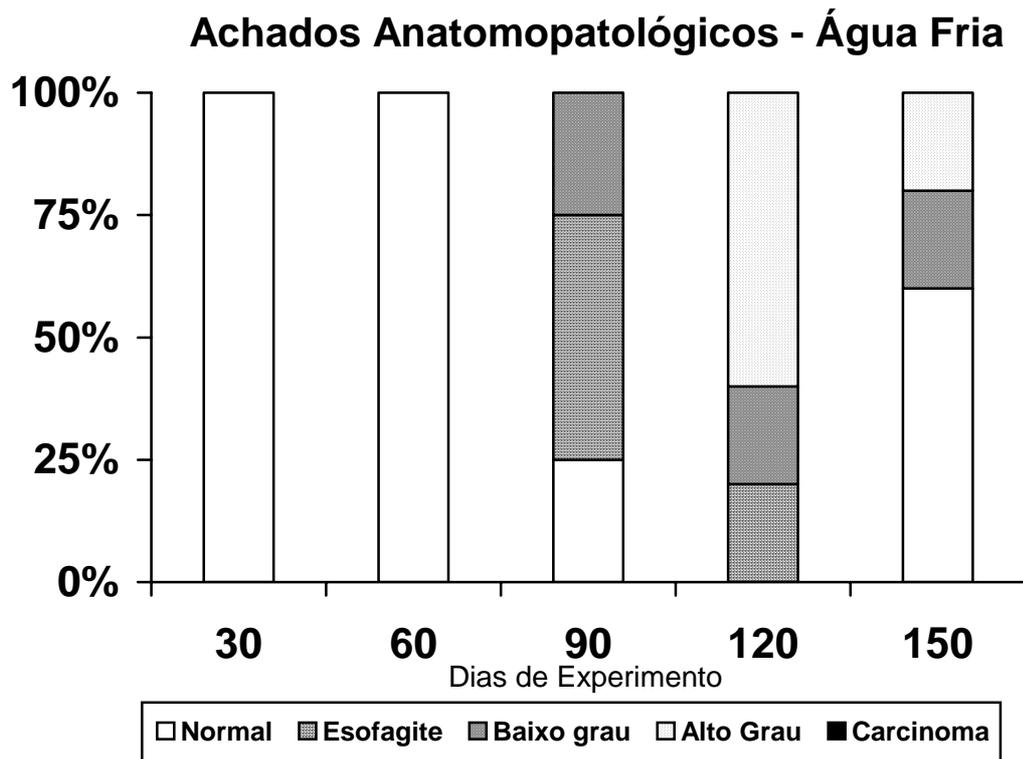


Figura 19 – Gráfico de barras demonstrando achados histológicos durante o experimento nos animais que receberam administração complementar de água fria por gavagem (com DEN).

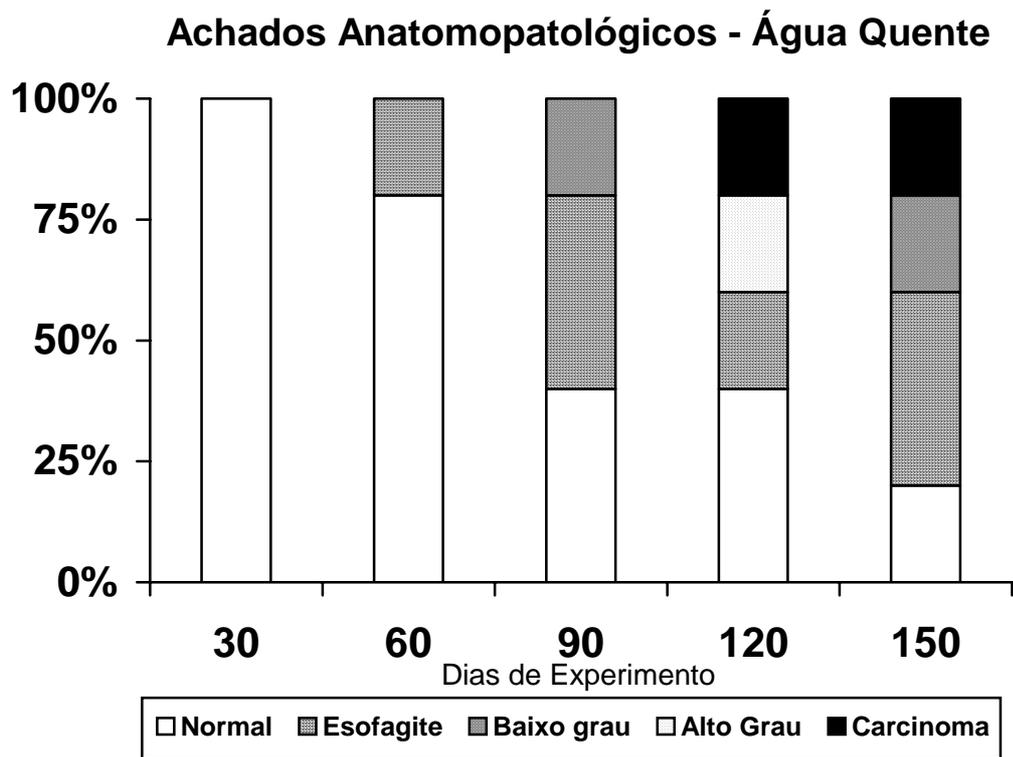


Figura 20 – Gráfico de barras demonstrando achados histológicos durante o experimento nos animais que receberam administração complementar de água quente por gavagem (com DEN).

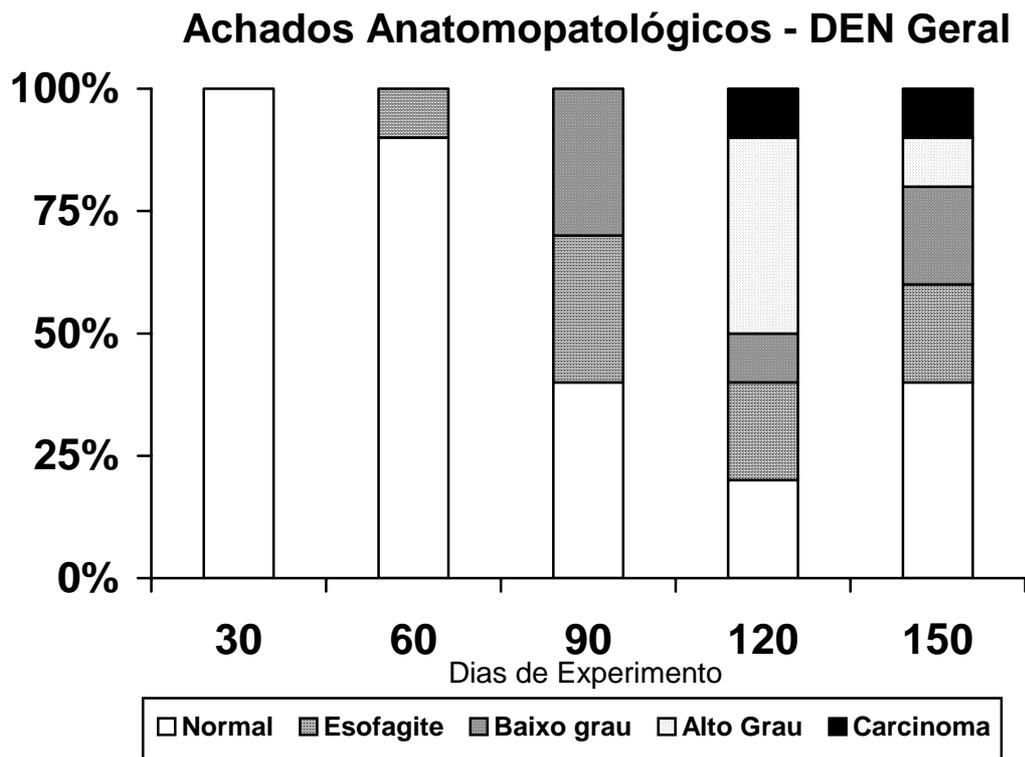


Figura 21 – Gráfico de barras demonstrando achados histológicos durante o experimento nos animais que receberam DEN independente do tipo de gavagem.

Não foi demonstrada expressão imunohistoquímica de p53 e ki-67 nos grupos controle. Achados de expressão imunohistoquímica de p53 considerados positivos, associados ao tempo, nos Grupo III e Grupo IV e toda amostra do grupo estudo, podem ser vistos nas Figuras 22, 23, e 24, respectivamente.

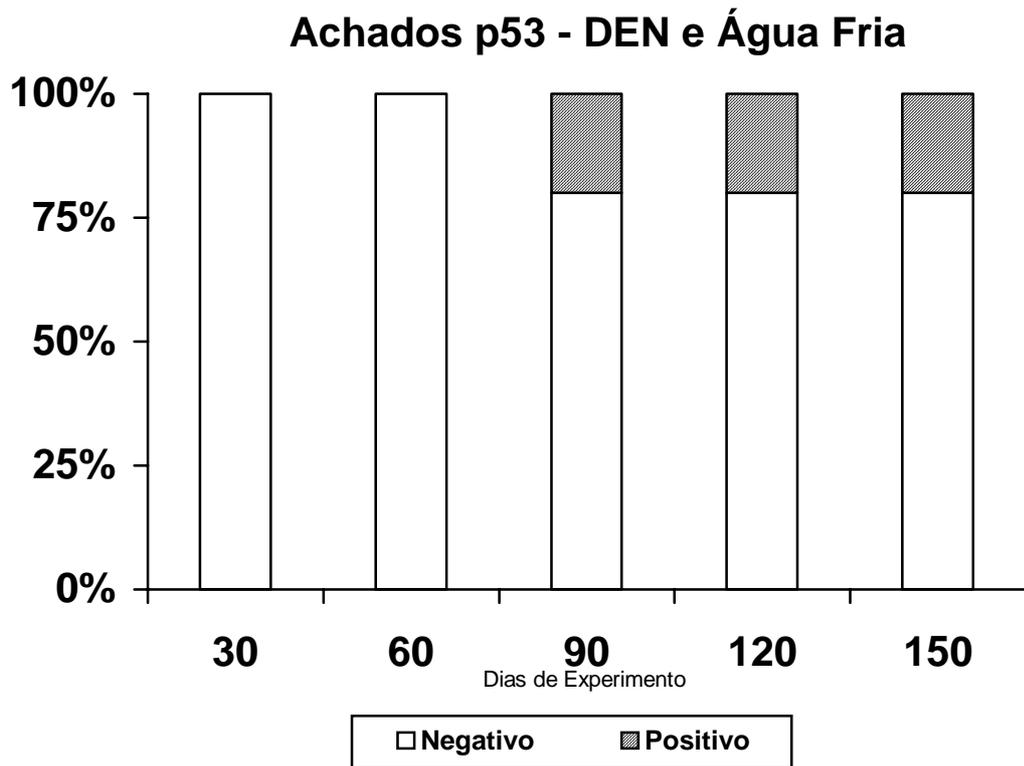


Figura 22 – Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imunohistoquímica de p53 considerados positivos, associados ao tempo no grupo que recebeu DEN e gavagem com água fria.

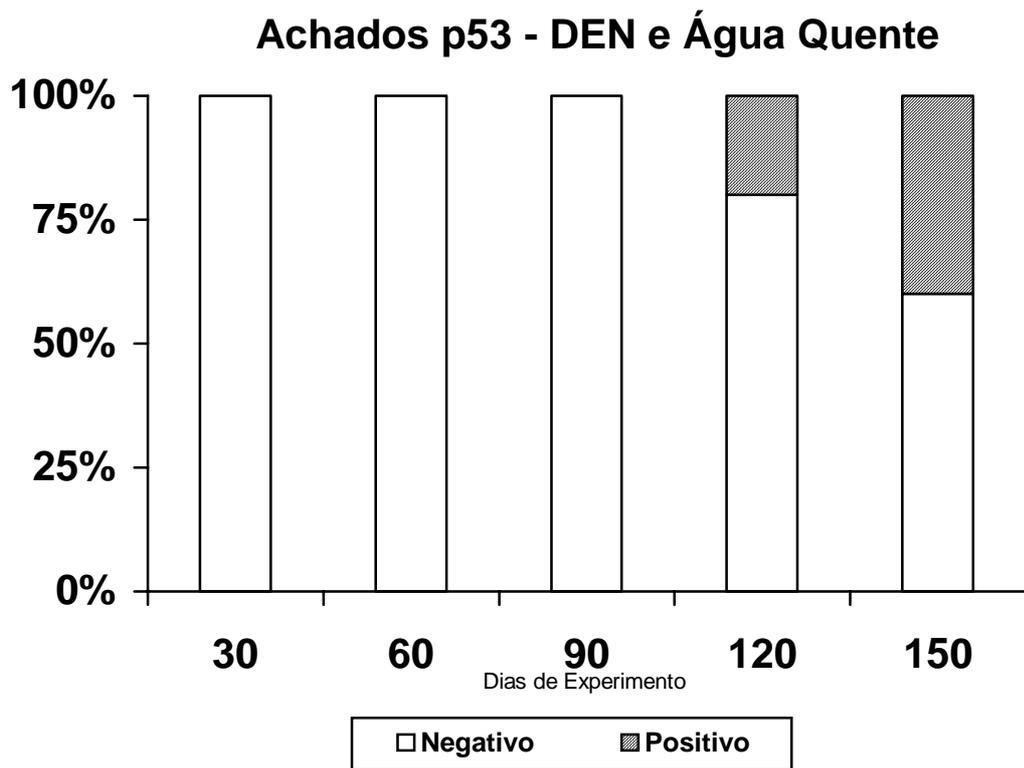


Figura 23 – Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imunohistoquímica de p53 considerados positivos, associados ao tempo no grupo que recebeu DEN e gavagem com água quente.

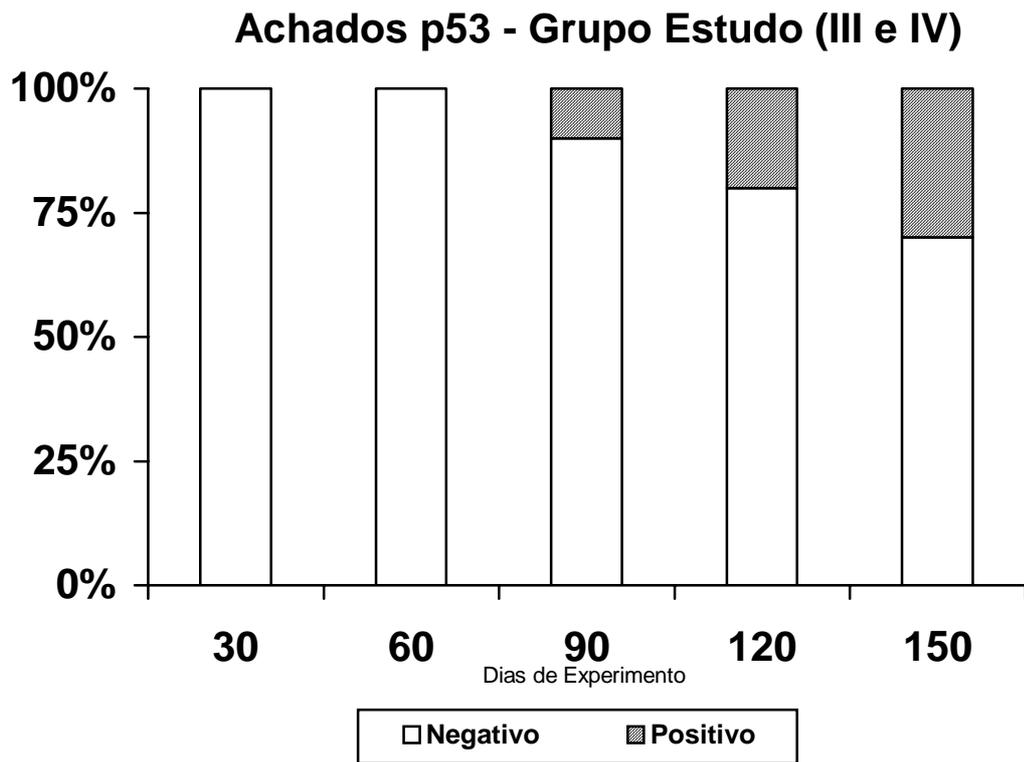


Figura 24 – Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imunohistoquímica de p53 considerados positivos, associados ao tempo no grupo que recebeu DEN e gavagem com água fria e quente.

Achados de expressão imunohistoquímica de Ki-67 considerados positivos, associados ao tempo, nos Grupo III e Grupo IV, e toda amostra do grupo estudo, podem ser vistos nas Figuras 25, 26 e 27, respectivamente.

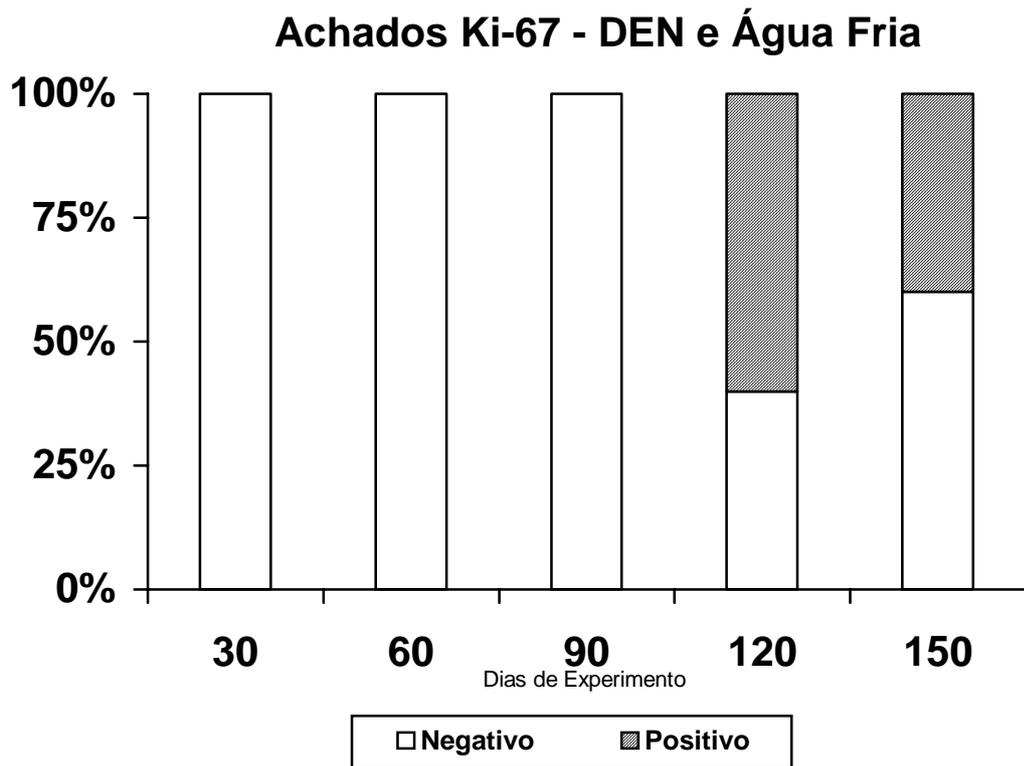


Figura 25 – Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imunohistoquímica de Ki-67 considerados positivos, associados ao tempo no grupo que recebeu DEN e gavagem com água fria.

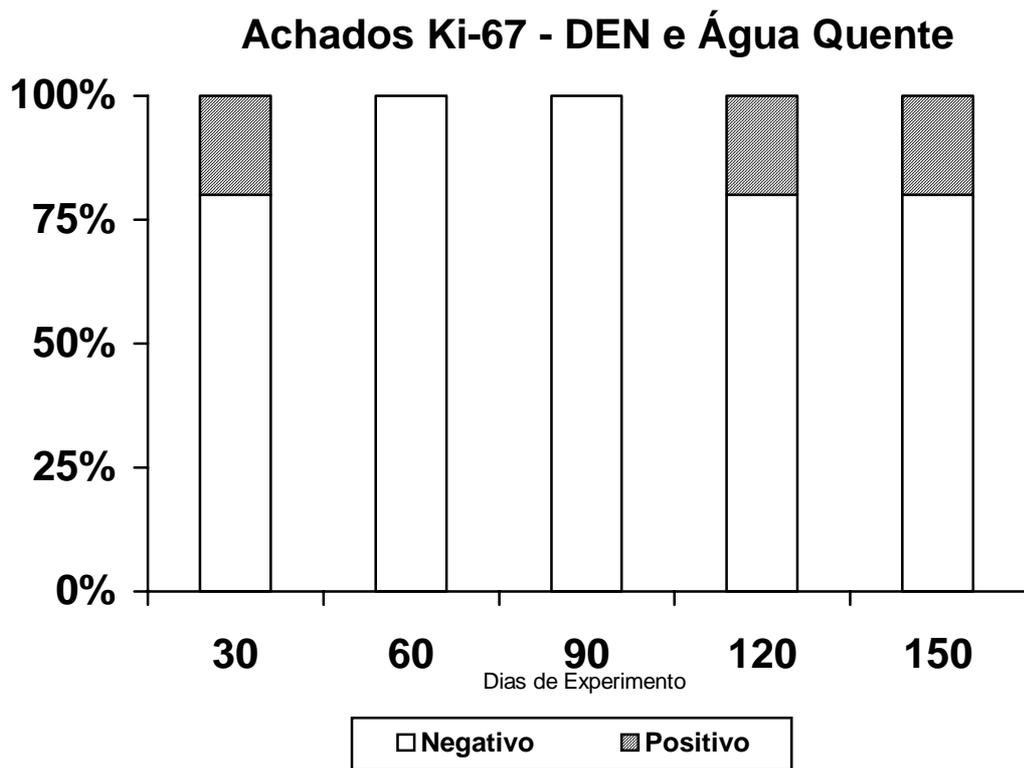


Figura 26 – Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imunohistoquímica de Ki-67 considerados positivos, associados ao tempo no grupo que recebeu DEN e gavagem com água quente.

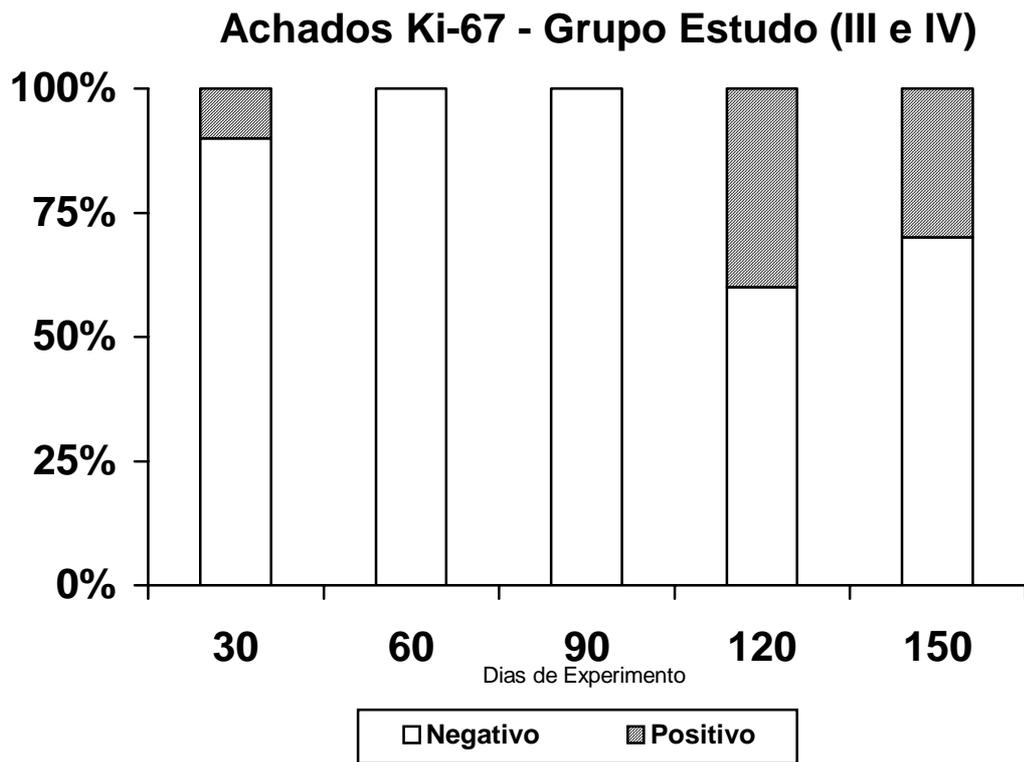


Figura 27 – Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imunohistoquímica de Ki-67 considerados positivos, associados ao tempo no grupo que recebeu DEN e gavagem com água fria e quente.

Foi estudada a evolução da expressão imunohistoquímica de p53 e ki-67, em percentagem, durante a carcinogênese, sendo utilizado o teste de análise de variância post-hoc (Teste Tukey). Inicialmente, foi analisado, para os grupos estudo, em separado (Figuras 28 e 30) e, após, considerando que não houve diferença na evolução tumoral, considerados como uma amostra única (Figuras 29 e 31). Ficou demonstrada diferença estatística somente para a expressão imunohistoquímica de Ki-67, quando analisado o grupo estudo como uma amostra única ( $p=0,01880$ ), a partir do dia 120 de experimento.

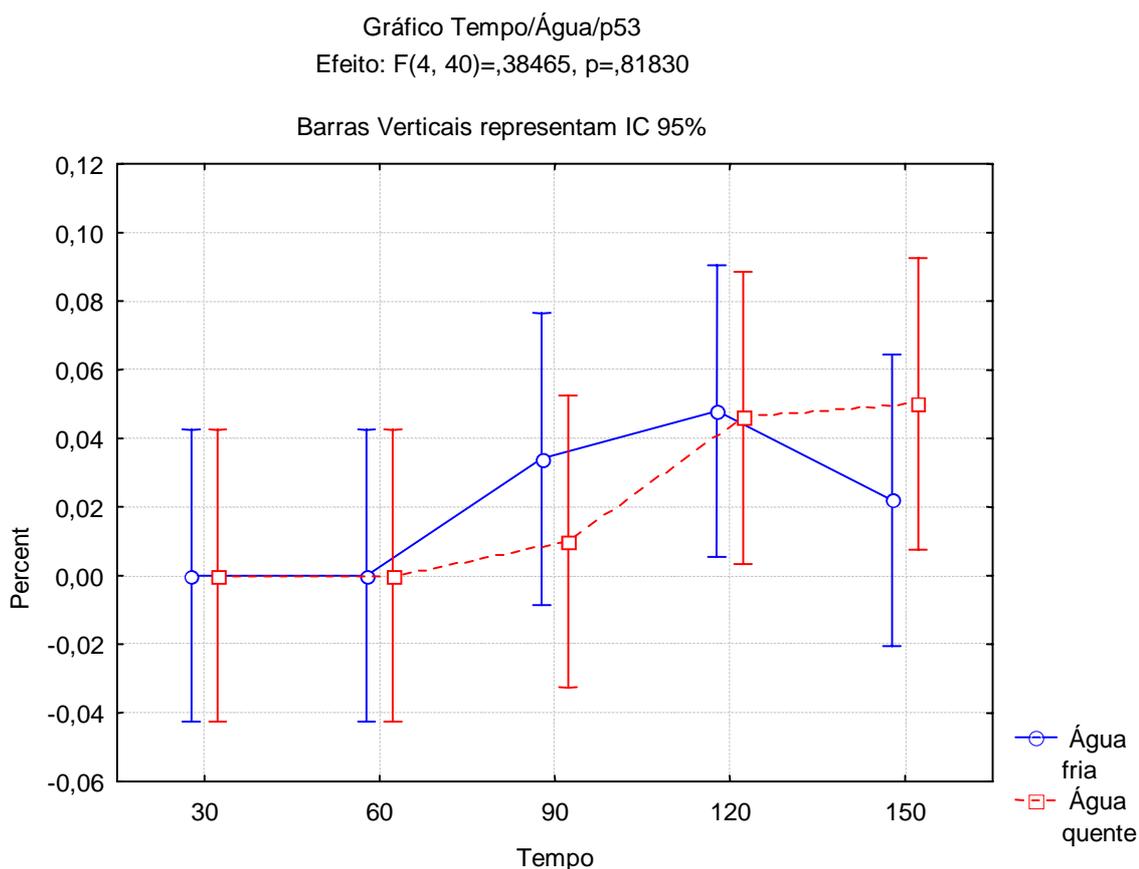


Figura 28 – Gráfico demonstrando aparecimento da expressão imunohistoquímica de p53 na carcinogênese nos grupos gavagem água fria e quente separadamente.

Gráfico Tempo/p53/DEN

Efeito:  $F(4, 40)=2,0135$ ,  $p=,11099$

Barras verticais representam IC 95%

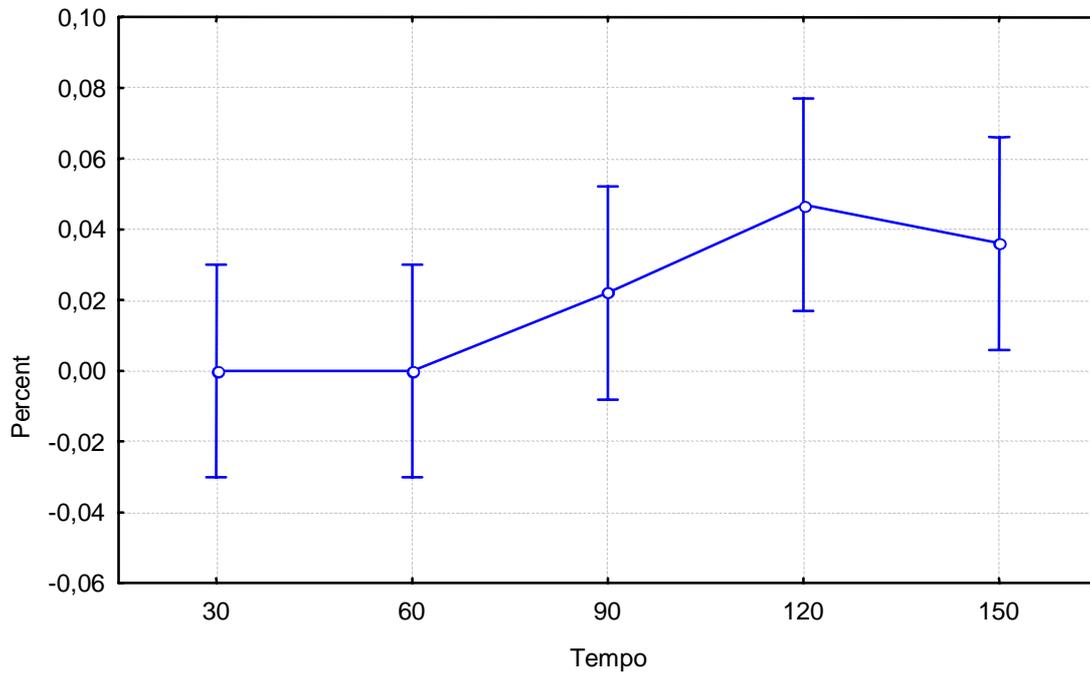


Figura 29 – Gráfico demonstrando aparecimento da expressão imunohistoquímica de p53 na carcinogênese nos grupos que receberam DEN (independente da gavagem).

Gráfico Tempo/Água/ki67  
Efeito:  $F(4, 40)=,93352, p=,45435$

Barras verticais representam IC 95%

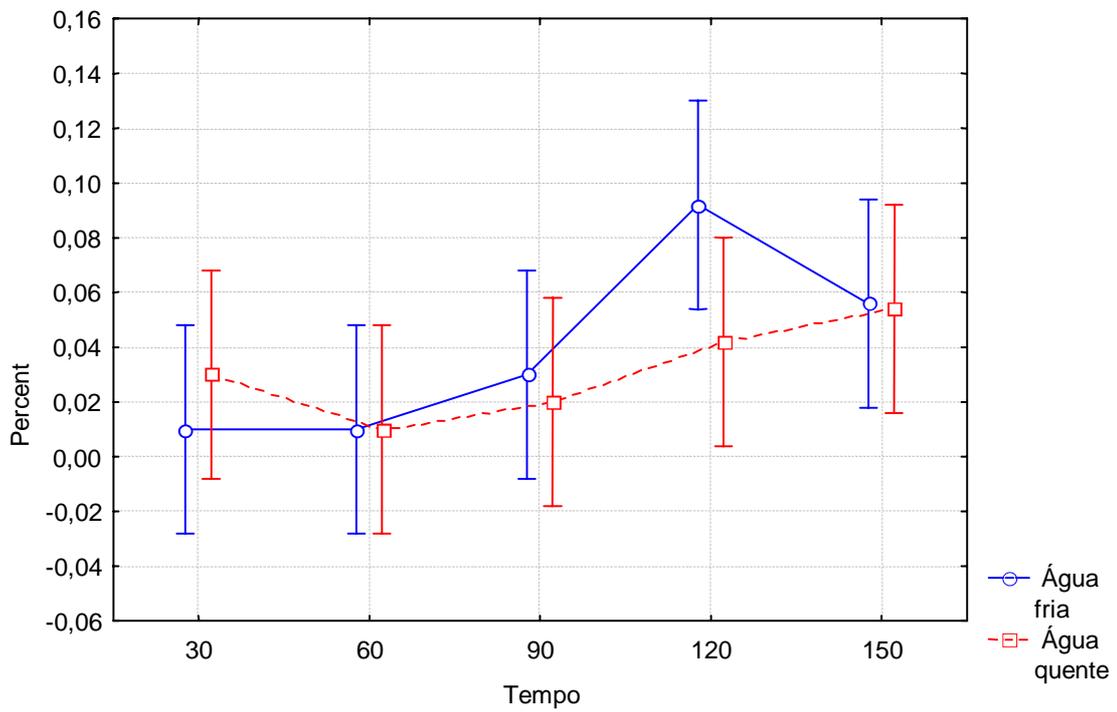


Figura 30 – Gráfico demonstrando aparecimento da expressão imunohistoquímica de Ki-67 na carcinogênese nos grupos gavagem água fria e quente separadamente.

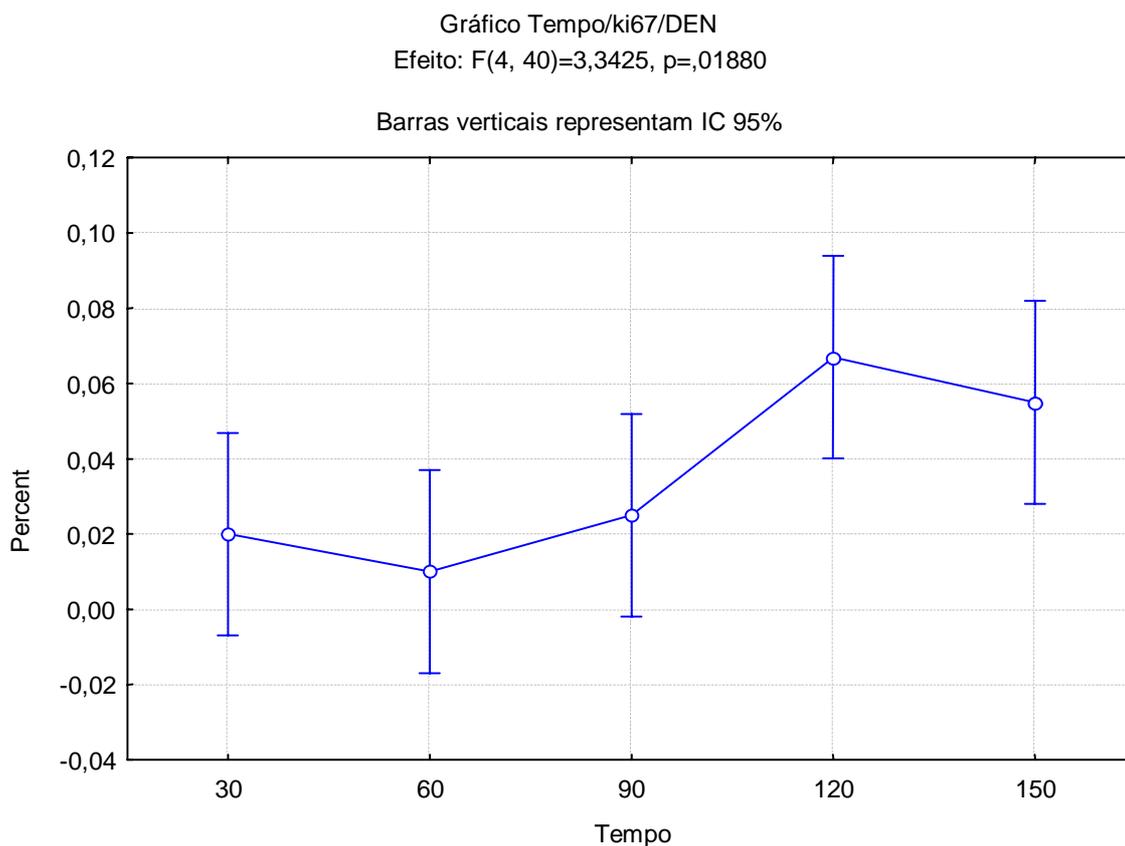


Figura 31 – Gráfico demonstrando aparecimento da expressão imunohistoquímica de Ki-67 na carcinogênese nos grupos que receberam DEN (independente da gavagem).

Os achados de expressão imunohistoquímica de p53 e Ki-67 foram comparados (Teste quiquadrado de Pearson) com a variabilidade de achados patológicos de toda a amostra (Tabela 2), havendo significância quanto à expressão negativa em relação aos achados de epitélio normal e expressão positiva para lesão intraepitelial de alto grau e carcinoma.

Quando comparado o achado ao epitélio normal apenas, e não toda a amostra, alcançou significância além das anteriores descritas, a lesão epitelial de baixo grau.

Tabela 2 – Ocorrência de alterações patológicas e de expressão imunohistoquímica

Marcador	% (positivo/número total de espécimes)				
	Normal	Esofagite	L.I. Baixo Grau	L.I. Alto Grau	Carcinoma
p53	0%(0/29)	0%(0/8)	33%(2/6) <sup>a</sup>	40%(2/5) <sup>b</sup>	100%(2/2) <sup>c</sup>
Ki-67	3%(1/29)	0%(0/8)	33%(2/6)	60%(3/5) <sup>d</sup>	100%(2/2) <sup>e</sup>

<sup>a,b,c,d,e</sup> Teste Quiquadrado de Pearson (p<0,05)

## 6 DISCUSSÃO

O modelo de pesquisa experimental utilizado demonstrou ter praticidade e factibilidade durante todo o período. A gavagem esofágica semanal, com certeza, era o ponto máximo de dificuldade no período inicial, porém, já a partir da segunda semana de experimento, houve controle efetivo desta tarefa.

Optou-se pelo emprego de fêmeas, neste trabalho, por ser conhecida a questão da morte de animais envolvidos em conflitos para estabelecimento territorial, atitude quase exclusiva dos machos (Kruel, 1992). Esta perda, associada às perdas naturais, relacionado-as á toxicidade e ao efeito carcinógeno da DEN, que levam ao comprometimento progressivo das condições gerais dos animais, poderiam comprometer a pesquisa.

A concentração de DEN foi a preconizada em outros modelos experimentais, tendo em vista diminuir a hepatotoxicidade (Rubio, 1987; Kruel, 1992; Velho,1998). A administração na água de beber tem dupla vantagem: da eficiência e da mínima necessidade de manipulação dos animais, embora permita variações de consumo.

A alimentação empregada foi semelhante àquela usada em diversos experimentos e não deve ter influído no processo de carcinogênese.

Os tempos para sacrifício foram escolhidos em função do conhecimento prévio da carcinogênese esofágica (Kruel, 1992), induzida pela dietilnitrosamina, que determina o aparecimento de tumores em torno de 120 dias após início da ingestão do carcinógeno (Kruel, 1992). Aos 30 dias, ocorrem modificações do tipo esofagite, as primeiras lesões intraepiteliais, aos 60-90 dias, e os primeiros carcinomas, aos 120 dias. O percentual de carcinoma invasor foi 9,5, aos 150 dias e 26,5, aos 180 dias, no trabalho de Kruel (1992). Desta forma, o experimento acompanhou a

cronologia da histogênese do carcinoma escamoso esofágico e propiciou acompanhar as expressões imunohistoquímicas do p53 e Ki-67. Kruehl (1992) demonstrou, em seu experimento, o primeiro carcinoma invasor no tempo 120, dois outros no tempo 150 e outros 26 no tempo 180, evidenciando uma clara eclosão de tumores invasores a partir do tempo 150.

Velho (1998) estudou a influência de chá preto na carcinogênese esofágica em 120 camundongos fêmeas. Durante 161 dias submeteu os grupos à dose de 0,04ml/l de DEN e associações com chá preto. O experimento permitiu demonstrar o possível efeito protetor do chá sobre o processo mutagênico, tendo como parâmetro lesões maiores de 1 mm.

Gurski (1999) utilizou 208 camundongos fêmeas e induziu a carcinogênese no esôfago por 180 dias, com DEN (dose preconizada por Rubio, 1987), durante 4 dias consecutivos e associando alguns grupos, ora com etanol, ora com N-nitrosornicotina, e associação das três substâncias em outro grupo. Todos os animais foram sacrificados ao final do experimento, alcançando alta incidência de câncer (85,4%) na análise microscópica, porém não demonstrou estatisticamente que o etanol e a substância N-nitrosornicotina influenciaram de alguma maneira no processo de carcinogênese.

Nossos resultados somam-se aos estudos experimentais desta linha de pesquisa de carcinogênese esofágica. O processo carcinogênico foi caracterizado com a evolução das lesões, culminando com aparecimento de carcinomas no tempo 120 e 150, com gavagem de água quente. Não sendo objeto principal desta dissertação o número de tumores, justificando o número pequeno de animais por sacrifício, pois a metodologia já está difundida na literatura médica, o modelo experimental torna-se útil para, agora sim, o estudo da carcinogênese.

A codificação dos blocos de parafina e lâminas objetivou diminuir vícios de aferição, uma vez que os patologistas desconheciam tempo e grupo que pertenciam às amostras.

Em tecidos normais, as populações celulares mantêm-se em crítico balanço entre proliferação e perdas celulares. Estas podem ocorrer por apoptose, a qual é um processo de morte celular regulado geneticamente. O balanço entre divisão celular e perdas celulares é importante para manter a integridade dos tecidos humanos. Se existe um aumento da proliferação, uma diminuição das perdas, ou a combinação de ambas, então se desenvolve estado de crescimento celular desordenado e isto é o fator chave de contribuição para a carcinogênese (Beardsmore, 2003).

O conhecimento de lesões pré-cancerosas esofágicas humanas em nível molecular é de importância crítica para o entendimento da etiologia das doenças e da identificação da utilidade de marcadores tumorais para estudos preventivos. Entretanto, poucas informações de alterações moleculares estão disponíveis, associadas a estas lesões.

Wang publicou sobre este tema em 1993 e 2002. Demonstrou, em ambos os estudos, que existe acúmulo da proteína p53 com o aumento das freqüências da proliferação celular em hiperplasia, displasia, carcinoma *in situ* e carcinoma escamocelular. Wang (1993) estudou espécimes de ressecção esofágica, realizando biópsias de 1 cm<sup>2</sup> na zona tumoral, na mucosa da margem da lesão na extremidade distal da peça cirúrgica. Realizou estudo imunohistoquímico das lesões em relação ao p53. Demonstrou prevalência de 0% em epitélio normal, 78% de p53 positivo para hiperplasia, 92% para displasia e entre 80-82% para o carcinoma *in situ* e invasor epidermóide. E, após, em 2002, realizou *screening* endoscópico de uma

população de aéreas com alta incidência e baixa incidência de tumor epidermóide do esôfago, e demonstrou que houve diferença estatística, comparando-se quanto a imunexpressão de p53 e também quando comparada à imunexpressão em relação à progressão patológica (hiperplasia para displasia, para carcinoma *in situ*, para carcinoma invasor).

Embora o gene p53 está freqüentemente mutado em muitos tipos de câncer, o momento (tempo) da ocorrência desta mutação durante progressão para o câncer é extremamente variável de um tumor para outro. É demonstrado no câncer colorretal que mutações no p53 ocorreram na transição entre adenoma tardio e carcinoma *in situ*, logo em fases tardias da carcinogênese. Similares achados são descritos para câncer de próstata e mama. Em contraste, mutações no p53 precocemente são detectadas em outros vários tumores (Brennan, 1995; Imazeki, 1992), como câncer de pulmão, de pele não melanoma e esofágicos (Gao, 1994; Hashimoto, 1999). Nestes, são freqüentemente detectadas em lesões hiperplásicas e displásicas, bem como em aparente tecido normal ao redor do tumor (Olivier, 2004).

Não foi evidenciado, durante a avaliação do material da dissertação, imunexpressão em áreas que não eram de interesse e muito menos nos casos de epitélio normal, quando avaliava-se o marcador p53, contrariando, parcialmente, os resultados de Oliver (2004). Porém, o aparecimento precoce, estatisticamente significativo, da detecção da proteína já em lesões intraepiteliais de baixo grau, realçam a sua importância precoce na carcinogênese.

No câncer de esôfago, o gene p53 está mutado em 50% dos carcinomas *in situ* ou invasor, e mutações já são detectadas em displasias. No carcinoma epidermóide, mutações têm sido observadas na mucosa de indivíduos com esofagite crônica, em regiões de alta incidência. Esta observação indica que a

perda da função do p53 é muito inicial, se não for o evento genético detectável mais precoce nos carcinomas de esôfago (Olivier, 2004).

A imunohistoquímica não define a existência de mutações genéticas, mas existem dados que sugerem a relação entre o prolongamento da estabilidade da proteína p53 e, conseqüentemente, a sua expressão imunohistoquímica, com mutações ocorrendo no epitélio esofágico, principalmente as mutações do tipo *missense* (Haris, 1993; Wagata, 1993).

É possível que o acúmulo da proteína p53 em células tumorais possa, em alguns casos, indicar a existência de um defeito regulatório na seqüência codificadora protéica do gene, ao invés de uma mutação. Diversos investigadores observaram discrepâncias entre a expressão da proteína p53 e a presença de mutações e, além, pode ocorrer a mutação no gene p53, sem aumento na expressão da proteína (Casson, 1998; Coggi, 1997).

Ribeiro (1998) estudou tumores esofágicos por imunohistoquímica para proteína p53 e os genes deste nos exons 5-8. Das amostras, 60% foram imunopositivos, e apenas em 40% provou-se mutação gênica. O autor conclui, relatando que o binômio de análise de histopatologia/genética é um melhor determinante do que a imunohistoquímica isolada e poderia ser utilizado como fator prognóstico no carcinoma epidermóide de esôfago.

Foi demonstrado que a porcentagem de células positivas à imunohistoquímica para Ki-67, nos casos de carcinoma epidermóide de esôfago, correlacionou-se com o grau de diferenciação encontrada á histologia (Matsumoto, 2000) e este achado correlacionou-se com a presença de metástases à distância e sobrevida. Estes achados podem ser transponíveis ao p53. O autor cita que o achado de um tumor

epidermóide indiferenciado, deveria ser encarado de forma não usual e agressiva por estes achados.

A Imunohistoquímica tem suas limitações, e ausência de marcação não significa ausência de alteração da proteína (falso negativo). Inversamente, o acúmulo de proteína não é sinônimo de mutação. A ausência de expressão da proteína pode ocorrer em virtude de condições adversas de fixação do tecido, diminuindo a sensibilidade da técnica. Mutações do tipo *nonsense* podem impedir a detecção da proteína. Por outro lado, a proteína pode ser detectada em tecidos normais, em situações de indução fisiológicas frente a alterações acidentais do genoma. Uma forte positividade, na maioria das células tumorais, indica uma disfunção da proteína, podendo corresponder à mutação ou estabilização por outro mecanismo (Klumb, 2002).

Diferente de Krueel (1995) e Li (2002), a administração de água quente (temperatura entre 60-70°C), tanto nos animais do grupo controle (II), como, principalmente, nos animais no grupo estudo (IV), não apresentou variação estatística aos resultados de seus grupos pares (Grupo I e III, respectivamente). Estes achados contrariam os achados, nesses trabalhos, como em outros: que a ação térmica promoveria o aparecimento precoce e comportamento mais agressivo das lesões expansivas neoplásicas esofágicas. Talvez este achado possa ser justificado pelo “n” de cada amostra ser pequeno, proporcionalmente à divisão entre os grupos, ou ainda pela administração única apenas semanal, trazendo pouco efeito térmico esofágico. Do mesmo modo, o composto nitroso utilizado foi diferente ao que foi disponibilizado aos animais nesta dissertação.

Porém, deve ser assinalada a evolução mais precoce das lesões no Grupo IV com casos de carcinoma e a maioria de displasias, e sem casos de carcinomas no Grupo III.

Os achados de expressão imunohistoquímica, durante a carcinogênese sob efeito de dietilnitrosamina, revelam a progressão de resultados de captação de proteína p53 e marcado aumento da proliferação celular, traduzido pelo aumento do Ki-67.

Apenas o Ki-67 apresentou poder para demonstrar, a partir do dia 150 de experimento, elevação significativa, sugerindo que, entre os dias 120 e 150, houve o descontrole do ciclo celular, reproduzindo grande atividade celular, podendo-se sugerir o início mutagênico do processo.

Os achados dos marcadores de Ki-67 e p53 vão ao encontro com os de Pera (2001). É demonstrado aparecimento de Ki-67, desde o início do processo e sendo negativo para p53. Com a evolução do processo, concomitante ao aparecimento das primeiras displasias, o p53 torna-se positivo e o Ki-67 aumenta sobremaneira a sua imunoexpressão, chegando aos casos de carcinoma, onde ambos são freqüentemente positivos.

As expressões imunohistoquímicas, com relação aos achados patológicos, demonstram que ambos os marcadores apresentam variabilidade precoce em relação a estes. Foi evidenciado, já nas lesões intraepiteliais, positividade clínica das peças cirúrgicas.

## 7 CONCLUSÕES

- A imunoexpressão do p53 e Ki-67 apresentou relação com o aparecimento das lesões patológicas e tendência de aumento em relação a variável tempo. Não houve diferença no efeito da temperatura da água para gavagem em relação ao número de tumores em 150 dias de experimento
- A imunoexpressão do Ki-67 correlacionou-se positivamente com achados de lesão intraepitelial de alto grau e carcinoma.
- A imunoexpressão do p53 correlacionou-se positivamente com achados de epitélio baixo grau, alto grau e carcinoma.

## **8 PERSPECTIVAS DE PESQUISAS**

- Avaliação gênica por PCR para p53 em busca de mutações na amostras do estudo, e inter-relacionar com achados histopatológicos e de expressão imunohistoquímica.

## 9 ANEXOS

### ANEXO A – DIETILNITROSAMINA (DEN)

#### DIETHYLNITROSAMINE (DEN / N-NITROSODIETHYLAMINE)

Nitrosamina de peso molecular 102,1 formada por um radical nitroso ligado a quatro átomos de carbono e dez de hidrogênio ( $C_4H_{10} - N_2O$ )

FABRICANTE: Sigma Chemicals Company, United States of America

## ANEXO B – RAÇÃO PARA CAMUNDONGOS GERMANI

COMPOSIÇÃO BÁSICA : farelo de trigo, farelo de soja, farinha de ostras, farinha de ossos, milho moído(54%), farinha de carne, sal e caulin.

EVENTUAIS SUBSTITUTIVOS: Calcáreo moído (farinha de ostras), bentonita(caulin), farelo de aveia(farelo de trigo), sorgo moído(milho moído).

NÍVEIS DE GARANTIA: umidade (máx.) 12,0%; proteína bruta (mín.) 20,5%; extrato etéreo (min.) 4,0%; matéria fibros (máx.) 6,0%; matéria mineral (máx.) 9,7%; cálcio (Ca) (min.) 2,0%; fósforo(P) (min.) 0,6%.

ENRIQUECIMENTO POR KG DE RAÇÃO: Vitamina A (8000 UI); Vitamina D3 (1498,5UI); Vitamina K (2mg); Vitamina E (5 UI); Riboflavina (3,3mg); Ac. Pantotênico (10 ng); Ac Nicotínico (2 mg); Vitamina B6 (2 mg); Vitamina B12 (10 mg); Coliona (300 mg); Antioxidante (100 mg); Metionina (0,7g); Ferro (20 mg); Manganês (81 mg); Zinco (48 mg); Cobre (2 mg); Cobalto (0,2mg); Iodo (2 mg); Farinha de ostras (1 g); Sal (5 g); Pigmentador (20 mg); Antibiótico (10 mg); Coccidiostático (1 g).

ANEXO C – PARAPLAST PLUS®

Tissue Embedding Medium

FABRICANTE: Tyco/Healthcare Kendeall.

COMPOSIÇÃO: D-metilSulfóxido (DMSO)

EMBALAGEM: 1Kg

ANEXO D – Anticorpo Ki-67

*(Monoclonal Mouse Anti-Rat Ki-67 Antigen)*

*(Clone MIB-5)*

*(Code No. M7248)*

FABRICANTE: DAKO Corporation

ANEXO E – Anticorpo p53

*(Monoclonal Mouse Anti-Murine p53)*

*(Clone Pab240)*

*(Code No. M3566)*

FABRICANTE: DAKO Corporation

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal ML, Taylor WR, Chernov MV, Chernova OB, Stark GR. Minireview. The p53 network. *J Biol Chem* 1998; 273(1): 1-4.

Aloia TA, Harpole DH, Reed CE, Allegra C, Moore MBH, Herndon II JE, D'amico TA. Tumor marker expression is predictive of survival in patients with esophageal cancer. *Ann Thorac Surg* 2001; 72: 859-866.

Baker SJ, Preisinger A, Jessup M, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JKV, Hamilton S, Volgeinstein. P53 gen mutations in combination with 17p allelic deletions as late event in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990; 50: 7717-7722.

Barrett JH, Parslow RC, Mckinney PA, Law GR, Forman D. Nitrate in drinking water and the incidence of gastric, esophageal and brain cancer in Yorkshire, England. *Cancer Cause and Control* 1998; 9: 153-159.

Barros SGS, Ghisolfi ES, Luz LP, Barlem GG, Vidal RM, Wolff FH, Magno VA, Breyer HP, Dietz J, Grüber AC, Krueel CDP, Prolla JC. Mate (Chimarrão) é consumido em alta temperatura por população sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago. *Arq Gastroenterol* 2000; 37(1): 25-30.

Barstch H. N-nitroso compounds and human câncer: where do we stand? *IARC Sci Publ* 1991; 105: 1-10.

Beardsmore DM, Verbeke CS, Davies CL, Guillon PJ, Clark GWB. Apoptotic and proliferative indexes in esophageal cancer: predictors of response to neoadjuvant therapy apoptosis and proliferation in esophageal cancer. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 77-87.

Bevilacqua RG, Cerqueira EMM, Alcântara PSM. Genética em câncer digestivo. In: Paula Castro, Savassi Rocha & Andy Petroinau. Tópicos em Gastroenterologia 7. Avanços em Gastroenterologia. 1997; 31-48. Ed Medsi – Rio de Janeiro.

Bishop JM. Molecular themes in oncogenes. Cell 1991; 64: 235-248.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer –INCA, Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2003.

Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, Couch MJ, Forastiere AA, Sidransky D. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Eng J Med 1995; 332: 712-7.

Brown JM, Wounters BG. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. Cancer Res 1999; 59: 1391-1399.

Casson AG, Tammemagi M, Eskandarian S, Redston M, McLaughlin J, Ozcelik H. p53 alterations in oesophageal cancer: association with clinicopathological features, risk factors, and survival. J Clin Pathol: Mol Pathol 1998; 51: 71-79.

Casson AG, Evans SC, Gillis A, Porter GA, Veugelers P, Darnton SJ, Guernsey DL, Hainaut P. Clinical Implications of p53 tumor suppressor gene mutation and protein expression in esophageal adenocarcinomas: results of a ten-year prospective study. J Thorac Cardiovasc Surg 2003; 125: 1121-1131.

Chang F, Syrjänen S, Syrjänen K. Implications of the p 53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. J Clin Oncol 1995; 13: 1009-1022.

Coggi G, Bosari S, Roncalli M, Gaziani D, Bossi P, Viale G, Buffa R, Ferrero S, Piazza M, Blandamura S, Segalin A, Bonavina L, Peracchia A. p53 protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma. *Cancer* 1997; 79: 425-432.

Coral, R.P., Gabiatti, G. Carcinoma epidermóide de esôfago in Rohde, L. Rotinas em cirurgia digestiva. 2005; 12: 91-95.

Craddock, V.W. (1993). *Cancer of the Oesophagus*. Oxford University Press, Oxford, UK.

Dolan K, Walker SJ, Gosney J, Field JK, Sutton R. TP53 mutations in malignant and premalignant Barrett's esophagus. *Dis Esophagus* 2003; 16: 83-89.

Étienne, J. *Bioquímica genética e biologia molecular*. 6. ed.. São Paulo: Liv. Santos, 2003. xx,504p.: il.

Evans SC, Lozano G. The Li-Fraumeni syndrome: an inherited susceptibility to cancer. *Molec Med Today* 1997 (sept): 390-395.

Faccini FP, Toneto Jr JE, Moreira LF. Molecular screening in esophageal cancer. *South-America J Cancer* 1997; 1: 272-220.

Fagundes RB, Barros SGS, Moreira LF. Expressão imunohistoquímica da proteína p53 em mucosa esofágica de indivíduos sob alto risco para carcinoma epidermóide de esôfago – 2000 Tese(Doutorado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Fagundes RB, Mello CR, Tollens P, Pütten ACK, Wagner MB, Moreira LF, Barros SGS. P53 protein in esophageal mucosa of individuals at high risk of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esophagus* 2001; 14: 185-190.

Farah SB. In Farah SB. Da célula ao DNA. In: DNA Segredos & Mistérios 1997; p7-36. Savier São Paulo.

Fujiki T, Haraoka S, Yoshioka S, Ohshima K, Iwashita A, Kikuchi M. p53 gene mutation and genetic instability in superficial multifocal esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2002; 20: 669-679.

Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T, Cai DW, Owen-Shaub LB, Roth JA. A retroviral wild-type p53 expression vector penetrates human lung cancer spheroids and inhibits growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 1989; 53: 4129-33.

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.

Goldin JR; Raymundo MM. Pesquisa em saúde e direito dos animais. Porto Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 1997.

Gurski RR, Schirmer CC, Krueel CR, Komlos F, Krueel CDP, Edelweiss MI. Induction of esophageal carcinogenesis by diethylnitrosamine and assessment of the promoting effect of ethanol and N-nitrosornicotine: experimental model in mice. *Dis Esophagus* 1999; 12: 99-105.

Hall PA, Lane DP. p53 in tumor pathology: Can we trust immunohistochemistry? - Revisited! *J Pathol* 1994; 172: 1-4.

Harpole DH, Moore MB, Herndon JE, Aloia T, D'Amico TA, Sporn T, Parr A, Linoila H, Allegra C. The prognostic value of molecular marker analysis in patients treated with trimodality therapy for esophageal cancer. *Clin Canc Res* 2001; 7: 562-569.

Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor suppressor gen. N Eng J Med 1993; 329(18): 1318-1326.

Hashimoto N, Tachibana M, Dhar DK, Yoshimura H, Nagasue N. Expression of p53 and RB proteins in squamous cell carcinoma of the esophagus: their relationship with clinicopathologic characteristics. Ann Surg Oncol 1999; 6(5): 489-494.

Hecht SS. Approaches to cancer prevention based on an understating of N-nitrosamine carcinogenesis. Proc Soc Exp Biol Med 1997; 216: 181-191.

Hollstein MC, Metcalf RA, Welsh JÁ, *et al.* Frequent mutation of the p53 gene in human esophageal cancer. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 9958-61.

IARC. Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some N-nitroso compounds. IARC monogr. 1978; 17: 1-365.

Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increase expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. Lancet 1990; 335: 675-679.

Iihara K, Shiozaki H, Oku K, Tahara H, Doki Y, Oka H, *et al.* Growth-regulatory mechanism of two human esophageal-cancer cell lines in protein-free conditions. Int J Cancer 1993; 55: 364-70.

Imazeki F, Omata M, Nose H, Ohto M, Isono K. p53 gene mutations in gastric and esophageal cancers. Gastroenterology 1992; 103: 892-896.

Inada S, Koto T, Futami K, Arima S, Iwasiuta A. Evaluation of malignancy and prognosis of esophageal cancer based on an immunohistochemical study (p53, E-cadherin, epidermal growth factor receptor). Surg Today Jpn J Surg 1999; 29: 493-503.

Kajiyama Y, Hattori K, Tomita N, Amano T, Iwanuma Y, Narumi K, Udagawa H, Tsurumaru. Histopathologic effects of neoadjuvant therapies for advanced squamous cell carcinoma of the esophagus: multivariate analysis of predictive factors and p53 overexpression. *Dis Esophagus* 2002; 15: 61-66.

Kawaguchi H, Ohno S, Hashimoto K, et al. CYFRA21-1 determination in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 1413-7.

Klumb CE, Cavalcanti Junior GB. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína p53 nas neoplasias linfóides. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2002; 24(2): 111-125.

Koide N, Nishio A, Hiraguri M, Hanazaki K, Adachi W, Amano J. Coexpression of vascular endothelial growth factor and p53 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1733-1740.

Krasna MJ, Mao YS, Sonett JR, Tamura G, Jones R, Suntharalingam M, Meltzer SJ. p53 gene protein overexpression predicts results of trimodality therapy in esophageal cancer patients. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 2021-2015.

Krishnadath KK, Tilanus HW, Blankenstein MV, Mulder BH, Mulder AH. Accumulation of p53 protein in normal, dysplastic, and neoplastic Barrett's oesophagus. *J Pathol* 1995; 175: 175-180.

Krontiris TG. Molecular Medicine. *Oncogenes. N Engl J Med* 1995; 333(5): 303-306.

Kruel CDP, Gurski r, Cavazzola LT, Kruel CRP, Madruga G, Sfair JA. Hot-water effect in the esophageal carcinogenesis experimental model in mice. In: *Sixth World*

Congress of International Society for Diseases of the Esophagus, Milan, Italy.  
Abstract 1995. p.199.

Kruel CDP, Pan Chacon J. Classificação citopatológica das lesões precursoras do carcinoma escamoso do esôfago: modelo experimental em camundongos – 1992 Tese(Doutorado) Escola Paulista de Medicina.

Kruel, C., Gurski R., Golbert, L., Da Luz, L., Ferreira M. (1999). Effect of thermal injury and the oral administration of diethylnitrosamine in the development of esophageal tumor in mice in Rosati, R, Bonavina, L., Fumagalli U., Bona, S. Chella, B. Recent advances in Diseases of the esophagus. pg. 37-40.

Kubba AK, Poole NA, Watson A. Role of p53 assessment in management of Barrett's esophagus. Dig Dis Scienc 1999; 44(4): 659-667.

Kuwahara M, Hirai T, Yoshida K, Yamashita Y, Hihara J, Inoue TT. p53, p21(Waf1/Cip1) and cyclin D1 protein expression and prognosis in esophageal câncer. Dis Esophagus 1999; 12: 116-119.

Lam KY, Law S, Ma LT, Ong SK, Wong J. Pre-operative chemotherapy for squamous cell carcinoma of the oesophagus: do histological assessment and p53 overexpression predict chemo-responsiveness? Eur J Cancer 1997; 33(8): 1221-1225.

Lam KY, Law S, Tung PH, Wong J. Esophageal small cell carcinomas. Clinicopathologic parameters, p53 overexpression, proliferation marker, and their impact on pathogenesis. Arch Pathol Lab Med 2000; 124: 228-233.

Lane D. Curing cancer with p53. N Engl J Med june 22, 2002; 271-2712.

Lane DP. P53, Guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-6.

Lerhbach DM, Nita ME, Cecconello I and Clinical Genomics of Esophageal Cancer Group. Molecular aspects of esophageal squamous cell carcinoma carcinogenesis. *Arq Gastroenterol* 2003; 40(4): 256-261.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-456.

Li H, Miguel SV, Vass WC, Parada LF, Declue JE. Epidermal Growth factor receptor signaling pathways are associated with tumorigenesis in the Nf1:p53 mouse tumor model. *Cancer Res* 2002; 62: 4507-4513.

Li ZG, Shimada Y, Sato F, Maeda M, Itami A, Kaganoi J, Komoto I, Kawabe A, Imamura M. Promotion effects of hot water on N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats. *Oncology Rep* 2003; 10: 421-426.

Lijinsky W. Structure-activity relations in carcinogenesis by N-nitroso compounds. *Cancer Met Rev* 1987; 6: 301-356.

Lijinsky, W. (1992). *Chemistry and Biology of N-nitroso Compounds*. Cambridge, Cambridge University Press.

Liu MC, Geimann EP. p53 gene mutations: case study of a clinical marker for solid tumors. *Semin Oncol* 2002; 29(3): 246-257.

Louro ID. Sistemas de controle celular. In: Louro ID, Llerena Jr JC, Melo MSV, Ashton-Prolla P, Schwarstmann, Conforti-Froes N. *Genética Molecular do Câncer*. 2000; 44-82. MSG Produção Gráfica – São Paulo.

Lutz WK, Fekete T, Vamvakas S. Position and base pair-specific comparison of p53 mutation spectra in human tumors: elucidation of relationships between organs for cancer etiology. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 207-211.

Maillet M. *Biologia celular*. 8. ed.. São Paulo: Santos Editora, 2003. ix, 501 p.: il.

Matsumoto M, Natsugoe S, Nakashima S, Shimada M, Nakano S, Kusano C, Baba M, Takao S, Matsushita Y, Aikou T. Biological Evaluation of undifferentiated carcinoma of the esophagus. *Ann Surg Oncol* 2000; 7(3): 204-209.

Miller EC, Miller JA. Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer* 1981; 47 Suppl: 1055-1064.

Mirvish SS. The etiology of gastric cancer: intragastric nitrosamide formation and other theories. *J Nat Cancer Inst* 1983; 71: 629-647.

Mori Y, Koide A, Kobayashi Y, Morimura K, Kaneko M, Fukushima S. Effect of ethanol treatment on metabolic and detoxification of esophagus carcinogenic N-nitrosamines in rat liver. *Mutagenesis* 2002; 17(3): 251-256.

Mowat MA, Chang A, Kimura N, Bernstein A, Benchimal S. Rearrangements of the cellular p53 gen in erythroleukaemic cells transformed by friend virus. *Nature* 1985; 314: 633-636.

Muñoz N, Victoria CG, Crespi M, Saul C, Braga NM, Correa P. Hot mate drinking and precancerous lesions of the oesophagus: an endoscopic survey in southern Brazil. *Int J Cancer* 1987; 39: 708-9.

Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 1681-1688.

Nakashima S, Natsugoe S, Matsumoto M, Miyazono F, Nakajo A, Uchikura K, Tukuda K, Ishigami S, Baba M, Takao S, Aikou T. Clinical significance of circulation tumor cells in blood by molecular detection and tumor markers in esophageal cancer. *Surgery* 2003; 133: 162-169.

Naoki H, Tachibana M, Dhar DK, Yoshimura H, Nagasue N. Expression of the p53 and Rb proteins in squamous cell carcinoma of the esophagus: their relationship with clinicopathologic characteristics. *Ann Surg Oncol* 1999; 6(5): 489-494.

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Hastetter R, Cleary K. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 1989; 342: 705-708.

Olivier M, Hussain SP, Fromentel CC, Hainaut P, Harris CC. TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. In: Buffler P, Rice J, Baan R, Bird M, Boffetta P. *Mechanisms of carcinogenesis: Contributions of molecular epidemiology*. IARC Scientific Publications 2004.

Parenti AR, Rugge M, Frizzera E, Ruol A, Noventa F, Ancona E, et al. p53 overexpression in the multistep process of esophageal carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 1995; 19: 1418-22.

Pera M, Fernandez PL, Pera M, Palacio A, Cardesa A, Dasenbrockn C, Tillman T, Mohr U. Expression of cyclin D1 and p53 and its correlation with proliferative activity in the spectrum of esophageal carcinomas induced after duodenal content reflux and

2,6-dimethylnitrosomorpholine administration in rats. *Carcinogenesis* 2001; 22(2): 271-277.

Peralta-Zaragoza O, Bahena-Roman M, Diaz-Benítez CE, Madri-Marina V. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Publica Mex* 1997; 39: 451-462

Ribeiro Jr U, Finkelstein SD, Safatle-Ribeiro AV, Landreneau RJ, Clarke MR, Bakker A, Swalsky PA, Gooding WE, Posner MC. p53 sequence análisis predicts treatment response and outcome of patients with esophageal carcinoma. *Cancer* 1998; 83(1): 7- 18.

Ristamäki, A., Honkanen, N. Jänkälä, H., Sipponen, P., Härkönen, M. Expression of Cyclooxygenase-2 in Human Gastric Carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 1276-80.

Rosen N. The molecular basis for cellular transformation: implications for esophageal carcinogenesis. *Semin Oncol* 1994; 21: 416-24.

Royds JA, Dower SK, Qwarnstrom EE, Lewis CE. Response of tumour cells to hypoxia: role of p53 and NFkB. *Clin Pathol: Mol Pathol* 1998; 51: 55-61.

Rubio CA, Liu F, Chejfec G, Sveander M. The induction of esophageal tumors in mice: dose and time dependency. *In Vivo* 1987; 1: 35-8.

Saeki H, Ohno S, Miyazaki M, Araki K, Egashira A, Kawaguchi H, Watanabe M, Morita M, Sugimachi K. p53 protein accumulation in multiple oesophageal squamous cell carcinoma: relationship to risk factors. *Oncology* 2002; 62: 175-179.

Saito H, Tsujitani S, Oka S, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. The expression of murine double minute 2 is a favorable prognostic marker in esophageal squamous

cell carcinoma without p53 protein accumulation. *Ann Surg Oncol* 2002; 9(5): 450-456.

Sallet JA, Andreollo NA, Venco FE, Brandalise NA, Leonardi LS. Carcinoma epidermóide de esôfago induzido pela dietilnitrosamina (DEN). *Acta Cir Bras* 1996; 11(3): 138-143.

Sallet JA, Zilberstein B, Andreollo NA, Eshkenazy R, Pajeki D. Experimental esophageal carcinogenesis: technical standardization and results. *Dis Esophagus* 2002; 15: 278-281.

Sander EB, Edelweis MIA. Expressão de Her-2/neu e p53 em adenocarcinoma de esôfago de cárdia – 2001 Dissertação(Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Sarbia M, Stahl M, Fink U, Willers R, Seeber S, Gabbert HE. Expression of apoptosis-regulating proteins and outcome of esophageal cancer patients treated by combined therapy modalities. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2991-2997.

Segal F, Prolla JC. Estudo da Carcinogênese da adenocarcinoma de esôfago: análise imunohistoquímica e molecular do gen p53 em pacientes com metaplasia intestinal da cárdia e com esôfago de Barret - 2002 Tese (Doutorado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994; 79: 551-555.

Shimada H, Kitabayashi H, Nabeya Y, Okazumi S, Matsubara H, Funami Y, Miyazawa Y, Shiratori T, Uno T, Itoh H, Ochiai. Treatment response and prognosis of patients after recurrence of esophageal cancer. *Surgery* 2003; 133: 24-31.

Shimada H, Nabeya Y, Okazumi SI, Matsubara H, Funami Y, Shiratori H, Takeda A, Ochiai T. Prognostic significance of serum p53 antibody in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Surgery* 2002; 132: 41-47.

Shimada H, Okazumi S, Takeda A, Nabeya Y, Matsubara H, Funami Y, Hayasiu H, Gunji Y, Suzuki T, Ochiai T. Presence of serum p53 antibodies is associated with decrease in vitro chemosensitivity in patients with esophageal cancer. *Surg Today* 2001; 31: 591-596.

Shimada H, Takeda A, Arima M, Okazumi S, Matsubara H, Nabeya Y, Funami Y, Hayashi H, Gunji Y, Suzuki T, Kobayashi S, Ochiai T. Serum p53 antibody is a useful tumor marker in superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 1677-1683.

Shimada Y, Imamura M, watanabe G, Uchida S, Harada H, Makino T, Kano M. Prognostic factors of oseophageal squamous cell carcinoma from the perspective of molecular biology. *Br J Cancer* 1999; 80(8): 1281-1288.

Shimoji H, Miyazato, Nakachi A, Kuniyoshi S, Isa T, Shiraishi M, Muto Y, Toda T. Expression of p53, bcl-2, and bax as predictors of response to radiotherapy in esophageal cancer. *Dis Esophagus* 2000; 13: 185-190.

Shirai N, Tsukamoto T, yamamoto M, lidaka T, Sakai H, Yanai T, Masegi T, Donehower LA, Tatematsu M. Elevated susceptibility of the p53 knockout mouse esophagus to methyl-N-amylNitrosamine carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2002; 23(9): 1541-1547.

Souza RF, Meltzer SJ. The molecular basis for carcinogenesis in metaplastic columnar-lined esophagus. *Gastroenterolgy* 1997; 26: 583-97.

Souza RF. Molecular and biologic basis of upper gastrointestinal malignancy – esophageal carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am* 2002; 11: 257-272.

Sugimachi K, Kitamura M, Matsuda H, Okudaira Y. Tumor antigen TA-4: an aid in detection post-operative recurrences of esophageal carcinoma. *Dis Markers* 1987; 5: 67-73.

Velho AV, Krueel CDP. A influência do chá preto sobre a gênese tumoral esofágica induzida pela dietilnitrosamina: modelo experimental em camundongos – 1998 Dissertação(Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Volgestein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9: 138-141.

Waddell WJ. Threshold for carcinogenicity of N-nitrosodiethylamine for esophageal tumors in rats. *Food Chem Toxicol* 2003; 41: 739-741.

Wagata T, Shibagaki I, Imamura M, Shimada Y, Toguchida J, Yandell DW, Ikenaga M, Tobe T, Ishizaki K. Loss of 17p, mutation of the p53 gene, and overexpression of p53 protein in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 1993; 53: 846-850.

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.

Wang LD, Yue WB, Zhong Y, Feng CW, Liu B, Zhou Q, Jia YY, Zheng S, Gao SS, Xie XJ, Fan ZM, Niou ZH, Zhuang ZH, Yang CS, Bai YM, Qi YJ. Endoscopic screening and determination of p53 and proliferating cell nuclear antigen in esophageal

multistage carcinogenesis: a comparative study between high a low-risk populations in henan, northern China. *Dis Esophagus* 2002; 15: 80-84.

WHO International histologic Classification of Tumors (1977) 18. Histological typing of gastric and oesophageal tumors. Geneva.

XU M, Jin YL, Fu J, Huang H, Chen SZ, Qu P, Tian HM, Liu ZY, Zhang W. The abnormal expression of retinoic acid receptor RAR, p53 and Ki67 protein in normal, premalignant and malignant esophageal tissues. *World J Gastroenterol* 2002; 8(2): 200-202.

YANG CS, Wang ZY. Tea and cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1038-1049.

Zhang W, Rashid A, Wu H, Xu XC. Differential expression of retinoic acid receptors and p53 protein in normal, premalignant, and malignant esophageal tissues. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127: 237-242.