



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Diego Sá Leal de Oliveira


**Análise do efeito do etanol sobre a expressão de proteínas de
diferenciação do epitélio escamoso no esôfago de camundongos
BALB/c**

Rio de Janeiro

2013

Diego Sá Leal de Oliveira

Análise do efeito do etanol sobre a expressão de proteínas de diferenciação do epitélio escamoso no esôfago de camundongos BALB/c



-Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra.Tatiana de Almeida Simão

Coorientador: Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

O48 Oliveira, Diego Sá Leal de.
Análise do efeito do etanol sobre a expressão de proteínas de diferenciação do epitélio escamoso no esôfago de camundongos BALB/c / Diego Sá Leal de Oliveira. – 2013.
69 f.

Orientadora: Tatiana de Almeida Simão.
Coorientador: Luís Felipe Ribeiro Pinto.
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Esôfago – Câncer – Teses. 2. Etanol – Teses. 3. Proteínas celulares – Teses. 4. Proliferação de células. I. Simão, Tatiana de Almeida. II. Pinto, Luís Felipe Ribeiro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.329-006.6

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Diego Sá Leal de Oliveira

Análise do efeito do etanol sobre a expressão de proteínas de diferenciação do epitélio escamoso no esôfago de camundongos BALB/c

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 19 de março de 2013.

Orientadora: Prof.^a Dra. Tatiana de Almeida Simão
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Yael de Abreu Villaça
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Andre Luiz Mencialha
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Simone de Queiroz Chaves Lourenço
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Marcos e Gláucia, que me ensinaram integridade, moral e justiça, e que são minha motivação para seguir em frente!

Ao meu irmão Pedro Henrique, que faz tudo fazer sentido!

À Juliana, que me fez ver a vida com outros olhos!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que age sobre tudo!

À minha orientadora, Prof.^a Tatiana, Tati, que sempre acreditou em mim e me apoiou. Obrigado pelo cuidado!

Ao prof. Luis Felipe, por todos os ensinamentos científicos e não científicos, obrigado pela orientação!

Aos professores Rodolpho e Ana, que sempre se mostraram solícitos, principalmente ao ensinar!

À Juliana, minha maravilhosa companheira, que esteve ao meu lado em todos os momentos, que não me deixou desanimar, que me reergueu, que me faz sorrir e que me faz feliz! Essa menina mulher, que é meu grande exemplo de obstinação! Você mudou a minha vida! Obrigado por tudo!

À Isabela, minha grande amiga, que por todos esses anos tem me apoiado e os tornou muito divertidos dentro e fora do laboratório! Além da parceria de sempre, como nos blocos. Sua amizade é única! Obrigado por todo apoio!

Ao Paulo Thiago, Leão, um grande amigo que descobri sob suas várias camadas. Sua fidelidade e justiça são grandes exemplos! Obrigado por todo apoio!

Ao Adilson, Ed, um amigo que apesar de ser muito divertido e brincalhão, sabe ser sério e muito competente no momento certo! Você é um exemplo de vitória! Obrigado por todo apoio!

À Ester, que, com sua múltipla inteligência, me ensinou e me ensina muito, principalmente sobre o mundo, e me faz ter maiores horizontes! Obrigado por todo apoio!

Ao Vagner, por me apoiar e me orientar em alguns dos momentos mais difíceis dentro e fora do laboratório nesses dois anos! Muito obrigado!

A Tânia, que por ter me ajudado tanto com as análises, com dúvidas sobre as técnicas quanto com o entendimento da histopatologia da doença. Muito obrigado!

Ao grupo ao qual fiz parte por quatro anos e meio, que me ensinou muito, me fez amadurecer e também me divertiu bastante! Muito obrigado a todos! Especialmente Alda, Marina, Monique, Nathalia, Nina, Pedro e Sheila.

Aos meus amigos de sempre que apesar de não terem participado ativamente desse dois difíceis anos, soube que sempre poderia contar com eles. E também o fizeram mais divertido e alegre nos intervalos de descanso: Leonardo, Suellen, Juliana (Jujuka) e Mariana.

Aos meu amigos do CPII, que mal posso descrever meu carinho! Principalmente os que tiveram sempre tão próximos, como se nunca estivéssemos estado distantes: Xico, Vinicius, Andinho, Paulo e Mari!

Aos meus tios que sempre me apoiaram, Fátima e Sebastião. E minha primas-irmãs Evinha, Marcia e Marcele! Muito obrigado, sem vocês não teria chegado até aqui!

Ao meu irmão, Pedro Henrique que está ser tornando um homem, do qual já tenho orgulho! Você me mostrou o sentido da vida, aprender, refletir e ensinar!

À minha mãe, Glauca, não consigo imaginar o que poderia ser melhor em você! Tenho que aprender cada vez mais contigo, pois assim não haverá limite para mim!

Ao meu pai, Marcos, orgulho de ser humano! Quero aprender cada vez mais e me tornar cada vez mais forte para me tornar um homem, próximo do que é você!

Que força é esta, eu não sei; tudo o que sei é que existe, e está disponível apenas quando alguém está num estado em que sabe exatamente o que quer, e está totalmente determinado a não desistir até conseguir.

Alexander Graham Bell

RESUMO

OLIVEIRA, Diego Sá Leal de. *Análise do efeito do etanol sobre a expressão de proteínas de diferenciação do epitélio escamoso no esôfago de camundongos BALB/c*. 2013. 69f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Câncer de esôfago (CE) é um dos tipos de câncer mais frequentes e agressivos, estando entre os dez tipos de câncer mais incidentes e letais no mundo. Entre as regiões mais incidentes do CE estão os países em desenvolvimento, como o Brasil. Apesar de recentes avanços em terapias anticâncer, menos de 10% dos pacientes acometidos por esta doença possuem uma sobrevida maior que cinco anos após seu diagnóstico e este fato é consequência do diagnóstico tardio, uma vez que os sintomas só aparecem em estádios bem avançados. Devido a este panorama há uma grande busca por métodos e, principalmente, biomarcadores de diagnóstico que possam detectar a doença em estádios iniciais e assim aumentar a sobrevida dos pacientes. A discriminação entre tumor e mucosa normal é possível ser feita endoscopicamente, porém, para detecção precoce de tumores esofágico seria importante discriminar mucosa saudável de lesão precursora, como displasia. Uma diferença típica entre tecido normal e displasia é a perda de diferenciação celular, sugerindo que proteínas de diferenciação possam ser um potencial alvo para serem usadas como biomarcadores de detecção precoce em câncer. Citoqueratinas (CKs) e esofagina (SPRR3) são importantes proteínas envolvidas na diferenciação das células no epitélio escamoso. A proteína (SPRR3) vem sendo estudada como um possível biomarcador de detecção de tumores em estádios iniciais de desenvolvimento. Em CE tem sido descrito perda da expressão de SPRR3 quando comparada com a mucosa saudável. Além disso, já foi mostrado que a análise combinada da expressão das duas variantes de SPRR3 (*SPRR3-v1* e *SPRR3-v2*) é capaz de discriminar a mucosa esofágica de indivíduos saudáveis da mucosa adjacente e do tumor com alta sensibilidade e especificidade. Porém, uma associação significativa foi encontrada entre uma menor expressão de *SPRR3-v2* e o consumo de álcool. Este dado gerou a hipótese de que o álcool pode levar a carcinogênese por estimular a proliferação e/ou perda de diferenciação do epitélio escamoso e desta forma contribuir para o surgimento do tumor. Para testar esta hipótese, foi realizado um modelo experimental utilizando camundongos BALB/c que receberam diariamente etanol em diferentes concentrações por diferentes intervalos de tempo. Foram analisados critérios de toxicidade dos animais e critérios para avaliação histopatológica no tecido esofágico. Além disso, foi analisado o perfil de expressão de proteínas envolvidas em diferenciação e proliferação celular que pudessem sugerir alterações no epitélio esofágico induzidas pelo etanol, sendo estas SPRR3, CK5/8 e CK14 e Ki67. Inflamação foi a única alteração histológica encontrada, porém ocorreu de forma aleatória, não podendo, portanto, ser associada ao etanol. Alteração no padrão de expressão das proteínas analisadas foi encontrada em regiões inflamadas. Porém, a maioria das amostras não apresentou alterações histopatológicas, nem tampouco alteração de expressão das proteínas, sugerindo que em epitélio esofágico de camundongos BALB/c o etanol não é capaz de induzir isoladamente alteração na proliferação e perda de diferenciação celular.

Palavras-chave: Etanol. Proliferação. Diferenciação. SPRR3. Câncer de esôfago.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Diego Sá Leal de. *Analysis of the effect of ethanol on the expression of proteins in differentiation of the stratified squamous epithelium of esophagus of mice BALB / c.* 2013. 69f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Esophageal cancer (EC) is one of the ten most common and aggressive cancers worldwide and the developing countries, including Brazil, are among the most incident regions. Despite recent advances in anticancer therapies, less than 10% of the patients with this disease have a survival rate higher than five years after diagnosis and this is a consequence of late diagnosis, since the symptoms only appear in advanced stages. Because of this background there is a big search for methods and diagnostic biomarkers that enable the detection of the disease in early stages and thus increase patient survival. The discrimination between tumor and normal mucosa can be done endoscopically, however, for early detection of esophageal tumors it would be important to discriminate healthy mucosa from precursor lesions, such as dysplasia. A typical difference between normal tissue and dysplasia is the loss of cellular differentiation, suggesting that differentiation markers may be potential targets to be used as biomarkers for cancer early detection. Cytokeratins (CK) and esophagin (SPRR3) are involved in cell differentiation in squamous epithelium. SPRR3 has been studied as a potential biomarker for the detection of tumors in their initial stages of development. In CE it has been described a loss of SPRR3 expression compared to healthy mucosa. Furthermore, it has been shown that the combined analysis of the expression of the two variants of *SPRR3* (*SPRR3-v1* and *SPRR3-v2*) is able to discriminate the esophageal mucosa from healthy individuals from the tumors and adjacent mucosa from patients with high sensitivity and specificity. Besides, a significant association was found between lower expression of *SPRR3-v2* and alcohol consumption. This finding led to the hypothesis that alcohol can lead to carcinogenesis by stimulating proliferation and/or differentiation loss of squamous epithelium and thereby contribute to the tumor development. To test this hypothesis we conducted an experimental model using BALB/c mice treated daily with ethanol at different concentrations for different time intervals. We analyzed animal toxicity and pathological alterations in the esophageal epithelium. Furthermore, we analyzed the expression profile of proteins involved in cellular differentiation and proliferation that could suggest changes in the esophageal epithelium induced by ethanol, which were SPRR3, CK5/8 and CK14 and Ki67. Inflammation was the only histological abnormality found, however, occurred randomly and can't therefore be associated with ethanol. Changes in the expression pattern of the proteins analyzed were found in inflamed areas. However, most of the samples showed no histological changes nor alterations in protein expression, suggesting that in the esophageal epithelium of BALB/c ethanol is not capable of inducing proliferation and/or loss of cell differentiation.

Keywords: Ethanol. Proliferation. Differentiation. SPRR3. Cancer of esophagus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estimativa da taxa de incidência de câncer de esôfago para ambos os sexos.....	20
Figura 2 –	Representação espacial da distribuição das taxas brutas de incidência, no Brasil em homens e mulheres, estimadas.....	22
Figura 3 –	Epitélio escamoso estratificado de camundongo com suas camadas.....	26
Figura 4 –	Esquema do mapa genômico dos clones dos genes <i>SPRR</i>	28
Figura 5 –	Diferença do grau de diferenciação entre mucosa normal e displasia de alto grau no epitélio esofágico humano.....	30
Figura 6 –	Linha do tempo do tratamento dos animais.....	36
Figura 7 –	Fotografia representativa de amostra de esôfago preservada em bloco de parafina.....	37
Figura 8 –	Figura representativa de corte histológico feito a partir de amostra de esôfago preservada em bloco de parafina.....	37
Figura 9 –	Fotomicrografia representativa de tecido esofágico normal de camundongo BALB/c.....	39
Figura 10 –	Fotomicrografia representativa de tecido epitelial estratificado queratinizado de esôfago de camundongo BALB/c.....	39
Figura 11 –	Fotomicrografia representativa de tecido esofágico de camundongo BALB/c apresentando inflamação leve.....	40
Figura 12 –	Fotomicrografia representativa de tecido esofágico de camundongo BALB/c apresentando inflamação moderada.....	41
Figura 13 –	Fotomicrografia representativa de tecido esofágico de camundongo BALB/c apresentando inflamação acentuada.....	42
Figura 14 –	Fotografias de camundongos BALB/c comparando animais saudáveis e animais com pelagem arrepiada.....	50
Figura 15 –	A a F - Figura representativa de um esôfago de camundongo BALB/c.....	52
Figura 16 –	A a D - Figura representativa da expressão de <i>SPRR3</i> no epitélio esofágico de camundongo BALB/c.....	54

Figura 17 –	A a D - Figura representativa da expressão de CK5/8 no epitélio esofágico de camundongo BABL/c.....	55
Figura 18 –	A a D - Figura representativa da expressão de CK14 no epitélio esofágico de camundongo BABL/c.....	56
Figura 19 –	A a D - Figura representativa da expressão de KI67 no epitélio esofágico de camundongo BABL/c.....	57
Figura 20 –	A a E - Figura representativa do epitélio esofágico de camundongo BABL/c apresentando inflamação e alteração na expressão de SPRR3, CK5/8, CK14 e KI67.....	58
Figura 21 –	Esquema de epitélio esofágico mostrando a expressão das proteínas SPRR3, CK5/8, CK14 e KI67.....	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva de sobrevivência com o percentual de camundongos e separados por grupo de tratamento.....	46
Gráfico 2 – Comparação da média da massa corporal, em gramas, dos camundongos separados por grupos, em duas semanas de tratamento.....	47
Gráfico 3 – Comparação da média da massa corporal, em gramas, dos camundongos separados por grupos, em quatro semanas de tratamento.....	48
Gráfico 4 – Variação da média da massa corporal de camundongos BALB/c.....	49
Gráfico 5 – Curva de Kaplan-Meier com desfecho inflamação.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Novos casos de câncer estimados em todo o mundo.....	19
Tabela 2 –	Animais que apresentaram alteração histopatológica.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCE	Adenocarcinoma de esôfago
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de Variância)
CK5/8	Citoqueratina 5/8
CK14	Citoqueratina 14
CE	Câncer de esôfago
CEE	Carcinoma epidermóide de esôfago
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CO ₂	Dióxido de carbono
DL	Displasia leve
DM	Displasia moderada
DA	Displasia acentuada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HE–	Hematoxilina-eosina
IARC	<i>International Agency For Research On Cancer</i> (Agencia Internacional de Pesquisa sobre o Câncer)
IBRAG	Instituto Roberto Alcantara Gomes
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Ki61	Marcador de proliferação celular
KS	Kolmogorov-Smirnov
RNA	Ácido Ribonucleico
SPRR	<i>small prolin-rich proteins</i> (pequenas proteínas ricas em prolina)
SPRR3	<i>small prolin-rich proteins 3</i> (pequenas proteínas ricas em prolina - esofagina)
TBS	Solução salina tamponada com Tris

UERJ Universidade do Estado do Rio de Janeiro

UVB Radiação ultravioleta B

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	CÂNCER	17
1.1	Câncer de esôfago	18
1.1.1	<u>Carcinoma epidermóide de esôfago</u>	23
1.2	Proteínas de diferenciação do epitélio escamoso esofágico	26
1.3	Álcool e câncer	31
2	OBJETIVO	34
2.1	Objetivos específicos	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Modelo Experimental	35
3.2	Análise histológica	38
3.3	Imuno-histoquímica	43
3.4	Análise estatística	44
4	RESULTADOS	45
4.1	Análise da toxicidade do tratamento	45
4.2	Análise histopatológica dos esôfagos dos camundongos tratados	50
5	DISCUSSÃO	61
	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66

INTRODUÇÃO

O câncer de esôfago é um dos tipos de câncer mais frequentes e mais agressivos no mundo (Jemal *et al.*, 2011). Esta doença possui uma grande variação na incidência em diversas regiões do mundo (Whelan *et al.*, 1990; Munoz *et al.*, 1993), sugerindo que o desenvolvimento tumoral esteja associado a fatores ambientais. Diversos estudos epidemiológicos apontam que o etilismo e o tabagismo são os principais fatores de risco para o principal subtipo da doença, carcinoma epidermóide de esôfago, havendo um efeito sinérgico destes dois fatores (*American Cancer Society*, 2008).

Apesar de recentes avanços em terapias para o tratamento do câncer, menos de 10% dos pacientes acometidos por esta doença possuem uma sobrevida maior que cinco anos após seu diagnóstico (McLarty *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1997). Este fato é consequência do diagnóstico tardio, uma vez que os sintomas só aparecem em estádios bem avançados, refletindo a ineficácia do tratamento, restando aos pacientes apenas cuidados paliativos (Ribeiro Pinto *et al.*, 2003; McLarty. *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1997). Em razão da agressividade dessa neoplasia há uma grande busca por métodos e, principalmente, biomarcadores de diagnóstico que possam detectá-la em estádios iniciais e assim aumentar a sobrevida dos pacientes (Adams *et al.*, 2008). Devido à diferença quanto ao grau de diferenciação do tecido esofágico entre mucosa normal e displasia, proteínas de diferenciação podem ter um potencial para serem usadas como biomarcador de detecção precoce em câncer. Porém sugere-se que o etanol, que é um dos principais fatores etiológicos, contribuiria para a carcinogênese por estimular proliferação celular, podendo levar a redução da diferenciação celular no tecido (Haentjens *et al.*, 1987; Mak *et al.*, 1987)

A fim de avaliar se o etanol reduziria o poder discriminatório entre amostras alteradas e amostras saudáveis na possível utilização de proteínas de diferenciação como biomarcadores de detecção precoce, a hipótese do trabalho foi de que o etanol seria capaz de alterar o padrão de expressão de proteínas de diferenciação do epitélio esofágico devido ao aumento da proliferação do epitélio. Testada através da apreciação da expressão de proteínas de diferenciação (citoqueratinas 5 e 14, e esofagina), possíveis biomarcadores de diagnóstico, e marcador de proliferação (ki67) em amostras de camundongos BALB/c tratados com etanol de forma aguda e crônica.

1 Câncer

Câncer atualmente é um termo que engloba mais de 100 diferentes doenças, pois cada tipo de tumor possui diversas peculiaridades, que envolvem: fatores etiológicos, características histopatológicas, moleculares, suscetibilidade a tratamento, entre muitos outros. No campo celular e molecular e possui como principal característica um crescimento desordenado e difuso das células aberrantes. Tumores malignos tanto podem crescer de forma rápida como levar anos antes de afetar a homeostase do organismo. Normalmente possuem uma estrutura atípica, menos diferenciação das células, são frequentemente invasivos, dificultando sua ressecção cirúrgica e com a capacidade de gerar metástases à distância (Cotran *et al.*, 2000). Esses fatores são críticos para que o câncer seja uma enfermidade de grande dificuldade de tratamento e bastante letal.

O câncer é a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento, como o Brasil (Organização Mundial de Saúde, 2008; Jemal *et al.*, 2011). Para 2008, estimou-se que ocorreriam cerca de 12,7 milhões de casos de câncer e 7,6 milhões de mortes por câncer, dos quais, 56% dos casos e 64% das mortes, foram estimados para países economicamente em desenvolvimento (Ferlay *et al.*, 2010). No Brasil, para o ano de 2012 foi estimado aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (INCA, 2012). Estimativas da Organização Mundial de Saúde apontam uma tendência de que haja um aumento de 50% no número de novos casos e de 100% na mortalidade decorrente de neoplasias até 2020. Este aumento se deve, em grande parte, ao envelhecimento e crescimento da população mundial, junto com uma crescente adoção de comportamentos de risco, especialmente em países economicamente em desenvolvimento (Jemal *et al.*, 2011).

1.1 Câncer de esôfago

O câncer de esôfago (CE) é um dos tipos de câncer mais frequentes e mais agressivos, estando entre os dez tipos de câncer mais incidentes e letais no mundo. Dentre todas as neoplasias, que podem atingir homens e mulheres, o CE é a oitava mais incidente e a sexta causa mais comum de morte por câncer. Para 2008, foram estimados 482.300 novos casos e 406.800 mortes por CE, sendo que cerca de 83% dos casos e 86% das mortes ocorrem nos países em desenvolvimento. O CE é de 3 a 4 vezes mais comum entre homens que mulheres, ocupando respectivamente, a sexta e a décima primeira colocação em incidência. Essa doença possui também uma alta letalidade, ocupando o quinto lugar em mortalidade entre os homens e o oitavo entre as mulheres (GLOBOCAN, 2008; Jemal *et al.*, 2011). (Tabela 1) Devido a esse panorama devastador, o CE representa um problema de saúde pública de grande relevância.

Tabela 1 - Novos casos de câncer estimados (milhares), ASR (por 100.000 habitantes) e os riscos cumulativos (por cento) por sexo e sítio de câncer em todo o mundo, 2008

Sítio de câncer	Ambos os sexos				Homens				Mulheres			
	Casos	(%)	ASR (world)	Risco cum. (0-74)	Cases	(%)	ASR (world)	Risco cum. (0-74)	Cases	(%)	ASR (world)	Risco cum. (0-74)
Lábio, cavidade oral	263	2.1	3.9	0.4	170	2.6	5.3	0.6	92	1.5	2.6	0.3
Nasofaringe	84	0.7	1.2	0.1	57	0.9	1.7	0.2	26	0.4	0.8	0.1
Faringe	135	1.1	2.0	0.2	107	1.6	3.4	0.4	27	0.4	0.8	0.1
Esôfago	482	3.8	7.0	0.9	326	4.9	10.2	1.3	155	2.6	4.2	0.5
Estômago	989	7.8	14.1	1.7	640	9.6	19.8	2.4	349	5.8	9.1	1.0
Colorretal	1233	9.7	17.3	2.0	663	10.0	20.4	2.3	570	9.4	14.6	1.6
Fígado	748	5.9	10.8	1.2	522	7.9	16.0	1.8	225	3.7	6.0	0.7
Vesícula biliar	145	1.1	2.0	0.2	58	0.9	1.8	0.2	86	1.4	2.2	0.3
Pâncreas	277	2.2	3.9	0.4	144	2.2	4.4	0.5	133	2.2	3.3	0.4
Laringe	151	1.2	2.3	0.3	130	2.0	4.1	0.5	21	0.3	0.6	0.1
Pulmão	1608	12.7	23.0	2.8	1095	16.5	34.0	4.1	513	8.5	13.5	1.6
Melanoma de pele	197	1.6	2.8	0.3	101	1.5	3.1	0.3	96	1.6	2.6	0.3
Sarcoma de Kaposi	34	0.3	0.5	0.0	22	0.3	0.6	0.1	12	0.2	0.3	0.0
Mama	1383	10.9	39.0	4.1					1383	22.9	39.0	4.1
Colo uterino	529	4.2	15.2	1.6					529	8.8	15.2	1.6
Corpo de útero	287	2.3	8.2	1.0					287	4.8	8.2	1.0
Ovário	225	1.8	6.3	0.7					225	3.7	6.3	0.7
Próstata	913	7.2	28.5	3.5	913	13.8	28.5	3.5				
Testículo	52	0.4	1.5	0.1	52	0.8	1.5	0.1				
Rim	271	2.1	3.9	0.5	167	2.5	5.2	0.6	103	1.7	2.8	0.3
Bexiga	386	3.0	5.3	0.6	297	4.5	9.1	1.0	89	1.5	2.2	0.2
Cérebro, sistema nervoso	238	1.9	3.5	0.3	127	1.9	3.9	0.4	110	1.8	3.2	0.3
Tireóide	212	1.7	3.1	0.3	49	0.7	1.5	0.2	163	2.7	4.7	0.5
Linfoma de Hodgkin	67	0.5	1.0	0.1	40	0.6	1.2	0.1	27	0.4	0.8	0.1
Linfoma não-Hodgkin	355	2.8	5.1	0.5	199	3.0	6.1	0.6	156	2.6	4.2	0.4
Mieloma múltiplo	102	0.8	1.5	0.2	54	0.8	1.7	0.2	47	0.8	1.3	0.1
Leucemia	351	2.8	5.1	0.5	195	2.9	5.9	0.6	155	2.6	4.3	0.4
Todos cânceres excl. câncer não melanoma de pele	12677	100.0	181.8	18.7	6639	100.0	204.4	21.2	6038	100.0	164.9	16.5

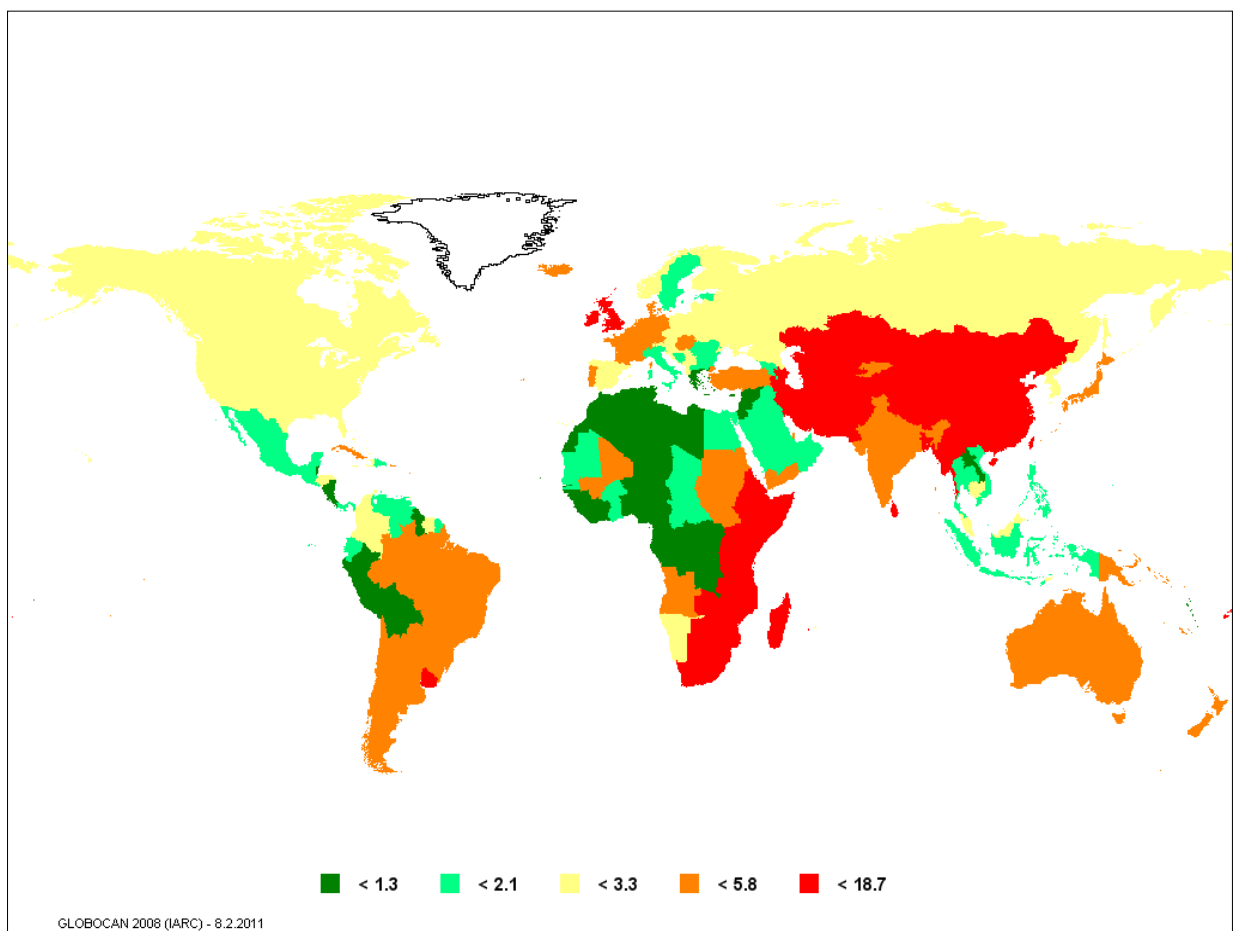
ASR - Taxa ajustada por idade

(Adaptado de GLOBOCAN 2008)

O CE apresenta uma variação geográfica de ampla distribuição e as taxas de incidência variam internacionalmente cerca de 16 vezes, com regiões que apresentam alto risco de CE próximas as regiões que apresentam baixo risco (Jemal *et al.*, 2011). A variação na incidência reflete a forte influência de fatores ambientais no desenvolvimento do CE (Smeds *et al.*, 2002). As regiões mais incidentes são o sul e o leste da África, países do sul e leste asiático, como China e Japão, alguns países europeus como França e países em desenvolvimento, como o Brasil (Parkin. *et al.*, 2005). O CE chega a alcançar taxas de incidência preocupantes em lugares como China ($21/10^5$ habitantes), América do sul ($13/10^5$ habitantes), o Oeste

Europeu ($11/10^5$ habitantes), África do sul ($10/10^5$ habitantes), Japão ($9/10^5$ habitantes) e algumas regiões da antiga União Soviética ($8/10^5$ habitantes). Dentro destas grandes áreas são identificadas regiões menores, nas quais a incidência de CE pode ser de 10 a 50 vezes maior, tais como regiões que incluem o centro e o norte da China, sul da Tailândia, norte da Itália, regiões montanhosas do Japão, parte da costa do Irã e certas províncias da França (Pickens e Orringer, 2003). Já as menores taxas são observadas na África Ocidental e Média e América Central (Jemal *et al.*, 2011). A Figura 1 apresenta a estimativa da incidência do câncer de esôfago no mundo.

Figura 1 - Estimativa da taxa de incidência de câncer de esôfago por 100 000 indivíduos de ambos os sexos (ajustada por idade)

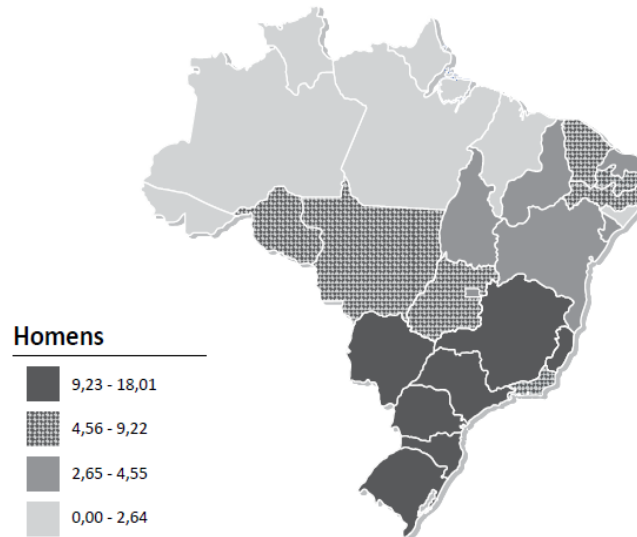


Destaque para as principais regiões afetadas pelo CE nas cores vermelho e laranja (GLOBOCAN, 2008).

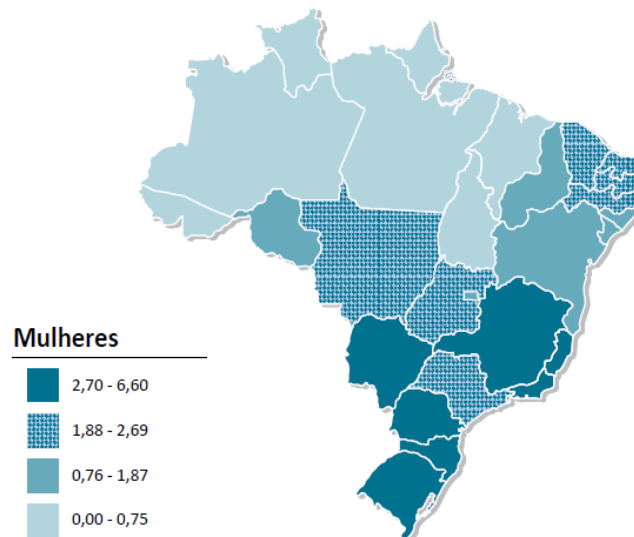
O Brasil, como um país economicamente em desenvolvimento, está entre as regiões mais incidentes de CE. Como pode ser observado na Figura 1, o Brasil possui uma incidência alta desta neoplasia. Porém esses dados acabam sendo mascarados pelas dimensões continentais do país, pois há no Brasil regiões com taxas maiores de incidência (como a Região Sudeste e, principalmente, a Região Sul) em comparação com as demais regiões, (Corley e Buffler, 2001). O estado do Rio Grande do Sul possui a maior incidência de CE do país, com as estimativas para 2012 de $18,01/10^5$ homens e $6,60/10^5$ mulheres, taxa bruta por habitantes. A diferença nas taxas de incidência do CE entre os estados do Brasil é apresentada na figura 2. As estimativas para o ano de 2012 foram de que 7.770 homens e 2.650 mulheres desenvolveriam a doença no Brasil. Esses valores correspondem a um risco estimado de 8 casos novos a cada 100 mil homens e 3 a cada 100 mil mulheres. Para ambos os sexos, o CE é o sétimo em incidência e o oitavo em mortalidade no Brasil. Entre os homens o CE é o sexto câncer mais incidente e o quarto mais letal, enquanto entre as mulheres é o décimo quinto mais incidente e o décimo terceiro mais letal (INCA, 2012; GLOBOCAN 2008).

Figura 2 - Representação espacial da distribuição das taxas brutas de incidência de CE por 100.000 habitantes, no Brasil em homens (A) e mulheres (B), estimadas para 2012 pelo INCA (INCA, 2012)

Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna do esôfago)



Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna do esôfago)



Legenda: A heterogeneidade da doença, em relação à incidência, é mantida tendo como principais regiões os estados do Sul e do Sudeste do país.

Os estudos epidemiológicos levaram a descoberta de que os dois principais subtipos de CE possuíam, além de características histopatológicas e clínicas, uma etiologia distinta. Atualmente esses dois subtipos podem ser classificados como

adenocarcinoma de esôfago (ADCE) e carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) (Montesano *et al.*, 1996).

O ADCE é geralmente mais frequente em países desenvolvidos devido a características sócio-culturais ligadas aos fatores de risco. Porém recentemente tem havido um rápido crescimento da sua incidência em países em desenvolvimento devido, principalmente, a mudanças nos hábitos alimentares destas populações, com um aumento no consumo de alimentos gordurosos e pobres em nutrientes (*junk-food*) (Falk *et al.*, 2009), levando ao excesso de peso e obesidade, que são fatores de risco para o desenvolvimento de ADCE (El-Serag *et al* 2007; Post *et al.* 2007).

O ADCE tem origem a partir da doença do refluxo, na qual os produtos da digestão assim como as secreções gástricas e duodenais seguem o fluxo inverso ao natural da digestão, chegando ao esôfago. Caso esse evento ocorra de maneira crônica, o epitélio esofágico pode sofrer uma transformação denominada metaplasia de *Barrett*, onde o epitélio pavimentoso estratificado (natural do esôfago saudável) é substituído por um epitélio colunar simples (semelhante ao epitélio intestinal). O não tratamento dessa metaplasia pode levar ao surgimento de uma displasia de baixo grau, que pode evoluir para uma displasia de alto grau, e por fim para um ADCE (Wild e Hardie, 2003). O outro subtipo, o CEE é o mais incidente correspondendo a mais de 93% dos casos de câncer de esôfago no mundo (IARC 2008) e terá maior destaque a seguir por ser o tipo histológico alvo do trabalho.

1.1.1 Carcinoma epidermóide de esôfago (CEE)

O CEE apresenta sua maior incidência em países em desenvolvimento, onde este também é o subtipo mais frequente, responsável por aproximadamente 93% de todos os casos de CE (Parkin *et al.*, 2005). No Brasil, um país em desenvolvimento, esta frequência não é diferente, uma vez que este tipo histológico é o mais predominante, responsável por mais de 90% dos casos (Parkin, 2001; INCA, 2011).

Há uma grande variação na incidência do CE em diversas regiões do mundo (Whelan *et al.*, 1990; Munoz *et al.*, 1993), sugerindo que o desenvolvimento tumoral esteja associado a fatores ambientais. Diversos estudos epidemiológicos apontam

que o etilismo e o tabagismo são os principais fatores de risco para o CEE, havendo um efeito sinérgico destes dois fatores. O consumo concomitante de álcool e tabaco leva a um aumento do risco relativo para o surgimento do câncer em mais de 30 vezes (*American Cancer Society*, 2008). O CEE tem tido constante declínio em países ocidentais por causa de reduções, em longo prazo, no consumo de tabaco e álcool (Cook *et al.*, 2009). No entanto, o CEE tem aumentado em certos países na Ásia, como Taiwan, provavelmente como resultado do aumento do consumo de tabaco e álcool (Lu *et al.*, 2010). A maior incidência do CE entre homens do que entre mulheres (Jemal *et al.*, 2011), pode ser devido ao consumo de álcool e tabaco ser mais prevalente no sexo masculino. No entanto, com o crescente aumento do hábito de fumar entre o sexo feminino, é provável que o número de casos de CE também aumente entre as mulheres, como tem acontecido com o câncer de pulmão (INCA, 2009).

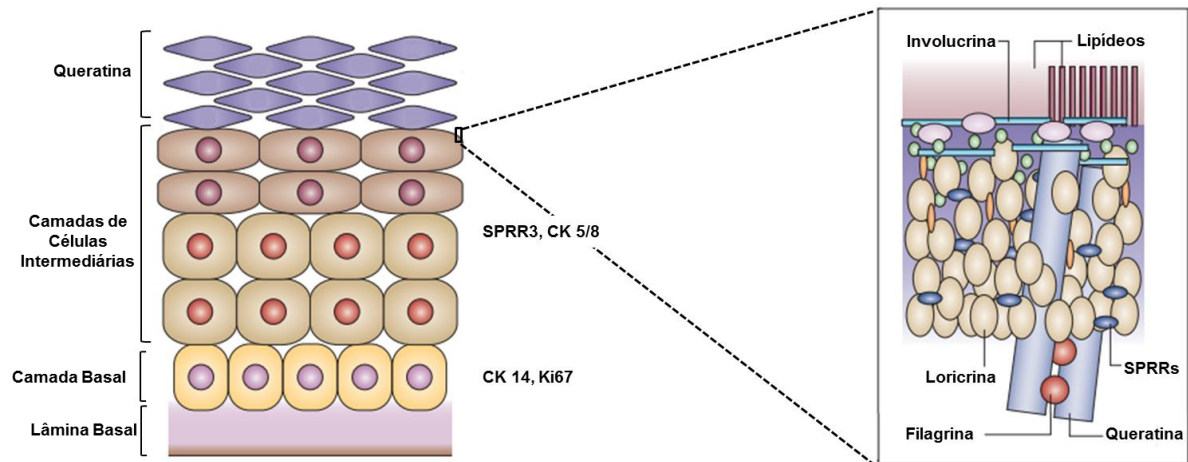
Contudo, outros fatores contribuem para a gênese do CEE. A contaminação de alimentos por nitrosaminas, potentes carcinógenos que apresentam tropismo pelo esôfago (Lijinsky, 1992), a desnutrição e o consumo de chá quente estão envolvidos na etiologia deste câncer na China e na Índia. No Irã, os principais fatores envolvidos são a desnutrição, a ingestão de chá quente e o consumo de ópio enquanto que no Japão apenas o consumo de chá quente parece ter relação direta (Tuyns, 1979; Sepehr *et al.*, 2001). No sul do Brasil, área de alta incidência, além do consumo de bebidas alcoólicas e tabaco, o consumo tradicional de “chimarrão” (erva mate - *Ilex paraguariensis* - consumido em altas temperaturas) tem sido associado ao desenvolvimento do CEE (Castellsagué *et al.*, 1999; 2000).

Apesar de recentes avanços em terapias anticâncer, menos de 10% dos pacientes acometidos por esta doença possuem uma sobrevida maior que cinco anos após seu diagnóstico (McLarty *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1997). Este fato é consequência do diagnóstico tardio, uma vez que os sintomas só aparecem em estádios bem avançados, refletindo a ineficácia do tratamento, restando aos pacientes apenas cuidados paliativos que incluem quimio/radioterapia e/ou ressecção cirúrgica (Ribeiro Pinto *et al.*, 2003; McLarty. *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1997). Também são práticas paliativas utilizadas no tratamento para o CEE, dilatações por endoscopia, colocação de próteses auto-expansivas, evitando o estreitamento esofágico e a braquiterapia (INCA, 2012). Todavia o prognóstico

desses indivíduos poderia ser muito melhor caso o diagnóstico ocorresse em estádios precoces da doença (Yokohama *et al.*, 2003).

Em razão da agressividade dessa neoplasia há uma grande busca por métodos e, principalmente, biomarcadores de diagnóstico que possam detectá-la em estádios iniciais e assim aumentar a sobrevida dos pacientes (Adams *et al.*, 2008). A discriminação entre tumor e mucosa normal é possível ser feita endoscopicamente, porém, para detecção precoce de tumores esofágicos seria importante discriminar mucosa saudável de lesão precursora, como displasias. Uma diferença típica entre tecido normal e displasia é a perda de diferenciação celular. Embora o mecanismo de perda de diferenciação não seja completamente conhecido, sabe-se que o aumento de proliferação celular e a perda de diferenciação ocorrem juntos, isto acontece uma vez que a célula não pode se diferenciar e se replicar ao mesmo tempo, já que a fase de diferenciação é posterior à fase de replicação. Porém, não se sabe se a perda de diferenciação é devido ao aumento de proliferação ou vice e versa. Devido à diferença quanto ao grau de diferenciação do tecido esofágico entre mucosa normal e displasia, proteínas de diferenciação podem ter um potencial para serem usadas como biomarcador de detecção precoce em câncer. A figura 3 apresenta um esquema da constituição do epitélio esofágico em camundongos, destacando as diferentes camadas de células, e algumas das proteínas expressas.

Figura 3 - Epitélio escamoso estratificado de camundongo com suas camadas e a membrana plasmática de célula da camada córnea em detalhe



Legenda: A camada basal do epitélio é uma camada de células indiferenciadas, onde ocorre a expressão de proteínas como CK14 e Ki67; já as camadas intermediárias são camadas de células diferenciadas, que apresentam a expressão de proteínas como SPRR3 e CK5/8. As camadas de queratinas que estão presentes no epitélio escamoso esofágico de camundongos, não estão presentes em humanos.

Fonte: Adaptada de Candi *et al.*, 2005.

1.2 Proteínas de diferenciação do epitélio escamoso esofágico

Citoqueratinas (CKs) são as principais proteínas estruturais encontradas nas células epiteliais e sua expressão está correlacionada com a diferenciação das células no epitélio escamoso, sendo sua função primária conferir resistência física para as células (Karantza V., 2011). Foi previamente mostrado que, como resultado de danos causados por radiação ultravioleta B (UVB), o epitélio escamoso cutâneo desenvolve um fenótipo hiperproliferativo com alteração da expressão de CKs (Bernerd, Asselineau, 1997; Del Bino, *et al.*, 2004).

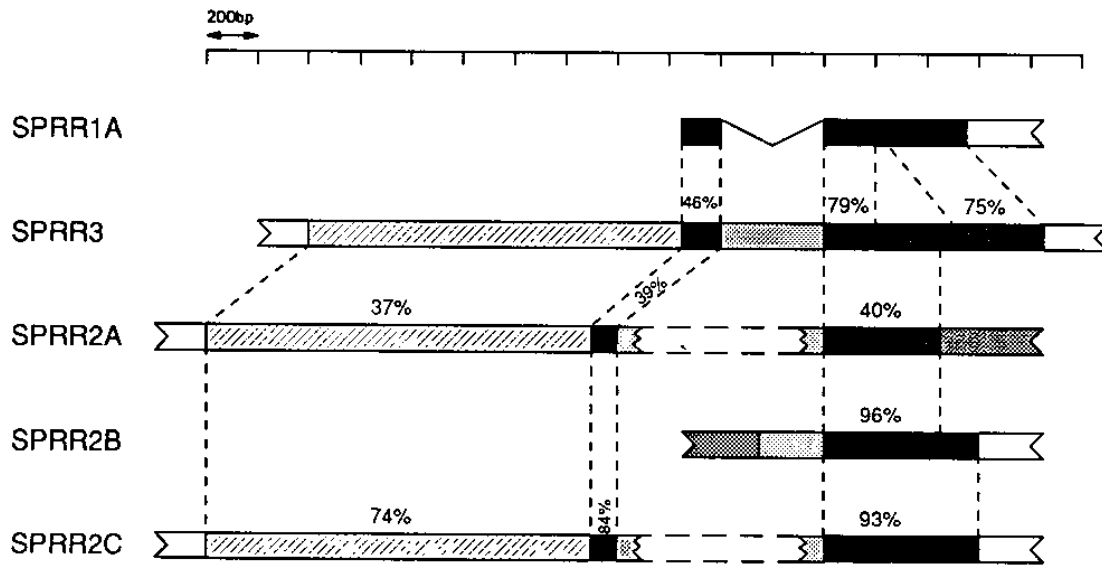
Durante o desenvolvimento da tese da Dra. Tania Blanco (Blanco, 2010) observou-se que amostras de esôfago de camundongos do grupo controle exibiam positividade para CK14 nos queratinócitos da camada basal, sendo, portanto, um marcador de células indiferenciadas, já CK5/8 estavam presentes nos queratinócitos suprabasais em toda a extensão do esôfago, sendo um marcador de células diferenciadas. Porém, nos grupos que receberam tratamentos que induziam

inflamação em consequência de lesão térmica, foi observada alteração no padrão de expressão de CKs no epitélio esofágico. Este padrão alterado de CKs era localizado nas áreas de epitélio adjacente às regiões inflamadas. O padrão de alteração se traduziu pela repressão ou diminuição da expressão da CK5/8, que se mostrou negativa ou com positividade restrita às camadas mais superficiais do epitélio; e detecção de positividade para CK14 em toda espessura epitelial (reação positiva nos queratinócitos basais e suprabasais). No epitélio mais afastado das áreas de inflamação, era observado o retorno do padrão normal de expressão dessas citoqueratinas, reproduzindo o aspecto visto no epitélio dos camundongos do grupo controle. Além disso, uma das conclusões do referido trabalho foi que a alteração na expressão das CKs 5/8 e 14 está relacionada com o estado inflamatório/regenerativo do epitélio.

Uma proteína envolvida em diferenciação e inicialmente descrita no esôfago, por isso nomeada esofagina (SPRR3), vem sendo estudada como um possível biomarcador de detecção de tumores em estádios iniciais de desenvolvimento (Abraham *et al.*, 1996). O gene que codifica esta proteína, *SPRR3*, se localiza na região 1q21 (Steinert *et al.* 1998; Gibbs *et al.* 1993; Zhang *et al.* 2008). Através de um evento de *splicing* alternativo o gene é capaz de dar origem a dois transcritos de RNAm diferentes. A variante *SPRR3-v1* não possui um éxon alternativo em relação à variante *SPRR3-v2*, porém devido a esse sítio de processamento estar situado a montante do códon de iniciação da tradução (região não traduzida – 5'UTR) ambas as variantes de RNAm produzem exatamente a mesma proteína (Simão *et al.*, 2011).

A *SPRR3* é um marcador de diferenciação epitelial, membro da família das pequenas proteínas ricas em prolina (*SPRR* – *small prolin-rich proteins*). *SPRR* é uma família multigênica cujo *locus* codifica 12 proteínas já identificadas: duas *SPRR1*, oito *SPRR2*, uma *SPRR3* e uma *SPRR4* (Gibbs *et al.* 2003; Fisher *et al.* 1999; Cabral *et al.* 2001). Gibbs e colaboradores (1993) caracterizaram um mapa genômico através de clones isolados dos genes de *SPRR* (Figura 4) onde é possível observar as variâncias e graus de identidade entre as variantes gênicas de *SPRR*.

Figura 4 - Esquema do mapa genômico dos clones dos genes *SPRR*



Legenda: A porcentagem da identidade da sequência está indicada para as diferentes seções gênicas. Os símbolos seguintes foram usados: área hachurada, região promotora; área pontilhada clara, íntrons; área escura, éxons; áreas brancas, regiões intergênicas.

Fonte: Gibbs *et al.*, 1993.

As SPRRs são altamente expressas em epitélio escamoso estratificado durante a diferenciação celular de queratinócitos a fim de compor o envelope celular, uma estrutura protéica insolúvel presente nas células da camada mais externa do epitélio e que fornece uma barreira entre o organismo e o ambiente, além de proteger contra estresse químico e mecânico do epitélio (Hohl *et al.*, 1990; Volz *et al.*, 1993; Candi *et al.*, 2005). Porém, em estudo com linhagens celulares de CEE foi demonstrado que das proteínas SPRRs, apenas a SPRR3 parece ser afetada severamente, o que pode indicar que as vias sinalizadoras envolvendo a expressão de SPRR3 são mais suscetíveis a transformação oncogênica que as vias envolvidas na expressão das outras proteínas da família SPRR (Lohman *et al.*, 1997).

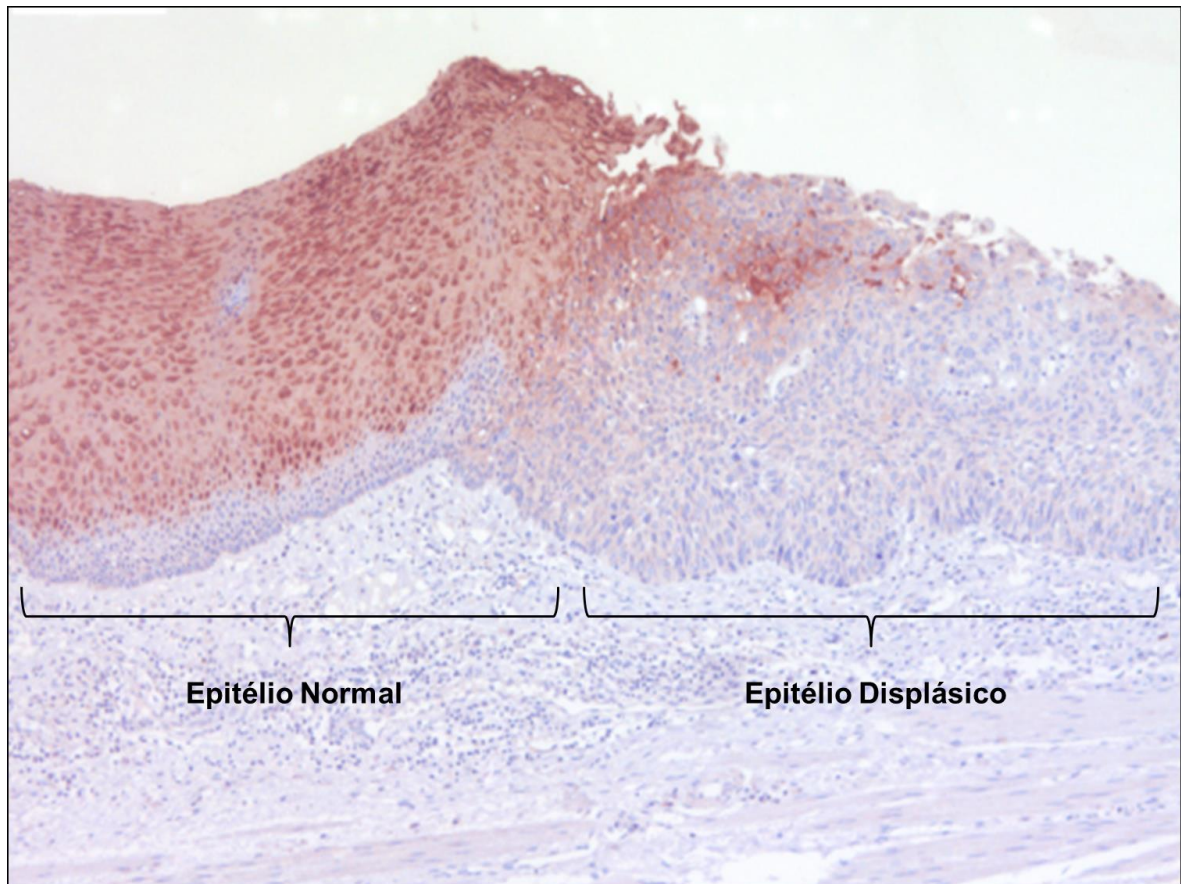
Alguns autores descreveram que em CEE, ADCE e linhagens celulares de CE há perda da expressão de SPRR3 quando comparada com a mucosa normal, seja ela adjacente ao tumor ou de grupos controle. Além disso, tecidos morfológicamente normais que são adjacentes aos tumores apresentam menor expressão de SPRR3 do que a mucosa saudável de grupos controle (Abraham *et al.* 1996; Kimos *et al.* 2004; Simão *et al.*, 2011). Alguns destes autores também observaram o decréscimo gradual da SPRR3 em displasias de baixo e alto grau, sugerindo uma perda prematura desta proteína na transformação neoplásica (Abraham *et al.* 1996; Kimos

et al. 2004). Porém pouco se sabe sobre os mecanismos de perda de expressão e como ela ocorre.

Apesar da diminuição da expressão de SPRR3 ter sido observada em CEE e ADCE, todas as análises descritas utilizavam métodos qualitativos ou semi-quantitativos, e, portanto, sujeitos a variações devido ao desenho experimental. Estas variações podem ser evitadas ou minimizadas com a utilização de métodos quantitativos, como a PCR em tempo real, (PCR quantitativo - PCRq), conforme utilizado por Simão *et al.*, em 2011.

Simão *et al.*, com objetivo de testar o potencial da SPRR3 como um biomarcador de diagnóstico de CEE realizou a análise quantitativa da expressão de SPRR3. A expressão das duas variantes de processamento do RNAm de SPRR3, v1 e v2, foi avaliada por PCRq no tumor, na mucosa adjacente (tecido histologicamente normal adjacente ao tumor) e mucosa normal (tecido de voluntário controle). Já a expressão proteica foi analisada por imuno-histoquímica, utilizando tumor e mucosa normal, ambos tecidos preservados em parafina. Informações dos pacientes, tais como sexo, idade, etnia, origem geográfica, bem como o consumo de álcool e/ou tabaco foi obtida através de um questionário padronizado. O maior nível de expressão de SPRR3-v1 foi observado na mucosa esofágica de indivíduos controle, com uma perda significativa e gradual de expressão na mucosa adjacente e em tumores de pacientes com CEE. A expressão SPRR3-v2 foi muito baixa nas amostras de mucosa normal e em tumores, tendo uma maior expressão na mucosa adjacente. A análise combinada da expressão de SPRR3-v1 e SPRR3-v2 foi capaz de discriminar a mucosa esofágica de indivíduos saudáveis da mucosa adjacente e do tumor, com alta sensibilidade e especificidade. Quanto à discriminação entre a mucosa adjacente e do tumor de pacientes CEE, houve sensibilidade e especificidade de 82% e 50%, respectivamente. Já a discriminação entre tecido saudável e tecido adjacente ao tumor pela SPRR3-v1 obteve 79,8% de sensibilidade e 88,9% de especificidade. A expressão proteica da SPRR3 apresentou uma boa correlação com a expressão gênica de ambas as variantes (Simão *et al.*, 2011). A figura 5 mostra diferença do grau de diferenciação entre mucosa normal e displasia de alto grau. Nesse caso a diferenciação é vista através da expressão de SPRR3, e é possível notar que esta proteína é capaz de discriminar estes dois tecidos.

Figura 5 - Diferença do grau de diferenciação entre mucosa normal e displasia de alto grau no epitélio esofágico humano



Legenda: Nesse caso a diferenciação é vista através da expressão de SPRR3, e é possível notar que esta proteína é capaz de discriminar estes dois tecidos, apresentando uma redução na expressão de SPRR3 no tecido displásico.

Fonte: Adaptado de Simão *et al.*, 2011.

Com relação à expressão de *SPRR3* e os critérios clinicopatológicos dos pacientes uma associação significativa foi encontrada entre uma menor expressão de *SPRR3-v1* e a idade mais avançada e uma menor expressão *SPRR3-v2* e o consumo de álcool (Simão *et al.*, 2011). Essa associação entre o consumo de álcool e *SPRR3-v2* pode sugerir a hipótese de que o etanol possa levar ao aumento da proliferação e/ou perda de diferenciação do epitélio escamoso e desta forma contribuir para o desenvolvimento do tumor.

1.3 Álcool e câncer

Com base em evidências epidemiológicas sobre a possível associação entre o consumo de bebidas alcoólicas e câncer em 27 localizações anatômicas, chegou-se a conclusão de que câncer do trato digestivo superior, sendo cavidade oral, faringe, laringe e esôfago, e câncer hepático são causalmente relacionados com o consumo de bebidas alcoólicas. Porém, não há provas suficientes para concluir que o câncer colorretal e de mama também pertencem a esta lista. O consumo diário de cerca de 50 g de etanol aumenta o risco para câncer do trato digestivo superior de duas a três vezes, comparado com o risco em não bebedores. Para estes tipos de câncer os efeitos de beber e fumar parecem ser multiplicativos, o que demonstra o efeito nocivo da combinação desses dois hábitos (IARC 1988 e 2010).

A luz de evidências epidemiológicas e de modelos animais experimentais, tanto o etanol quanto bebidas alcoólicas são classificados pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como compostos do grupo 1, ou seja, carcinogênico para seres humanos (IARC 1988, 2010 e 2012). Embora, o etanol e água sejam os componentes principais da maioria das bebidas alcoólicas (com exceção de alguns licores que o conteúdo de açúcar pode ser mais elevado que o de etanol), tem sido sugerido que a associação entre bebida alcoólica e câncer pode ser devido a carcinógenos contaminantes presentes nas bebidas. Entre estes carcinógenos estão nitrosaminas, acetaldeído, arsênico, benzeno, aflatoxina, todos estes, compostos classificados pelo IARC como grupo 1 ou 2A, ou seja, carcinogênico ou provavelmente carcinogênico para seres humanos (IARC, 2010).

Porém, o mecanismo pelo qual o álcool leva a carcinogênese ainda não é completamente estabelecido. Uma variedade de mecanismos tem sido relatado para explicar a associação entre o álcool e o câncer (Seitz *et al.*, 2001), sendo as quatro hipóteses mais aceitas listadas a baixo.

- O álcool contribui para a carcinogênese por facilitar a absorção de carcinógenos. O etanol é um solvente versátil, miscível com a água e com a maioria dos solventes orgânicos (Lide 2000; Windholz 1976). Por ser totalmente miscível em água o etanol pode ter o papel de solvente, ou seja, ele pode aumentar a solubilidade de um segundo composto. Tal propriedade permite que o etanol

solubilize substâncias carcinogênicas, como nitrosaminas, facilitando sua interação com os tecidos intra e extracelulares (OGA, Seizi, Atheneu; Poster *et al.* 1981).

- O álcool contribui para a carcinogênese por alterar a farmacocinética de agentes cancerígenos, como nitrosaminas. Nitrosaminas são substâncias consideradas pré-carcinógenos, ou seja, compostos geralmente lipofílicos, estáveis em pH fisiológico e que no interior do organismo sofrem reações de biotransformação, visando convertê-los em compostos mais hidrofílicos a fim de facilitar sua excreção (Mirvish, 1975). O etanol inibe a primeira passagem hepática da depuração de nitrosaminas, e conseqüentemente leva ao aumento da exposição a outros órgãos internos (Swann *et al.*, 1984, Anderson *et al.*, 1992). Além disso, o etanol inibe seletivamente citocromo P450 2E1 (Peng *et al.*, 1982.), a principal enzima P450 responsável pelo metabolismo de nitrosaminas no fígado de rato (Yang *et al.*, 1991). Esses dois fatores atuam em conjunto, aumentando a exposição do esôfago às nitrosaminas, e mudando sua ativação do fígado para o esôfago, resultando em um maior aumento de alquilação de DNA no esôfago (Swann *et al.*, 1984, Anderson *et al.*, 1995; Pinto LFR, 2000).

- O álcool contribui para a carcinogênese através do acetaldeído, que é o principal metabólito do álcool. O acetaldeído pode se ligar ao DNA formando adutos estáveis, e caso essa lesão não seja reparada, pode desencadear erros durante a replicação do DNA, podendo afetar a expressão de genes importantes como os supressores tumorais (Homann, 2001). O acetaldeído é considerado um composto do grupo 1 pelo IARC (IARC, 2010 e 2012). Embora o acetaldeído seja um carcinógeno fraco, é um composto produzido em grande quantidade durante o metabolismo do álcool.

- O álcool contribui para a carcinogênese por estimular proliferação celular (Haentjens *et al.*, 1987; Mak *et al.*, 1987; Craddock, 1991)

O fato de uma redução no consumo de álcool levar a uma rápida redução na incidência de CE oferece uma evidência de que o álcool aja em uma fase tardia da carcinogênese (Day *et al.* 1982). Além disso, após 10 anos de abstinência de álcool é observado o retorno do risco para o CE dentro dos níveis de quem nunca bebeu. Em contraste, abstinência de tabaco por mais de 10 anos está associada com uma redução de risco de 50%, sendo que o ponto estimado de risco permanece sempre ligeiramente maior do que aqueles que nunca fumaram. Esses padrões sugerem que o tabaco tem um papel importante tanto no início quanto nos estágios finais da

carcinogênese (iniciação e promoção do câncer), enquanto o álcool parece desempenhar um papel mais importante nos estágios finais da carcinogênese. (Castellsagué *et al.*, 1999). Desde modo, embora bebidas alcoólicas e também o etanol, sejam considerados carcinogênicos para seres humanos (IARC 1988, 2010 e 2012), inclusive para o CEE, o álcool parece não estar presente em todas as etapas da carcinogênese, não tendo a capacidade de iniciar as células. Sendo assim, as três primeiras hipóteses propostas para o mecanismo de ação do álcool na carcinogênese poderiam ser descartadas uma vez que propõem mecanismos de dano ao DNA, o que seria irreversível mesmo quando o estímulo, no caso o álcool, cessasse.

Assim, é sugerido que o álcool contribui para o CE por estimular a proliferação do epitélio escamoso interferindo na diferenciação celular. Desta forma, com base no que foi apresentado, e nos modelos desenvolvidos pela Dra. Tania Blanco e pelo Dr. Davy Carlos Rapozo durante suas respectivas teses (Blanco, 2010 e Rapozo, 2009), foi desenvolvido nessa dissertação um modelo em camundongos BALB/c para analisar o efeito do etanol sobre a expressão de proteínas do epitélio escamoso esofágico. Desta forma a hipótese deste trabalho é de que o etanol, através do aumento da proliferação, é capaz de alterar o padrão de expressão de proteínas de diferenciação do epitélio esofágico de camundongos BALB/c.

2 OBJETIVO

Analisar o efeito do etanol na diferenciação e proliferação celular do epitélio escamoso no esôfago de camundongos BABL/c.

2.1 Objetivos específicos:

- Avaliar possíveis alterações histopatológicas no esôfago causado pelo etanol em diferentes concentrações e intervalos de tempo;
- Avaliar alterações do epitélio esofágico causadas pela administração de etanol através da análise da expressão das proteínas SPRR3, CK5/8 e CK14;
- Avaliar a influência do etanol na proliferação celular através da proteína Ki67 no epitélio esofágico;
- Correlacionar a expressão dessas proteínas com possíveis alterações histopatológicas.

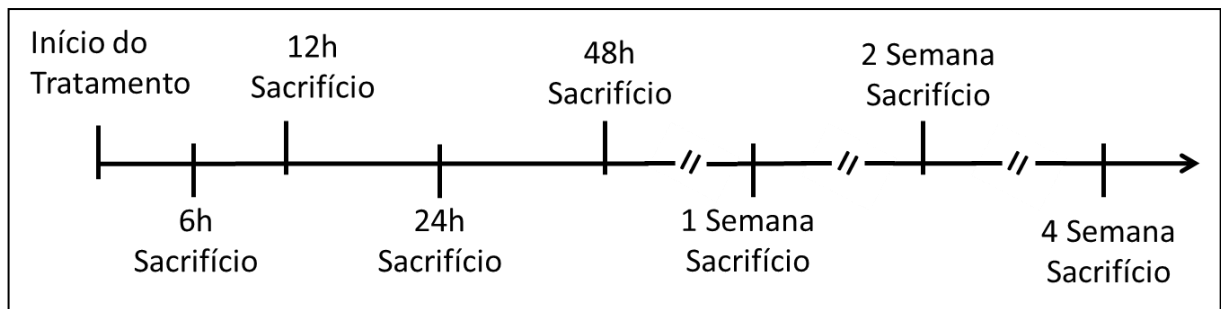
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelo experimental

Para realização do modelo animal foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas provenientes do biotério do Centro de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (INCA). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica do Instituto Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) em ciclos claro/escuro recebendo ração sólida (Nuvilab CR1, Nuvital[®]) e água *ad libitum*. Este projeto obteve aprovação do Comitê de ética CEUA/IBRAG sob o protocolo de número 033/10. Os camundongos chegaram ao biotério da UERJ com dois meses de idade e aguardaram duas semanas até o início do tratamento, para ambientação. A massa corporal dos animais antes do início do experimento variou entre 18,4g e 26,5g, com média de 22,059g. Todos os camundongos receberam diariamente gavagem através de sonda intraesofágica com diferentes soluções aquosas, sendo água (controle) ou etanol em diferentes concentrações (10%, 20% e 40%), no volume de 300 µL. O número de animais no início do tratamento foi de 181 sendo estes distribuídos entre os grupos de tratamento (grupo controle, etanol 10%, etanol 20% e etanol 40%). Os animais tiveram sua massa aferida por balança de precisão (Marte[®] AL500C) antes do tratamento e semanalmente até o término do experimento.

Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ após 6, 12, 24 e 48 horas e 1, 2 e 4 semanas após o início do tratamento. Como os animais foram tratados a cada 24 (vinte e quatro) horas, os grupos sacrificados nos intervalos de 6 (seis), 12 (doze) e 24 (vinte e quatro) horas receberam uma dose de tratamento apenas, já os animais sacrificados nos tempos de 48 (quarenta e oito) horas, 1 (uma) , 2 (duas) e 4 (quatro) semanas receberam, respectivamente, duas, sete, 14 e 28 doses. A figura abaixo (figura 6) representa a linha do tempo de tratamento e de sacrifício dos animais.

Figura 6 - Linha do tempo do tratamento dos animais



Legenda: Todos os animais receberam gavagem diariamente, sendo que os grupos de 6h, 12h, 24h receberam uma única dose.

Ao ser sacrificado, cada animal teve o seu esôfago retirado por excisão torácica, com o máximo cuidado para evitar qualquer dano que dificultasse a avaliação. O órgão era retirado inteiro junto com uma pequena parte do estômago, que auxiliava na orientação, em relação aos terços esofágicos (proximal, médio e distal). O esôfago era colocado sobre uma superfície onde era estendido e, com a ajuda de uma tesoura fina suficiente para ser colocada na luz do órgão, era aberto longitudinalmente. Em seguida o esôfago, que fisiologicamente é um tubo cilíndrico, passa a ser um tecido plano e retangular, sendo enrolando no sentido do seu comprimento, embrulhado em papel filtro e colocado em cassetes, seguindo para fixação em formaldeído seguido de processamento deste material, que então é preservado em parafina (figura 7). Esta confecção do esôfago em rolos é importante, porque desta forma em todos os cortes histológicos é possível avaliar toda a extensão do esôfago, conforme mostrado na figura 8.

Figura 7 - Fotografia representativa de amostra de esôfago preservada em bloco de parafina



.Legenda: A amostra na conformação de rolo é colocada em cassete (em verde), e então, incluída em parafina.

Figura 8 - Figura representativa de corte histológico feito a partir de amostra de esôfago preservada em bloco de parafina



Legenda: Através da inclusão em parafina da amostra em conformação de rolo é possível analisar toda a extensão do esôfago no mesmo corte.

Os esôfagos dentro dos cassetes foram submetidos à fixação em formaldeído tamponado em solução a 10%. Em seguida foram processados seguindo a

sequência histológica convencional: desidratação em etanol, diafanização em xileno e inclusão em parafina (Paraplast, Sigma). Cada amostra foi emblocada separadamente e cortada com espessura de 3 μm em micrótomo Leica[®] RM2125RT. De cada amostra foram feitos seis cortes seriados, sendo um corado com HE (Hematoxilina, que cora o núcleo em azul e Eosina, que cora o citoplasma em rosa) para a análise histológica, um controle negativo da reação (amostra que é submetida a todas as etapas exceto a aplicação do anticorpo primário) e um corte para cada anticorpo utilizado na imuno-histoquímica. Não houve necessidade de utilização de controle positivo, já que todos os anticorpos utilizados possuem antígenos expressos em regiões específicas em condições normais. Esses cortes histológicos foram analisados ao microscópio óptico na magnificação de 10, 20 e 40 vezes.

3.2 Análise histológica

A análise histológica foi realizada pela Dra. Tânia Blanco, patologista com experiência em modelo animal de carcinogênese esofágica de camundongos. O tecido esofágico normal é constituído por uma camada muscular, seguida por uma camada de tecido conjuntivo, chamada de lâmina própria, e um epitélio estratificado queratinizado, que pode possuir até sete camadas de células. A figura 9 representa a constituição normal do tecido esofágico. O epitélio esofágico é formado por uma camada de células indiferenciadas, sendo conhecida como camada basal, e por uma série de camadas intermediárias de células que sofrem diferenciação conforme se direcionam para luz esofágica. As camadas intermediárias se estendem desde a camada suprabasal até a camada mais apical. No caso de camundongos ainda há uma camada de queratina, sendo importante ressaltar que o tecido esofágico humano não é queratinizado. A organização normal do tecido epitelial esofágico pode ser visto na figura 10.

Figura 9 - Fotomicrografia representativa de tecido esofágico normal de camundongo BALB/c (HE)

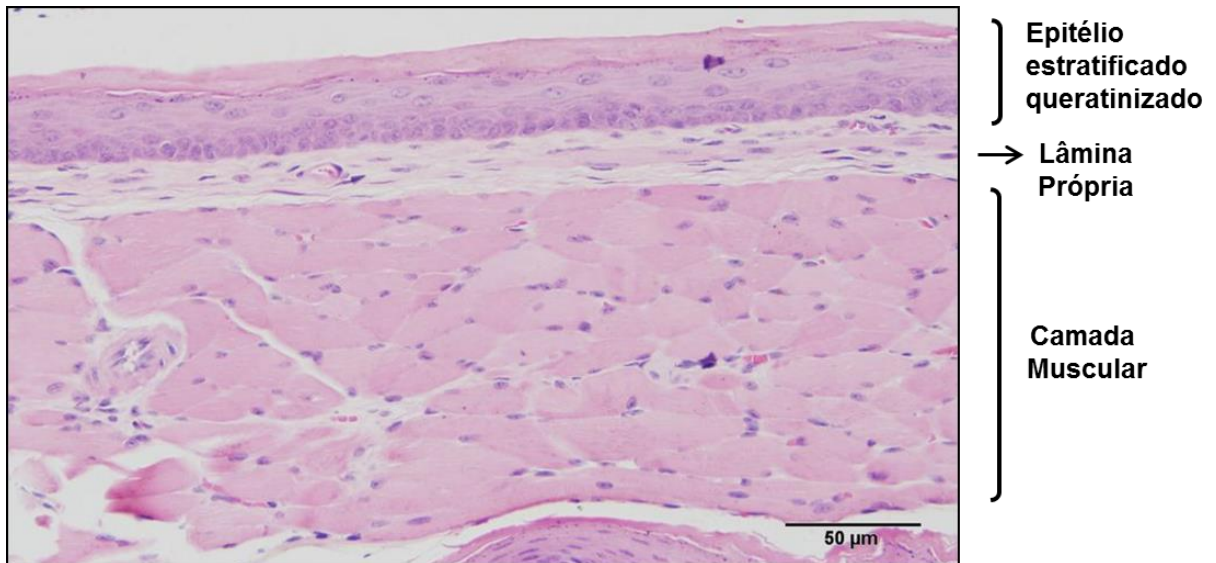
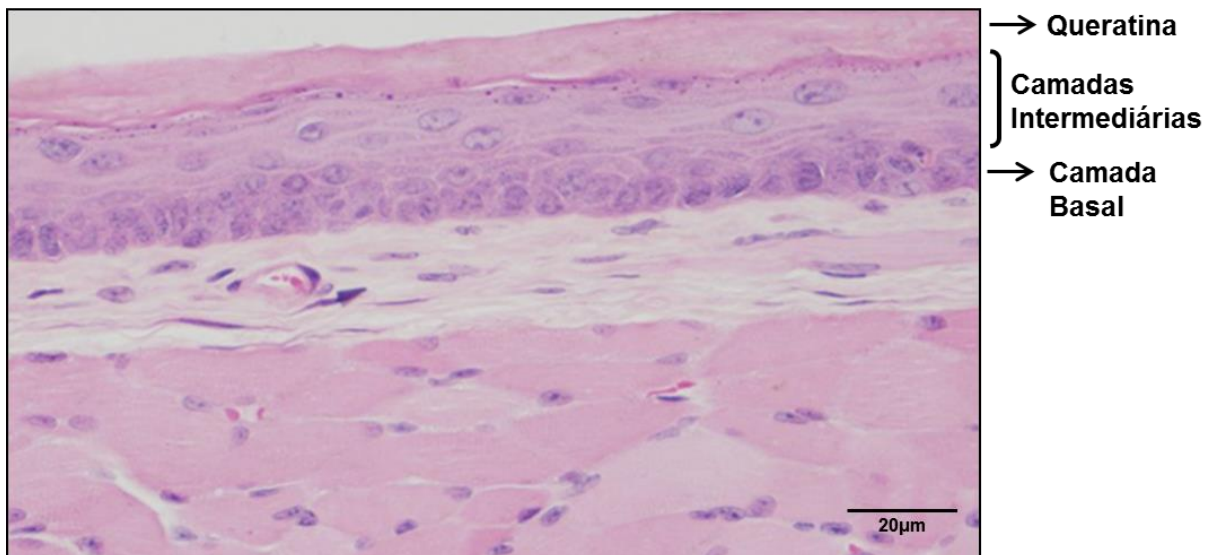


Figura 10 - Fotomicrografia representativa de tecido epitelial estratificado queratinizado de esôfago de camundongo BALB/c (HE)

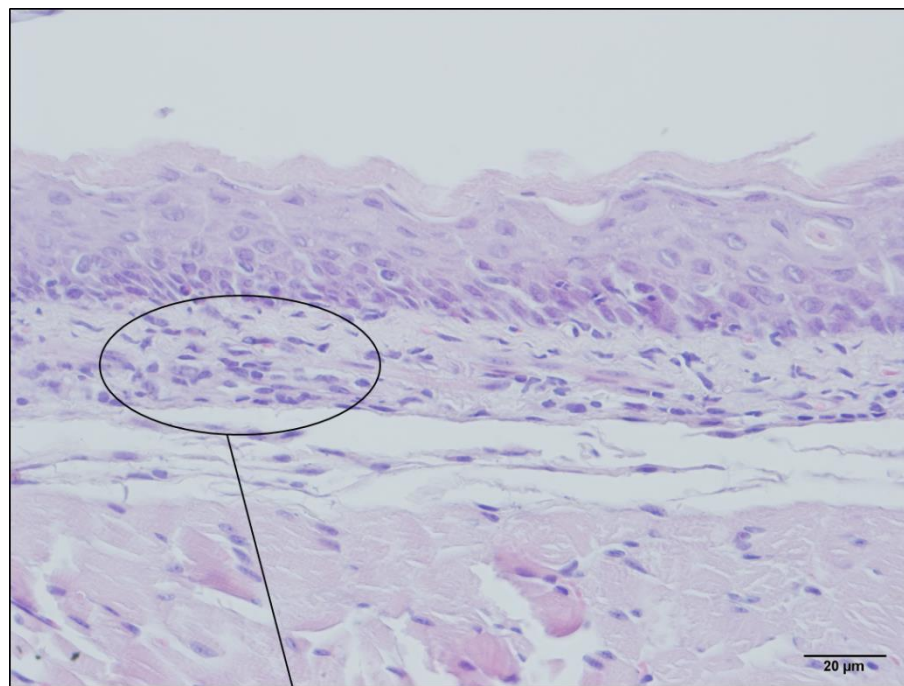


Foram registradas todas as alterações epiteliais e inflamatórias. Os critérios avaliados foram hiperplasia, displasia e inflamação. Pelo fato de não existir critério convencional para avaliação da inflamação esofágica, foi necessária a criação de parâmetros para uniformização das análises relacionadas à presença do infiltrado inflamatório.

A inflamação observada foi graduada em leve, moderada ou acentuada, segundo a intensidade do processo inflamatório. Para tanto, foram consideradas a presença de células inflamatórias, sua distribuição pelas camadas do esôfago e presença de ulceração epitelial. Assim a inflamação foi classificada da seguinte forma:

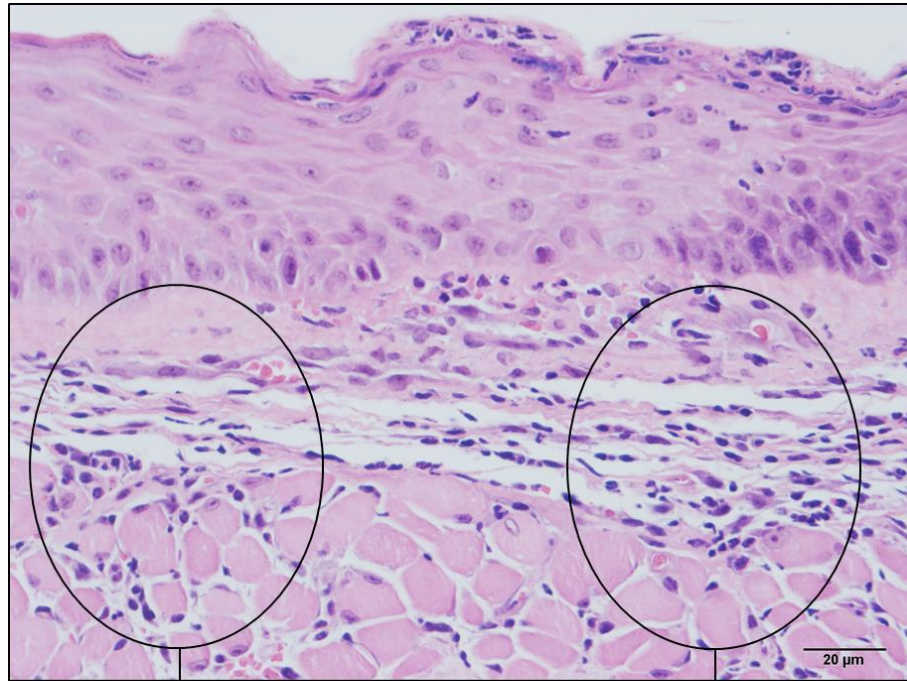
- Sem inflamação;
- Inflamação leve: poucas células inflamatórias, sendo estas restritas à lâmina própria logo abaixo do epitélio, podendo estar acompanhada de vasocongestão e leve edema, mas sem ulceração epitelial (figura 11);
- Inflamação moderada: maior quantidade de células inflamatórias presentes na lâmina própria e também permeando a camada muscular do órgão, sem ulceração do epitélio (figura 12);
- Inflamação acentuada: grande número de células inflamatórias associadas à ulceração epitelial (figura 13);

Figura 11 - Fotomicrografia representativa de tecido esofágico de camundongo BALB/c apresentando inflamação leve, caracterizada por infiltrado inflamatório na lâmina própria (HE)



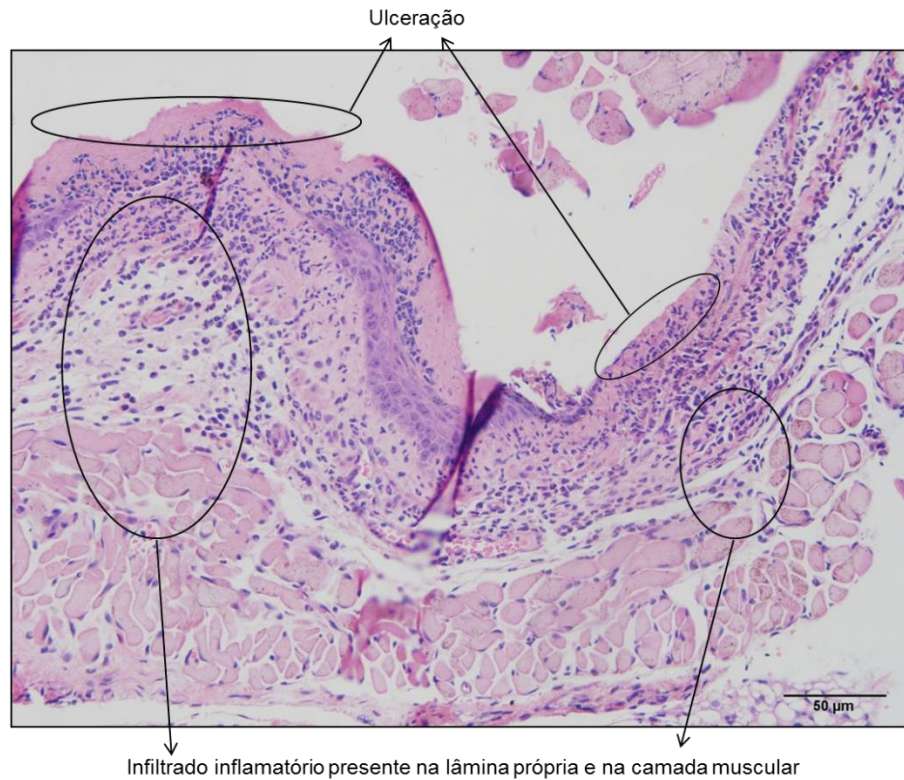
Infiltrado inflamatório presente na lâmina própria

Figura 12 - Fotomicrografia representativa de tecido esofágico de camundongo BALB/c apresentando inflamação moderada, caracterizada por infiltrado inflamatório na lâmina própria e na camada muscular (HE)



Infiltrado inflamatório presente na lâmina própria e na camada muscular

Figura 13 - Fotomicrografia representativa de tecido esofágico de camundongo BALB/c apresentando inflamação acentuada caracterizada por infiltrado inflamatório na lâmina própria e na camada muscular com ulceração do epitélio (HE)



Vale ressaltar que para realizar a gradação da displasia observada é necessária a utilização de critérios que tenham sido convencionados e validados. Porém, não existe nenhum critério convencionado para avaliar a displasia esofágica. Nestes casos, nos quais não existe nenhum critério, é recomendada a utilização de normas já estabelecidas para epitélios do mesmo tipo histológico. Então foram utilizadas normas de avaliação para o epitélio do colo uterino, uma vez que este, assim como o epitélio esofágico é o tipo escamoso e possui critérios convencionados.

A ocorrência de displasia epitelial foi caracterizada pela presença de células epiteliais atípicas com núcleos grandes hiper cromáticos, com perda de polaridade celular. A displasia foi graduada em:

- Displasia leve (DL): quando as células atípicas ocupavam apenas o terço inferior do epitélio;

- Displasia moderada (DM): quando as células atípicas ocupavam cerca de dois terços das camadas da espessura do epitélio;
- Displasia acentuada/carcinoma *in situ* (DA): células atípicas presentes em todas as camadas da espessura do epitélio.

Todos os critérios histopatológicos apresentados nesta dissertação foram desenvolvidos pela Dra. Tania Blanco durante sua tese (Blanco T.C.M, 2010) e utilizados em todos os trabalhos do grupo que utilizaram/utilizam modelo experimental em camundongos.

3.3 Imuno-histoquímica

A reação de imuno-histoquímica para avaliação da expressão proteica de SPRR3, KI67, CK5/8 e CK14 foi desenvolvida através de secções seguidas de 3µm de cada amostra de esôfago de camundongo, em um micrótomo (Leica®). Uma secção era direcionada para cada anticorpo e outra para o controle negativo.

Após as secções serem feitas, os cortes eram fixados nas lâminas tratadas com silano através de uma incubação a 60°C *overnight*, em estufa. Em seguida proceu-se a desarafinação utilizando a imersão das lâminas em seis frascos contendo xilol seguidos de mais seis frascos contendo etanol, por 5 minutos cada, e lavagem em água corrente por 5 minutos. Para a recuperação antigênica as secções foram incubadas em banho-maria submersas em solução tampão citrato, pH 6.0, por 30 minutos a 98°C. Em seguida, os casos eram incubados por 10 minutos em temperatura ambiente e eram lavados em água corrente por 10 minutos. As secções eram delimitadas com caneta Dako Pen (Dako®), para manter as soluções sobre os cortes, e incubadas em três banhos de 5 minutos de tampão de lavagem (TBS). Logo após, era retirado qualquer resquício de tampão de lavagem e os cortes eram incubados em solução inibidora de peroxidase endógena (Peróxido de hidrogênio Merk® 3% - diluído em TBS) por dois tempos de 20 minutos. As lâminas eram, então, lavadas com água destilada e incubadas em mais três banhos de 5 minutos de tampão de lavagem. Os cortes eram secados e incubados em solução inibidora de ligações inespecíficas (Albumina 2,5% + TBS 100 mL+ soro bovino fetal 8 mL + leite Molico® desnatado 2 g) por 30 minutos. Em seguida, o excesso de solução de

bloqueio era retirado e era adicionado o anticorpo específico, contra SPRR3 (Cód SC-55939 – Santa Cruz Biotechnology®) KI67 (Cód AB-15580 – Abcam®), CK5/8 (Cód SC-32328 – Santa Cruz Biotechnology®), CK14 (Cód SC-53253 – Santa Cruz Biotechnology®) diluídos 1:1200, 1:5000, 1:100 e 1:100 respectivamente, em solução diluidora, contendo 1mg/mL de Albumina e 1mg/mL de Azida dissolvidos em TBS. O controle negativo de cada caso recebia apenas a solução diluidora. As lâminas eram incubadas *overnight* a 4°C.

Em seguinte, as lâminas eram incubadas em 3 ciclos de imersão por 5 minutos cada em TBS e, em seguida incubadas com um anticorpo secundário biotinilado do *kit* LSAB (Dako®) por 30 minutos. As secções, eram, então, lavadas com água destilada e incubadas por mais 3 vezes de 5 minutos cada em TBS, para em seguida serem incubadas em solução de anticorpo terciário de estreptavidina do *kit* LSAB (Dako®) por mais 30 minutos. Logo após, as secções eram lavadas com água destilada e mais uma vez incubadas em 2 ciclos de imersão de 5 minutos cada em TBS. Posteriormente, o processo de revelação era feito através da coloração por System HRP (Dako®) usando diaminobenzidina (DAB) como substrato. Para tal revelação, era utilizado uma gota de DAB para cada 2mL de solução tampão proveniente do *kit* (DAB + *Chomogen Substrate Buffer*, Dako®) por 3 minutos.

3.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc.). Primeiramente, os grupos analisados foram testados quanto à normalidade, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov (KS). A análise de Variância (ANOVA) seguida do pós-teste de comparação múltipla de Tukey foi utilizada para testar a influência dos tratamentos com etanol na massa corpórea dos animais. A fim de analisar a letalidade e o acometimento do esôfago por inflamação foram construídas curvas de Kaplan-Meier comparadas pelo teste de logrank.

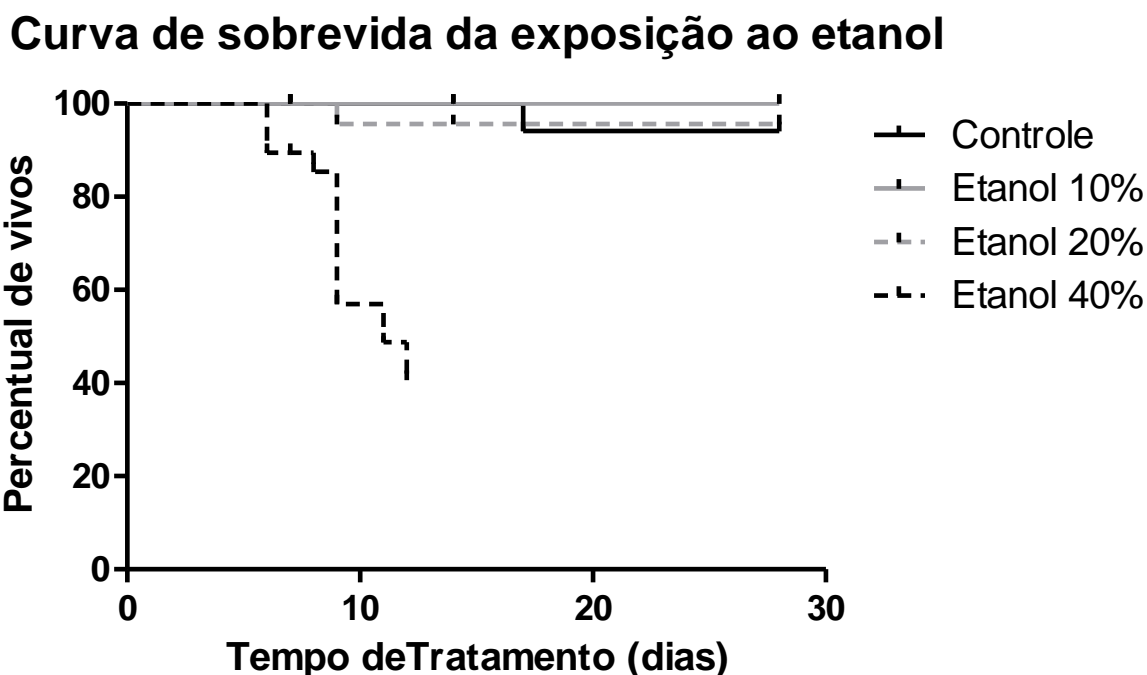
A hipótese de nulidade quanto à influência do etanol nas variáveis testadas foi rejeitada quando o valor de p foi menor que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da toxicidade do tratamento

A fim de mimetizar o consumo habitual dos pacientes de câncer de esôfago, motivação inicial deste trabalho, foram adotadas altas concentrações de etanol no tratamento dos animais, chegando a 40% de etanol em água. Devido à quantidade de etanol ingerido, foi importante avaliar a toxicidade do tratamento imposto. A toxicidade de tratamento foi aferida através da mortalidade dos camundongos, representada no gráfico 1 que representa a sobrevivência dos animais ao longo do tratamento. Não houve morte de nenhum animal até o fim do tratamento (quatro semanas) nos grupos que receberam etanol 10%. Apenas uma morte ocorreu no grupo que recebeu água (controles) e uma no que recebeu etanol 20%. Contudo os camundongos que receberam gavagem com etanol 40% tiveram mortalidade de cerca de 60% até o 12º dia de tratamento. Este grupo seria tratado por duas semanas com etanol 40%, porém no décimo segundo dia de tratamento, chegou-se ao número mínimo de indivíduos para a análise estatística pretendida (cinco animais), sendo estes animais, portanto, sacrificados antecipadamente devido à toxicidade do tratamento.

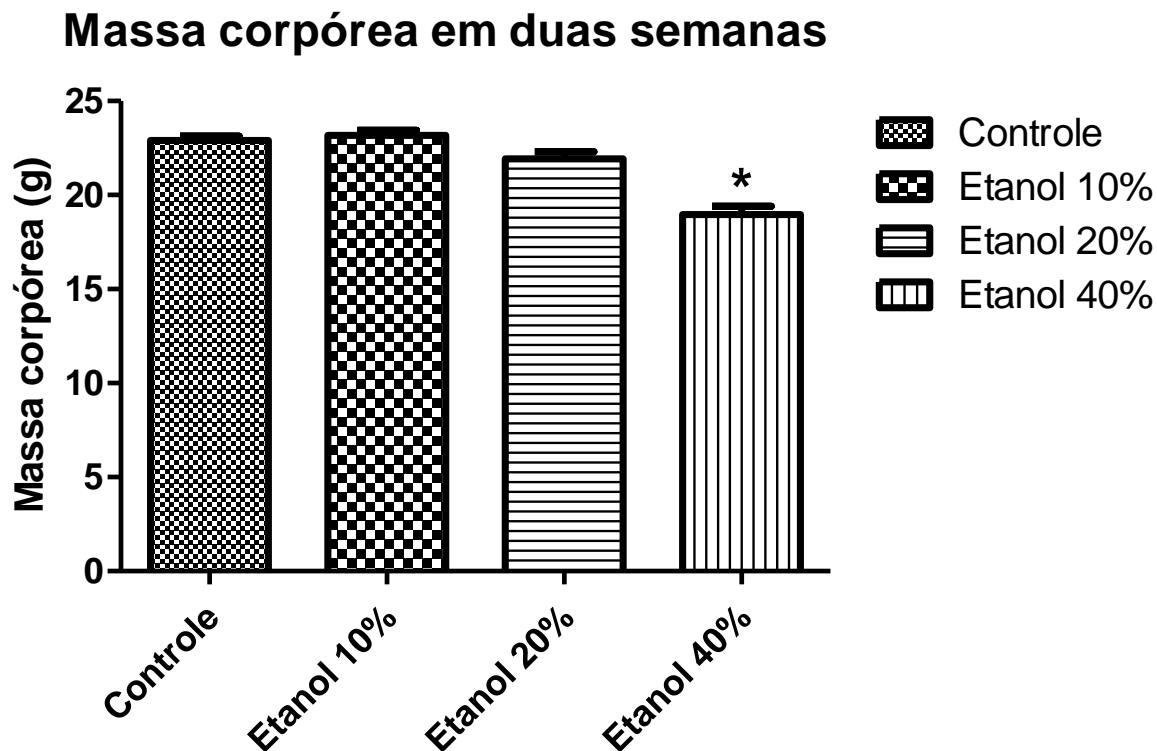
Gráfico 1 - Curva de sobrevivência com o percentual de camundongos, separados por grupo de tratamento



Legenda: Etanol 40% é estatisticamente diferente do controle, etanol 10% e 20%, com $p=0,0001$.

Outra forma utilizada para avaliar a toxicidade do tratamento foi através da perda de massa corporal, que foi registrada semanalmente. Inicialmente comparou-se a variação da massa dos animais em até duas semanas, entre controle e as diferentes concentrações de etanol administrado, como pode ser observado através do gráfico 2. Foi observado que camundongos BALB/c que receberam solução de etanol a 40% tiveram uma redução significativa da média da massa corporal, que em relação ao controle foi de 17%, 18% em relação aos grupos 10% de tratamento e 14% em relação aos de 20%. Lembrando que os grupos de etanol 40% foram tratados por no máximo 12 dias, devido à toxicidade do tratamento. Não houve diferença estatisticamente significativa comparando os outros grupos entre si.

Gráfico 2 - Comparação da média da massa corporal, em gramas, dos camundongos separados por grupos, em duas semanas de tratamento

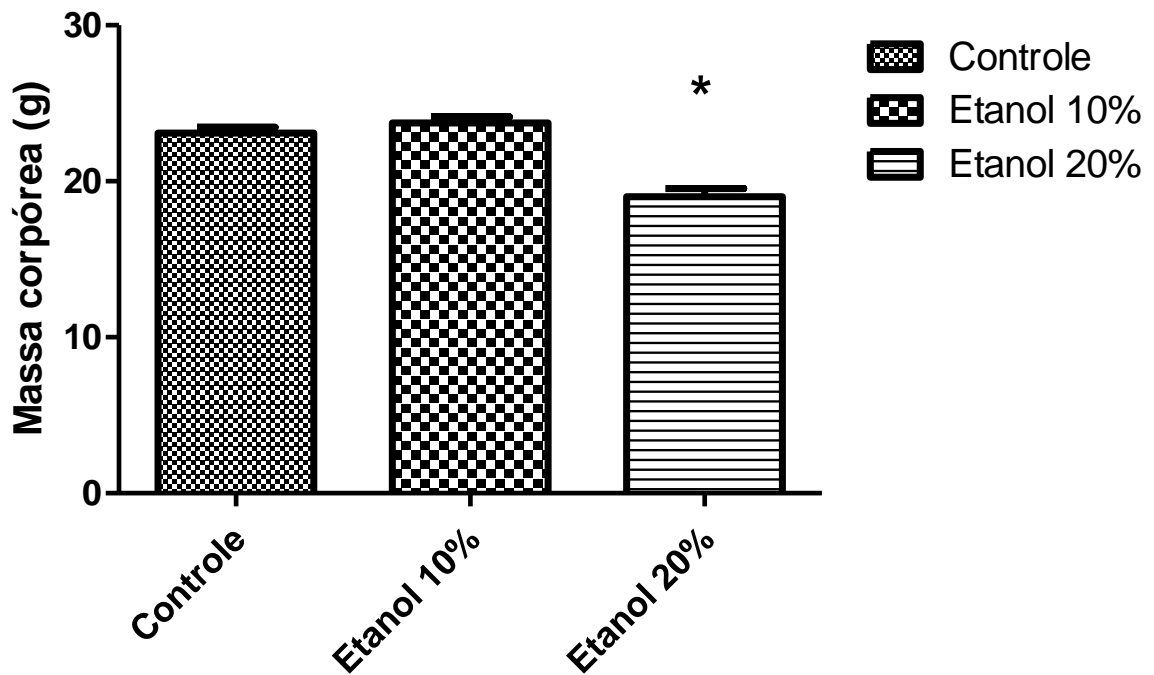


Legenda: Etanol 40% é estatisticamente diferente do controle, etanol 10% e 20%, com $p=0,0001$.

Em seguida, foram comparadas as médias da massa corporal dos animais após quatro semanas de tratamento. O grupo 20% mostrou redução estatisticamente significativa em relação aos demais grupos, com perda de 18% da média da massa do grupo de 20% de etanol em relação ao controle e 20% em relação ao grupo 10%, como evidenciado pelo gráfico 3. Não houve diferença estatisticamente significativa entre controle e o grupo 10%.

Gráfico 3 - Comparação da média da massa corporal, em gramas, dos camundongos separados por grupos, em quatro semanas de tratamento

Massa corpórea em quatro semanas

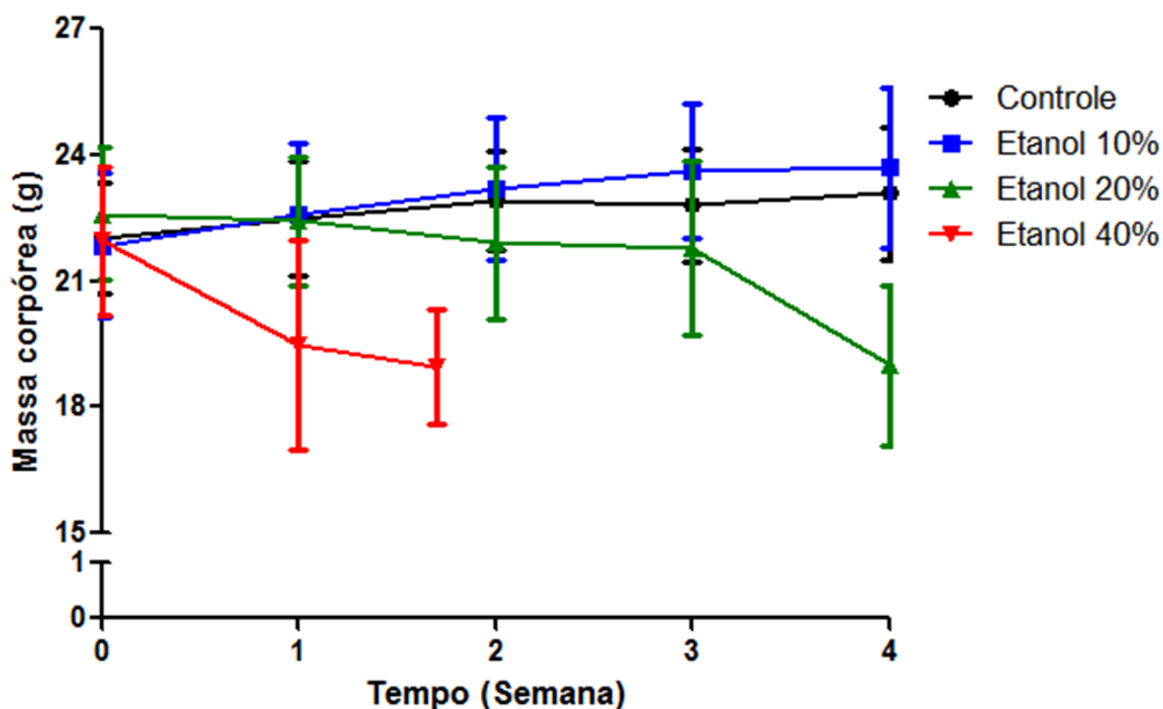


Legenda: Etanol 20% é estatisticamente diferente do controle e etanol 10%, com $p=0,0001$.

Apesar de não ter sido obtido valor estatisticamente significativo para a diferença entre os grupos analisados no período de uma semana de tratamento, é possível identificar uma tendência a essa redução da massa corporal nos grupos que receberam 40% de etanol. O gráfico 4, apresenta a variação da massa corporal dos animais desde o início da aferição até o fim do tratamento.

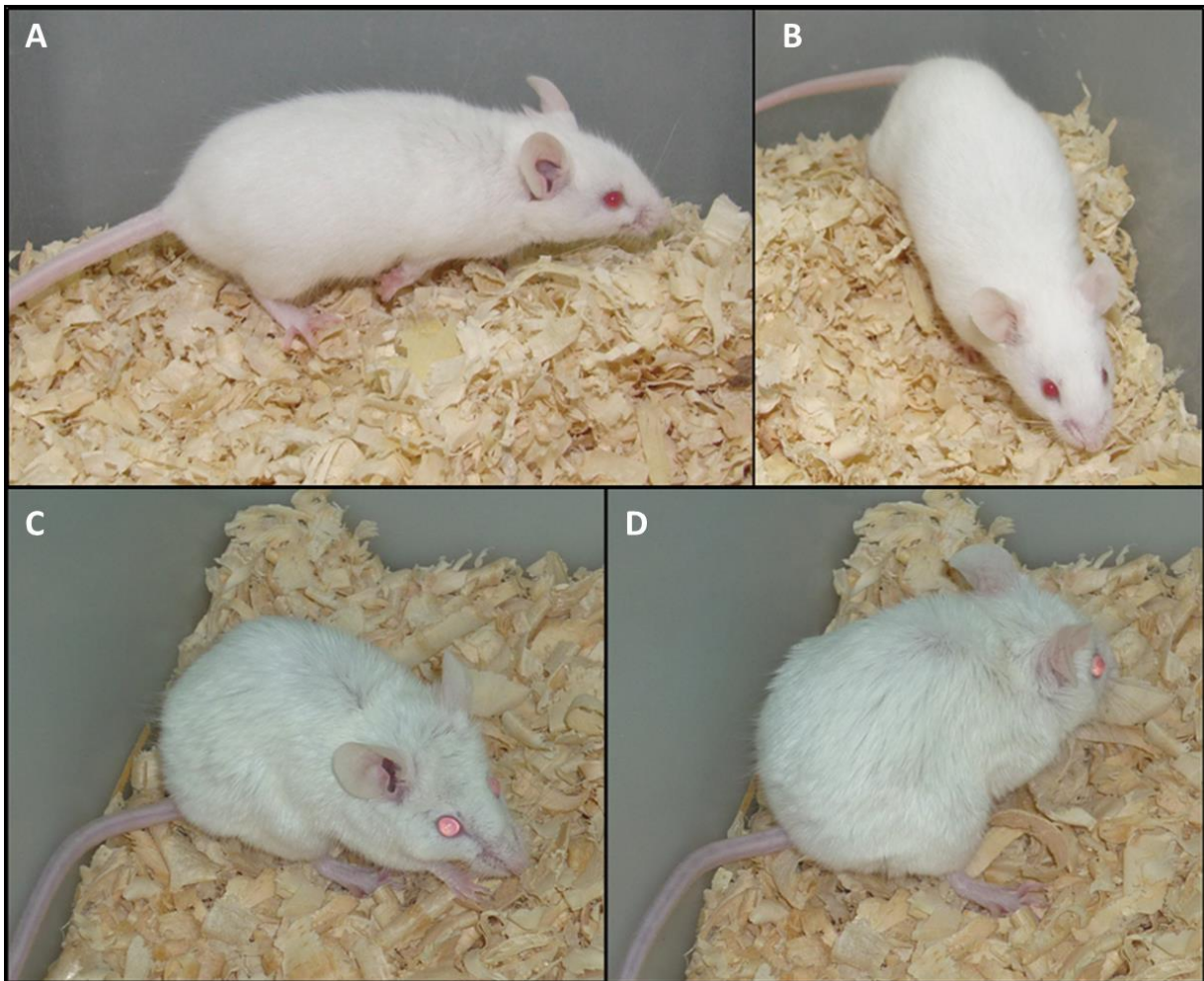
Gráfico 4 - Variação da média da massa corporal de camundongos BALB/c, tratados diariamente, ao longo de até quatro semanas de tratamento

Variação da massa corpórea dos animais



A toxicidade do tratamento imposto também foi observada através de características físicas dos animais, onde foi observado que os animais começaram a apresentar pelagem arrepiada e curvatura da coluna vertebral, sugerindo toxicidade, em períodos que coincidiram com a perda de peso. Ou seja, entre a primeira e a segunda semana de tratamento com etanol 40% e entre a terceira e a quarta semana de tratamento com etanol 20%. A comparação dos aspectos físicos de animais saudáveis e animais com pelagem arrepiada e curvatura da coluna vertebral, sugerindo toxicidade, pode ser vista na figura 14.

Figura 14 - Fotografias de camundongos BABL/c



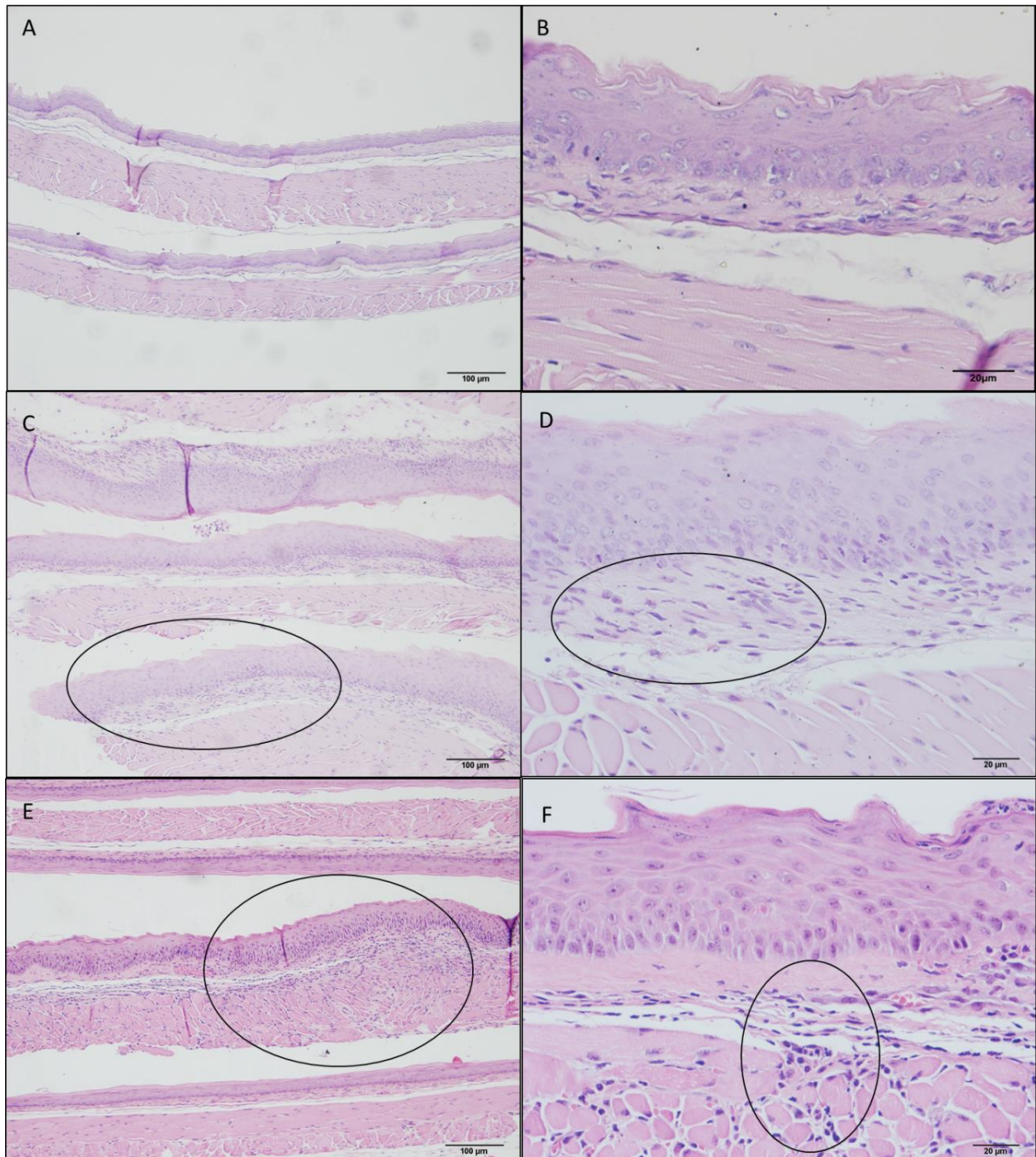
Legenda: Comparação de animais saudáveis (A e B) e animais com pelagem arrepiada e curvatura da coluna vertebral, sugerindo toxicidade de tratamento (B e C).

4.2 Análise histopatológica dos esôfagos dos camundongos tratados

Para as análises histopatológicas foram utilizados esôfagos de 157 animais que estavam distribuídos entre os quatro grupos de tratamento (controle, etanol 10%, etanol 20% e etanol 40%) e os tempos de sacrifício (6h, 12h, 24h, 48h, uma semana, duas semanas e quatro semanas). As lâminas com os cortes de esôfago dos camundongos tratados foram analisados isoladamente e depois entre HE e os anticorpos utilizados (SPRR3, KI67, CK5/8 e CK14), o que totalizou 785 lâminas, além dos controles negativos de cada reação. Todas as lâminas foram comparativamente submetidas à análise histológica que teve como parâmetros avaliados inflamação e as alterações epiteliais (hiperplasia e displasia) conforme já descrito na metodologia. A maioria das amostras não apresentou alterações

histológicas significativas (Figura R15 A e B) apresentando nove casos de inflamação leve (Figura 15 C e D) e um caso com inflamação moderada (Figura 15 E e F).

Figura 15 - Figura representativa de um esôfago de camundongo BALB/c

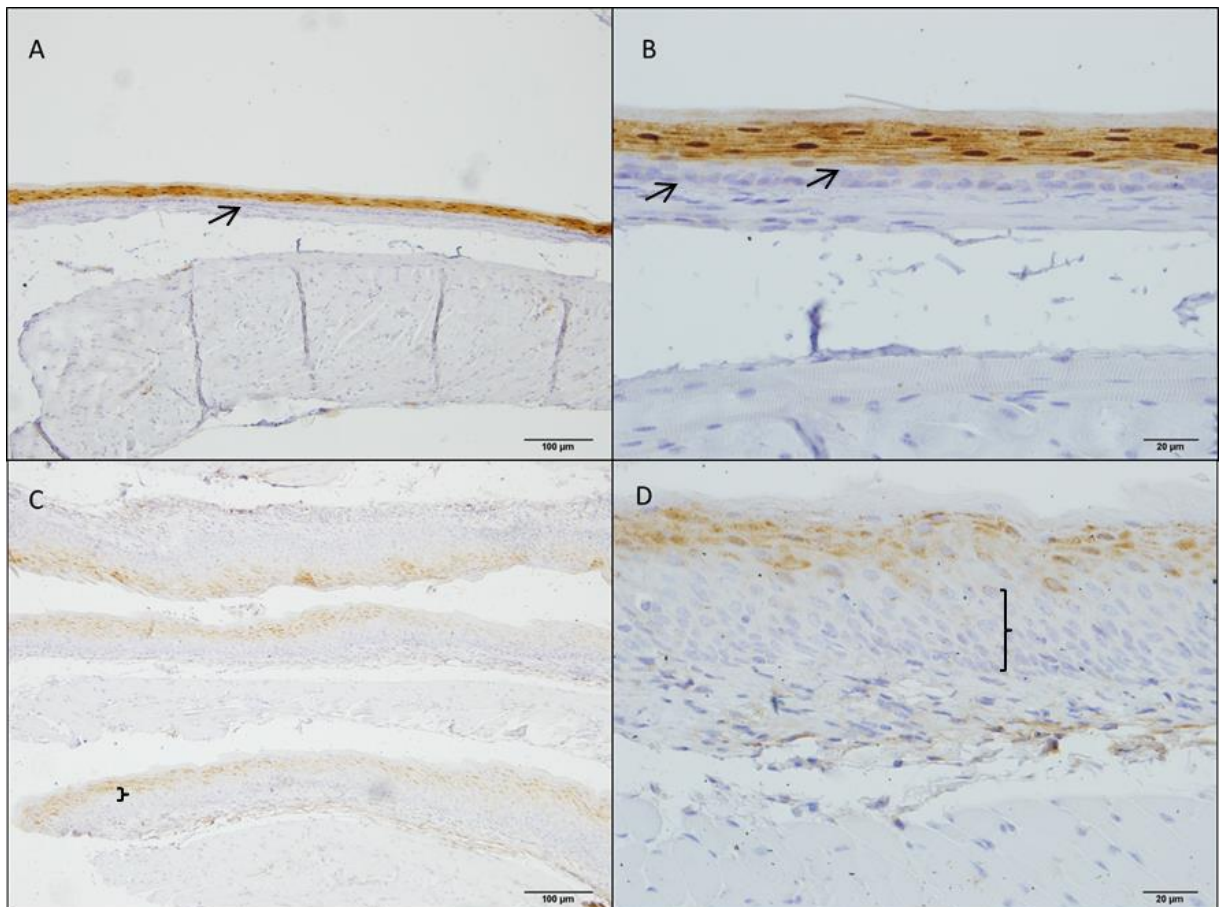


Legenda: A e B apresentam epitélio sem alterações histológicas, mostrando três regiões distintas, todas com epitélio, lâmina própria e camadas musculares normais. C e D apresentam inflamação leve caracterizada por infiltrado inflamatório apenas na lâmina própria. E e F apresentam inflamação moderada caracterizada por infiltrado inflamatório na lâmina própria

(REVER/ AR) e na camada muscular. Os círculos indicam as áreas de inflamação. Barras de escala 100 micrômetros para A, C e E; e de 20 micrômetros para B, D e F.

Com relação à análise da expressão de SPRR3 por imuno-histoquímica, houve um padrão de positividade normal, apresentando marcação no citoplasma e no núcleo da camada suprabasal até a camada apical do epitélio, em todos os casos, com exceção de cinco casos, que também apresentaram inflamação observada pela lâmina de HE. Onde a inflamação estava presente, a positividade ocorreu apenas nas camadas mais superiores. Na figura 16 podemos ver a comparação entre a imagem de um esôfago saudável com a marcação normal para SPRR3 e a imagem de um esôfago com inflamação e redução de expressão de SPRR3, que está presente apenas nas camadas mais apicais do esôfago.

Figura 16 - Figura representativa da expressão de SPRR3 no epitélio esofágico de camundongo BABL/c

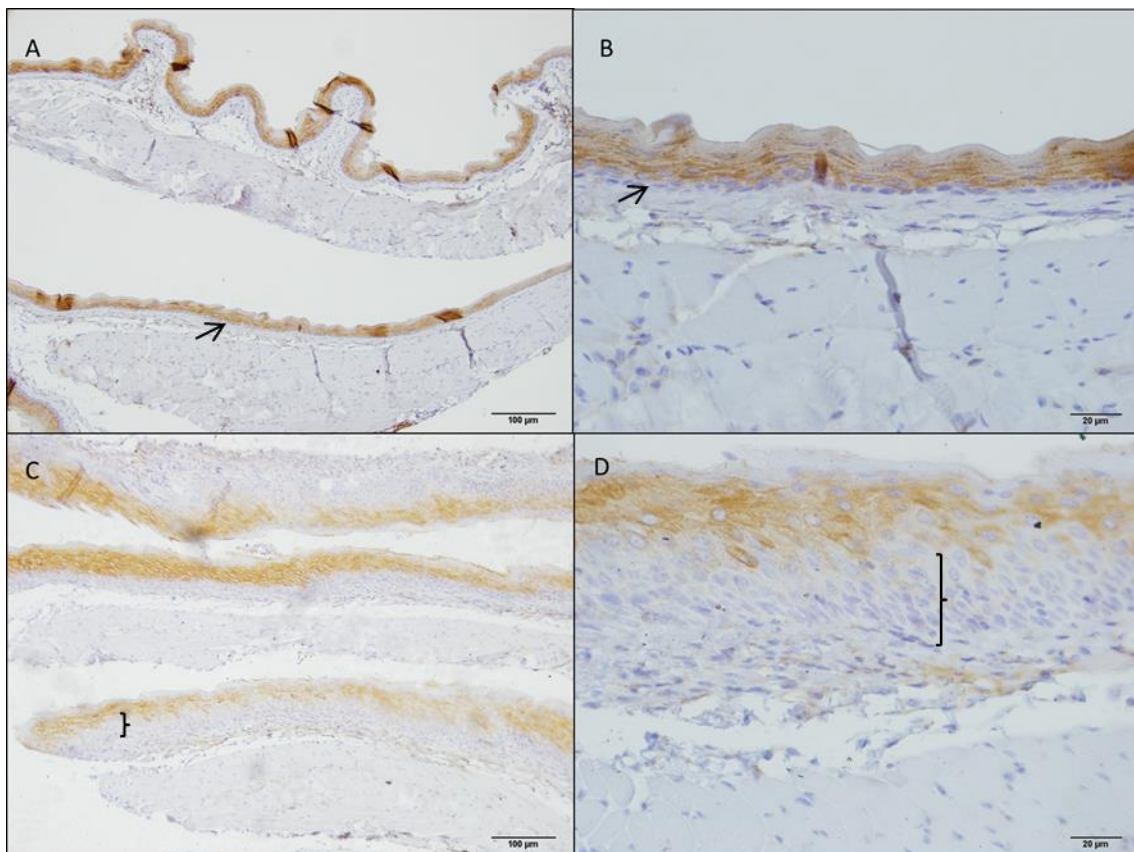


Legenda: A e B representam expressão normal de SPRR3 que apresenta positividade em todo o epitélio, exceto na camada basal e suprabasal (as setas indicam as duas únicas camadas onde não há expressão). C e D representam esôfago com inflamação e redução da expressão de SPRR3, que está presente apenas nas camadas mais superiores, ou seja,

próximas à luz do órgão (as chaves indicam várias camadas onde não há expressão). Barras de escala 100 micrômetros para A e C; e de 20 micrômetros para B e D.

De forma semelhante, na imuno-histoquímica para CK5/8, a maioria das amostras apresentou padrão de marcação normal, com exceção de cinco amostras, as mesmas que apresentaram alteração para SPRR3 e que tinham a presença de inflamação. O padrão de marcação de CK5/8 é semelhante ao padrão de marcação de SPRR3, sendo expresso em células diferenciadas, ou seja, todo o epitélio exceto a camada basal. Porém, assim como acontece para SPRR3, o padrão alterado de expressão é caracterizado pela redução da expressão nas camadas próximas à camada basal do epitélio. Tal comparação é possível de ser vista na figura 17.

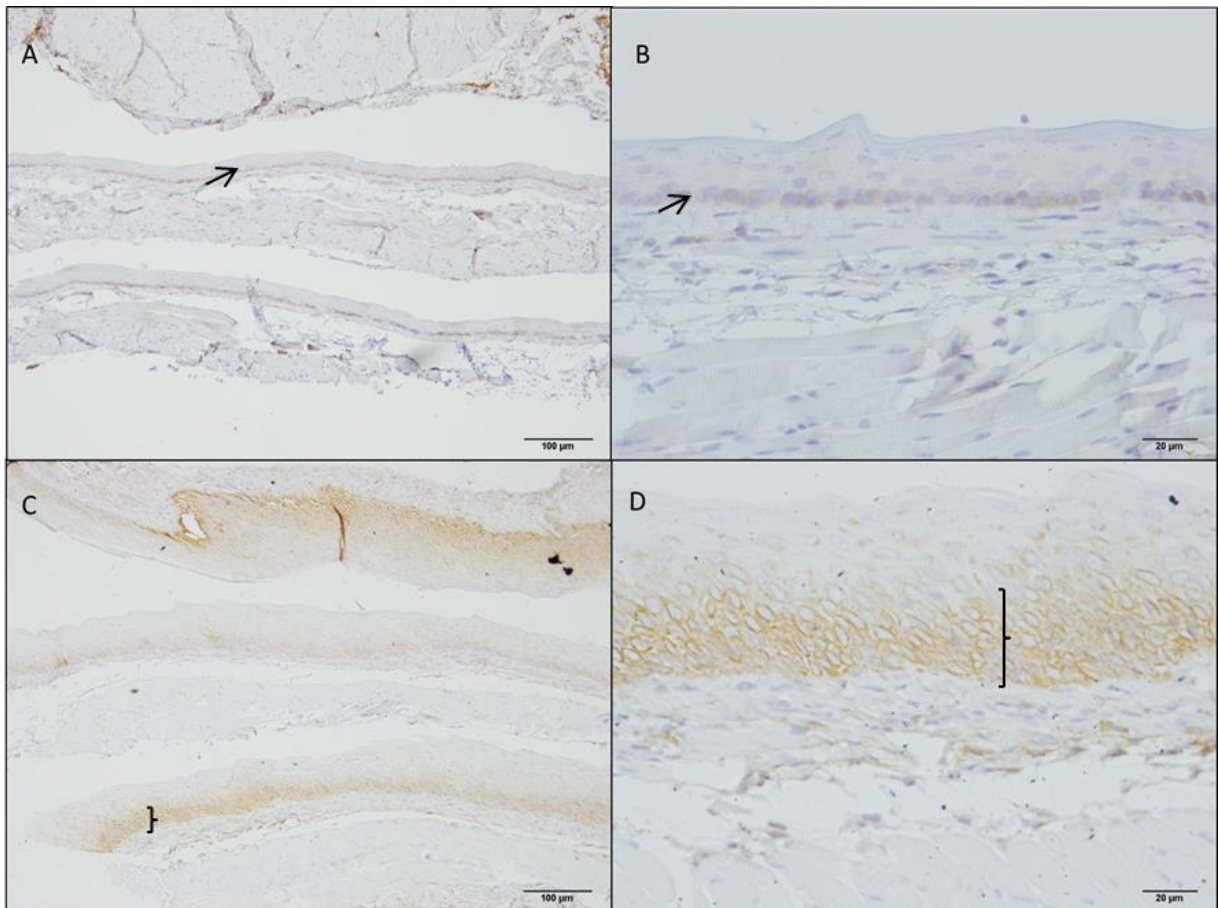
Figura 17 - Figura representativa da expressão de CK5/8 no epitélio esofágico de camundongo BABL/c



Legenda: A e B representam expressão normal de CK5/8 que apresenta positividade em todo o epitélio exceto na camada basal (as setas indicam a única camada onde não há expressão). C e D representam esôfago com inflamação e redução da expressão de CK5/8, que se resume apenas às camadas mais superiores, ou seja, próximas à luz do órgão (as chaves indicam várias camadas onde não há expressão). Barras de escala 100 micrômetros para A e C; e de 20 micrômetros para B e D.

Em relação ao anticorpo anti-CK14 a positividade normal que ocorre apenas em células indiferenciadas, ou seja, na camada basal, apresentou alteração em cinco amostras, as mesmas onde houve alteração da expressão para SPRR3 e CK5/8, e que também apresentava inflamação. Nas amostras alteradas houve um aumento da positividade da marcação no tecido como um todo, ocorrendo positividade em células de outras camadas além da camada basal, conforme pode ser observado na figura 18.

Figura 18 - Figura representativa da expressão de CK14 no epitélio esofágico de camundongo BABL/c

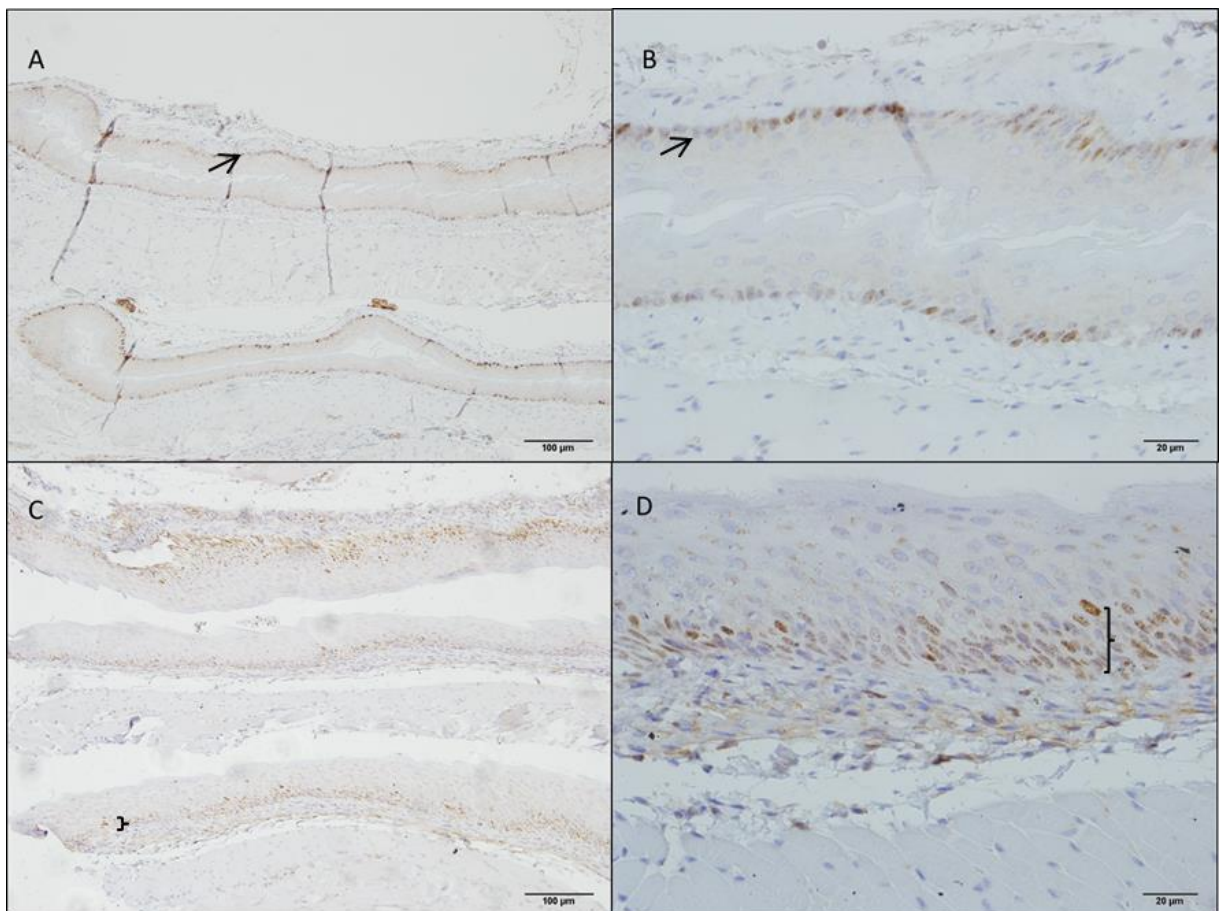


Legenda: A e B representam expressão normal de CK14 que apresenta positividade apenas na camada basal (indicado pelas setas). C e D representam esôfago com inflamação e aumento na expressão de CK14, que passa a ser expressa em camadas mais superiores, além da camada basal (indicado pelas chaves). Barras de escala 100 micrômetros para A e C; e de 20 micrômetros para B e D.

Na maioria dos casos, a marcação de KI67 apresentou cerca de 50% de núcleos positivos em camada basal, o que se apresenta dentro da normalidade. Porém em três casos ocorreu um aumento da quantidade de células que apresentaram positividade. Todas as três amostras que tiveram essa alteração,

estavam entre as cinco que apresentaram alteração na marcação para as proteínas já descritas, e conseqüentemente estavam também entre as amostras que apresentaram inflamação. A positividade normal para KI67 apresenta marcação restrita as células da camada basal, porém, nas amostras alteradas, núcleos de células de outras camadas do epitélio esofágico apresentaram positividade. Na figura 19 é possível notar a variação de expressão encontrada entre amostra com e sem inflamação.

Figura 19 - Figura representativa da expressão de KI67 no epitélio esofágico de camundongo BABL/c

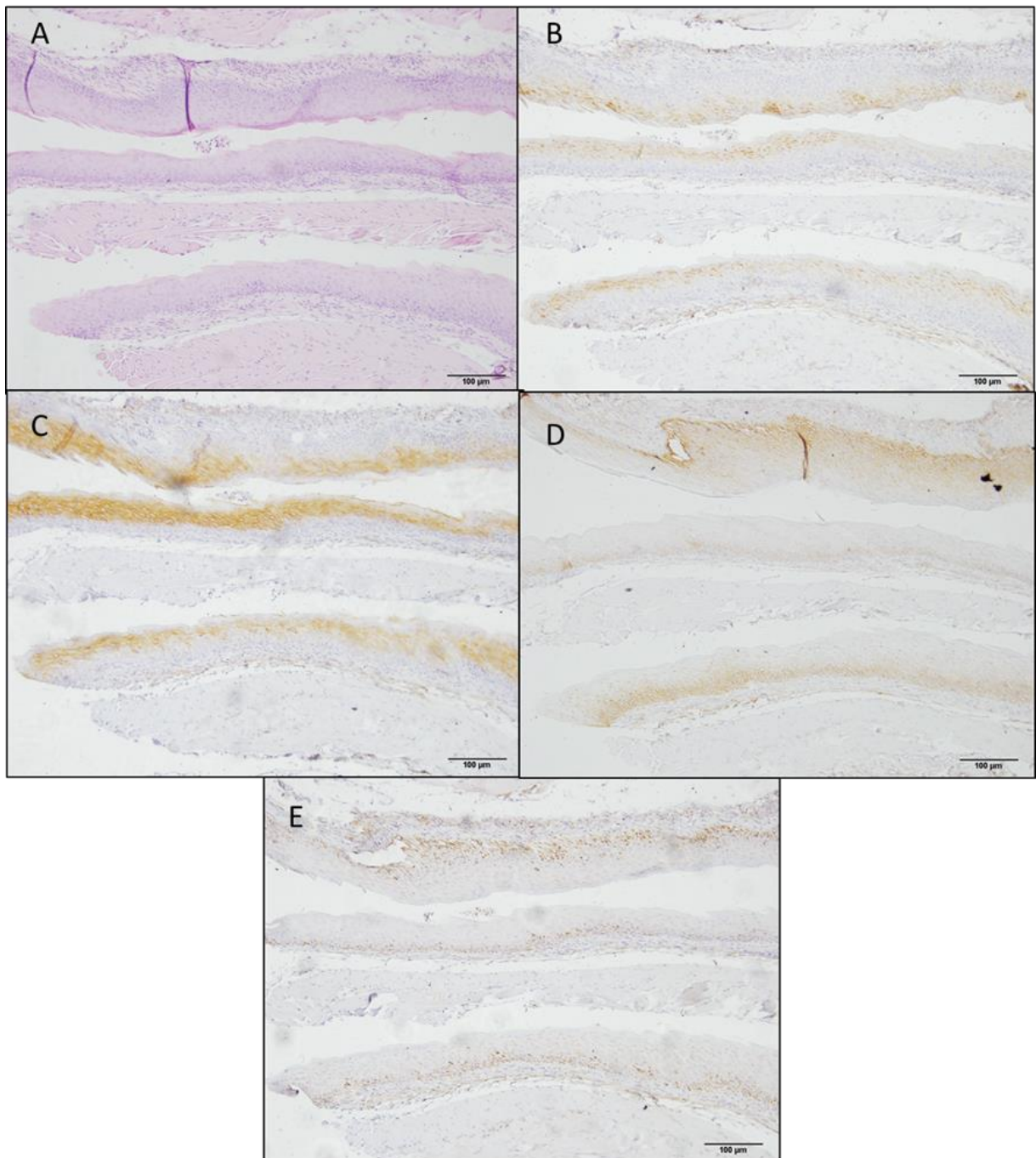


.Legenda: A e B representam expressão normal de KI67 que apresenta positividade nuclear apenas em células da camada basal (indicado pelas setas). C e D representam esôfago com inflamação e aumento na expressão de KI67, que passa a ser expresso em camadas mais superiores, além da camada basal (indicado pelas chaves). Barras de escala 100 micrômetros para A e C; e de 20 micrômetros para B e D.

Conforme mencionado acima, a maioria das amostras não apresentou alteração nem na histologia nem expressão das proteínas analisadas. Porém, é interessante notar que as alterações de expressão observadas ocorreram apenas em regiões onde havia inflamação. A figura 20 apresenta essa observação,

mostrando uma área inflamada com alterações de expressão, para todas as proteínas analisadas, na mesma região.

Figura 20 - Figura representativa do epitélio esofágico de camundongo BABL/c



Legenda: Apresentando inflamação (A) e alteração na expressão de SPRR3 (B), CK5/8 (C), CK14 (D) e Ki67 (E). Inflamação leve está presente em toda a extensão do esôfago representado, e é possível notar que na mesma região há alteração na expressão de todas as proteínas analisada. Barras de escala 100 micrômetros.

Para avaliar o efeito do tratamento (concentração e tempo) sobre os animais e possíveis alterações encontradas pela avaliação histopatológica, os dados dos animais foram dispostos em uma tabela (tabela 2) com a presença dos seguintes critérios: a que grupo de tratamento (concentração e tempo) pertencia; se houve inflamação; se houve alteração nos anticorpos analisados; e que regiões do esôfago foram encontradas alteradas. Além das regiões, ou terços, descritos do esôfago (proximal, médio e distal) também foi avaliada uma região presente em camundongos, conhecida como *forestomach*. Esta região é diretamente conectada ao esôfago, o que ajuda a nortear o patologista em relação aos terços. Trata-se de uma porção do tubo digestivo desses animais entre o esôfago e o estômago (não há nenhuma estrutura equivalente em humanos). Há certa dificuldade em distinguir essa região do esôfago, tanto macro quanto microscopicamente. A principal diferença é que o *forestomach* tem uma camada granulosa epitelial pouco mais espessa que o esôfago, e também possui camada muscular da mucosa, que o esôfago não possui. Seu papel fisiológico não bem estabelecido, mas costuma ser uma área mais sensível do ponto de vista de carcinogênese, tendo uma frequência alta de tumores nos animais tratados com carcinógenos.

Tabela 2 - Animais que apresentaram alteração histopatológica. Dados da tabela: a que grupo de tratamento (concentração e tempo) pertencia; se houve inflamação; se houve alteração nos anticorpos analisados; e que regiões do esôfago foram alteradas

GRUPOS	TRATAMENTO	INFLAMAÇÃO	SPRR3	KI67	CK5/8	CK14	REGIÃO DA INFLAMAÇÃO
controle	6h	X	X	X	X	X	P M D
20%	6h	X					D F
10%	12h	X					P M
10%	24h	X	X	X	X	X	P M D F
40%	24h	X	X	X	X	X	P M D F
20%	48h	X	X		X	X	P M D F
40%	48h	X	X		X	X	P M
controle	1 semana	X					P
10%	1 semana	XX					M
20%	4 semanas	X					D

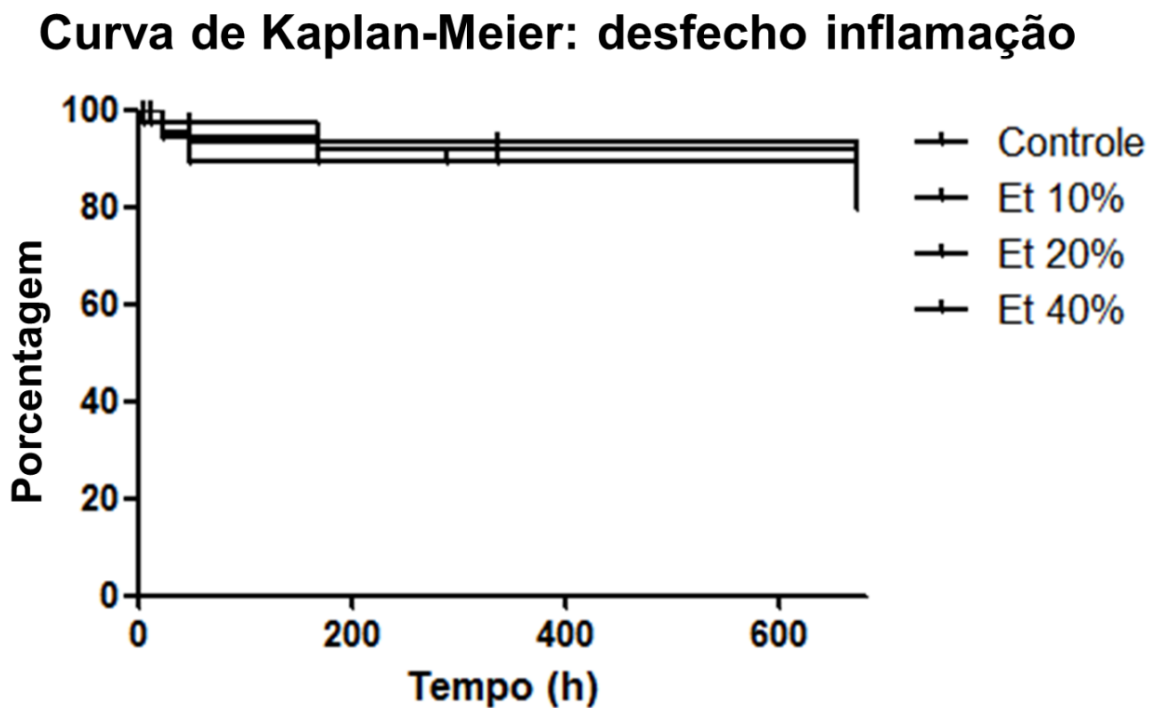
P = proximal, M = médio, D = distal e F = *forestomach*;

X = inflamação leve e XX= inflamação moderada.

A única alteração histopatológica encontrada foi inflamação. Uma grande heterogeneidade foi observada na distribuição da inflamação entre as amostras,

tanto em relação aos grupos de tratamento, quanto em relação às regiões onde incidiam essas alterações. Devido ao fato de ter ocorrido alteração na expressão das proteínas analisadas por imunohistoquímica apenas onde também houve inflamação do esôfago, resolveu-se analisar a relação entre a inflamação e o tratamento utilizado. O gráfico 5 apresenta os grupos de tratamento que tem como desfecho a inflamação. A curva demonstra que durante todo o tratamento, em nenhum grupo, a incidência de inflamação esofágica se correlacionou com o tratamento, seja em relação à concentração ou ao tempo.

Gráfico 5 - Curva de Kaplan-Meier com desfecho inflamação com o percentual de camundongos, e separados por grupo de tratamento. $p > 0,05$



5 DISCUSSÃO

Uma diferença típica entre tecido normal e displasia é a perda de diferenciação celular, embora o mecanismo de perda de diferenciação não seja completamente conhecido. Devido à diferença quanto ao grau de diferenciação do tecido esofágico entre mucosa normal e displasia, proteínas de diferenciação podem ser um potencial alvo para serem usadas como biomarcador de detecção precoce de CE. O álcool é um dos principais fatores de risco para o CE, porém, o mecanismo pelo qual o álcool contribui para a carcinogênese ainda não é bem definido. Uma associação encontrada entre o consumo de álcool e uma redução da expressão de SPRR3-v2 em CEE pode sugerir a hipótese de que o etanol possa levar ao aumento da proliferação e/ou perda de diferenciação do epitélio escamoso e desta forma contribuir para o surgimento do tumor.

O etanol, principal constituinte das bebidas alcoólicas, além da água, foi descrito em alguns modelos experimentais em animais, ser capaz de levar a um aumento da proliferação celular em epitélio esofágico. Haentjens e colaboradores (1987) mostraram um aumento do índice de marcação para proliferação na camada basal do epitélio esofágico de ratos que tiveram seus esôfagos perfundidos com calvados (bebida com alto teor alcoólico originária da Normandia, França) ou com etanol na mesma concentração, durante 20 minutos. Porém essa metodologia não reflete a realidade, pois em humanos o etanol, presente nas bebidas alcoólicas, é ingerido e passa pela superfície do epitélio esofágico, ou seja, o contato com o tecido é breve. Desta maneira 20 minutos de contato direto com o tecido levaria a uma natural irritação da mucosa. Mak e colaboradores (1987), também observaram um aumento da proliferação do epitélio esofágico após a administração de etanol através de dieta líquida isocalórica por oito semanas. Porém, a espessura do epitélio e a morfologia das células basais não foram alteradas pela exposição ao etanol, assim como, alteração na diferenciação não foi observada (Mak 1987). Em ambos os trabalhos citados, a técnica usada para analisar a proliferação celular foi a incorporação de [³H]-timidina. A timidina é seletivamente incorporada ao DNA celular durante a fase S do ciclo celular, porém, além da proliferação, há outros mecanismos pelos quais a timidina possa ser incorporada, como por exemplo, no reparo de DNA, que pode ser ativado sobretudo quando a célula é desafiada com

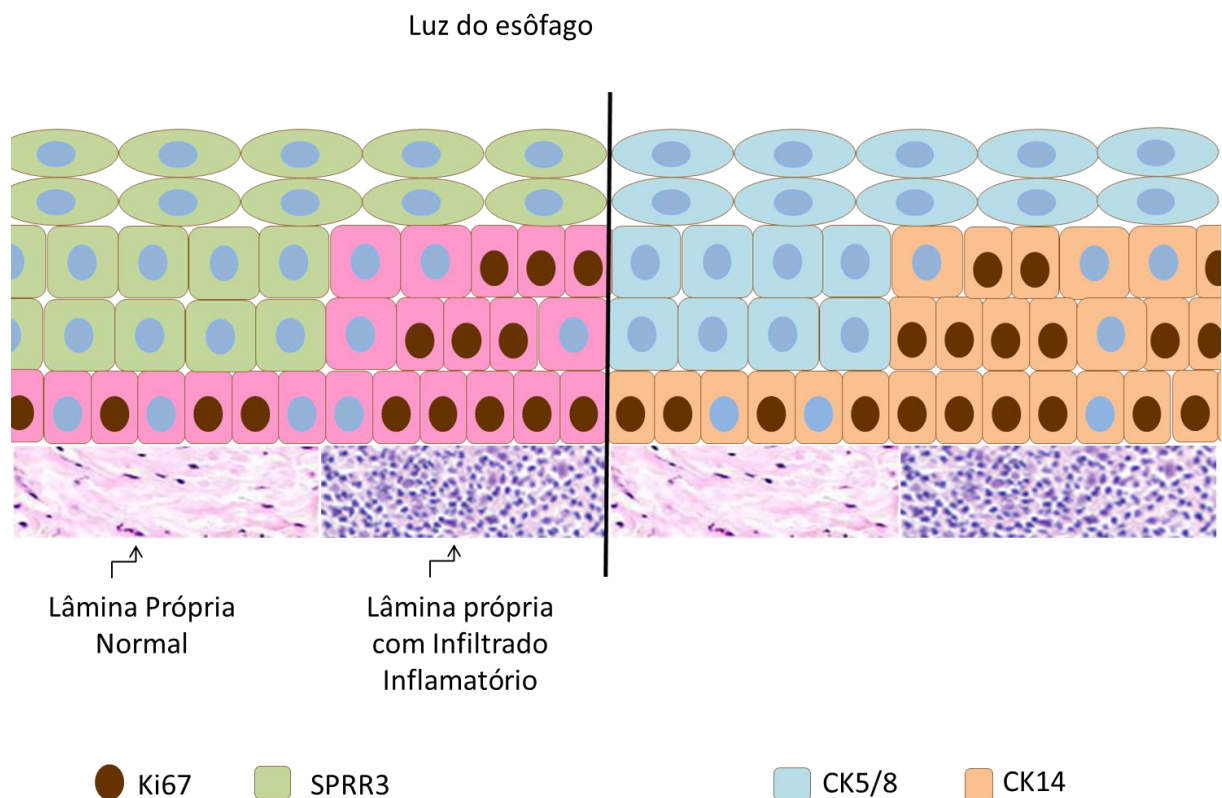
um agente genotóxico, como o acetaldeído. Desta forma a taxa de proliferação pode estar superestimada pelo fato destes estudos terem utilizado a quantidade de timidina captada. Além disso, atualmente é bem estabelecido o uso do procedimento de “gavagem” como sendo o método mais eficaz para estudar o efeito tóxico agudo e crônico do etanol sobre o epitélio esofágico, pois além de refletir bem o que acontece no consumo humano, oferece a possibilidade do controle exato da quantidade de etanol aplicada (Siegmund, Haas, Singer 2005).

Na maioria dos trabalhos, quando o etanol é utilizado como único tratamento, alterações esofágicas não são observadas (Morimura *et al*, 2001; Aze *et al.*, 1993; Kuratsume *et al.*, 1971). Craddock (1991) utilizando como forma de administração do álcool a técnica de gavagem observou que o tratamento com 64% de etanol não levou a alterações esofágicas, havendo um aumento de proliferação no epitélio esofágico apenas quando o tratamento com etanol estava associado com 2-metilbutanol (32% de etanol associado a 32% de 2-metilbutanol). Além disso, outras alterações, incluindo o surgimento de tumores esofágicos, só foram observadas com a administração de etanol associado à nitrosaminas, mostrando que houve um aumento no número de tumores em animais tratados com etanol e nitrosaminas em comparação com animais tratados apenas com nitrosaminas (Nachiappan 1994; Aze *et al.*, 1993). Estes dados sugerem que o álcool participa da carcinogênese esofágica na fase de promoção tumoral e não na iniciação.

Das amostras analisadas no presente trabalho, a maioria independente do tratamento ou duração deste, não apresentou alterações histopatológicas ou mesmo alterações na marcação dos anticorpos avaliados. Regiões que apresentaram inflamação, cuja procedência não é conhecida devido ao evento ter ocorrido ao acaso, apresentaram também um aumento proliferativo caracterizado pela marcação do anticorpo para Ki67, provavelmente devido ao *turn-over* (renovação do tecido) celular, em consequência da morte de células induzidas pela presença de inflamação. Corroborando o dado de aumento de proliferação através de Ki67, foi visto também um aumento da marcação de CK14, proteína descrita como expressa em células indiferenciadas da camada basal do epitélio esofágico de camundongos (Blanco 2010). Ao se analisar a marcação dos outros anticorpos é possível perceber que tanto CK5/8 quanto SPRR3, que são marcadores de células diferenciadas, apresentaram uma redução da sua marcação nas células mais próximas à região basal do epitélio. Essa mudança do padrão normal nas regiões identificadas com

presença de inflamação sugere que haja uma substituição das células diferenciadas do epitélio por células indiferenciadas (em proliferação) na tentativa de restaurar o tecido inflamado. Este fenômeno de aumento de proliferação celular induzido por inflamação e redução de células diferenciadas na mesma região é esperado, uma vez que, a inflamação pode induzir o *turn-over* e as células que estão em replicação ainda não se diferenciaram. Embora seja um fenômeno esperado e tenha ocorrido aleatoriamente em algumas amostras, ele demonstra a eficácia dos marcadores analisados, caracterizando um bom funcionamento destes. Assim como demonstrado na tabela 2 e também pelos cortes seriados apresentado na figura 20, os esquemas abaixo (figura 21) mostram a transição que acontece pelo efeito da inflamação, para uma melhor compreensão do fenômeno ocorrido.

Figura 21 - Esquema de epitélio esofágico mostrando a expressão das proteínas SPRR3, CK5/8, CK14 e KI67



Legenda: Essas proteínas tem seu perfil de expressão alterado na presença de inflamação.

Um dado observado nos experimentos foi o efeito tóxico do etanol, indicado tanto pela perda de massa corpórea quanto pela alteração do aspecto físico, nos animais que receberam uma alta concentração de etanol ou uma concentração

moderada por um longo período. Esta toxicidade evidencia que o etanol estava sendo ingerido e absorvido pelo organismo dos animais, indicando que os resultados negativos encontrados quanto ao aumento da proliferação não são devido a não ingestão ou absorção do etanol. Com relação à mortalidade dos animais foi observado que o grupo que não recebeu etanol e o grupo que recebeu etanol a 20%, tiveram uma mortalidade ligeiramente maior que os grupos que receberam etanol a 10%. Porém, etanol a 40% apresentou uma alta taxa de mortalidade, sendo a maior dentre todos os grupos. Estes dados foram semelhantes aos encontrados em um estudo de coorte com a população da Califórnia, onde se analisou a mortalidade por câncer oral e de esôfago em relação ao número de doses consumidas diariamente de cerveja, vinho, destilados ou coquetéis. O trabalho analisou o consumo de álcool de grupo controle (sem ingestão de álcool); menos de 2 doses; 3-5 doses; e mais que 6 doses, e a percentagem de mortalidade encontrada foi de, respectivamente, 2, 0, 5 e 8%. Isto é, não bebedores tinham uma taxa ligeiramente maior de mortalidade por câncer do que aqueles que consumiam menos de duas doses por dia, enquanto que aqueles que consumiam de 3-5 doses apresentaram quase o dobro de mortalidade do que aqueles que consumiam pouco álcool, e aqueles que consumiam mais de 6 doses (cerca de 72g de álcool) apresentaram taxas de mortalidade quatro vezes maior (Klatsky *et al.*, 1981).

De acordo com os dados gerados no presente trabalho, o etanol não é capaz de alterar proliferação e expressão de proteínas de diferenciação no epitélio escamoso esofágico de camundongos BALB/c, sugerindo a refutação da hipótese de que o álcool contribua para a carcinogênese esofágica por estimular proliferação e/ou perda de diferenciação epitelial.

CONCLUSÕES

- O etanol não está relacionado com alterações clinicopatológicas e morfológicas ou no epitélio esofágico de camundongos BALB/c.
- O etanol não altera a expressão das proteínas SPRR3, CK5/8 e CK14 no epitélio esofágico de camundongos BALB/c.
- O etanol não influencia no índice de proliferação do epitélio esofágico de camundongos BALB/c.
- A presença de inflamação esofágica dos camundongos foi capaz de alterar o padrão de marcação dos anticorpos para SPRR3, CK5/8, CK14 e KI67, contudo, a inflamação não se correlacionou com o consumo de etanol, independente da duração e da concentração.

REFERÊNCIAS

- Abraham JM, Wang S, Suzuki H, Jiang HY, Rosenblum-Vos LS, Meltzer SJ. et al Esophagin cDNA cloning and characterization: a tissue- specific member of the small proline-rich protein family that is not expressed in esophageal tumors. *Cell Growth Differ.* 1996; 7: 855–60.
- Adams L, Roth MJ, Abnet CC, Dawsey SP, Dawsey SM, Woodson K. et al Promoter methylation in cytology specimens as an early detection marker for esophageal squamous dysplasia and early esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Prev Res (Phila).* 2008; 1(5):357-61.
- Allen JW, Richardson JD, Edwards MJ. Squamous cell carcinoma of the esophagus: a review and update. *Surg Oncol.* 1997; 6:193-200.
- American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures.* p15. [acesso em 2013 Jan]. Disponível em: <http://www.cancer.org>.(2008).
- Anderson LM, Koseniauskas R, Burak ES, Moskal TJ, Rice JM, Harrington GW, et al Reduced blood clearance and increased urinary excretion of N-nitrosodimethylamine in patas monkeys exposed to ethanol or isopropyl alcohol. *Cancer Res.* 1992; 52: 1463–1468.
- Anderson LM, Chhabra SK, Nerurkar PV, Souliotis VL, Kyrtopoulos SA, Alcohol-related cancer risk: a toxicokinetic hypothesis. *Alcohol.*1995; 12: 97–104.
- Aze Y, Toyoda K, Furukawa F, Mitsumori K, Takahashi M. Enhancing effect of ethanol on esophageal tumor development in rats by initiation of diethylnitrosamine. *Carcinogenesis.* 1993; 14:37–40.
- Bernerd F, Asselineau D. Successive alteration and recovery of epidermal differentiation and morphogenesis after specific UVB-damages in skin reconstructed in Vitro. *Dev Biol.* 1997; 183: 123-38.
- Blanco TCM. Alterações histopatológicas em modelo de carcinogênese esofágica induzida pela N-nitrosodietilamina associada à lesão térmica crônica. [tese]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2010.
- Cabral A, Sayin A, de Winter S, Fischer D, Pavel S, Backendorf C: SPRR4, a novel cornified envelope precursor: UV-dependent epidermal expression and selective incorporation into fragile envelopes. *J Cell Sci.* 2001; 114:3837-3843.
- Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6(4):328-40.
- Castellsagué X, Muñoz N, De Stefani E, Victoria C, Rolon P, Quintana M. Independent and joint effects of tobacco smoking and alcohol drinking on the risk of esophageal cancer in men and women. *Int J Cancer.* 1999; 82:657-664.

Castellsague X, Munoz N, De Stefani E, Victora CG, Castelletto R, Rolon PA. et al Influence of Mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. *Int J Cancer*. 2000; 88:658–64.

Cook MB, Chow WH, Devesa SS. Oesophageal cancer incidence in the united states by race, sex, and histologic type, 1977–2005. *British Journal of Cancer*. 2009; 101: 855–859.

Corley DA, Buffler PA. Oesophageal and gastric cardia adenocarcinomas: analysis of regional variation using the Cancer Incidence in Five Continents database. *Int J Epidemiol*. 2001; 30(6):1415-25.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Patologia Estrutural e Funcional*. 6 ed. Guanabara: Rio de Janeiro; 2000.

Craddock VM, Henderson AR, Potent inhibition of oesophageal metabolism of N-nitrosomethylbenzylamine, an oesophageal carcinogen, by higher alcohols present in alcoholic beverages. In: O'Neill, I.K., Chen, J., Bartsch, H, editors. *Relevance to Human Cancer of N-nitroso Compounds Tobacco Smoke and Mycotoxins*. International Agency for Research on Cancer. Lyon; 1991. p. 564–567.

Day NE, Muñoz N, Ghadirian P. Epidemiology of esophageal cancer: a review. *Epidemiology of cancer of the digestive tract*. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers; 1982. p. 21-57.

Del Bino S, Vioux C, Rossio-Pasquier P, Jomard A, Asselineau D, Bernerd F. et al Ultraviolet B induces hiperproliferation and modification of epidermal differentiation in normal human skin grafted on to nude mice. *Br J Dermatol*. 2004; 150: 658-67.

El-Serag HB, Ergun GA, Pandolfino J, Fitzgerald S, Tran T, Kramer JR. Obesity increases oesophageal acid exposure. *Gut*. 2007; 56(6):749-55.

Falk GW, Risk factors for esophageal cancer development. *Surgical Oncology Clinics of North America*. 2009; 18(3): 469–485.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer*. 2010; 127: 2893–291.

Fischer DF, Sark MW, Lehtola MM, Gibbs S, van de Putte P, Backendorf C: Structure and Evolution of the Human SPRR3 Gene: Implications for Function and Regulation. *Genomics*. 1999; 55:88-99.

Gibbs S, Fijneman R, Wiegant J, van Kessel AG, van De Putte P, Backendorf C: Molecular characterization and evolution of the SPRR family of keratinocyte differentiation markers encoding small proline-rich proteins. *Genomics*. 1993; 16:630-637.

GLOBOCAN. Cancer incidence and mortality worldwide. [acesso em 2013 Jan]. Disponível em: <http://www-dep.iarc.fr>.

Haentjens P, De Backer A, Willems G. Effect of an apple brandy from Normandy and of ethanol on epithelial cell proliferation in the esophagus of rats. *Digestion*. 1987; 37(3):184-92.

Hohl D. Cornified cell envelope. *Dermatologica*. 1990; 180:201–11.

Homann N, Tillonen J, Rintamaki H, Salaspuro M, Lindqvist C and Meurman JH, Poor dental status increases acetaldehyde production from ethanol in saliva: a possible link to increased oral cancer risk among heavy drinkers. *Oral Oncol*. 2001; 37: 153-158.

IARC. Alcohol Drinking. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1988. v44.

IARC/OMS. World Cancer Report 2008.

IARC. Alcohol Consumption and Ethyl Carbamate. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2010; v 96.

IARC. A Review of Human Carcinogens: Personal Habits and Indoor Combustions. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2012; volume 100E .

INCA. Tipos de câncer. [acesso em 2012 Jun]. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/esofago/definicao>.

INCA – Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>. Estimativas 2012.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA. Cancer J Clin*. 2011; 61:69–90.

Karantza V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene*. 2011; 30:127-138.

Kimos MC, Wang S, Borkowski A, Yang GY, Abraham JM, Meltzer SJ. et al Esophagin and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) are biomarkers of human esophageal neoplastic progression. *Int J Cancer*. 2004; 111:415-17.

Klatsky AL, Friedman GD, Siegelaub AB. Alcohol and mortality. A ten-year Kaiser-Permanente experience. *Ann Intern Med*. 1981; 95(2):139-45.

Kuratsune M, Kochi S, Horie A, Nishizumi M. Test of alcoholic beverages and ethanol solutions for carcinogenicity and tumor promoting activity. *Gann*. 1971; 62(5):395-405.

Lide DR, CRC Handbook of Chemistry and Physics. 81st edition. CRC press. 2000.

Lijinsky W. Chemistry and biology of N-nitroso compounds. Cambridge: Cambridge University Press; 1992.

Lohman FP, Medema JK, Gibbs S, Ponec M, van de Putte P, Backendorf C. Expression of the SPRR cornification genes is differentially affected by carcinogenic transformation. *Exp Cell Res*. 1997; 231:141–8.

Lu SH, Montesano R, Zhang MS, Feng L, Luo FJ, Chui SX, Umbenhauer D, Saffhill R, Rajewsky MF. Relevance of N-nitrosamines to esophageal cancer in China. *J Cell Physiol Suppl*. 1986; 4:51-8.

Mak KM, Leo MA, Lieber CS. Effect of ethanol and vitamin A deficiency on epithelial cell proliferation and structure in the rat esophagus. *Gastroenterology*. 1987; 93(2):362-70.

McLarty AJ, Deschamps C, Trastek VF, Allen MS, Pairolero PC, Harmsen WS. Esophageal resection for cancer of the esophagus: long-term function and quality of life. *Ann Thorac Surg*. 1997; 63(6):1568-72.

Mirvish SS. Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and in vivo occurrence. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1975; 31:325-351.

Montesano R, Hollstein M, Hainaut P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer*. 1996; 69:225-235.

Morimura K, Hori T, Kaneko M et al. Promotion of chemically induced rat esophageal tumorigenesis with post-initiation ethanol modification. *Teratog Carcinog Mutagen*. 2001; 21: 295–301.

Munoz N. Epidemiological aspects of esophageal cancer. *Endoscopy*. 1993; 23:609–12.

Nachiappan V, Mufti SI, Chakravarti A, Eskelson CD, Rajasekharan R. Lipid peroxidation and ethanol-related tumor promotion in Fischer-344 rats treated with tobacco-specific nitrosamines. *Alcohol Alcohol*. 1994; 29: 565–574.

OGA, Seizi. *Fundamentos de toxicologia*. São Paulo: Atheneu; 1996.

Organização Mundial da Saúde. *The Global Burden of Disease*. Geneva: World Health Organization; 2008.

Parkin DM Global cancer statistics in the year 2000. *The Lancet. Oncology*. 2001; 2: 533-543.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005; 55: 74-108.

- Peng R, Tu YY, Yang CS. The induction and competitive inhibition of a high affinity microsomal nitrosodimethylamine demethylase by ethanol. *Carcinogenesis*. 1982; 3: 1457–146.
- Pickens A, Orringer MB. Geographical distribution and racial disparity in esophageal cancer. *Ann Thorac Surg*. 2003; 76(4):S1367-9.
- Pinto LFR. Differences between isoamyl alcohol and ethanol on the metabolism and DNA ethylation of N-nitrosodiethylamine in the rat. *Toxicology*. 2000; 151:73–79.
- Pinto LFR, Teixeira-Rossini AM, Albano RM, Felzenszwalb I, Nunes RA, Andreollo NA. et al. Mechanisms of esophageal cancer development in Brazilians. *Mutat Res*. 2003; 544: 365-73.
- Postel, VW, Adam, L, Jager, KH. Herstellung und Zusammensetzung von Calvados. *Die Branntweinwirtschaft*. 1981; 162–167.
- Post PN, Siersema PD, Van Dekken H. Rising incidence of clinically evident Barrett's oesophagus in The Netherlands: a nation-wide registry of pathology reports. *Scand J Gastroenterol*. 2007; 42(1):17-22.
- Rapozo DCM. Efeito da lesão térmica na carcinogênese esofágica. [dissertação] Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2009.
- Seitz HK, Matsuzaki S, Yokoyama A, Homann N, Väkeväinen S, Wang XD. Alcohol and cancer. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001; 25(5):S137-143.
- Sepehr A, Tanière P, Martel-Planche G, Zia'ee AA, Saidi F, Hainaut P. et al. Distinct pattern of TP53 mutations in squamous cell carcinoma of the esophagus in Iran. *Oncogene*. 2001; 20(50):7368-74.
- Siegmund SV, Haas S, Singer MV. Animal models and their results in gastrointestinal alcohol research. *Dig Dis*. 2005; 23(3-4):181-94.
- Simão TA, Souza-Santos PT, de Oliveira DS, Bernardo V, Ribeiro Pinto LF, Albano RM. et al Quantitative evaluation of SPRR3 expression in esophageal squamous cell carcinoma by qPCR and its potential use as a biomarker. *Exp Mol Pathol*. 2011; 91(2):584-9.
- Smeds J, Berggren P, Ma X, Xu Z, Hemminki K, Kumar R. Genetic status of cell cycle regulators in squamous cell carcinoma of the oesophagus: the CDKN2A (p16INK4a and p14ARF) and p53 genes are major targets for inactivation. *Carcinogenesis*. 2002; 23: 645-655.
- Steinert PM, Candi E, Kartasova T, Marekov L: Small proline-rich proteins are cross-bridging proteins in the cornified cell envelopes of stratified squamous epithelia. *J Struct Biol*. 1998; 122:76-85.
- Swann PF, Coe, AM, Mace, R Ethanol and dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine metabolism and disposition in the rat. Possible relevance to the

influence of ethanol on human cancer incidence. *Carcinogenesis*. 1984; 5: 1337–1343.

Tuyns AJ. Epidemiology of alcohol and cancer. *Cancer Res*. 1979; 39(7 Pt 2):2840-3.

Whelan SL et al. Patterns of cancer in five continents. V. Lyon, IARC Scient. 1990; Publ. 12.

Wild CP and Hardie LJ. Reflux, Barrett's oesophagus and adenocarcinoma: burning questions. *Nature Reviews in Cancer*. 2003; 3(9):676-84.

Windholz, Martha. *The Merck index: an encyclopedia of chemicals and drugs*. 9th ed. New Jersey : Merck; 1976.

Zhang Y, Feng YB, Shen XM, Chen BS, Zhan QM, Wang MR et al: Exogenous expression of Esophagin/SPRR3 attenuates the tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma cells via promoting apoptosis. *Int J Cancer*. 2008. 122:260-266.