Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Marina Chianello Nicolau

Caracterização da expressão gênica dos receptores colinérgicos nicotínicos (*CHRNs*) no epitélio esofágico normal e em carcinoma epidermóide de esôfago

Rio de Janeiro

2015

Marina Chianello Nicolau

Caracterização da expressão gênica dos receptores colinérgicos nicotínicos (*CHRNs*) no epitélio esofágico normal e em carcinoma epidermóide de esôfago

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

Orientador: Prof. Dra. Tatiana de Almeida Simão

Coorientador: Dra. Sheila Coelho Soares Lima

Rio de Janeiro

2015

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

N639 Nicolau, Marina Chianello.
Caracterização da expressão gênica dos receptores colinérgicos nicotínicos (CHRNs) no epitélio esofágico normal e em carcinoma epidermóide de esôfago / Marina Chianello Nicolau. – 2015.
144 f.

Orientadora: Tatiana de Almeida Simão.
Coorientadora: Sheila Coelho Soares Lima.
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Esôfago - Teses. 2. Esôfago - Câncer - Teses. 3. Receptores Nicotínicos. 4. Carcinoma de células escamosas - Teses. 5. Tabagismo - Teses. 6. Etanol - Teses. I. Simão, Tatiana de Almeida. II. Lima, Sheila Coelho Soares. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.32

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

_____ _____

Assinatura Data

Marina Chianello Nicolau

Caracterização da expressão gênica dos receptores colinérgicos nicotínicos (*CHRNs*) no epitélio esofágico normal e em carcinoma epidermóide de esôfago

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: 31 de março de 2015.

Orientadora:

Prof. Dra. Tatiana de Almeida Simão

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientadora:

Dra. Sheila Coelho Soares Lima

Instituto Nacional do Câncer

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. André Luiz Mencalha

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Prof. Dra. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Dra. Miriam Bianchi de Frontin Werneck

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, meu irmão, minha avó Francisca e ao meu namorado pelo amor incondicional e por estarem sempre do meu lado.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus por tudo de maravilhoso que tem acontecido em minha vida e por eu estar cumprindo mais uma etapa da minha carreira profissional;

Às minhas queridas orientadores, Prof.Dra Tatiana de Almeida Simão e a Dra Sheila Coelho Soares Lima por toda dedicação, excelente orientação e por toda paciência que tiveram comigo desde o início da minha carreira científica. São mais do que orientadoras, são amigas, super "chefas" e mãezonas. Sempre estão dispostas a ajudar. Muito obrigada por tudo, conhecimento adquirido, por todos os ensinamentos e por acreditarem em mim, em meu potencial. Só estou aqui hoje graças a vocês. Nossa filha nasceu (haha) e a gente conseguiu. Foi uma longa trajetória, bem tensa, mas no final vai valer à pena. Estamos juntas até o fim;

Ao Prof.Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto por contribuir na minha carreira científica e profissional e por me dar uma oportunidade de estar nesse grupo tão maravilhoso, unido e com excelentes profissionais. Muito obrigada por todo o aprendizado e conhecimento;

Aos Prof. Dr. Rodolpho Albano e Prof.Dra Ana Rossini por toda ajuda;

A todos os membros do laboratório que contribuíram muito para desenvolvimento dos experimentos, pelas palavras de carinho, pela amizade: Alda (você é ímpar, sempre me ajudando quando preciso), Fernanda (técnica que organiza nossa amada sala de cultura), Isabela (Cara, o que falar?! Obrigada por tudo! Você foi essencial em cada etapa), Letícia (minha amiga querida, nova mestranda do pedaço), Lilian (você é uma fofa! Adoro muuito você), Monique (essencial!), Nina (excelente profissional e a mais nova barrigudinha da área - Linda), Paulo Thiago (fundamental nas análises estatísticas e em fazer perguntas complicadas), Pedro Nicolau (meu primo, obrigada por tudo, se não fosse você, eu não estaria aqui – Te amo!), Vanessa (adoro essa menina, muito dedicada), Nath (gosto muito de você, você faz parte do meu crescimento também), Marcela (Adorooo!!), Ricardo (você contribui muito para o meu aprendizado), Fernanda (estamos juntas!!), Antônio (você é um querido), Albert (adoro você), Haonne (nosso futuro médico querido), Cláudia (nossa médica querida). Meus amigos, obrigada por tudo! Todos vocês contribuíram para a minha formação seja nas nossas reuniões científicas, seja simplesmente por me escutarem. Gosto muito de cada um de vocês. Vocês estão no lado esquerdo do peito!!!!

À Dra Anke pela ajuda nas análises de sobrevida.

Aos membros dessa banca por terem aceitado o meu convite de avaliar minha dissertação;

À endoscopia do HUPE-UERJ e do INCA pelas coletas das biópsias de esôfago. Sem amostras, não seria possível trabalhar;

Às agências de fomento, pois sem ajuda financeira, nada disso teria acontecido;

À UERJ por esses 5 anos juntas e à PPGB que é uma pós-graduação de excelente padrão;

Aos meus pais que são a minha fortaleza e porto-seguro. Quantas vezes cheguei a casa, cansada, com vontade de desistir de tudo e eles ficavam me escutando, me dando força para seguir sempre em frente. Eu dedico essa dissertação a vocês porque só vocês sabem o quanto foi difícil. Obrigada, meus amores por tudo!! Sem vocês, eu não teria conseguido e eu não seria nada. Ana Lúcia e André Nicolau, meu amor por vocês não cabe no peito e obrigada por tudo, por sempre acreditar em mim, em meu potencial e por sempre estarem do meu lado. Vocês são e sempre serão tudo para mim!! Amo incondicionalmente!!

Ao meu irmão Deco por todo apoio, carinho e por sempre me alegrar nos momentos mais difíceis. Você é mais do que um irmão de sangue, é irmão do coração, meu amigo, meu companheiro. Amo muito, muito você!

À minha amada avó Chica que acompanhou desde o início essa trajetória. Sempre preocupada comigo e com o meu bem estar. Você é uma linda!! Te amo demais!!!

Às minhas amigas do coração, Thais, Bruna e Andreia. Tatá, você é minha alma gêmea desde o início e será assim para sempre! Você é Best!! Bruninha, minha querida amiga, sempre disposta a me ajudar e a me escutar, muito obrigada pelo carinho de sempre!! Andréa, nos afastamos um pouco, mas saiba que eu gosto muito de você. Amigas, obrigada por toda cumplicidade de sempre e por tornar a minha vida muito mais agradável mesmo em momentos tensos, como esse. Estamos sempre juntas! Amo vocês!!!

O que falar dele? Ele que está sempre do meu lado, sendo a minha válvula de escape. Ele que é meu eterno amor, meu companheiro, meu melhor amigo. Amor, nós estamos passando por mais uma etapa juntos e será assim para sempre. Obrigada por me agüentar mesmo naqueles momentos que eu mesma não me agüentava, obrigada por me compreender naqueles momentos que não conseguia te dar muita atenção nas suas quinzenas de folga, por sempre me escutar, por sempre estar do meu lado para o que der e vier. Dedico essa dissertação também a você porque você lutou comigo! E como você mesmo diz: isso aqui é só um momento, é passageiro e o que a gente tem é eterno. Mário, te amo mais do que tudo e do que todos!!!

À minha família por todo apoio principalmente a minha madrinha Angela e minha tia Andreia por sempre acreditarem em mim e na minha capacidade.

Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia. Porque o mundo pertence a quem se atreve, e a vida é muito para ser insignificante!

Charles Chaplin

RESUMO

NICOLAU, Marina Chianello. *Caracterização da expressão gênica dos receptores colinérgicos nicotínicos (CHRNs) no epitélio esofágico normal e em carcinoma epidermóide de esôfago.* 2015. 144f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

O câncer de esôfago (CE) é uma doença extremamente agressiva e é um dos tumores mais incidentes e letais no Brasil e no mundo, sendo o carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) o principal subtipo histológico, apresentando como principais fatores de risco o etilismo e o tabagismo na população ocidental. A exposição concomitante desses dois fatores representa um risco multiplicador para o desenvolvimento de CEE, sendo que o fumo parece ter um papel importante tanto na iniciação quanto na promoção do tumor, enquanto o álcool teria um papel mais relevante na promoção. Componentes do tabaco, como a nicotina e as nitrosaminas são potentes carcinógenos e agonistas de alta afinidade dos receptores colinérgicos nicotínicos (CHRNs), podendo atuar ativando vias de sinalização celular fundamentais para a progressão tumoral. Pouco se sabe sobre a expressão e regulação dos CHRNs na mucosa esofágica e no processo de carcinogênese desse tecido. Assim, o objetivo desse trabalho foi analisar a expressão gênica dos *CHRNs* no epitélio esofágico normal e em CEE, bem como sua regulação pelos fatores de risco associados ao tumor**.** Foi observado que as subunidades α3, α5, α7 e β4 são expressas no epitélio esofágico saudável humano enquanto as subunidades α1, α4, α9 e α10 apresentaram baixa ou nenhuma expressão nesse mesmo tecido. Além disso, foram encontradas diferenças de expressão das subunidades α3 e α7 em indivíduos etilistas e tabagistas quando comparados com indivíduos não-etilistas (subunidade α3) e não-tabagistas (subunidade α7). Nas amostras de CEE, as subunidades *CHRNA5* e *CHRNA7* foram encontradas superexpressas no tumor quando comparado ao tecido normal adjacente e observou-se diferença de expressão da subunidade α7 no tumor comparado com o tecido saudável e a subunidade β4 apresentou-se mais expressa no tecido tumoral e no tecido normal adjacente ao tumor do que no epitélio esofágico saudável. Entretanto, não foram encontradas diferenças de expressão de nenhuma das subunidades avaliadas nas linhagens CEE quando submetidas a tratamento com nicotina ou etanol. Os resultados obtidos sugerem uma participação dos CHRNs na fisiologia do epitélio esofágico e que os fatores de risco associados ao desenvolvimento de CEE parecem ser capazes de afetar a expressão desses receptores no epitélio esofágico.

Palavras-chave: Receptores colinérgicos nicotínicos. Esôfago. Carcinoma epidermóide de esôfago. Tabagismo. Etilismo.

ABSTRACT

NICOLAU, Marina Chianello. *Characterization of gene expression of the nicotinic cholinergic receptors (CHRNs) in normal esophageal epithelium and esophageal squamous cell carcinoma.* 2015. 144f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Esophageal cancer (EC) is an extremely aggressive disease and it is one of the most incident and lethal cancers in the world and in Brazil. Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is the main histological type of EC, being associated with alcohol and tobacco consumptiom. In Western countries, the concomitant use of these two factors provides a multiplying risk for the development of ESCC, and smoking seems to play an important role in both tumor initiation and promotion, while alcohol seems to have a more important role in promoting the tumor. Tobacco's components like nicotine and nitrosamines are powerful carcinogens as well as high-affinity agonists of nicotinic cholinergic receptors (CHRNs). The activation of CHRNs by tobacco components results in the activation of key cellular signaling pathways for cancer progression. Very little is known about the expression and regulation of CHRNs in esophageal mucosa and carcinogenesis process. Thus, the objective of this study was to analyze the expression of *CHRNs* subunits in healthy esophageal mucosa and ESCC. Furthermore, we aimed to investigate whether etiologic factors associated with ESCC development could affect the expression of these receptors. According to our results, α3, α5, α7 and β4 subunits are expressed in human normal esophagus whereas α1, α4, α9 e α10 subunits showed very low or no expression in the same tissue. Besides, there were differences in the expression of α3 and α7 subunits in alcoholic and smokers when compared with non-alcoholic (α3 subunit) and nonsmokers (α7 subunit). Regarding ESCC analyses, *CHRNA5* and *CHRNA7* were found overexpressed in tumor tissues when compared to surrounding mucosa. There were differences in the expression of α7 subunit in tumor tissues compared to healthy tissue and of β4 subunit in tumor tissue and surrounding mucosa compared to healthy tissue. No differences were found in the expressions of these subunits in esophageal cancer cell lines exposed to nicotine or ethanol. These results suggest that CHRNs play a role in esophageal physiology and that ESCC etiological factors seem to be able to affect the expression of these receptors.

Keywords: Nicotinic cholinergic receptors. Esophagus. Esophageal squamous cell carcinoma. Tobacco. Alcohol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das taxas estimadas, ajustadas por idade, de incidência e mortalidade dos tumores mais frequentes no mundo..... 25

Figura 2 – Distribuição geográfica da incidência de câncer de esôfago no mundo para ambos os sexos..... 26

Figura 3 – Gráfico representando as taxas de incidência e mortalidade de câncer de esôfago ajustadas por idade, sexo e região mundial..... 27

Figura 4 – Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer de esôfago por 100 mil indivíduos, estimadas para o ano de 2014..... 28

Figura 5 – História natural do CEE. Progressão de CEE ao longo do tempo e os diferentes momentos de intervenção para a prevenção e o diagnóstico da doença..... 30

Figura 6 – Exemplo de composição de diferentes subunidades dos receptores colinérgicos nicotínicos e a estrutura detalhada da subunidade α que interage com o ligante..... 32

Figura 7 – Composição das subunidades dos subtipos de receptores colinérgicos nicotínicos musculares e neuronais..... 33

Figura 8 – Esquema ilustrativo das diversas funções de CHRNA7 homomérico e CHRNA4B2 heteromérico..... 35

Figura 9 – Representação simplificada das etapas iniciais da sinalização via CHRNs mediante interação com seus agonistas..... 36

Figura 10 – Cascatas de sinalização envolvidas na proliferação celular, inibição apoptótica, migração e angiogênese mediante ativação dos CHRNs..... 37

Figura 11 – Esquema representativo do metabolismo da nicotina em que gera metabólitos com alta afinidade ao receptor colinérgico nicotínico..... 38

Figura 12 – Curva de dissociação da PCRq para o gene da subunidade *CHRNA7*..... 50

Figura 13 – Gráfico de detecção de fluorescência de PCR em tempo real..... 51

Figura 14 – Curva padrão de expressão do gene da subunidade *CHRNA7* utilizando diluição seriada de cDNA da linhagem celular A549..... 52

Figura 15 – Curvas de dissociação da curva-padrão e das amostras para a expressão da subunidade α1 e os valores de C_T encontrados para as amostras de esôfago saudável dos três terços e do controle positivo, a linhagem U-

251..... 60
Figura 16 – Curvas de dissociação da curva-padrão e das amostras para a expressão da subunidade α4 e os valores de C_T encontrados para as amostras de esôfago saudável dos três terços e do controle positivo, a linhagem TE-1. 60
Figura 17 – Curvas de dissociação da curva-padrão e das amostras para a expressão da subunidade α9 e os valores de C_T encontrados para as amostras de esôfago saudável dos três terços e do controle positivo, a linhagem U-251..... 61
Figura 18 – Curvas de dissociação da curva-padrão e das amostras para a expressão da subunidade α10 e os valores de C_T encontrados para as amostras de esôfago saudável dos três terços e do controle positivo, a linhagem U-251..... 61
Figura 19 – Comparação da expressão de *CHRNA3* entre os três terços de esôfago saudável..... 63
Figura 20 – Comparação de expressão de *CHRNA3* de acordo com o gênero, tabagismo, etilismo e os dois fatores de risco associados nos três terços de esôfago saudável..... 64
Figura 21 – Comparação da expressão de *CHRNA5* entre os três terços de esôfago saudável..... 65
Figura 22 – Comparação de expressão de *CHRNA5* de acordo com o gênero, tabagismo, etilismo e os dois fatores de risco associados nos três terços de esôfago saudável..... 66
Figura 23 – Comparação da expressão de *CHRNA7* entre os três terços de esôfago saudável..... 67
Figura 24 – Comparação de expressão de *CHRNA7* de acordo com o gênero, tabagismo, etilismo e os dois fatores de risco associados nos três terços de esôfago saudável..... 68
Figura 25 – Comparação da expressão de *CHRNB4* entre os três terços de esôfago saudável..... 69
Figura 26 – Comparação de expressão de *CHRNB4* de acordo com o gênero, tabagismo, etilismo e os dois fatores de risco associados nos três terços de esôfago saudável..... 70
Figura 27 – Análise da expressão gênica de *CHRNA3* em amostras de esôfago de

pacientes com CEE..... 75
Figura 28 – Comparação da expressão de *CHRNA3* entre o total de indivíduos, indivíduos não tabagistas e não etilistas, indivíduos tabagistas e etilistas de esôfago saudável e pacientes com CEE..... 76
Figura 29 – Análise da expressão gênica de *CHRNA5* em amostras de esôfago de pacientes com CEE..... 78
Figura 30 – Comparação da expressão de *CHRNA5* entre o total de indivíduos, indivíduos não tabagistas e não etilistas, indivíduos tabagistas e etilistas de esôfago saudável e pacientes com CEE..... 79
Figura 31 – Curva de Kaplan-Meier apresentando a sobrevida dos pacientes com CEE em relação à expressão de *CHRNA5*..... 81
Figura 32 – Curva ROC exibindo o poder discriminativo entre o epitélio tumoral e a mucosa normal adjacente ao tumor utilizando como base valores de expressão de *CHRNA5*..... 81
Figura 33 – Análise da expressão gênica de *CHRNA7* em amostras de esôfago de pacientes com CEE..... 82
Figura 34 – Comparação da expressão de *CHRNA7* entre o total de indivíduos, indivíduos não tabagistas e não etilistas, indivíduos tabagistas e etilistas de esôfago saudável e pacientes com CEE..... 83
Figura 35 – Curva de Kaplan-Meier apresentando a sobrevida dos pacientes com CEE em relação à expressão de *CHRNA7*..... 85
Figura 36 – Curva ROC exibindo o poder discriminativo entre o epitélio tumoral e a mucosa normal adjacente ao tumor utilizando como base valores de expressão de *CHRNA7*..... 85
Figura 37 – Análise da expressão gênica de *CHRNB4* em amostras de esôfago de pacientes com CEE..... 86
Figura 38 – Comparação da expressão de *CHRNB4* entre o total de indivíduos, indivíduos não tabagistas e não etilistas, indivíduos tabagistas e etilistas de esôfago saudável e pacientes com CEE..... 87
Figura 39 – Perfil de expressão gênica das subunidades de *CHRNs* em linhagens de esôfago humano comparadas com as amostras de esôfago de indivíduos saudáveis..... 91
Figura 40 – Sobrevivência celular após tratamento com nicotina nas doses de 1 µM,

10 µM, 100 µM por 72h das linhagens celulares..... 92
Figura 41 – Comparação da expressão das diferentes subunidades de *CHRNs* frente ao tratamento com nicotina nas doses de 1 µM, 10 µM, 100 µM e o controle por 72h na linhagem TE-1..... 93
Figura 42 – Comparação da expressão das diferentes subunidades de *CHRNs* frente ao tratamento com nicotina nas doses de 1 µM, 10 µM, 100 µM e o controle por 72h na linhagem TE-11..... 94
Figura 43 – Sobrevivência celular após tratamento com etanol nas doses de 50 mM (0,2%), 100 mM (0,4%), 200 mM (0,8%) por 96h das linhagens celulares..... 95
Figura 44 – Comparação da expressão das diferentes subunidades de *CHRNs* frente ao tratamento com etanol nas doses de 50 mM (0,2%), 100 mM (0,4%), 200 mM (0,8%) e o controle por 96h na linhagem TE-1..... 96
Figura 45 – Comparação da expressão das diferentes subunidades de *CHRNs* frente ao tratamento com etanol nas doses de 50 mM (0,2%), 100 mM (0,4%), 200 mM (0,8%) e o controle por 96h na linhagem TE-11..... 97

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sequências de oligonucleotídeos utilizadas para amplificação dos genes das subunidades de *CHRNs* e o *GAPDH* (gene - referência)..... 48

Quadro 2 – Volume de cada componente do mix para realização da PCR_q para expressão de cada subunidade de *CHRNs* avaliada e do gene-referência, *GAPDH*..... 49

Quadro 3 – Condições da reação de amplificação para *CHRNs* e para *GAPDH*..... 49

Quadro 4 – Resultados da expressão de *CHRNs* nas amostras de esôfago de indivíduos saudáveis..... 72

Quadro 5 – Análise de expressão de *CHRNs* nas amostras de esôfagos de indivíduos saudáveis e de pacientes com CEE..... 90

Quadro 6 – Análise de expressão de *CHRNs* nas amostras de esôfago humano e nas linhagens de esôfago derivadas de CEE frente ao tratamento com nicotina ou etanol..... 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Expressão de diferentes subunidades de CHRNs em células não-neuronais em humanos..... 34

Tabela 2 – Expressão de diferentes subunidades de CHRNs em diferentes tipos tumorais..... 39

Tabela 3 – Principais publicações associando o tabagismo e o etilismo com a regulação da expressão dos *CHRNs* em diversos tipos celulares..... 41

Tabela 4 – Características das linhagens TE-1 e TE-11 e a capacidade tumorigênica em camundongos..... 53

Tabela 5 – Caracterização dos indivíduos saudáveis incluídos nesse estudo de acordo com gênero, tabagismo e etilismo..... 59

Tabela 6 – Associação entre a expressão de *CHRNA3* com a idade nos três terços avaliados..... 63

Tabela 7 – Associação entre a expressão de *CHRNA5* com a idade nos três terços avaliados..... 65

Tabela 8 – Associação entre a expressão de *CHRNA7* com a idade nos três terços avaliados..... 67

Tabela 9 – Associação entre a expressão de *CHRNB4* com a idade nos três terços avaliados..... 69

Tabela 10 – Matriz de correlação entre a expressão gênica de *CHRNs* no terço superior de esôfago saudável..... 71

Tabela 11 – Matriz de correlação entre a expressão gênica de *CHRNs* no terço médio de esôfago saudável..... 71

Tabela 12 – Matriz de correlação entre a expressão gênica de *CHRNs* no terço inferior de esôfago saudável..... 71

Tabela 13 – Características clínico-patológicas dos pacientes com CEE incluídos nesse estudo..... 74

Tabela 14 – Associação da expressão de *CHRNA3* no *Fold Change* com os dados clínico-patológicos dos pacientes com CEE..... 77

Tabela 15 – Associação da expressão de *CHRNA5* no *Fold Change* com os dados clínico-patológicos dos pacientes com CEE..... 80

Tabela 16 – Associação da expressão de *CHRNA7* no *Fold Change* com os dados

clínico-patológicos dos pacientes com CEE..... 84
Tabela 17 – Associação da expressão de *CHRNB4* no *Fold Change* com os dados clínico-patológicos dos pacientes com CEE..... 88
Tabela 18 – Matriz de correlação entre a expressão gênica das subunidades de *CHRNs* no tecido normal adjacente ao tumor..... 89
Tabela 19 – Matriz de correlação entre o *Fold Change* de expressão gênica das subunidades de *CHRNs* no tecido tumoral..... 89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549	Linhagem celular derivada de adenocarcinoma de pulmão
AA	Ácido aracdônico
Ach	Acetilcolina
ADE	Adenocarcinoma de esôfago
AKT	Proteína quinase B (PKB)
ASR (W)	Taxa ajustada por idade
BNT	Banco Nacional de Tumores – INCA
CDC	Ciclo de Divisão Celular
cDNA	DNA complementar
CaMKII	Proteína quinase II dependente de Ca^{+2}/Calmodulina
CE	Câncer de Esôfago
CEE	Carcinoma epidermóide de esôfago
CEP – HUPE	Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto
CHRNs	Receptores Colinérgicos Nicotínicos
COOH	Extremidade carboxi-terminal
C_T	Ciclo de threshold
Curva ROC	Receiver Operating Characteristic – eficiência do operador de recepção de sinais
Cyc D/E	Ciclina D ou E
CYP450	Citocromo P450
CYP2A6	Citocromo P450 2A6
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
DIPAT	Divisão de Patologia – INCA
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Ditiotreitol – molécula redutor
EC	Câncer de Esôfago
E2F	Fator de transcrição em eucariotos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético – agente quelante

EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ESCC	Esophageal squamous cell carcinoma
ETOH	Etanol
FC	*Fold Change*
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HET-1A	Linhagem celular de esôfago normal imortalizada com SV40
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
HUVEC	Célula endotelial da veia do cordão umbilical
IARC	International Agency for Research on Cancer (Agência Nacional de Pesquisa em Câncer)
IC	Intervalo de confiança
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JAK2	Proteína quinase Janus 2
JNK	Proteína quinase n-terminal JUN
KYSE510	Linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago
M1-M4	Quatro domínios transmembranares hidrofóbicos
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEK	MAPK quinase (proteína quinase ativada por mitógeno)
Meio DMEM	Meio Dulbecco MEM - É uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e outros componentes essenciais para o crescimento celular
Meio DMEM/F12	Meio Dulbecco MEM com a mistura de nutriente F-12
Meio RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute – É um meio contendo uma série de sais, aminoácidos e outros componentes essenciais para o crescimento celular
mPTP	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NH_2	Extremidade amino-terminal
NIC	Nicotina
NNK	4-metilnitrosamina-1,3-piridil-1butanona
NNN	N-nitrosonornicotina

NSCLC	Câncer de pulmão de não pequenas células
OE-21	Linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Sítio de fosforilação para quinases
p70S6K	Proteína quinase serina/treonina
PBS	Solução tampão fosfato-salino
PCRq	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PPTPs	Fosfotirosinas fosfatases associadas ao SRC
Ras	GTPases monoméricas
Raf	MAP-quinase-quinase-quinase (MAPKKK)
RB	Proteína retinoblastoma
RLT	Tampão de Lise celular contendo guanidina tiocianato
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
rRNA	RNA ribossomal
RPE	Tampão no qual é adicional etanol para uso
RT	Reação de transcrição reversa
RW1	Tampão contendo sais de guanidina e etanol
SCLC	Câncer de pulmão de pequenas células
SFB	Soro Fetal Bovino
SFK	Proteína quinase da família SRC
SNP	Polimorfismo de base única
SRC	Proteína tirosina quinase proto-oncogene
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TE-1	Linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago
TE-11	Linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago
TE-13	Linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago
TNFα	Fator alfa de necrose tumoral
U-251	Linhagem celular derivada de glioblastoma
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Vegf	Fator de crescimento endotelial vascular
VOCC	Canais iônicos de cálcio voltagem dependentes
XIAP	Inibidor ligado ao X de proteína de apoptose
YAP	Fator de transcrição chave da via do hipotálamo em mamíferos

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
Na^{+}	Sódio
Ca^{+2}	Cálcio
K^{+}	Potássio
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
ε	Epsilon
γ	Gamma
µM/L	Micromolar/litro
h	Hora
nmol/L	Nanomolar/litro
nM	Nanomolar
µM	Micromolar
mM	Milimolar
mg	Miligrama
µL	Microlitro
mL	Mililitro
rpm	Rotação por minuto
°C	Grau Celsius
x g	Força centrífuga relativa cuja unidade de medida é grama
s	Segundo
min	Minuto
nm	Nanômetro
µg	Micrograma
ng	Nanograma
M	Molar
U	Unidade
CO_2	Dióxido de carbono
Mg^{+2}	Magnésio
<	Menor que

±	Mais ou menos
>	Maior que
≤	Menor e igual que
=	Igual
+	Mais

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	24
1	**OBJETIVOS**.....	43
1.1	**Geral**.....	43
1.2	**Específicos**	43
2	**MATERIAL E MÉTODOS**	44
2.1	**Amostras**.....	44
2.2	**Extração de RNA, quantificação, determinação da pureza e integridade das amostras de RNA**.....	45
2.2.1	Extração de RNA – Amostras de Esôfago de Indivíduos Saudáveis.....	45
2.2.2	Extração de RNA – Amostras de Esôfago de Paciente com CEE.....	45
2.2.3	Quantificação e determinação da pureza das amostras de RNA.....	46
2.3	**Reação de Transcrição Reversa (RT)**.....	47
2.4	**Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (PCRq)**.....	47
2.5	**Experimentos *in vitro***.....	52
2.5.1	Linhagens Celulares.....	52
2.5.2	Tratamentos com Nicotina ou Etanol.....	53
2.5.3	Contagem e Viabilidade Celular.....	55
2.6	**Extração de RNA das linhagens celulares**.....	55
2.7	**Tratamento com DNase I das linhagens celulares**.....	55
2.8	**Síntese de cDNA (RT) das linhagens celulares**.....	56
2.9	**Análises Estatísticas.**.....	56
3	**RESULTADOS**.....	58
3.1	**Análise de expressão de *CHRNs* nas amostras de esôfago de indivíduos saudáveis**.....	58
3.1.1	Caracterização dos indivíduos saudáveis.....	58
3.1.2	Análise da expressão das subunidades de *CHRNs* em indivíduos saudáveis.....	59
3.2	**Análise de expressão de *CHRNs* nas amostras de esôfago de pacientes com CEE**.....	73
3.2.1	Caracterização dos pacientes com CEE incluídos no estudo.....	73
3.2.2	Análise da expressão das subunidades de *CHRNs*.....	74
3.3	**Análise de expressão gênica das subunidades dos *CHRNs* em linhagens de**	

esôfago humano frente ao tratamento com nicotina ou etanol..... 91
3.3.1 Escolha das linhagens..... 91
3.3.2 Tratamento com Nicotina..... 92
3.3.2.1 Análise da expressão de *CHRNs* nas linhagens TE-1 e TE-11 frente ao tratamento com nicotina..... 92
3.3.3 Tratamento com Etanol..... 94
3.3.3.1 Análise da expressão de *CHRNs* nas linhagens TE-1 e TE-11 frente ao tratamento com etanol..... 95
4 **DISCUSSÃO**..... 99
CONCLUSÃO..... 108
PERSPECTIVAS..... 110
REFERÊNCIAS..... 111
APÊNDICE A – Termo de consentimento informado (HUPE/UERJ)..... 122
APÊNDICE B – Questionário sobre hábitos (HUPE/UERJ)..... 123
APÊNDICE C - Termo de consentimento informado (INCA)..... 135
APÊNDICE D – Prontuários – INCA..... 141
ANEXO A – Carta de aprovação do projeto sob o número 416 (CEP/HUPE)..... 143
ANEXO B – Carta de aprovação do projeto sob o número 116/11 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA..... 144

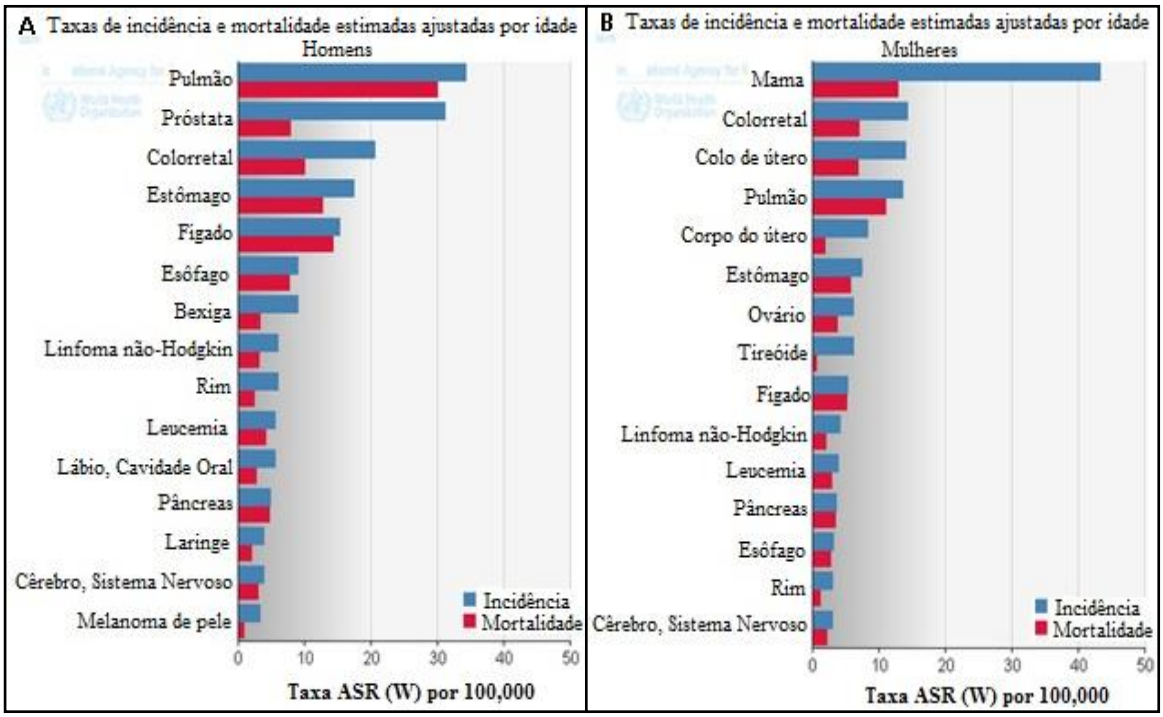
INTRODUÇÃO

Câncer de esôfago

O câncer de esôfago (CE) é responsável por 7% de todas as neoplasias malignas do trato gastrointestinal, além de ser o oitavo tipo de câncer mais comum em todo o mundo e a sexta causa mais comum de morte por câncer (Lehrbach et al., 2003; Kuwano et al., 2005; Ferlay et al., 2013), sendo a incidência mundial de CE em homens mais que o dobro da incidência em mulheres (razão de 2,4: 1) (Ferlay et al., 2013). De acordo com os dados da GLOBOCAN, o CE é a sexta neoplasia mais incidente entre homens e a décima terceira entre mulheres no mundo (Figura 1), estimando-se 323 mil novos casos e 281 mil mortes por essa neoplasia entre homens e 133 mil novos casos e 119 mil mortes entre mulheres para o ano de 2012. Além disso, o CE apresenta taxas de incidência e mortalidade muito próximas, sendo a razão entre mortalidade e incidência anual de 0,87, demonstrando sua alta agressividade e letalidade (Ferlay et al., 2013).

Menos de 20% dos pacientes acometidos por esta doença têm uma sobrevida maior que cinco anos após seu diagnóstico (Cohen e Ajani, 2011). Este fato é consequência do diagnóstico tardio, uma vez que os sintomas só aparecem em estádios bem avançados da doença. Somente quando 50 a 75% da luz esofágica está obstruída, o paciente apresenta disfagia (dificuldade de engolir), sendo normalmente o primeiro sintoma apresentado (Stein et al, 2001), o que resulta na ineficácia do tratamento (McLarty et al., 1997; Allen et al., 1997; Ribeiro Pinto et al., 2003).

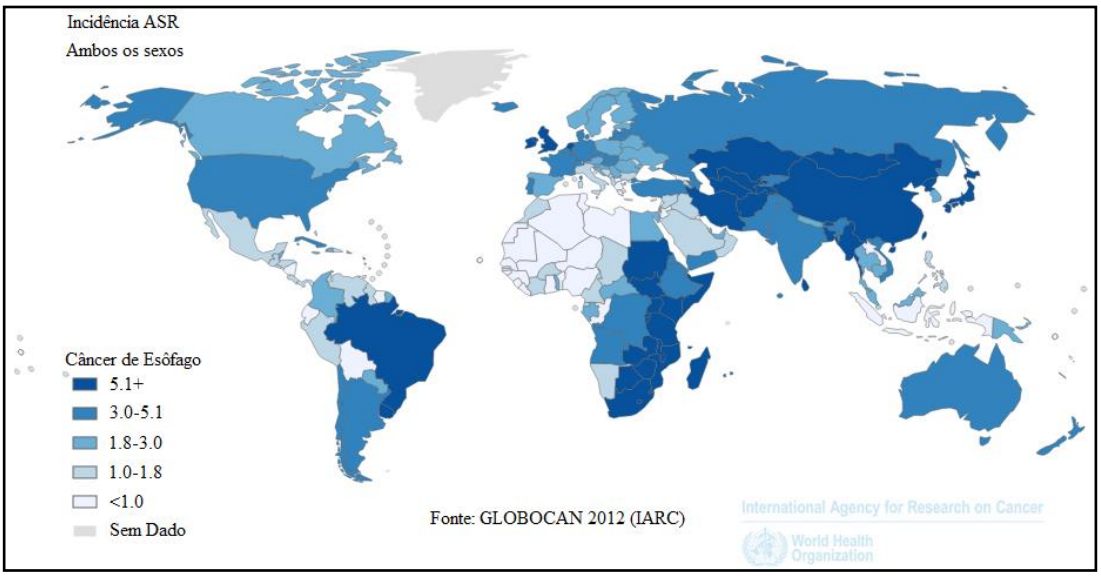
Figura 1: Representação das taxas estimadas, ajustadas por idade, de incidência e mortalidade dos tumores mais frequentes no mundo.



Legenda: A - taxas de incidência e mortalidade para indivíduos do sexo masculino. B - taxas de incidência e mortalidade para indivíduos do sexo feminino. ASR (W): Taxa ajustada por idade.
Fonte: Adaptado de GLOBOCAN 2012 – IARC.

O CE apresenta uma ampla distribuição geográfica quanto à sua incidência, com regiões de alto risco de desenvolvimento do tumor bem próximas a regiões de baixo risco (Figura 2) (Eslick, 2009). Isso é consequência da forte influência de fatores sócio-ambientais no desenvolvimento do CE (Smeds et al., 2002), sendo os países em desenvolvimento as principais regiões acometidas pelo CE, com 83% dos casos e 86% dos óbitos decorrentes da doença (Parkin et al., 2005; Eslick, 2009; Jemal et al., 2011).

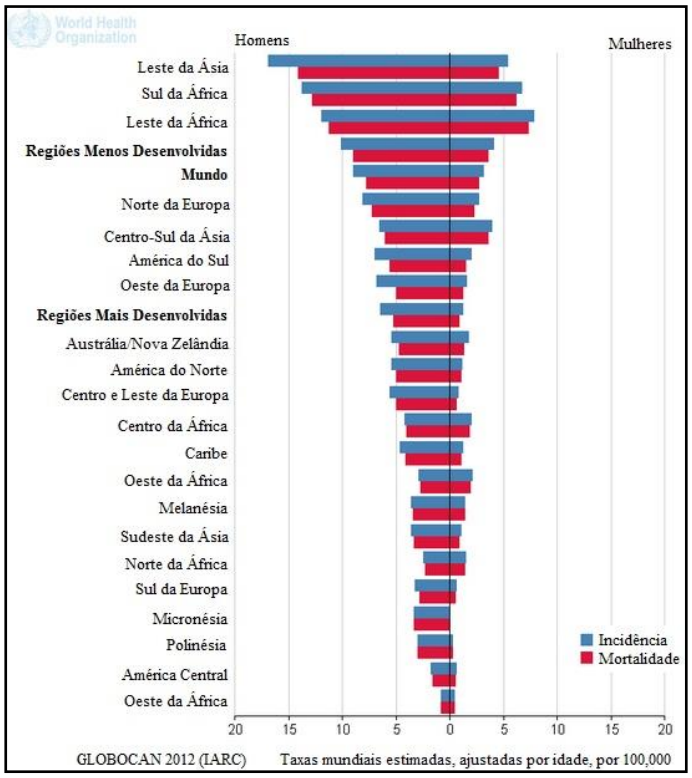
Figura 2: Distribuição geográfica da incidência de câncer de esôfago no mundo para ambos os sexos.



Legenda: Azul mais escuro representa regiões de alta incidência e azul mais claro, regiões de baixa incidência. ASR: Taxa ajustada por idade.
Fonte: Adaptado de GLOBOCAN 2012 – IARC.

As taxas de incidência variam até 16 vezes entre regiões de alta e baixa incidência. As regiões de alta incidência são regiões como o sudeste da África (Quênia), leste da Ásia (do norte do Irã até a China, região conhecida como cinturão asiático do câncer de esôfago), no sul da América do Sul (Brasil e Uruguai, por exemplo), alguns países desenvolvidos (França e Inglaterra) e regiões de baixa incidência são encontradas, por exemplo, na América Central (Parkin et al., 2005; Eslick, 2009; Jemal et al., 2011) (Figura 3).

Figura 3: Gráfico representando as taxas de incidência e mortalidade de câncer de esôfago ajustadas por idade, sexo e região mundial.

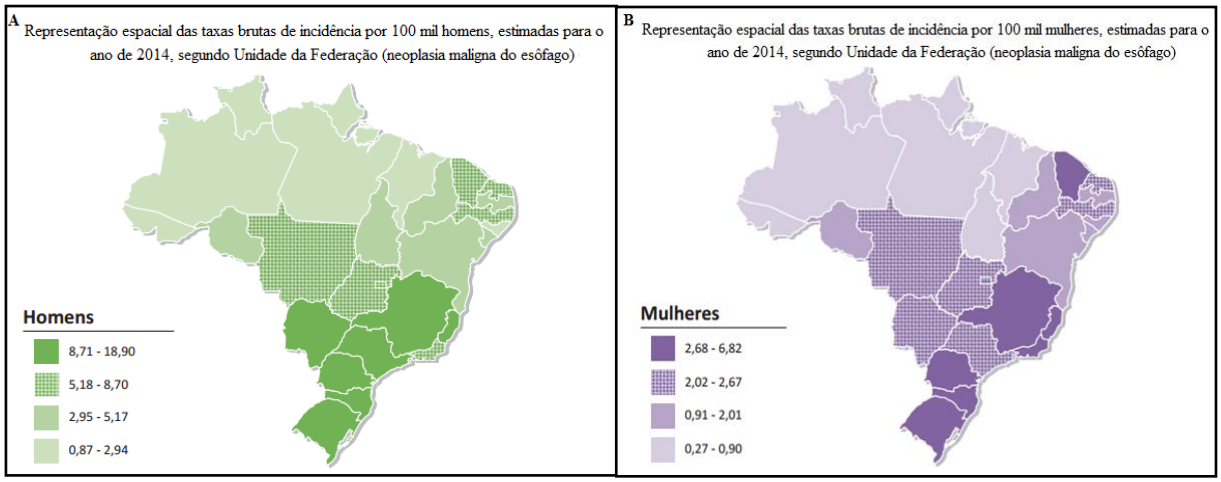


Fonte: Adaptado de GLOBOCAN 2012 – IARC.

Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o ano de 2014, no Brasil, eram esperados 8.010 novos casos de câncer de esôfago em homens e 2.770 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 8,18 novos casos a cada 100 mil homens e 2,70 a cada 100 mil mulheres.

No Brasil, o CE é o sexto tipo de câncer mais incidente entre os homens e o décimo quinto em incidência entre as mulheres. Além disso, o câncer de esôfago em homens é o quinto mais frequente na região Sul (15,97/100 mil), o sexto na região Centro-Oeste (6,88/ 100 mil), o sétimo nas regiões Sudeste (9,45/ 100 mil) e Nordeste (4,50/100 mil), e o 11º na região Norte (1,88/100 mil). Para as mulheres, é o 13º mais frequente nas regiões Sul (5,27/100 mil), Sudeste (2,86/100 mil) e Nordeste (1,80/100 mil). Já nas regiões Centro-Oeste (2,39/100 mil) e Norte (0,67/100 mil), é o 14º (Figura 4) (INCA, 2014).

Figura 4: Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer de esôfago por 100 mil indivíduos, estimadas para o ano de 2014.



Legenda: A - Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer de esôfago em indivíduos do sexo masculino. B - Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer de esôfago em indivíduos do sexo feminino. Os tons mais escuros de verde e roxo representam as regiões de maior incidência enquanto que os tons mais claros, regiões de menor incidência.

Fonte: INCA, 2014.

O câncer de esôfago apresenta dois subtipos histológicos principais, o adenocarcinoma de esôfago (ADE) e o carcinoma epidermóide de esôfago (CEE). Esses subtipos diferem em características histopatológicas e clínicas, etiologia, distribuição geográfica, população acometida, entre outros aspectos (Queiroga e Pernambuco, 2006; Hongo, 2009).

O ADE está intimamente relacionado a regiões desenvolvidas, como por exemplo, Europa Ocidental e os Estados Unidos, devido aos fatores de risco associados. Porém, recentemente, tem havido um rápido crescimento da sua incidência em países em desenvolvimento, devido principalmente às mudanças nos hábitos. Dentre eles, o consumo de alimentos ricos em gordura e o aumento da média de peso dessas populações, caracterizando obesidade, parecem ser os mais relevantes (Falk et al,. 2009). O principal fator de risco para o desenvolvimento do ADE é o desenvolvimento do esôfago de Barret especializado ou intestinal, uma condição pré-maligna na qual o epitélio normal do esôfago é substituído por um epitélio metaplásico colunar (Spechler et al., 1994). O esôfago de Barret se origina em pacientes que sofrem de refluxo gastro-esofágico crônico, condição que aumenta em mais de 100 vezes a chance de desenvolver ADE (Thomas e Sobin, 1995). O tabagismo foi identificado como fator de risco para o ADE, mas o etilismo mostrou estar pouco relacionado à gênese da doença (Toh et al., 2010). O ADE acomete principalmente o terço inferior do

esôfago, enquanto o CEE ocorre mais frequentemente em células escamosas que revestem os terços superior e médio (Enzinger e Mayer, 2003).

O CEE é o subtipo histológico de CE mais frequente, correspondendo a mais de 90% dos casos de câncer de esôfago no mundo. O CEE apresenta sua maior incidência em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde este também é o subtipo mais frequente (Parkin et al., 2005; INCA, 2014). Além disso, apresenta uma grande variação da incidência de acordo com a distribuição geográfica, sendo possível encontrar áreas de alto e baixo risco localizadas em regiões próximas (Smeds et al., 2002). As áreas de maior incidência deste tipo de câncer são: China (21/100.000 habitantes), América do sul (13/100.000 habitantes), Oeste Europeu (11/100.000 habitantes), África do sul (10/100.000 habitantes), Japão (9/100.000 habitantes) e algumas regiões da antiga União Soviética (8/100.000 habitantes). Dentro destas grandes áreas são identificadas regiões menores, nas quais a incidência de CEE 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, certas províncias da França (Pickens e Orringer, 2003) e região sul do Brasil (Corley e Buffler, 2001).

Diversos estudos epidemiológicos apontam que o etilismo e o tabagismo são os principais fatores de risco para o desenvolvimento de CEE. Em países ocidentais, o consumo concomitante desses dois fatores representa um risco multiplicador (IARC, 1986; Castellsagué et al., 1999). Além disso, há a sugestão de que o fumo tenha um papel importante tanto na iniciação quanto na promoção do tumor, enquanto o álcool teria um papel mais relevante na promoção. Isso porque após 10 anos de abstinência de álcool o risco retorna aos valores dos abstêmios, enquanto após 10 anos sem tabaco o risco diminui apenas 50% (Castellsagué et al., 1999).

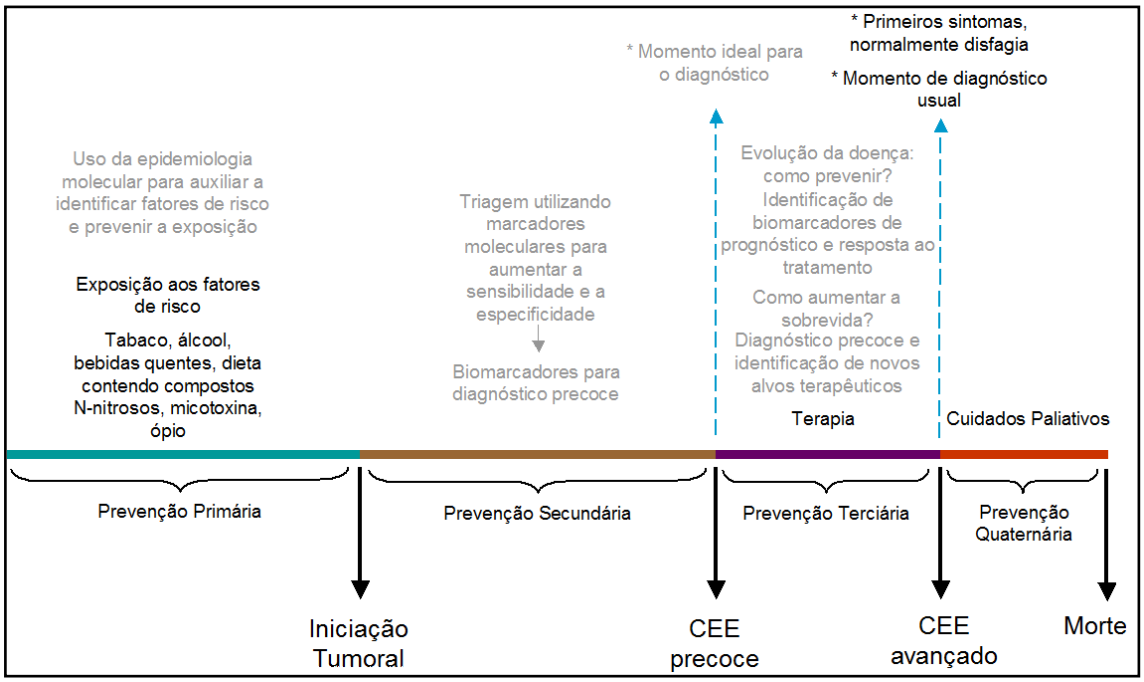
Todavia, há outros fatores que contribuem para a gênese do CEE. A contaminação de alimentos por nitrosaminas, potentes carcinógenos que apresentam tropismo pelo esôfago (Lijinsky, 1992), a desnutrição e o consumo de chá quente estão envolvidos na etiologia deste câncer em alguns países, como a China e a Índia. No Irã, além da desnutrição e da ingestão de chá quente, o consumo de ópio é um importante fator de risco para o desenvolvimento de CEE. No Japão, apenas o consumo de chá quente parece ter relação direta (Tuyns, 1979; Sepehr et al., 2001). Já na região sul do Brasil, área de alta incidência, além do consumo de bebidas alcoólicas e tabaco, há também o consumo do “chimarrão” (chá da erva mate consumido em torno de 70°C), que vem sendo associado ao desenvolvimento do CEE (Castellsagué et al., 1999; 2000).

História Natural do CEE

A história natural proposta para o desenvolvimento de CEE se baseia no seguinte modelo: depois de uma exposição de longo prazo do indivíduo aos agentes etiológicos, ocorre transformação neoplásica na mucosa esofágica que é raramente detectada nos estádios iniciais. Quando a terapia curativa é possível, a cirurgia (uma mucosectomia para excisão do tumor *in situ*) é o tratamento primário (Chen et al., 1999). Porém, na maioria dos pacientes, o tumor é detectado em estádios avançados, quando a quimiorradioterapia seguida ou não por esofagectomia são os procedimentos empregados. Entretanto, a maioria dos pacientes não apresenta uma melhora da sobrevida a longo prazo (da Costa et al., 2013).

Intervenções podem ocorrer como prevenção primária, através de identificação e diminuição da exposição aos principais fatores etiológicos (etilismo e tabagismo), enquanto que a prevenção secundária pode ocorrer por meio de programas de rastreamento. A prevenção terciária ocorreria através da detecção CEE em estágios iniciais e intervenção curativa, como a esofagectomia, e a quaternária permitiria ao paciente uma melhor qualidade de vida, com tratamentos paliativos (Figura 5) (da Costa et al., 2013).

Figura 5: História natural do CEE. Progressão de CEE ao longo do tempo e os diferentes momentos de intervenção para a prevenção e o diagnóstico da doença.



Fonte: Adaptado de da Costa et al., 2013.

Conforme supracitado, a intervenção primária pode ocorrer através de um melhor entendimento e identificação de fatores etiológicos associados ao desenvolvimento de CEE, principalmente o tabagismo e o etilismo. No ocidente, a alta incidência de CEE entre homens é em geral de 3 a 10 vezes maior que em mulheres, provavelmente devido aos hábitos de ingerir bebidas alcoólicas e de fumar serem mais prevalente no sexo masculino. No entanto, há um crescente aumento do hábito de fumar entre o sexo feminino, promovendo um aumento no número de casos de câncer de esôfago entre as mulheres ocidentais, à semelhança do que vem acontecendo com o câncer de pulmão (INCA, 2009).

O consumo do tabaco é uma das principais fontes de exposição a agentes cancerígenos conhecidos e está intimamente relacionado às mortes por vários tipos de câncer. A fumaça do tabaco contém potentes carcinógenos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e metabólitos derivados da nicotina como 4-metilnitrosamina-1,3-piridil-1butanona (NNK) e N-nitrosonornicotina (NNN) (Hecht e Hoffmann,1988). Essas nitrosaminas formam adutos no DNA que podem levar ao aparecimento de mutações e, consequentemente, levar ao desenvolvimento de um tumor. Além disso, esses componentes do tabaco podem ainda atuar via receptores colinérgicos nicotínicos (CHRNs) que ativam vias de sinalização celular fundamentais para a progressão do câncer, como por exemplo, proliferação celular, angiogênese, inibição da apoptose e migração tumoral (Lee et al., 2011).

Receptores colinérgicos nicotínicos

Os receptores colinérgicos nicotínicos (CHRNs) são representantes clássicos da superfamília de proteínas ligantes de canais iônicos que são responsáveis por transmissões sinápticas rápidas e medeiam o influxo de Na^{+} e Ca^{+2} e o efluxo de K^{+}. São compostos por cinco subunidades que podem ser homólogas (homopentâmeros) ou diferentes (heteropentâmeros) em torno de um canal iônico (Itier et al, 2001; Zouridakis, et al, 2009; Grando, 2014).

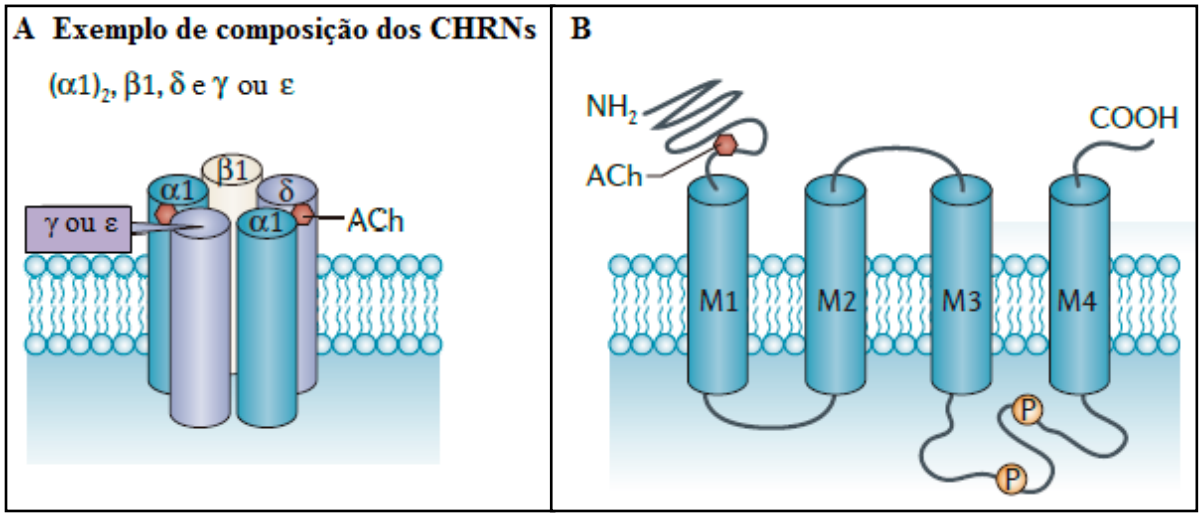
Os CHRNs possuem dois tipos de subunidades diferentes caracterizadas: α e β, sendo que nove tipos diferentes das subunidades α (α2 - α10) e três tipos da subunidade β (β2 – β4) já foram descritos. As subunidades α são sítios principais de ligação ao agonista com exceção da subunidade α5 que, junto com as subunidades β, são subunidades estruturais. Além disso,

as subunidades β regulam a taxa de ligação e dissociação de agonistas (Papke, 1993). Em humanos, já foram descritas 16 subunidades diferentes: α1-7 (α7 é seletiva para cálcio), α9-10, β1-4, δ, ε (adulto), γ (fetal) (Zouridakis, et al, 2009).

Subtipos dos CHRNs

Os CHRNs são pentâmeros compostos por diferentes subunidades, conforme supracitado, em que em cada subunidade tem quatro domínios transmembranares e estrutura topológica similar (Grando, 2014) (Figura 6). Os CHRNs encontram-se na membrana plasmática, tendo sido inicialmente identificados no sistema nervoso (gânglios autônomos e gânglios sensoriais e no sistema nervoso central) e em junções neuromusculares. Assim, são classificados nos subtipos neuronal e muscular, sendo que este último pode ainda estar presente em tecidos não neuronais ou tecidos não-musculares (Sobel et al., 1977; O'Brian et al., 1972; Karlin, 1974; Galzi et al, 1991).

Figura 6: Exemplo de composição de diferentes subunidades dos receptores colinérgicos nicotínicos e a estrutura detalhada da subunidade α que interage com o ligante.

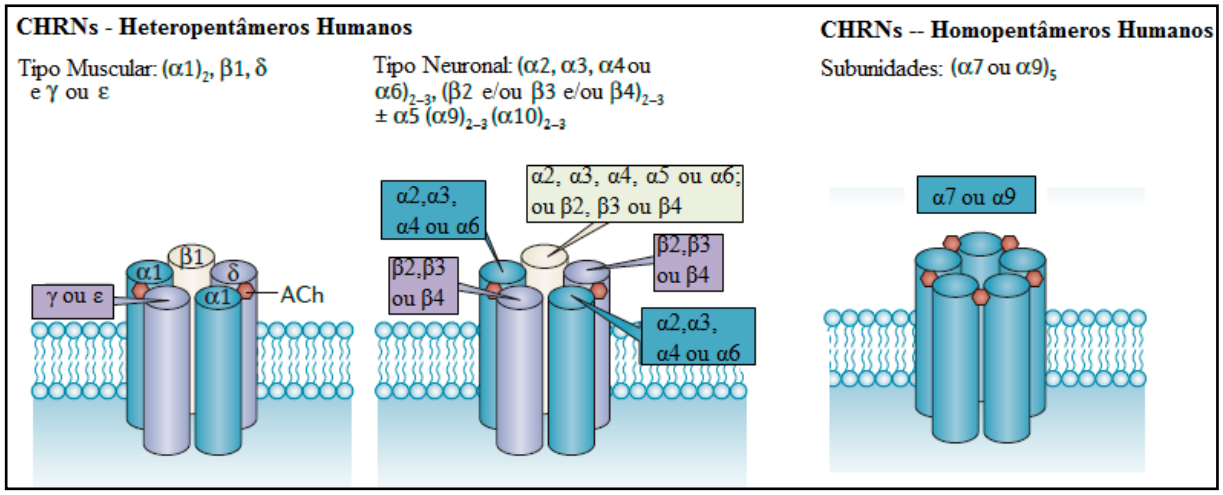


Legenda: A - Exemplo de composição das diferentes subunidades dos receptores colinérgicos nicotínicos. Os sítios de interação ao agonista estão localizados na interface entre duas subunidades. Além disso, há a subunidade estrutural não envolvida na interação com o ligante. B - Estrutura detalhada da subunidade α que interage com o ligante. Os quatro domínios transmembranares hidrofóbicos são designados M1-M4. O sítio de interação ao agonista está localizado na extremidade amino-terminal. Os sítios de fosforilação para as quinases estão representados como P. Ach: acetilcolina.

Fonte: Adaptado de Grando, 2014.

Os CHRNs do tipo neuronal, que, originalmente, acreditava-se serem expressos exclusivamente nos neurônios, podem ser compostos por cinco subunidades idênticas α7, α8 (não encontrado em humanos) ou α9 (CHRNs homoméricos), ou podem ainda ser constituídos por combinações das subunidades α2 até α6 ou α10 com as subunidades β2-β4 (CHRNs heteroméricos). As subunidades α7, α4 e β2 são predominantes em cérebro de mamíferos, sendo que os homopentâmeros α7 são os receptores mais abundantes. Já os CHRNs do tipo muscular podem ser compostos por combinações da subunidade α1 com as subunidades β1, γ e δ em músculos em desenvolvimento, sendo que a subunidade γ é substituída pela subunidade ε em músculos maduros (Conti-Tronconi, et al., 1994; Portugal e Gould, 2008; Zouridakis, et al, 2009). Ambas as famílias de CHRNs são expressas em células tumorais malignas (Wessler e Kirkpatrick, 2008). A Figura 7 apresenta os subtipos dos CHRNs.

Figura 7: Composição das subunidades dos subtipos de receptores colinérgicos nicotínicos musculares e neuronais.



Legenda: Os sítios de interação ao agonista estão localizados na interface entre duas subunidades e há a subunidade estrutural não envolvida na interação com o ligante.
Fonte: Adaptado de Grando, 2014.

Os CHRNs também estão presentes em tecidos não-neuronais. As subunidades α3,α5 e α7 são encontradas no epitélio brônquico (Maus et al., 1998; Zia et al., 1997); α4 em células epiteliais alveolares (Zia et al., 1997); α3, α5, α7, β2 e β4 em células pulmonares neuroendócrinas, carcinoma de pequenas células de pulmão (Song et al., 2003; Maneckjee e Minna, 1990; Quik et al., 1994; Plummer et al., 2005), queratinócitos da pele (Grando et al.,

1995), tecidos vasculares (Wang et al., 2001) e em linfócitos humanos (Hiemke et al., 1996) (Tabela 1).

Tabela 1: Expressão de diferentes subunidades de CHRNs em células não-neuronais em humanos.

Tabela 1

Subunidades de CHRNs expressas em células não-neuronais em humanos

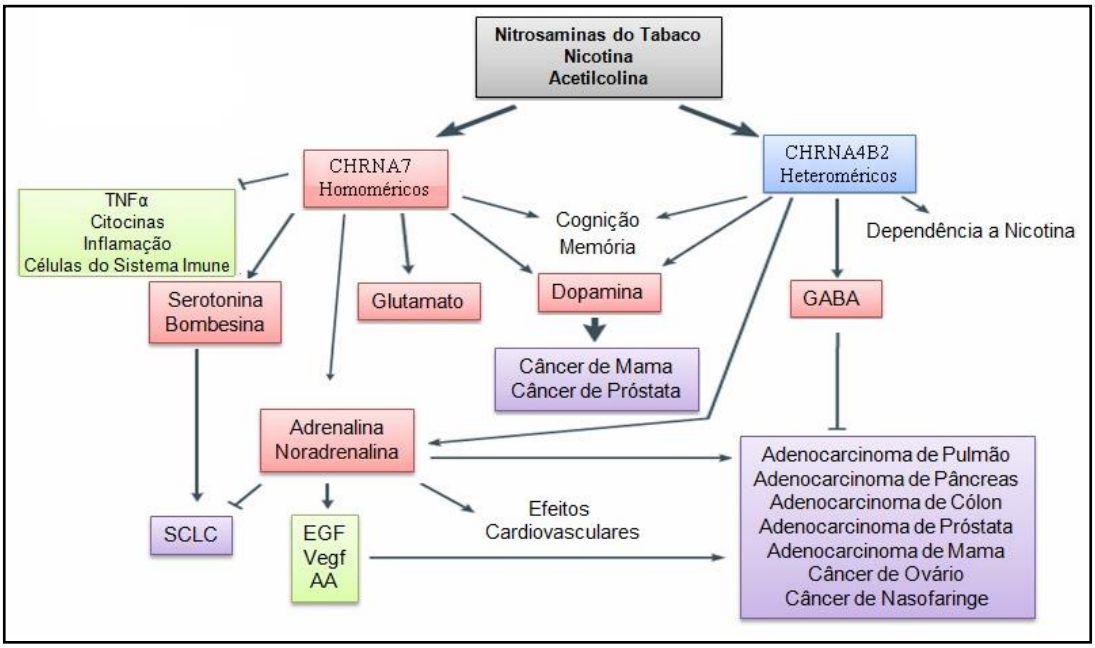
Tipo Celular	Subunidades Expressas
Células Endoteliais Vasculares	α3, α5, α7, β2-β4
Células Endoteliais da veia do cordão umbilical (HUVECs)	α3-α5, α7, α10, β2-β4
Células Epiteliais Brônquicas	α1, α3, α5 , α7, α9, α10, β1, β2, β4, δ, ε
Células Epiteliais de Vias Aéreas	α2, α4, α7, α9, α10, β2, β4
Queratinócitos (Oral e Pele)	α3, α5, α7, α9, α10, β1, β2, β4
Epitélio Esofágico	α3, α5, α7, β2
Astrócitos	α2-α5, α7, β2, β3
Urotélio	α2-α7, α9, α10
Linfócitos	α2, α3, α5, α7, α9, α10, β2, β4
Monócitos	α2, α5-α7, β2
Macrófagos	α1, α7, α10

Fonte: Adaptado de Arias, et al., 2009.

A principal função desses receptores é transmitir sinal em junções neuromusculares, além do sistema nervoso central e sistema nervoso periférico, e o neurotransmissor acetilcolina é o ligante fisiológico de todos os CHRNs (Wessler e Kirkpatrick, 2008). Entretanto, conforme citado anteriormente, componentes do tabaco como a nicotina e a NNK (4-metilnitrosamina-1,3-piridil-1butanona) também são agonistas de alta afinidade dos CHRNs (Schuller e Orloff, 1998).

A nicotina interage com a subunidade α dos CHRNs como agonista, mimetizando a acetilcolina (Lindstrom, 1996), apresentando maior afinidade pelo CHRNA4B2 do que por CHRNA7 (Gotti, Fornasari, Clementi, 1997). Em tabagistas, as funções biológicas de CHRNA7 são aumentadas enquanto que as funções de CHRNA4B2 são inibidas. Isso é extremamente interessante porque CHRNA7 regula respostas que estimulam as células tumorais enquanto CHRNA4B2 regula predominantemente ações inibitórias, resultando em um meio que provê suporte seletivo para o desenvolvimento e progressão do câncer *in vivo* (Schuller, 2009; Singh, Pillai,Chellappan, 2011) (Figura 8). Além da nicotina, a NNN se liga ao heteropentâmero CHRNαβ e a NNK ao CHRNA7, com 5000 vezes e 1300 vezes mais afinidade do que a nicotina, respectivamente (Schuller e Orloff, 1998; Arredondo, Chernyavsky, Grando, 2006).

Figura 8: Esquema ilustrativo das diversas funções de CHRNA7 homomérico e CHRNA4B2 heteromérico.



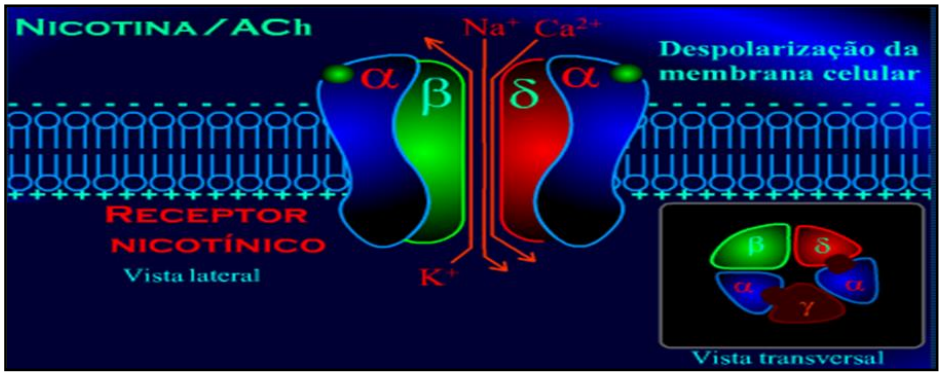
Legenda: AA: ácido aracdônico; GABA: Ácido gama-aminobutírico; EGF: fator de crescimento epidermal; SCLC: câncer de pulmão de pequenas células; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular.

Nota: Ambos os receptores estimulam a liberação de dopamina (neurotransmissor excitatório). CHRNA7 estimula a liberação de glutamato e serotonina como também o neuropeptídeo bombesina e neurotransmissores de estresse, noradrenalina e adrenalina. Essas substâncias estimulam o crescimento de diferentes tipos de câncer seja por ativação direta de vias de sinalização intracelular ou indiretamente pela regulação da liberação de EGF (fator de crescimento epidermal), VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e AA (ácido aracdônico). CHRNA7 medeia o controle colinérgico de células imune e de ações anti-inflamatórias. CHRNA4B2 já foi descrito como responsável pela dependência à nicotina e por estimular a liberação do neurotransmissor GABA. O GABA tem ação inibitória em funções do cérebro e função de supressor de tumor em vários tipos de câncer.

Fonte: Adaptado de Schuller, 2009.

A ligação do agonista, seja a acetilcolina ou os componentes do tabaco (nicotina ou as nitrosaminas), com o receptor através da subunidade α faz com que haja uma mudança conformacional desse receptor que resulta na abertura de canal iônico e o influxo de cátions como Na^+ e Ca^{2+} e o efluxo de K^+. Isso leva a uma despolarização da membrana celular, com a consequente abertura dos canais iônicos de cálcio voltagem-dependentes (VOCC), levando a um fluxo adicional de cálcio (Schuller, 2009) (Figura 9). O influxo de cálcio desencadeia a secreção de fatores mitogênicos e ativação das cascatas de sinalização envolvidas na proliferação celular, inibição apoptótica, migração e angiogênese (Schuller, 1994; Cattaneo et al., 1993; Schuller, 2009).

Figura 9: Representação simplificada das etapas iniciais da sinalização via CHRNs mediante interação com seus agonistas.



Fonte: Adaptado de Toxicologia – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, 2006/2007.

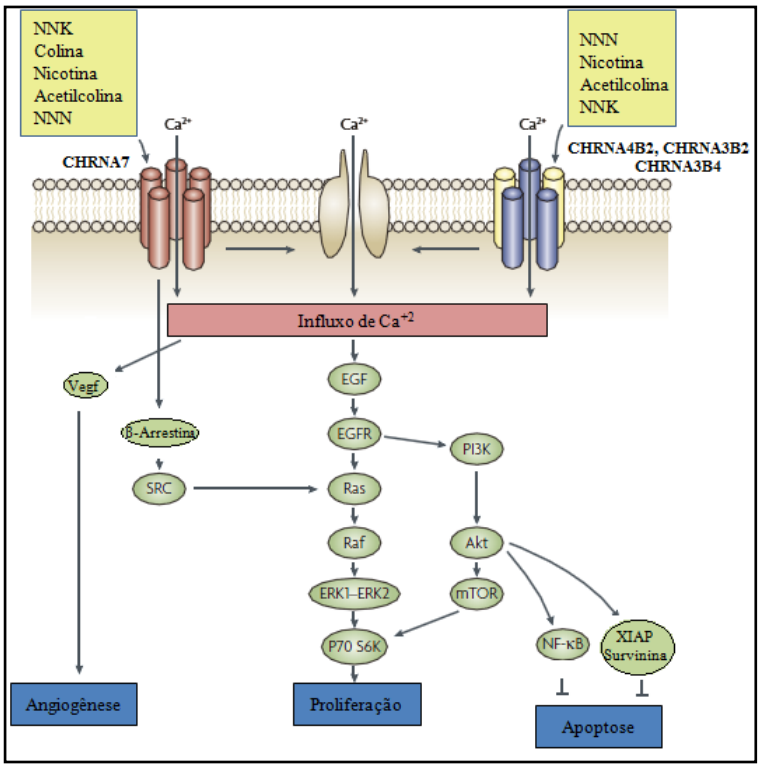
Vias de sinalização dos CHRNs

A ativação de CHRNs em células não-neuronais provoca fosforilação e desfosforilação de proteínas. Isso porque os CHRNs podem se associar fisicamente com proteínas quinases e fosfatases em complexos multiméricos. Por exemplo, JAK2 se liga ao CHRNA7 após a interação desse receptor com a nicotina, que leva à fosforilação e ativação de JAK2 e subsequente ativação de PI3K (Wu, Lee, Ho, 2011; de Jonge, et al., 2005; Kihara, et al., 2001). A subunidade α7 também pode se associar fisicamente e funcionalmente com quinases da família SRC (proteína tirosina quinase proto-oncogene) e as fosfotirosinas fosfatases associadas ao SRC (PPTPs) regulam a atividade de CHRNs, ativando e inibindo, respectivamente (Wang, et al., 2004). Um exemplo disso é a sinalização da β-arrestina que implica na proliferação celular induzida por nicotina (Dasgupta et al., 2006). Essa indução mediada por nicotina da proliferação celular envolve o recrutamento da β-arrestina ao CHRNA7 que leva à ativação de SRC. Isto, por sua vez, leva à ligação da quinase Raf com a proteína retinoblastoma (Rb), levando à fosforilação de Rb. A inativação de Rb por esta quinase leva à ativação da transcrição regulada por E2F (fator de transcrição em eucariotos) e a entrada na fase S do ciclo celular, promovendo a proliferação.

A Figura 10 é uma representação ilustrativa da ativação de algumas cascatas de sinalização mediante interação dos CHRNs com seu agonista. Conforme já mencionado, após interagir com seu agonista, há uma mudança conformacional do CHRN, que resulta na abertura de canal iônico e o influxo de íons, por exemplo, Ca^{2+}. Isso leva a uma despolarização da membrana celular, com a consequente abertura dos canais de cálcio

voltagem-dependentes. Esse influxo de cálcio adicional ativa a via de PI3K-AKT-mTOR, que resulta na proliferação celular e inibição da apoptose e a via de sinalização RAS-RAF-ERK, desencadeando proliferação celular. Há também a ativação de VEGF (fator de crescimento de endotélio vascular), desencadeando a angiogênese (Schuller, 2009; Improgo et al., 2011).

Figura 10: Cascatas de sinalização envolvidas na proliferação celular, inibição apoptótica, migração e angiogênese mediante ativação dos CHRNs.

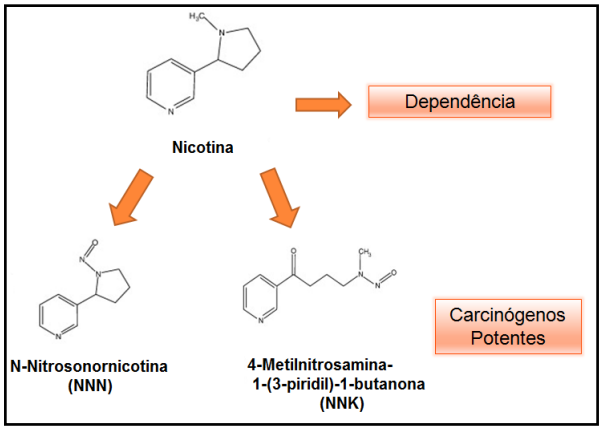


Fonte: Adaptado de Schuller, 2009.

CHRNs e o Câncer

De acordo com dados da literatura, um dos principais fatores ambientais relacionados ao câncer é o tabagismo. A nicotina presente no tabaco gera dependência via CHRNA4B2 (Picciotto et al., 1998; Tapper et al., 2004) e o seu metabolismo gera produtos como as NNN e as NNK, que são potentes carcinógenos (Figura 11).

Figura 11: Esquema representativo do metabolismo da nicotina em que gera metabólitos com alta afinidade ao receptor colinérgico nicotínico.



Fonte: Adaptado de Schuller, 2007.

Já foi relatado que CHRNs servem como mediadores centrais que, por vários estímulos, promovem a progressão do tumor (Schuller, 2009). Esses estímulos podem ativar numerosas vias de sinalização já vistas alteradas em câncer de pulmão e que podem estar na base da resistência desta doença aos tratamentos atualmente disponíveis. Isto pode indicar o mecanismo associado a uma menor taxa de sobrevida observada em pacientes que continuam a fumar durante a quimioterapia (Schuller, 2009).

A exposição só à nicotina não parece iniciar o câncer de pulmão, uma vez que nicotina age promovendo a tumorigênese depois que esta já foi iniciada (Schuller et al., 1995). Em câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC), a nicotina leva à liberação de EGF via CHRNA7, um fator de crescimento que se liga ao seu receptor (EGFR) e ativa a cascata Ras-Raf-ERK, uma via de transdução de sinal relacionada à proliferação celular (Dasgupta e Chellappan, 2006; Carlisle et al., 2007).

A progressão tumoral pode estar associada com a superexpressão de CHRNs, em que alguns subtipos de CHRNs são superexpressos seletivamente, independentemente do status de tabagismo do indivíduo, como a expressão de CHRNA7 em câncer de pulmão e CHRNA9 em câncer de mama. Além disso, a inibição da expressão de algumas subunidades (por exemplo, a subunidade α9 em linhagens de câncer de mama) atenua a proliferação celular induzida pela nicotina ou pelas nitrosaminas *in vitro* (Singh, Pillai, Chellappan, 2011; Wu, Lee, Ho, 2011).

Conforme supracitado, os CHRNs são expressos em diversos tumores (Improgo, Soll, Tapper, Gardner, 2013) (Tabela 2). Por exemplo, em câncer de pulmão já foi detectada a

expressão de diversas subunidades, em particular as subunidades α3, α5 e β4 (Improgo, et al., 2010).

Tabela 2: Expressão de diferentes subunidades de CHRNs em diferentes tipos tumorais.

Expressão de CHRNs em diferentes tipos celulares tumorais.		
Tipos de câncer	**Subunidades dos CHRNs**	**Referências**
Câncer Cervical	α5, α7, α9	Calleja-Macias et al., 2009
Câncer de Cólon	α7	Ye et al., 2004
Leucemia	α2, α3, α5, α6, α7, α9, β2, β4	Sato et al., 1999; Chernyavsky et al., 2009
Câncer de Pulmão (NSCLC)	α3, α4, α5, α6, α7, α9, β2, β4	West et al., 2003; Tsurutani et al., 2005; Lam et al.,2007; Improgo et al., 2010
Câncer de Pulmão (SCLC)	α3, α5, α7, α9, β2, β4	Codignola et al., 1994; Song et al., 2003; Improgo et al., 2010
Mesotelioma	α7	Trombino et al., 2004
Meduloblastoma	α7	Siegel e Lukas, 1988
Neuroblastoma	α3, β4	Lukas, 1993
Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço	α3, α5, α7	Carracedo, et al., 2007
Câncer de Mama	α9	Lee, et al., 2010

Fonte: Adaptado de Improgo, et al., 2013.

Além disso, já foram encontradas alterações de CHRNs em tumores. Paliwal e colaboradores, em 2010, demonstraram uma hipermetilação significativa e moderada da região promotora de *CHRNA3* e *CHRNB4* em câncer de pulmão, respectivamente, culminando somente no silenciamento gênico da subunidade α3. Além disso, já foi encontrada uma variante não sinônima em *CHRNA5* que confere um risco aumentado para o desenvolvimento do câncer de pulmão (Hung et al., 2008). Por fim, as subunidades α5 e α7 são encontradas superexpressas neste mesmo tipo de tumor (Improgo et al., 2010). Sendo assim, estes receptores parecem desempenhar um papel importante na carcinogênese pulmonar, processo este intimamente relacionado ao consumo de tabaco. Em câncer de mama, foi demonstrada uma superexpressão da subunidade α9 em amostras tumorais quando comparado com o tecido normal adjacente (Lee, et al., 2010). Além disso, foi observado que

os pacientes que apresentaram elevados níveis de RNAm de *CHRNA9* apresentaram uma sobrevida menor que 5 anos. Foi mostrado ainda que essa superexpressão é preferencialmente detectada em tumores positivos para receptor de estrogênio em comparação com aqueles que eram negativos. E em ensaios *in vitro*, foi demonstrado que o receptor de estrogênio é o principal fator de transcrição que medeia a superexpressão gênica de *CHRNA9* induzida por nicotina e estradiol em linhagens de câncer de mama humano (Lee, et al., 2010). Assim, essa subunidade parece ter um papel importante na carcinogênese deste tipo tumoral.

Conforme já mencionado, os CHRNs podem ser regulados pelos componentes presentes na fumaça do cigarro, como por exemplo, a nicotina, em tipos celulares normais e tumorais. Já foi demonstrada uma indução significativa e reversível de *CHRNA1*, *CHRNA5* e *CHRNA7* em células epiteliais brônquicas frente ao tratamento com nicotina (Lam, et al, 2007) e superexpressão de *CHRNA7* em células escamosas de pulmão tratadas com nicotina (Brown, et al, 2013), ambos em 72h. Além disso, já foi demonstrado também que esses receptores podem ser regulados pelo etanol em diversos tipos celulares. Gorbounova e colaboradores, em 1998, demonstraram uma redução de expressão de *CHRNA3*, porém uma superexpressão de *CHRNA7* em linhagens de neuroblastoma tratadas com etanol por 4 dias (96h). Assim, a Tabela 3 resume as principais publicações associando o tabagismo e o etilismo com a regulação da expressão de *CHRNs* em diversos tipos celulares. Isso é bastante interessante uma vez que o tabagismo e o etilismo são os principais fatores de risco para o desenvolvimento de diversos tumores, como por exemplo, o CEE, foco desse trabalho.

Tabela 3: Principais publicações associando o tabagismo e o etilismo com a regulação da expressão dos *CHRNs* em diversos tipos celulares.

Autor	Droga	Dose e Tempo	Tipo Celular	Efeito	Ano de Publicação
Zia, et al. **Arredondo, et al.**	Nicotina (NIC)	10µM/L 5 dias	queratinócitos cutâneos e orais humanos	↑ α5; β2; α3α5 e a7 (24h)	1997; 2005; 2006; 2008
Lam, et al.	Nicotina (NIC)	100nmol/L 72h	células epiteliais brônquicas	↑ CHRNA1 CHRNA5 CHRNA7 Reversível	2007
Brown, et al.	Nicotina (NIC)	1nM -10µM 96h	células escamosas de pulmão	↑ CHRNA7 (100nM – 72h) Sem efeito em α3	2013
Shi, et al.	Nicotina (NIC)	10µM 72h	carcinoma de nasofaringe	↑ CHRNA7 dose-dependente (8h-40h)	2012
Dohrman e Reiter	Nicotina (NIC) Etanol (ETOH)	1µM; 100mM 96h	fibroblastos	Efeito da NIC amenizado pelo ETOH (48h), depois revertido (96h) ↑ α4, β2	2003
Gorbounova, et al.	Etanol (ETOH)	100 mM (0,4%) 4 dias	neuroblastoma	↓ α3 ↑ α7	1998
Al-Wadei, et al.	Etanol (ETOH)	17mM (0,08%) 7 dias	adenocarcinoma ductal pancreático	↑ α3 (4,5 vezes); α5 (5 vezes); α7 (5 vezes).	2013

Legenda: ↑- aumento de expressão da subunidade; ↓ - diminuição da expressão da subunidade.

Com relação ao epitélio esofágico, pouco se sabe sobre a expressão das subunidades de CHRNs. Até o momento, apenas um trabalho fez essa avaliação através da expressão protéica por imunohistoquímica de algumas subunidades (α3, α5, α7 e β4). Os principais achados desse estudo foram a expressão da subunidade α3 nas células esofágicas compreendendo as camadas basais e suprabasais do epitélio, a expressão da subunidade α5 na maioria das camadas mais superficiais de queratinócitos esofágicos, a subunidade α7 presente

predominantemente no terço inferior do epitélio esofágico e a subunidade β2 predominante em células basais do esôfago (Nguyen, et al., 2000). Também já foi encontrada uma associação positiva entre um polimorfismo de base única (SNP) no cluster gênico CHRNA3-CHRNA5-CHRNB4 com o desenvolvimento de carcinoma epidermóide de esôfago em população chinesa (Wang, et al., 2013).

Pelo fato da carcinogênese esofágica estar extremamente associada ao tabagismo e sabendo da importância da ativação dos CHRNs pelos componentes do tabaco, existe a necessidade de se explorar essa via de ativação de cascatas de sinalização celular em neoplasias esofágicas. Além disso, pouco se sabe sobre a expressão e regulação dos CHRNs na mucosa esofágica e no processo de carcinogênese desse tecido.

1 **OBJETIVOS**

1.1 **Geral**

Analisar a expressão gênica dos receptores colinérgicos nicotínicos (*CHRNs*) no epitélio esofágico normal e em carcinoma epidermóide de esôfago.

1.2 **Específicos**

- Analisar a expressão gênica dos *CHRNs* no epitélio esofágico normal considerando as seguintes variáveis: idade, terço, gênero, tabagismo e etilismo;

- Correlacionar a expressão dos *CHRNs* entre si nas amostras de epitélio esofágico normal;

- Avaliar a expressão desses genes em amostras de tecido tumoral e normal adjacente de pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) e comparar a expressão desses genes com a das amostras de esôfago saudável;

- Correlacionar a expressão desses genes com as características clínico-patológicas e sobrevida dos pacientes com CEE;

- Analisar a expressão gênica das subunidades dos *CHRNs* em linhagens de esôfago frente ao tratamento com nicotina ou etanol.

2 **MATERIAL E MÉTODOS**

2.1 **Amostras**

Foram utilizadas 44 amostras frescas de doadores voluntários submetidos à endoscopia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ) que não apresentavam qualquer doença no tecido esofágico. Foram coletados dois fragmentos dos três terços do esôfago (terço superior, terço médio e terço inferior) de cada indivíduo.

Todos os indivíduos assinaram um termo de consentimento informado (Apêndice A) e responderam um questionário sobre os seus hábitos (Apêndice B). Nesse questionário, há dois tópicos de destaque: informações sobre o tabagismo e o etilismo (fatores etiológicos do CEE). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CEP – HUPE) e foi aprovado sob o número 416 (CEP/HUPE) (Anexo A).

Além disso, foi abordada nesse estudo uma coorte prospectiva composta de 19 pacientes portadores de CEE primário. Foram considerados os seguintes critérios para a inclusão dos pacientes no estudo:

- Casos cujo laudo histopatológico confirmou o diagnóstico de CEE revisto na Divisão de Patologia (DIPAT) INCA;

- Pacientes que ainda não haviam sido submetidos a qualquer tratamento na ocasião da biópsia;

- Pacientes cadastrados no Banco Nacional de Tumores (BNT) – INCA, onde as amostras eram armazenadas;

- Pacientes em condições clínicas que permitissem realização de endoscopia digestiva alta e biópsias no Serviço de Endoscopia - INCA.

Além dos procedimentos vinculados ao BNT-INCA, o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, sob o número 116/11 (Anexo B). Foram coletadas biópsias de CEE e do tecido normal adjacente ao tumor de cada paciente incluído no trabalho. Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento informado (Apêndice C). Além disso, as informações sobre os pacientes foram coletadas a partir de seus

prontuários com o preenchimento de uma ficha, incluindo dados sobre tabagismo e etilismo (Apêndice D).

2.2 **Extração de RNA, quantificação, determinação da pureza e integridade das amostras de RNA**

2.2.1 Extração de RNA – Amostras de Esôfago de Indivíduos Saudáveis

O RNA total foi extraído das amostras utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante. Cada amostra contendo 50 a 100 mg de tecido foi homogeneizada em 200 µL a 1 mL de TRIzol (1 mL para cada 100 mg de tecido) e incubada por cinco minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 100 a 200 µL de clorofórmio (200 µL para cada 1 mL de trizol utilizado) com subsequente homogeneização em agitador vortex. Após este processo houve incubação de 15 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas à velocidade de 12.000 rpm por 15 minutos à 4°C e então a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, com descarte do material restante. Ao novo tubo foram adicionados 500 µL de isopropanol com posterior agitação e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, seguida de centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 1 mL de etanol 75%. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos, com posterior descarte do etanol. Para eluir o RNA, foram adicionados 10 a 20 µL de água livre de RNase.

2.2.2 Extração de RNA – Amostras de Esôfago de Pacientes com CEE

As amostras de CEE e tecido normal adjacente coletadas foram processadas no laboratório do BNT-INCA, como determina o regimento da instituição. Para a extração do RNA total, foi utilizado o RNeasy Mini kit (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante:

- Um fragmento da biópsia de até 30 mg foi colocado em um microtubo de 1,5 mL junto com 200 μL do tampão RLT com beta-mercaptoetanol. Após macerar o tecido, com auxílio de um pilão, foram adicionados mais 400 μL do tampão RLT e posteriormente foram centrifugados em microcentrífuga por 3 min à velocidade de 12.000 x g para sedimentar o material não lisado. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e um volume de etanol 70% foi adicionado. Após homogeneização, 700 μL da solução foram transferidos para uma coluna de purificação alocada em um tubo coletor de 2 mL e centrifugados por 15 s a 8.000 x g . Ao término, o líquido do tubo coletor foi descartado e o procedimento foi repetido até passar toda a solução pela coluna. Em seguida, 700 μL do tampão RW1 foram adicionados à coluna de purificação e centrifugados por 15 s a 8.000 x g. Ao término, o líquido do tubo coletor foi descartado e 500 μL do tampão RPE foram adicionados à coluna de purificação e, posteriormente, centrifugados por 2 min a 8.000 x g. Em seguida, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 2 mL e centrifugados por 1 min a 12.000 x g. Após essa centrifugação, a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e 30 μL de água livre de RNase foram adicionados no centro da membrana, sem encostar a ponteira na mesma, a fim de eluir o RNA total. Após 1 minuto à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados por mais 1 min a 8.000 x g. A coluna foi descartada e posteriormente os tubos contendo o RNA total extraído foram armazenados à -80ºC.

2.2.3 Quantificação e determinação da pureza das amostras de RNA

A quantificação e determinação da pureza das amostras de RNA foram feitas com o auxílio do equipamento NanoDrop (Uniscience), um espectrofotômetro simples, capaz de mensurar a concentração de ácidos nucléicos e proteínas em solução. Para a realização da quantificação, é necessário configurar os parâmetros do equipamento para mensurar ácidos nucléicos, determinados pela absorbância em comprimento de onda de 260 nm. O cálculo da concentração do RNA tomou por base a informação de que uma unidade de absorbância corresponde a uma concentração de 40 μg / mL de RNA. Em seguida, aplica-se 1 μL de RNA total extraído no leitor óptico do aparelho. O resultado mostra automaticamente a concentração do RNA em μg/μL e verifica o grau de pureza da amostra a partir da razão entre a absorbância em 260 nm e a absorbância em 280 nm (comprimento de onda necessário para

medir a concentração de proteínas contaminantes na solução). As amostras foram consideradas puras quando esta razão era igual ou superior ao valor de 1,7.

2.3 **Reação de Transcrição Reversa (RT)**

Para a análise da expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction*- PCR) foi necessário primeiramente transcrever o RNAm recém extraído em um DNA complementar (cDNA). O cDNA possui uma sequência de desoxirribonucleotídeos complementar à sequência do RNAm. Este procedimento é essencial para a PCR porque as moléculas de RNA são muito instáveis e pelo fato da DNA polimerase, enzima responsável pela reação, ter a capacidade de polimerizar fitas complementares de DNA a partir, somente, de outra fita de DNA.

A síntese de cDNA foi feita através da reação de transcrição reversa (RT), na qual o RNA total extraído foi incubado com a enzima transcriptase reversa *SuperScript II®* (Invitrogen). Em um microtubo foram adicionados 250 ng de *primer* randômico (Promega), 500 ng de RNA alvo, 1 µL do set de dNTPs a 10 mM e água livre de RNase suficiente para completar o volume final de 20 µL de reação e subseqüente incubação por 5 minutos à 65ºC. Em seguida, foram adicionados 4 µL do tampão da enzima transcriptase reversa (5X) fornecido pelo fabricante (Invitrogen) e 2 µL de DTT 0,1M e subsequente incubação por 2 min à 25ºC. Em seguida, foi adicionado 1 µL de *SuperScript II®* (200 U) e as reações foram incubadas no termociclador por 10 min à 25ºC e 50 min à 42ºC. A inativação da enzima é feita incubando a reação a 70ºC por 15 min. Após a síntese, o cDNA foi armazenado à -20ºC.

2.4 **Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (PCRq)**

A PCRq ou PCR em tempo real é um tipo de reação em cadeia da polimerase (PCR) em que podemos observar a geração de novas cópias de determinada sequência do DNA ao longo da reação, ou seja, em tempo real. Esta metodologia foi realizada em termociclador equipado com detectores de fluorescência que acompanham o processo de amplificação

através da captação de sinal fluorescente emitido por moléculas específicas (fluoróforos), quando estas interagem com o DNA ao longo de cada ciclo da reação.

O fluoróforo mais comumente utilizado nas práticas de PCRq é o reagente SYBR Green que emite fluorescência após interagir fisicamente com a dupla-fita de DNA ao longo do processo de amplificação.

A PCR quantitativa (PCRq) foi otimizada para cada par de oligonucleotídeos a fim de avaliar a expressão gênica de cada subunidade de *CHRNs*. Foi utilizado o sistema Rotor-Gene Q (Qiagen) e o reagente QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen). O gene *GAPDH* foi utilizado como gene - referência.

As sequências dos oligonucleotídeos específicos para cada gene encontram-se no Quadro 1.

Quadro 1: Sequências de oligonucleotídeos utilizadas para amplificação dos genes das subunidades de *CHRNs* e o *GAPDH* (gene - referência)

Genes das Subunidades de *CHRNs* Gene - Referência	**Sequências dos oligonucleotídeos específicos para cada gene**
CHRNA1	Senso: 5’ – ACCAGGAGTCTAACAATGCG-3’ Anti-Senso: 5’ – ACAAGCATGAAGACTCCGAG-3’
CHRNA3	Senso: 5’-AACCTGTGGCTCAAGCAAATCT-3’ Anti-Senso: 5’– CATGAACTCTGCCCCACCAT-3’
CHRNA4	Senso: 5’- ACACAGACTTCTCGGTGAAG-3’ Anti-Senso: 5’– CAGCAGGCAGACGATGATGA-3’
CHRNA5	Senso: 5’-AGATGGAACCCTGATGACTATGGT-3’ Anti-Senso: 5’-AAACGTCCATCTGCATTATCAAAC-3’
CHRNA7	Senso: 5’-GCTGCTCGTGGCTGAGATC-3’ Anti-Senso: 5’-TGGCGAAGTACTGGGCTATCA-3’
CHRNA9	Senso: 5’ – GATGGCCTAGACTCCATCAG-3’ Anti-Senso: 5’- CTGAAGATTCATCATCAGCCTTG-3’
CHRNA10	Senso: 5’ – CTACTCCCTGCAGAGTGCCTG-3’ Anti-Senso: 5’- TCTGGTCTGTGTCTGCCACAG-3’
CHRNB4	Senso: 5’-TCACAGCTCATCTCCATCAAGCT-3’ Anti-Senso: 5’-CCTGTTTCAGCCAGACATTGGT-3’
GAPDH	Senso: 5’- CAACAGCCTCAAGATCATCAGCAA-3’ Anti-Senso: 5’-AGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT- 3’

As reações de PCRq foram realizadas em duplicata e dois controles negativos. A PCRq foi realizada em um rotor de 72 poços e em cada reação, foram adicionados o tampão QuantiFast SYBR Green (Qiagen), os oligonucleotídeos específicos, cDNA e água deionizada autoclavada para cada subunidade avaliada e para o gene-referência, conforme descrição na Quadro 2.

Quadro 2: Volume de cada componente do mix para realização da PCR_q para expressão de cada subunidade de *CHRNs* avaliada e do gene-referência, *GAPDH*

Subunidades e Gene-Referência	**Tampão QuantiFast SYBR Green (Qiagen)**	**Oligonucleotídeos Específicos**	**cDNA**	**Água deionizada autoclavada**
α3, α4, α5, α7, β4	7,5 µL	0,4 µL a 25 µM	1 µL diluído 1:10	Volume para completar o volume final de 15 µL
GAPDH	7,5 µL	0,4 µL a 10 µM	1 µL diluído 1:10	Volume para completar o volume final de 15 µL
α1 e α9	5 µL	0,5 µL a 10 µM	1 µL diluído 1:10	Volume para completar o volume final de 10 µL
α10	5 µL	0,3 µL a 10 µM	1 µL diluído 1:10	Volume para completar o volume final de 10 µL

E as condições da reação de amplificação para cada subunidade de *CHRNs* e para o gene-referência estão descritas no Quadro 3.

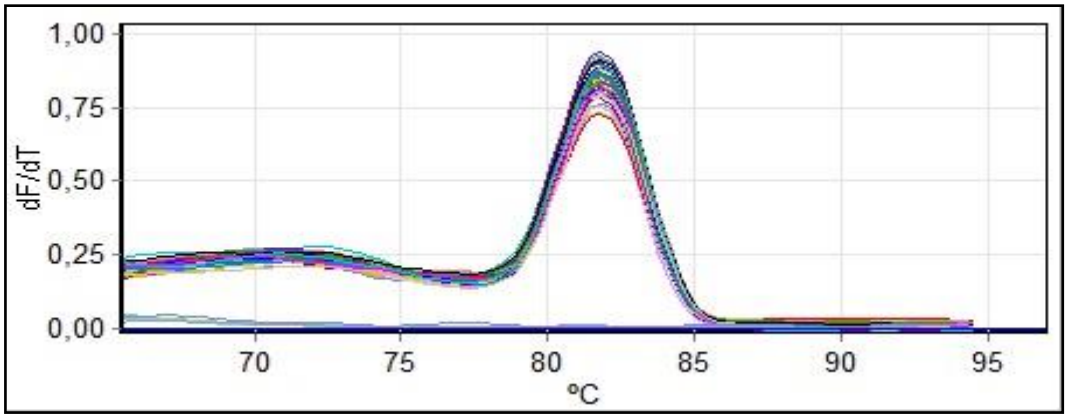
Quadro 3: Condições da reação de amplificação para *CHRNs* e para *GAPDH*

Subunidades e Gene-Referência	**Pré-Desnaturação**	**Desnaturação (40 ciclos)**	**Anelamento (40 ciclos)**	**Extensão (40 ciclos)**	**Curva de Dissociação**
α3, α4, α5, α7, α10, β4 e *GAPDH*	5 minutos a 95°C	5 segundos a 95°C	Etapas de anelamento e extensão integradas	10 segundos a 60°C	65°C - 95°C
α1	5 minutos a 95°C	5 segundos a 95°C	10 segundos a 58,1°C	10 segundos a 60°C	65°C - 95°C
α9	5 minutos a 95°C	5 segundos a 95°C	5 segundos a 62°C	5 segundos a 60°C	65°C - 95°C

Após a amplificação dos produtos, é realizada a análise da curva de dissociação gerada pelo *software* do termociclador. Essa curva é importante para verificar se os produtos observados na PCRq são específicos para os oligonucleotídeos analisados, para verificar se há

formação de estruturas secundárias entre os oligonucleotídeos e contaminação da reação (controle negativo amplificando). Um gráfico representativo da curva de dissociação está representado na Figura 12.

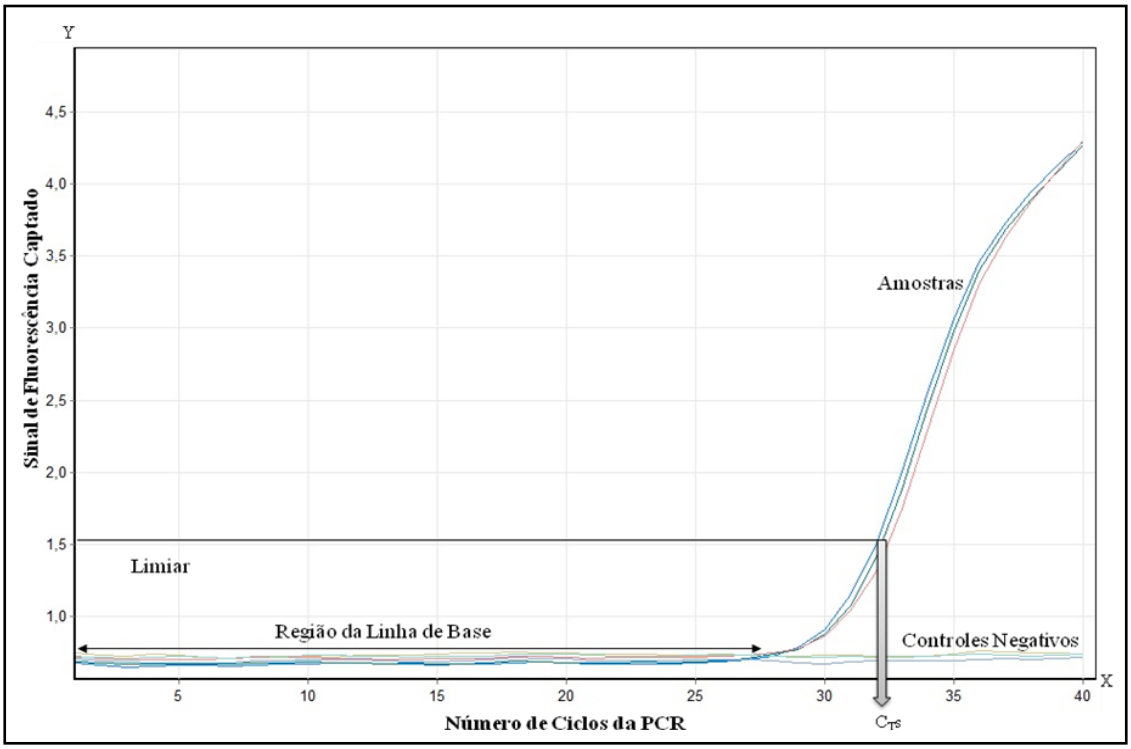
Figura 12: Curva de dissociação da PCRq para o gene da subunidade *CHRNA7*



Nota: Esta curva tem como base a captura da fluorescência à medida que aumenta a temperatura. Com o aumento da temperatura os produtos dupla fita vão se dissociando e com isso a emissão de fluorescência vai diminuindo. Assim, é possível verificar se o produto é específico ou não. Nesse caso, o produto é específico, não há formação de estruturas secundárias de oligonucleotídeos e nem contaminação da reação.

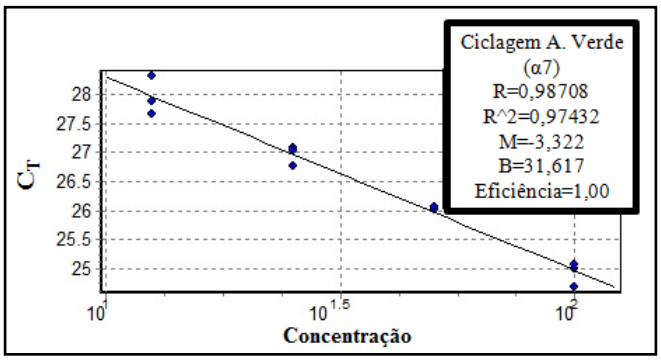
Após a reação, foi feita a quantificação relativa do RNAm de cada gene, utilizando o *GAPDH* como controle interno, através do método de ΔC_T. Durante a reação de amplificação, é gerado um gráfico em que o eixo Y representa o sinal de fluorescência captado e o eixo X, o número de ciclos da reação. No primeiro ciclo da reação de PCR, há pouca emissão de fluorescência. É justamente isso que define a linha de base do gráfico de amplificação. Ao decorrer da reação, há um aumento do sinal de fluorescência, indicando um acúmulo de produto de PCR. Esse acúmulo de produto de PCR é representado através de uma curva exponencial. Durante a fase exponencial, é determinado um limiar de detecção de fluorescência fixo acima da linha de base (*threshold*). A partir desse limiar, é obtido o parâmetro C_T (ciclo de *threshold*), definido como o número de ciclos, inteiro ou não, em que a fluorescência ultrapassou o limiar previamente estabelecido (Figura 13). Como o experimento era feito sempre em duplicata, foi calculada a média dos C_Ts tanto para o gene alvo (no caso os genes das subunidades de *CHRNs*) como para o gene - referência (*GAPDH*). A diferença entre as médias dos C_Ts (ΔC_T) de cada gene de interesse e a do *GAPDH* foi calculada pelo programa Microsoft Excel e o valor de quantificação relativa foi expresso pela fórmula $2^{-\Delta CT}$, também calculado pelo programa Microsoft Excel.

Figura 13: Gráfico de detecção de fluorescência de PCR em tempo real



Para o estabelecimento do limiar de detecção, foi feita uma curva padrão de expressão para cada gene das subunidades de *CHRNs* e do gene – referência, utilizando uma diluição seriada de cDNA de um controle positivo da reação (Figura 14). Foi utilizada como controle positivo a linhagem celular A549, linhagem derivada de adenocarcinoma de pulmão para a expressão das subunidades α3, α5, α7, β4; a linhagem celular TE-1, linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago, para expressão da subunidade α4; e a linhagem U-251, linhagem derivada de glioblastoma, para expressão das subunidades α1, α9 e α10.

Figura 14: Curva padrão de expressão do gene da subunidade *CHRNA7* utilizando diluição seriada de cDNA da linhagem celular A549



2.5 **Experimentos *in vitro***

2.5.1 Linhagens Celulares

Foram utilizadas como controle positivo da expressão de *CHRNs* as linhagens A549, linhagem celular derivada de adenocarcinoma de pulmão (para a expressão das subunidades α3, α5, α7, β4), TE-1, linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (para expressão da subunidade α4) e U-251, linhagem celular derivada de glioblastoma (para expressão das subunidades α1, α9 e α10). A linhagem A549 foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% do coquetel de penicilina/glutamina/estreptomicina (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, EUA), e foi mantida em estufa à 37º C sob 5% de CO_2.

Já as células de glioblastoma U-251 foram cultivadas com meio de cultura DMEM/F12 (Dubelcco's Modified Eagle Medium com a adição de nutriente F-12) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e com as mesmas condições da linhagem A549. A linhagem TE-1 foi utilizada tanto como controle positivo da expressão da subunidade α4 quanto para o tratamento com nicotina ou etanol. O seu cultivo foi realizado conforme descrito a seguir.

Neste estudo, foram utilizadas as linhagens celulares provenientes de carcinoma epidermóide de esôfago, TE-1 e TE-11 para realizar os tratamentos com nicotina ou etanol.

As características das linhagens estão listadas na Tabela 4. As linhagens celulares foram periodicamente testadas com MycoAlert®Mycoplasma Detection Kit (Cambrex Bio Science, EUA) para a certificação de ausência de infecção por micoplasma. A linhagem TE-1 foi cultivada em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de glutamina e 1% do coquetel de penicilina/estreptomicina (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, EUA), e foi mantida em estufa à 37º C sob 5% de CO_2. Já a linhagem TE-11 foi cultivada em meio DMEM com os mesmos suplementos e as mesmas condições da linhagem TE-1.

Tabela 4: Características das linhagens TE-1 e TE-11 e a capacidade tumorigênica em camundongos

Linhagem Celular	**Indivíduo**		**Tumor**			**Material de Cultura**	**Tumorigenicidade em camundongos**
	Idade	Sexo	Histologia	Estágio	Diferenciação		
TE-1	58	M	CEE	II	Bem	Lesão Primária	+
TE-11	58	M	CEE	IV	Moderadamente	Lesão Primária	-

Legenda: M – sexo masculino; CEE – carcinoma epidermóide de esôfago.
Fonte: Igaki, et al., 1994; Barnas, et al., 1997.

2.5.2 Tratamentos com Nicotina ou Etanol

Após o tempo de cultivo celular através de repiques, as linhagens foram plaqueadas da seguinte forma:

- Retirada do meio correspondente em cada linhagem;
- Lavagem com PBS e remoção do mesmo;
- Foi adicionada solução de 0,25% de tripsina, com EDTA e subsequente incubação durante 5 min, à 37ºC, 5% CO_2 para soltar as células aderidas;
- Foi adicionado o meio para inibir a tripsina (o meio contém SFB capaz de inibir a tripsina);
- Contagem das células na câmara de Neubauer através do método do azul de tripan (diluição do corante na proporção de 1:1 com a suspensão celular);
- Plaqueamento: $2x10^5$ células /poço. Incubação por 24h;

- Tratamento com nicotina (Sigma): Após 24h, as linhagens celulares eram tratadas com 1,5 mL da solução meio + nicotina diluída em etanol nas doses de 1 µM, 10 µM e 100 µM. No controle, 1,5 mL da solução meio + etanol (mesmo volume de etanol da solução de nicotina). Em seguida, foram incubadas por 72h na estufa a 37°C sob 5% de CO_2;

- Tratamento com etanol: Após 24h do plaqueamento, as linhagens celulares eram tratadas com 1 mL da solução meio + etanol nas doses de 50 mM (0,2%), 100 mM (0,4%) e 200 mM (0,8%). O controle só continha o respectivo meio das linhagens celulares. Em seguida, foram incubadas por 96h na estufa a 37°C sob 5% de CO_2. Os meios desse tratamento foram trocados diariamente e as placas eram vedadas com parafilme para evitar a evaporação do etanol.

As doses e tempos foram escolhidos com base em artigos da literatura científica (Lam, et al, 2007, Shi, et al., 2012; Dohrman e Reiter, 2003; Gorbounova, et al., 1998). A concentração de 100 µM de nicotina é equivalente à concentração na saliva de um indivíduo que fuma 25 cigarros/dia (Cheng e Tsai,1999). Já as doses escolhidas para o álcool refletem os níveis dentro de intervalos atingíveis por alcoólatras crônicos (Adachi, et al., 1991). Foram feitos três experimentos independentes e triplicata de cada dose e do controle.

Após o tempo determinado para cada tratamento, as células eram retiradas de cultura da seguinte maneira:

- Retirada do meio em cada poço das placas;
- Lavagem com PBS e remoção do mesmo;
- Foi adicionada solução de 0,25% de tripsina, com EDTA e subsequente incubação durante 5 min, à 37ºC, 5% CO_2 para soltar as células aderidas;
- Adicionou-se meio de cultura para inibir a tripsina (o meio contém SFB capaz de inibir a tripsina);
- Transferência da solução contendo as células para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e subsequente centrifugação por 5 minutos a 10000 rpm;
- Descarte do sobrenadante e armazenamento do precipitado em freezer -80ºC para posterior extração de RNA.

2.5.3 Contagem e Viabilidade Celular

As linhagens celulares foram contadas tanto para o plaqueamento e posterior tratamento quanto para avaliar a viabilidade celular. A contagem foi feita com auxílio da câmara de Neubauer através do método do azul de tripan:

- Foi pipetada solução contendo azul de tripan e suspensão celular (diluição do corante na proporção de 1:1 com a suspensão celular) na câmara de Neubauer contendo lamínula;
- O número de células foi determinado pela contagem das mesmas em cada quadrante da câmara de Neubauer e os valores encontrados foram somados e divididos pelo número de quadrantes. Em seguida, este valor foi multiplicado pelo fator de diluição $2x10^4$ para se obter o número de células/mL;
- Para o plaqueamento: $2x10^5$ células foram utilizadas;
- Após a marcação com azul de tripan, as células vivas de membrana intacta não se coram, pois o corante não atravessa a membrana e assim não é incorporado. Já nas células não viáveis, esse corante atravessa a membrana e é incorporado nessas células. Isso é observado no microscópio. Assim era obtido o número de células viáveis.

2.6 **Extração de RNA das linhagens celulares**

O precipitado de células foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante, conforme descrito anteriormente no item 2.2.1.

2.7 **Tratamento com DNase I das linhagens celulares**

O tratamento com DNase I (Sigma) tem como objetivo evitar contaminação com DNA genômico nas soluções de RNA. Em um microtubo foram adicionados 1 µg de RNA total e volume de água de injeção para completar o volume de 8 µL. Depois, foram acrescentados 1 µL de tampão da reação (10X) fornecido pelo fabricante (Sigma) e 1 µL da enzima DNase I, Amplification Grade (1unidade/µL). Em seguida, as reações foram

homogenizadas e incubadas por 15 min à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 1 µL de Stop Solution para ligar íons Ca^{+2} e Mg^{+2} e inativar a enzima. Aquecimento por 10 min a 70°C. Depois, o RNA livre de DNA foi armazenado à -80°C.

2.8 **Síntese de cDNA (RT) das linhagens celulares**

A síntese de cDNA foi feita através da reação de transcrição reversa (RT), na qual o RNA total extraído foi incubado com a enzima transcriptase reversa *SuperScript II®* (Invitrogen), seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente para a reação de transcrição reversa (RT) a partir das biópsias. Foi utilizado um input de RNA tratado com DNase I de 800 ng. Em seguida, foram feitas as reações de PCRq conforme já descritas no item 2.4.

2.9 **Análises Estatísticas**

Toda análise estatística foi feita utilizando o *software* GraphPad Prism versão 5.0. O valor de p foi considerado estatisticamente significativo quando <0,05.

Para averiguar se os dados obedeciam a uma distribuição normal, utilizou-se o teste Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, na análise de diferença de expressão entre amostras de tumores e de tecidos adjacentes pareados com dados paramétricos, foi aplicado o teste t. Se os dados não fossem paramétricos foi utilizado o *Wilcoxon matched pairs test*. Já na análise de diferença de expressão entre amostras não pareadas utilizou-se teste t não pareado quando os dados foram paramétricos ou o teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos.

O Teste One-Way ANOVA foi usado quando mais de dois grupos eram avaliados. Para os dados paramétricos foi utilizado o Teste One-Way *analysis of variance* e o pós-teste de Tukey. Já para os dados não paramétricos foi aplicado o Teste de Kruskal Wallis e o pós-teste de Dunn.

As correlações entre a expressão dos genes nas diferentes amostras foi realizada utilizando o teste de correlação de Pearson, quando os dados apresentaram-se paramétricos ou correlação de Spearman, quando os dados não foram paramétricos. A análise de correlação da

sobrevida dos pacientes com os valores de expressão dos genes selecionados foi realizada utilizando a curva de Kaplan-Meier.

Além disso, foi realizada a curva ROC para avaliar a sensibilidade e especificidade da expressão de genes selecionados em distinguir amostras tumorais das amostras de tecido normal adjacente em pacientes com CEE.

3 **RESULTADOS**

3.1 **Análise de expressão de *CHRNs* nas amostras de esôfago de indivíduos saudáveis**

3.1.1 Caracterização dos indivíduos saudáveis

Os indivíduos saudáveis foram caracterizados segundo os seguintes critérios: gênero, hábito de fumar e hábito de ingerir bebidas alcoólicas (Tabela 5). De acordo com os dados, a maioria dos indivíduos foi do sexo feminino (70,5% dos casos), era não tabagista (61,4% dos casos) e não etilista (45,4% dos casos) e a média de idade foi 53,84 anos $\pm$ 17,49. A média do tempo desde o abandono do hábito de fumar foi de 20,44 anos $\pm$ 15,09 e da duração do hábito foi de 33,25 anos $\pm$ 14,14 entre os tabagistas ativos e 29,11 anos $\pm$ 20,91 entre os ex-tabagistas. Já o tempo desde o abandono do hábito de ingerir bebidas alcóolicas foi de 21 anos, 2 anos, 4 anos e não pôde ser determinado para dois indivíduos.

Tabela 5: Caracterização dos indivíduos saudáveis incluídos nesse estudo de acordo com gênero, tabagismo e etilismo

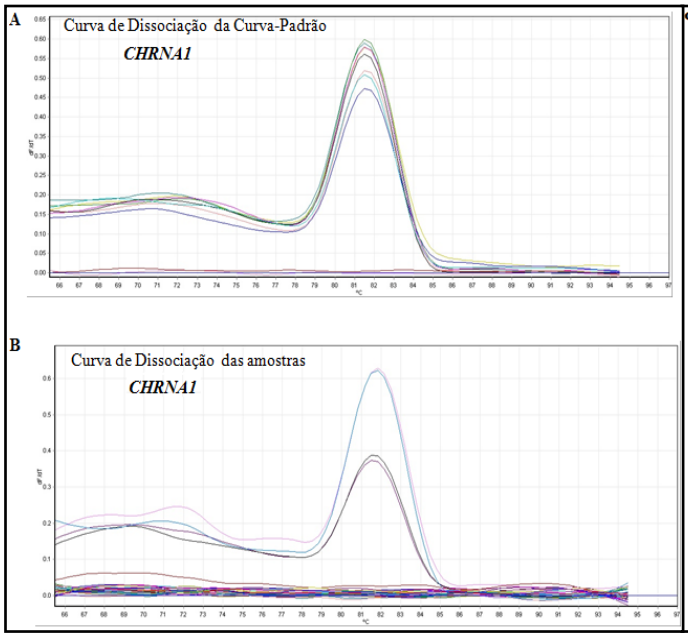
Número total de indivíduos	**44**
Critérios Avaliados	**Números de Indivíduos (%)**
Idade	53,84 anos ± 17,49
Gênero	
Masculino	13 (29,5%)
Feminino	31 (70,5%)
Tabagismo	
Não tabagista	27 (61,4%)
Tabagista ativo	8 (18,2%)
Ex-tabagista	9 (20,4%)
Média do tempo que parou de fumar	20,44 anos ± 15,09
Média da duração do fumo	33,25 anos ± 14,14 (tabagistas ativos) 29,11 anos ± 20,91 (ex-tabagistas)
Etilismo	
Não etilista	20 (45,4%)
Etilista ativo	19 (43,2%)
Ex-etilista	5 (11,4%)
Duração do hábito	Sem informação
Tempo que parou de beber	21 anos, 2 anos, 4 anos e 2 não determinados

3.1.2 Análise da expressão das subunidades de *CHRNs* em indivíduos saudáveis

Em seguida, a expressão gênica das subunidades α1, α3, α4, α5, α7, α9, α10 e β4 foi analisada com a finalidade de determinar qual (is) subunidade (s) é (são) expressa (s) no epitélio esofágico de indivíduos saudáveis.

As subunidades α1, α4, α9 e α10 mostraram baixa ou nenhuma expressão nas amostras de esôfago saudável analisadas, independente do terço, apresentando replicatas de uma mesma amostra com valores de C_T muito distantes entre si ou amostras sem amplificação. Assim, sugere-se, através da técnica utilizada, que essas subunidades são pouco ou não são expressas no epitélio esofágico saudável. Os valores de C_T e as curvas de dissociação das amostras para essas subunidades estão demonstradas a seguir (Figuras 15, 16, 17 e 18).

Figura 15: Curvas de dissociação da curva-padrão e das amostras para a expressão da subunidade α1 e os valores de C_T encontrados para as amostras de esôfago saudável dos três terços e do controle positivo, a linhagem U-251.

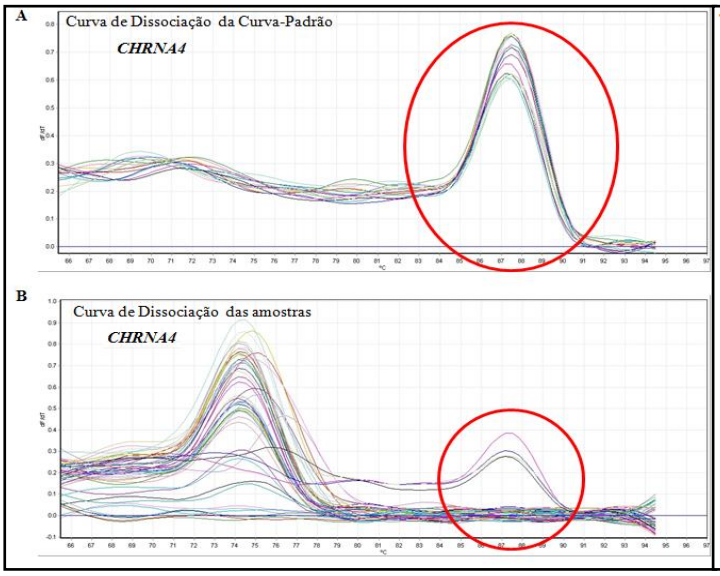


C

Amostras	C_{T1} α1	C_{T2} α1
9S	-	-
9M	32,92	-
9I	-	-
14S	-	-
14M	-	-
14I	32,91	-
25S	-	-
25M	-	-
25I	-	-
85S	37,24	-
85M	-	-
85I	-	-
86S	-	-
86M	-	-
86I	-	-
94S	-	-
94M	-	-
94I	-	-
U-251	28,11	27,98

Legenda: (A) Curva de dissociação da curva-padrão para expressão da subunidade α1, utilizando a linhagem U-251; (B) curva de dissociação das amostras analisadas para a expressão da subunidade α1; (C) Valores de C_T encontrados para as amostras de esôfago saudável dos três terços e do controle positivo, a linhagem U-251.- sem amplificação; S – terço superior; M – terço médio; I – terço inferior.

Figura 16: Curvas de dissociação da curva-padrão e das amostras para a expressão da subunidade α4 e os valores de C_T encontrados para as amostras de esôfago saudável dos três terços e do controle positivo, a linhagem TE-1.

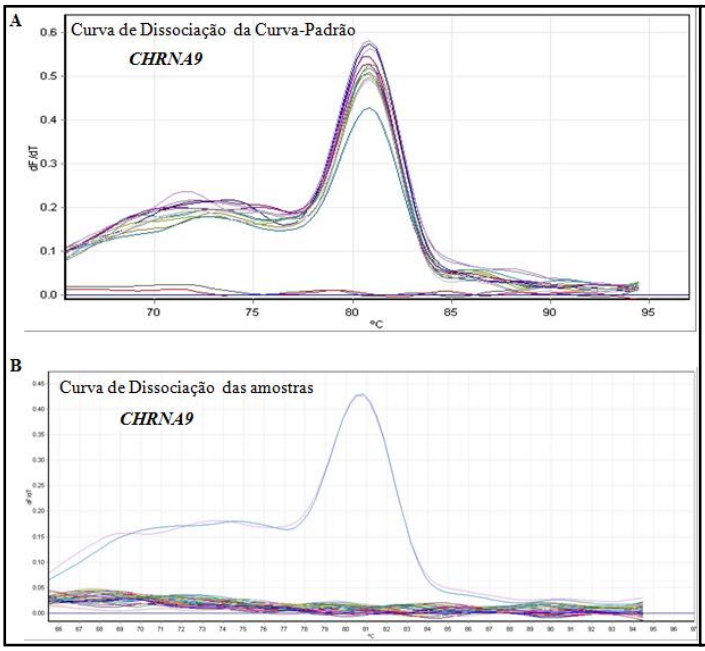


C

Amostras	C_{T1} α4	C_{T2} α4
37S	31,91	31,97
37M	33,17	30,33
37I	33,5	30,95
38S	32,82	-
38M	32,77	32,7
38I	35,13	35,64
39S	32,76	31,35
39M	34,3	32,13
39I	33,89	31,71
45S	35,34	31,66
45M	37,44	31,91
45I	30,89	34,85
46S	32,26	33,44
46M	33,05	32,6
46I	32,89	31,91
48S	30,81	32,95
48M	32,09	32,7
48I	31,91	33,32
TE-1	26,06	25,85

Legenda: (A) Curva de dissociação da curva-padrão para expressão da subunidade α4, utilizando a linhagem TE-1; (B) curva de dissociação das amostras analisadas para a expressão da subunidade α4; (C) Valores de C_T encontrados para as amostras de esôfago saudável dos três terços e do controle positivo, a linhagem TE-1.- sem amplificação; S – terço superior; M – terço médio; I – terço inferior. Círculo em vermelho – pico dos produtos amplificados específicos.

Figura 17: Curvas de dissociação da curva-padrão e das amostras para a expressão da subunidade α9 e os valores de C_T encontrados para as amostras de esôfago saudável dos três terços e do controle positivo, a linhagem U-251

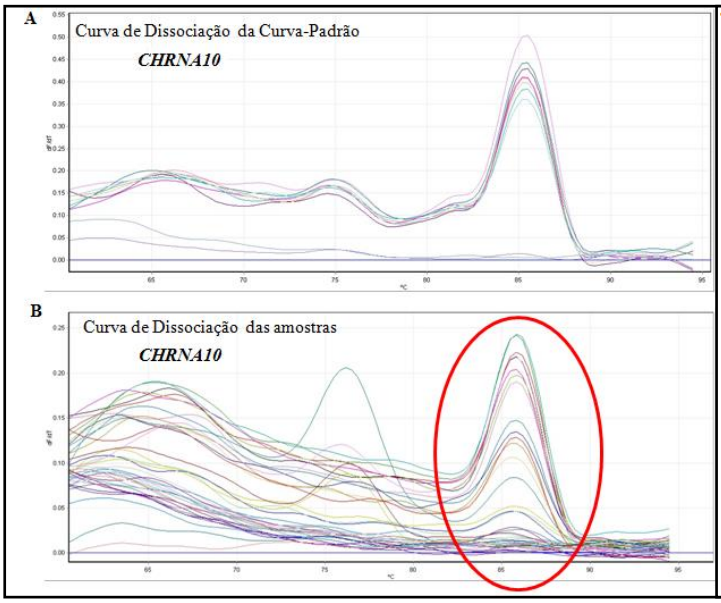


C

Amostras	C_{T1} α9	C_{T2} α9
9S	-	-
9M	-	-
9I	-	-
14S	-	-
14M	-	-
14I	-	-
25S	-	-
25M	-	-
25I	-	-
85S	-	-
85M	-	-
85I	-	-
86S	-	-
86M	-	-
86I	-	-
94S	-	-
94M	-	-
94I	-	-
U-251	29,43	29,09

Legenda: (A) Curva de dissociação da curva-padrão para expressão da subunidade α9, utilizando a linhagem U-251; (B) curva de dissociação das amostras analisadas para a expressão da subunidade α9; (C) Valores de C_T encontrados para as amostras de esôfago saudável dos três terços e do controle positivo, a linhagem U-251.- sem amplificação; S – terço superior; M – terço médio; I – terço inferior.

Figura 18: Curvas de dissociação da curva-padrão e das amostras para a expressão da subunidade α10 e os valores de C_T encontrados para as amostras de esôfago saudável dos três terços e do controle positivo, a linhagem U-251.



C

Amostras	C_{T1} α10	C_{T2} α10
9S	32,79	35,96
9M	36,09	-
9I	38,9	-
14S	32,79	-
14M	32,44	32,98
14I	32,63	38,91
25S	34,26	36,11
25M	-	-
25I	-	-
85S	33,16	35,44
85M	34,15	33,07
85I	32,6	33,93
86S	34,06	-
86M	36,53	-
86I	37,8	-
94S	-	-
94M	33,74	35,6
94I	38,85	-
U-251	28,85	28,61

Legenda: (A) Curva de dissociação da curva-padrão para expressão da subunidade α10, utilizando a linhagem U-251; (B) curva de dissociação das amostras analisadas para a expressão da subunidade α10; (C) Valores de C_T encontrados para as amostras de esôfago saudável dos três terços e do controle positivo, a linhagem U-251.- sem amplificação; S – terço superior; M – terço médio; I – terço inferior. Círculo em vermelho – pico dos produtos amplificados específicos.

Por outro lado, identificamos a expressão das subunidades α3, α5, α7 e β4 em todas as amostras de esôfago analisadas. O número total de amostras foi de 38, 36, 42 e 32 para análise da expressão de *CHRNA3, CHRNA5, CHRNA7* e *CHRNB4*, respectivamente. Não foi possível incluir o mesmo número de amostras na análise da expressão de todas as subunidades devido à escassez das mesmas.

As análises para essas subunidades expressas no esôfago foram realizadas de acordo com os critérios: terços (superior, médio e inferior), idade, gênero, tabagismo, etilismo e tabagismo e etilismo associados.

- Subunidade α3:

As análises de expressão gênica da subunidade α3 demonstraram que o esôfago humano expressa essa subunidade de maneira uniforme entre os terços avaliados (Figura 19). Em seguida, foi avaliada a associação entre a idade dos indivíduos saudáveis e a expressão desse gene nos diferentes terços, não sendo encontrada associação significativa (Tabela 6). Além disso, o gênero pareceu não influenciar na expressão desse receptor independentemente do terço analisado (Figura 20A). De maneira semelhante, o hábito de fumar desses indivíduos não apresentou correlação com a expressão dessa subunidade (Figura 20B). Curiosamente, o consumo de bebidas alcoólicas foi capaz de afetar a expressão desse receptor, ou seja, indivíduos etilistas apresentaram uma redução significativa da expressão da subunidade α3 em relação aos indivíduos não etilistas, no terço inferior do esôfago saudável (Figura 20C). Porém, esses dois fatores de risco quando avaliados em conjunto, não apresentaram correlação com a expressão gênica desse receptor (Figura 20D).

Figura 19: Comparação da expressão de *CHRNA3* entre os três terços de esôfago saudável.

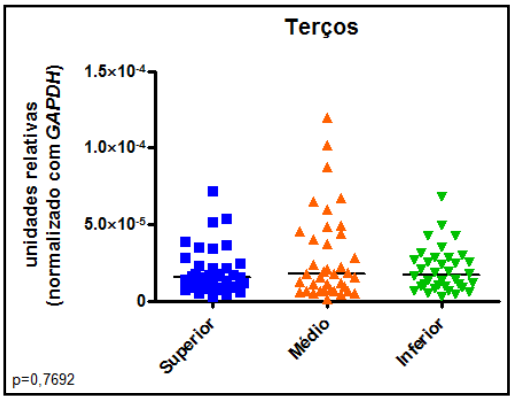
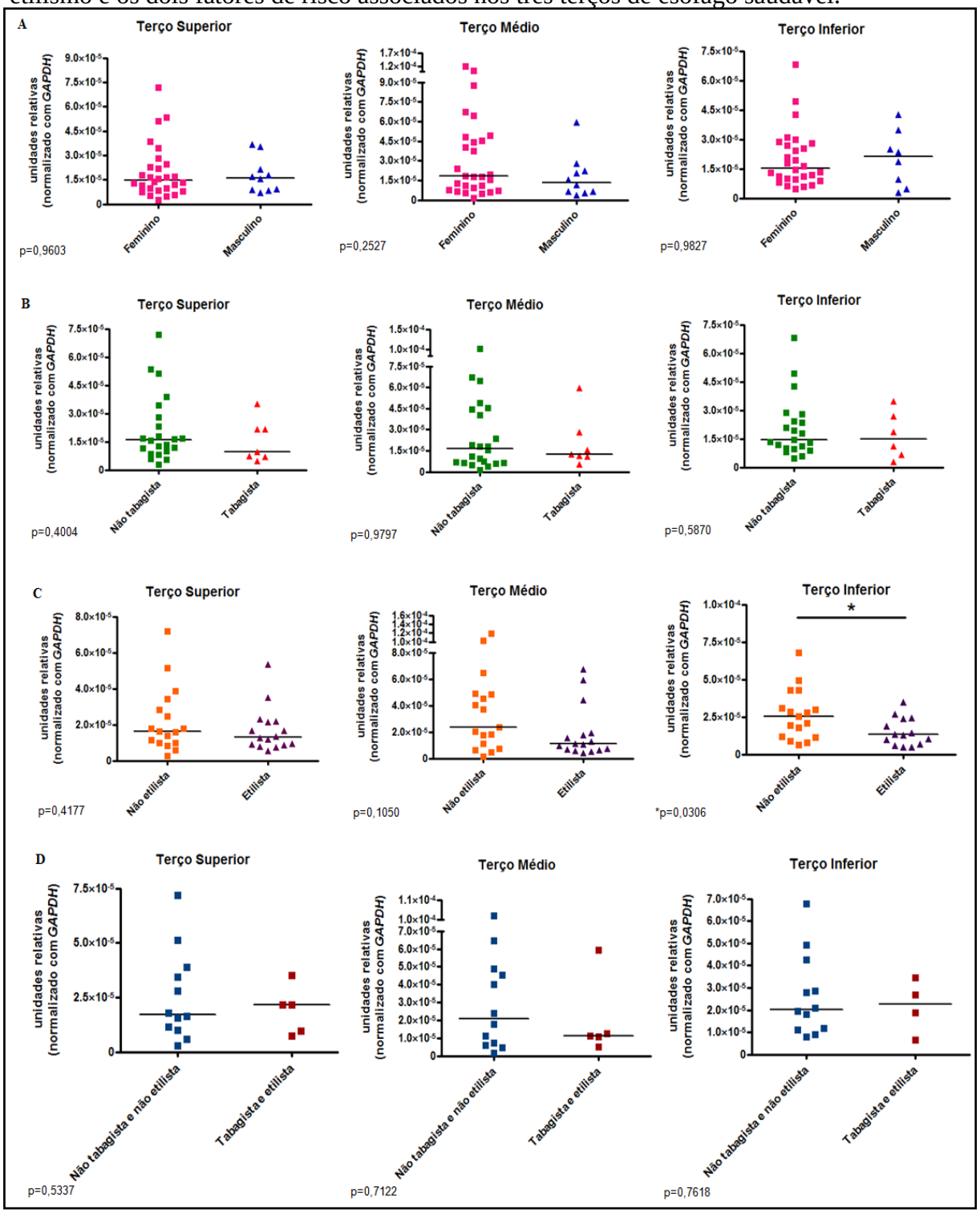


Tabela 6: Associação entre a expressão de *CHRNA3* com a idade nos três terços avaliados

Critério	**Terços do Esôfago Saudável**	**Mediana de expressão de *CHRNA3***	***CHRNA3* Mediana de idade (mínimo-máximo)**	**Valor de p**
Idade (variável contínua)	Superior	> Mediana ≤ Mediana	65 anos (20-85) 54 anos (23-74)	p= 0,1235
	Médio	> Mediana ≤ Mediana	64 anos (31-85) 54 anos (20-84)	p= 0,0563
	Inferior	> Mediana ≤ Mediana	62,50 anos (20-85) 53,50 anos (23-84)	p= 0,2547

Nota: Valor da mediana de expressão da subunidade α3 para o terço superior: 1,56E-05; Valor da mediana de expressão da subunidade α3 para o terço médio: 1,78E-05; Valor da mediana de expressão da subunidade α3 para o terço inferior: 1,72E-05.

Figura 20: Comparação de expressão de *CHRNA3* de acordo com o gênero, tabagismo, etilismo e os dois fatores de risco associados nos três terços de esôfago saudável.



Legenda: A- Comparação de expressão de *CHRNA3* entre indivíduos do sexo masculino e feminino no terço superior; no terço médio e no terço inferior de esôfago saudável. B - Comparação de expressão de *CHRNA3* entre indivíduos não tabagistas e tabagistas no terço superior; no terço médio e no terço inferior de esôfago saudável. C - Comparação de expressão de *CHRNA3* entre indivíduos não etilistas e etilistas no terço superior; no terço médio e no terço inferior de esôfago saudável. D - Comparação de expressão de *CHRNA3* entre indivíduos não tabagistas e não etilistas com indivíduos tabagistas e etilistas no terço superior; no terço médio e no terço inferior de esôfago saudável. *p estatisticamente significativo.

➢ Subunidade α5:

As análises para a subunidade α5 demonstraram que não houve diferença de expressão entre os terços avaliados (Figura 21) e não há associação entre a idade e a expressão desse gene nesses terços (Tabela 7). Além disso, o gênero pareceu não influenciar na expressão desse receptor independentemente do terço analisado (Figura 22A). De maneira semelhante, os hábitos de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas (isolados e associados) não apresentaram correlação com a expressão dessa subunidade nos indivíduos saudáveis (Figuras 22B-D).

Figura 21: Comparação da expressão de *CHRNA5* entre os três terços de esôfago saudável.

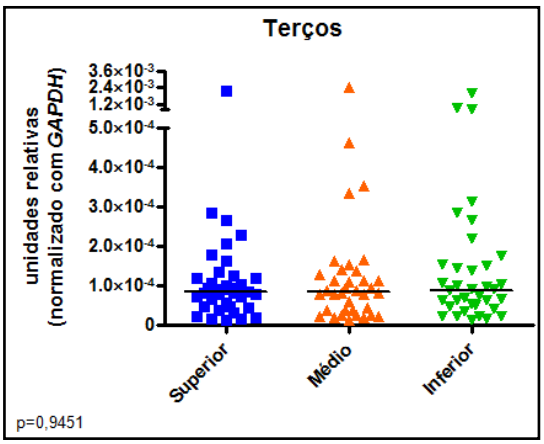
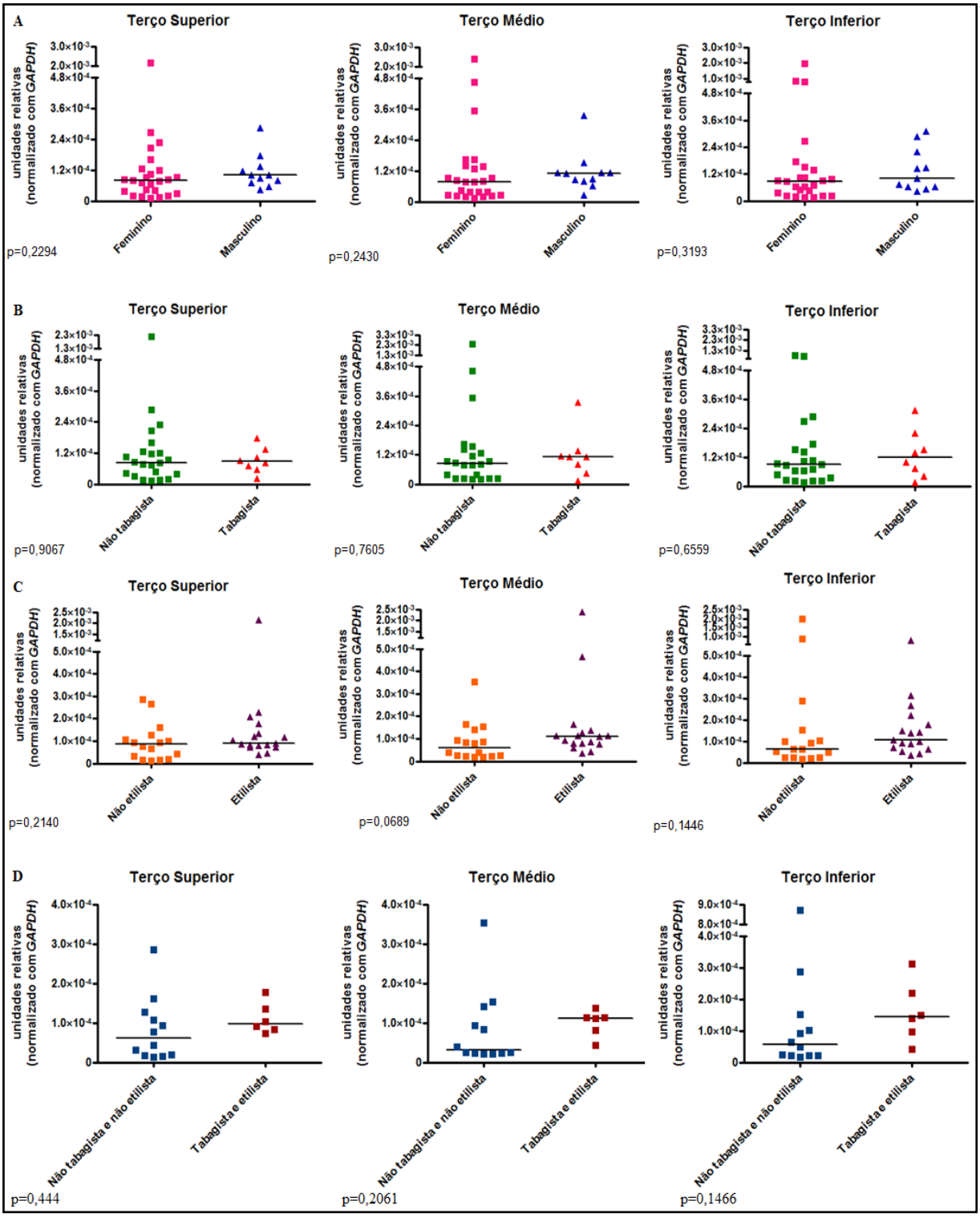


Tabela 7: Associação entre a expressão de *CHRNA5* com a idade nos três terços avaliados.

Critério	**Terços do Esôfago Saudável**	**Mediana de expressão de *CHRNA5***	***CHRNA5* Mediana de idade (mínimo-máximo)**	**Valor de p**
Idade (variável contínua)	Superior	> Mediana ≤ Mediana	56,50 anos (22-81) 55,50 anos (20-84)	p= 0,8925
	Médio	> Mediana ≤ Mediana	52,50 anos (22-81) 59 anos (20-84)	p= 0,4496
	Inferior	> Mediana ≤ Mediana	47 anos (20-81) 59 anos (23-84)	p= 0,1255

Nota: Valor da mediana de expressão da subunidade α5 para o terço superior: 8,43E-05; Valor da mediana de expressão da subunidade α5 para o terço médio: 8,48E-05; Valor da mediana de expressão da subunidade α5 para o terço inferior: 8,91E-05.

Figura 22: Comparação de expressão de *CHRNA5* de acordo com o gênero, tabagismo, etilismo e os dois fatores de risco associados nos três terços de esôfago saudável.



Legenda: A- Comparação de expressão de *CHRNA5* entre indivíduos do sexo masculino e feminino no terço superior; no terço médio e no terço inferior de esôfago saudável. B - Comparação de expressão de *CHRNA5* entre indivíduos não tabagistas e tabagistas no terço superior, no terço médio e no terço inferior de esôfago saudável. C - Comparação de expressão de *CHRNA5* entre indivíduos não etilistas e etilistas no terço superior, no terço médio e no terço inferior de esôfago saudável. D - Comparação de expressão de *CHRNA5* entre indivíduos não tabagistas e não etilistas com indivíduos tabagistas e etilistas no terço superior, no terço médio e no terço inferior de esôfago saudável.

➢ Subunidade α7:

As análises para a subunidade α7 demonstraram que o esôfago humano expressa esse gene homogeneamente entre os terços (Figura 23). A idade dos indivíduos bem como o gênero não influenciaram na expressão desse receptor em nenhum dos terços analisados (Tabela 8 e Figura 24A, respectivamente). Por outro lado, o tabagismo foi capaz de alterar a expressão desse gene, sendo que indivíduos tabagistas apresentaram uma expressão significativamente menor desse receptor do que indivíduos não tabagistas no terço superior do esôfago saudável (Figura 24B). Já o etilismo e os dois fatores de risco associados não foram capazes de afetar a expressão da subunidade α7 (Figura 24C-D).

Figura 23: Comparação da expressão de *CHRNA7* entre os três terços de esôfago saudável

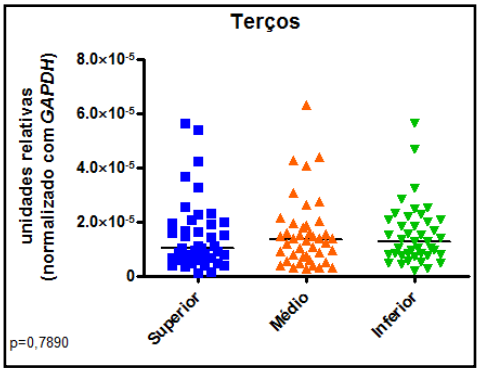
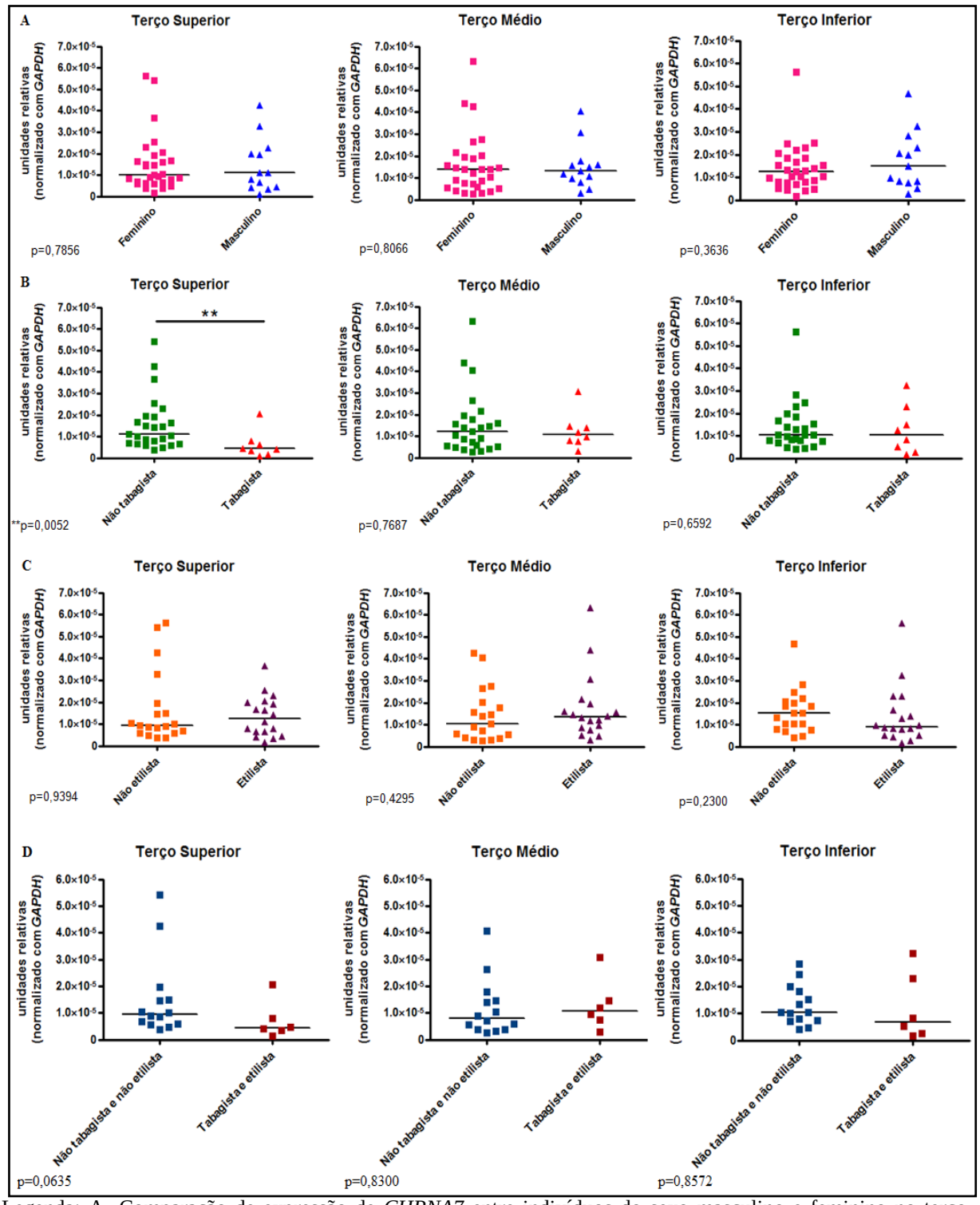


Tabela 8: Associação entre a expressão de *CHRNA7* com a idade nos três terços avaliados

Critério	**Terços do Esôfago Saudável**	**Mediana de expressão de *CHRNA7***	***CHRNA7* Mediana de idade (mínimo-máximo)**	**Valor de p**
Idade (variável contínua)	Superior	> Mediana	54 anos (18-85)	p= 0,1990
		≤ Mediana	59 anos (35-81)	
	Médio	> Mediana	57 anos (18-74)	p= 0,4059
		≤ Mediana	62 anos (20-85)	
	Inferior	> Mediana	59 anos (18-85)	p= 0,3962
		≤ Mediana	49 anos (23-84)	

Nota: Valor da mediana de expressão da subunidade α7 para o terço superior: 1,02E-05; Valor da mediana de expressão da subunidade α7 para o terço médio: 1,35E-05; Valor da mediana de expressão da subunidade α7 para o terço inferior: 1,26E-05.

Figura 24: Comparação de expressão de *CHRNA7* de acordo com o gênero, tabagismo, etilismo e os dois fatores de risco associados nos três terços de esôfago saudável.



Legenda: A- Comparação de expressão de *CHRNA7* entre indivíduos do sexo masculino e feminino no terço superior; no terço médio e no terço inferior de esôfago saudável. B - Comparação de expressão de *CHRNA7* entre indivíduos não tabagistas e tabagistas no terço superior; no terço médio e no terço inferior de esôfago saudável. C - Comparação de expressão de *CHRNA7* entre indivíduos não etilistas e etilistas no terço superior; no terço médio e no terço inferior de esôfago saudável. D - Comparação de expressão de *CHRNA7* entre indivíduos não tabagistas e não etilistas com indivíduos tabagistas e etilistas no terço superior; no terço médio e no terço inferior de esôfago saudável. **p estatisticamente significativo.

- Subunidade β4:

Assim como as demais subunidades, as análises para a subunidade β4 demonstraram que o esôfago humano expressa esse gene uniformemente entre os terços (Figura 25). Foi possível observar uma associação entre a idade e a expressão desse gene no terço superior, em que indivíduos com maior idade apresentaram menor expressão dessa subunidade. Já no terço inferior, foi observado o inverso, indivíduos com maior idade apresentaram uma maior expressão desta subunidade (Tabela 9). Além disso, o gênero pareceu não influenciar na expressão desse receptor em nenhum dos terços analisados (Figura 26A). De forma semelhante, os *status* de tabagismo e etilismo (isolados ou associados) dos indivíduos não apresentaram correlação com a expressão desse receptor (Figura 26B-D).

Figura 25: Comparação da expressão de *CHRNB4* entre os três terços de esôfago saudável.

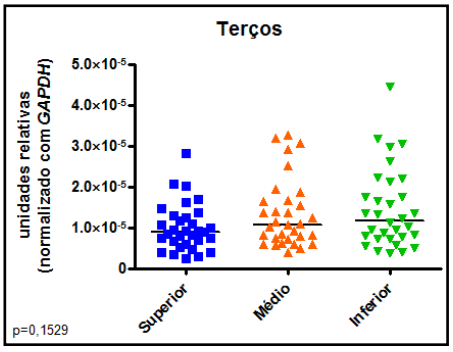
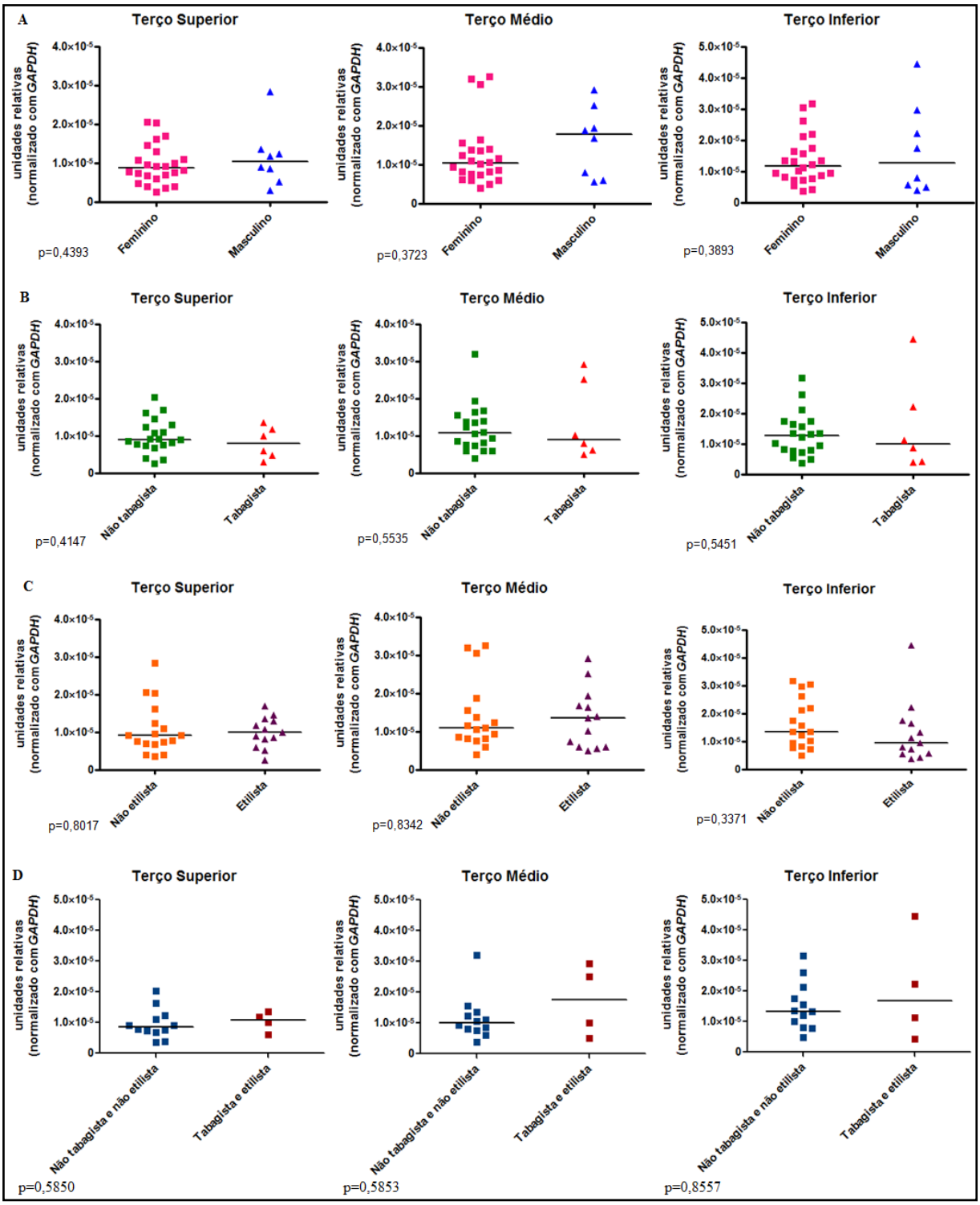


Tabela 9: Associação entre a expressão de *CHRNB4* com a idade nos três terços avaliados.

Critério	Terços do Esôfago Saudável	Mediana de expressão de *CHRNB4*	*CHRNB4* Mediana de idade (mínimo-máximo)	Valor de p
Idade (variável contínua)	Superior	> Mediana	48,50 anos (20-74)	*p= 0,0433
		≤ Mediana	61,50 anos (31-84)	
	Médio	> Mediana	56,50 anos (31-74)	p= 0,9679
		≤ Mediana	58 anos (20-84)	
	Inferior	> Mediana	63,50 anos (40-81)	*p= 0,0131
		≤ Mediana	48,50 anos (20-84)	

Legenda: *p estatisticamente significativo.
Nota: Valor da mediana de expressão da subunidade β4 para o terço superior: 9,03E-06; Valor da mediana de expressão da subunidade β4 para o terço médio: 1,08E-05; Valor da mediana de expressão da subunidade β4 para o terço inferior: 1,17E-05.

Figura 26: Comparação de expressão de *CHRNB4* de acordo com o gênero, tabagismo, etilismo e os dois fatores de risco associados nos três terços de esôfago saudável.



Legenda: A- Comparação de expressão de *CHRNB4* entre indivíduos do sexo masculino e feminino no terço superior; no terço médio e no terço inferior de esôfago saudável. B - Comparação de expressão de *CHRNB4* entre indivíduos não tabagistas e tabagistas no terço superior; no terço médio e no terço inferior de esôfago saudável. C - Comparação de expressão de *CHRNB4* entre indivíduos não etilistas e etilistas no terço superior; no terço médio e no terço inferior de esôfago saudável. D - Comparação de expressão de *CHRNB4* entre indivíduos não tabagistas e não etilistas com indivíduos tabagistas e etilistas no terço superior; no terço médio e no terço inferior de esôfago saudável.

Por fim, buscando uma possível associação entre a expressão gênica das diferentes subunidades dos *CHRNs*, foi realizada uma análise de correlação. Foram observadas associações positivas entre as subunidades α7 e β4 no terço superior (Tabela 10), entre as subunidades α3 e β4 nos três terços (Tabelas 10, 11 e 12), e as subunidades α3 e α7 no terço inferior (Tabela 12).

Tabela 10: Matriz de correlação entre a expressão gênica de *CHRNs* no terço superior de esôfago saudável.

	***CHRNA3* Superior**	***CHRNA5* Superior**	***CHRNA7* Superior**	***CHRNB4* Superior**
***CHRNA3* Superior**		p=0,369	p=0,296	**p=0,020**
***CHRNA5* Superior**	r=0,16		p=0,800	p=0,866
***CHRNA7* Superior**	r=0,18	r=0,044		**p=0,014**
***CHRNB4* Superior**	r=0,41	r=0,031	r=0,43	

Legenda: Em negrito, os valores de p estatisticamente significativo.

Tabela 11: Matriz de correlação entre a expressão gênica de *CHRNs* no terço médio de esôfago saudável.

	***CHRNA3* Médio**	***CHRNA5* Médio**	***CHRNA7* Médio**	***CHRNB4* Médio**
***CHRNA3* Médio**		p=0,822	p=0,203	**p=0,007**
***CHRNA5* Médio**	r=-0,04		p=0,727	p=0,672
***CHRNA7* Médio**	r=0,22	r=0,06		p=0,193
***CHRNB4* Médio**	r=0,47	r=-0,079	r=0,24	

Legenda: Em negrito, os valores de p estatisticamente significativo.

Tabela 12: Matriz de correlação entre a expressão gênica de *CHRNs* no terço inferior de esôfago saudável.

	***CHRNA3* Inferior**	***CHRNA5* Inferior**	***CHRNA7* Inferior**	***CHRNB4* Inferior**
***CHRNA3* Inferior**		p=0,782	**p=0,008**	**p=1,607010e-007**
***CHRNA5* Inferior**	r=0,05		p=0,755	p=0,178
***CHRNA7* Inferior**	r=0,45	r=0,054		p=0,576
***CHRNB4* Inferior**	r=0,8	r=-0,25	r=0,103	

Legenda: Em negrito, os valores de p estatisticamente significativo.

Por fim, é importante ressaltar que as subunidades, α2, α6, β2 e β3 não foram analisadas devido à falta de um controle positivo para a realização da curva-padrão. O Quadro 4 sumariza os resultados de expressão das subunidades de *CHRNs* anlisadas nas amostras de esôfago de indivíduos saudáveis.

Quadro 4: Resultados da expressão de *CHRNs* nas amostras de esôfago de indivíduos saudáveis

Subunidade	**Controle Positivo**	**Expressão no esôfago saudável**	**Correlação de expressão com a idade**	**Correlação de expressão entre as subunidades**
CHRNA1	U-251 58,1°C	Sem/Baixa expressão	Não foi avaliado	Não foi avaliado
CHRNA2	-	-	-	-
CHRNA3	A549 60°C	↓ Etilista terço inferior	Sem correlação	Correlação com *CHRNA7* terço inferior Correlação com *CHRNB4* nos três terços
CHRNA4	TE-1 60°C	Sem/Baixa expressão	Não foi avaliado	Não foi avaliado
CHRNA5	A549 60°C	Sem diferença de expressão	Sem correlação	Sem correlação
CHRNA6	-	-	-	-
CHRNA7	A549 60°C	↓ Tabagista terço superior	Sem correlação	Correlação com *CHRNA3* terço inferior Correlação com *CHRNB4* terço superior
CHRNA9	U-251 62°C	Sem expressão	Não foi avaliado	Não foi avaliado
CHRNA10	U-251 60°C	Sem/Baixa expressão	Não foi avaliado	Não foi avaliado
CHRNB2	-	-	-	-
CHRNB3	-	-	-	-
CHRNB4	A549 60°C	Sem diferença de expressão	↓ Maior idade terço superior ↑ Maior idade terço inferior	Correlação com *CHRNA7* terço superior Correlação com *CHRNA3* nos três terços

Legenda: - sem controle positivo, conseqüentemente, sem análise de expressão. ↑- maior expressão da subunidade; ↓ - menor expressão da subunidade.

3.2 **Análise de expressão de *CHRNs* nas amostras de esôfago de pacientes com CEE**

3.2.1 Caracterização dos pacientes com CEE incluídos no estudo

As características clínico-patológicas dos pacientes que fizeram parte deste estudo estão demonstradas na tabela 13. De acordo com os dados, a maioria dos indivíduos foi do sexo masculino (73,7%) e a média de idade foi de 61,95 anos ± 9,015. Os indivíduos eram em sua maioria tabagistas ativos (52,6% dos casos) e etilistas ativos (52,6% dos casos). Somente 3 indivíduos não foram a óbito (15,8% dos casos). O principal sítio acometido foi o terço médio, com 9 indivíduos (47,3%); quanto ao grau de diferenciação, o mais frequente foi o moderadamente diferenciado (68,4% dos casos) e em relação ao estadiamento, os estádios 3 e 4 representaram 57,9 % dos casos.

Tabela 13: Características clínico-patológicas dos pacientes com CEE incluídos nesse estudo.

Número total de indivíduos	**19**
Critérios Avaliados	**Números de Indivíduos (%)**
Idade	61,95 anos ± 9,015
Gênero	
Masculino	14 (73,7%)
Feminino	5 (26,3%)
Tabagismo	
Não tabagista	1 (5,3%)
Tabagista ativo	10 (52,6%)
Ex-tabagista	8 (42,1%)
Etilismo	
Não etilista	2 (10,5%)
Etilista ativo	10 (52,6%)
Ex-etilista	7 (36,9%)
Óbito	
Não	3 (15,8%)
Sim	16 (84,2%)
Localização do Tumor	
Superior	7 (36,9%)
Médio	9 (47,3%)
Inferior	3 (15,8%)
Grau de Diferenciação do Tumor	
Pouco	5 (26,3%)
Moderadamente	13 (68,4%)
Bem	1 (5,3%)
Estadiamento Clínico	
1 + 2	6 (31,6%)
3 + 4	11 (57,9%)
Não determinado	2 (10,5%)

3.2.2 Análise da expressão das subunidades de *CHRNs*

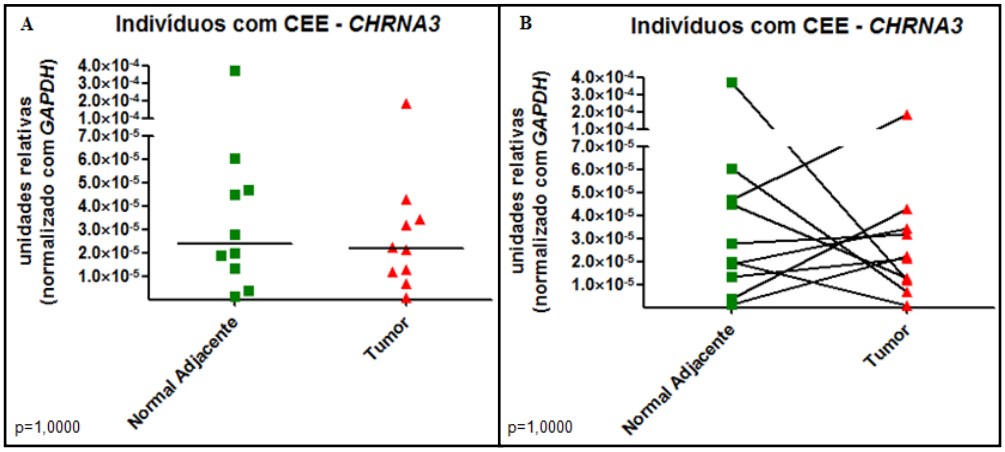
Após a caraterização dos pacientes com CEE, foram selecionadas para análises posteriores as subunidades α3, α5, α7 e β4 por serem aquelas expressas nas amostras de esôfago de indivíduos saudáveis. O número total de pares de amostras foi de 10, 19, 19 e 10 para análise da expressão de *CHRNA3*, *CHRNA5*, *CHRNA7* e *CHRNB4*, respectivamente. Não

foi incluído o mesmo número de amostras na análise da expressão de todas as subunidades, pois as análises foram iniciadas com 10 pares de tumor e tecido normal adjacente e aquelas subunidades que apresentaram uma tendência de diferença de expressão entre os pares (*CHRNA5* e *CHRNA7*) teve o número de amostras aumentado, com o objetivo de ganhar poder estatístico.

- Subunidade α3:

As análises para essa subunidade demonstraram que não há diferença de expressão desse gene entre o tumor e a mucosa normal adjacente de pacientes com CEE, apresentando um perfil de expressão bem heterogêneo, em que alguns pacientes apresentaram um aumento de expressão da subunidade α3 enquanto outros apresentaram redução ou não apresentaram diferença de expressão dessa subunidade (Figura 27).

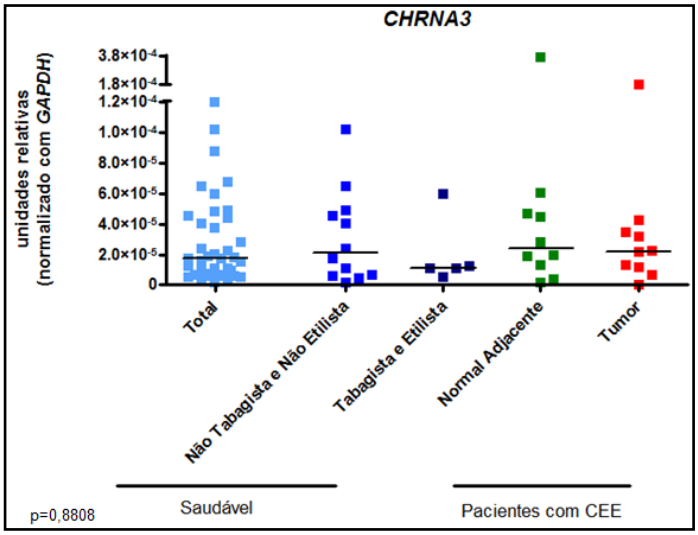
Figura 27: Análise da expressão gênica de *CHRNA3* em amostras de esôfago de pacientes com CEE.



Legenda: A – Comparação do perfil de expressão de *CHRNA3* entre a mucosa normal adjacente e tumoral de esôfago de pacientes com CEE. B – Variação de expressão de *CHRNA3* entre os pares de amostras de CEE e mucosa adjacente ao tumor. CEE – carcinoma epidermóide de esôfago.

Quando comparadas as amostras de esôfago de indivíduos saudáveis, agrupados em total de indivíduos, indivíduos não tabagistas e não etilistas e indivíduos tabagistas e etilistas, com as de pacientes com CEE, também não foi encontrada diferença de expressão dessa subunidade (Figura 28).

Figura 28: Comparação da expressão de *CHRNA3* entre o total de indivíduos, indivíduos não tabagistas e não etilistas, indivíduos tabagistas e etilistas de esôfago saudável e pacientes com CEE.



Além disso, foi feita correlação entre o *Fold Change* (FC) (razão entre a expressão no tumor e no tecido normal adjacente) dessa subunidade com os dados clínico-patológicos. Os critérios utilizados foram gênero (masculino e feminino), tabagismo (não tabagista + ex-tabagista e tabagista ativo), etilismo (não etilista + ex-etilista e etilista ativo), subsítio (superior, médio e inferior), grau de diferenciação (bem + moderadamente diferenciado e pouco diferenciado) e o estadiamento (estádios 1+2 e 3+4). Já nas análises referentes à idade, variável contínua, foi utilizada a mediana do FC da subunidade (indivíduos com FC > ou ≤ que a mediana, cujo valor foi 1,377673). Não foi observada nenhuma associação da expressão da subunidade α3 com os dados clínico-patológicos (Tabela 14).

Tabela 14: Associação da expressão de *CHRNA3* no *Fold Change* com os dados clínico-patológicos dos pacientes com CEE.

Dados clínico-patológicos	Número de Indivíduos (Total: 10)	*Fold Change* (FC) *CHRNA3* Mediana (mínimo-máximo)	Valor de p
Idade (variável contínua)			
Indivíduos com FC > que mediana	5	60 anos (58-73)	p= 0,3560
Indivíduos com FC ≤ que mediana	5	66 anos (58-78)	
Gênero			
Masculino	8	1,720 (0,03136-14,69)	NA
Feminino	2	0,07570 (0,03610- 0,1153)	
Tabagismo			
Não tabagista + Ex-Tabagista	4	6,215 (0,2908-14,69)	p=0,1143
Tabagista ativo	6	0,6221 (0,03136-3,904)	
Etilismo			
Não etilista + Ex-Etilista	3	0,2908 (0,03136-10,62)	p=0,6667
Etilista ativo	7	1,626 (0,03610-14,69)	
Subsítio[1*]			
Superior	6	0,2031 (0,03136-14,69)	p=0,3810
Médio	3	1,626 (1,129-10,62)	
Inferior	1	NA	
Grau de Diferenciação do Tumor			
Bem + Moderadanente diferenciados	8	1,471 (0,03136-14,69)	NA
Pouco diferenciado	2	0,9586 (0,2908-1,626)	
Estadiamento clínico[2*]			
1+2	3	3,904 (0,03610-10,62)	p=0,3929
3+4	5	1,129 (0,03136-1,813)	

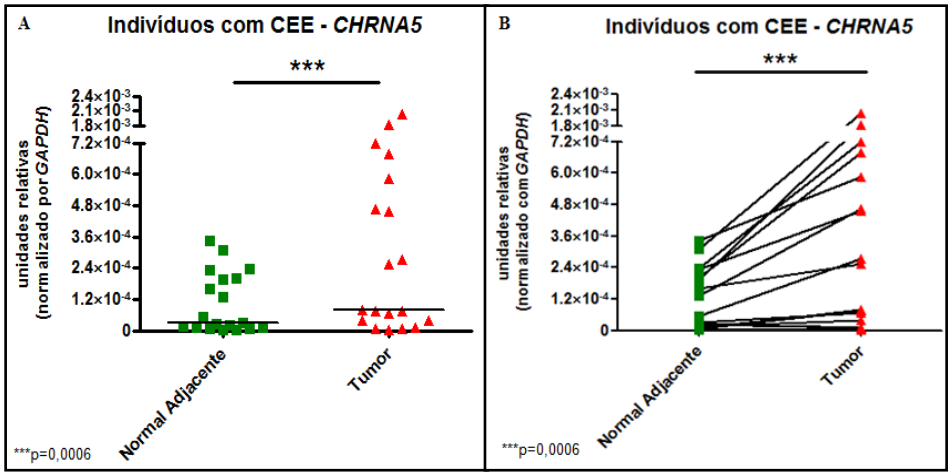
Legenda: NA - não aplicado, não foi possível analisar devido ao número pequeno de amostras. [1*] - como o número de amostras para o terço inferior foi muito pequeno, a análise estatística foi feita entre os terços superior e médio (Teste Mann Whitney). [2*] - Duas amostras não determinadas.

Nota: Para as análises com a variável idade, os indivíduos foram divididos em dois grupos de acordo com o *Fold Change* e foi comparada então a idade dos indivíduos entre os dois grupos. Foi utilizada como critério para a análise a mediana do FC da subunidade (indivíduos com FC > ou ≤ que a mediana). O valor da mediana do FC da subunidade α3 foi 1,377673.

- Subunidade α5:

As análises para essa subunidade demonstraram que a mucosa tumoral apresenta uma expressão significativamente maior dessa subunidade quando comparada com o tecido normal adjacente de pacientes com CEE, p=0,0006 (Figura 29).

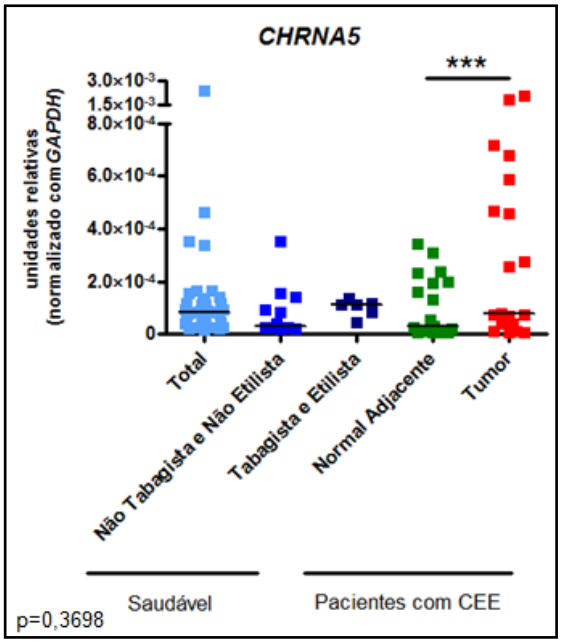
Figura 29: Análise da expressão gênica de *CHRNA5* em amostras de esôfago de pacientes com CEE.



Legenda: A – Comparação do perfil de expressão de *CHRNA5* entre a mucosa normal adjacente e tumoral de esôfago de pacientes com CEE. B – Variação de expressão de *CHRNA5* entre os pares de amostras de CEE e mucosa adjacente ao tumor. CEE – carcinoma epidermóide de esôfago. *** p estatisticamente significativo.

Além disso, também foi avaliada a expressão dessa subunidade comparando as amostras de esôfago de indivíduos saudáveis, ou seja, total de indivíduos, indivíduos não tabagistas e não etilistas e indivíduos tabagistas e etilistas, com as de pacientes com CEE, porém não foi encontrada diferença de expressão dessa subunidade (Figura 30).

Figura 30: Comparação da expressão de *CHRNA5* entre o total de indivíduos, indivíduos não tabagistas e não etilistas, indivíduos tabagistas e etilistas de esôfago saudável e pacientes com CEE.



Legenda: ***p=0,0006.

Além disso, foi feita correlação entre o *Fold Change* dessa subunidade com os dados clínico-patológicos. Os critérios utilizados foram os mesmos das análises de α3. Foi observada associação apenas com a localização do tumor. A diferença de expressão entre o tumor e o tecido normal adjacente (*Fold Change*) é maior quando temos o acometimento do terço inferior em comparação ao acometimento do terço superior (Tabela 15).

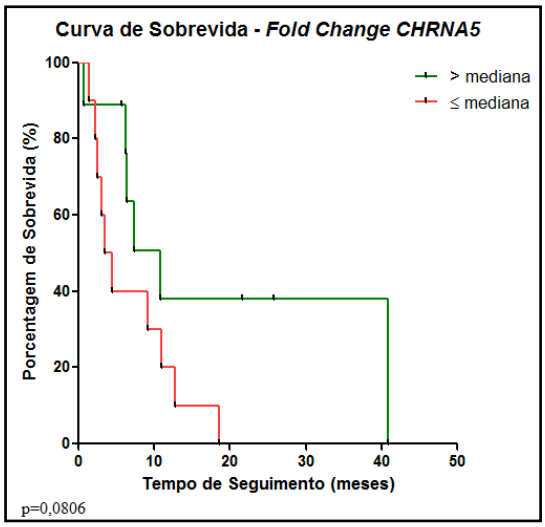
Tabela 15: Associação da expressão de *CHRNA5* no *Fold Change* com os dados clínico-patológicos dos pacientes com CEE.

Dados clínico-patológicos	Número de Indivíduos (Total: 19)	*Fold Change* (FC) *CHRNA5* Mediana (mínimo-máximo)	Valor de p
Idade (variável contínua)			
Indivíduos com FC > que mediana	9	58 anos (46-69)	p= 0,0684
Indivíduos com FC ≤ que mediana	10	63 anos (53-79)	
Gênero			
Masculino	14	3,2 (0,4-15)	p=0,1165
Feminino	5	1,7 (0,5-2,5)	
Tabagismo			
Não tabagista + Ex-Tabagista	9	2,2 (0,4-11,6)	p=0,9349
Tabagista ativo	10	2,7 (0,4-15)	
Etilismo			
Não etilista + Ex-Etilista	9	2,2 (0,4-11,6)	p=0,9349
Etilista ativo	10	2,7 (0,4-15)	
Subsítio			
Superior	7	1,6 (0,4-6,3)	*p=0,0298
Médio	9	2,9 (1,7-11,6)	
Inferior	3	9,3 (3,4-15)	
Grau de Diferenciação do Tumor			
Bem + Moderadanente diferenciado	14	2,7 (0,4-15)	p=0,9631
Pouco diferenciado	5	2,2 (1,8-5)	
Estadiamento clínico[2*]			
1+2	6	5,9 (1,6-15)	p=0,0662
3+4	11	2,9 (0,4-6,5)	

Legenda: *p estatisticamente significativo. [2*] - Duas amostras não determinadas.
Nota: Para as análises com a variável idade, os indivíduos foram divididos em dois grupos de acordo com o *Fold Change* e foi comparada então a idade dos indivíduos entre os dois grupos. Foi utilizada como critério para a análise a mediana do FC da subunidade (indivíduos com FC > ou ≤ que a mediana). O valor da mediana do FC da subunidade α5 foi 2,5.

Com relação à sobrevida, aos 20 meses, 40% dos indivíduos com *Fold Change* de *CHRNA5* maior que a mediana (valor da mediana = 2,5) ainda estavam vivos enquanto todos os indivíduos com *Fold Change* menor ou igual à mediana já tinham ido a óbito, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 31).

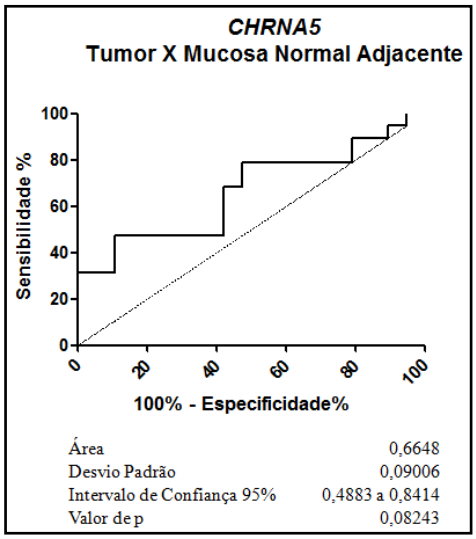
Figura 31: Curva de Kaplan-Meier apresentando a sobrevida dos pacientes com CEE em relação à expressão de *CHRNA5*.



Nota: O critério utilizado para análise de sobrevida foi a mediana do FC da subunidade (indivíduos com FC > ou ≤ que a mediana). O valor da mediana do FC da subunidade α5 foi 2,5.

Além disso, foi analisado o valor preditivo de alterações histológicas no epitélio esofágico utilizando o valor de expressão da subunidade α5, através da curva ROC ("Receiver Operating Characteristic"). Assim, o objetivo foi avaliar a sensibilidade e especificidade da expressão dessa subunidade em discriminar os dois tecidos, o tumoral e o normal adjacente ao tumor. A expressão de *CHRNA5* foi capaz de distinguir o tumor da mucosa normal adjacente com 79% de sensibilidade e 52% de especificidade, porém não foi estatisticamente significativo (Figura 32).

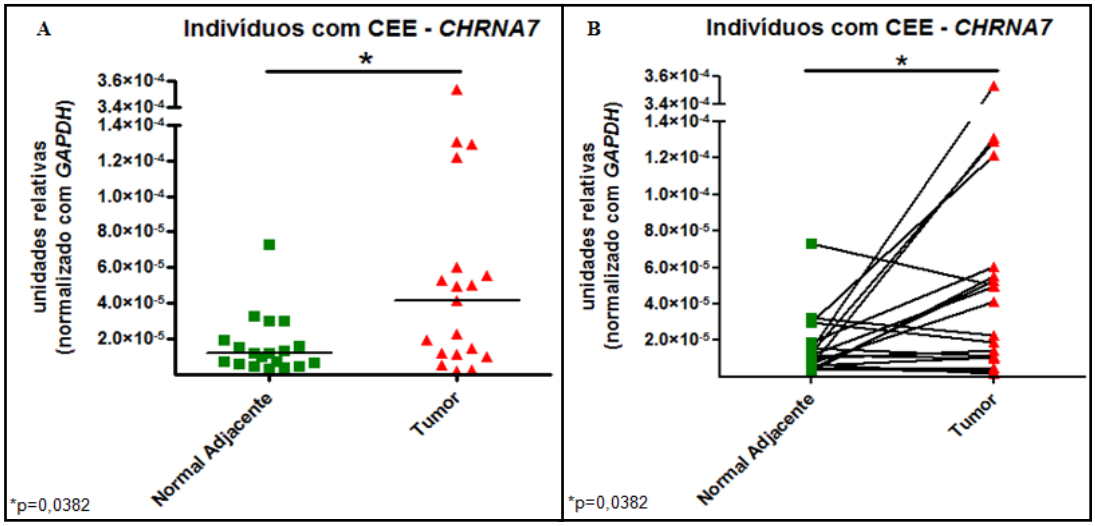
Figura 32: Curva ROC exibindo o poder discriminativo entre o epitélio tumoral e a mucosa normal adjacente ao tumor utilizando como base valores de expressão de *CHRNA5*.



➢ Subunidade α7:

As análises demonstraram que as amostras tumorais apresentam aumento significativo de expressão dessa subunidade quando comparadas com o tecido normal adjacente de pacientes com CEE, p = 0,0382 (Figura 33).

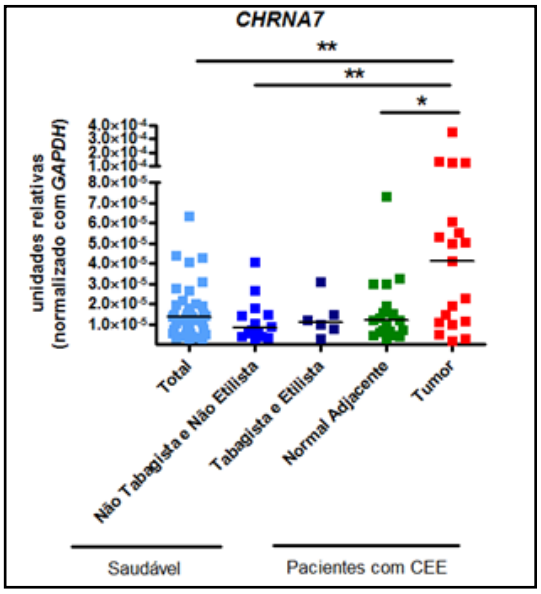
Figura 33: Análise da expressão gênica de *CHRNA7* em amostras de esôfago de pacientes com CEE.



Legenda: A – Comparação do perfil de expressão de *CHRNA7* entre a mucosa normal adjacente e tumoral de esôfago de pacientes com CEE. B – Variação de expressão de *CHRNA7* entre os pares de amostras de CEE e mucosa adjacente ao tumor. CEE – carcinoma epidermóide de esôfago. * p estatisticamente significativo.

Além disso, também foi avaliada a expressão dessa subunidade comparando as amostras de esôfago de indivíduos saudáveis separadas em total de indivíduos, indivíduos não tabagistas e não etilistas e indivíduos tabagistas e etilistas, com as de pacientes com CEE. As amostras tumorais de esôfago apresentaram uma expressão significativamente maior dessa subunidade quando comparadas com as de tecido normal adjacente de esôfago de pacientes com CEE e de amostras de esôfago de indivíduos saudáveis totais e de indivíduos saudáveis não tabagistas e não etilistas (Figura 34).

Figura 34: Comparação da expressão de *CHRNA7* entre o total de indivíduos, indivíduos não tabagistas e não etilistas, indivíduos tabagistas e etilistas de esôfago saudável e pacientes com CEE.



Nota: As amostras de tumor apresentaram uma expressão significativamente maior dessa subunidade em relação ao tecido normal adjacente de esôfago de pacientes com CEE (*p=0,0382) e das amostras de esôfago de indivíduos saudáveis totais (**p=0,0100) e de indivíduos saudáveis não tabagistas e não etilistas (**p=0,0083).

Além disso, foi feita correlação entre *Fold Change* dessa subunidade e os dados clínico-patológicos. Os critérios utilizados foram os mesmos das análises das demais subunidades. Não foi observada nenhuma associação da expressão da subunidade α7 com os dados clínico-patológicos (Tabela 16).

Tabela 16: Associação da expressão de *CHRNA7* no *Fold Change* com os dados clínico-patológicos dos pacientes com CEE.

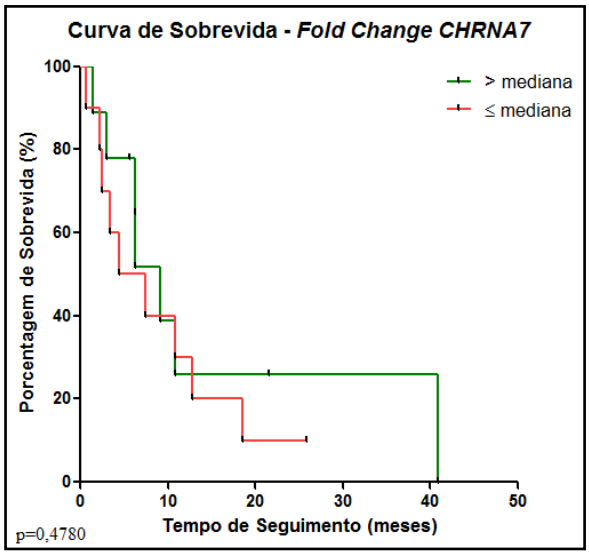
Dados clínico-patológicos	Número de Indivíduos (Total: 19)	*Fold Change* (FC) *CHRNA7* Mediana (mínimo-máximo)	Valor de p
Idade (variável contínua)			
Indivíduos com FC > que mediana	9	62 anos (46-79)	p=0,5404
Indivíduos com FC ≤ que mediana	10	58,50 anos (53-78)	
Gênero			
Masculino	14	3,6 (0,6-23)	p=0,5464
Feminino	5	1,5 (0,3-20,5)	
Tabagismo			
Não tabagista + Ex-Tabagista	9	1,5 (0,6-20,5)	p=0,7434
Tabagista ativo	10	4,1 (0,3-23)	
Etilismo			
Não etilista + Ex-Etilista	9	3,2 (0,7-20,5)	p=0,2354
Etilista ativo	10	0,75 (0,3-23)	
Subsítio			
Superior	7	0,8 (0,3-4)	p=0,1597
Médio	9	5,6 (0,6-23)	
Inferior	3	4,2 (0,7-13,4)	
Grau de Diferenciação do Tumor			
Bem + Moderadanente diferenciados	14	1,15 (0,3-23)	p=0,3781
Pouco diferenciado	5	3,2 (1,1-18,5)	
Estadiamento clínico[2*]			
1+2	6	5,7 (0,7-20,5)	p=0,8799
3+4	11	3,2 (0,6-23)	

Legenda: [2*] - Duas amostras não determinadas.

Nota: Para as análises com a variável idade, os indivíduos foram divididos em dois grupos de acordo com o *Fold Change* e foi comparada então a idade dos indivíduos entre os dois grupos. Foi utilizada como critério para a análise a mediana do FC da subunidade (indivíduos com FC > ou ≤ que a mediana). O valor da mediana do FC da subunidade α7 foi 1,8.

A expressão de *CHRNA7* não impactou na sobrevida dos pacientes com CEE (Figura 35).

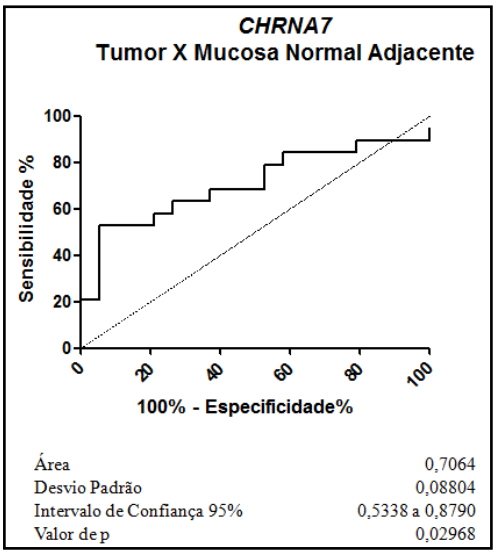
Figura 35: Curva de Kaplan-Meier apresentando a sobrevida dos pacientes com CEE em relação à expressão de *CHRNA7*.



Nota: O critério utilizado para análise de sobrevida foi a mediana do FC da subunidade (indivíduos com FC > ou ≤ que a mediana). O valor da mediana do FC da subunidade α7 foi 1,8.

Através da curva ROC, a expressão de *CHRNA7* foi capaz de distinguir significativamente o tumor da mucosa normal adjacente com 63% de sensibilidade e 73% de especificidade (Figura 36).

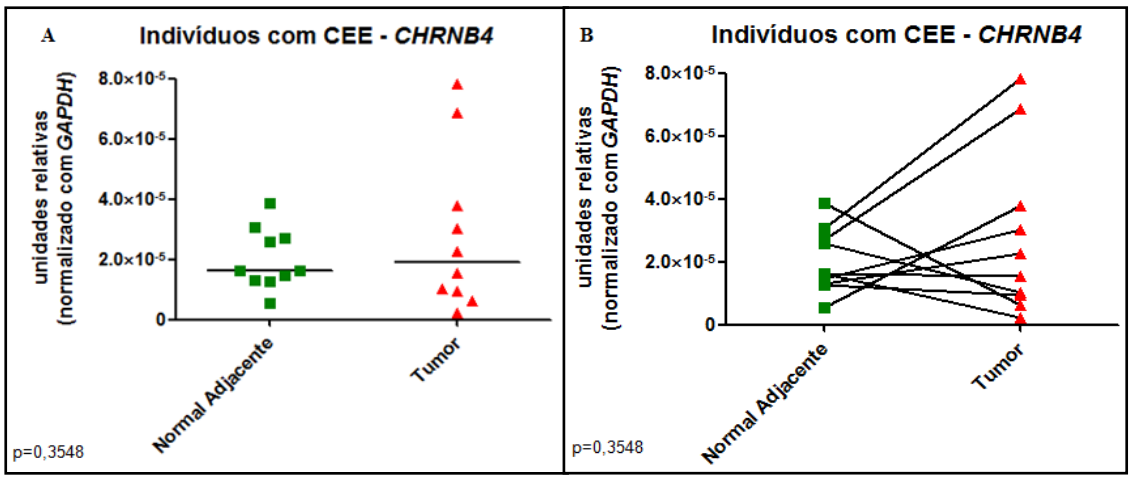
Figura 36: Curva ROC exibindo o poder discriminativo entre o epitélio tumoral e a mucosa normal adjacente ao tumor utilizando como base valores de expressão de *CHRNA7*.



➢ Subunidade β4:

As análises para essa subunidade demonstraram que não houve diferença de expressão desse gene entre o tumor e o tecido normal adjacente de pacientes com CEE, sendo o perfil de expressão heterogêneo, em que alguns pacientes apresentaram um aumento de expressão da subunidade β4 enquanto outros apresentaram redução ou não apresentaram diferença de expressão dessa subunidade (Figura 37).

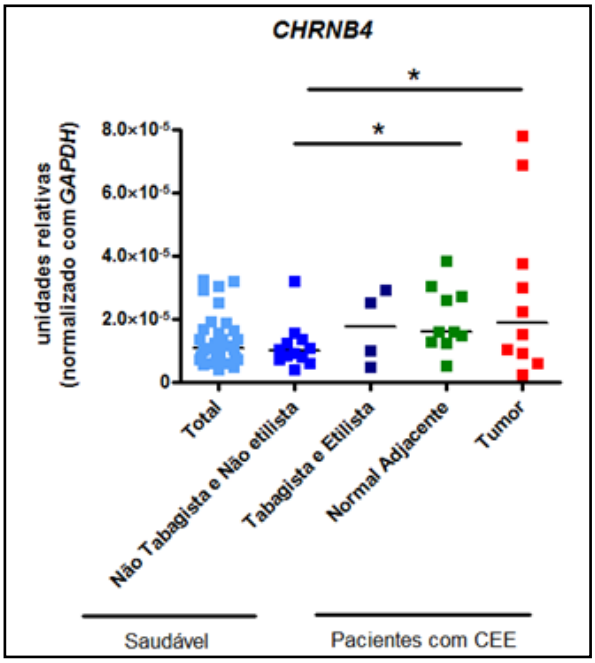
Figura 37: Análise da expressão gênica de *CHRNB4* em amostras de esôfago de pacientes com CEE.



Legenda: A – Comparação do perfil de expressão de *CHRNB4* entre a mucosa normal adjacente e tumoral de esôfago de pacientes com CEE. B – Variação de expressão de *CHRNB4* entre os pares de amostras de CEE e mucosa adjacente ao tumor. CEE – carcinoma epidermóide de esôfago.

Em seguida, comparamos as amostras de esôfago de indivíduos saudáveis, ou seja, total de indivíduos, indivíduos não tabagistas e não etilistas e indivíduos tabagistas e etilistas, com as de pacientes com CEE. Foi observado que as amostras tumorais e de tecido normal adjacente de esôfago de pacientes com CEE apresentaram expressão significativamente maior desse receptor quando comparadas com as amostras de esôfago de indivíduos saudáveis não tabagistas e não etilistas (Figura 38).

Figura 38: Comparação da expressão de *CHRNB4* entre o total de indivíduos, indivíduos não tabagistas e não etilistas, indivíduos tabagistas e etilistas de esôfago saudável e pacientes com CEE.



Nota: As amostras tumorais e o tecido normal adjacente apresentaram uma expressão significativamente maior dessa subunidade quando comparada com as amostras de esôfago de indivíduos saudáveis não tabagistas e não etilistas, *p=0,0488 e *p=0,0327, respectivamente.

Além disso, foi feita correlação entre o *Fold Change* (razão entre a expressão no tumor e no tecido normal adjacente) dessa subunidade com os dados clínico-patológicos, como feito para as demais subunidades analisadas. Não foi observada nenhuma associação da expressão da subunidade β4 com os dados clínico-patológicos (Tabela 17).

Tabela 17: Associação da expressão de *CHRNB4* no *Fold Change* com os dados clínico-patológicos dos pacientes com CEE.

Dados clínico-patológicos	Número de Indivíduos (Total: 10)	*Fold Change* (FC) *CHRNB4* Mediana (mínimo-máximo)	Valor de p
Idade (variável contínua)			
Indivíduos com FC > que mediana	5	62 anos (58-73)	p=0,5079
Indivíduos com FC ≤ que mediana	5	66 anos (58-78)	
Gênero			
Masculino	8	1,904 (0,3964-7,119)	NA
Feminino	2	0,15 (0,1414-0,1586)	
Tabagismo			
Não tabagista + Ex-Tabagista	4	2,291 (0,7518-7,119)	p=0,1714
Tabagista ativo	6	0,6767 (0,1414-2,552)	
Etilismo			
Não etilista + Ex-Etilista	3	2,051 (0,3964-2,532)	p=0,8333
Etilista ativo	7	0,9571 (0,1414-7,119)	
Subsítio[1*]			
Superior	6	0,5741 (0,1414-7,119)	p=0,5476
Médio	3	1,757 (0,9571-2,051)	
Inferior	1	NA	
Grau de Diferenciação do Tumor			
Bem + Moderadanente diferenciados	8	0,8544 (0,1414-7,119)	NA
Pouco diferenciado	2	2,144 (1,757-2,532)	
Estadiamento clínico[2*]			
1+2	3	2,051 (0,1414-2,552)	p=0,7857
3+4	5	0,9571 (0,3964-2,532)	

Legenda: NA - não aplicado, não foi possível analisar devido ao número pequeno de amostras. [1*] - como o número de amostras para o terço inferior foi muito pequeno, a análise estatística foi feita entre os terços superior e médio (Teste Mann Whitney). [2*] - Duas amostras não determinadas.

Nota: Para as análises com a variável idade, os indivíduos foram divididos em dois grupos de acordo com o *Fold Change* e foi comparada então a idade dos indivíduos entre os dois grupos. Foi utilizada como critério para a análise a mediana do FC da subunidade (indivíduos com FC > ou ≤ que a mediana). O valor da mediana do FC da subunidade β4 foi 1,357159.

Por fim, buscando uma possível correlação entre a expressão gênica de *CHRNs* no tecido tumoral e no tecido normal adjacente ao tumor, foi realizada uma análise de correlação e foram observadas correlações positivas entre as subunidades α3 e β4 em ambos os tecidos (Tabela 18 e 19).

Tabela 18: Matriz de correlação entre a expressão gênica das subunidades de *CHRNs* no tecido normal adjacente ao tumor.

	CHRNA3	***CHRNA5***	***CHRNA7***	***CHRNB4***
CHRNA3		p=0,560	p=0,811	**p=0,0016**
CHRNA5	r=0,212		p=0,416	p=0,946
CHRNA7	r=-0,091	r=-0,198		p=0,492
CHRNB4	r=0,879	r=0,030	r= -0,248	

Legenda: Em negrito, o valor de p significativo.

Tabela 19: Matriz de correlação entre o *Fold Change* de expressão gênica das subunidades de *CHRNs* no tecido tumoral.

	CHRNA3	***CHRNA5***	***CHRNA7***	***CHRNB4***
CHRNA3		p=0,368	p=0,537	**p=0,011**
CHRNA5	r=0,321		p=0,147	p=0,759
CHRNA7	r=0,224	r=0,346		p=0,330
CHRNB4	r=0,782	r=0,115	r=0,345	

Legenda: Em negrito, o valor de p significativo.

O quadro 5 resume as análises de expressão de *CHRNs* encontradas nas amostras de esôfago de indivíduos saudáveis e de pacientes com CEE.

Quadro 5: Análise de expressão de *CHRNs* nas amostras de esôfagos de indivíduos saudáveis e de pacientes com CEE.

Subunidade	**Controle Positivo**	**Expressão no esôfago saudável**	**Expressão em CEE**	**Expressão no CEE e no Esôfago Saudável**	**Associação de expressão de *CHRNs* com os dados clínico-patológicos CEE**	**Correlação de expressão entre as subunidades no CEE**
CHRNA1	U-251 58,1°C	Sem/Baixa expressão	Não foi avaliado	Não foi avaliado	Não foi avaliado	Não foi avaliado
CHRNA2	-	-	-	-	-	-
CHRNA3	A549 60°C	↓ Etilista terço inferior	Sem diferença de expressão	Sem diferença de expressão	Sem associação	Correlação com *CHRNB4* tecido normal adjacente ao tumor *Fold Change* no tecido tumoral
CHRNA4	TE-1 60°C	Sem/Baixa expressão	Não foi avaliado	Não foi avaliado	Não foi avaliado	Não foi avaliado
CHRNA5	A549 60°C	Sem diferença de expressão	↑ Amostras de tecido tumoral	Sem diferença de expressão	↑ Subsítio inferior em relação ao superior	Sem correlação
CHRNA6	-	-	-	-	-	-
CHRNA7	A549 60°C	↓ Tabagista terço superior	↑ Amostras de tecido tumoral	↑ Tumor em relação Saudável Total e Saudável não tabagista e não etilista	Sem associação	Sem correlação
CHRNA9	U-251 62°C	Sem expressão	Não foi avaliado	Não foi avaliado	Não foi avaliado	Não foi avaliado
CHRNA10	U-251 60°C	Sem/Baixa expressão	Não foi avaliado	Não foi avaliado	Não foi avaliado	Não foi avaliado
CHRNB2	-	-	-	-	-	-
CHRNB3	-	-	-	-	-	-
CHRNB4	A549 60°C	Sem diferença de expressão	Sem diferença de expressão	↑ Tumor e no tecido normal adjacente em relação Saudável não tabagista e não etilista	Sem associação	Correlação com *CHRNA3* tecido normal adjacente ao tumor *Fold Change* no tecido tumoral

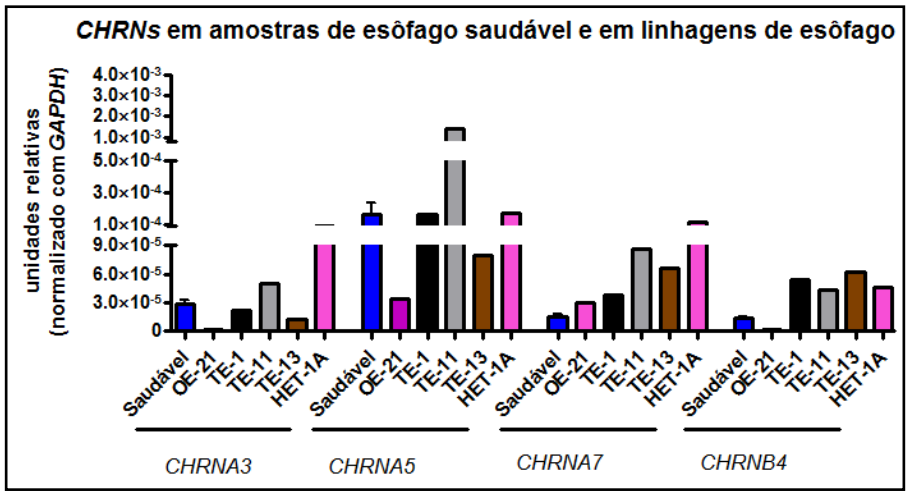
Legenda: - sem controle positivo, conseqüentemente, sem análise de expressão. ↑ - maior expressão da subunidade; ↓ - menor expressão da subunidade.

3.3 **Análise de expressão gênica das subunidades dos *CHRNs* em linhagens de esôfago humano frente ao tratamento com nicotina ou etanol**

3.3.1 Escolha das linhagens

Foi realizado um *screening* de expressão gênica das subunidades de *CHRNs*, selecionadas a partir das análises em amostras de esôfago de indivíduos saudáveis, em linhagens celulares de esôfago humano (Figura 39). Todas as linhagens expressaram as subunidades analisadas de *CHRNs*, sendo a linhagem OE-21 aquela que menos expressa os genes em questão. Foram escolhidas as linhagens TE-1 e TE-11, uma vez que essas linhagens apresentaram um perfil de expressão similar e/ou maior do que o encontrado nas amostras humanas saudáveis. A linhagem HET-1A foi descartada, pois além do cultivo celular demandar muito tempo, o tratamento com etanol mostrou-se altamente tóxico para essa linhagem.

Figura 39: Perfil de expressão gênica das subunidades de *CHRNs* em linhagens de esôfago humano comparadas com as amostras de esôfago de indivíduos saudáveis.

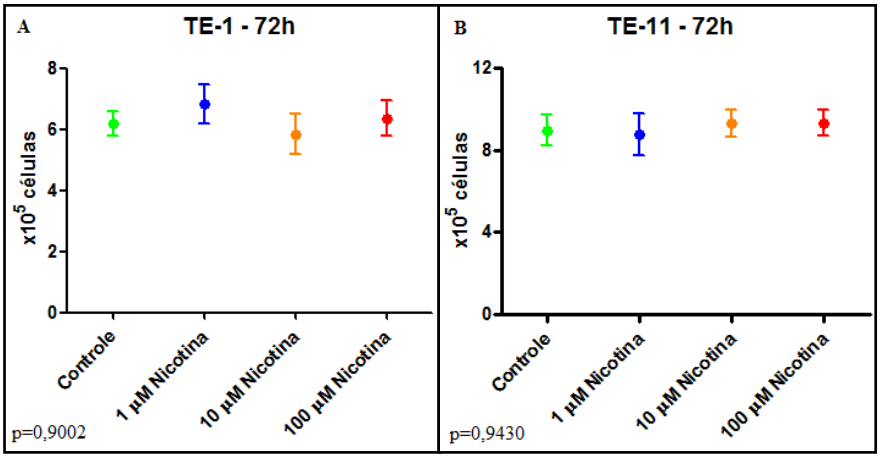


Legenda: Saudável – amostras de esôfago de indivíduos saudáveis; OE-21, TE-1, TE-11, TE-13 – linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago; HET-1A- linhagem celular de esôfago normal imortalizada com SV40.

3.3.2 Tratamento com Nicotina

As linhagens TE-1 e TE-11 foram tratadas com nicotina nas doses de 1 µM, 10 µM e 100 µM por 72h. Foram feitos três experimentos independentes em triplicata para cada dose e para o controle do tratamento. Após o tratamento, as células foram contadas. Na figura 40, podemos observar que o tratamento com nicotina não foi capaz de alterar o número de células viáveis em ambas as linhagens celulares.

Figura 40: Sobrevivência celular após tratamento com nicotina nas doses de 1 µM, 10 µM, 100 µM por 72h das linhagens celulares.

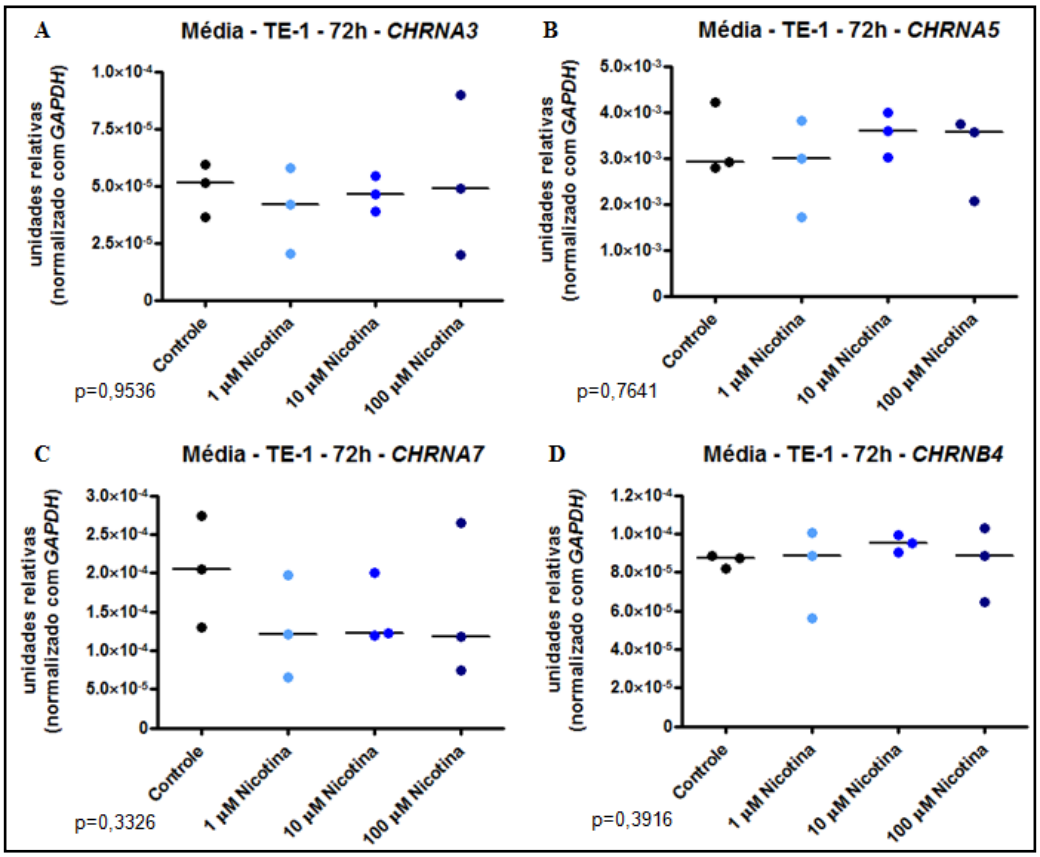


Legenda: A – Sobrevivência celular após tratamento com nicotina nas doses de 1 µM, 10 µM, 100 µM por 72h da linhagem TE-1; B – da linhagem TE-11.

3.3.2.1 Análise da expressão de *CHRNs* nas linhagens TE-1 e TE-11 frente ao tratamento com nicotina

Os dados obtidos mostraram que o tratamento com nicotina não alterou a expressão das subunidades de CHRN em comparação ao controle do tratamento na linhagem TE-1. (Figura 41).

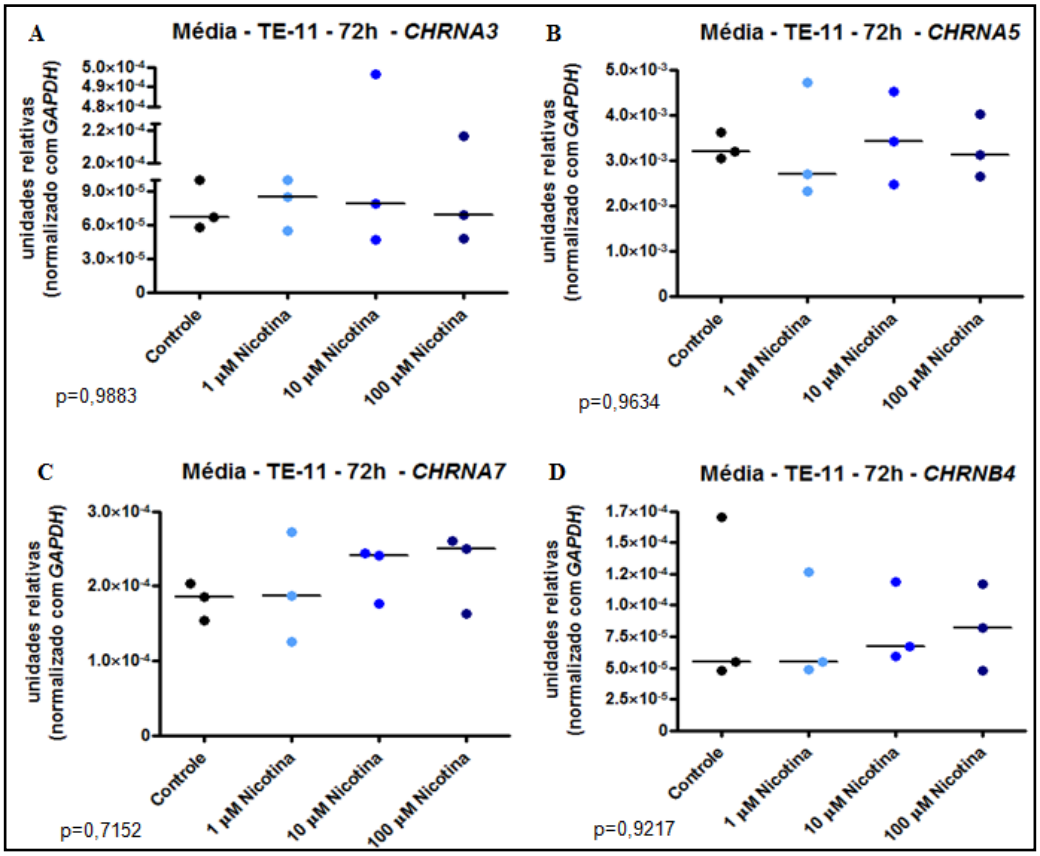
Figura 41: Comparação da expressão das diferentes subunidades de *CHRNs* frente ao tratamento com nicotina nas doses de 1 µM, 10 µM, 100 µM e o controle por 72h na linhagem TE-1.



Legenda: A - Comparação da expressão da subunidade α3; B – da subunidade α5; C – da subunidade α7; D – da subunidade β4 frente ao tratamento com nicotina nas doses de 1 µM, 10 µM, 100 µM e o controle por 72h na linhagem TE-1.

Assim como na linhagem TE-1, o tratamento com nicotina também não foi capaz de afetar a expressão das subunidades de CHRN em comparação ao controle do tratamento na linhagem TE-11. (Figura 42).

Figura 42: Comparação da expressão das diferentes subunidades de *CHRNs* frente ao tratamento com nicotina nas doses de 1 µM, 10 µM, 100 µM e o controle por 72h na linhagem TE-11.

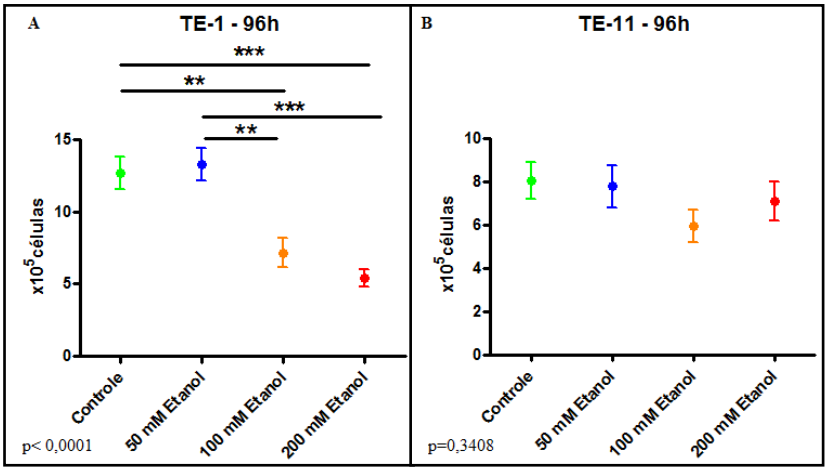


Legenda: A - Comparação da expressão da subunidade α3; B – da subunidade α5; C – da subunidade α7; D – da subunidade β4 frente ao tratamento com nicotina nas doses de 1 µM, 10 µM, 100 µM e o controle por 72h na linhagem TE-11.

3.3.3 Tratamento com Etanol

As linhagens TE-1 e TE-11 foram tratadas com etanol nas doses de 50 mM (0,2%), 100 mM (0,4%) e 200 mM (0,8%) por 96h. Foram feitos três experimentos independentes e em triplicata para cada dose e para o controle do tratamento. Após o tratamento, as células foram contadas. De acordo com os dados, o tratamento com etanol nas doses de 100 e 200 mM foi capaz de reduzir o número de células viáveis tanto em relação à dose de 50 mM quanto em relação ao controle na linhagem TE-1. Esse efeito, no entanto, não foi observado para a linhagem TE-11 (Figura 43).

Figura 43: Sobrevivência celular após tratamento com etanol nas doses de 50 mM (0,2%), 100 mM (0,4%), 200 mM (0,8%) por 96h das linhagens celulares.



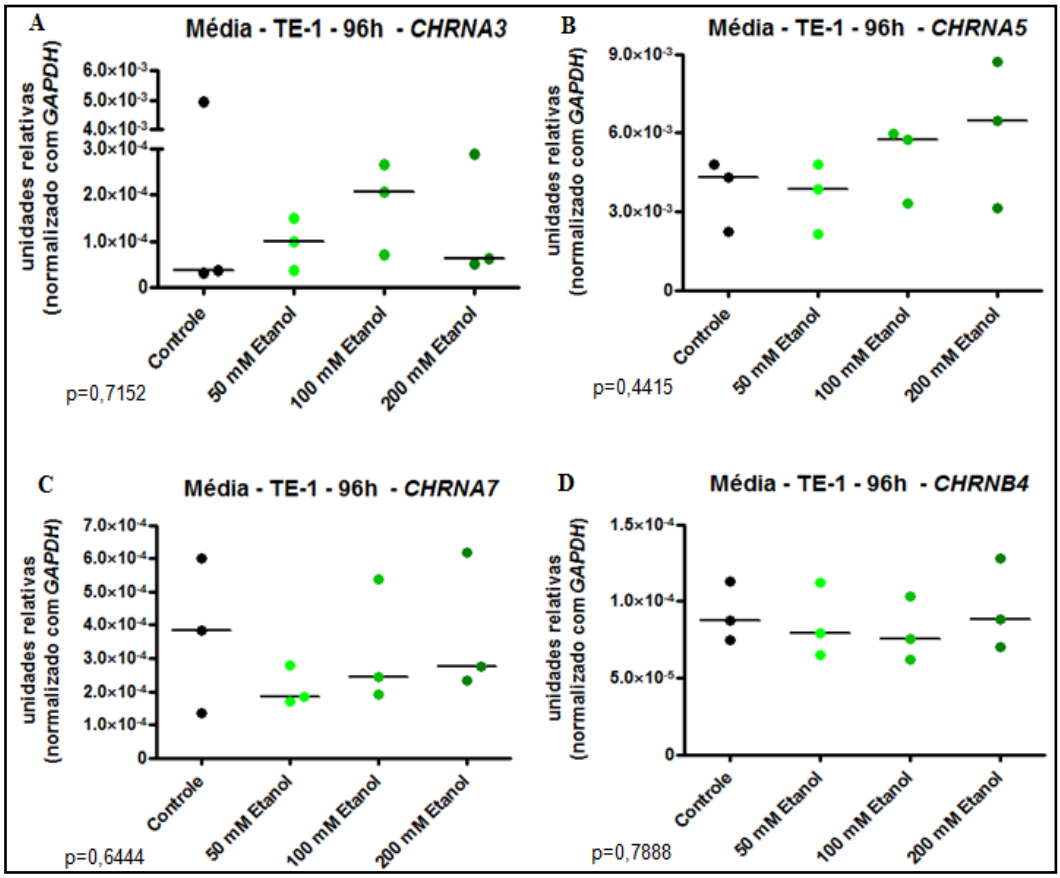
Legenda: A – Sobrevivência celular após tratamento com etanol nas doses de 50 mM (0,2%), 100 mM (0,4%), 200 mM (0,8%) por 96h da linhagem TE-1; B – da linhagem TE-11.

Nota: Na linhagem TE-1, o tratamento com etanol nas maiores doses (100 mM e 200 mM) foi capaz de reduzir o número de células viáveis tanto em relação à menor dose quanto em relação ao controle. **p=0,0021 (controle x dose 100 mM); ***p<0,0001 (controle x dose 200 mM) ;**p=0,0010 (dose 50 mM x dose 100 mM); ***p<0,0001 (dose 50 mM x dose 200 mM). **p, ***p estatisticamente significativos.

3.3.3.1 Análise da expressão de *CHRNs* nas linhagens TE-1 e TE-11 frente ao tratamento com etanol

Os dados obtidos mostraram que o tratamento com etanol não alterou a expressão das subunidades de CHRN em comparação ao controle do tratamento na linhagem TE-1. (Figura 44).

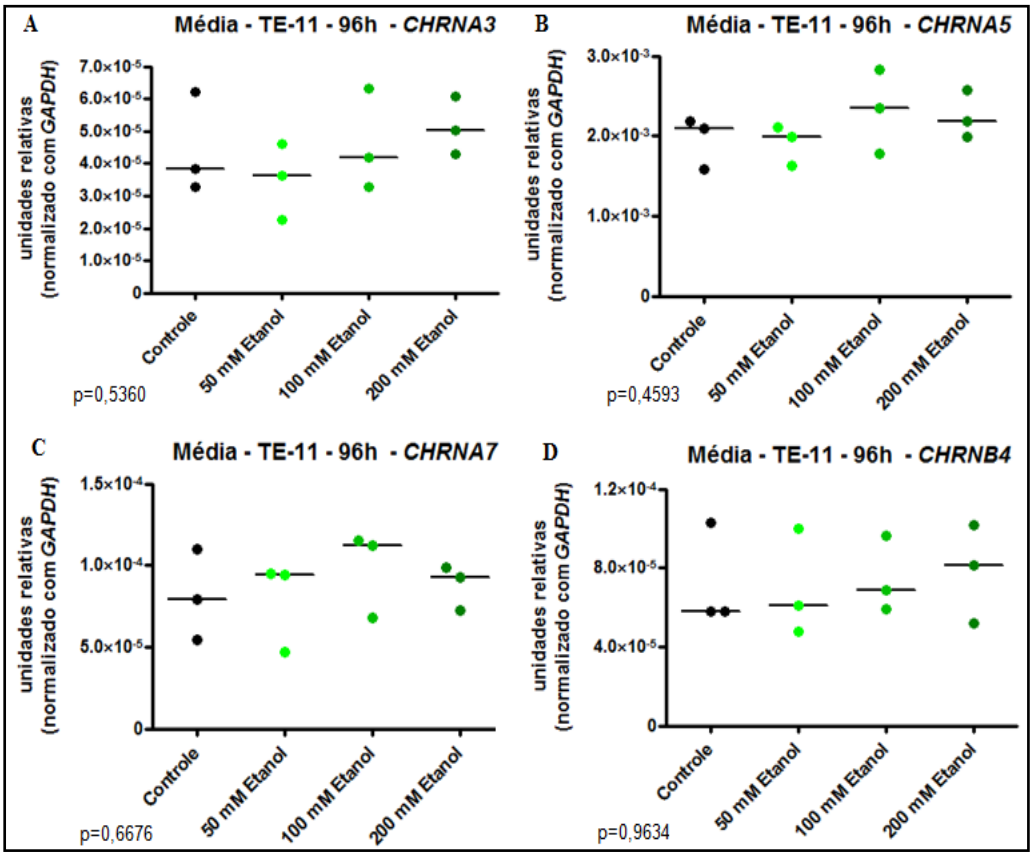
Figura 44: Comparação da expressão das diferentes subunidades de *CHRNs* frente ao tratamento com etanol nas doses de 50 mM (0,2%), 100 mM (0,4%), 200 mM (0,8%) e o controle por 96h na linhagem TE-1.



Legenda: A - Comparação da expressão da subunidade α3; B – da subunidade α5; C – da subunidade α7; D – da subunidade β4 frente ao tratamento com etanol nas doses de 50 mM (0,2%), 100 mM (0,4%), 200 mM (0,8%) e o controle por 96h na linhagem TE-1.

Assim como na linhagem TE-1, o tratamento com etanol também não foi capaz de afetar a expressão das subunidades de CHRN na linhagem TE-11 (Figura 45).

Figura 45: Comparação da expressão das diferentes subunidades de *CHRNs* frente ao tratamento com etanol nas doses de 50 mM (0,2%), 100 mM (0,4%), 200 mM (0,8%) e o controle por 96h na linhagem TE-11.



Legenda: A - Comparação da expressão da subunidade α3; B – da subunidade α5; C – da subunidade α7; D – da subunidade β4 frente ao tratamento com etanol nas doses de 50 mM (0,2%), 100 mM (0,4%), 200 mM (0,8%) e o controle por 96h na linhagem TE-11.

O quadro 6 resume os resultados obtidos da expressão de *CHRNs* nas amostras de esôfago humano (saudáveis e CEE) e nas linhagens de esôfago derivadas de CEE frente ao tratamento com nicotina ou etanol.

Quadro 6: Análise de expressão de *CHRNs* nas amostras de esôfago humano e nas linhagens de esôfago derivadas de CEE frente ao tratamento com nicotina ou etanol

Subunidade	**Controle Positivo**	**Expressão no esôfago saudável**	**Expressão em CEE**	**Linhagens Tratamento Nicotina**	**Linhagens Tratamento Etanol**
CHRNA1	U-251 58,1°C	Sem/Baixa expressão	Não foi avaliado	Não foi avaliado	Não foi avaliado
CHRNA2	-	-	-	-	-
CHRNA3	A549 60°C	↓ Etilista terço inferior	Sem diferença de expressão	Sem diferença de expressão	Sem diferença de expressão
CHRNA4	TE-1 60°C	Sem/Baixa expressão	Não foi avaliado	Não foi avaliado	Não foi avaliado
CHRNA5	A549 60°C	Sem diferença de expressão	↑ Amostras de tecido tumoral	Sem diferença de expressão	Sem diferença de expressão
CHRNA6	-	-	-	-	-
CHRNA7	A549 60°C	↓ Tabagista terço superior	↑ Amostras de tecido tumoral	Sem diferença de expressão	Sem diferença de expressão
CHRNA9	U-251 62°C	Sem expressão	Não foi avaliado	Não foi avaliado	Não foi avaliado
CHRNA10	U-251 60°C	Sem/Baixa expressão	Não foi avaliado	Não foi avaliado	Não foi avaliado
CHRNB2	-	-	-	-	-
CHRNB3	-	-	-	-	-
CHRNB4	A549 60°C	Sem diferença de expressão	Sem diferença de expressão	Sem diferença de expressão	Sem diferença de expressão

Legenda: - sem controle positivo, conseqüentemente, sem análise de expressão. ↑- maior expressão da subunidade; ↓ - menor expressão da subunidade.

4 **DISCUSSÃO**

O desenvolvimento de CEE está fortemente relacionado ao tabagismo e sabe-se que os componentes do tabaco podem atuar via CHRNs. O papel dos CHRNs em câncer de pulmão vem sendo estudado há algum tempo, porém muito pouco se sabe sobre o papel dos CHRNs na carcinogênese esofágica ou mesmo sua expressão no esôfago normal. Apenas um trabalho avaliou a expressão destes receptores em esôfago até então (Nguyen et al., 2000), porém apenas algumas das subunidades foram investigadas e a técnica utilizada foi a de imunohistoquímica. Esta técnica tem como mecanismo básico o reconhecimento de antígeno por um anticorpo, sendo uma técnica qualitativa e não quantitativa.

Assim, esse trabalho visou analisar a expressão desses receptores no esôfago humano utilizando a técnica de PCRq, uma técnica de amplificação de DNA *in vitro*, mais sensível e quantitativa. Analisamos então a expressão gênica dos *CHRNs* no epitélio esofágico normal e em carcinoma epidermóide de esôfago, bem como sua regulação pelos fatores de risco associados ao tumor. Foram avaliadas as subunidades α1, α3, α4, α5, α7, α9, α10 e β4 pois, para demais subunidades, não foram encontrados controles positivos.

As subunidades α1, α4, α9 e α10 mostraram baixa ou nenhuma expressão em seis amostras de esôfago saudável analisadas, apresentando replicatas de uma mesma amostra com valores de C_T distantes entre si ou amostras sem amplificação. Assim, sugere-se que essas subunidades não sejam expressas no epitélio esofágico saudável. Já foi descrito que as subunidades α1, α9 e α10 são expressas em células epiteliais brônquicas (Carlisle, et al, 2004; Arias, et al., 2009; West, et al, 2003). Já em células epiteliais de vias aéreas, são encontradas as subunidades α4, α9 e α10 (West, et al, 2003). Além disso, a subunidade α9 está presente em queratinócitos da pele (Chernyavsky, et al, 2007), enquanto a subunidade α4 também pode ser encontrada em células epiteliais alveolares (Zia et al., 1997) e em neurônios dopaminérgicos e adrenérgicos no cérebro (Lindstrom, 2003). Assim, essas subunidades parecem ser mais importantes na fisiologia de outros tecidos do que na do esôfago.

Por outro lado, demonstramos que as subunidades α3, α5, α7 e β4 são expressas uniformemente no esôfago e o gênero parece não influenciar a expressão destes receptores independentemente do terço avaliado.

Além disso, mostramos que indivíduos com maior idade apresentaram menor expressão da subunidade β4 no terço superior. Já no terço inferior, foi observado o inverso,

indivíduos com maior idade apresentaram uma maior expressão desta subunidade. Com relação à literatura, já foi avaliada a expressão das subunidades α4, α5, α7 e β4 relacionada à idade em hipocampo de camundongos adultos (12-14 meses) e idosos (24-28 meses) sendo que a idade parece não influenciar igualmente todas as subunidades. Normalmente, há perda de expressão das subunidades α4 e α7 em hipocampo de camundongos idosos, por exemplo. Para a subunidade β4, alterações de sua expressão associadas à idade são controversas, em que já foi demonstrada redução de expressão em regiões do hipocampo de camundongos C57BL/6, porém não há mudança de expressão em camundongos CBA/Js idosos quando comparados com os adultos (Gahring LC, Persiyanov K, Rogers SW, 2005). Com relação ao esôfago, não há artigos na literatura até então que tenham avaliado esse aspecto em relação aos receptores colinérgicos nicotínicos. Sendo assim, são necessários mais estudos para melhor compreender esse fenômeno inverso observado nos terços superior e inferior.

Com relação à *CHRN*A7, os indivíduos tabagistas apresentaram uma redução de expressão dessa subunidade em comparação aos indivíduos não tabagistas no terço superior do esôfago. Assim, os componentes do tabaco parecem ser capazes de influenciar a expressão dessa subunidade, mesmo que de maneira transitória. De maneira contraditória, já foi descrito na literatura que a administração de nicotina aumenta a expressão de *CHRN*A7 em células pulmonares, levando à proliferação celular (Sekhon et al., 1999). Além disso, foi observada uma indução de expressão significativa e reversível de *CHRN*A7 *in vitro* frente à exposição aguda à nicotina em linhagens celulares epiteliais brônquicas humanas (Lam et al., 2007). Por fim, um aumento de expressão também foi descrito no cérebro fetal de rato quando administrada a nicotina (Lv *et al*., 2008). Entretanto, vale ressaltar que esôfago, cérebro e pulmão são tecidos bastante diferentes metabolicamente, além de serem submetidos a doses diferenciadas de nicotina e nitrosaminas após o fumo devido à biodisponibilidade dessas drogas. Sendo assim, cada tecido irá metabolizar tais drogas em taxas diferentes, o que pode acarretar uma maior ou menor oferta das mesmas para se ligar e levar à regulação de expressão das subunidades. Além disso, a nicotina, a NNK e a NNN possuem afinidades variadas pelos receptores nicotínicos, dependendo da sua composição (Schuller, 2007). Dessa forma, podemos também supor que estes compostos possam regular de maneira tecido-dependente a expressão de tais receptores, uma vez que cada tecido possui composições específicas. Devido a todas as diferenças aqui apresentadas entre esôfago, cérebro e pulmão e, uma vez que muito pouco se sabe sobre a expressão e regulação dos *CHRNs* no epitélio

esofágico, nossos dados apontam para a necessidade de estudos que tenham como enfoque especificamente o esôfago, considerando todas as suas particularidades.

Além disso, de acordo com os nossos dados, a expressão de *CHRNA3* parece ser afetada pelo consumo de álcool. Nossas análises mostraram que indivíduos etilistas apresentaram uma expressão reduzida desta subunidade em comparação a indivíduos não etilistas no terço inferior do esôfago. Já foi descrito que o promotor do gene que codifica CHRNA3 encontra-se hipermetilado em câncer de pulmão (Paliwal *et al*., 2010), levando à redução de sua expressão. Além disso, já foi relatado que o álcool interfere nos mecanismos de metilação de alguns genes como genes supressores de tumor e de reparo em pacientes com câncer de cólon e reto (Van Engeland et al., 2003). Já foi mostrado também que o álcool induz uma redução significativa da absorção do folato, membro da classe B de vitaminas, que é requerido para metilação de substâncias biológicas essenciais como o DNA, no intestino (Hamid *et al*., 2009;Weir *et al*., 1985). Portanto, podemos supor que o perfil de metilação de *CHRNA3* poderia estar sendo afetado no esôfago dos indivíduos etilistas incluídos nesse estudo, o que resultaria na menor expressão desta subunidade. Contudo, é essencial uma análise mais profunda dessa subunidade, assim como de sua regulação epigenética no esôfago humano para melhor compreender os possíveis mecanismos moleculares que estariam envolvidos nesta diminuição de expressão.

A subunidade α5 não apresentou diferença de expressão em nenhuma das análises realizadas e, de acordo com a literatura, há uma indução de expressão significativa e reversível de *CHRNA5 in vitro* frente à exposição aguda à nicotina em linhagens celulares epiteliais brônquicas humanas (Lam *et al*., 2007). Neste contexto, mais uma vez as diferenças entre os tecidos devem ser consideradas para explicar tais resultados.

Por fim, buscando uma possível associação entre a expressão gênica de *CHRNs* em cada terço de esôfago saudável, foi realizada uma análise de correlação e observadas associações positivas entre as subunidades α7 e β4 no terço superior, entre as subunidades α3 e β4 nos três terços e as subunidades α3 e α7 no terço inferior. Isso sugere que essas subunidades podem estar sendo correguladas no epitélio esofágico saudável. Já foi demonstrado na literatura que, em condições normais, células epiteliais de pulmão expressam níveis ótimos de diferentes subunidades de CHRNs de maneira controlada, assim são formados receptores heteropentâmeros compostos pelas subunidades α3, α5 e β4. Ao serem ativados, estes receptores ativam vias de sinalização pró-apoptóticas com o objetivo de manter o estado de equilíbrio entre sobrevivência e apoptose (Paliwal, *et al*., 2010). Assim, a

associação positiva das subunidades α3 e β4 encontrada nos três terços pode ser explicada dessa forma, pela formação de receptores heteropentâmeros para manter a homeostasia do tecido. Além disso, a subunidade α7 é capaz de regular a proliferação e diferenciação celular em epitélio de vias aéreas (Maouche, et al, 2009). Assim, uma corregulação positiva com subunidades associadas com apoptose (β4 no terço superior e α3 no terço inferior) pode ser importante também como uma forma de manter o estado de equilíbrio do tecido.

Com relação às amostras de esôfago de pacientes com CEE, a maioria dos indivíduos foi do sexo masculino, idade a partir dos 50 anos, tabagistas e etilistas ativos. O principal terço do esôfago acometido é o terço médio, tumor moderadamente diferenciado e estadiamento 3 ou 4 . Características essas que estão de acordo com o que já foi relatado para CEE em outros estudos (Queiroga, Pernambuco, 2006; Shi, et al, 2014; Arnold, et al, 2015).

Foram avaliadas as subunidades α3, α5, α7, β4 em amostras de tumor e tecido normal adjacente pareadas de pacientes com CEE. As subunidades α3 e β4 apresentaram um perfil de expressão bastante heterogêneo, não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas. Também não foram encontradas associações entre o *Fold Change* (razão entre a expressão no tumor e no tecido normal adjacente) dessa subunidade e os dados clínico-patológicos dos pacientes com CEE. Além disso, não foi possível fazer a curva ROC e a curva de sobrevida, pois o número de amostras foi pequeno, não havendo assim poder estatístico para fazer tais análises.

Para a subunidade α3, também não foi encontrada diferença de expressão entre as amostras de esôfago de indivíduos saudáveis e as amostras de esôfago de pacientes com CEE. De acordo com a literatura, a expressão dessa subunidade varia dependendo do tipo de tumor. Carracedo e colaboradores, em 2007, avaliaram a expressão dessa subunidade em amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e a detectaram em apenas 3,33% dos casos (1/30 casos), também não houve correlação estatística com os dados clínico-patológicos (sítio anatômico, estadiamento e grau de diferenciação do tumor). Já Improgo e colaboradores, em 2010, encontraram superexpressão dessa subunidade em carcinoma de pulmão de pequenas células, porém o autor não correlaciona tal expressão com os dados clínico-patológicos. Assim, os dados sugerem que a expressão da subunidade α3 não está alterada no CEE.

Já no caso da subunidade β4, as amostras tumorais e o tecido normal adjacente apresentaram uma expressão significativamente maior dessa subunidade quando comparada com as amostras de esôfago de indivíduos saudáveis não tabagistas e não etilistas. Improgo e

colaboradores, em 2010, observaram superexpressão dessa subunidade em carcinoma de pulmão de pequenas células, em adenocarcinoma e em carcinoma de células escamosas. Esses dados demonstram a importância dessa subunidade para a carcinogênese pulmonar. Com relação aos nossos dados, uma possível explicação para tais diferenças de expressão observadas entre as amostras pode ser os níveis de exposição aos fatores de risco, tabagismo e etilismo, uma vez que essa diferença foi encontrada somente quando as amostras de CEE foram comparadas com as amostras de esôfago de indivíduos que não fumam e não bebem. O consumo de altas doses de álcool e tabaco, característico de pacientes com CEE, parece influenciar na expressão desse receptor, afetando tanto o tecido tumoral quanto o tecido normal adjacente.

Neste trabalho, a subunidade α5 foi encontrada superexpressa na mucosa tumoral quando comparada com o tecido normal adjacente ao tumor e não foram econtradas diferenças de expressão entre as amostras de esôfago de indivíduos saudáveis e de pacientes com CEE. Além disso, avaliamos a correlação entre o *Fold Change* dessa subunidade e os dados clínico-patológicos. Foi observada associação apenas com a localização do tumor. A diferença de expressão entre o tumor e o tecido normal adjacente é maior quando o terço inferior do esôfago é acometido em comparação ao acometimento do terço superior. Já foi demonstrado que, em carcinoma de pulmão de pequenas células e em amostras de câncer de pulmão de não pequenas células, essa subunidade se encontra superexpressa (Improgo, et al, 2010), porém o autor não correlaciona sua expressão com os dados clínico-patológicos. Com isso, os dados sugerem que a expressão da subunidade α5 está alterada no CEE, assim como demonstrado no pulmão, talvez ainda mais pronunciadamente no terço inferior.

Com relação à sobrevida, aos 20 meses, 40% dos indivíduos com *Fold Change* de *CHRNA5* maior que a mediana ainda estavam vivos enquanto todos os indivíduos com *Fold Change* menor ou igual à mediana já tinham ido a óbito, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Com relação à literatura, a maioria dos artigos não correlaciona a expressão dos *CHRNs* com os dados clínico-patológicos e quando correlacionam, não encontram associações para essa subunidade. Assim são necessárias análises com um maior número de pacientes para ser ter certeza de tal efeito.

Através da curva ROC, a expressão de *CHRNA5* foi capaz de distinguir o tumor da mucosa normal adjacente com 79% de sensibilidade e 52% de especificidade, porém não foi estatisticamente significativo. Apesar de não haver poder estatístico, os dados sugerem que a expressão dessa subunidade apresenta uma sensibilidade considerada alta (capacidade de

detectar verdadeiros positivos), porém não é muito específica (capacidade de identificar os verdadeiros negativos) na distinção dos dois tecidos. Não há artigos na literatura até então que tenham avaliado esse aspecto em relação aos receptores colinérgicos nicotínicos, demonstrando assim a relevância desse trabalho. Porém, precisamos aumentar o número de amostras avaliadas.

Finalmente, as amostras tumorais apresentaram uma expressão significativamente maior da subunidade α7 em relação ao tecido normal adjacente de pacientes com CEE. Não foi encontrada nenhuma associação entre *Fold Change* desta subunidade e os dados clínico-patológicos. Brown e colaboradores, em 2013, demonstraram superexpressão dessa subunidade em amostras de carcinoma de células escamosas de pulmão e tais níveis foram correlacionados ao histórico de tabagismo dos pacientes, fato esse não observado em nossas amostras. Os nossos dados sugerem que a expressão dessa subunidade está aumentada no CEE, porém esse aumento possivelmente não está correlacionado ao tabagismo.

A expressão da subunidade α7 não foi capaz de impactar na sobrevida dos pacientes com CEE. Novamente, se faz necessário aumentar o número de indivíduos analisados.

Através da curva ROC, a expressão de *CHRNA7* foi capaz de distinguir o tumor da mucosa normal adjacente com 63% de sensibilidade e 73% de especificidade, sendo estatisticamente significativo. Esse dado demonstra que essa subunidade é capaz de distinguir melhor os dois tecidos do que a subunidade α5, porém com sensibilidade e especificidade baixas.

Por fim, buscando uma possível correlação entre a expressão gênica de *CHRNs* no tecido normal adjacente ao tumor e no tecido tumoral, foi realizada uma análise de correlação e foram observadas correlações positivas entre as subunidades α3 e β4 em ambos os tecidos. Sugere-se assim que as subunidades α3 e β4 possam ser correguladas. Este mesmo padrão foi observado nos três terços do esôfago de indivíduos saudáveis, o que sugere que essas subunidades sejam correguladas no esôfago humano, independentemente da condição (normal ou patológica).

Em relação aos experimentos *in vitro*, foram realizados tratamentos com nicotina ou etanol nas linhagens de CEE, TE-1 e TE-11, para avaliar se esses fatores de risco são capazes de regular a expressão das subunidades α3, α5, α7 e β4. Foram escolhidas essas linhagens por expressarem níveis consideráveis de RNAm desses receptores, especialmente a subunidade α3, encontrada reduzida em indivíduos saudáveis etilistas no presente estudo. Além disso,

foram avaliadas somente essas subunidades, pois elas foram as únicas detectadas no epitélio esofágico saudável.

O tratamento com nicotina (doses de 1 µM, 10 µM e 100 µM por 72h) não foi capaz de alterar o número de células viáveis ou a expressão das subunidades α3, α5, α7 e β4 em ambas as linhagens. Na literatura, já foi demonstrado que tratamento agudo de células epiteliais brônquicas humanas imortalizadas com nicotina (100 nM – 72h) leva a uma indução significativa e reversível de *CHRNA5* e *CHRNA7*, retornando as níveis basais quando a nicotina era removida. Já as demais subunidades não apresentaram aumento ou redução significativos frente ao tratamento (Lam, et al, 2007). Shi e colaboradores, por sua vez, demonstraram que o tratamento com nicotina na dose de 10 µM por 8-40h promoveu a expressão protéica de CHRNA7 de maneira tempo-dependente, levando a um aumento na proliferação celular no tempo de 72h de maneira dose-dependente (0,01 µM - 10 µM) em linhagens de carcinoma de nasofaringe (Shi, et al.,2012). Há ainda trabalhos que demonstraram superexpressão de *CHRNs* na linhagem A549 (linhagem de adenocarcinoma de pulmão) frente tratamento com nicotina, como por exemplo, Ma e colaboradores demonstraram superexpressão da subunidade α5 (1 µM – 16h) (Ma, et al., 2014). Isso é bastante interessante uma vez que a linhagem A549 é uma linhagem celular que apresenta altos níveis de expressão da maioria dos receptores colinérgicos nicotínicos e ainda assim um tratamento com nicotina é capaz de aumentar a expressão dos *CHRNs* nessa linhagem. Por outro lado, nenhum trabalho avaliou a expressão desses receptores em linhagens de esôfago até então. Há somente um trabalho que demonstrou que células KYSE510 (linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago) expostas à nicotina (80 nM – 81h) apresentaram um aumento na taxa de proliferação e na capacidade migratória e invasiva quando comparadas às células não tratadas (Zhao, et al, 2014). Nesse presente estudo, não foram observados aumento no número de células viáveis frente ao tratamento e diferenças de expressão das subunidades avaliadas, contrastando com a literatura. Esse é o primeiro trabalho visando a regulação de expressão de CHRNs pelos fatores de risco associados ao CEE com linhagens de CEE. Sendo assim, são necessários novos experimentos incluindo tempos mais curtos (24h, 48h), para confirmar tal achado.

Conforme já mencionado, outro fator de risco fundamental para o CEE é o etilismo. Também foi realizado tratamento com etanol (doses de 50 mM, 100 mM e 200 mM por 96h) nas linhagens TE-1 e TE-11. De acordo com os dados, o tratamento com etanol nas maiores doses foi capaz de reduzir o número de células viáveis em relação ao controle na linhagem

TE-1. Esse efeito, no entanto, não foi observado para a linhagem TE-11. Esse tratamento não afetou a expressão das subunidades α3, α5, α7 e β4 em ambas as linhagens. Com relação aos dados da literatura, já foi visto que o tratamento crônico com etanol (100 mM - 0,4% por 4 dias) diminui os níveis de RNAm da subunidade α3, enquanto os níveis de RNAm da subunidade α7 aumentam significativamente em linhagem de neuroblastoma (Gorbounova, et al., 1998). Em linhagens celulares de adenocarcinoma ductal pancreático, a exposição a longo prazo com etanol (17 mM - 0,08% por 7 dias) induz significativamente a expressão de α3 (4,5 vezes), α5 (5 vezes) e α7 (5 vezes), resultando no aumento da produção de noradrenalina e adrenalina que conduzem proliferação e migração celular (Al-Wadei MH, Al-Wadei HA, Schuller HM, 2013). Mais uma vez, a diferença entre os tipos celulares avaliados pode explicar a discrepância dos resultados. Porém, fica claro que a regulação destes receptores pelo etanol precisa ser avaliada em mais detalhes.

Caso nossos dados sejam confirmados, eles sugerem que linhagens de CEE (TEs) não são responsivas frente ao tratamento com nicotina ou etanol em termos de regulação da proliferação e regulação da expressão de CHRNs. Esta falta de responsividade pode ser decorrência do fato deste ser um sistema isolado, ou seja, outros componentes do tecido esofágico e do organismo não estão presentes, portanto, não observamos uma modulação da expressão dos receptores em questão como no caso do esôfago saudável. Além disso, no caso específico do tabagismo, talvez a nicotina sozinha não seja capaz de desencadear tais efeitos. Por fim, cabe ressaltar que a falta de modulação dos receptores nicotínicos não significa que estes não estejam sendo ativados pelo tratamento, desencadeando respostas intracelulares. Portanto, é necessária a avaliação das mesmas.

Esse foi o primeiro trabalho que avaliou a expressão gênica dos receptores colinérgicos nicotínicos em amostras humanas (saudável e CEE) e em linhagens de esôfago derivadas de CEE frente ao tratamento com nicotina ou etanol. Foram utilizados diferentes modelos para avaliar tal expressão gênica, tornando esse trabalho bastante relevante, uma vez que a literatura científica é bastante escassa nesse tema em esôfago, especificamente. Porém devemos levar em consideração as limitações de cada experimento como, por exemplo, número de amostras humanas e doses, tempos e linhagens utilizados para os experimentos *in vitro*, conforme já mencionado. Os resultados obtidos sugerem uma participação dos CHRNs na fisiologia do epitélio esofágico e os fatores de risco associados ao desenvolvimento de CEE parecem ser capazes de afetar a expressão desses receptores no epitélio esofágico humano saudável. Com relação ao CEE, a expressão das subunidades α5 e α7 estão alteradas

nesse tumor. Análises mais detalhadas são necessárias para tentar compreender melhor esse tecido e os mecanismos de ação da nicotina e do etanol na carcinogênese esofágica.

CONCLUSÃO

- O esôfago humano saudável não expressa as subunidades α1, α4, α9 e α10, de acordo com a técnica utilizada. Por outro lado, expressa as subunidades α3, α5, α7 e β4 de maneira uniforme nos três terços analisados;

- O gênero parece não influenciar a expressão destes receptores, independentemente do terço de esôfago saudável analisado;

- Indivíduos com maior idade apresentaram menor expressão da subunidade β4 no terço superior. Já no terço inferior, foi observado o inverso, indivíduos com maior idade apresentaram uma maior expressão desta subunidade;

- O status de tabagismo dos indivíduos não apresentou correlação com a expressão das subunidades α3, α5 e β4 nas amostras de esôfago de indivíduos saudáveis. Entretanto, foi observada menor expressão da subunidade α7 em indivíduos tabagistas quando comparados a não tabagistas no terço superior de esôfago saudável.

- O consumo de álcool pareceu não influenciar a expressão dos receptores α5, α7 e β4 nas amostras de esôfago de indivíduos saudáveis. Por outro lado, foi observada uma menor expressão de α3 em etilistas em comparação a não etilistas no terço inferior de esôfago saudável;

- Foram encontradas associações positivas entre as subunidades α7 e β4 no terço superior, entre as subunidades α3 e β4 nos três terços e as subunidades α3 e α7 no terço inferior de esôfago saudável;

- Nas amostras de CEE, as subunidades *CHRNA5* e *CHRNA7* foram encontradas superexpressas no tumor quando comparado ao tecido normal adjacente;

- As amostras tumorais de esôfago de pacientes com CEE apresentaram uma expressão significativamente maior da subunidade α7 quando comparadas com as de tecido normal adjacente de esôfago de pacientes com CEE e de amostras de esôfago de indivíduos saudáveis totais e de indivíduos saudáveis não tabagistas e não etilistas;

- Foi observado que as amostras tumorais e de tecido normal adjacente de esôfago de pacientes com CEE apresentaram expressão significativamente maior do receptor *CHRNB4* quando comparadas com as amostras de esôfago de indivíduos saudáveis não tabagistas e não etilistas;

- A diferença de expressão da subunidade α5 entre o tecido tumoral e normal adjacente (*Fold Change*) é maior quando o tumor acomete o terço inferior em comparação ao terço superior;

- Com relação à sobrevida, aos 20 meses, 40% dos indivíduos com *Fold Change* de *CHRNA5* maior que a mediana ainda estavam vivos enquanto todos os indivíduos com *Fold Change* menor ou igual à mediana já tinham ido a óbito. Já para a subunidade α7, sua expressão não foi capaz de impactar na sobrevida dos pacientes com CEE. Em ambas as subunidades, a análise não foi estatisticamente significativa;

- A expressão de *CHRNA5* foi capaz de distinguir o tumor da mucosa normal adjacente com 79% de sensibilidade e 52% de especificidade, porém não foi estatisticamente significativo. Já a subunidade α7 foi capaz de distinguir o tumor da mucosa normal adjacente com 63% de sensibilidade e 73% de especificidade, sendo estatisticamente significativo;

- Foram observadas associações positivas entre as subunidades α3 e β4 no tecido normal adjacente ao tumor e no tecido tumoral;

- O tratamento com a nicotina não foi capaz de afetar o número de células viáveis nas linhagens TE-1 e TE-11. Porém, as doses maiores de etanol foram capazes de reduzir o número de células viáveis em relação ao controle na linhagem TE-1;

- Não foram encontradas diferenças de expressão de nenhuma das subunidades avaliadas nas linhagens TE-1 e TE-11, frente ao tratamento com nicotina ou etanol.

PERSPECTIVAS

- Avaliar a expressão protéica das subunidades de CHRNs nas amostras de esôfago saudável;
- Aumentar o número de amostras de CEE para avaliação da expressão de RNAm das subunidades α3, α5, α7 e β4 e associação com os dados clínico-patológicos;
- Incluir a linhagem A549 como controle positivo dos tratamentos, uma vez que já foi mostrado na literatura que a nicotina é capaz de afetar a expressão dos *CHRNs* nesta linhagem;
- Curva de tempo (24h, 48h) para o tratamento agudo com nicotina (1 µM, 10 µM e 100 µM) e etanol (50 mM, 100 mM e 200 mM) das linhagens TE-1 e TE-11;
- Tratamentos crônicos: tratamento das linhagens TE-1, TE-11 e A549 com nicotina (6 semanas, dose baseada no tratamento agudo) ou etanol (96h, dose baseada no tratamento agudo);
- Tratamento combinado com nicotina e etanol: dose e tempo baseados nos experimentos anteriores.

REFERÊNCIAS

Adachi J, Mizoi Y, Fukunaga T, Ogawa Y, Ueno Y, Imamichi H. Degrees of alcohol intoxication in 117 hospitalized cases. J Stud Alcohol. 1991 Sep;52(5):448-53.

Allen JW, Richardson JD, Edwards MJ. Squamous cell carcinoma of the esophagus: a review and update. Surg Oncol. 1997 Dec;6(4):193-200.

Al-Wadei MH, Al-Wadei HA, Schuller HM. Gamma-amino butyric acid (GABA) prevents the induction of nicotinic receptor-regulated signaling by chronicethanol in pancreatic cancer cells and normal duct epithelia. Cancer Prev Res (Phila). 2013 Feb;6(2):139-48.

Arias HR, Richards VE, Ng D, Ghafoori ME, Le V, Mousa SA. Role of non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors in angiogenesis. Int J Biochem Cell Biol. 2009 Jul; 41(7):1441-51.

Arnold M, Soerjomataram I, Ferlay J, Forman D. Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012. Gut. 2015 Mar;64(3):381-7.

Arredondo J, Chernyavsky AI, Marubio LM, Beaudet AL, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grando SA. Receptor-mediated tobacco toxicity: regulation of gene expression through alpha3beta2 nicotinic receptor in oral epithelial cells. Am J Pathol. 2005 Feb;166(2):597-613.

Arredondo J, Chernyavsky AI, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grando SA. Receptor-mediated tobacco toxicity: cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathwaysdownstream of alpha7 nicotinic receptor in oral keratinocytes. FASEB J. 2006 Oct;20(12):2093-101.

Arredondo J, Chernyavsky AI, Grando SA. Nicotinic receptors mediate tumorigenic action of tobacco-derived nitrosamines on immortalized oral epithelial cells. Cancer Biol Ther. 2006 May;5(5):511-7.

Arredondo J, Chernyavsky AI, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grando SA. Receptor-mediated tobacco toxicity: acceleration of sequential expression of alpha5 and alpha7 nicotini creceptor subunits in oral keratinocytes exposed to cigarette smoke. FASEB J. 2008 May;22(5):1356-68.

Barnas C, Martel-Planche G, Furukawa Y, Hollstein M, Montesano R, Hainaut P. Inactivation of the p53 protein in cell lines derived from human esophageal cancers. Int J Cancer. 1997 Mar 28;71(1):79-87.

Brown KC, Perry HE, Lau JK, Jones DV, Pulliam JF, Thornhill BA, Crabtree CM, Luo H, Chen YC, Dasgupta P. Nicotine induces the upregulation of the α7-nicotinic receptor (α7-nAChR) in human squamous cell lung cancer cells via the Sp1/GATA pathway. J Biol Chem. 2013 Nov 15;288(46):33049-59.

Calleja-Macias IE, Kalantari M, Bernard HU. Cholinergic signaling through nicotinic acetylcholine receptors stimulates the proliferation of cervical cancer cells: an explanation for

the molecular role of tobacco smoking in cervical carcinogenesis? Int J Cancer. 2009 Mar 1;124(5):1090-6.

Carlisle DL, Hopkins TM, Gaither-Davis A, Silhanek MJ, Luketich JD, Christie NA, Siegfried JM. Nicotine signals through muscle-type and neuronal nicotinic acetylcholine receptors in both human bronchial epithelial cells and airway fibroblasts. Respir Res. 2004 Dec 10;5:27.

Carlisle DL, Liu X, Hopkins TM, Swick MC, Dhir R, Siegfried JM. Nicotine activates cell-signaling pathways through muscle-type and neuronal nicotinic acetylcholine receptors in non-small cell lung cancer cells. Pulm Pharmacol Ther. 2007;20(6):629-41.

Carracedo DG, Rodrigo JP, Nieto CS, Gonzalez MV. Epithelial cell nicotinic acetylcholine receptor expression in head and neck squamous cell carcinoma pathogenesis. Anticancer Res. 2007 Mar-Apr;27(2):835-9.

Castellsagué X, Muñoz N, De Stefani E, Victora CG, Castelletto R, Rolón PA, Quintana MJ. Independent and joint effects of tobacco smoking and alcohol drinking on the risk of esophageal cancer in men and women. Int J Cancer. 1999 Aug 27;82(5):657-64.

Castellsagué X, Muñoz N, De Stefani E, Victora CG, Castelletto R, Rolón PA. Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. Int J Cancer. 2000 Nov 15;88(4):658-64.

CATASSI, A.; SERVENT, D.; PALEARI, L.; CESARIO, A.; RUSSO, P. Multiple roles of nicotine on cellproliferation and inhibition of apoptosis: implications on lungcarcinogenesis. Mutat Res. 659(3):221-31, 2008.

Cattaneo MG, Codignola A, Vicentini LM, Clementi F, Sher E. Nicotine stimulates a serotonergic autocrine loop in human small-cell lung carcinoma. Cancer Res. 1993 Nov 15;53(22):5566-8.

Chen LQ, Hu CY, Ghadirian P, Duranceau A. Early detection of esophageal squamous cell carcinoma and its effects on therapy: an overview. Dis Esophagus. 1999;12(3):161-7.

Cheng YA, Tsai CC. Nicotine- and arecoline-induced interleukin-1 secretion and intercellular adhesion molecular-1 expression in human oral epidermoid carcinoma cells in vitro. Arch Oral Biol. 1999 Oct;44(10):843-51.

Chernyavsky AI, Arredondo J, Vetter DE, Grando SA. Central role of alpha9 acetylcholine receptor in coordinating keratinocyte adhesion and motility at the initiation of epithelialization. Exp Cell Res. 2007 Oct 1;313(16):3542-55.

Chernyavsky AI, Arredondo J, Galitovskiy V, Qian J, Grando SA. Structure and function of the nicotinic arm of acetylcholine regulatory axis in human leukemic T cells. Int J Immunopathol Pharmacol. 2009 Apr-Jun;22(2):461-72.

Codignola A, Tarroni P, Cattaneo MG, Vicentini LM, Clementi F, Sher E.Serotonin release and cell proliferation are under the control of alpha- bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in small-cell lung carcinoma cell lines. FEBS Lett. 1994 Apr 11;342(3):286-90.

Cohen DJ, Ajani J. An expert opinion on esophageal cancer therapy. Expert Opin Pharmacother. 2011 Feb;12(2):225-39.

Collins AC. Interactions of ethanol and nicotine at the receptor level. Recent Dev Alcohol. 1990;8:221-31.

Conti-Tronconi BM, McLane KE, Raftery MA, Grando SA, Protti MP. The nicotinic acetylcholine receptor: structure and autoimmune pathology. Crit Rev Biochem Mol Biol. 1994;29(2):69-123.

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 Dec;30(6):1415-25.

da Costa NM, Soares Lima SC, de Almeida Simão T, Ribeiro Pinto LF.The potential of molecular markers to improve interventions through the natural history of oesophageal squamous cell carcinoma. Biosci Rep. 2013 Aug 14;33(4).

Dasgupta P, Chellappan SP.Nicotine-mediated cell proliferation and angiogenesis: new twists to an old story. Cell Cycle. 2006 Oct;5(20):2324-8.

Dasgupta P, Rastogi S, Pillai S, Ordonez-Ercan D, Morris M, Haura E, Chellappan S. Nicotine induces cell proliferation by beta-arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways. J Clin Invest. 2006 Aug;116(8):2208-2217.

de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, Berthoud HR, Uematsu S, Akira S, van den Wijngaard RM,Boeckxstaens GE.Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signalling pathway. Nat Immunol. 2005 Aug;6(8):844-51.

Dohrman DP, Reiter CK. Ethanol modulates nicotine-induced upregulation of nAChRs. Brain Res. 2003 Jun 13;975(1-2):90-8.

Egleton RD, Brown KC, Dasgupta P.Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis. Trends Pharmacol Sci. 2008 Mar;29(3):151-8.

Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. N Engl J Med. 2003 Dec 4;349(23):2241-52.

Eslick GD. Epidemiology of esophageal cancer. Gastroenterol Clin North Am. 2009 Mar;38(1):17-25, vii.

Falk GW. Risk factors for esophageal cancer development. Surg Oncol Clin N Am. 2009 Jul;18(3):469-85.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013.

Forsyth CB, Tang Y, Shaikh M, Zhang L, Keshavarzian A. Alcohol stimulates activation of Snail, epidermal growth factor receptor signaling, and biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in colon and breast cancer cells. Alcohol Clin Exp Res. 2010 Jan;34(1):19-31.

Galzi JL, Revah F, Bessis A, Changeux JP. Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: from electric organ to brain. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1991;31:37-72.

Gahring LC, Persiyanov K, Rogers SW. Mouse strain-specific changes in nicotinic receptor expression with age. Neurobiol Aging. 2005 Jun;26(6):973-80.

Godoy W, Albano RM, Moraes EG, Pinho PR, Nunes RA, Saito EH, Higa C, Filho IM, Kruel CD, Schirmer CC, Gurski R, Lang MA, Pinto LF. CYP2A6/2A7 and CYP2E1 expression in human oesophageal mucosa: regional and inter-individual variation in expression and relevance to nitrosamine metabolism. Carcinogenesis. 2002 Apr;23(4):611-6.

Gorbounova O, Svensson AL, Jönsson P, Mousavi M, Miao H, Hellström-Lindahl E, Nordberg A. Chronic ethanol treatment decreases [3H]epibatidine and [3H]nicotine binding and differentially regulates mRNA levels of nicotinic acetylcholine receptor subunits expressed in M10 and SH-SY5Y neuroblastoma cells. J Neurochem. 1998 Mar;70(3):1134-42.

Gotti C, Fornasari D, Clementi F. Human neuronal nicotinic receptors. Prog Neurobiol. 1997 Oct;53(2):199-237.

Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. Prog Neurobiol. 2004 Dec;74(6):363-96.

Grando SA, Horton RM, Pereira EF, Diethelm-Okita BM, George PM, Albuquerque EX, Conti-Fine BM. A nicotinic acetylcholine receptor regulating cell adhesion and motility is expressed in human keratinocytes. J Invest Dermatol. 1995 Dec;105(6):774-81.

Grando SA. Connections of nicotine to cancer. Nat Rev Cancer. 2014 Jun;14(6):419-29.

Hamid A, Wani NA, Kaur J.New perspectives on folate transport in relation to alcoholism- induced folate malabsorption-association with epigenome stability and cancer development. FEBS J. 2009 Apr;276(8):2175-91.

Hecht SS, Hoffmann D. Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. Carcinogenesis. 1988 Jun;9(6):875-84.

Hiemke C, Stolp M, Reuss S, Wevers A, Reinhardt S, Maelicke A, Schlegel S, Schröder H. Expression of alpha subunit genes of nicotinic acetylcholine receptors in human lymphocytes. Neurosci Lett. 1996 Aug 23;214(2-3):171-4.

Hongo M, Nagasaki Y, Shoji T. Epidemiology of esophageal cancer: Orient to Occident. Effects of chronology, geography and ethnicity. J Gastroenterol Hepatol. 2009 May;24(5):729-35.

Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. Nature. 2008 Apr 3;452(7187):633-7.

IARC. Tobacco smoking. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Lyon, France: IARC. 1986;38:35-394.

Igaki H, Sasaki H, Kishi T, Sakamoto H, Tachimori Y, Kato H, Watanabe H, Sugimura T, Terada M. Highly frequent homozygous deletion of the p16 gene in esophageal cancer cell lines. Biochem Biophys Res Commun. 1994 Sep 15;203(2):1090-5.

Improgo MR, Schlichting NA, Cortes RY, Zhao-Shea R, Tapper AR, Gardner PD. ASCL1 regulates the expression of the CHRNA5/A3/B4 lung cancer susceptibility locus. Mol Cancer Res. 2010 Feb;8(2):194-203.

Improgo MR, Tapper AR, Gardner PD. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated mechanisms in lung cancer. Biochem Pharmacol. 2011 Oct 15;82(8):1015-21.

Improgo MR, Soll LG, Tapper AR, Gardner PD. Nicotinic acetylcholine receptors mediate lung cancer growth. Front Physiol. 2013 Sep 17;4:251.

INCA. *Estimativa 2010*: Incidência de Câncer no Brasil. 98p. Rio de Janeiro: INCA, 2009.

INCA. *Estimativa 2014*: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. 124p. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

Itier V, Bertrand D. Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function. FEBS Lett. 2001 Aug 31;504(3):118-25.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. CA Cancer J Clin. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.

Karlin A. The acetylcholine receptor: progress report. Life Sci. 1974 Apr 16;14(8):1385-415.

Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Honda K, Nakamizo T, Shibasaki H, Kume T, Akaike A. alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity. J Biol Chem. 2001 Apr 27;276(17):13541-6.

Ksir C, Hakan R, Hall DP Jr, Kellar KJ. Exposure to nicotine enhances the behavioral stimulant effect of nicotine and increases binding of [3H]acetylcholine to nicotinic receptors. Neuropharmacology. 1985 Jun;24(6):527-31.

Lam DC, Girard L, Ramirez R, Chau WS, Suen WS, Sheridan S, Tin VP, Chung LP, Wong MP, Shay JW, Gazdar AF, Lam WK, Minna JD. Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in non-small-cell lung cancer reveals differences between smokers and nonsmokers. Cancer Res. 2007 May 15;67(10):4638-47.

Lau JK, et al. Inhibition of cholinergic signalling causes apoptosis in human bronchioalveolar carcinoma. Cancer Res. 2013 Feb 15;73(4):1328-39.

Lee CH, Huang CS, Chen CS, Tu SH, Wang YJ, Chang YJ, Tam KW, Wei PL, Cheng TC, Chu JS, Chen LC, Wu CH, Ho YS.Overexpression and activation of the alpha9-nicotinic receptor during tumorigenesis in human breast epithelial cells. J Natl Cancer Inst. 2010 Sep 8;102(17):1322-35.

Lee CH, Wu CH, Ho YS. From Smoking to Cancers: Novel Targets to Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. J Oncol. 2011;2011:693424.

Lee CH, Chang YC, Chen CS, Tu SH, Wang YJ, Chen LC, Chang YJ, Wei PL, Chang HW, Chang CH, Huang CS, Wu CH, Ho YS. Crosstalk between nicotine and estrogen-induced estrogen receptor activation induces α9-nicotinic acetylcholine receptor expression in human breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat. 2011 Sep;129(2):331-45.

Lehrbach DM, Nita ME, Cecconello I. Molecular aspects of esophageal squamous cell carcinoma carcinogenesis. Arq Gastroenterol. 2003 Oct-Dec;40(4):256-61.

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

Lindstrom J. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Ion Channels. 1996;4:377-450.

Lindstrom JM. Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves: comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology. Ann N Y Acad Sci. 2003 Sep;998:41-52.

Lukas RJ. Expression of ganglia-type nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic ligand binding sites by cells of the IMR- 32 human neuroblastoma clonal line. J Pharmacol Exp Ther. 1993 Apr;265(1):294-302.

Lv J, Mao C, Zhu L, Zhang H, Pengpeng H, Xu F, Liu Y, Zhang L, Xu Z. The effect of prenatal nicotine on expression of nicotine receptor subunits in the fetal brain. Neurotoxicology. 2008 Jul;29(4):722-6.

Ma X, Jia Y, Zu S, Li R, Jia Y, Zhao Y, Xiao D, Dang N, Wang Y. α5 Nicotinic acetylcholine receptor mediates nicotine-induced HIF-1α and VEGF expression in non-small cell lung cancer. Toxicol Appl Pharmacol. 2014 Jul 15;278(2):172-9.

Maneckjee R, Minna JD. Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 May;87(9):3294-8.

Mani S, Szymańska K, Cuenin C, Zaridze D, Balassiano K, Lima SC, Matos E, Daudt A, Koifman S, Filho VW, Menezes AM, Curado MP, Ferro G, Vaissière T,Sylla BS, Tommasino M, Pinto LF, Boffetta P, Hainaut P, Brennan P, Herceg Z. DNA methylation changes associated with risk factors in tumors of the upper aerodigestive tract. Epigenetics. 2012 Mar;7(3):270-7.

Maouche K, Polette M, Jolly T, Medjber K, Cloëz-Tayarani I, Changeux JP, Burlet H, Terryn C, Coraux C, Zahm JM, Birembaut P, Tournier JM. alpha7 nicotinic acetylcholine receptor regulates airway epithelium differentiation by controlling basal cell proliferation. Am J Pathol. 2009 Nov;175(5):1868-82.

Maus AD, Pereira EF, Karachunski PI, Horton RM, Navaneetham D, Macklin K, Cortes WS, Albuquerque EX, Conti-Fine BM. Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. Mol Pharmacol. 1998 Nov;54(5):779-88.

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 Jun;63(6):1568-72.

Montesano R, Hollstein M, Hainaut P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. Int J Cancer. 1996 Jun 21;69(3):225-35.

Nguyen VT, Hall LL, Gallacher G, Ndoye A, Jolkovsky DL, Webber RJ, Buchli R, Grando SA. Choline acetyltransferase, acetylcholinesterase, and nicotinic acetylcholine receptors of human gingival and esophageal epithelia. J Dent Res. 2000 Apr;79(4):939-49.

O'Brien RD, Eldefrawi ME, Eldefrawi AT. Isolation of acetylcholine receptors. Annu Rev Pharmacol. 1972;12:19-34.

O'Leary K, Parameswaran N, McIntosh JM, Quik M. Cotinine selectively activates a subpopulation of alpha3/alpha6beta2 nicotinic receptors in monkey striatum. J Pharmacol Exp Ther. 2008 May;325(2):646-54.

Paliwal A, Vaissière T, Krais A, Cuenin C, Cros MP, Zaridze D, Moukeria A, Boffetta P, Hainaut P, Brennan P, Herceg Z. Aberrant DNA methylation links cancer susceptibility locus 15q25.1 to apoptotic regulation and lung cancer. Cancer Res. 2010 Apr 1;70(7):2779-88.

Papke RL. The kinetic properties of neuronal nicotinic receptors: genetic basis of functional diversity. Prog Neurobiol. 1993 Oct;41(4):509-31.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin. 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.

Picciotto MR, Zoli M, Rimondini R, Léna C, Marubio LM, Pich EM, Fuxe K, Changeux JP. Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. Nature. 1998 Jan 8;391(6663):173-7.

Pickens A, Orringer MB.Geographical distribution and racial disparity in esophageal cancer. Ann Thorac Surg. 2003 Oct;76(4):S1367-9.

Plummer HK 3rd, Dhar M, Schuller HM. Expression of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in human lung cells. Respir Res. 2005 Apr 4;6:29.
Portugal GS, Gould TJ. Genetic variability in nicotinic acetylcholine receptors and nicotine addiction: converging evidence from human and animal research. Behav Brain Res. 2008 Nov 3;193(1):1-16.

Queiroga RC, Pernambuco AP. Câncer de esôfago: epidemiologia, diagnóstico e tratamento. Revista Brasileira de Cancerologia 2006; 52(2): 173-178.

Quik M, Chan J, Patrick J. alpha-Bungarotoxin blocks the nicotinic receptor mediated increase in cell number in a neuroendocrine cell line. Brain Res. 1994 Aug 29;655(1-2):161-7.

Reynolds PR, Hoidal JR. Temporal-spatial expression and transcriptional regulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by thyroid transcription factor-1 and early growth response factor-1 during murine lung development. J Biol Chem. 2005 Sep 16; 280(37):32548-54.

Reynolds PR, Allison CH, Willnauer CP. TTF-1 regulates α5 nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits in proximal and distal lung epithelium. Respir Res. 2010 Dec 9;11:175.

Ribeiro Pinto LF, Teixeira Rossini AM, Albano RM, Felzenszwalb I, de Moura Gallo CV, Nunes RA, Andreollo NA. Mechanisms of esophageal cancer development in Brazilians. Mutat Res. 2003 Nov;544(2-3):365-73.

Sartelet H, Maouche K, Totobenazara JL, Petit J, Burlet H, Monteau M, Tournier JM, Birembaut P. Expression of nicotinic receptors in normal and tumoral pulmonary neuroendocrine cells (PNEC). Pathol Res Pract. 2008;204(12):891-8.

Sato KZ, Fujii T, Watanabe Y, Yamada S, Ando T, Kazuko F, Kawashima K. Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines. Neurosci Lett. 1999 Apr 30;266(1):17-20.

Schuller HM. Carbon dioxide potentiates the mitogenic effects of nicotine and its carcinogenic derivative, NNK, in normal and neoplastic neuroendocrine lung cells via stimulation of autocrine and protein kinase C-dependent mitogenic pathways. Neurotoxicology. 1994 Winter;15(4):877-86.

Schuller HM, McGavin MD, Orloff M, Riechert A, Porter B. Simultaneous exposure to nicotine and hyperoxia causes tumors in hamsters. Lab Invest. 1995 Sep;73(3):448-56.

Schuller HM, Orloff M. Tobacco-specific carcinogenic nitrosamines. Ligands for nicotinic acetylcholine receptors in human lung cancer cells. Biochem Pharmacol. 1998 May 1;55(9):1377-84.

Schuller HM. Nitrosamines as nicotinic receptor ligands. Life Sci. 2007 May 30;80(24-25):2274-80.

Schuller HM. Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? Nat Rev Cancer. 2009 Mar;9(3):195-205.

Sekhon HS, Jia Y, Raab R, Kuryatov A, Pankow JF, Whitsett JA, Lindstrom J, Spindel ER. Prenatal nicotine increases pulmonary alpha7 nicotinic receptor expression and alters fetal lung development in monkeys. J Clin Invest. 1999 Mar;103(5):637-47.

Sepehr A, Tanière P, Martel-Planche G, Zia'ee AA, Rastgar-Jazii F, Yazdanbod M, Etemad-Moghadam G, Kamangar F, Saidi F, Hainaut P. Distinct pattern of TP53 mutations in squamous cell carcinoma of the esophagus in Iran. Oncogene. 2001 Nov 1;20(50):7368-74.

Shi D, Guo W, Chen W, Fu L, Wang J, Tian Y, Xiao X, Kang T, Huang W, Deng W. Nicotine promotes proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cells by regulating α7AChR, ERK, HIF-1α and VEGF/PEDF signalling. PLoS One. 2012;7(8):e43898.

Shi HY, Zhu SC, Shen WB, Liu ML. Pathological characteristics of esophageal cancer. Oncol Lett. 2014 Aug;8(2):533-538.

Siegel HN, Lukas RJ. Nicotinic agonists regulate alpha- bungarotoxin binding sites of TE671 human medulloblastoma cells. J Neurochem. 1988 Apr;50(4):1272-8.

Singh S, Pillai S, Chellappan S. Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis. J Oncol. 2011;2011:456743.

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 (p16(INK4a) and p14(ARF)) and p53 genes are major targets for inactivation. Carcinogenesis. 2002 Apr;23(4):645-55.

Sobel A, Weber M, Changeux JP. Large-scale purification of the acetylcholine-receptor protein in its membrane-bound and detergent-extracted forms from Torpedo marmorata electric organ. Eur J Biochem. 1977 Oct 17;80(1):215-24.

Soma T, Kaganoi J, Kawabe A, Kondo K, Imamura M, Shimada Y. Nicotine induces the fragile histidine triad methylation in human esophageal squamous epithelial cells. Int J Cancer. 2006 Sep 1;119(5):1023-7.

Song P, Sekhon HS, Jia Y, Keller JA, Blusztajn JK, Mark GP, Spindel ER. Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. Cancer Res. 2003 Jan 1;63(1):214-21.

Spechler SJ, Zeroogian JM, Antonioli DA, Wang HH, Goyal RK.Prevalence of metaplasia at the gastro-oesophageal junction. Lancet. 1994 Dec 3;344(8936):1533-6.

Stein HJ, Brücher BL, Sendler A, Siewert JR. Esophageal cancer: patient evaluation and pre-treatment staging. Surg Oncol. 2001 Nov;10(3):103-11.

Stevens VL, Bierut LJ, Talbot JT, Wang JC, Sun J, Hinrichs AL, Thun MJ, Goate A, Calle EE. Nicotinic receptor gene variants influence susceptibility to heavy smoking. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008 Dec;17(12):3517-25.

Tapper AR, McKinney SL, Nashmi R, Schwarz J, Deshpande P, Labarca C, Whiteaker P, Marks MJ, Collins AC, Lester HA. Nicotine activation of alpha4* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. Science. 2004 Nov 5;306(5698):1029-32.

Thomas RM, Sobin LH. Gastrointestinal cancer. Cancer. 1995 Jan 1;75(1 Suppl):154-70.

Toxicologia – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto. (2006/2007). [acesso em fev. 2013]. Disponível em: http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0607/neonicot/recepnicot.html.

Toh Y, Oki E, Ohgaki K, Sakamoto Y, Ito S, Egashira A, Saeki H, Kakeji Y, Morita M, Sakaguchi Y, Okamura T, Maehara Y. Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: molecular mechanisms of carcinogenesis. Int J Clin Oncol. 2010 Apr;15(2):135-44.

Trombino S, Cesario A, Margaritora S, Granone P, Motta G, Falugi C, Russo P. Alpha7-nicotinic acetylcholine receptors affect growth regulation of human mesothelioma cells: role of mitogen- activated protein kinase pathway. Cancer Res. 2004 Jan 1;64(1):135-45.

Tsurutani J, Castillo SS, Brognard J, Granville CA, Zhang C, Gills JJ, Sayyah J, Dennis PA.Tobacco components stimulate Akt-dependent proliferation and NFkappaB- dependent survival in lung cancer cells. Carcinogenesis. 2005 Jul;26(7):1182-95.

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

Vainio PJ, Tuominen RK. Cotinine binding to nicotinic acetylcholine receptors in bovine chromaffin cell and rat brain membranes. Nicotine Tob Res. 2001 May;3(2):177-82.

van Engeland M, Weijenberg MP, Roemen GM, Brink M, de Bruïne AP, Goldbohm RA, van den Brandt PA, Baylin SB, de Goeij AF, Herman JG. Effects of dietary folate and alcohol intake on promoter methylation in sporadic colorectal cancer: the Netherlands cohort study on diet and cancer. Cancer Res. 2003 Jun 15;63(12):3133-7.

Wang Y, Pereira EF, Maus AD, Ostlie NS, Navaneetham D, Lei S, Albuquerque EX, Conti-Fine BM. Human bronchial epithelial and endothelial cells express alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. Mol Pharmacol. 2001 Dec;60(6):1201-9.

Wang K, Hackett JT, Cox ME, Van Hoek M, Lindstrom JM, Parsons SJ. Regulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor by SRC family tyrosine kinases. J Biol Chem. 2004 Mar 5;279(10):8779-86.

Wang Y, Wu H, Liu Q, Wang C, Fu L, Wang H, Zhu W, Fu W, Lv Y, Wang S, Hu L. Association of CHRNA5-A3-B4 variation with esophageal squamous cell carcinoma risk and smoking behaviors in a Chinese population. PLoS One. 2013 Jul 2;8(7):e67664.

Weir DG, McGing PG, Scott JM. Folate metabolism, the enterohepatic circulation and alcohol. Biochem Pharmacol. 1985 Jan 1;34(1):1-7.

Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. Br J Pharmacol. 2008 Aug;154(8):1558-71.

West KA, Brognard J, Clark AS, Linnoila IR, Yang X, Swain SM, Harris C, Belinsky S, Dennis PA. Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. J Clin Invest. 2003 Jan;111(1):81-90.

Wu J, Lukas RJ. Naturally-expressed nicotinic acetylcholine receptor subtypes. Biochem Pharmacol. 2011 Oct 15;82(8):800-7.

Wu CH, Lee CH, Ho YS. Nicotinic acetylcholine receptor-based blockade: Applications of molecular target for cancer therapy. Clin Cancer Res. 2011 Jun 1;17(11):3533-41.

Ye YN, Liu ES, Shin VY, Wu WK, Cho CH. The modulating role of nuclear factor-kappaB in the action of alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and cross-talk between 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in colon cancer growth induced by 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3- pyridyl)-1-butanone. J Pharmacol Exp Ther. 2004 Oct;311(1):123-30.

Ye B, Ji CY, Zhao Y, Li W, Feng J, Zhang X. Single nucleotide polymorphism at alcohol dehydrogenase-1B is associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Cell Int. 2014 Jan 31;14(1):12.

Yu MA, Kiang A, Wang-Rodriguez J, Rahimy E, Haas M, Yu V, Ellies LG, Chen J, Fan JB, Brumund KT, Weisman RA, Ongkeko WM. Nicotine promotes acquisition of stem cell and epithelial-to-mesenchymal properties in head and neck squamous cell carcinoma. PLoS One. 2012;7(12):e51967.

Zhao Y, Zhou W, Xue L, Zhang W, Zhan Q. Nicotine activates YAP1 through nAChRs mediated signaling in esophageal squamous cell cancer (ESCC). PLoS One. 2014 Mar 12;9(3):e90836.

Zia S, Ndoye A, Nguyen VT, Grando SA. Nicotine enhances expression of the alpha 3, alpha 4, alpha 5, and alpha 7 nicotinic receptors modulating calcium metabolism and regulating adhesion and motility of respiratory epithelial cells. Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 1997 Sep;97(3):243-62.

Zong Y, Zhang ST, Zhu ST. Nicotine enhances migration and invasion of human esophageal squamous carcinoma cells which is inhibited by nimesulide. World J Gastroenterol. 2009 May 28;15(20):2500-5.

Zouridakis M, Zisimopoulou P, Poulas K, Tzartos SJ. Recent advances in understanding the structure of nicotinic acetylcholine receptors. IUBMB Life. 2009 Apr;61(4):407-23.

APÊNDICE A – Termo de consentimento informado (HUPE/UERJ)

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA/SERVIÇO DE ENDOSCOPIA DIGESTIVA

FOLHA DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Informações aos participantes

Este estudo tem como objetivo investigar aspectos genéticos e da saúde de pacientes submetidos à endoscopia digestiva no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) e para isso pedimos a colaboração destes pacientes para responder um questionário e doar 5mL de sangue periférico (veia do braço). Pedimos também o consentimento para a utilização e fragmentos retirados do esôfago durante a endoscopia para que possamos efetuar as análises genéticas relevantes. O questionário e a coleta do material serão realizados por pessoas que fazem parte desta pesquisa e que são devidamente treinadas para este fim.

Deixamos claro que a participação dos pacientes nesta pesquisa é voluntária, e as informações coletadas aqui, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidos sob estrito sigilo e serão utilizados somente pela equipe interna que faz parte desta pesquisa.

Toda a equipe que faz parte desta pesquisa agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu declaro que concordo em participar desta pesquisa na condição de voluntário de acordo com os critérios acima expostos.

Assinatura: _____

Data: _____

APÊNDICE B – Questionário sobre hábitos (HUPE/UERJ)

No do Paciente/amostra(s)
_____/ _____

Nome do paciente: _____

Indicação clínica: _____

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

QUESTIONÁRIO SOBRE A SAÚDE DO ADULTO

Tecido coletado:

- esôfago ( ) endoscopia ( ) cirurgia
  ( ) normal ( ) tumor

terço: ( ) superior ( ) médio ( ) inferior

- sangue ( ) sim ( ) não

I- Identificação:

Data da entrevista: _____ / _____ / _____

Nome do entrevistador: _____

Condição: Controle ( ) Caso ( )

Hospital/Serviço: _____ / _____

Número de prontuário: _____

Início da entrevista: ____ : ____ (horas : minutos)

II - Dados pessoais:

Idade: _____ anos

Data de nascimento: ____ / ____ / ____

Sexo: ( ) Feminino ( ) Masculino

Cor de pele (segundo entrevistador):

1. ( ) branca 4. ( ) oriental

2. ( ) parda 5. ( ) índio

3. ( ) preta

Tem ascendente índio (pais, avós e bisavós)? ( ) Não ( ) Sim ( ) Não sabe informar

Tem ascendente negro (pais, avós e bisavós)? ( ) Não ( ) Sim ( ) Não sabe informar

Qual o estado do Brasil que você nasceu? _____
Caso não tenha nascido no Brasil, qual o país? _____

Endereço: _____

Telefone: _____ ( ) residência ( ) recado ( )trabalho ( )celular
_____ ( ) residência ( ) recado ( )trabalho ( )celular
_____ ( ) residência ( ) recado ( )trabalho ( )celular

Onde o/a senhor/a mora* atualmente?
( ) zona rural ( ) zona urbana (bairro: _____)
***Se for no município do Rio de Janeiro colocar o bairro**

Há quantos anos o/a senhor/a mora neste local? ____ anos

O/a senhor/a já morou na zona rural (roça, sítio, chácara)? ( ) Não ( ) Sim ( ) Não sabe informar.

Se sim, quantos anos? ____ anos

III. Informações sobre problemas de saúde

Alguma vez já foi diagnosticado:

Doença		Com que idade?	Usou remédio? Qual?	Quanto tempo?
Hipertensão arterial	( )		( )	
Diabetes	( )		( )	
Hipercolesterolemia/colesterol alto	( )		( )	
Gastrite	( )		( )	
Refluxo esofágico	( )		( )	
Acalasia	( )		( )	
Tilose	( )		( )	
Doença de Chagas	( )		( )	
Doenças no fígado (Hepatite, Esteatose – gordura no fígado, cirrose)	( )		( )	
Pancreatite	( )		( )	
Úlcera péptica	( )		( )	
Gástrica	( )		( )	
Duodenal	( )		( )	
Câncer	( )		( )	
Que tipo?	( )		( )	
Distúrbio emocional ou nervoso?	( )		( )	
Outras	( )		( )	
			( )	

Somente para as mulheres:

Faz ou fez terapia de reposição hormonal? ( ) Não ( ) Sim ( ) Não sabe informar

Usa anticoncepcionais? ( ) Não ( ) Sim ( ) Não sabe informar

Em caso afirmativo para a ou b, qual o medicamento utilizado? _____

Qual a idade da menarca? _____ anos

Qual a idade da menopausa? _____ anos

IV. Dados sobre ocupação

O/a senhor/a trabalha atualmente? ( ) sim ( ) não
Considerar sim o licenciado para tratamento clínico

Se não, o senhor/a:

( ) nunca trabalhou
( ) já trabalhou mas não recebe aposentadoria
( ) já trabalhou e é aposentado atualmente

Se sim, com que tipo de atividade? Por quanto tempo?

_____ _____
_____ _____
_____ _____
_____ _____

Caso o senhor trabalhe ou tenha trabalhado, em seu ambiente profissional o/a senhor/a entra ou entrou em contato com alguns dos agentes ou processos abaixo:

		Início (idade)	**Término (idade)**	**Horas/dia**
Petróleo ou subprodutos	( )			
Material de tipografia	( )			
Amianto	( )			
Pesticidas	( )			
Alta temperatura	( )			
Raios x e outras radiações	( )			
Lavoura	( )			
Outros	( )			

V. Informações sobre renda e escolaridade

Qual a renda habitual de sua família, incluindo salários, aposentadorias, pensões, aluguéis e outros rendimentos por mês?_____ reais

Quantas pessoas vivem desta renda? _____

Qual a sua escolaridade?

( ) não sabe ler e escrever
( ) primário completo
( ) primário incompleto
( ) 1º grau completo
( ) 1º grau incompleto
( ) 2º grau completo
( ) 2º grau incompleto
( ) superior completo
( ) superior incompleto
( ) pós-graduação

VI. Dados familiares

Qual o seu estado conjugal atual?

( ) casado ou morando há mais de 6 meses com o mesmo/aparceiro/a
( ) separado ou divorciado
( ) viúvo
( ) nunca se casou

Quantos irmãos o senhor/a tem ou teve? (incluir vivos e mortos)

_____ irmãos _____ irmãs

Quantos filhos o senhor/a tem ou teve? (incluir vivos e mortos)

_____ filhos _____ filhas

Somente para as mulheres:

Quantas vezes a senhora engravidou? _____

Qual a sua idade ao ter seu 1º filho? _____ anos

A senhora já passou por algum aborto? ( ) Não ( ) Sim. Quantos? _____

Para TODOS:

Houve algum caso de tumor benigno na sua família? ( ) sim ( ) não ( ) não sabe informar

Houve algum caso de câncer na sua família? ( ) sim ( ) não ( ) não sabe informar

Se sim, em que familiar e que tipo de tumor benigno ou de câncer?

Tumor (benigno ou maligno)	Parentesco	Tecido

VII. Informações sobre tabagismo

O senhor se enquadra, em relação a o hábito de fumar, em que condição:

( ) fuma atualmente pelo menos 1 cigarro por dia durante um período mínimo de 3 meses
( ) parou de fumar há pelo menos 1 ano
( ) nunca fumou

Com que idade o senhor/a começou a fumar? _____ anos

Se parou de fumar, com que idade? _____ anos

Qual a quantidade e duração do hábito de fumar?

Tipo	Idade início	Idade que parou	Quantidade diária
Cigarro com filtro			
Cigarro sem filtro			
Cigarro de palha			
Charuto			
Cachimbo			
Narguilé			

Durante toda a sua vida, você já viveu com alguém que fumava regularmente dentro de casa?

( ) sim ( ) não ( ) não sabe informar

Se sim, preencher a tabela a seguir:

Parentesco	Tipo de fumo	Quantos anos essa pessoa morou com você?	Essa pessoa fumou por todo o período em que vocês viveram juntos?	Durante quantos anos essa pessoa fumou?	Qual era o hábito de fumar dessa pessoa?
			( ) Sim ( ) Não ( ) Não lembra		( ) Diário ( ) Ocasional ( ) Não lembra
			( ) Sim ( ) Não ( ) Não lembra		( ) Diário ( ) Ocasional ( ) Não lembra
			( ) Sim ( ) Não ( ) Não lembra		( ) Diário ( ) Ocasional ( ) Não lembra

VIII. Informações sobre peso e alimentação

Qual o seu peso atual? _____
E sua altura atual? _____

Qual foi seu peso máximo? _____ (excluir os períodos de gestação)

Quantos anos tinha quando atingiu seu peso máximo? _____

IX. Informações sobre etilismo

Costuma ingerir bebida alcoólica? ( ) Sim ( ) Não

Se bebe ou bebeu por 6 meses ou mais, com que freqüência bebe/ia?

( ) 1 vez por dia ou mais
( ) 5 a 6 vezes por semana
( ) 2 a 4 vezes por semana
( ) 1 vez por semana
( ) 1 a 3 vezes por mês
( ) nunca ou quase nunca

Quando foi que o(a) senhor(a) bebeu pela última vez? _____ dias

Qual a bebida alcoólica que o senhor/a costuma/va tomar?

Tipo	Quantidade diária
cerveja	
vinho	
pinga	
vodka	
uísque	
conhaque	

Com que idade começou a beber? ____ anos ( ) não lembra

Se parou de beber, com que idade parou? ____ anos( ) não lembra

Por que parou?

( ) indicação médica ( ) doença ( ) outros _____

Com que faixa etária o/a senhor/a bebia mais?

( ) de 15 a 19 anos ( ) de 20 a 29 ( ) de 30 a 39 ( ) 40 ou mais

Recordando seu hábito alimentar

Mudou sua alimentação no último ano, antes do tratamento atual? ( ) Sim ( ) Não

Se SIM, por que motivo?

( ) por estar doente
( ) religião
( ) para emagrecer
( ) para engordar
( ) alergia alimentar
( ) outros _____

Que tipo de mudança ocorreu na sua alimentação? _____

As perguntas seguintes devem considerar os hábitos <u>anteriores</u> à mudança na alimentação:

O/a senhor/a costuma:

Tomar café da manhã	( )
Lanchar entre o café e o almoço	( )
Almoçar	( )
Lanchar à tarde	( )
Jantar	( )
Lanchar após o jantar	( )

Com que freqüência costuma consumir queijo light, requeijão light, iogurte diet ou light?

( ) 1 vez por dia ou mais
( ) 5 a 6 vezes por semana
( ) 2 a 4 vezes por semana
( ) 1 vez por semana
( ) 1 a 3 vezes por mês
( ) nunca ou quase nunca

Quanto da gordura visível da carne o/a senhor/a costuma tirar antes de comer?

( ) tira toda a gordura visível
( ) tira a maior parte
( ) tira pequena parte da gordura
( ) não tira a gordura
( ) não come carne
( ) não sabe

O/a senhor/a costuma comer a pele do frango? ( ) sim ( ) não

Quando o/a senhor/a come frango ou carne fritos eles têm aparência externa:

( ) bastante escura ou tostado
( ) tostado médio
( ) não come
( ) pouco tostado
( ) mal passado

Quando come churrasco, a aparência externa da carne que você come:

( ) bastante escura ou tostada
( ) tostada médio
( ) pouco tostada
( ) bem clara
( ) não come

Costuma utilizar com maior freqüência:

( ) manteiga
( ) margarina
( ) ambas
( ) não utiliza nenhuma

Se utiliza margarina, ela é do tipo light? ( ) sim ( ) não

Costuma comer frituras? ( ) sim ( ) não

Com que freqüência?

( ) 1 vez por dia ou mais
( ) 5 a 6 vezes por semana
( ) 2 a 4 vezes por semana
( ) 1 vez por semana
( ) 1 a 3 vezes por mês
( ) nunca ou quase nunca

Que tipo de gordura costuma utilizar para cozinhar?

( ) banha
( ) manteiga
( ) óleo de soja
( ) óleo de milho
( ) óleo de girassol
( ) óleo de canola
( ) azeite
( ) não sabe

Com que freqüência costuma utilizar azeite?

( ) 1 vez por dia ou mais
( ) 5 a 6 vezes por semana
( ) 2 a 4 vezes por semana
( ) 1 vez por semana
( ) 1 a 3 vezes por mês
( ) nunca ou quase nunca

Costuma tomar chimarrão? ( ) sim ( ) não

Qual o volume por vez?

( ) uma xícara
( ) 2 xícaras
( ) mais de 2 xícaras

Com qual temperatura?

( ) gelado
( ) temperatura ambiente
( ) morno
( ) quente
( ) muito quente

Costuma tomar mate? ( ) sim ( ) não

Qual o tipo de mate? ( ) industrializado ( ) caseiro

Costuma tomar outros tipos de chá? ( ) sim ( ) não Qual tipo? _____

Qual o volume por vez?

( ) uma xícara
( ) 2 xícaras
( ) mais de 2 xícaras

Com qual temperatura?

( ) gelado
( ) temperatura ambiente
( ) morno
( ) quente
( ) muito quente

Quando o/a senhor/a bebe café, café com leite ou leite com chocolate, qual é a temperatura?

( ) gelado
( ) temperatura ambiente
( ) morno
( ) quente
( ) muito quente

Qual o tipo de leite que o/a senhor/a costuma utilizar?

( ) integral
( ) desnatado
( ) semi-desnatado
( ) nunca toma leite

Costuma ingerir sopa? ( ) sim ( ) não

Com qual temperatura?

( ) gelado
( ) temperatura ambiente
( ) morno
( ) quente
( ) muito quente

Nos dias frios, de que maneira você prefere ingerir as bebidas:

( ) prefere não esquentar e tomar frio
( ) prefere beber morno
( ) prefere beber quente
( ) prefere beber muito quente
( ) prefere beber fervendo

X- Para o entrevistador

Final da entrevista: ___:____

A cooperação do/a entrevistado/a foi:

( ) muito boa
( ) boa
( ) regular
( ) ruim

Observações:

APÊNDICE C - Termo de consentimento informado (INCA)

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer

Comitê de Ética em Pesquisa-INCA
PROT #### – Aprovado __/ __ / 2011

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 1

Projeto de Pesquisa **"**Marcadores Moleculares de Tumores Secundários de Esôfago em Pacientes com Carcinoma de Células Escamosas em Cabeça e Pescoço: Uso Potencial no Diagnóstico Precoce e na Terapêutica de Rotina" (CEE)

Nome do Voluntário: _____

Você é um paciente matriculado no INCA com diagnóstico confirmado de câncer de esôfago e, em breve, será submetido a um tratamento que poderá ser cirúrgico ou não (Quimioterapia/Radioterapia). Para seu estudo e planejamento terapêutico será necessária a realização de uma Endoscopia Digestiva Alta (exame para avaliar características do seu tumor como tamanho, localização, etc.). Por isso está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa que envolve a coleta de uma biópsia do seu tecido tumoral, de tecido normal próximo ao tumor (quando possível) e uma amostra do seu sangue. Esta biópsia poderá ser realizada no momento em que for feita sua EDA e/ou no momento da cirurgia (caso seja indicado o tratamento cirúrgico). Para que você possa decidir se quer participar ou não deste projeto, precisa conhecer seus benefícios, riscos e consequências. Após receber todas as informações abaixo você poderá fornecer seu consentimento por escrito, caso queira participar.

PROPÓSITO DO PROJETO DE PESQUISA

Este projeto de pesquisa é um esforço conjunto entre pesquisadores para utilizar os recentes avanços na medicina na tentativa de diagnosticar precocemente casos de câncer de esôfago que surgem como segundos tumores primários (um segundo tumor que ocorre em alguns pacientes que já tiveram câncer de cabeça e pescoço). Tanto os tumores de esôfago quanto os de cabeça e pescoço são muito comuns em nosso país e frequentemente causam a

morte desses indivíduos. Para que você possa decidir se quer participar ou não deste projeto de pesquisa, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVOS DO PROJETO DE PESQUISA

Os objetivos deste projeto são a comparação das alterações moleculares entre câncer de cabeça e pescoço e câncer de esôfago buscando descobrir marcadores moleculares com maior eficiência para o diagnóstico precoce do câncer de esôfago ou identificar os indivíduos que possuem um alto risco de desenvolver um segundo tumor.

PROCEDIMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

Se concordar em participar deste projeto será necessário coletar amostras do tumor, e quando possível, do tecido normal próximo à lesão. Esta coleta poderá ser realizada na endoscopia digestiva alta e/ou durante o procedimento cirúrgico. Este procedimento não comprometerá o diagnóstico e não irá interferir no tratamento. Além disto, será coletada uma pequena amostra de sangue, o equivalente a duas colheres de sopa, para futuras pesquisas. Para realizar a endoscopia, todo paciente precisa que seja puncionada uma veia do braço com uma agulha para a aplicação de soro e medicamentos. Nesse momento aproveitaremos a punção para a coleta do sangue.

Ao concordar em participar deste projeto, os pesquisadores participantes consultarão seus registros do prontuário e poderão utilizar para pesquisas parte do material coletado que foi armazenado.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Caso você não deseje participar deste projeto de pesquisa, basta que você não assine este Termo de Consentimento, e nenhuma amostra será utilizada nem os seus registros médicos serão consultados.

RISCOS

O seu tratamento será exatamente o mesmo caso você participe ou não deste projeto de pesquisa. Não haverá risco adicional para a obtenção de amostras para o presente projeto.

BENEFÍCIOS

Não haverá benefícios imediatos a você, porém a sua participação nesse projeto de pesquisa poderá contribuir para o entendimento de casos como o seu no futuro. Este projeto poderá, no entanto, resultar em benefícios para outros pacientes que terão o diagnóstico de câncer de esôfago e que irão fazer o tratamento.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Durante o projeto você terá o acompanhamento normal junto ao seu médico do INCA que é responsável pela sua assistência. Além disso, a Drª Izabela Costa da Cirurgia de Cabeça e Pescoço (tel: 3207-6782), o Dr. Eduardo Pinto, da cirurgia abdominopélvica (tel: 3207-1161) e o pesquisador responsável pelo projeto, Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto (tel: 3207-6560), estarão disponíveis para esclarecer eventuais dúvidas.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e equipe de pesquisadores envolvidos. As amostras de tecido serão processadas de tal forma que sua privacidade e identidade sejam preservadas. Seu nome não será revelado ainda que as informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Caso haja a necessidade de atendimento médico, durante ou após este projeto, este ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste projeto de pesquisa.

CUSTOS

Se você concordar com o uso das amostras biológicas conforme escrito acima, é necessário esclarecer que você não terá qualquer custo ou forma de pagamento pela participação no projeto de pesquisa. A participação no projeto é voluntária e você não sofrerá nenhuma penalidade caso não autorize a sua participação. Todo o seu tratamento e acompanhamento médico serão os mesmos, independente de sua decisão de autorizar ou não a participação no projeto.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste projeto de pesquisa é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de desistência, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento durante o andamento desse projeto de pesquisa. Neste caso, por favor, ligue para o Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto no telefone (21) 3207-6560**.** Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante desse projeto de pesquisa, também pode contar com uma terceira pessoa imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do INCA, Rua André Cavalcanti 37, telefone (21) 3207-6551. Email: CEP@inca.gov.br

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer

Comitê de Ética em Pesquisa-INCA
PROT #### – Aprovado __/ __ / 2011

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito deste projeto de pesquisa assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste projeto de pesquisa e:

( ) Expresso que desejo ser reconvocado a oferecer um novo consentimento para cada projeto que venha a utilizar agora, ou no futuro, material biológico coletado pelo presente projeto de pesquisa, indicando as pessoas abaixo relacionadas como representantes em caso de incapacidade minha para prover tal consentimento:

_____(NOME EM LETRA FORMA)

_____(GRAU DE PARENTESCO)

_____(TELEFONE)

_____(NOME EM LETRA FORMA)

_____(GRAU DE PARENTESCO)

_____(TELEFONE)

( ) Não gostaria de ser reconvocado a oferecer um novo consentimento para cada projeto de pesquisa que venha a utilizar agora, ou no futuro, material biológico coletado pelo presente projeto de pesquisa.

Entendo que não receberei compensação monetária por minha participação neste projeto.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

_____ ____ / _____ / _____

(Assinatura do Paciente) dia mês ano

_____

(Nome do Paciente – letra de forma)

_____ ____ / ____ / _____

(Assinatura de Testemunha, se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste projeto ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

_____ ____ / ____ / ____

(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano

APÊNDICE D – Prontuários - INCA

REANÁLISE DE PRONTUÁRIOS – Câncer de Esôfago – INCA

CEE ☐ **ADE** ☐

Preenchedor: _____ **Data:** ____/____/____ **Matrícula do Pcte:** _____

Nome:_____ **Data Matrícula:** ____/____/____ **Gênero:** Masculino ☐ Feminino ☐

Nacionalidade: Brasil ☐ Outro ☐ _____ **Naturalidade (UF):** _____ **Residência:** Cidade:_____ UF:_____

Cor da pele: Branca ☐ Não-branca ☐ **Data Nascimento:** ____/____/____ **Idade:** _____ **Profissão:**_____

Escolaridade: Analfabeto ☐ 1º Grau Incompleto ☐ 1º Grau Completo ☐ 2º Grau Incompleto ☐ 2º Grau Completo ☐ Superior Incompleto ☐ Superior Completo ☐ Pós-Graduação ☐ Não Informa ☐

Estado Civil: Casado ☐ União Estável ☐ Divorciado ☐ Solteiro ☐ **Hist Familiar de Câncer de Esôfago:** Não ☐ Sim ☐

HÁBITOS DO PACIENTE

Tabagismo: Não ☐ Sim ☐ Ex ☐ Não Informa ☐ | **Refluxo:** Não ☐ Sim ☐ Não Informa ☐

Etilismo: Não ☐ Sim ☐ Ex ☐ Não Informa ☐ | **Barret:** Não ☐ Sim ☐ Não Informa ☐

Status Nutricional: Desnutrição Grave ☐ Desnutrição Moderada ☐ Desnutrição Leve ☐ Eutrófico ☐ Sobrepeso ☐ Obeso ☐ Não Informa ☐

INFORMAÇÕES SOBRE A DOENÇA

Data do Diagnóstico (Laudo DIPAT): ____/____/____ | **Esôfago é STP:** Não ☐ Sim ☐ **CID PTP:**_____

Tto do PTP: Nenhum ☐ Cirurgia ☐ Rxt ☐ QT ☐ Rxt+QT ☐ Rxt+BQT ☐ Rxt+QT+BQT ☐ Outro ☐ **Outro:**_____

Localização: C15.0 Esôfago Cervica; ☐ C15.1 Esôfago Torácico ☐ C15.2 Esôfago Abdominal ☐ C15.3 Esôfago Torácio 1/3 Sup ☐ C15.4 Esôfago Torácico 1/3 Med ☐ C15.5 Esôfago Torácico 1/3 Inf ☐ C15.8 Lesão Invasiva ☐ C15.9 Não especificado ☐

Grau de Diferenciação: I (Bem dif) ☐ II (Mod dif) ☐ III (Pouco dif) ☐ | **Uso de Sonda NasoEntérica:** Não ☐ Sim ☐ Não Informa ☐

TNM (Abdome): **cT:** 1a ☐ 1b ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4a ☐ 4b ☐ is ☐ X ☐
cN: 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ X ☐ **cM:** 0 ☐ 1 ☐ X ☐

Estadiamento (Abdome): IA ☐ IB ☐ IIA ☐ IIB ☐ IIIA ☐ IIIB ☐ IIIC ☐ IV ☐

TRATAMENTO

Tto Inicial: Nenhum ☐ Cirurgia ☐ Rxt ☐ Rxt+QT ☐ Rxt+BQT ☐ Rxt+QT+BQT ☐ Suporte ☐

Local Tto inicial: For a do INCA ☐ No INCA ☐ **Início Tto inicial:** ____/____/____ **Fim do Tto inicial:** ___/___/___

Doença Residual após Tto inicial: Não ☐ Sim ☐

Tto Adjuvante: Nenhum ☐ Radioterapia ☐ Rxt+QT ☐ **Tto Resgate:** Cirurgia ☐ Suporte ☐ Nenhum ☐ **Tto Resgate:** ___/___/___

RXT: Curativa ☐ Neoadjuvante ☐ Paliativa ☐ **Completou?** Não ☐ Sim ☐
QT: Curativa ☐ Neoadjuvante ☐ Paliativa ☐ **Completou?** Não ☐ Sim ☐

INFORMAÇÕES SOBRE CIRURGIA (ESOFAGECTOMIA)							
Cirurgia: VLP ☐	Transhiatal ☐	Transtorácica ☐	**Linfadenectomia:** 2 Campos ☐	3 Campos ☐	Não Realizada ☐	Não Informa ☐	
Reconstrução Trato Alimentar:	Cólon Direito ☐	Cólon Esquerdo ☐	Cólon Transverso ☐	Estômago ☐			
Margens Livres: Não ☐	Sim ☐	Sim, após ampliação ☐	Não avaliado ☐				
TNM (Abdome): cT: 1a ☐	1b ☐	2 ☐	3 ☐	4a ☐	4b ☐	is ☐	X ☐
cN: 0 ☐	1 ☐	2 ☐	3 ☐	X ☐	**cM:** 0 ☐	1 ☐	X ☐
Estadiamento (Abdome): IA ☐	IB ☐	IIA ☐	IIB ☐	IIIA ☐	IIIB ☐	IIIC ☐	IV ☐

ACOMPANHAMENTO							
Remissão Completa: Não ☐	Sim ☐	**Recidiva Presente:** Não ☐	Sim ☐	**Data Recidiva:** _____/____/_____			
Local Recidiva: Local ☐	LNFD ☐	Distância ☐	**Última Consulta:** _____/____/_____	C/ Evid. de doença ☐	S/ Evid. de doença ☐		
Data HCIV: _____/____/_____	**Data Óbito:** _____/____/_____	**Causa Óbito:** _____					
Apresentou STP: Não ☐	Sim ☐	**Detecção STP:** _____/____/_____	**Sincrônico:** Não ☐	Sim ☐	**CID STP:** _____		
Metástase a distância: Não ☐	Sim ☐	**Sítio de Metástase:** _____					

ANEXO A – Carta de aprovação do projeto sob o número 416 (CEP/HUPE)

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rio de Janeiro, 20 de junho de 2002

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof.: Wille Oigman
Para: Prof. Paulo Roberto Alves de Pinho

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (416-CEP/HUPE) " CÂNCER DE ESÔFAGO: UM ESTUDO MULTIDISCIPLINAR " aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º 251 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 07 de agosto de 1997, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B – Carta de aprovação do projeto sob o número 116/11 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA

CEP

INCA
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Memo 440/11-CEP-INCA Rio de Janeiro, 5 de dezembro de 2011.

A(o): Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto
Pesquisador(a) Principal

Registro CEP nº 116/11 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)
CAAE – 0086.0.007.000-11
Título do Estudo – Marcadores Moleculares de Tumores Secundários de Esôfago em Pacientes com Carcinoma de Células Escamosas em Cabeça e Pescoço: Uso Potencial no Diagnóstico Precoce e na Terapia de Rotina

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do INCA **aprovou** após reanálise o estudo intitulado: **Marcadores Moleculares de Tumores Secundários de Esôfago em Pacientes com Carcinoma de Células Escamosas em Cabeça e Pescoço: Uso Potencial no Diagnóstico Precoce e na Terapia de Rotina versão 2,** bem como seu **TCLE para estudo prospectivo CECP versão 3** e **TCLE para estudo retrospectivo CECP e CEE versão 3**, em 30 de novembro de 2011.

Ressalto o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo.

Atenciosamente,

Dr. Carlos Henrique D. Silva
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

C/c – Dr. Luiz Augusto Maltoni – Direção Geral

1