

Fernanda da Silva Manoel Caetano

**Aneuploidias, Deleção do Gene TP53 e Amplificação
do Gene Ciclina D1 em Megaesôfago Chagásico
e Carcinoma do Esôfago**



*

1910001100



Fernanda da Silva Manoel-Caetano

ANEUPLOIDIAS, DELEÇÃO DO GENE *TP53* E
AMPLIFICAÇÃO DO GENE *CICLINA D1* EM
MEGAESÔFAGO CHAGÁSICO E CARCINOMA DO
ESÔFAGO

Orientador: Profa. Dra. Ana Elizabete Silva



T 1.100/02

Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Genética.

São José do Rio Preto - SP

2002

576.3:575

M285a

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
FACULDADE DE CIÊNCIAS

Fernanda da Silva Manoel-Caetano

ANEUPLOIDIAS, DELEÇÃO DO GENE TP53 E
AMPLIFICAÇÃO DO GENE CICLINA D1 EM
MEGASÔFAGO CHAGÁSICO E CARCINOMA DO
ESÔFAGO

Manoel-Caetano, Fernanda da Silva.

Aneuploidias, deleção do gene *TP53* e amplificação do gene *Ciclina D1* em megasôfago chagásico e carcinoma do esôfago / Fernanda da Silva Manoel-Caetano. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2002.
107 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Ana Elizabete Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Megasôfago chagásico. 2. Carcinoma do esôfago. 3. Hibridização *in situ* Fluorescente. 4. Aneuploidias. 5. Amplificação. 6. Deleção. I. Silva, Ana Elizabete. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 576.3 : 575



Fernanda da Silva Manoel-Caetano

**Aneuploidias, deleção do gene *TP53* e amplificação do
gene *Ciclina D1* em megaesôfago chagásico e carcinoma
do esôfago**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador.....

1º Examinador.....

2º Examinador.....

São José do Rio Preto, 23/08/2002.



O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, Campus de São José do Rio Preto, com auxílio financeiro e bolsa da FAPESP.



Dedico aos meus pais, **José Antônio e Aparecida**, e ao meu bebê, que em meu ventre, acompanhou todas as emoções da etapa final deste trabalho.

Agradecimentos

Pelo auxílio recebido tornando possível a realização deste trabalho, agradeço:

À Profa. Dra. **Ana Elizabete Silva**, pela orientação, amizade, dedicação e compreensão, possibilitando a realização deste trabalho;

Às Profa. Dra. **Gilka J. Figaro Gattás** e Profa. Dra. **Cláudia Regina Bonini Domingos**, por terem aceito participar da banca examinadora, permitindo o enriquecimento do trabalho;

Aos médicos **Alaor Caetano**, **Aldenís Albaneze Borim** e **Eumíldo de Campos Junior**, pelo apoio e colaboração na coleta das amostras;

À Dra. **Patrícia Maluf Cury**, patologista do Hospital de Base de São José do Rio Preto, pela confirmação histológica das amostras;

Às amigas do laboratório **Ana Cristina Gobbo Cezar** e **Lucimari Bizari Di-Cézar**, pela amizade, companheirismo, incentivo nos momentos de desânimo e auxílio durante a contagem das lâminas;

À Profa. Dra. **Marileila Varella-Garcia**, pelo auxílio nos critérios de análises dos resultados;

À Profa. Dra. **Eny Goloni Bertollo**, pela gentileza na obtenção dos prontuários dos pacientes;

Ao Prof. Dr. **Carlos Daghlían**, pela gentileza na revisão do Abstract;

À Profa. Dra. **Paula Rahal**, pela amizade, carinho e incentivo durante a realização deste trabalho;

Ao amigo e funcionário **Josué Rodrigues dos Santos**, pela amizade, apoio e auxílio que sempre me dispensou;

Aos funcionários da biblioteca, e em especial à Elza, pela competência e dedicação nos serviços de comutação bibliográfica;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido e aos assessores, pelas valiosas críticas e sugestões que enriqueceram este trabalho;

Aos pacientes que aceitaram em participar da pesquisa, pois sem eles este trabalho não teria sido desenvolvido;

À todos os meus amigos de laboratório, Janaína, Paola, Flávia, Alessandra Trovó, Giovana, Jucimara, Mariângela, Alessandra Vidotto, Sylvia, Ulises, Marcos e Melissa, pela amizade, companheirismo e incentivo que sempre me dispensaram durante a realização deste trabalho;

Ao meu irmão **Luís Ricardo**, pelo carinho, amizade e companheirismo que sempre foram muito importantes, principalmente nos momentos de desânimo;

Aos meus pais, **José Antônio e Aparecida**, pela formação que me proporcionaram, pelo carinho e incentivo incondicional, que permitiram com que eu concluísse mais esta etapa;

Ao meu esposo, **Renato**, pelo amor, carinho, incentivo e compreensão durante a fase final deste trabalho;

À **Deus**, por estar sempre presente iluminando o meu caminho, tornando possível a realização de mais esta etapa da minha vida..

“Não há nada de nobre em sermos superiores ao próximo. A verdadeira nobreza consiste em sermos superiores ao que éramos antes” (Autor desconhecido).

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO

I.1. Aspectos anatômicos e patológicos do esôfago.....	9
I.2. Epidemiologia do câncer de esôfago.....	13
I.3. Alterações citogenéticas em câncer de esôfago.....	15
I.4. Mecanismos moleculares e transformação maligna do esôfago.....	18

II. OBJETIVOS.....26

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Caracterização das amostras.....	27
III.2. Estudo citogenético molecular.....	32
III.2.1. Método para obtenção de núcleos interfásicos a partir de tecido fresco.....	32
III.2.2. Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente – FISH.....	33
III.3. Análise ao microscópio.....	34
III.4. Critérios para contagem dos núcleos.....	35
III.5. Análise estatística.....	36

IV. RESULTADOS

IV.1. Aneuploidias dos cromossomos 7, 11 e 17.....	37
IV.2. Deleção do gene <i>TP53</i> e amplificação do gene <i>Ciclina D1</i>	52

V. DISCUSSÃO.....70

VI. CONCLUSÕES.....89

VII. RESUMO.....90

VIII. ABSTRACT.....91

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....92

ANEXO.....107



I. INTRODUÇÃO

I.1. Aspectos anatômicos e patológicos do esôfago

O esôfago, um tubo muscular altamente distensível, tem por funções conduzir os alimentos e os fluidos da faringe para o estômago e impedir o refluxo do conteúdo gástrico (Cotran et al., 1999).

Histologicamente, o esôfago é revestido pelas camadas mucosa, submucosa, muscular própria e adventícia, refletindo a organização estrutural geral do trato gastrintestinal. A camada muscular própria contém fibras musculares estriadas do cricofaríngeo, conseqüentemente distúrbios do músculo esquelético podem causar disfunção esofágica (Cotran et al., 1999).

As lesões que abrangem o esôfago consistem em azias meramente irritativas até neoplasias altamente letais. As varizes esofágicas, resultantes de cirrose e hipertensão porta são de importância principal, mesmo sua ruptura sendo freqüentemente seguida de vômito de sangue. A esofagite e as hérnias hiatais, apesar de serem bem mais freqüentes, raramente são ameaçadoras à vida. O refluxo gastroesofágico de longa duração pode resultar no denominado esôfago de Barrett, no qual a mucosa escamosa distal é substituída por um epitélio colunar metaplásico, como resposta da injúria prolongada, ocorrendo em mais de 11% dos pacientes com a doença do refluxo sintomática (Cotran et al., 1999).

Um outro tipo de lesão que acomete o esôfago, a acalásia, representa um distúrbio motor caracterizado pelo relaxamento insuficiente do esfíncter esofágico inferior e uma perda progressiva da peristalse no corpo do esôfago (Chino et al., 2000; Lehman et al., 2001). A acalásia caracteriza-se pela destruição ou ausência dos plexos nervosos intramurais do esôfago, condição que determina ausência de peristaltismo ao nível do corpo do órgão, bem como a não abertura do esfíncter

esofágiano inferior em resposta à deglutição. Conseqüentemente, há estase alimentar e, inicialmente, acentuada incoordenação motora e, de modo progressivo, dilatação (megaesôfago) e diminuição de sua capacidade de contração (Pinotti et al., 1996).

No Brasil, a causa mais freqüente de acalásia é a doença de Chagas causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado, sendo, portanto, também conhecida como megaesôfago chagásico. Esta doença afeta 17 a 24 milhões de pessoas na América do Sul e Central. No entanto, ainda não se conhece as causas das alterações degenerativas na inervação neural observadas na acalásia que ocorre no restante do mundo. Na sua fase crônica, a característica patológica típica é uma redução no número de células ganglionares do plexo mioentérico levando a um relaxamento defeituoso, peristalse alterada, dilatação e esofagite crônica (Safatle-Ribeiro et al., 2000).

O sintoma clínico clássico da acalásia é a disfagia progressiva (dificuldade na deglutição), podendo ocorrer a regurgitação e aspiração noturnas de alimentos não digeridos (Cotran et al., 1999). O megaesôfago chagásico afeta preferencialmente os pacientes entre a terceira e sexta décadas da vida (Ferreira Santos, 1963 apud Borim, 1988).

O megaesôfago é classificado em graus I a IV com base na retenção de contraste, no diâmetro, na atividade contrátil, na tonicidade do segmento inferior, no alongamento do órgão e por meio da avaliação do aspecto radiológico do esôfago baseada no diâmetro e na retenção do meio de contraste no órgão (Rezende et al., 1960 apud Pinotti et al., 1996).

Pacientes com megaesôfago apresentam um risco aumentado de cerca de 3% a 8% de desenvolverem carcinoma de células escamosas do esôfago (Pinotti et al., 1996; Brücher et al., 2001). Esse tipo de carcinoma desenvolve-se em aproximadamente 5% dos pacientes com megaesôfago chagásico em uma idade muito mais jovem em relação àqueles sem essa doença (Cotran et al., 1999). O desenvolvimento do tumor está

tumor está relacionado ao contato prolongado de certos elementos da dieta alimentar com a mucosa devido à estase esofágica, aumento do crescimento bacteriano e irritação química, que culminam na esofagite crônica (Safatle-Ribeiro et al., 2000). Assim, a maior incidência de câncer nos pacientes portadores de megaesôfago pode estar relacionada à ocorrência dessas alterações inflamatórias da mucosa (Pinotti et al., 1996), sendo o carcinoma esofágico a complicação tardia mais séria desta afecção (Chino et al., 2000).

A detecção do carcinoma nesses pacientes é dificultada pelo fato dos sintomas serem encobertos pela disfagia severa provocada pela acalásia (Chino et al., 2000). Nestes casos o diagnóstico é realizado freqüentemente em estágio avançado, provavelmente porque o tumor pode progredir assintomaticamente no esôfago dilatado (Haubrich et al., 1995), sendo o prognóstico considerado pobre (Brücher et al., 2001). A duração entre o início dos sintomas relacionado ao megaesôfago e a detecção do câncer varia de 17 a 28 anos (Haubrich et al., 1995; Bektas et al., 2001).

Os carcinomas representam a maioria dos tumores esofagianos malignos. Dentre eles os carcinomas de células escamosas (CCE) perfazem 80 a 85% desses cânceres, os adenocarcinomas cerca de 5 a 10% e o restante incluem os tipos indiferenciados ou mais raros (Cotran et al., 1999).

Os carcinomas de células escamosas do esôfago iniciam-se como lesões *in situ* inaparentes e, quando se tornam evidentes, cerca de 20% desses tumores estão localizados no terço superior, 50% no terço médio e 30% no terço inferior. A maioria deles é moderadamente à bem diferenciado e independente do grau de diferenciação, muitos já estão volumosos ao serem diagnosticados (Cotran et al., 1999). Os tumores localizados no terço superior do esôfago metastizam para os vasos linfáticos cervicais, aqueles do terço médio para os gânglios mediastinais, paratraqueais e traqueo-brônquicos, e os do terço inferior disseminam-se

mais freqüentemente para os gânglios gástrico e celíaco (Cotran et al., 1999).

Inicialmente, o carcinoma esofágico produz disfagia, sendo que a obstrução ocorre de maneira gradual. Os pacientes ajustam-se subconscientemente à maior dificuldade de deglutição alterando progressivamente sua dieta de sólidos para líquidos. Tanto a nutrição alterada quanto os efeitos do próprio tumor causam a debilitação e redução de peso do paciente. No diagnóstico, o crescimento intenso e invasivo dessas neoplasias produz lesões extensas, tornando a dissecação difícil ou até impossível. A taxa de sobrevida de 5 anos em pacientes com carcinoma esofágico superficial é de aproximadamente 75%, comparado com 25% nos pacientes submetidos à cirurgia para a doença mais avançada e 5% para todos os pacientes com carcinoma esofágico. A presença de metástases para linfonodos no período da ressecção reduz significativamente a sobrevida de 5 anos (Cotran et al., 1999).

Os adenocarcinomas esofágicos desenvolvem-se bem menos freqüentemente que os CCE e geralmente afetam homens caucasianos na Europa Ocidental e América do Norte. Nesse tipo de neoplasia o esôfago de Barrett é conhecido como uma lesão precursora (Stemmermann et al., 1994). O padrão histológico do epitélio de Barrett mais comum é a metaplasia intestinal resultante da substituição do epitélio escamoso estratificado pelo tipo gástrico ou intestinal, conferindo resistência à agressão provocada pela esofagite de refluxo no esôfago distal (Cotran et al., 1999). O epitélio metaplásico pode tornar-se displásico representando um risco aumentado para o desenvolvimento desse tipo de neoplasia (Stemmermann et al., 1994). O prognóstico dos adenocarcinomas esofágicos é tão pobre quanto as outras formas de câncer de esôfago, apresentando uma taxa de sobrevida de 5 anos menor que 30% (De-Vita et al., 1997; Cotran et al., 1999).

I.2. Epidemiologia do câncer de esôfago

O câncer de esôfago está entre as dez neoplasias mais comuns, com acentuada variação geográfica na sua incidência (Barros et al., 2000). Mundialmente, os carcinomas de células escamosas constituem 90% das neoplasias esofágicas, com exceção dos Estados Unidos, cujas taxas de carcinoma e adenocarcinoma do esôfago apresentam incidências semelhantes (Cotran et al., 1999).

A incidência do carcinoma de células escamosas do esôfago varia amplamente em diferentes países e nas regiões de um mesmo país. A região estendendo-se do norte do Irã e Ásia Central ao norte da China, exibe taxas de incidência anual excedendo 100 casos por 100.000 habitantes, com mortalidade superior a 20% considerando-se todas as mortes por câncer. Outras áreas com incidência elevada incluem Porto Rico, África do Sul e Europa Ocidental. Nos Estados Unidos, o carcinoma de células escamosas do esôfago afeta 2 a 8 pessoas/100.000 anualmente, predominantemente o sexo masculino, com taxa sexual de 4:1. Os negros apresentam um risco maior do que os brancos, alcançando uma incidência quatro vezes maior nesse país (Cotran et al., 1999).

No Brasil, o câncer de esôfago ocupa o 6º lugar entre os homens e o 7º lugar entre as mulheres, com as maiores taxas de incidência e mortalidade presentes nas regiões Sudeste e Sul. No estado de São Paulo, a neoplasia maligna do esôfago ocupa o 6º lugar entre os homens com uma taxa de incidência de 11,39/100.000, enquanto entre as mulheres, ocupa o 7º lugar com uma taxa de 2,82/100.000 (INCA, 2002).

As variações geográficas observadas na incidência do carcinoma de esôfago sugerem a contribuição de fatores ambientais para o surgimento dessa neoplasia (Rubin & Farber, 1990). Assim, admite-se que o câncer de células escamosas do esôfago possui origem multifatorial, com alguns fatores ambientais sendo altamente significativos

(Cotran et al., 1999). Na região Sul do Brasil, o hábito de beber chimarrão está relacionado a maior incidência de carcinoma de células escamosas devido à grande quantidade ingerida (1265 mL/dia/pessoa) em temperatura superior à 60°C. Segundo Barros et al. (2000), o efeito carcinogênico do chimarrão pode ser tanto devido ao extrato da planta (*Ilex paraguayensis*) conter substâncias carcinogênicas ou promotoras, fato ainda não comprovado, como à injúria térmica na mucosa, assim potencializando a ação de outros carcinógenos, especialmente quando associado ao álcool e ao tabaco.

Alguns estudos epidemiológicos têm mostrado o envolvimento do uso do álcool e do fumo na carcinogênese esofágica (Cotran et al., 1999; Matsuo et al., 2001). Recentemente, Matsuo et al. (2001) revelaram uma associação entre um polimorfismo da aldeído desidrogenase-2 (ALDH2) e o consumo de álcool com risco aumentado de desenvolvimento do câncer de esôfago. Algumas bebidas alcoólicas contêm quantidades significativas de carcinógenos, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, óleo queimado e nitrosaminas. As deficiências nutricionais associadas ao alcoolismo podem também contribuir no processo carcinogênico (Cotran et al., 1999). Os compostos nitrosos metilantes presentes na dieta e no cigarro podem ser a razão para o amplo espectro de mutações em genes supressores de tumor, como o *TP53*, cujas mutações de ponto estão presentes em metade dos carcinomas de células escamosas do esôfago (Cotran et al., 1999).

Em outras áreas do mundo, particularmente no Irã e norte da China, onde o álcool e o tabaco não são consumidos em excesso, inúmeros fatores ambientais e deficiências dietéticas parecem desempenhar papéis importantes, como a contaminação microbiana dos alimentos e da água, dietas ricas em milho, painço e trigo e pobre em vegetais, frutas e proteínas animais, assim como o consumo de vegetais em conserva. Por exemplo, o consumo de alimentos contaminados por certos fungos, como o *Aspergillus*, a deficiência nutricional crônica das

vitaminas A, C e alguns membros do complexo B ou de oligoelementos como o zinco e o molibdênio também representam fatores de risco para o carcinoma de esôfago (Cotran *et al.*, 1999).

A infecção pelo papiloma vírus humano (HPV), principalmente dos tipos 16 e 18, desempenha um papel significativo na carcinogênese esofágica nas áreas de alto risco para essa neoplasia (He *et al.*, 1997; Poljak *et al.*, 1998). A oncoproteína E6 do HPV 16/18 pode se ligar à proteína p53 e causar a inativação da sua função normal (Argawal *et al.*, 1998). No Japão, a infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) está associada com o CCE de esôfago (De-Vita *et al.*, 1997; Gaur *et al.*, 1997; World Cancer Research Fund., 1997; Cotran *et al.*, 1999). Portanto, os fatores ambientais e dietéticos parecem atuar conjuntamente, conferindo um risco aumentado para o câncer de esôfago. Nesse modelo as deficiências nutricionais atuam como promotoras ou potencializadoras dos efeitos tumorigênicos dos carcinógenos ambientais (Cotran *et al.*, 1999).

Além dos fatores ambientais e patológicos já descritos, vários fatores genéticos estão associados à carcinogênese esofágica, tais como aneuploidias, deleções alélicas, ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor.

I.3. Alterações citogenéticas em câncer de esôfago

A análise cariotípica é uma abordagem útil para a identificação de aberrações cromossômicas, contudo não é uma técnica prática devido às dificuldades no preparo de metáfases distendidas e de boa qualidade em tumores sólidos (Tada *et al.*, 2000). Todavia, a citogenética clássica foi importante para a indicação de alguns cromossomos e regiões cromossômicas envolvidas com a carcinogênese esofágica.



O estudo em culturas primárias de tumores de carcinoma de células escamosas do esôfago (CCE) com a técnica de bandeamento GTG revelou algumas alterações, como a perda do cromossomo Y, i(13q) e anormalidades estruturais nos cromossomos 1, 4, 7 e 11 (Rosenblum-Vos et al., 1993). Menke-Pluymers et al. (1996) utilizando o bandeamento Q e a citometria de fluxo para avaliar adenocarcinomas do esôfago distal e da cárdia, evidenciaram aneuploidias em 60% e perda dos cromossomos 4, 18, 21 e Y e ganhos dos cromossomos 14 e 20, sendo que os braços cromossômicos 1p, 3p, 11p e 22p estavam mais freqüentemente rearranjados.

A citogenética molecular, através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), tem auxiliado no entendimento das modificações genéticas que ocorrem em células tumorais, assumindo grande importância nas pesquisas em câncer.

A técnica de FISH, portanto, tem tido ampla aplicação, pois permite a localização cromossômica de seqüências de DNA em núcleos interfásicos (citogenética interfásica) e preparações metafásicas, tanto de células cultivadas como de preparações frescas ou de material de arquivo embocado em parafina. Dessa forma, tornou-se uma técnica rápida e sensível para detecção de heterogeneidade intratumoral quando comparada a citogenética clássica ou bandeamento de alta resolução (Virmani et al., 1998).

A análise por FISH em núcleos interfásicos de adenocarcinoma esofágico revelou algumas anormalidades cromossômicas, como monossomias dos cromossomos 3, 8, 10, 16, 18 e Y, e trissomias dos cromossomos 1, 2, 3, 6, 7, 8, 11, 12, 17 e 18, sendo que os cromossomos 7, 8, 10, 11, 17 e Y estavam mais freqüentemente envolvidos com alterações não-disjuncionais (Rao et al., 1993; Persons et al., 1998).

Em linhagens celulares de tumores primários de CCE do esôfago, MacLeod et al. (1999) encontraram, com a técnica de FISH, alguns pontos de quebras recorrentes em 1p34-36, 1q11-12, 1q32, 3q13-21, 5p13-15,

7p21-22, 7q33-35, 8p12-23, 9q32-35, 11p13-15, 14p11-13, 19p13, 19q13, 21p11-13 e Xq25-27. Dessa forma, os autores concluíram que as linhagens celulares contínuas bem caracterizadas e identificadas representam uma fonte alternativa de dados citogenéticos, particularmente entre os tipos de tumor menos comuns ou tratáveis, como o CCE de esôfago.

Du Plessis et al. (1999) em CCE destacaram principalmente o ganho de algumas regiões relacionadas com oncogenes como 11q13 (*INT-2*, *HST-1*, *CCND1/PRAD1*), 7p11-15 (*EGF-R*), 7q21.1 (*HGF*) e 7q31 (*HGF-R*) e perda de outras regiões contendo genes supressores de tumor como 9p (*MTS1/CDKN2*), 11p (*WT1*, *KA11*), 13q (*RB1*) e 17p (*TP53*).

A técnica de Hibridização Genômica Comparativa (CGH) consiste em outra metodologia molecular para o estudo de tecidos tumorais. Ela é capaz de demonstrar perdas ou ganhos de segmentos cromossômicos relativamente grandes ou muito pequenos, podendo conter oncogenes celulares amplificados (Kamitani et al., 2002).

A técnica de CGH tem sido utilizada em associação com a técnica de FISH no estudo de diferentes tipos de tecidos tumorais.

Em linhagens celulares estabelecidas de tumores primários de carcinomas de células escamosas, Xiao et al. (1998) utilizando as técnicas de FISH e de CGH observaram ganho dos cromossomos 1, 2, 3, 8, 16, 17 e 20 e perda do cromossomo Y. Também verificaram deleções de 1p e 17q, translocação de 2q e amplificação de 5p, 8q e 13q. Tada et al. (2000a) encontraram algumas aberrações citogenéticas em linhagens celulares envolvendo as regiões 3q26-qter, 5p, 7p15-qter, 8q21.3-q22, 8q23-qter, 11p11-p12, 11q13, 13q21.1-q32, 17p, 20q13, Xq22.1-q25 e Xq25-qter.

Nos tumores de CCE de esôfago avaliados pela técnica de CGH Du Plessis et al. (1999) e Tada et al. (2000a) observaram ganhos de 3q em 72% dos casos, assim como em 1q, 2q, 4q, 5p, 7q, 8q, 9q, 11q, 12pq, 13q, 14q, 19q e X, níveis altos de amplificação em 2q12, 2q24-33, 6p21-

q14, 7p12-q21, 7q12.2-31, 8q22-24, 8q13-qter, 11q13, 13q21-34, 13q32-34 e 20q11.2. Também observaram perdas freqüentes no cromossomo 19 e em outras regiões, como 1p, 2q35-37, 3p, 4pq, 5q14.3-21.3, 5q32-34, 8p, 9pq, 10q, 11pq, 13q, 16p, 17p, 18q, 21q e 22q. Todas estas regiões identificadas podem abrigar genes responsáveis pela predisposição individual ao câncer de esôfago. Dentre essas regiões Tada et al. (2000b) observaram que os ganhos de 3q e 11q13, e perdas de 3p, 4q, 5q14-23, 9p e 18q pareciam não estar relacionados com metástases, enquanto os ganhos de 5p14-pter, 8q23-qter e perdas de 11q22-qter foram observadas em tumores com metástases para linfonodos.

A técnica de CGH também tem sido muito utilizada no estudo de adenocarcinomas esofágicos. No estudo de Moskaluk et al. (1998), o cromossomo 8 mostrou a incidência mais alta de ganho de DNA, principalmente na região 8q24 (*c-MYC*). Outras regiões como 17q21 (*c-ERBB2*) e 7p11-15 (*EGF-R*) também mostraram amplificação de DNA, enquanto as perdas foram observadas nas regiões 4p13 a 4q21 e 5q13-15. Desse modo, os autores sugeriram que os oncogenes localizados nas regiões 8q24 e 17q21 podem estar relacionados com o desenvolvimento dessas neoplasias.

Parece evidente que o acúmulo de alterações genéticas em vários cromossomos pode desempenhar papel importante na carcinogênese esofágica e, assim servirem de base para o desenvolvimento de marcadores prognósticos na detecção precoce do câncer.

I.4. Mecanismos moleculares de transformação maligna do esôfago

A iniciação e a progressão dos tumores é o resultado de uma série de eventos que ocorrem ao longo de vários anos, a partir da interação entre os fatores ambientais e genéticos. Estudos moleculares do câncer esofágico revelaram alterações gênicas e anormalidades cromossômicas

incluindo a amplificação dos oncogenes celulares *c-MYC* (8q24) e *MDM2* (12q13-14), a expressão aumentada de receptores de fatores de crescimento como o gene *EGF-R* (7p11-15), *c-ERBB2/HER-2/neu* (17q21), *HST-1* e *INT-2* (11q13) (Stemmermann et al., 1994; Shimada & Imamura, 1996; Suzuki et al., 1997; Du Plessis et al., 1999; Lu, 2000), a amplificação do gene *Ciclina D1/PRAD1* (11q13), mutações e deleções dos genes *RB* (13q14), *TP53* (17p13), *APC/MCC* (5q21), *DCC* (18q23) e *MTS-1/CDKN2/P16* (9p22) (Stemmermann et al., 1994; Montesano et al., 1996; Montesano et al., 1997; Du Plessis et al., 1999; Lu, 2000).

A perda de heterozigiosidade (LOH) em células cancerosas humanas tem-se mostrado como um indicador efetivo de perdas genéticas tumores-específicas definindo regiões que contém genes relevantes para a patogênese do tumor (Montesano et al., 1996).

Em carcinomas de células escamosas do esôfago têm sido observada uma frequência alta de perda de heterozigiosidade nos cromossomos 3pq, 5pq, 8p, 9pq, 11p, 13q, 17pq, 18q e 19q, sendo as perdas de 3p, 5q e 13q relacionadas ao prognóstico ruim, sugerindo que o acúmulo de alterações genéticas contribui para a carcinogênese e/ou progressão desse tipo de neoplasia (Aoki et al., 1994; Shibagaki et al., 1994; Ogasawara et al., 1995; Ogasawara et al., 1996; Hu et al., 1999; Li et al., 2001). Dentre os cromossomos envolvidos a região 3p25 foi detectada mais freqüentemente em carcinomas com metástases em linfonodos (Ogasawara et al., 1995), enquanto a deleção na região 5q31.1 indicou a ocorrência de um gene supressor de tumor que inclui o loco IRF-1 (Ogasawara et al., 1996).

Outra perda alélica freqüente em carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas esofágicos envolve a região cromossômica 9p21-22, na qual estão localizados os genes *MTS-1* e *MTS-2* (Tarmin et al., 1994; Muzeau et al., 1997). O gene *MTS-1* codifica a proteína p16, enquanto o gene *MTS-2* é responsável pela proteína p15, que são inibidoras da quinase dependente de ciclina 4 (CDK4) (Liu et al.,

1995). Portanto, as deleções e mutações dos genes *CDKN2* (*MST-1*, *INK4A*, *p16*) e *CDKN2B* (*MTS2*, *INK4B*, *p15*) podem desempenhar um papel importante na patogênese molecular do carcinoma esofágico (Igaki et al., 1995; Liu et al., 1995; Zhou et al., 1995; Muzeau et al., 1997; Takeuchi et al., 1997).

As perdas alélicas também ocorrem com alta prevalência (57%-96%) nos cromossomos 13q e 17q, e com menor frequência em 18q, regiões onde estão localizados, respectivamente, os genes *RB*, *BRCA1* e *DCC* (Shibagaki et al., 1994; Mori et al., 1994; Harada et al., 1999; Hausen et al., 1999; Li et al., 2001). Recentemente, foi observada a LOH envolvendo o cromossomo 11 em 87% dos casos de CCE avaliados por Lam et al. (2002). Os autores verificaram frequências elevadas de perdas alélicas nas regiões 11p15.5 e 11q22.3, portanto, indicando a presença de genes candidatos a supressores de tumor relacionados a esse tipo de neoplasia. Assim, a LOH de múltiplos locos cromossômicos desempenham um papel importante no comportamento invasivo dos tumores (Ikeguchi et al., 1999).

A perda alélica em 17p ocorre frequentemente em câncer esofágico, assim como em muitos outros tumores humanos, e geralmente circunda o loco do gene *TP53*, na região 17p13 (Montesano et al., 1996).

O gene *TP53* possui 20Kb e 11 exons (Lamb & Crawford, 1986), e codifica uma fosfoproteína com 393 aminoácidos denominada p53, que possui propriedades de ligação à seqüências específicas do DNA. Essa proteína é sintetizada continuamente em células normais, mas sem se acumular em níveis significantes devido à sua vida média muito curta. Ela é um fator transcricional que regula a atividade de outros genes, como por exemplo, o gene *WAF1/CIP1* que codifica a proteína p21 (Seta et al., 1998), assim atuando como “guardiã do genoma” impedindo a replicação do DNA após acúmulos de danos ou bloqueio das células na fase G1 permitindo um tempo maior para o reparo do DNA, ou ainda a apoptose das células danificadas (Bektas et al., 2001).



As mutações no gene *TP53* são as anormalidades mais comuns em neoplasias humanas. Assim, a perda da sua função pode intensificar a instabilidade genômica das células cancerosas favorecendo um acúmulo rápido de múltiplas alterações genéticas que caracterizam o desenvolvimento dos fenótipos completamente malignos (Bektas et al., 2001).

Diversos estudos em carcinomas de células escamosas têm revelado a ocorrência de perda de heterozigossidade em pelo menos um loco de 17p, assim como mutações do gene *TP53* compreendendo transições G:A para A:T, principalmente nos exons 5-8 (Wagata et al., 1993; Coggi et al., 1997; Seta et al., 1998; Mizobuchi et al., 2000). Este tipo de mutação ocorre como um evento precoce na carcinogênese esofágica, mesmo em tumores sem deleção alélica de 17p (Montesano et al., 1997).

As mutações no gene *TP53*, em pacientes com CCE, parecem ser decorrentes da ação de compostos mutagênicos presentes no álcool e no tabaco (Mizobuchi et al., 2000; Putz et al., 2002), como também devido ao consumo elevado de mate quente (chimarrão), na região sul do Brasil, responsável pela irritação hipertérmica crônica e inflamação no esôfago com uma formação endógena de radicais ou fatores carcinogênicos que, nesses casos, levam à maior prevalência de transições (Putz et al., 2002).

Hu et al. (2001) também observaram que a maioria das mutações de ponto do gene *TP53* em pacientes com CCE compreendiam as transições G:C para A:T ou C:G para T:A. Dessa forma, sugeriram que as diferentes alterações no gene, em populações de alto risco para esse tipo de carcinoma, indicam um grau elevado de instabilidade genética desempenhando, portanto, um papel crítico no processo carcinogênico do CCE do esôfago.

Em lesões não cancerosas adjacentes ao tumor, como hiperplasia de células basais e displasia, Shi et al. (1999) verificaram que tais lesões compartilhavam das mesmas mutações observadas nos CCE

correspondentes, confirmando a participação das mutações em *TP53* nos estádios iniciais da carcinogênese do esôfago.

A maioria das mutações de ponto no gene *TP53* geralmente resultam na produção da forma mutante da proteína p53, que possui vida média prolongada acumulando-se no núcleo. Assim, a sua expressão aumentada pode ser detectada por técnicas imunoistoquímicas. Vários estudos têm confirmado a expressão aumentada dessa proteína em 33% a 79% dos casos de carcinoma de esôfago (Coggi et al., 1997; Tian et al., 1998; Ikeda et al., 1999; Ikeguchi et al., 2000; Kato et al., 2000; Chino et al., 2001).

A super expressão da proteína p53 é, portanto, um evento molecular comum em carcinoma esofágico ocorrendo desde os estágios precoces da tumorigênese esofágica (Lu, 2000), de forma crescente a partir de hiperplasia de células basais do esôfago, displasia e carcinoma de células escamosas (Wang et al., 1994; Tian et al., 1998; Shi et al., 1999). Tal correlação entre displasia e o número de células positivas para a proteína p53 sugere que esse parâmetro pode ser um biomarcador útil para estimar o risco para o desenvolvimento do tumor (Wang et al., 1994).

As alterações na expressão da proteína p53 também têm sido descritas em pacientes portadores de acalásia associada ou não com carcinoma de esôfago.

Em amostras de CCE de pacientes com megaesôfago chagásico e em pacientes com megaesôfago não-chagásico sem desenvolvimento do tumor, Safatle-Ribeiro et al. (2000) encontraram imunorreatividade difusa forte da proteína p53. Os autores sugeriram que o grau de alterações do gene *TP53* em disfunção proliferativa no epitélio de megaesôfago chagásico pode ser um biomarcador útil para identificar indivíduos com um risco aumentado para o desenvolvimento de carcinoma do esôfago. No mesmo ano, Chino et al. (2000) observaram uma expressão aumentada da proteína p53 tanto em carcinoma associado à acalasia quanto em displasia, sugerindo que as alterações displásicas ocorrendo

em pacientes com acalásia no seu estágio avançado, podem estar relacionadas com maior risco de desenvolvimento tumoral.

A frequência de imunorreatividade da proteína p53 aumenta significativamente quando se compara pacientes com mucosa esofágica normal e com acalásia (Lehman et al., 2001). Bektas et al. (2001) também observaram uma frequência maior de positividade da p53 em pacientes com acalásia (65%) em relação ao grupo normal, além da observação de aneuploidia do DNA por citometria de fluxo em dois dos pacientes com acalásia.

Alterações de genes responsáveis por proteínas envolvidas no controle positivo da proliferação celular, envolvem a amplificação de genes como *EGF-R*, *INT-2*, *HST-1*, *c-MYC* e *Ciclina D1* (Montesano et al., 1996), como já mencionadas, sendo que a amplificação de *Ciclina D1* representa o fator mais comum ocorrendo na carcinogênese esofágica (Shamma et al., 1998).

O gene *Ciclina D1* está localizado no loco dos genes *INT-2* e *HST-1*, apresentando 4,5Kb de tamanho e 5 exons (Bosch et al., 1994), presente na região cromossômica 11q13. Tal gene codifica uma proteína regulatória de 295 aminoácidos, a ciclina D1, a qual é expressa em níveis elevados durante a fase G1 do ciclo celular. Essa proteína se liga as quinases dependentes de ciclina (CDK4 e CDK6) formando um complexo ativo ciclina D1/CDK, o qual promove a fosforilação da proteína pRb liberando o fator de transcrição E2F ligado a pRb. Os genes transativados da família do E2F são essenciais para a entrada do ciclo celular na fase S e replicação do DNA (efetores da fase S). No entanto, a atividade da ciclina D1/CDK é regulada negativamente pela ligação de vários inibidores de quinases dependentes de ciclina (CKI), incluindo p16/*MTS-1* e p21^{Waf1}. A proteína p16 é ativada em resposta a um estímulo do controle do crescimento celular ainda não muito bem compreendido. Já a p21 é ativada de uma maneira dependente da p53 em resposta a um estresse genotóxico (Figura 1) (Montesano et al., 1996).



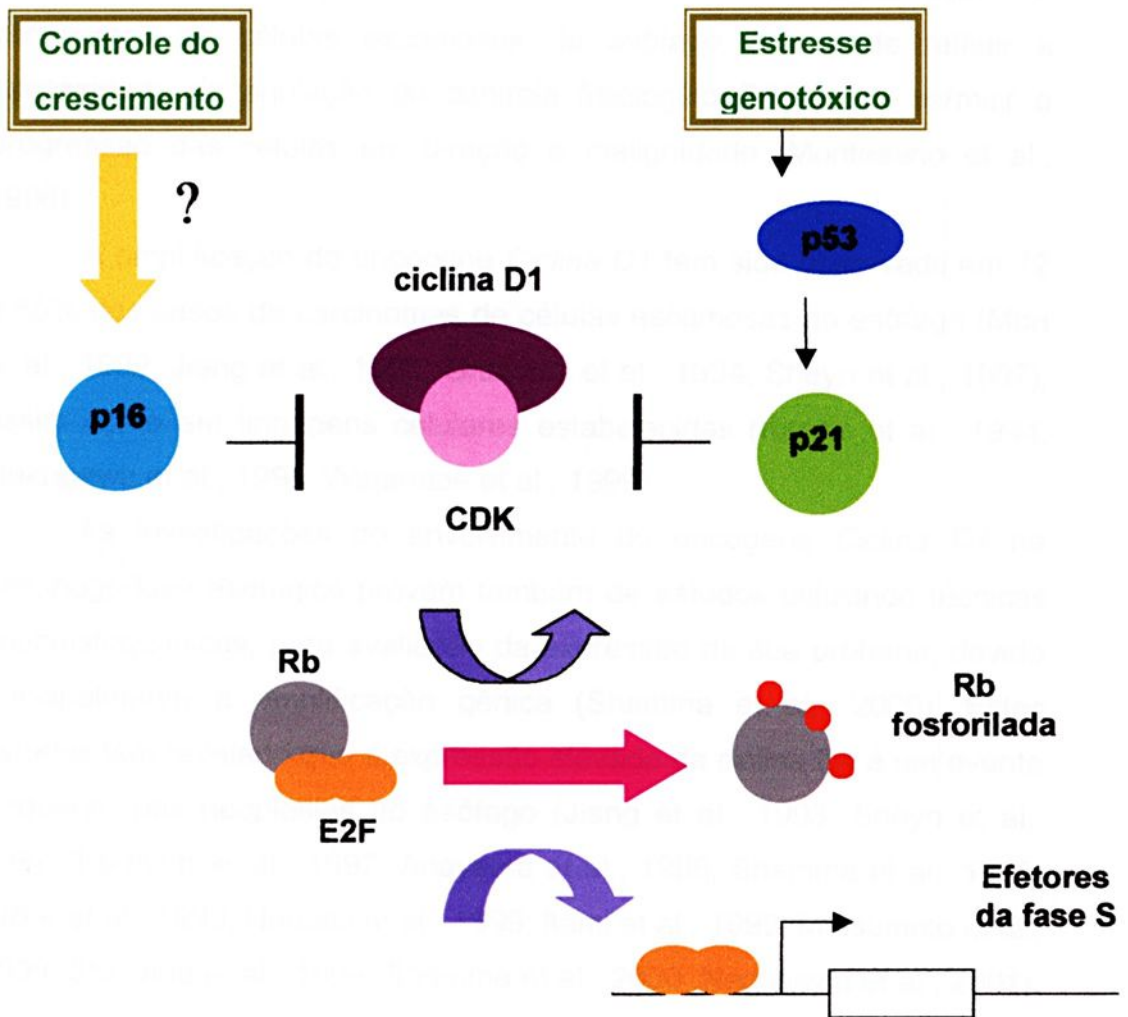


Figura 1. Esquema da interação entre ciclina D1, quinases dependentes de ciclina (CDK), inibidores das ciclina-quinases (p16 e p21) e os genes de supressão tumoral *Rb* e *TP53*, na regulação da progressão do ciclo celular da fase G1 para S (modificado de Montesano *et al.*, 1996).

As alterações genéticas que ocorrem nas vias controladoras da transição G1/S no ciclo celular, como por exemplo, aquelas envolvendo as proteínas ciclina D1, p53 e pRb, são freqüentemente observadas em carcinomas de células escamosas do esôfago. Isto pode refletir a necessidade de anulação do controle fisiológico G1/S para permitir a progressão das células em direção à malignidade (Montesano et al., 1996).

A amplificação do oncogene *Ciclina D1* tem sido observada em 22 a 65% dos casos de carcinomas de células escamosas do esôfago (Mori et al., 1992; Jiang et al., 1993; Gramlich et al., 1994; Sheyn et al., 1997), assim como em linhagens celulares estabelecidas (Kanda et al., 1994; Nakagawa et al., 1995; Watanabe et al., 1999).

As investigações do envolvimento do oncogene *Ciclina D1* na carcinogênese esofágica provém também de estudos utilizando técnicas imunoistoquímicas, para avaliação da expressão de sua proteína, devido principalmente a amplificação gênica (Shamma et al., 2000). Estes estudos têm revelado que a expressão elevada da ciclina D1 é um evento freqüente nas neoplasias do esôfago (Jiang et al., 1993; Sheyn et al., 1997; Takeuchi et al., 1997; Anayama et al., 1998; Shamma et al., 1998; Arber et al., 1999; Hausen et al., 1999; Itami et al., 1999; Matsumoto et al., 1999; Shimada et al., 1999; Shamma et al., 2000; Nagasawa et al., 2001). Há sugestões de que os casos de carcinomas de células escamosas com amplificação de *Ciclina D1* ou expressão aumentada de sua proteína apresentam incidência maior de metástases e sobrevida reduzida (Gramlich et al., 1994; Shinozaki et al., 1996; Toyoda et al., 2000).

Além dos carcinomas também há relatos do aumento da expressão da ciclina D1 em displasias moderadas e severas (Shamma et al., 2000). Contudo, ainda não se tem informações da ocorrência de amplificação e/ou super expressão do gene *Ciclina D1* em pacientes com acalásia avançada ou megaesôfago chagásico, já que podem ocorrer alterações displásicas nesse tipo de afecção, como descrito anteriormente.



II. OBJETIVOS

Com o intuito de detectar possíveis marcadores cromossômicos em megaesôfago chagásico que possam estar relacionados com um risco aumentado para o desenvolvimento de carcinoma do esôfago e, assim, poder auxiliar no seu diagnóstico precoce, o presente trabalho teve como objetivos:

- a) investigar pela técnica de FISH a ocorrência de anormalidades numéricas envolvendo os cromossomos 7, 11 e 17, a deleção do gene *TP53* e a amplificação do oncogene *Ciclina D1* em núcleos interfásicos de megaesôfago chagásico;
- b) avaliar esses mesmos parâmetros em carcinoma de células escamosas do esôfago; e
- c) comparar os resultados de ambas as amostras com aqueles obtidos na mucosa esofágica histologicamente normal.

III. MATERIAL E MÉTODOS

De acordo com as Normas Regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, o projeto referente ao presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP (FAMERP) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-DF (Processo nº 25000.025196/2000-84; Parecer nº 1188/2000). De todos os indivíduos foram obtidos os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido pela pesquisadora e médicos responsáveis de cada setor.

III.1. Caracterização das amostras

Foram obtidas sessenta amostras de tecidos frescos após exame endoscópico ou ressecção cirúrgica, sendo quarenta provenientes de megaesôfago chagásico (M), dez de carcinomas de células escamosas do esôfago (CCE) e dez amostras de mucosa esofágica histologicamente normal (controle). As amostras foram coletadas no Serviço de Endoscopia pelo médico Alaor Caetano e no Centro Cirúrgico pelo Prof. Dr. Aldenis Albanese Borim, ambos do Hospital de Base de São José do Rio Preto-SP. Todas as amostras foram obtidas anteriormente ao tratamento rádio e quimioterápico.

O diagnóstico histopatológico foi realizado pelo Serviço de Patologia também do Hospital de Base sob chefia da Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury, utilizando a técnica Hematoxilina-Eosina.

As amostras de megaesôfago chagásico foram obtidas das regiões média (M-TM) e distal (M-TD) do esôfago de 20 pacientes após coloração com solução de lugol 2% com a finalidade de corar áreas de epitélios normais facilitando a coleta do tecido anormal. As duas amostras de cada paciente foram obtidas com o objetivo de comparar as regiões dos terços

médio e distal do esôfago, já que existem indicações da ocorrência de 50% dos carcinomas no terço médio e 30% no terço distal (Cotran et al., 1999). A caracterização dessas amostras está descrita na Tabela 1. Os megaesôfagos foram graduados (graus I a IV) conforme a retenção de contraste, o diâmetro, a atividade contrátil, a tonicidade do segmento inferior e o alongamento do órgão (Rezende et al., 1960 apud Pinotti et al., 1996). Dos 20 pacientes com megaesôfago chagásico, 10 são do sexo masculino e 10 do sexo feminino, com idades entre 37 e 80 anos ($\bar{x}=60,8$ e $s=13,3$). Seis amostras foram provenientes de megaesôfago de grau I, seis de grau II, quatro de grau III e quatro de grau IV. A maioria desses indivíduos (78%) são fumantes ou ex-fumantes e 39% são etilistas ou deixaram esse vício a algum tempo. Pela análise histopatológica, todos os pacientes apresentavam esofagite crônica nas duas regiões do megaesôfago. Quanto à procedência dos pacientes, 45% são do Estado de São Paulo, mas também foram obtidas amostras de indivíduos provenientes, principalmente, de Minas Gerais (35%), da Bahia (15%) e do Mato Grosso do Sul (5%).

Foram obtidas dez amostras de carcinomas de células escamosas do esôfago (CCE), sendo sete delas coletadas por meio de cirurgia e três biópsias por endoscopia (Tabela 2). Desses pacientes, 8 são do sexo masculino e 2 do sexo feminino, com idades entre 48 e 79 anos ($\bar{x}=62,7$ e $s=8,9$). Todos, exceto um em que não foi obtida a informação, são fumantes e 60% são etilistas ou ex-etilistas. Quanto à procedência, todos os pacientes são do Estado de São Paulo.

As dez amostras restantes (Tabela 3) são referentes às biópsias, também coletadas dos terços médio (C-TM) e distal (C-TD) da mucosa histologicamente normal do esôfago (controle), de seis indivíduos submetidos à endoscopia com queixa gástrica. Em todas as amostras o diagnóstico foi confirmado pelo Serviço de Patologia do Hospital de Base. O grupo controle foi constituído por indivíduos mais jovens, com idades



Tabela 1. Caracterização dos indivíduos com diagnóstico de megaesôfago chagásico (M).

Caso	Grau	Sexo	Idade (anos)	Fumante	Etilista	Ocupação Profissional	Outras informações	Procedência
M-1	I	M	79	Ex	S	Lavrador/Aposentado	Constipação intestinal/Estenose de esôfago/Óbito	Tabapuã-SP
M-2	I	F	69	S	N	Lavadora	Gastrite enantematosa/Carcinoma de pele	Ipiguá-SP
M-3	I	M	65	S	N	Lavrador	*	São João da Mata-MG
M-4	I	F	39	N	*	Do lar	Refluxo gastroesfágico	Cacule-BA
M-5	I	F	66	N	N	Do lar	Gastrite/Óbito	Ubarana-SP
M-6	I	F	50	S	N	Do lar	Constipação intestinal	Alexandrita-MG
M-7	II	M	80	S	Ex	Lavrador/Aposentado		Ibitira-BA
M-8	II	F	38	S	N	Empregada doméstica		Carneirinho-MG
M-9	II	M	76	Ex	Ex	Lavrador/Aposentado	Gastrite crônica/Metaplasia intestinal	Guapiaçu-SP
M-10	II	M	54	Ex	Ex	Pedreiro		Conceição das Alagoas-MG
M-11	II	M	52	N	Ex	Lavrador	Megacólon	Macedônia-MG
M-12	II	F	71	N	N	Do lar	Gastrite crônica	Nova Aliança-SP
M-13	III	F	58	N	N	Do lar	Constipação intestinal/Refluxo gastroesofágico	Guairá-SP
M-14	III	M	57	Ex	Ex	Autônomo	Gastrite crônica	Ituverava-MG
M-15	III	M	37	S	N	Garçom	Megacólon	Minas Gerais-MG
M-16	III	M	58	S	Ex	Agricultor	Gastrite crônica/Metaplasia intestinal	Palestina-SP
M-17	IV	F	69	S	N	Lavadora/Aposentada		João Ramalho-SP
M-18	IV	M	66	Ex	N	Lavrador	Gastrite crônica	Bahia-BA
M-19	IV	F	77	N	N	Do lar	Megacólon/Óbito	Cosmorama-SP
M-20	IV	F	55	Ex	N	Do lar	Gastrite crônica	Três Lagoas-MS

F= feminino; M= masculino; *= dado não disponível; S= sim; N= não

Tabela 2. Caracterização dos indivíduos com diagnóstico de carcinoma de células escamosas do esôfago (CCE).

Caso	Sexo	Idade (anos)	Fumante	Etilista	Ocupação profissional	Diferenciação	Região do esôfago	Outras informações	Procedência
CCE-1	M	64	Ex	Ex	Servente de pedreiro	MDI	TD	Óbito	Guapiaçu-SP
CCE-2	M	63	*	*	*	*	*	*	*
CCE-3	M	55	S	S	Ajudante geral	MDI	TD		Nhandeara-SP
CCE-4	M	65	Ex	Ex	Aposentado	MDI	TD		Ibirá-SP
CCE-5	M	48	S	N	Pedreiro	MDI	TM	Metástase/Óbito	José Bonifácio-SP
CCE-6	M	58	S	Ex	Lavrador	MDI	TM	Chagas+/Óbito	Barretos-SP
CCE-7	M	58	S	S	Operador de máquinas	MD	TM	Metástase/Recidiva	Santa Adélia-SP
CCE-8	F	74	S	Ex	Lavadeira/Aposentada	MDI	TM	Chagas+/Recidiva	Nipoã-SP
CCE-9	M	63	S	N	Pedreiro	PD	TM		Palestina-SP
CCE-10	F	79	S	N	Do lar	*	TD	Óbito	Piracicaba-SP

F= feminino; M= masculino; *= dado não disponível; S= sim; N= não; MDI= moderadamente diferenciado e invasivo; MD= moderadamente diferenciado; PD= pobremente diferenciado; TM= terço médio; TD= terço distal

Tabela 3. Caracterização dos controles com mucosa esofágica histologicamente normal (C).

Caso	Sexo	Idade (anos)	Ocupação profissional	Procedência
C-1	M	23	Leiteiro	SJRPreto-SP
C-2	F	15	Vendedora	Votuporanga-SP
C-3	M	18	Estudante	Ibiporã-PR
C-4*	M	38	Ajudante geral	Votuporanga-SP
C-5**	F	39	Comerciante	SJRPreto-SP
C-6	F	27	Enfermeira	SJRPreto-SP

F = feminino; M = masculino; *amostra apenas do terço médio; **amostra apenas do terço distal

entre 15 e 39 anos ($\bar{x}=26,7$ e $s=10,0$), sendo três do sexo masculino e três do sexo feminino. Todos são não-fumantes e não-etilistas. Esses pacientes foram provenientes principalmente do Estado de São Paulo. Nos casos C-4 e C-5, devido ao insucesso na etapa de desagregação dos núcleos, foram analisadas apenas as lâminas contendo material proveniente do terço médio e do terço distal, respectivamente.

III.2. Estudo Citogenético Molecular

III.2.1. Método para obtenção de núcleos interfásicos a partir de tecido fresco

Após a coleta das biópsias por endoscopia ou dos fragmentos cirúrgicos, o material foi acondicionado em tubos estéreis previamente identificados, contendo solução salina de Hanks acrescida de penicilina (100 U/ml) e quemicitina (500 mg/ml), sendo mantidos sob refrigeração a 4°C até o momento do processamento.

O tecido foi submetido inicialmente à desagregação mecânica em placa de Petri descartável, com o auxílio de uma tesoura em uma câmara de fluxo laminar. Ao material desagregado foi adicionado 1 mL da enzima colagenase XI (2000 U/mL-Sigma) e incubado em estufa a 37°C por 50 minutos. Após a inativação da enzima com solução de Hanks, procedeu-se a hipotonização com solução de KCl 0,075M a 37°C em banho-maria por 30 minutos. A solução hipotônica foi descartada e o material fixado em metanol:ácido acético (3:1) em três banhos consecutivos com centrifugação a 1.100 rpm por 6 minutos, sendo o último de 16 horas (*overnight*). No dia seguinte, o fixador foi removido e o material lavado em ácido acético 60% em três banhos consecutivos com centrifugação a 1.100 rpm por 6 minutos.



Em seguida, a suspensão celular foi gotejada em lâminas secas e aquecidas a 50°C, sendo mantidas à temperatura ambiente por cerca de 2 dias para envelhecimento e, depois, estocadas em freezer -70°C até o momento da hibridização.

III.2.2. Hibridização *in situ* Fluorescente – FISH

Foi empregada a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) em núcleos interfásicos, com a utilização da sonda centromérica de marcação direta CEP7 marcada com o fluorocromo Spectrum Green (Vysis), da sonda de seqüência única LSI Cyclin D1 e CEP 11 marcadas com os fluorocromos Spectrum Orange/Spectrum Green (Vysis), da sonda de seqüência única LSI p53 e CEP17 marcadas com Spectrum Orange/Spectrum Green (Vysis).

A) Pré-tratamento para as amostras de material fresco

As áreas desejadas para hibridização, contendo maior densidade de material, foram assinaladas sob as lâminas com o auxílio de um lápis diamante. As lâminas envelhecidas naturalmente foram submetidas à desidratação em etanol (70, 85 e 100%) por 2 minutos cada à temperatura ambiente, seguida de secagem ao ar. Após, as lâminas foram fixadas em formaldeído 4% por 1 minuto à temperatura ambiente, seguida de três lavagens consecutivas em 1xPBS por 5 minutos cada. Posteriormente, foram novamente desidratadas em etanol (70, 85 e 100%) por 2 minutos cada e secas ao ar.

B) Hibridização

Foram colocados em cada campo da lâmina cerca de 10 µL de solução de sonda diluída (7 µL de tampão + 2 µL de água milli-Q + 1 µL de sonda), sendo coberto com lamínula de vidro e imediatamente vedado

com selante. As lâminas foram co-denaturadas em estufa a 80°C por 8 minutos e depois incubadas em câmara úmida a 37°C por um período de 20 horas.

Em seguida, o selante foi retirado e as lamínulas removidas cuidadosamente com o auxílio de uma pinça. Após, procedeu-se a lavagem para a retirada do excesso de sonda em uma solução 0,1% NP40/2xSSC por 1 minuto à temperatura ambiente (para as sondas CEP7 e LSI CyclinD1/CEP11) e por 2 minutos a 37°C (para as sondas LSI p53/CEP17), desidratadas em etanol (70, 85 e 100%) por 1 minuto cada e secas ao ar.

C) Contra-coloração

As lâminas hibridizadas com as sondas marcadas com o fluorocromo Spectrum Green receberam 10 µL do contra-corante iodeto de propídeo. As lâminas hibridizadas com duas sondas simultaneamente (LSI Cyclin D1/CEP11 e LSI p53/CEP17) receberam 10 µL do contra-corante DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol). Logo após, foram cobertas com lamínulas de vidro para posterior análise.

III.3. Análise ao microscópio

A análise de cada caso foi realizada por dois observadores que contaram cerca de 150 núcleos em campos diferentes da lâmina, totalizando 300 núcleos para cada uma das sondas CEP7, LSI Cyclin D1/CEP11 e LSI p53/CEP17, em microscópio Olympus BMAX60, com lâmpada HBO 100W, equipado com filtros para FITC, DAPI, rodamina, duplo e triplo. A concordância entre os dois observadores foi de 95%. A análise de aneuploidias dos cromossomos 11 e 17 foi realizada simultaneamente com a análise, respectivamente, da amplificação de

Ciclina D1 e deleção do gene *TP53*. Para a documentação dos resultados foi utilizado o filme EliteChrome ASA 400 (Kodak).

III.4. Critérios para contagem dos núcleos

Os critérios de análise foram seguidos de acordo com Eastmond et al. (1995), não sendo considerados núcleos sobrepostos ou danificados, os sinais completamente separados foram contados como dois sinais e os incompletamente separados como um. Para a análise citogenética foram consideradas somente lâminas que demonstravam pelo menos 90% de eficiência de hibridização. As aneuploidias foram consideradas significantes quando o valor observado era superior à média acrescida de quatro desvios-padrões, que foram calculados para cada sonda a partir do controle da mucosa normal do esôfago.

Na análise de deleção do gene *TP53*, para cada amostra foi calculada a razão gene/centrômero (G/C), ou seja, o número total de sinais do gene observado em cada caso dividido pelo número total de sinais do centrômero. Como no grupo controle foi observada apenas a razão 1,0 (balanceada), ou seja, a mesma proporção de número de sinais do gene *TP53* e do centrômero 17, foram considerados com deleção aqueles casos apresentando uma razão igual ou inferior a 0,9.

Quanto à amplificação do gene *Ciclina D1*, para cada amostra também calculou-se a razão gene/centrômero (G/C), da mesma forma que para a deleção do gene *TP53*. Assim, as razões entre 0,9 e 1,0 (balanceada) observadas no grupo controle foram consideradas sem amplificação. Os casos com razões entre 1,1 e 2,0 foram considerados com ganho preferencial do gene, mas sem amplificação, pois podem refletir células apresentando 3 ou 4 sinais do gene que possam estar na fase G2 (Pauletti et al., 1996), e aqueles com razão superior a 2,0, ou ainda apresentando *cluster* (agrupamento de várias cópias do gene),

foram considerados com amplificação gênica, conforme consenso da literatura (Isola et al., 1999; Mark et al., 1999; Hirsch et al., 2002).

III.5. Análise Estatística

Para comparação das distribuições das porcentagens de células com diferentes números de sinais dos cromossomos 7, 11 e 17 foi aplicado o teste de qui-quadrado (χ^2) de homogeneidade, calculado a partir dos totais de células com um, dois, três ou quatro sinais. Esse teste foi aplicado para comparar as duas regiões (terço médio e terzo distal) da mucosa normal do esôfago e de megaesôfago chagásico. Foi fixado em 5% o nível crítico de rejeição (Vieira, 1985).



IV.RESULTADOS

IV.1. Aneuploidias dos cromossomos 7, 11 e 17

Os dados referentes a análise citogenética interfásica utilizando-se as sondas centroméricas dos cromossomos 7, 11 e 17 no grupo controle, constituído por cinco amostras do terço médio do esôfago (C-TM) e cinco amostras do terço distal (C-TD), estão apresentados na Tabela 4. Nessa tabela estão discriminadas as porcentagens médias de núcleos com um, dois e três sinais dos referidos cromossomos, assim como as variações observadas considerando as cinco amostras do terço médio e as cinco do terço distal. As porcentagens médias foram utilizadas para a elaboração dos histogramas. Nessas amostras, a maioria dos núcleos apresentaram dissomia para os cromossomos avaliados, com porcentagem média de cerca de 97% dos núcleos com dois sinais. As porcentagens médias de núcleos com um ou três cópias dos cromossomos 7, 11 e 17 foram baixas, não ultrapassando 3,0% para os núcleos com apenas um sinal e 1,4% com três sinais. Após teste de χ^2 de homogeneidade para a comparação das distribuições das porcentagens de núcleos com diferentes números de cópias dos cromossomos 7, 11 e 17, não foram observadas diferenças significantes entre as amostras do terço médio e do terço distal para os cromossomos 7 ($\chi^2 = 3,1$; GL = 2; $P > 0,05$), 11 ($\chi^2 = 0,2$; GL = 2; $P > 0,05$) e 17 ($\chi^2 = 0,3$; GL = 2; $P > 0,05$). Pela representação gráfica dessas distribuições (Figura 2) pode-se observar que as porcentagens de núcleos com um, dois e três sinais desses cromossomos são semelhantes em relação às regiões média e distal do esôfago.

A partir das médias e desvios padrões das porcentagens de núcleos com diferentes números de cópias dos cromossomos 7, 11 e 17 (Tabela 5), dos terços médio e distal da mucosa normal (controle), estabeleceu-se os limites de corte, calculados a partir da média acrescida de quatro desvios padrões (Tabela 6) para aneuploidias desses

Tabela 4 – Porcentagem média e variação de núcleos com 1, 2 e 3 cópias dos centrômeros dos cromossomos 7, 11 e 17 nas 10 amostras de mucosa esofágica histologicamente normal (controle), dos terços médio e distal do esôfago.

	Terço médio		Terço distal	
	% média	Variação	% média	Variação
Centrômero 7				
1	2,2	1,1-2,8	3,0	1,8-4,6
2	96,8	96,0-97,6	95,6	94,0-96,4
3	1,0	0,0-2,9	1,4	0,4-2,2
Centrômero 11				
1	2,5	1,2-5,0	2,8	0,6-4,2
2	97,4	95,0-98,8	97,1	95,8-98,8
3	0,1	0,0-0,3	0,1	0,0-0,6
Centrômero 17				
1	2,1	0,6-3,9	2,2	0,6-3,9
2	97,6	96,1-99,1	97,4	94,9-99,4
3	0,3	0,0-0,9	0,4	0,0-1,2

Figura 2

Figura 2. Representação gráfica da distribuição porcentual de núcleos com diferentes números de cópias dos cromossomos 7 (A), 11 (B) e 17 (C) dos terços médio (C-TM) e distal (C-TD) do esôfago no grupo controle.

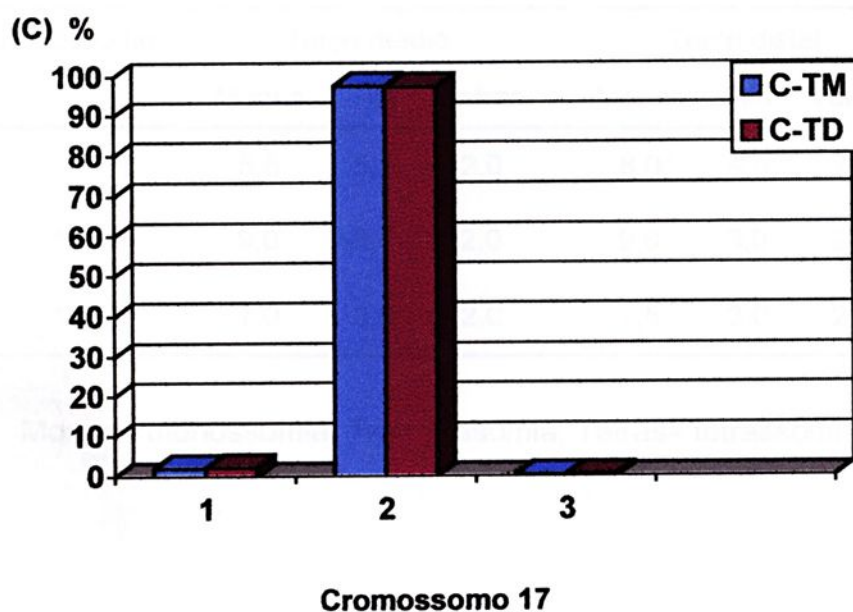
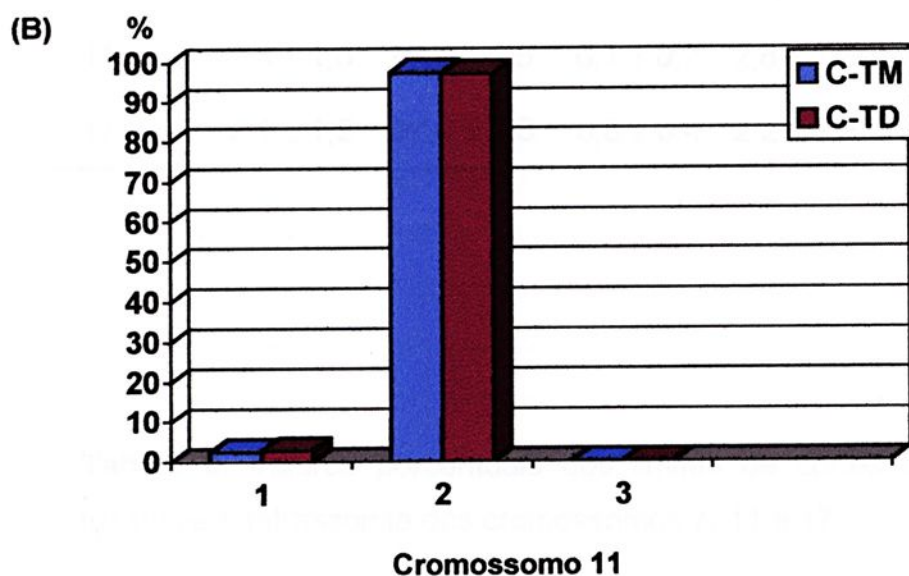
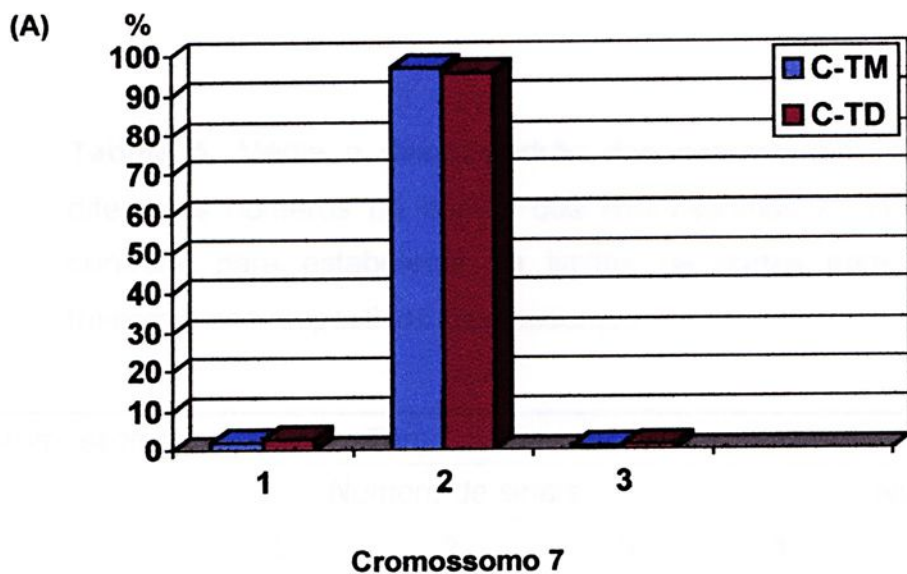


Tabela 5. Média e desvio-padrão das porcentagens de núcleos com diferentes números de cópias dos cromossomos 7, 11 e 17 do grupo controle, para estabelecer os limites de cortes para monossomia e trissomia dos respectivos cromossomos.

Cromossomo	Terço médio			Terço distal		
	Número de sinais			Número de sinais		
	1	2	3	1	2	3
7	$2,2 \pm 0,8$	$96,8 \pm 0,7$	$1,0 \pm 1,1$	$3,0 \pm 1,2$	$95,6 \pm 1,0$	$1,4 \pm 0,7$
11	$2,5 \pm 1,6$	$97,4 \pm 1,5$	$0,1 \pm 0,2$	$2,8 \pm 1,5$	$97,1 \pm 1,3$	$0,1 \pm 0,3$
17	$2,1 \pm 1,2$	$97,6 \pm 1,3$	$0,3 \pm 0,4$	$2,2 \pm 1,3$	$97,4 \pm 1,7$	$0,4 \pm 0,6$

Tabela 6. Valores percentuais dos limites de cortes de monossomia, trissomia e tetrassomia dos cromossomos 7, 11 e 17.

Cromossomo	Terço médio			Terço distal			Terços médio e distal		
	Monos	Tris	Tetras	Monos	Tris	Tetras	Monos	Tris	Tetras
7	5,5	5,5	2,0	8,0	4,5	2,0	7,0	5,0	2,0
11	9,0	3,0	2,0	9,0	3,0	2,0	9,0	3,0	2,0
17	7,0	3,0	2,0	7,5	3,0	2,0	7,5	3,0	2,0

Monos= monossomia; Tris= trissomia; Tetras= tetrassomia

cromossomos. Para a região do terço médio do esôfago foi considerada como monossomia aquelas amostras com mais de 5,5%, 9,0% e 7,0% dos núcleos com apenas um sinal dos cromossomos 7, 11 e 17, respectivamente, e para o terço distal, com mais de 8,0%, 9,0% e 7,5%. Como trissomia, para a região do terço médio, estabeleceu-se valores superiores à 5,5%, 3,0% e 3,0% e, para o terço distal, com mais de 4,5%, 3,0% e 3,0%, respectivamente. Nas amostras de mucosa normal não foram observadas tetrassomias dos cromossomos 7, 11 e 17 nos terços médio e distal, sendo estabelecido, portanto, o limite de corte de 2,0%. Esses valores foram utilizados para a comparação de aneuploidias das amostras de megaesôfago chagásico (terços médio e distal).

Como não observou-se diferenças significantes nas distribuições de núcleos com diferentes números de cópias desses cromossomos, nas regiões dos terços médio e distal da mucosa normal, utilizou-se a porcentagem média desses valores considerando-se os dois terços juntos, para comparação das aneuploidias observadas nas amostras de carcinomas de células escamosas, em que não houve distinção das regiões do esôfago. Assim, para aneuploidias dos cromossomos 7, 11 e 17 fixou-se, respectivamente, os valores de 7,0%, 9,0% e 7,5% para monossomias e de 5,0%, 3,0% e 3,0% para trissomias.

Das 39 amostras de megaesôfago chagásico avaliadas, 8/19 (42%) do terço médio e 7/20 (35%) do terço distal apresentaram alterações numéricas de um dos cromossomos analisados, cujos dados estão apresentados na Tabela 7. Nas 24 amostras restantes, as porcentagens observadas foram inferiores àquelas estabelecidas pelos limites de corte para os três cromossomos avaliados. No entanto, na referida tabela estão discriminadas as porcentagens médias e a variação de núcleos com diferentes números de cópias desses cromossomos referentes às 39 amostras analisadas, pois foram utilizadas para a elaboração dos histogramas.



Tabela 7 - Distribuição das porcentagens de núcleos com diferentes números de cópias dos centrômeros dos cromossomos 7, 11 e 17 nas amostras dos terços médio e distal do megaesôfago chagásico.

Caso	Centrômero 7					Centrômero 11					Centrômero 17				
	% núcleos com sinais					% núcleos com sinais					% núcleos com sinais				
	1	2	3	≥4	Total	1	2	3	≥4	Total	1	2	3	≥4	Total
Terço médio															
MI-TM 1	8,1	91,3	0,6	0,0	335	0,0	99,2	0,8	0,0	259	2,5	94,0	3,5	0,0	201
MII-TM 8	5,7	92,4	1,9	0,0	317	3,0	97,0	0,0	0,0	231	5,4	94,6	0,0	0,0	203
MII-TM 9	4,9	93,2	1,9	0,0	205	0,5	99,5	0,0	0,0	219	8,9	91,1	0,0	0,0	203
MIII-TM13	2,5	89,9	7,0	0,6	316	2,1	97,9	0,0	0,0	336	2,0	97,7	0,3	0,0	300
MIII-TM14	7,6	90,7	1,7	0,0	300	2,5	95,9	1,3	0,3	318	1,5	96,1	2,4	0,0	207
MIII-TM15	1,5	91,2	6,5	0,8	260	5,4	94,1	0,5	0,0	203	-	-	-	-	-
MIV-TM19	2,0	92,2	5,8	0,0	309	0,0	98,5	1,5	0,0	340	2,9	96,7	0,4	0,0	245
MIV-TM20	3,7	94,5	1,8	0,0	273	10,3	89,2	0,5	0,0	204	-	-	-	-	-
% média (20*)	3,4	94,4	2,1	0,1		2,6	96,9	0,4	0,1		2,5	96,6	0,8	0,1	
Variação	1,2-8,1	89,9-98,2	0,3-7,0	0,0-0,8		0,0-10,3	89,2-100,0	0,0-1,8	0,0-0,6		0,3-8,9	91,1-99,0	0,0-3,5	0,0-0,5	
Terço distal															
MI-TD 1	3,3	94,7	2,0	0,0	302	0,0	100,0	0,0	0,0	279	1,4	91,4	5,0	2,3	220
MI-TD 3	0,8	93,0	5,6	0,6	359	0,6	98,8	0,3	0,3	340	1,0	99,0	0,0	0,0	315
MII-TD 7	6,1	92,5	1,4	0,0	214	3,5	96,5	0,0	0,0	201	9,4	90,6	0,0	0,0	235
MII-TD 9	4,9	92,9	2,2	0,0	267	5,3	94,7	0,0	0,0	285	8,5	82,9	8,6	0,0	246
MIII-TD13	2,7	90,7	6,6	0,0	301	3,2	96,8	0,0	0,0	310	2,7	97,3	0,0	0,0	329
MIV-TD17	3,1	95,0	1,9	0,0	318	1,3	98,2	0,5	0,0	221	1,0	94,5	4,5	0,0	311
MIV-TD18	5,6	92,9	1,5	0,0	268	5,9	88,7	4,9	0,5	222	3,2	92,9	3,9	0,0	283
% média (20*)	3,2	94,8	1,9	0,1		2,1	97,4	0,4	0,1		3,4	94,6	1,9	0,1	
Variação	0,3-6,4	89,6-97,7	0,3-6,6	0,0-1,0		0,0-5,9	88,7-100,0	0,0-4,9	0,0-0,5		0,5-9,4	82,9-99,1	0,0-8,6	0,0-2,3	

M (I, II, III, IV)-TD = megaesôfago (grau)- terço distal; -- não analisado; *= amostras



Após teste de χ^2 de homogeneidade para a comparação das distribuições das porcentagens de núcleos com diferentes números dos cromossomos avaliados, não foram observadas diferenças significantes entre os terços médio e distal das amostras de megaesôfago chagásico para os cromossomos 7 ($\chi^2 = 1,0$; GL = 3; $P > 0,05$) e 11 ($\chi^2 = 2,3$; GL = 3; $P > 0,05$), enquanto que para o cromossomo 17 a diferença foi significativa ($\chi^2 = 23,1$; GL = 3; $P < 0,05$). Tais distribuições podem ser observadas na Figura 3. Quando comparou-se as distribuições das porcentagens de núcleos com diferentes números de sinais destes cromossomos entre os terços médio e entre os terços distal da mucosa esofágica normal com os do megaesôfago chagásico, não foram observadas diferenças significantes tanto entre os terços médio da mucosa esofágica normal e do megaesôfago para os cromossomos 11 ($\chi^2 = 3,3$; GL = 3; $P > 0,05$) e 17 ($\chi^2 = 5,6$; GL = 3; $P > 0,05$), como entre os terços distal para os cromossomos 7 ($\chi^2 = 3,2$; GL = 3; $P > 0,05$) e 11 ($\chi^2 = 4,8$; GL = 3; $P > 0,05$). Todavia, foram observadas diferenças significantes entre os terços médio da mucosa normal e do megaesôfago para o cromossomo 7 ($\chi^2 = 16,5$; GL = 3; $P < 0,05$), assim como entre os terços distal dessas amostras para o cromossomo 17 ($\chi^2 = 27,3$; GL = 3; $P < 0,05$). Esses resultados podem ser observados nos histogramas apresentados nas Figuras 4 e 5.

Na região do terço médio do megaesôfago o cromossomo mais freqüentemente envolvido com aneuploidias foi o 7 (31,6%), devido a ocorrência de monossomia 7 (Figura 6A) observada em três casos (MI-TM 1, MII-TM 8 e MIII-TM 14) e trissomia 7 ocorrendo em outros três casos (MIII-TM 13, MIII-TM 15 e MIV-TM 19). Aneuploidia do cromossomo 11 foi detectada em apenas um caso (5,3%) com monossomia (MIV-TM 20). Enquanto, aneuploidias do cromossomo 17 ocorreram em dois casos (10,5%), um com monossomia (MII-TM 9) e outro com trissomia (MI-TM 1).

Figura 3

Figura 3. Representação gráfica da distribuição porcentual de núcleos com diferentes números de cópias dos cromossomos 7 (A), 11 (B) e 17 (C) nas amostras de terço médio (M-TM) e terço distal (M-TD) de megaesôfago chagásico.

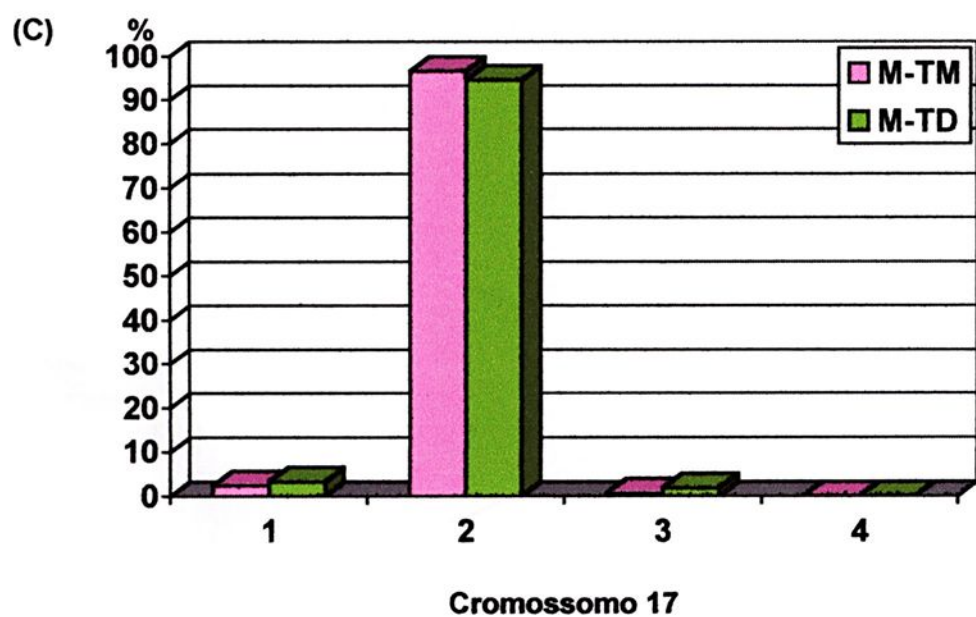
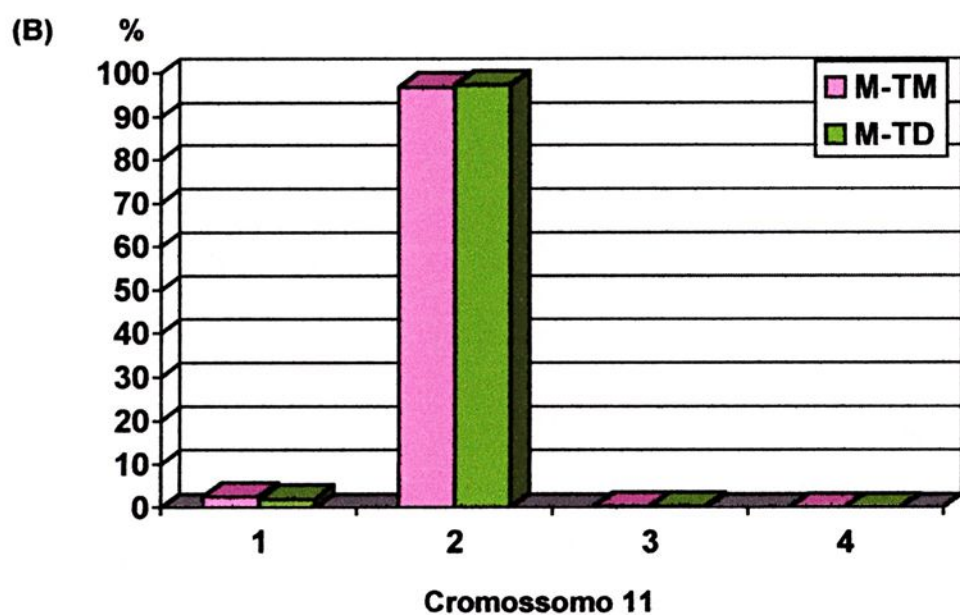
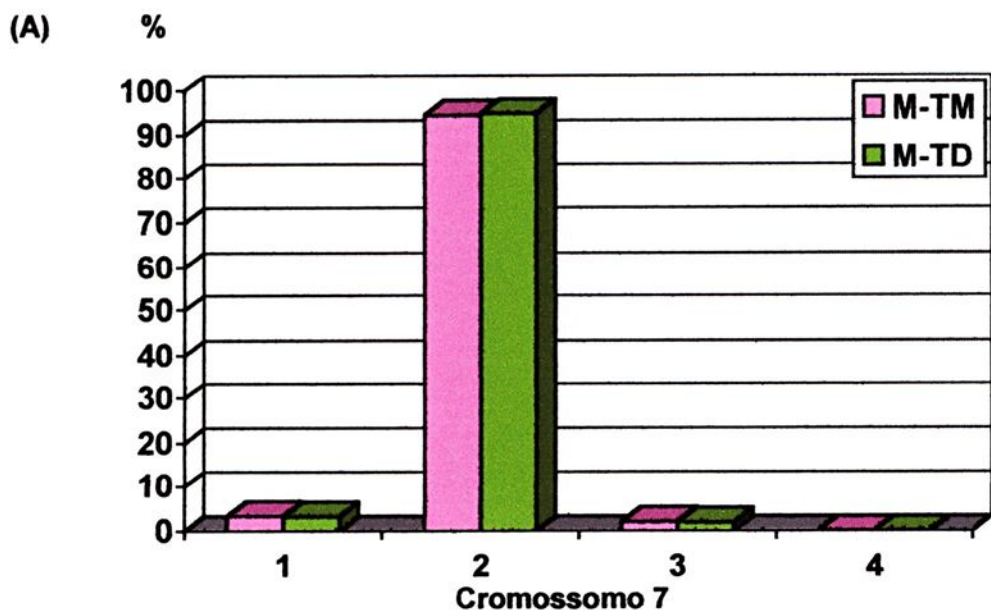
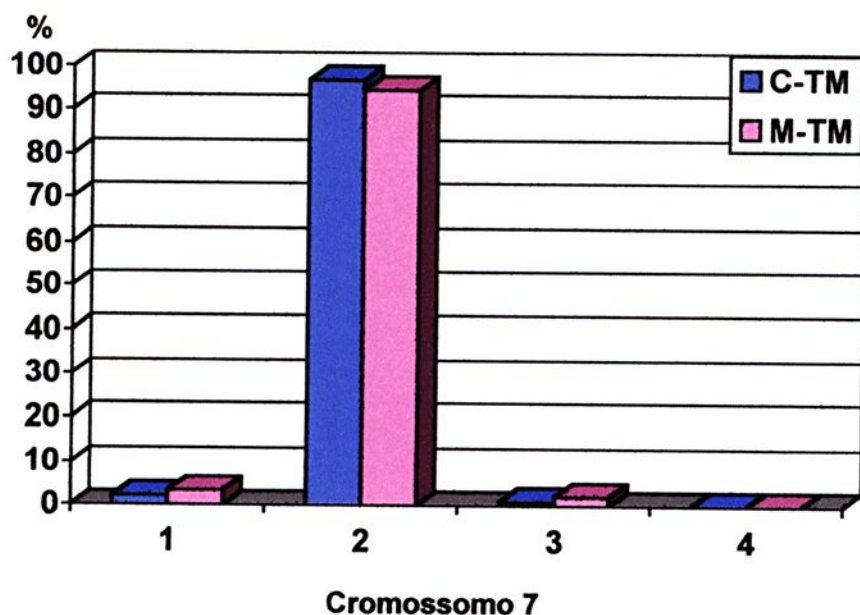


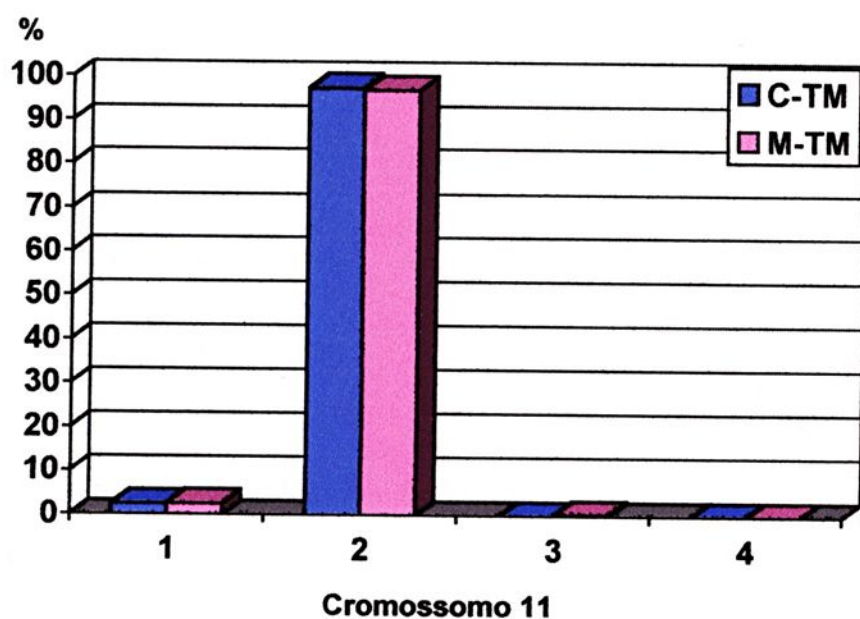
Figura 4

Figura 4. Representação gráfica da distribuição porcentual de núcleos com diferentes números de cópias dos cromossomos 7 (A), 11 (B) e 17 (C) nas amostras dos terços médios do grupo controle (C-TM) e de megaesôfago chagásico (M-TM).

(A)



(B)



(C)

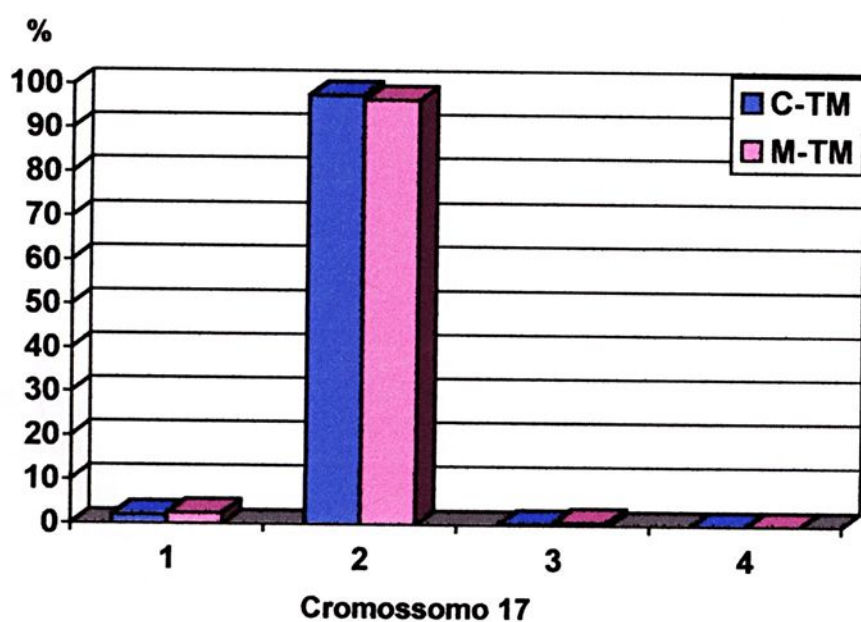
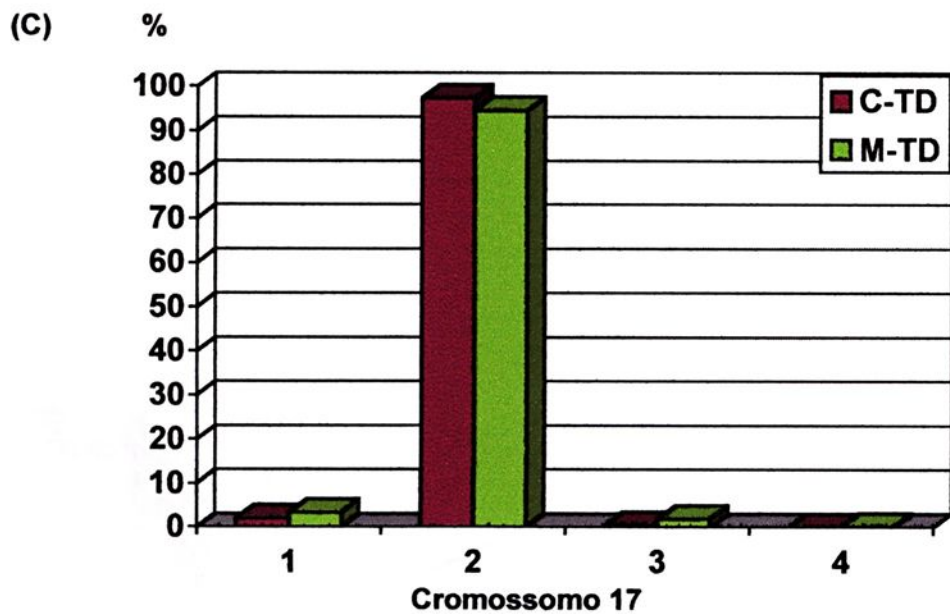
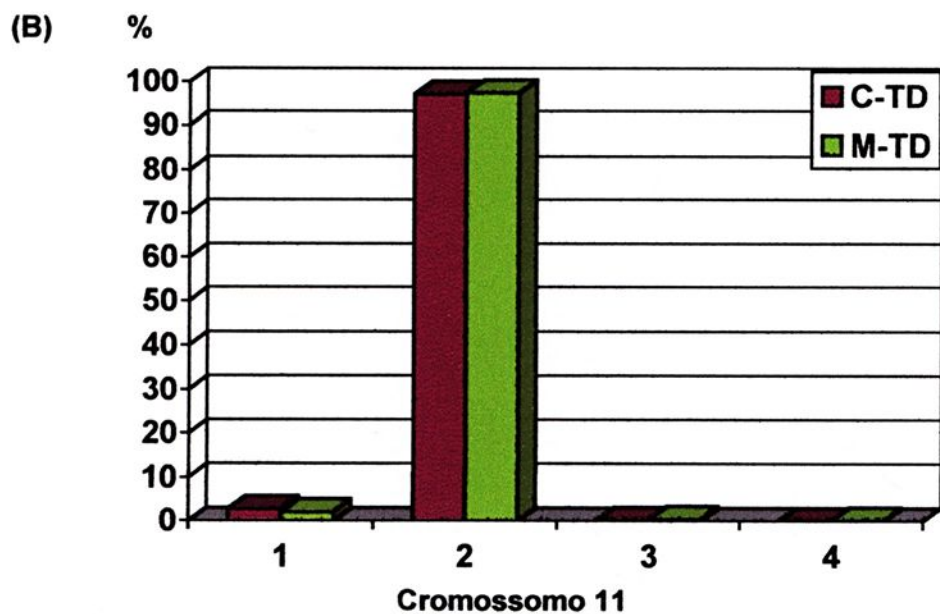
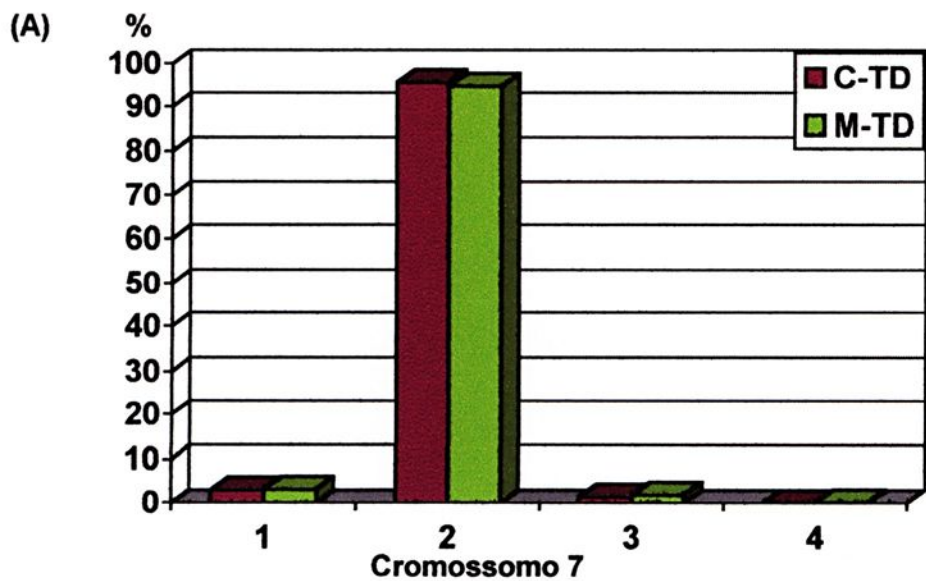


Figura 5

Figura 5. Representação gráfica da distribuição porcentual de núcleos com diferentes números de cópias dos cromossomos 7 (A), 11 (B) e 17 (C) nas amostras dos terços distais do grupo controle (C-TD) e de megaesôfago chagásico (M-TD).



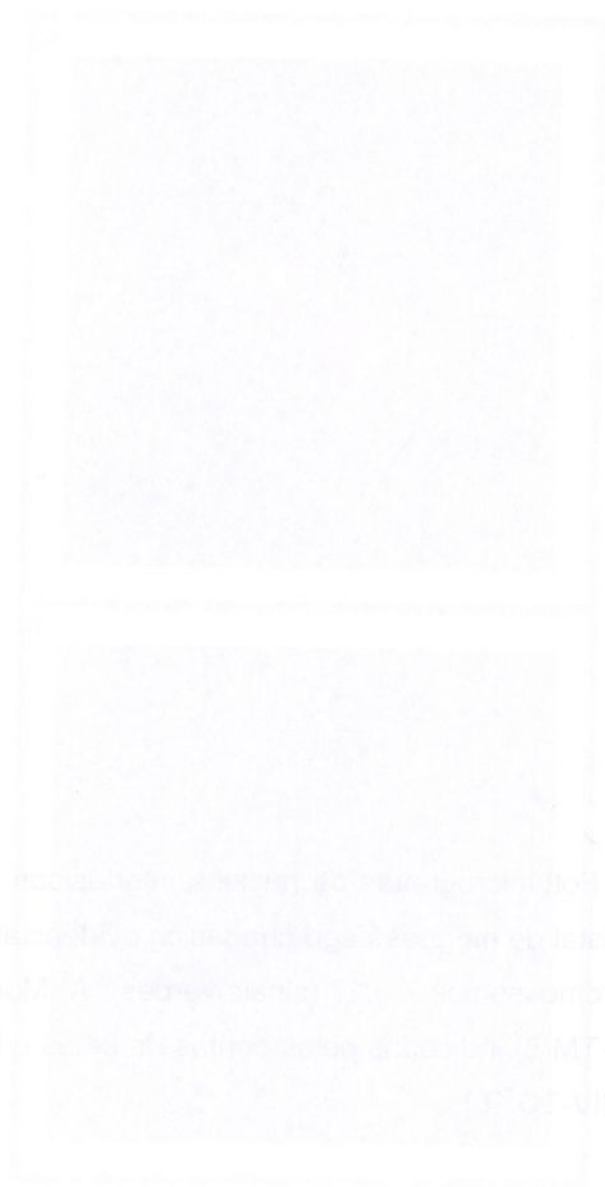
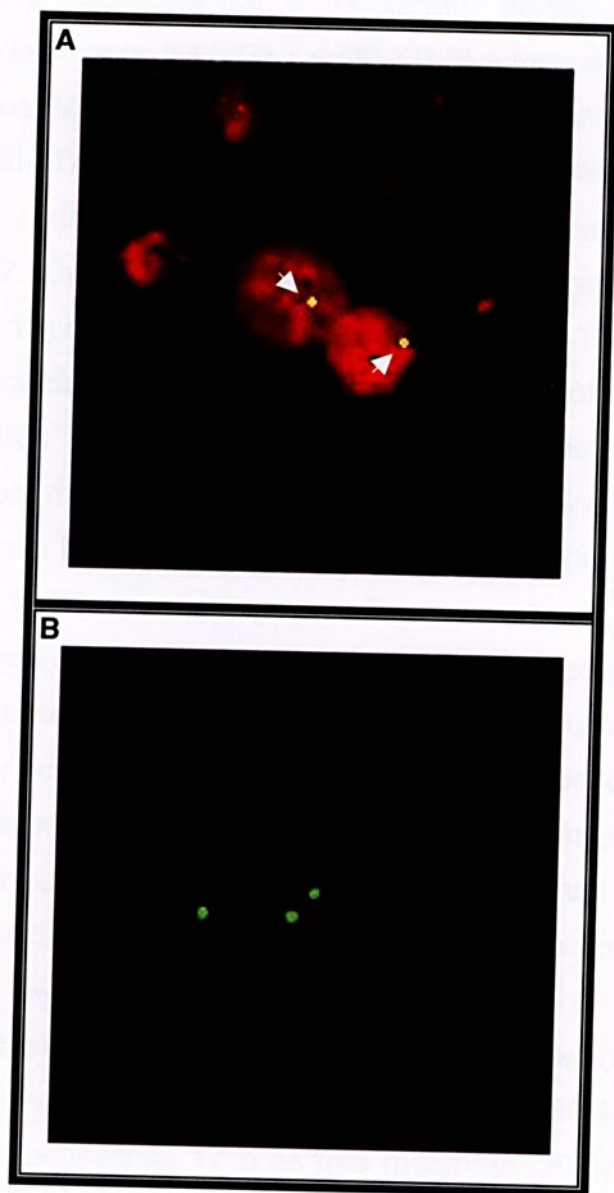
**Figura 6**

Figura 6. Fotomicrografias de núcleos interfásicos das regiões média e distal de megaesôfago chagásico evidenciando aneuploidias dos cromossomos 7 e 17 (sinais verdes): A) Monossomias 7 (caso M II-TM 8) indicadas pelas pontas de setas e B) trissomia 17 (caso MIV-TD 18).



No terço distal do megaesôfago, o cromossomo com maior frequência de aneuploidias foi o 17 (25%), devido monossomia 17 detectada em dois casos (MII-TD 7 e MII-TD 9) e trissomia 17 (Figura 6B) em quatro casos (MI-TD 1, MII-TD 9, MIV-TD 17 e MIV-TD 18). Os casos MI-TD 1 e MII-TD 9 apresentaram, respectivamente, populações de células com trissomia/tetrassomia e monossomia/trissomia do cromossomo 17. Em sequência, dois casos apresentaram trissomia 7 (MI-TD 3 e MIII-TD 13) e um apresentou trissomia 11 (MIV-TD 18).

Considerando-se as duas regiões do megaesôfago constatou-se que apenas três casos apresentaram aneuploidias de um desses cromossomos ocorrendo simultaneamente nos terços médio e distal: caso MI-TM 1/TD 1 com trissomia 17; caso MII-TM 9/TD 9 com monossomia 17 e caso MIII-TM 13/TD 13) com trissomia 7.

Quanto aos carcinomas de células escamosas do esôfago (Tabela 8), pode-se observar uma frequência elevada de aneuploidias em todas as amostras, principalmente trissomia e polissomia do cromossomo 17 (90%), seguidas pelas trissomias/polissomias dos cromossomos 7 (70%) e 11 (70%). Enquanto, o ganho desses cromossomos foi um evento frequente em CCE, a monossomia não foi observada em nenhuma das amostras.

Metade das amostras (50%) apresentaram trissomias/polissomias simultâneas envolvendo os três cromossomos; duas (20%) apresentaram apenas trissomia/polissomia 17 e as três restantes (30%), apresentaram trissomias e/ou polissomias envolvendo combinações dos cromossomos 7, 11 e 17. Na Figura 7 podem ser observadas algumas das aneuploidias frequentes nas amostras de CCE.

Os histogramas apresentados na Figura 8, para comparação das distribuições das porcentagens de núcleos com diferentes números de cópias dos cromossomos 7, 11 e 17 entre as amostras de mucosa esofágica normal, megaesôfago chagásico e carcinoma de células

Tabela 8. Distribuição das porcentagens de núcleos com diferentes números de cópias dos centrômeros dos cromossomos 7, 11 e 17 nas amostras de carcinomas de células escamosas do esôfago (CCE).

Caso	Centrômero 7					Centrômero 11					Centrômero 17				
	% núcleos com sinais				Total núcleos	% núcleos com sinais				Total núcleos	% núcleos com sinais				Total núcleos
	1	2	3	≥4		1	2	3	≥4		1	2	3	≥4	
CCE-1	3,0	90,5	6,5	0,0	337	1,0	92,2	6,8	0,0	385	3,1	93,8	2,8	0,3	288
CCE-2	2,5	72,2	20,3	5,0	281	0,3	97,9	1,0	0,7	291	3,3	58,2	22,5	16,0	213
CCE-3	5,5	74,6	14,8	5,1	311	0,0	6,1	47,7	46,1	310	0,0	17,8	35,6	46,6	208
CCE-4	2,6	79,9	10,5	7,0	343	1,0	83,8	9,4	5,7	297	2,3	78,8	4,9	14,0	306
CCE-5	2,8	76,7	10,8	9,7	288	2,3	56,4	29,7	11,6	259	0,9	70,6	14,0	14,5	214
CCE-6	4,5	93,1	2,4	0,0	290	2,2	97,2	0,3	0,3	324	6,0	82,0	6,0	6,0	200
CCE-7	1,8	55,1	27,7	15,4	332	4,0	86,8	6,3	2,9	272	0,5	54,1	23,9	21,5	205
CCE-8	4,1	81,2	13,4	1,3	313	1,0	15,1	62,5	21,4	192	4,6	31,3	30,8	33,3	201
CCE-9	5,3	92,8	1,5	0,4	264	1,6	90,4	6,4	1,6	311	0,0	94,9	5,1	0,0	294
CCE-10	6,5	88,1	4,6	0,8	261	2,0	95,1	2,4	0,5	205	0,9	91,7	6,5	0,9	216
%	3,8	80,0	11,6	4,6		1,5	74,1	15,6	8,7		2,4	60,4	18,7	18,5	

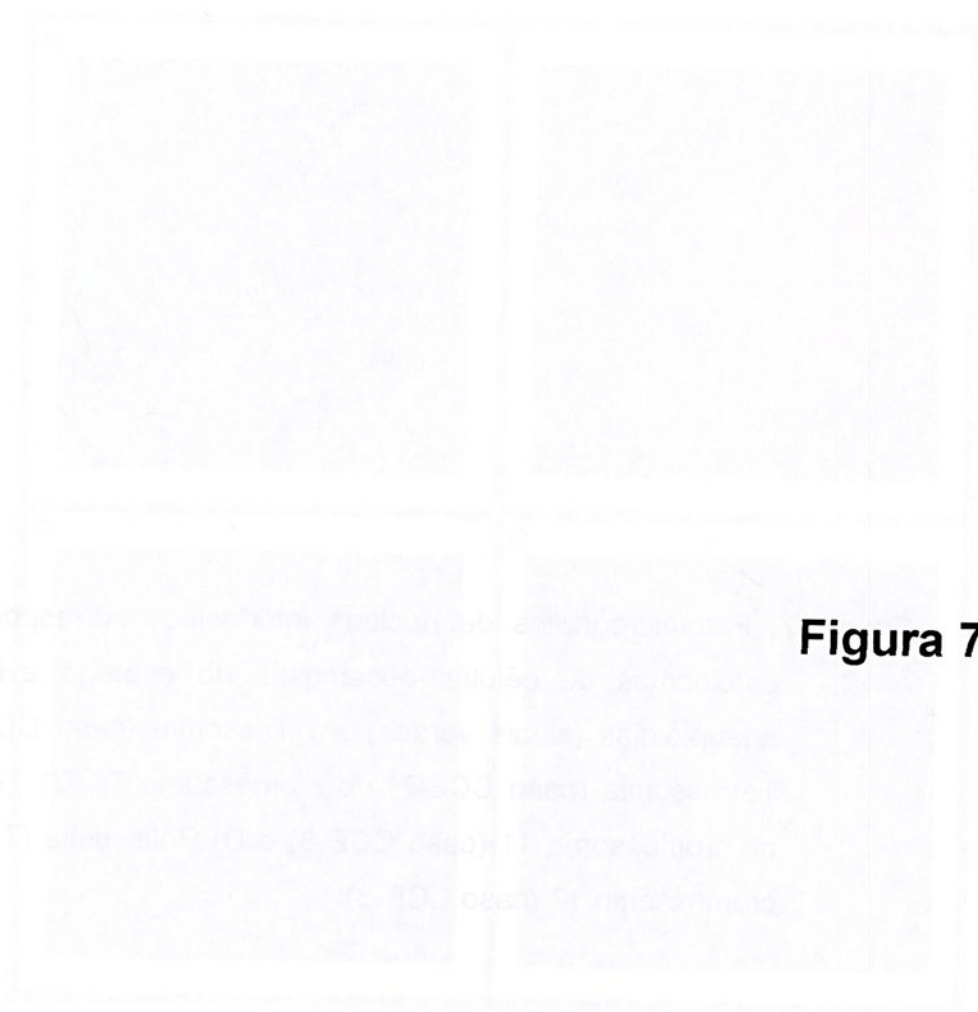
**Figura 7**

Figura 7. Fotomicrografias de núcleos interfásicos correspondentes a carcinomas de células escamosas do esôfago evidenciando aneuploidias (sinais verdes): A) Trissomia (caso CCE-1) e B) Tetrassomia (caso CCE-7) do cromossomo 7; (C) Tetrassomia do cromossomo 11 (caso CCE-8) e D) Polissomia (7 sinais) do cromossomo 17 (caso CCE-3).

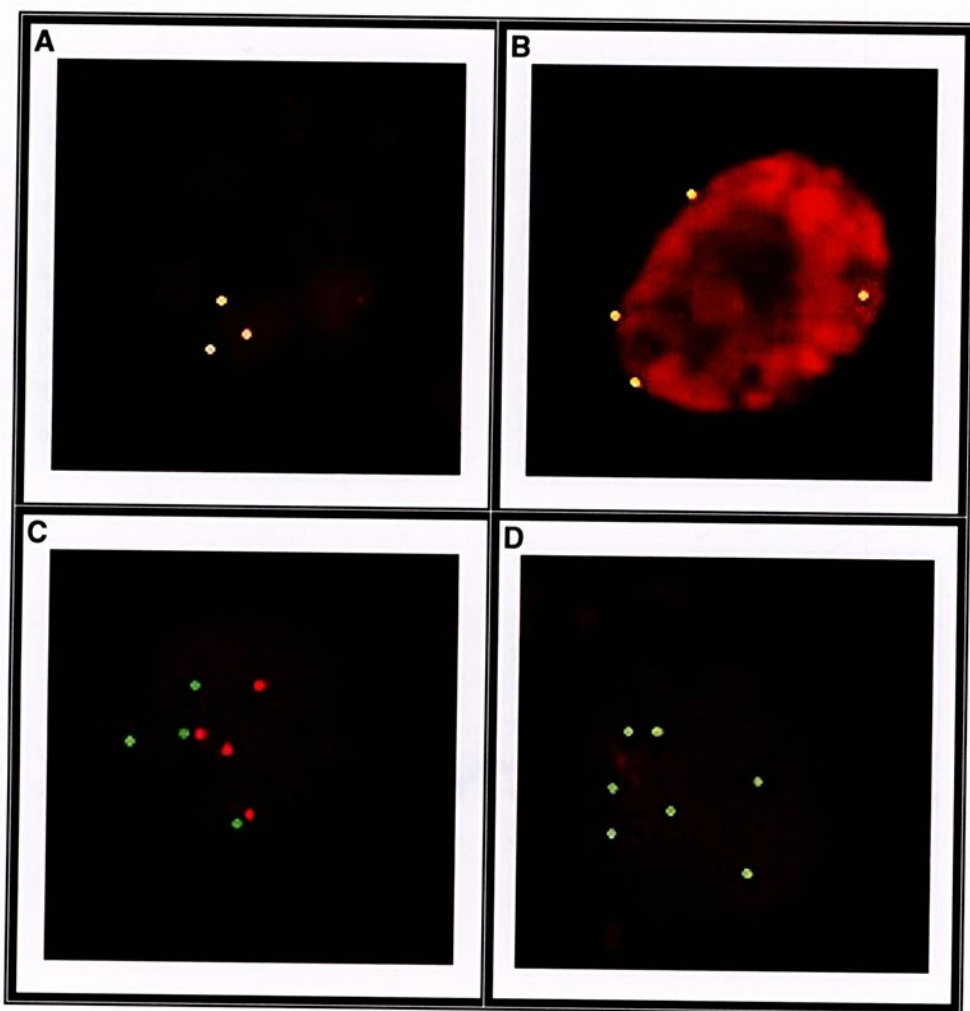
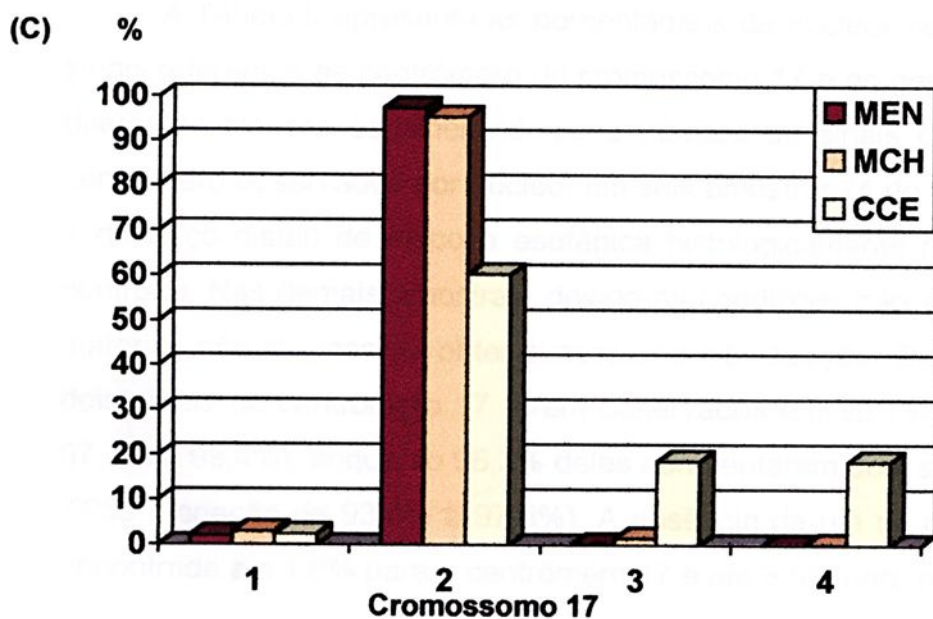
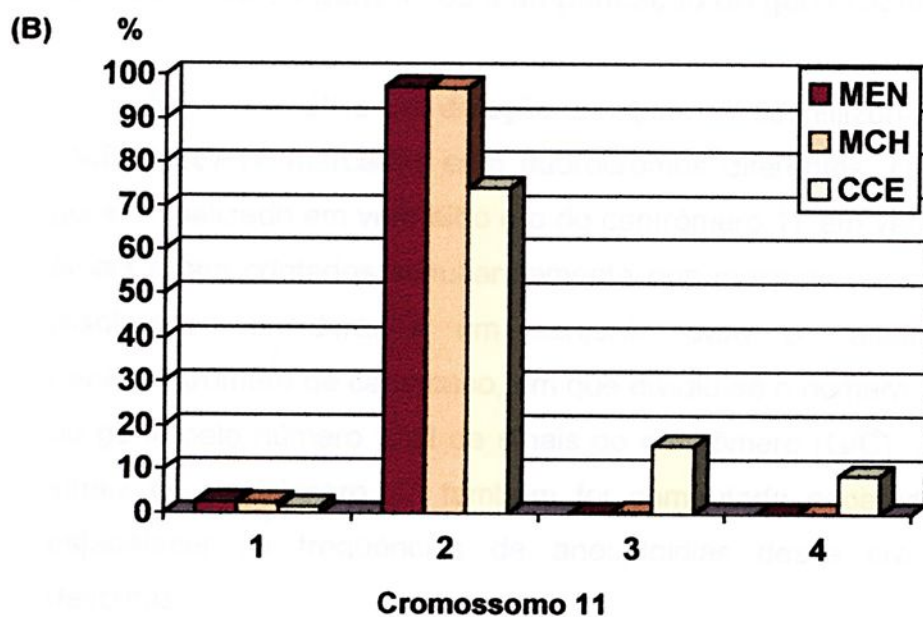
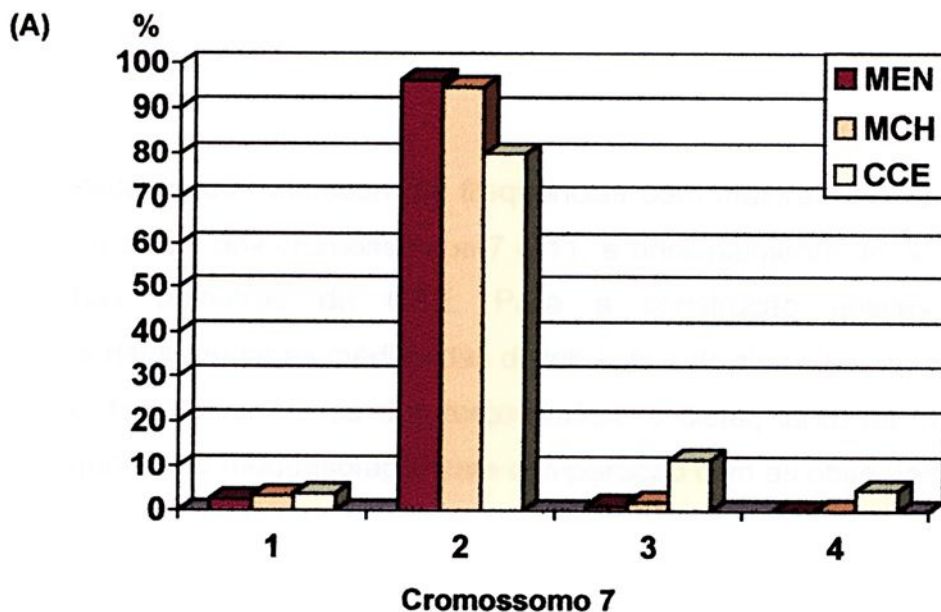


Figura 8

Figura 8. Representação gráfica da distribuição porcentual de núcleos com diferentes número de cópias dos cromossomos 7 (A), 11 (B) e 17 (C) nas amostras de mucosa esofágica normal (MEN), megaesôfago chagásico (MCH) e carcinomas de células escamosas do esôfago (CCE).



escamosas, destacam as frequências bem maiores de núcleos com 3 e ≥ 4 sinais dos cromossomos 7 e 11, e principalmente do cromossomo 17, nas amostras de CCE. Para a construção desses histogramas considerou-se as médias das distribuições de sinais (cromossomos 7, 11 e 17) das amostras dos terços médio e distal, tanto da mucosa normal quanto do megaesôfago, para comparação com as observadas em CCE.

IV.2. Deleção do gene *TP53* e amplificação do gene *Ciclina D1*

Para a análise de deleção do gene *TP53* utilizou-se as sondas LSIP53/CEP17 marcadas com fluorocromos diferentes, com o sinal do gene visualizado em vermelho e o do centrômero 17 em verde. Ambos os sinais foram contados simultaneamente nos mesmos núcleos, sendo os resultados considerados em conjunto para o cálculo da razão gene/centrômero de cada caso, em que dividiu-se o número total de sinais do gene pelo número total de sinais do centrômero (G/C). A análise dos sinais do centrômero 17 também foi computada separadamente para estabelecer as frequências de aneuploidias desse cromossomo, já descritas.

A Tabela 9 apresenta as porcentagens de núcleos com 0, 1, 2 e 3 sinais referentes ao centrômero do cromossomo 17 e do gene *TP53*, e as diferentes classes considerando-se o número de sinais do gene e do centrômero observados por núcleo, em seis amostras (4 do terço médio e 2 do terço distal) de mucosa esofágica histologicamente normal (grupo controle). Nas demais amostras, devido às condições não adequadas do material, não foi possível obter sucesso na hibridização. Os núcleos com dois sinais do centrômero 17 foram observados em 98,1% (variação de 97,1% a 99,4%), enquanto 96,3% deles apresentaram dois sinais do gene *TP53* (variação de 93,4% a 97,8%). A ausência de um ou dois sinais foi encontrada em 1,6% para o centrômero 17 e em 3,5% para o gene,



Tabela 9. Distribuição das porcentagens de sinais do centrômero 17 e do gene *TP53*, diferentes classes do número de sinais do gene para os do centrômero e a razão gene/centrômero (G/C) nas amostras das regiões média (C-TM) e distal (C-TD) da mucosa esofágica histologicamente normal (controle) pela técnica de FISH.

Caso	% núcleos com sinais								Gene <i>TP53</i> / Centrômero 17						Razão G/C	Total núcleos
	Centrômero 17				Gene <i>TP53</i>				% classes gene/centrômero (G/C)							
	0	1	2	3	0	1	2	3	0:2	1:2	2:3	1:1	2:2	3:3		
C-TM 2	0,0	2,6	96,5	0,9	2,2	3,5	93,4	0,9	2,2	0,9	0,0	1,3	95,2	0,4	1,0	229
C-TM 3	0,0	2,4	97,1	0,5	1,9	2,4	95,2	0,5	1,9	0,0	0,0	2,4	95,2	0,5	1,0	208
C-TM 4	0,0	1,6	98,4	0,0	0,0	2,2	97,8	0,0	0,0	0,6	0,0	1,6	97,8	0,0	1,0	321
C-TM 6	0,0	0,7	99,0	0,3	0,0	2,2	97,8	0,0	0,0	1,5	0,3	0,7	97,5	0,0	1,0	324
C-TD 2	0,0	1,6	98,4	0,0	1,3	2,0	96,7	0,0	1,6	0,4	0,0	1,3	96,7	0,0	1,0	307
C-TD 5	0,0	0,6	99,4	0,0	0,0	3,2	96,8	0,0	0,0	2,6	0,0	0,6	96,8	0,0	1,0	340
% média	0,0	1,6	98,1	0,3	0,9	2,6	96,3	0,2	0,8	1,1	0,1	1,2	96,7	0,1	1,0	



enquanto a presença de três sinais ocorreu em 0,3% dos núcleos para o centrômero 17 e 0,2% para o gene *TP53*. A razão média gene/centrômero no grupo controle foi 1,0, evidenciando uma razão balanceada entre o número de sinais do gene *TP53* e do centrômero 17. Portanto, considerou-se com deleção do gene *TP53* aqueles casos com razão menor ou igual a 0,9. Quando avaliou-se as diferentes classes (gene/centrômero), a ausência de um ou ambos os sinais do gene *TP53* (classes 0:2 e 1:2) em núcleos dissômicos para o cromossomo 17 foi observada, em média, em apenas 2,0% dos núcleos do grupo controle, sendo o valor máximo de 3,1% encontrado na amostra C-TM 2. Portanto, mostrando uma taxa reduzida de perda do gene *TP53* em mucosa esofágica normal e reforçando a razão balanceada 1,0 obtida no grupo controle.

No grupo de megaesôfago chagásico a deleção do gene *TP53* foi avaliada em oito amostras do terço médio e em dez amostras do terço distal. Dentre elas, 5/8 (62,5%) do terço médio e 4/10 (40%) do terço distal apresentaram deleção desse gene, cujos dados estão apresentados na Tabela 10. Nas demais amostras não foi possível a análise do gene *TP53* devido às condições inadequadas do material. Considerando-se ambas as regiões do megaesôfago, dois sinais do centrômero 17 foram observados em cerca de 96% (variação de 92,9% a 99,1%) dos núcleos, enquanto para o gene *TP53* foram encontrados em aproximadamente 86% (variação de 71,1% a 97,4%). Quanto à ausência de um ou dois sinais, cerca de 13% dos núcleos apresentaram perda do sinal do gene, enquanto, cerca de 2,0% apresentaram perda de sinal do centrômero. Núcleos com três sinais do gene e do centrômero foram encontrados, respectivamente, em 0,5% e 1,0% das células. A razão gene/centrômero, nos casos do terço médio e distal variou de 0,8 a 1,0. Portanto, evidenciando os cinco casos do terço médio (MI-TM 1, MI-TM 2, MI-TM 5, MI-TM6 e MIV-TM 18) e os quatro do terço distal (MI-TD 2, MI-TD 5, MIV-TD 18 e MIV-TD 20) com deleção do gene *TP53*, descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Distribuição das porcentagens de sinais do centrômero do cromossomo 17 e do gene *TP53*, diferentes classes do número de sinais do gene para os do centrômero e a razão gene/centrômero (G/C) nas amostras de megasôfago chagásico dos terços médio e distal que apresentaram deleção.

Caso	% núcleos com sinais										Gene <i>TP53</i> / Centrômero 17				Razão G/C	Total núcleos
	Centrômero 17					Gene <i>TP53</i>					% classes gene/centrômero (G/C)					
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0:2	1:2	2:2	Outras*		
Terço médio																
MI-TM 1	0,0	2,5	94,0	3,5	0,0	11,5	17,4	71,1	0,0	0,0	11,0	11,9	71,1	6,0	0,8	201
MI-TM 2	0,0	0,7	99,0	0,3	0,0	7,2	8,6	83,9	0,3	0,0	7,2	7,9	83,9	1,0	0,9	291
MI-TM 5	0,0	0,5	99,0	0,5	0,0	4,7	18,2	76,6	0,5	0,0	4,7	17,7	76,6	1,0	0,9	214
MI-TM 6	0,0	3,5	96,5	0,0	0,0	4,5	13,0	82,5	0,0	0,0	4,5	9,5	82,5	3,5	0,9	200
MIV-TM 18	0,0	2,2	96,9	0,9	0,0	13,5	4,4	82,1	0,0	0,0	12,6	2,2	82,1	3,1	0,9	223
% média (8*)	0,0	1,6	97,3	1,0	0,1	5,7	9,6	84,3	0,4	0,0					0,9	
Terço distal																
MI-TD 2	0,0	2,3	97,3	0,4	0,0	7,7	8,1	83,8	0,4	0,0	7,7	5,8	83,8	2,7	0,9	260
MI-TD 5	0,0	3,5	96,0	0,5	0,0	5,8	11,0	82,7	0,5	0,0	5,8	7,5	82,7	3,9	0,9	226
MIV-TD 18	0,0	3,2	92,9	3,9	0,0	12,7	7,4	78,1	1,8	0,0	11,3	3,5	78,1	7,1	0,9	283
MIV TD 20	0,0	0,5	99,1	0,4	0,0	3,6	7,2	88,8	0,4	0,0	3,6	6,7	88,8	0,9	0,9	224
% média (10*)	0,0	2,5	96,4	1,1	0,0	3,9	6,4	89,1	0,6	0,0					1,0	

M (I, III, IV)-TM= megasôfago (grau)-terço médio; M (I, III, IV)-TD= megasôfago (grau)-terço distal; *= 0:3, 1:3, 2:3, 1:1, 2:1, 2:4 e 3:3



Em três deles houve concordância da deleção ocorrendo tanto no terço médio como distal (MI-TM/TD 2, MI-TM/TD 5 e MIV-TM/TD 20). As três amostras do terço médio e as seis do terço distal restantes apresentaram razões gene/centrômero iguais a 1,0, sendo, portanto, normais. Quando esses dados foram reagrupados nas diferentes classes (0:2, 1:2 e 2:2) conforme o número de sinais do gene e do centrômero, considerando-se apenas as células dissômicas, pode-se verificar que os casos com razão igual a 0,9 e 0,8 também apresentaram taxas elevadas de núcleos acima de 10% (variação de 10,3% a 22,9%) nas classes com perda gênica (0:2 e 1:2), confirmando, portanto, a deleção do gene *TP53*. Nas Figuras 9A-B estão ilustradas algumas dessas alterações.

Com relação aos carcinomas de células escamosas do esôfago (Tabela 11), apenas 67,3% dos núcleos apresentaram dois sinais do centrômero 17, devido a frequência elevada de células com três (15,2%), quatro ou mais sinais (15,3%), evidenciando trissomia/tetrassomia desse cromossomo. Uma porcentagem muito baixa de dois sinais também ocorreu em relação ao gene *TP53*, principalmente devido à ausência de um (27,9%) ou dois sinais (6,3%) do gene (Figura 9C). Nesse grupo, todos os casos apresentaram razão G/C igual ou menor a 0,9 (variação de 0,5 a 0,9), indicando deleção gênica, que pode ser confirmada quando esses dados são agrupados por classes, que nesse grupo foram ampliadas devido à frequência elevada de células com trissomia/tetrassomia do cromossomo 17.

Para a investigação de amplificação gênica utilizou-se as sondas LSI Cyclin D1/CEP11 marcadas com fluorocromos diferentes, sendo o sinal do gene *Ciclina D1* visualizado em vermelho e o do centrômero 11 em verde. Os sinais centroméricos e do gene foram contados simultaneamente nos mesmos núcleos e as contagens foram consideradas em conjunto para estabelecer a razão gene/centrômero (G/C). A análise dos sinais do centrômero 11 também foi computada

**Figura 9**

Figura 9. Fotomicrografias de núcleos interfásicos evidenciando deleção do gene *TP53* (sinais vermelhos) em terço distal de megaesôfago chagásico com a perda de 1 (A) e 2 (B) sinais do gene (caso MI-TD 5) acompanhados de 2 sinais do centrômero do cromossomo 17 (sinais verdes), e em carcinoma de células escamosas do esôfago (caso CCE-4) indicada pela perda de 2 sinais do gene acompanhada de 4 sinais do centrômero 17 (C). Os sinais do gene estão indicados pelas pontas de setas.

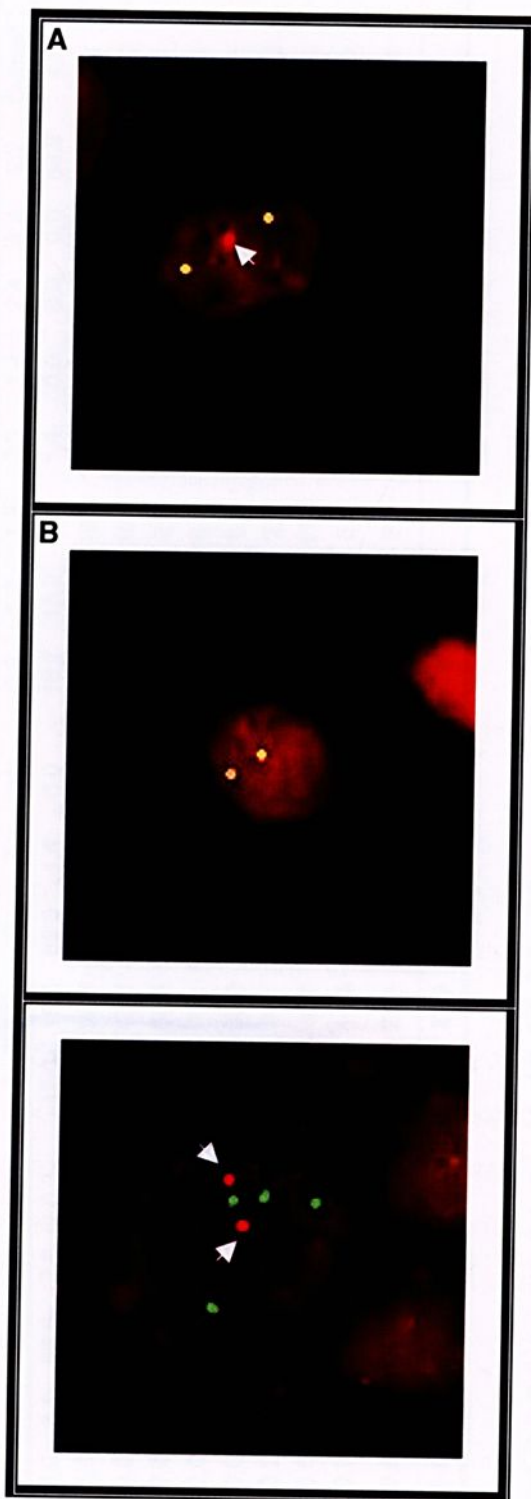


Tabela 11. Distribuição das porcentagens de sinais do centrômero do cromossomo 17 e do gene *TP53*, diferentes classes do número de sinais do gene para os do centrômero e a razão gene/centrômero (G/C) nas amostras de carcinoma de células escamosas do esôfago (CCE).

Caso	% núcleos com sinais										Gene <i>TP53</i> / Centrômero 17										Razão G/C	Total núcleos
	Centrômero 17					Gene <i>TP53</i>					% classes gene/centrômero (G/C)											
	0	1	2	3	≥4	0	1	2	3	≥4	0:2	1:2	1:3	2:3	1:4	2:4	3:4	2:2	Outras*			
CCE-1	0,0	3,1	93,8	2,8	0,3	17,0	16,3	65,3	1,4	0,0	16,7	13,2	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	63,9	4,8	0,8	288	
CCE-2	0,0	3,3	58,2	22,5	16,0	0,0	34,3	65,7	0,0	0,0	0,0	0,0	19,3	3,3	11,7	4,2	0,0	58,2	3,3	0,5	213	
CCE-3	0,0	0,0	17,8	35,6	46,6	15,9	47,0	19,3	7,7	10,1	3,4	9,1	16,3	8,7	21,6	5,3	2,9	5,3	22,2	0,5	208	
CCE-4	0,0	2,3	78,8	4,9	14,0	12,8	59,8	27,4	0,0	0,0	11,8	49,3	2,3	1,6	5,9	8,2	0,0	17,6	3,3	0,5	306	
CCE-5	0,0	0,9	70,6	14,0	14,5	0,0	7,9	79,0	7,9	5,2	0,0	0,9	6,1	3,8	0,0	5,6	3,7	69,6	9,8	0,9	214	
CCE-6	0,0	6,0	82,0	6,0	6,0	11,0	23,0	66,0	0,0	0,0	11,0	11,0	6,0	0,0	0,0	6,0	0,0	60,0	6,0	0,8	200	
CCE-7	0,0	0,5	54,1	23,9	21,5	0,0	7,8	63,9	20,0	8,3	0,0	2,9	2,4	4,4	2,0	7,8	2,9	51,2	25,9	0,9	205	
CCE-8	0,0	4,6	31,3	30,8	33,3	0,0	46,7	49,3	0,0	4,0	0,0	22,4	11,4	19,4	8,4	20,9	0,0	9,0	8,5	0,5	201	
CCE-9	0,0	0,0	94,9	5,1	0,0	1,4	14,6	82,3	1,7	0,0	1,4	14,3	3,1	0,0	0,0	0,0	0,0	79,2	2,0	0,9	294	
CCE-10	0,0	0,9	91,7	6,5	0,9	5,1	22,1	71,8	1,0	0,0	4,6	17,1	3,2	1,9	0,9	0,0	0,0	69,9	2,4	0,8	216	
% média	0,0	2,2	67,3	15,2	15,3	6,3	27,9	59,0	4,0	2,8										0,7		

*= 0:3, 0:4, 0:5, 0:6, 0:7, 1:1, 3:4, 4:4, 4:5, 4:6, 5:5; 7:7 e 8:8.



separadamente para estabelecer as frequências de aneuploidias desse cromossomo, já descritas.

A Tabela 12 apresenta as porcentagens de núcleos com 0, 1, 2 e 3 sinais referentes ao centrômero do cromossomo 11 e ao gene *Ciclina D1* em 10 amostras (5 do terço médio e 5 do terço distal) de mucosa esofágica histologicamente normal, que constitui o grupo controle. Cerca de 97% dos núcleos (variação de 95% a 98,8%), tanto das amostras de mucosa normal do terço médio como distal apresentaram dois sinais para o centrômero 11, enquanto aproximadamente 92% dos núcleos (variação de 88,2% a 98,5%) apresentaram dois sinais do gene *Ciclina D1*. Aneuploidia do cromossomo 11 ocorreu em frequência baixa, ou seja, cerca de 3% dos núcleos apresentaram apenas um sinal e 0,1% três sinais. Todavia, a ausência de uma ou ambas as cópias do gene *Ciclina D1* ocorreu em aproximadamente 7% dos núcleos, enquanto três cópias desse gene foram observadas em cerca de 1,0% dos núcleos de mucosa normal.

Para o cálculo da razão gene/centrômero de cada caso dividiu-se o número total de sinais do gene pelo número total de sinais do centrômero. A razão média G/C em ambas as regiões da mucosa normal foi 1,0 (variação de 0,9 a 1,0). Portanto, considerou-se sem amplificação aqueles casos com razão G/C balanceada entre 0,9-1,0. Os casos com razões entre 1,1-2,0 foram considerados com ganho preferencial do gene, e aqueles com razão maior a 2,0, com amplificação gênica. No grupo dos carcinomas, além de amplificação do gene com sinais dispersos no núcleo (razão >2,0), uma grande porcentagem dos núcleos também apresentaram os sinais agrupados na forma de *clusters*, que foram considerados como apresentando cerca de 20 cópias do gene.

Na Tabela 13 estão apresentados os resultados obtidos em 39 amostras das regiões média e distal de megaesôfago chagásico. Na amostra MIII-TM 16 não foi possível a análise devido às condições não



Tabela 12. Distribuição das porcentagens de sinais do centrômero do cromossomo 11 e do gene *Ciclina D1* e a razão gene/centrômero (G/C) nas amostras de mucosa esofágica histologicamente normal (controle) pela técnica de FISH.

Caso	% núcleos com sinais								Razão G/C	Total núcleos
	Centrômero 11				Gene <i>Ciclina D1</i>					
	0	1	2	3	0	1	2	3		
Terço médio										
C-TM 1	0,0	1,3	98,4	0,3	4,6	5,9	88,2	1,3	0,9	306
C-TM 2	0,0	5,0	95,0	0,0	1,0	8,0	90,5	0,5	1,0	199
C-TM 3	0,0	2,5	97,2	0,3	3,7	5,5	90,8	0,0	0,9	325
C-TM 4	0,0	1,2	98,8	0,0	0,3	3,0	96,7	0,0	1,0	332
C-TM 6	0,0	3,6	96,4	0,0	0,0	4,0	94,2	1,8	1,0	223
% média	0,0	2,7	97,2	0,1	1,9	5,3	92,1	0,7	1,0	
Terço distal										
C-TD 1	0,0	2,2	97,8	0,0	4,1	5,7	88,9	1,0	0,9	316
C-TD 2	0,0	3,6	96,4	0,0	1,9	4,0	92,8	1,3	1,0	223
C-TD 3	0,0	4,2	95,8	0,0	2,7	8,9	88,4	0,0	0,9	259
C-TD 5	0,0	0,6	98,8	0,6	0,0	1,2	98,5	0,3	1,0	325
C-TD 6	0,0	3,9	96,1	0,0	0,0	3,9	93,8	2,3	1,0	257
% média	0,0	2,9	97,0	0,1	1,7	4,7	92,5	1,0	1,0	

C-TM= controle-terço médio; C-TD= controle-terço distal

Tabela 13. Distribuição das porcentagens de sinais do centrômero do cromossomo 11 e do gene *Ciclina D1* e a razão gene/centrômero (G/C) nas amostras de megaesôfago chagásico pela técnica de FISH.

Caso	% núcleos com sinais										Razão G/C	Total núcleos
	Centrômero 11					Gene <i>Ciclina D1</i>						
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	≥4		
Terço médio												
MI-TM 1	0,0	0,0	99,2	0,8	0,0	0,0	10,4	89,6	0,0	0,0	0,9	257
MI-TM 2	0,0	4,0	96,0	0,0	0,0	0,0	12,0	88,0	0,0	0,0	1,0	225
MI-TM 3	0,0	0,6	97,6	1,2	0,6	0,9	3,7	92,1	3,3	0,0	1,0	328
MI-TM 4	0,0	2,5	97,5	0,0	0,0	0,0	7,2	92,8	0,0	0,0	1,0	236
MI-TM 5	0,0	2,2	97,8	0,0	0,0	0,0	2,2	96,9	0,9	0,0	1,0	323
MI-TM 6	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	3,7	3,7	92,5	0,0	0,0	0,9	214
MII-TM 7	0,0	2,9	97,1	0,0	0,0	3,8	8,2	88,0	0,0	0,0	0,9	208
MII-TM 8	0,0	3,0	97,0	0,0	0,0	2,2	4,8	92,6	0,4	0,0	1,0	231
MII-TM 9	0,0	0,5	99,5	0,0	0,0	6,4	4,1	89,5	0,0	0,0	0,9	219
MII-TM 10	0,0	1,2	98,8	0,0	0,0	1,5	4,3	94,2	0,0	0,0	1,0	328
MII-TM 11	0,0	6,4	93,6	0,0	0,0	0,0	5,6	94,4	2,2	0,0	1,0	267
MII-TM 12	0,0	1,7	98,3	0,0	0,0	0,7	5,9	93,4	0,0	0,0	1,0	290
MIII-TM 13	0,0	2,1	97,9	0,0	0,0	0,0	3,0	97,0	0,0	0,0	1,0	336
MII-TM 14	0,0	2,5	95,9	1,3	0,3	1,9	7,9	89,0	0,6	0,6	0,9	318
MIII-TM 15	0,0	5,4	94,1	0,5	0,0	3,9	7,4	88,2	0,5	0,0	0,9	203
MIV-TM 17	0,0	3,2	96,8	0,0	0,0	3,6	10,0	86,4	0,0	0,0	0,9	280
MIV-TM 18	0,0	4,6	93,6	1,8	0,0	0,7	7,8	88,6	2,9	0,0	1,0	281
MIV-TM 19	0,0	0,0	98,5	1,5	0,0	0,3	4,1	93,5	1,8	0,3	1,0	340
MIV-TM 20	0,0	10,3	89,2	0,5	0,0	2,0	4,9	79,9	4,4	8,8	1,2	204
% média	0,0	2,8	96,7	0,4	0,1	1,6	6,2	90,8	0,9	0,5	1,0	
Terço distal												
MI-TD 1	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	6,4	93,2	0,4	0,0	1,0	279
MI-TD 2	0,0	4,4	95,6	0,0	0,0	0,0	7,8	91,2	0,5	0,5	1,0	205
MI-TD 3	0,0	0,6	98,8	0,3	0,3	0,3	2,3	96,5	0,9	0,0	1,0	340
MI-TD 4	0,0	1,0	98,7	0,3	0,0	3,9	5,2	90,9	0,0	0,0	0,9	308
MI-TD 5	0,0	1,7	98,3	0,0	0,0	0,4	6,2	91,7	1,7	0,0	1,0	242
MI-TD 6	0,0	3,6	96,0	0,4	0,0	2,2	6,7	90,7	0,4	0,0	1,0	225
MII-TD 7	0,0	3,5	96,5	0,0	0,0	1,5	4,0	94,0	0,5	0,0	1,0	201
MII-TD 8	0,0	2,0	97,4	0,6	0,0	1,3	3,3	95,1	0,3	0,0	1,0	304
MII-TD 9	0,0	5,3	94,7	0,0	0,0	0,0	8,4	91,6	0,0	0,0	1,0	285
MII-TD 10	0,0	1,0	99,0	0,0	0,0	0,3	2,6	97,1	0,0	0,0	1,0	309
MII-TD 11	0,0	1,7	98,3	0,0	0,0	0,0	3,4	96,6	0,0	0,0	1,0	292
MII-TD 12	0,0	1,6	98,4	0,0	0,0	2,1	6,2	91,7	0,0	0,0	0,9	192
MIII-TD 13	0,0	3,2	96,8	0,0	0,0	0,0	4,2	94,2	1,6	0,0	1,0	310
MII-TD 14	0,0	1,9	96,2	1,4	0,5	0,5	8,5	87,7	2,8	0,5	1,0	211
MIII-TD 15	0,0	4,0	96,0	0,0	0,0	1,3	8,4	90,3	0,0	0,0	1,0	226
MIII-TD 16	0,0	1,6	97,8	0,6	0,0	0,6	1,9	96,5	0,9	0,0	1,0	318
MIV-TD 17	0,0	1,3	98,2	0,5	0,0	2,7	3,2	92,3	1,8	0,0	1,0	221
MIV-TD 18	0,0	5,9	88,7	4,9	0,5	4,9	4,5	70,3	13,1	7,2	1,1	222
MIV-TD 19	0,0	0,6	99,4	0,0	0,0	1,2	1,3	97,5	0,0	0,0	1,0	162
MIV-TD 20	0,0	0,3	99,7	0,0	0,0	0,0	1,3	98,4	0,0	0,3	1,0	304
% média	0,0	2,3	97,2	0,4	0,1	1,1	5,0	92,3	1,2	0,4	1,0	

M (I, II, III, IV)-TM= megaesôfago (grau)-terço médio; M (I, II, III, IV)-TD= megaesôfago (grau)-terço distal

adequadas do material. Considerando-se ambas as regiões do megaesôfago observou-se dois sinais do centrômero 11 em 97% (variação de 88,7% a 100%) dos núcleos, enquanto para o gene *Ciclina D1* foram encontrados em 91% (variação de 70,3% a 98,4%). Cerca de 2,5% dos núcleos apresentaram um sinal do centrômero 11, enquanto 0,4% e 0,1% apresentaram, respectivamente, três e quatro sinais. As porcentagens de núcleos com um ou nenhum sinal do gene foram, respectivamente, de 5,5% e 1,3%. Enquanto, três cópias do gene foram encontradas em 1,0% das células, e quatro cópias em 0,5%. A razão média G/C nessas amostras foi 1,0 (balanceada) com variação de 0,9-1,2 na região do terço médio e 0,9-1,1 na região do terço distal.

Com base nos critérios estabelecidos, nenhum caso de megaesôfago apresentou amplificação do gene *Ciclina D1*, contudo, em dois deles, um do terço médio (MIV-TM 20) e outro do terço distal (MIV-TD 18), verificou-se respectivamente as razões 1,2 e 1,1 indicando, portanto, um ganho preferencial do gene *Ciclina D1* (Figura 10A), devido a uma frequência maior de núcleos com três a sete sinais desse gene.

Com relação aos carcinomas de células escamosas do esôfago (Tabela 14) pode-se observar que a porcentagem média de núcleos com dois sinais do centrômero 11, ou seja, 72,1% (variação de 6,1% a 97,9%) é menor do que a das amostras de mucosa normal e de megaesôfago, em decorrência principalmente, da maioria das amostras (7/10) apresentarem trissomia e/ou tetrassomia desse cromossomo. De modo contrário, a presença de apenas um sinal do centrômero 11 foi observada em 1,5% dos núcleos. Quanto ao gene *Ciclina D1* apenas 28,9% dos núcleos (variação de 0% a 93,6%) apresentaram dois sinais, pois observou-se frequências elevadas de núcleos com 3-10 sinais, ou agrupados na forma de *cluster*. Nas amostras de carcinomas do esôfago ficou evidente a amplificação do gene *Ciclina D1* observada em 70% dos casos (7/10), com variação da razão G/C de 2,2 a 9,5 e cerca de 22% a 99% dos núcleos com sinais do gene agrupados (*clusters*) (Figura 10B-C).

**Figura 10**

Figura 10. Fotomicrografias de núcleos interfásicos evidenciando: (A) três sinais do gene *Ciclina D1* no caso MIV-TM 20 (sinais vermelhos indicados pelas pontas de setas) acompanhados de 2 sinais do centrômero 11 (sinais verdes); e amplificação em nível elevado do gene *Ciclina D1* (B-C) na forma de *cluster* (grupos vermelhos) acompanhados de 2 sinais do centrômero 11 (caso CCE-1).

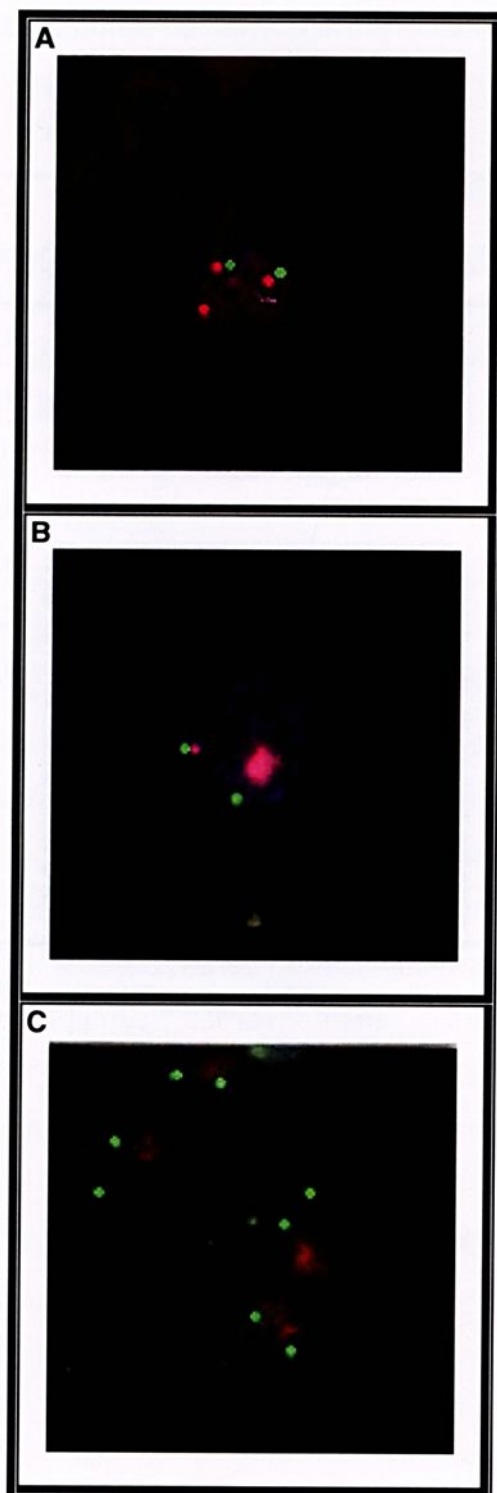


Tabela 14. Distribuição das porcentagens de sinais do centrômero do cromossomo 11 e do gene *Ciclina D1* e a razão gene/centrômero (G/C) nas amostras de carcinoma de células escamosas do esôfago (CCE) pela técnica de FISH.

Caso	% núcleos com sinais											Razão G/C	Total núcleos
	Centrômero 11					Gene <i>Ciclina D1</i>							
	0	1	2	3	≥4	0	1	2	3	4-10	Cluster		
CCE-1	0,0	1,0	92,2	6,8	0,0	1,0	0,3	2,6	1,0	6,2	88,8	8,9	385
CCE-2	0,0	0,3	97,9	1,0	0,7	0,0	0,0	14,1	0,3	3,1	82,5	8,4	291
CCE-3	0,0	0,0	6,1	47,7	46,1	0,0	2,3	0,0	30,6	44,8	22,3	2,2	310
CCE-4	0,0	1,0	83,8	9,4	5,7	1,7	5,4	76,8	10,4	5,7	0,0	1,0	297
CCE-5	0,0	2,3	56,4	29,7	11,6	0,0	0,0	25,9	5,4	34,3	34,4	4,2	259
CCE-6	0,0	2,2	97,2	0,3	0,3	0,0	1,5	56,8	0,0	0,6	41,1	4,7	324
CCE-7	0,0	4,0	86,8	6,3	2,9	0,0	2,9	0,0	0,4	0,7	96,0	9,3	272
CCE-8	0,0	1,0	15,1	62,5	21,4	1,6	5,7	9,4	47,4	35,9	0,0	1,0	192
CCE-9	0,0	1,6	90,4	6,4	1,6	0,0	0,0	0,3	0,0	0,6	99,0	9,5	311
CCE-10	0,0	2,0	95,1	2,4	0,5	0,0	4,9	93,6	1,0	0,5	0,0	1,0	205
% média	0,0	1,5	72,1	17,3	9,1	0,3	1,7	28,9	9,6	13,0	46,5	5,0	

Apenas os casos CCE-4, CCE-8 e CCE-10 não apresentaram amplificação, com razão G/C igual a 1,0.

Na Tabela 15 estão resumidos os resultados da análise citogenética molecular (aneuploidias e deleção do gene *TP53*), assim como sexo, idade, tabagismo, etilismo e outras informações nas amostras de megaesôfago chagásico. Entre as 39 amostras de megaesôfago analisadas, 11 do terço médio (58%) e 10 do terço distal (50%) apresentaram algum tipo de alteração genética. Dessas amostras, sete apresentaram algum tipo de alteração em ambas as regiões do megaesôfago e, em seis delas, as alterações foram concordantes: MI-TM/TD 1 com trissomia 17, MII-TM/TD 9 com monossomia 17, MIII-TM/TD 13 com trissomia 7 e os casos MI-TM/TD 2, MI-TM/TD 5 e MIV-TM/TD 18 com deleção do gene *TP53*, evidenciando o mesmo evento genético no epitélio dessas regiões. Ainda nas amostras de megaesôfago, uma do terço médio (MI-TM 1) e uma do terço distal (MIV-TD 18) apresentaram alterações múltiplas envolvendo aneuploidias dos cromossomos avaliados associadas à deleção do gene *TP53*.

Comparando-se ambas as regiões do megaesôfago observa-se uma preponderância de alterações afetando o terço médio. No entanto, enquanto no terço médio foi mais freqüente aneuploidias do cromossomo 7 (monossomia e trissomia), no terço distal observou-se principalmente trissomia 17. Ainda comparando-se as duas regiões do megaesôfago, no terço médio foi observada monossomia em cinco casos, afetando os cromossomos 7, 11 ou 17, porém no terço distal observou-se monossomia em apenas dois casos, ocorrendo no cromossomo 17. Agora, quando compara-se os megaesôfagos de graus I e II em relação aos de graus elevados (III e IV) pode-se verificar que enquanto nos casos do terço médio, a ocorrência de alterações genéticas é mais freqüente nos de grau elevado, ou seja, seis das sete amostras (86%), nos do terço distal tal diferença não é observada, pois 50% (4/8) dos casos de graus baixo e elevado apresentaram algum tipo de alteração.



Tabela 15. Distribuição das anormalidades numéricas, deleção do gene *TP53*, sexo, idade, tabagismo, etilismo e outras informações nas amostras de megaesôfago chagásico (terços médio e distal).

Caso	Aneuploidias			Deleção TP53	Sexo/Idade	Fumante/Etilista	Outras informações
	7	11	17				
Terço Médio							
M I-TM 1	Monos	–	Tris	Del	M/79	Ex/S	Constipação intestinal/Estenose de esôfago/Óbito
M I-TM 2	–	–	–	Del	F/69	S/N	Gastrite enantematosa/Carcinoma de pele
M I-TM 5	–	–	–	Del	F/66	N/N	Gastrite/Óbito
M I-TM 6	–	–	–	Del	F/50	S/N	Constipação intestinal
M II-TM 8	Monos	–	–	*	F/38	S/N	
M II-TM 9	–	–	Monos	*	M/76	Ex/Ex	Gastrite crônica/Metaplasia intestinal
M III-TM 13	Tris	–	–	–	F/58	N/N	Constipação intestinal/Refluxo
M III-TM 14	Monos	–	–	–	M/57	Ex/Ex	Gastrite crônica
M III-TM 15	Tris	–	–	*	M/37	S/N	Megacólon
M IV-TM 18	–	–	–	Del	M/66	Ex/N	Gastrite crônica/Chagas-
M IV-TM 19	Tris	–	–	*	F/77	N/N	Megacólon/Óbito
M IV-TM 20	–	Monos	–	*	F/55	Ex/N	Gastrite crônica
Terço Distal							
M I-TD 1	–	–	Tris/Tetras	*	M/79	Ex/S	Constipação intestinal/Estenose de esôfago/Óbito
M I-TD 2	–	–	–	Del	F/69	S/N	Gastrite enantematosa/Carcinoma de pele
M I-TD 3	Tris	–	–	–	M/65	S/N	**
M I-TD 5	–	–	–	Del	F/66	N/N	Gastrite/Óbito
M II-TD 7	–	–	Monos	–	M/80	S/Ex	
M II-TD 9	–	–	Monos/Tris	*	M/76	Ex/Ex	Gastrite crônica/Metaplasia intestinal
M III-TD 13	Tris	–	–	–	F/58	N/N	Constipação intestinal/Refluxo
M IV-TD 17	–	–	Tris	*	F/69	S/N	
M IV-TD 18	–	Tris	Tris	Del	M/66	Ex/N	Gastrite crônica
M IV-TD 20	–	–	–	Del	F/55	Ex/N	Gastrite crônica

M(I-IV)-TM= megaesôfago (grau)-terço médio; M(I-IV)-TD= megaesôfago (grau)-terço distal;
 Monos/Tris/Tetras= monossomia/trissomia/tetrassomia; Del= deleção; –= sem alteração; M= masculino; F= feminino; S= sim; N= não; *= não analisado; **= dado não disponível

Quanto às amostras dos terços médio e distal de megaesôfago chagásico que apresentaram alterações genéticas, a maioria dos casos (33,3%) relatou a ocorrência de gastrite crônica, assim como hábitos de tabagismo (80%) e/ou de etilismo (26,7%) ou que tinham parado durante algum tempo. A idade desses indivíduos variou de 37 a 80 anos, sendo oito do sexo feminino e sete do sexo masculino. Três pacientes foram a óbito, com um caso (MIV-TM 19) apresentando megacólon, mas sem os hábitos de tabagismo e/ou etilismo. Ao contrário, um outro paciente com megacólon relatou o hábito de tabagismo (caso MIII-TM 15).

Na Tabela 16 encontram-se resumidos os resultados da análise citogenética molecular nas 10 amostras de CCE, assim como informações quanto à diferenciação, região do esôfago, sexo, idade, tabagismo, etilismo, ocorrência de óbito, metástase e recidiva. Dos 9 casos de CCE em que obteve-se informações sobre a localização do tumor, cerca de 55% ocorreram no terço médio e 45% no terço distal, não evidenciando, portanto, uma localização preferencial. A maioria dos casos de CCE eram moderadamente diferenciado e invasivo e dos seis casos em que haviam informações, quatro deles foram a óbito. A idade média dos pacientes era de 62,7 anos, todos eram fumantes e a maioria (60%) eram etilistas ou ex-etilistas. Procurando-se associar as alterações genéticas com o quadro clinicopatológico dos pacientes podemos observar que dos cinco casos de CCE do terço médio, em quatro (80%) ocorreu amplificação do gene *Ciclina D1*, enquanto nos do terço distal tal evento ocorreu em apenas dois dos quatro casos (50%). Quanto às aneuploidias dos cromossomos 7, 11 e 17, enquanto no terço médio observou-se trissomia/tetrassomia simultânea dos três cromossomos em 3/5 dos casos (60%), no terço distal tal alteração ocorreu em 2/4 dos casos (50%). Todavia, não parece haver associação entre a ocorrência múltipla de alterações genéticas e os casos que foram a óbito, pois dos quatro pacientes que faleceram, em três (CCE-1, CCE-6 e CCE-10) não observou-se alterações afetando

Tabela 16. Distribuição das anormalidades numéricas, deleção do gene *TP53* e amplificação do gene *Ciclina D1* em relação à diferenciação, região do esôfago, sexo, idade, tabagismo, etilismo, metástases e recidivas nos casos de carcinomas de células escamosas do esôfago (CCE).

Caso	Aneuploidias			Deleção <i>TP53</i>	Amplificação <i>Ciclina D1</i>	Diferenciação	Região do esôfago	Sexo/Idade	Fumante/Etilista	Outras informações
	7	11	17							
CCE-1	Tris	Tris	–	Del	Cluster	MDI	TD	M/64	Ex/Ex	Óbito
CCE-2	Tris/Tetras	–	Tris/Tetras	Del	Cluster	*	*	M/63	*	
CCE-3	Tris/Tetras	Tris/Tetras	Tris/Tetras	Del	Cluster	MDI	TD	M/55	S/S	
CCE-4	Tris/Tetras	Tris/Tetras	Tris/Tetras	Del	–	MDI	TD	M/65	Ex/Ex	
CCE-5	Tris/Tetras	Tris/Tetras	Tris/Tetras	Del	Cluster	MDI	TM	M/48	S/N	Metástase/ Óbito
CCE-6	–	–	Tris/Tetras	Del	Cluster	MDI	TM	M/58	S/Ex	Chagas ⁺ / Óbito
CCE-7	Tris/Tetras	Tris/Tetras	Tris/Tetras	Del	Cluster	MD	TM	M/58	S/S	Metástase/ Recidiva
CCE-8	Tris/Tetras	Tris/Tetras	Tris/Tetras	Del	–	MDI	TM	F/74	S/Ex	Chagas ⁺ / Recidiva
CCE-9	–	Tris/Tetras	Tris	Del	Cluster	PD	TM	M/63	S/N	
CCE-10	–	–	Tris	Del	–	*	TD	F/79	S/N	Óbito

Monos/Tris/Tetras= monossomia/trissomia/tetrassomia; MDI= moderadamente diferenciado e invasivo; MD= moderadamente diferenciado; PD= pobremente diferenciado; TD= terço distal; TM= terço médio; – = sem alteração; M= masculino; F= feminino; S= sim; N= não * = dado não disponível

conjuntamente os cromossomos analisados, e no caso CCE-10 não havia amplificação do gene *Ciclina D1*.

V. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, ocorreu um progresso considerável na identificação de alterações genéticas, cujo acúmulo está relacionado ao desenvolvimento do câncer. Tais alterações incluem mutações de ponto, deleções, translocações, perdas alélicas, amplificação e desregulação da expressão gênica (Montesano et al., 1997), afetando genes que controlam o ciclo celular.

A citogenética molecular, a partir da técnica de FISH, que utiliza vários tipos de sondas não-radioativas de DNA, é um método que permite a detecção de complementos cromossômicos numéricos em núcleos interfásicos e metafásicos em tecidos tumorais frescos ou emblocados em parafina. Embora essa técnica não evidencie mutações de ponto, ela pode identificar rapidamente anormalidades numéricas de cromossomos específicos, amplificações, deleções e rearranjos cromossômicos grandes, indicando a localização de oncogenes e genes supressores (Persons et al., 1998; Alavi et al., 1999).

A carcinogênese do esôfago é um processo progressivo multifásico que envolve a aquisição gradativa de uma série de alterações genéticas acompanhando, ou talvez responsável, pela seqüência de alterações histopatológicas no epitélio. Essa seqüência envolve a conversão do epitélio normal em esofagite, atrofia, hiperplasia de células basais, displasia média à severa, carcinoma *in situ* e, finalmente, carcinoma invasivo (Shi et al., 1999; Mandard et al., 2000).

No presente trabalho, foram investigadas algumas das alterações genéticas envolvidas com a carcinogênese esofágica, como aneuploidias dos cromossomos 7, 11 e 17, deleção do gene *TP53* e amplificação do oncogene *Ciclina D1*, utilizando a técnica de FISH. Esses parâmetros foram avaliados em amostras de tecido fresco de megaesôfago chagásico, um tipo de lesão que aumenta o risco de carcinoma de células escamosas do esôfago em 140 vezes mais do que a população sem essa

afecção (Brücher et al., 2001), assim como em amostras do próprio carcinoma.

Apesar do CCE do esôfago ser amplamente estudado geneticamente, são inexistentes estudos genéticos em megaesôfago chagásico, principalmente no Brasil e América Latina, em que essa afecção está diretamente associada com a doença de Chagas. O megaesôfago aparece em cerca de 3% das pessoas cronicamente infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* (Oliveira et al., 1998), sendo que no Brasil as maiores freqüências são relatadas nos estados de São Paulo, Goiás, Minas Gerais e Distrito Federal. Atualmente, no estado de São Paulo, a doença de Chagas é considerada erradicada, contudo um número significativo de indivíduos apresenta a doença crônica (Barbosa Franca & Xavier, 1996). A destruição neuronal provocada pelo *Trypanosoma cruzi* leva a alterações motoras que se instalam de forma progressiva, como falta de peristaltismo, ausência de abertura do esfíncter esofágico inferior, estase do conteúdo esofágico, hipertrofia da musculatura, progressiva atrofia muscular, dilatação progressiva, metaplasia epitelial e malignização (Oliveira et al., 1998).

No estudo ora realizado, foi possível estabelecer a ocorrência de aneuploidias dos cromossomos 7, 11 e 17 e deleção do gene *TP53* em mais da metade (56%) das amostras de megaesôfago chagásico, desde o grau I ao grau IV, com preponderância do terço médio, a região segundo a literatura, com maior ocorrência de carcinoma esofágico (Cotran et al., 1999). Essas alterações ainda não descritas na literatura em megaesôfago chagásico, devem ocorrer como eventos precoces, podendo conferir um risco maior de instabilidade cromossômica e progressão maligna. No entanto, nessas amostras não foi observada amplificação do oncogene *Ciclina D1*, apesar desse evento estar associado com os estádios iniciais da carcinogênese do esôfago (displasia moderada à severa, carcinoma *in situ*, carcinoma invasivo). Mas em duas amostras de megaesôfago, há indicações de ganho preferencial

desse gene. Portanto, o gene *Ciclina D1* não é indicado como um biomarcador útil para os pacientes com megaesôfago chagásico. Em carcinomas de células escamosas do esôfago, todas as amostras apresentaram aneuploidias dos cromossomos avaliados e deleção do gene *TP53* e, em 70% delas também observou-se amplificação elevada do gene *Ciclina D1*.

Em megaesôfago chagásico, as alterações genéticas mais freqüentes, considerando-se ambas as regiões média e distal foram deleção do gene *TP53* (9/39), trissomias 7 (5/39) e 17 (5/39), monossomias 7 (3/39) e 17 (3/39), e trissomia e monossomia 11 (1/39). No entanto, quando avalia-se separadamente os dois terços; no médio o cromossomo mais afetado é o 7, devido à monossomia e trissomia ocorrendo em três casos, cada uma delas, e no terço distal o cromossomo 17, com quatro casos apresentando trissomias e dois com monossomia 17, um deles apresentou simultaneamente monossomia/trissomia 17. O cromossomo 11 foi o menos afetado (2/39 amostras), tendo sido observada monossomia em um caso e trissomia em outro.

Nos carcinomas de células escamosas do esôfago a perda cromossômica parece não ser um evento comum, pois não ocorreu monossomia desses cromossomos em nenhuma das amostras avaliadas. Todavia, o ganho de cromossomos foi um evento freqüente, pois 90% dos casos apresentaram trissomia/tetrassomia 17 e 70% trissomia/tetrassomia dos cromossomos 7 e 11. Em metade das amostras foram observados ganhos dos três cromossomos simultaneamente, sugerindo a existência de uma heterogeneidade intratumoral.

O ganho do cromossomo 17 já foi identificado pelas técnicas de FISH e CGH em pacientes com carcinoma e adenocarcinoma esofágicos (Rao et al., 1993; Persons et al., 1998; Du-Plessis et al., 1999; Van Dekken et al., 1999). Com a técnica de CGH evidenciou-se o ganho do braço longo do cromossomo 17 em 47% dos casos de adenocarcinoma do esôfago, com uma região mínima de amplificação em 17q12-21, na

qual está localizado o gene *HER-2/neu*, sugerindo o envolvimento desse oncogene na patogênese esofágica (Moskaluk et al., 1998; van Dekken et al., 1999). Em linhagens celulares de carcinoma de células escamosas do esôfago utilizando a técnica de CGH Tada et al. (2000) identificaram o ganho do cromossomo 17, reforçando o papel importante de genes localizados nessa região com a proliferação celular. De modo contrário, também foi detectada a perda de 17p em carcinoma esofágico (Du Plessis et al., 1999). Nesse braço cromossômico, na região 17p13 encontra-se o gene supressor de tumor *TP53* (Montesano et al., 1996). Assim, as aneuploidias do cromossomo 17 parecem apresentar um papel importante na carcinogênese do esôfago (Persons et al., 1998), pois são encontradas também em lesões precursoras (van Dekken et al., 1999).

Aneuploidias do cromossomo 17 têm sido relatadas em vários tipos de neoplasias, como tumor de próstata (Brothman et al., 1994), carcinoma hepatocelular (Huang et al., 1999), tumor de bexiga (Bizari, 2000), do estômago (Takahashi et al., 2000) e câncer de mama (Wang et al., 2002).

No presente trabalho, o ganho do cromossomo 17 foi observado em 90% das amostras de CCE, e também foi o evento mais freqüente nas amostras de megaesôfago chagásico do terço distal (graus I, II e IV), uma região mais exposta aos efeitos nocivos do refluxo gástrico e esofagite crônica, como também mais freqüentemente acometida pelo adenocarcinoma esofágico (Cotran et al., 1999). A perda do cromossomo 17 foi observada em uma amostra do terço médio (MII-TM 9) e em duas do terço distal (MII-TD 7 e 9). Apenas o caso MI-TD 1 apresentou trissomia/tetrassomia 17, e um caso em particular, o MII-TD 9 apresentou monossomia e trissomia do cromossomo 17 que, segundo Di Vinci et al. (1999), suporta um modelo de aneuploidização e instabilidade cromossômica que pode ocorrer durante a progressão tumoral baseado na perda da simetria durante a segregação cromossômica.

A trissomia do cromossomo 7 é uma alteração já descrita pela técnica de FISH tanto em carcinomas de células escamosas quanto em

adenocarcinomas esofágicos (Rao et al., 1993; Persons et al., 1998). Com a técnica de CGH alguns autores têm observado o ganho desse cromossomo relacionado à patogênese dessas neoplasias (Du Plessis et al., 1998; Moskaluk et al., 1998), assim como da região 7p12, na qual está localizado o gene *EGF-R*, freqüentemente envolvido em neoplasias humanas (van Dekken et al., 1999). Tada et al. (2000) observaram ganho de 7q em 22% dos casos de CCE avaliados, reforçando a indicação de genes implicados no desenvolvimento e/ou progressão desse tipo de carcinoma, como o *HGF* (7q21.1) e o seu receptor *HGF-R* (7q31). As aneuploidias envolvendo o cromossomo 7 também têm sido detectadas em outros tipos de tumores, como de próstata (Jones et al., 1994; Barranco et al., 1998; Skacel et al., 2001), de bexiga (Bizari, 2000; Cianciulli et al., 2001), melanoma (Udart et al., 2001) e adenocarcinomas colorretal (Di Vinci et al., 1999) e gástrico (Okada et al., 2000). Enquanto em neoplasias gástricas as anormalidades do cromossomo 7 estão envolvidas nos estádios iniciais da transformação neoplásica, em carcinoma de próstata parecem desempenhar um papel importante na progressão tumoral (Skacel et al., 2001). No estudo de Jones et al. (1994), a trissomia 7 observada em apenas 16% dos casos de câncer de próstata foi relacionada como um evento tardio. Em carcinoma do esôfago, a aneuploidia do cromossomo 7 ocorre como um evento precoce durante a tumorigênese (Persons et al., 1998). Todavia, no presente trabalho, a maioria das amostras de CCE encontravam-se em estágio avançado, tanto que quatro dos pacientes já foram a óbito, durante o desenvolvimento desse estudo.

Algumas amostras dos terços médio (15,8%) e distal (10%) do megaesôfago apresentaram trissomia 7. Na região média, o ganho desse cromossomo ocorreu apenas nos megaesôfagos de graus III e IV, enquanto na região distal, ocorreu nos graus I e III. A perda do cromossomo 7 foi observada apenas nas amostras da região média, detectada nos graus I, II e III. Parece que há uma tendência ao ganho do

cromossomo 7 no terço médio em pacientes com megaesôfago chagásico e que a trissomia ocorre com maior frequência nos graus mais avançados. Assim, tal alteração pode ocorrer como um evento inicial afetando lesões benignas com pontencial pré-neoplásico.

A trissomia do cromossomo 11 consiste em outra alteração relacionada com a carcinogênese do esôfago (Rao et al., 1993; Persons et al., 1998). Sheyn et al. (1997) observaram tetrassomia do cromossomo 11 em 43% das amostras de carcinomas estudados, associada com amplificação do gene *Ciclina D1*. Tada et al. (2000) encontraram ganho envolvendo a região 11q13 em 44% dos casos de CCE do esôfago, assim como perdas de 11q22-qter em 19% deles, sendo essas alterações associadas com metástases. No presente estudo, a trissomia e a polissomia do cromossomo 11 também ocorreram em frequências elevadas nos casos de CCE avaliados (70%). No entanto, foi o evento menos freqüente nos megaesôfagos, tendo sido observada em apenas um caso do terço distal.

A região cromossômica 11q13 abriga um oncogene importante denominado *PRAD1/Ciclina D1*, o qual desempenha um papel crítico na regulação do ciclo celular. Quando esse gene torna-se alterado em uma célula, ocorrem anormalidades proliferativas que a predispõe para a transformação maligna. A duplicação do cromossomo 11 geralmente está associada com a amplificação do gene *Ciclina D1* (Sheyn et al., 1997).

De modo geral, torna-se evidente o acúmulo de alterações genéticas em vários cromossomos ocorrendo em carcinomas de células escamosas do esôfago corroborando os dados da literatura, e em menor frequência em megaesôfago chagásico, evidenciando pela primeira vez a ocorrência de aneuploidias nesse tipo de lesão. O megaesôfago chagásico pode ser considerado como uma condição pré-neoplásica, pois os pacientes afetados apresentam um risco aumentado de 3-8% de desenvolverem esse tipo de carcinoma (Brücher et al., 2001), em uma idade mais jovem, no período de 17 a 28 anos após o início da afecção

(Bektas et al., 2001). No entanto, no presente estudo não há informações de desenvolvimento neoplásico nos pacientes ora avaliados.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento da oncologia molecular tem fornecido informações sobre as anormalidades genéticas que ocorrem durante o processo carcinogênico em diferentes tipos de neoplasias, permitindo a associação entre tais alterações e as características clínicas dos pacientes (Shinozaki et al., 1996).

O carcinoma esofágico é uma doença altamente maligna com um prognóstico pobre. O conhecimento sobre os eventos genéticos envolvidos no desenvolvimento desse carcinoma ainda é ineficiente, mas há indicações de que a perda do controle do ciclo celular seja um fator importante (Morgan et al., 1999). A expressão alterada ou aumentada de proteínas codificadas por oncogenes modificam os caminhos normais de transdução de sinais (Arber et al., 1999). Assim, fatores genéticos como ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor, culminam no desenvolvimento do carcinoma de esôfago (Lu, 2000).

A função normal dos genes supressores de tumor é atuar no controle do crescimento e da diferenciação celular. Como as mutações desses genes atuam de forma recessiva, ambos os alelos de um gene particular devem ser inativados durante a tumorigênese. Enquanto o primeiro alelo pode ser inativado por qualquer tipo de mutação ou deleção, o segundo alelo muitas vezes é inativado por mecanismos cromossômicos, tais como perda cromossômica ou recombinação mitótica. Entre tais genes supressores de tumor, o gene *TP53* localizado na região 17p13 é um dos alvos mais freqüentes de alterações genéticas em câncer (Wagata et al., 1993; Hartig et al., 2000; Chino et al., 2001).

Muitas mutações no gene *TP53* resultam na proteína p53 mutante sem a atividade de supressão tumoral, mas com estabilidade aumentada (Wang et al., 1994; Safatle-Ribeiro et al., 2000). Alguns resultados indicam que o acúmulo da proteína p53 em consequência das mutações gênicas pode ser um evento precoce na carcinogênese esofágica,

sugerindo que desempenhe um papel crucial na homeostase da mucosa esofágica normal (Wang et al., 1994; Gaur et al., 1997). As mutações no gene também podem estar associadas com instabilidade no restante do genoma podendo gerar múltiplas alterações genéticas culminando no câncer (Wang et al., 1994).

As alterações de *TP53* são muito comuns em câncer esofágico, mas a relação entre mutação desse gene e o acúmulo da proteína nem sempre são concordantes, pois a proteína p53 pode ser inativada por outros mecanismos que não a mutação (Coggi et al., 1997). Frequentemente, um segundo evento leva à perda do alelo normal (perda de heterozigiosidade) no cromossomo 17, na célula tumoral afetada (Safatle-Ribeiro et al., 2000).

No trabalho ora realizado, foram avaliadas 10 amostras de carcinoma de células escamosas do esôfago e 18 de megaesôfago chagásico para verificar a ocorrência de deleção do gene *TP53* aplicando a técnica de FISH com a sonda de sequência única LSIP53 em conjunto com a sonda centromérica do cromossomo 17 (CEP17), a qual serve como um controle interno do gene.

Das 10 amostras de CCE avaliadas, todas apresentaram deleção de um ou ambos os genes. Dentre elas, cerca de 50% correspondiam a tumores localizados no terço médio e 50% no terço distal do esôfago. A maioria das amostras (90%) era tumores moderadamente diferenciados. Os casos CCE-5 e CCE-7 apresentaram metástases para linfonodos, enquanto os casos CCE-7, CCE-8 e CCE-10 tiveram recorrência após a ressecção cirúrgica, sendo que o caso CCE-10 foi a óbito, assim como os casos CCE-1, CCE-5 e CCE-6. Os casos CCE-6 e CCE-8 apresentaram sorologia positiva para Chagas, mas sem evidência de megaesôfago.

Esses resultados confirmam os dados da literatura no que se refere à ocorrência freqüente de alterações no gene *TP53* em pacientes com carcinoma de células escamosas do esôfago. Todavia, não foram obtidas informações de estudos que avaliaram a freqüência de deleção desse

gene em câncer de esôfago, pois os estudos são baseados na ocorrência de mutações de ponto e expressão elevada da proteína p53 (Coggi et al., 1997; Gaur et al., 1997; Lam et al., 1997; Seta et al., 1998; Chino et al., 2000; Ikeguchi et al., 2000; Kato et al., 2000; Chino et al., 2001; Hu et al., 2001; Putz et al., 2002). Portanto, o presente trabalho também tem uma contribuição evidenciando a participação da deleção do gene *TP53* como um evento comum na carcinogênese esofágica.

Em neoplasias gastrointestinais, Gomyo et al. (1996) observaram que 77% dos casos de carcinomas gástricos apresentavam deleção do gene *TP53*, sendo que algumas amostras continham trissomia do cromossomo 17 acompanhando a deleção. No presente estudo, todos os casos de carcinomas avaliados também apresentaram trissomia e/ou polissomia desse cromossomo. Segundo Gomyo et al. (1996), esses achados indicam que um dos cromossomos, materno ou paterno, foram parcialmente duplicados e a deleção ocorreu em um deles. Posteriormente, Takahashi et al. (2000) identificaram um desbalanço entre o número de cópias do gene *TP53* e do cromossomo 17 em núcleos interfásicos de carcinomas de estômago e cólon, ou seja, contagem de sinais do gene inferior a de sinais do centrômero, indicando que a perda de heterozigosidade do loco do *TP53* em 17p ocorre durante a carcinogênese desses cânceres.

As deleções do gene *TP53* pela técnica de FISH também foram descritas em outros tipos de neoplasias em estágio avançado, como carcinoma lingual (Hartig et al., 2000) e leucemia linfocítica crônica (Lazaridou et al., 2000), assim como relacionadas com progressão maligna e metástases em carcinoma de célula renal (Yoshioka & Nakamura, 2001) e meningioma (Yakut et al., 2002). Em câncer endometrial, a deleção desse gene consiste em uma alteração genética comum e está associada a tumores de grau baixo (Williams et al., 1999), enquanto em câncer colorretal ocorre como um evento precoce (Nanashima et al., 1997).

Por outro lado, as mutações do gene *TP53* têm sido extensivamente avaliadas em carcinomas esofágicos com taxas de 47% a 80% dos casos, afetando os exons 5-8 e envolvendo, principalmente, transversões G:C para T:A, com papel na predição da sobrevida dos pacientes (Coggi et al., 1997; Lam et al., 1997; Seta et al., 1998; Shi et al., 1999; Hu et al., 2001). A perda alélica do gene *TP53* e/ou perda de heterozigosidade em 17p também foram relatadas em 59% a 80% dos casos de CCE esofágico (Wagata et al., 1993; Hu et al., 2001).

Recentemente, foi observado um acúmulo maior de mutações no exon 8 do gene *TP53* e uma prevalência alta de transições em carcinomas de células escamosas de uma área de alto risco do sul do Brasil (Putz et al., 2002). Esse padrão diferente de mutações, de acordo com a base de dados IARC (Agência Internacional de Pesquisas sobre Câncer), está relacionado com o consumo de mate quente (chimarrão), além de álcool e fumo, que promove irritação hipertérmica crônica e inflamação no esôfago com a formação endógena de radicais ou fatores carcinogênicos que levam à uma prevalência aumentada de transições.

As mutações no gene *TP53* podem alterar a função fisiológica da proteína p53 e resultar na promoção da carcinogênese pela diminuição da interrupção do ciclo celular e desaceleração da apoptose (Seta et al., 1998).

A proteína p53 mutante tem uma vida média prolongada, acumulando-se no núcleo das células (Wagata et al., 1993). Este também parece ser um evento freqüente ocorrendo em pacientes com carcinomas esofágicos. Por técnicas imunoistoquímicas, vários autores observaram a ocorrência de acúmulo nuclear da proteína p53 em 33% a 79% dos casos de CCE do esôfago (Coggi et al., 1997; Gaur et al., 1997; Lam et al., 1997; Seta et al., 1998; Shi et al., 1999; Ikeguchi et al., 2000; Kato et al., 2000; Chino et al., 2001).

No estudo realizado por Seta et al. (1998), a imunorreatividade positiva para a proteína p53 estava associada com câncer esofágico de

baixo grau de diferenciação. Enquanto, no presente estudo, a deleção do gene *TP53* ocorreu em CCE com grau moderadamente diferenciado.

A análise imunoistoquímica em tecidos pré-cancerosos e carcinoma esofágico revelou um aumento progressivo da positividade da proteína p53 de 64% em hiperplasia de células basais para 70% em displasia e 88% em carcinoma *in situ*, sugerindo que o acúmulo dessa proteína está bem correlacionada com a progressão neoplásica (Wang et al., 1994; Tian et al., 1998).

O padrão e a frequência do acúmulo da proteína p53 nas lesões precursoras e tumores do esôfago são consistentes com a cancerização de campo (Tian et al., 1998). Tal fato pode ser justificado pela observação de 95% das displasias contíguas aos carcinomas positivos para a p53 também expressarem essa proteína (Yasuda et al., 2000).

A origem multifocal independente do acúmulo da p53 suportam a hipótese de que primariamente, as partes média e inferior do esôfago são expostas a agentes carcinogênicos que induzem mutações nessas regiões (Tian et al., 1998). No estudo ora realizado, os tumores ocorreram igualmente nas regiões média e distal do esôfago. Sabe-se que em CCE de esôfago, a exposição ao álcool e ao fumo parecem ser a fonte principal de mutações no gene *TP53* (Montesano et al., 1996). Nos pacientes estudados, 90% eram fumantes e 60% eram etilistas, portanto, ambas as regiões do esôfago sofreram a ação dos compostos carcinogênicos contidos no álcool e no tabaco, podendo intensificar o risco de alterações no gene *TP53*, pois a sua deleção foi observada em 100% das amostras.

O carcinoma esofágico também representa a complicação tardia mais séria da acalasia ou megaesôfago chagásico e pode surgir 17 a 28 anos depois do início da doença (Chino et al., 2000; Bektas et al., 2001). A partir do primeiro relato sobre a relação carcinoma-acalásia (Fagge, 1872 apud Chino et al., 2000), o risco elevado do desenvolvimento do tumor tem sido investigado em pacientes com acalásia de longa duração (Seliger et al., 1972). A incidência de carcinoma em pacientes com

acalásia varia de 3% a 8% (Pinotti *et al.*, 1996; Brücher *et al.*, 2001), sendo a irritação inflamatória crônica provocada pelo alimento retido no esôfago, o fator responsável pela indução da carcinogênese do epitélio esofágico escamoso. Assim, o carcinoma pode surgir a partir de uma série de alterações progressivamente displásicas da acalásia (Chino *et al.*, 2000).

As alterações no gene *TP53*, como referido, parecem ocorrer precocemente na tumorigênese esofágica, estando presente na seqüência displasia-carcinoma tanto do CCE quanto do adenocarcinoma esofágicos (Bennett *et al.*, 1992; Mandard *et al.*, 2000).

No estudo ora realizado, a investigação de deleção do gene *TP53* pela técnica de FISH em 8 amostras da região média e 10 da região distal de pacientes com megaesôfago chagásico de graus I a IV, evidenciou deleção em 5 (62,5%) do terço médio e em 4 (40%) do terço distal. As amostras afetadas compreendiam os graus I, II e IV. Tais achados, ainda não descritos na literatura em megaesôfago chagásico, são esperados, pois alterações nesse gene, como já descritas, ocorrem como um evento precoce na tumorigênese do esôfago (Bektas *et al.*, 2001).

Pela análise histopatológica dos casos estudados, todas as amostras de megaesôfago exibiam esofagite crônica causada pela estase alimentar atingindo as duas regiões do esôfago. Chino *et al.* (2000) revelaram que a estase de alimento no esôfago induz a esofagite hiperplásica crônica e, eventualmente, a transformação maligna das células epiteliais esofágicas associada com a seqüência displasia-carcinoma. Os pacientes com megaesôfago cujas amostras apresentaram deleção também relataram exposição ao álcool e ao fumo. Dessa forma, a inflamação da mucosa juntamente com a exposição aos agentes carcinogênicos do álcool e do cigarro pode conferir um risco maior de desenvolvimento do carcinoma de células escamosas nesses pacientes.

Nos pacientes com megaesôfago chagásico, a deleção do gene *TP53* parece ocorrer em uma idade mais avançada em homens (a partir dos 66 anos) em relação às mulheres (a partir dos 50 anos). A gastrite crônica foi um outro tipo de lesão, além da esofagite crônica, observada nesses pacientes com deleção gênica.

Safatle-Ribeiro et al. (2000) observaram que a inflamação da mucosa freqüentemente observada em pacientes com megaesôfago chagásico parecia estar associada com alterações na proteína p53.

Alterações nessa proteína têm sido observadas em 44% a 65% dos casos de acalásia associada ou não a doença de Chagas (Chino et al., 2000; Safatle-Ribeiro et al., 2000; Bektas et al., 2001; Lehman et al., 2001).

A super-expressão freqüente da p53 encontrada tanto em carcinoma associado com acalásia como em displasia sugere que a displasia seja uma lesão pré-maligna intermediária da carcinogênese do esôfago mediada pela acalásia (Chino et al., 2000). Da mesma forma, a positividade crescente da proteína p53 a partir do epitélio normal, para hiperplasia de célula basal associada à esofagite e para displasia em pacientes com acalásia indica que o acúmulo dessa proteína, possivelmente devido à mutação no gene *TP53*, seja também um evento precoce na carcinogênese da acalásia (Bektas et al., 2001).

No estudo de Safatle-Ribeiro et al. (2000) foi observada uma imunorreatividade difusa forte da proteína p53 em 2/4 dos tumores que ocorreram em pacientes com acalásia causada pela doença de Chagas (megaesôfago chagásico). Estes autores sugeriram que o acúmulo da proteína p53 e a mutação gênica podem ser um evento precoce também em carcinoma esofágico decorrente de pacientes com megaesôfago chagásico, e tais eventos podem surgir antes do aparecimento tumoral. O local de maior expressão da proteína p53 na mucosa inflamada é especialmente nas camadas basal e para-basal, as mesmas áreas que abrigam a proliferação aumentada.

Nos indivíduos com megaesôfago chagásico do presente estudo, não há indicações até o momento de desenvolvimento de carcinoma, mas a deleção do gene *TP53* observada em 50% dessas amostras pode estar ocorrendo como um evento inicial, e associadas com outras alterações genéticas, podem aumentar o risco de transformação neoplásica.

No presente trabalho, não foi possível estabelecer uma associação entre os dados clinicopatológicos dos pacientes com megaesôfago chagásico e as alterações genéticas observadas, pois alguns indivíduos com idades mais avançadas apresentaram apenas um tipo de alteração envolvendo um dos cromossomos 7, 11 e 17 ou deleção do gene *TP53* nem sempre correlacionando com os hábitos de tabagismo e/ou etilismo, mas apresentando outras informações importantes como a ocorrência de gastrite crônica e megacólon. Dos três pacientes que foram a óbito, dois eram não-fumantes e não-etilistas com apenas um tipo de alteração genética, enquanto o outro era ex-fumante e etilista com aneuploidias envolvendo ambos os cromossomos 7 e 17, e também com deleção do gene *TP53*.

Os dados da literatura sugerem que a taxa de alterações no gene *TP53* observada em disfunção proliferativa no epitélio de megaesôfago chagásico pode ser um biomarcador útil para a identificação de indivíduos com risco mais elevado para o desenvolvimento de tumores, e pode servir como um parâmetro intermediário importante em exames de quimioprevenção (Safatle-Ribeiro et al., 2000).

Outro mecanismo envolvido no processo carcinogênico é a ativação de oncogenes que pode ocorrer por vários processos, mas a amplificação gênica é um dos mais comuns. Isto leva à expressão aumentada do produto gênico a um nível inapropriado, contribuindo com a transformação neoplásica (Morgan et al., 1999).

O gene *Ciclina D1*, localizado na região cromossômica 11q13, é classificado como um oncogene, pois a sua produção de forma incorreta pode estimular a divisão celular desregulada (Stemmermann et al., 1994).

A amplificação desse oncogene tem sido relatada em 16% a 65% dos casos de carcinomas de células escamosas do esôfago (Mori et al., 1992; Gramlich et al., 1994; Adélaide et al., 1995; Shinozaki et al., 1996; Sheyn et al., 1997; Alavi et al., 1999; Morgan et al., 1999).

Geralmente, o gene *Ciclina D1* amplificado pode não estar presente na sua localização normal no cromossomo 11. Em muitos casos, o DNA amplificado aparece extracromossomicamente na forma de *double minutes* (Sheyn et al., 1997) ou intracromossomicamente como regiões homogeneamente coradas (HSR) (Alavi et al., 1999). Morgan et al. (1999) revelaram que, em alguns casos, a amplificação pode ser estimada também pela ocorrência de aneuploidia, com uma contagem aumentada do cromossomo 11. No presente trabalho, 7/10 amostras (70%) de CCE avaliadas apresentaram amplificação do gene *Ciclina D1* na forma de agrupamento de várias cópias do gene, denominado de *cluster*, provavelmente devido à HSR, o qual estava acompanhado principalmente de dois centrômeros do cromossomo 11, mas também em alguns casos de três ou quatro centrômeros. Alavi et al. (1999) verificaram que em tumores de cabeça e pescoço, a maioria dos núcleos com amplificação, também apresentavam dois sinais ou menos do centrômero 11, enquanto em outros dois casos, 75% continham três sinais e 25% polissomia do cromossomo.

As amostras CCE-4, CCE-8 e CCE-10 não apresentaram amplificação do gene *Ciclina D1*, mas mostraram ganho do cromossomo 11 (trissomia/tetrassomia). Sheyn et al. (1997) observaram que em 43% dos casos de carcinomas esofágicos a duplicação do cromossomo 11 estava geralmente associada com amplificação do gene *Ciclina D1*. No presente estudo, tal fato não foi observado nessas três amostras, pois os núcleos apresentando números iguais de sinais do gene e do centrômero (3:3 e 4:4) foram agrupados na razão 1,0, considerada balanceada e, portanto, não sendo indicativo de amplificação gênica. Alavi et al. (1999)

também observaram núcleos de tumores de cabeça e pescoço com números iguais de sinais do gene e do centrômero 11.

Quando procurou associar-se o nível de amplificação com estado clinicopatológico dos pacientes com CCE avaliados, não foi possível estabelecer qualquer tipo de associação, pois o número de indivíduos analisados era pequeno. A idade média dos pacientes com amplificação era de 58,4 anos, semelhante à média do grupo com CCE. Apenas dois dos sete casos amplificados (28,6%) tinham metástases (CCE-5 e CCE-7), um outro caso (CCE-7) apresentou recorrência após 8 meses do tumor primário e três foram a óbito (CCE-1, CCE-5 e CCE-6). Dos três casos sem amplificação, dois (CCE-8 e CCE-10) também apresentaram recorrência tumoral e um (CCE-10) foi a óbito. Os casos CCE-6 e CCE-8 apresentaram sorologia positiva para Chagas

A amplificação do gene *Ciclina D1*, em alguns casos, parece estar associada com uma frequência maior de metástases para linfonodos (Gramlich et al., 1994; Shinozaki et al., 1996; Alavi et al., 1999). No presente trabalho, a amplificação do gene *Ciclina D1* nem sempre estava associada com recorrência e metástases.

Sabe-se que a proteína ciclina D1 atua juntamente com as quinases dependentes de ciclina (CDKs) de forma a regular a fase de transição G1/S do ciclo celular (Shamma et al., 1998). Assim, um excesso de ciclina D1 na célula estimula a atividade da CDK4 aumentando a proliferação celular (Morgan et al., 1999). De acordo com os resultados obtidos nas amostras de CCE ora avaliadas, o controle do ciclo celular estava comprometido devido os efeitos da amplificação do gene *Ciclina D1* e deleção do gene *TP53*, assim como possivelmente pelo envolvimento de outros genes que participam da regulação da divisão celular, acarretando na agressividade do tumor, metástases e recidivas.

Alguns autores suportam a hipótese de que a amplificação da região 11q13 possa ser um fator prognóstico útil para pacientes com carcinoma esofágico (Mori et al., 1992; Gramlich et al., 1994; Nagasawa



et al., 2001). Parece que tal amplificação atua nos estágios iniciais do desenvolvimento do tumor (Tsuji et al., 1994).

No presente trabalho, não foi observada amplificação do gene *Ciclina D1* nas amostras de megaesôfago chagásico. Apenas verificou-se um ganho preferencial do gene em uma amostra da região média (MIV-TM 20) e em outra da região distal (MIV-TD 18), representado por 3 a 7 sinais do gene na presença de 1 ou 2 sinais do centrômero 11. Esse ganho foi observado no grau mais avançado de megaesôfago (grau IV) e, talvez, possa indicar um início do processo de amplificação podendo estar relacionada com a progressão da doença conferindo, portanto, um risco maior de desenvolvimento de carcinoma nesses indivíduos.

Em carcinomas de células escamosas do esôfago, a amplificação do gene *Ciclina D1* pode ser acompanhada pela expressão aumentada da proteína ciclina D1 (Shinozaki et al., 1996) ocorrendo em 18% a 71% dos casos (Takeuchi et al., 1997; Shamma et al., 1998; Ishikawa et al., 1998; Arber et al., 1999; Matsumoto et al., 1999; Morgan et al., 1999; Toyoda et al., 2000; Ikeguchi et al., 2001; Nagasawa et al., 2001; Nakajima et al., 2002).

Adélaide et al. (1995) observaram que nos tumores esofágicos com amplificação do gene *Ciclina D1*, a expressão da proteína estava sempre presente. No entanto, em alguns casos de CCE de esôfago, o gene *Ciclina D1* é super-expresso na ausência de amplificação gênica. Tais achados podem sugerir o envolvimento de outros mecanismos que não a amplificação do DNA, ou ainda um grande rearranjo do gene acarretando no aumento da expressão da proteína (Ishikawa et al., 1998).

A expressão aumentada da ciclina D1 também foi observada nos estágios iniciais do desenvolvimento do câncer esofágico, como displasias moderadas e severas, e carcinomas *in situ* (Shamma et al., 2000). Enquanto Toyoda et al. (2000) relacionaram a expressão elevada da ciclina D1 como um evento inicial na carcinogênese esofágica, Ikeguchi et

al. (2001) associaram-na com estágios mais avançados e com sobrevida reduzida.

Em carcinoma esofágico avançado, a super expressão da ciclina D1 parece estar relacionada com recorrência pós-operatória e metástases para linfonodos (Toyoda et al., 2000; Nagasawa et al., 2001). No presente trabalho, dois casos (CCE-5 e CCE-7) com amplificação do gene *Ciclina D1* apresentaram metástases e recorrência pós-operatória, que também foram observadas em dois casos sem amplificação (CCE-8 e CCE-10).

Nagasawa et al. (2001) observaram que a localização mais comum do câncer esofágico nos casos positivos para a proteína era o esôfago torácico: médio (56,3%), inferior (26,1%) e superior (13%). No presente estudo, dentre os 7 casos de CCE amplificados, 4 (57%) estavam localizados no terço médio do esôfago e 3 (43%) no terço distal. Portanto, não parece haver associação entre a localização do tumor e a amplificação.

Além da amplificação do gene *Ciclina D1* ser um evento comum em carcinomas de células escamosas do esôfago, ela também tem sido descrita em outros tipos de neoplasias, como câncer de mama (Tanner et al., 1998), CCE de língua (Fujii et al., 2001) e carcinomas de cabeça e pescoço (Jin et al., 2002).

Conforme os resultados obtidos fica evidente a ocorrência de alterações numéricas envolvendo os cromossomos 7, 11 e 17 afetando os graus I a IV das regiões média e distal de megaesôfago chagásico, assim como um ganho preferencial do gene *Ciclina D1* em amostras de grau IV e deleção do gene *TP53*, com uma frequência maior na região média do esôfago, consistente com a maior incidência de carcinomas de células escamosas nessa região. Esses achados citogenéticos, ainda não relatados em pacientes com esse tipo de afecção, indicam a ocorrência de alterações importantes que podem levar à progressão maligna do megaesôfago. Os dados também confirmaram a ocorrência freqüente de aneuploidias, amplificação e deleção gênicas em carcinomas de células

escamosas do esôfago. Portanto, a técnica de FISH atua como uma ferramenta útil na detecção dessas anormalidades citogenéticas, podendo trazer informações relevantes para o acompanhamento clínico e escolha de tratamentos específicos para os pacientes.

VI. CONCLUSÕES

- a. Os resultados demonstram a ocorrência de aneuploidias dos cromossomos 7, 11 e 17 e deleção do gene *TP53* em amostras de megaesôfago chagásico, até então não descritas na literatura;
- b. As monossomia/trissomia do cromossomo 7 foram as aneuploidias mais freqüentes no terço médio de megaesôfago chagásico, enquanto, no terço distal, ocorreram principalmente no cromossomo 17;
- c. A região do megaesôfago aparentemente mais afetada por aneuploidias e deleção do gene *TP53* foi a do terço médio, principalmente nos megaesôfagos mais avançados de graus III e IV, podendo estar relacionada com um risco aumentado de desenvolvimento de carcinoma de células escamosas, já que a maior incidência desse tipo de neoplasia ocorre nessa região;
- d. A ocorrência de um ganho preferencial do oncogene *Ciclina D1* em pacientes com megaesôfago chagásico avançado (grau IV) pode sugerir que a partir desse grau comecem a ocorrer alterações levando a uma instabilidade genética e desregulação do ciclo celular, culminando no desenvolvimento do carcinoma;
- e. Nos carcinomas de células escamosas do esôfago, as trissomias e/ou polissomias envolvendo os cromossomos 7, 11 e 17, deleção do gene *TP53*, assim como a amplificação do oncogene *Ciclina D1* foram observadas em freqüências elevadas, sendo concordantes com a literatura, evidenciando, portanto, instabilidade cromossômica e participação desses genes na carcinogênese esofágica.

VII. RESUMO

Os pacientes com megaesôfago chagásico apresentam um risco aumentado de 3 a 8% de desenvolverem carcinoma de células escamosas do esôfago (CCE). No presente trabalho, a técnica de FISH evidenciou aneuploidias envolvendo os cromossomos 7, 11 e 17 em 38,5% (15/39) das amostras de megaesôfago, principalmente monossomia/trissomia 7 (31,6%) nas amostras do terço médio e monossomia/trissomia 17 (25%) nas do terço distal. A deleção do gene *TP53* ocorreu mais freqüentemente nas amostras do terço médio (62,5%), ao contrário das do terço distal (40%). Em megaesôfago chagásico não houve amplificação do gene *Ciclina D1*, mas um ganho preferencial desse gene em duas amostras de grau IV (5%). Em CCE do esôfago, foi observada uma freqüência elevada de aneuploidias nas 10 amostras analisadas, principalmente trissomia e polissomia do cromossomo 17 (90%), seguidas pelas trissomias/polissomias dos cromossomos 7 (70%) e 11 (70%). Também ficou evidente, nessas amostras, a amplificação do gene *Ciclina D1*, em 70% dos casos, presente na forma de *cluster* (22-99%), assim como a deleção do gene *TP53* em 100% das amostras. Os resultados demonstraram que o terço médio dos megaesôfagos de graus elevados (III e IV) foi mais afetado por aneuploidias, enquanto os de graus I e IV apresentaram deleção do gene *TP53*, sugerindo um risco maior de desenvolvimento de CCE nessa região. Em CCE, a ocorrência de aneuploidias dos cromossomos 7, 11 e 17, e a amplificação do gene *Ciclina D1* evidencia instabilidade cromossômica e uma heterogeneidade intra-tumoral. A deleção do gene *TP53*, nessas amostras, parece ocorrer como um evento comum durante a carcinogênese esofágica.

Palavras-chave: megaesôfago chagásico; carcinoma do esôfago; aneuploidia; amplificação de *Ciclina D1*; deleção de *TP53*; Hibridização *in situ* Fluorescente.

VIII. ABSTRACT

Patients with chagasic megaesophagus are liable to an additional 3-8% possibility of developing esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). In the present study the FISH technique has shown aneuploidy involving chromosomes 7, 11, and 17 in 38.5% (15/39) of the megaesophagus samples, mainly monosomy/trisomy 7 (31.6%) in middle third samples and monosomy/trisomy 17 (25%) in the distal third ones. *TP53* gene deletion occurred most frequently in the middle third samples (62.5%), as opposed to the distal third samples (40%). There was no chagasic megaesophagus amplification of the *Cyclin D1* gene, but this gene obtained a preferential gain in two grade IV (5%) in all 10 samples. In SCC a higher frequency of the aneuploidy was observed in all 10 samples, mainly in chromosome 17 trisomy and polisomy (90%), followed by chromosomes 11 (70%) and 7 (70%) trisomies/polisomies. These samples also evidenced *Cyclin D1* gene amplification in 70% of the cases present in *cluster* form (22-99%), as well as *TP53* gene deletion in 100% of them. The results showed that megaesophagus middle third of higher grades (III and IV) was the most affected by aneuploidies, while grade I and IV showed *TP53* gene deletion. In SCC samples, the occurrence of chromosomes 7, 11, and 17 aneuploidies and *Cyclin D1* gene amplification indicates chromosomal instability and intratumoral heterogeneity. *TP53* gene deletion, in these samples, seems to occur as a common event during esophageal carcinogenesis.

KEY-WORDS: chagasic megaesophagus; esophagus carcinoma; aneuploidy; *Cyclin D1* amplification; *TP53* deletion; Fluorescence *in situ* Hybridization.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADÉLAIDE, J. et al. Oesophageal cancer and amplification of the human cyclin D1 gene *CCND1/PRAD1*. **Brit. J. Cancer**, v.71, p.64-68, 1995.

ALAVI, S. et al. Clinical application of Fluorescence in situ Hybridization for chromosome 11q13 analysis in head and neck cancer. **Laryngoscope**, v.109, p.874-879, 1999.

ANAYAMA, T. et al. Positive correlation between P27^{KIP1} expression and progression of human esophageal squamous cell carcinoma. **Int. J. Cancer**, v.79, p.439-443, 1998.

AGARWAL, S.K. et al. Immunohistochemical co-expression of human papillomavirus type 16/18 transforming (E6) oncoprotein and p53 tumour suppressor gene proteins in esophageal cancer. **Indian. J. Exp. Biol.**, v.36, p.559-563, 1998.

AOKI, T. et al. Allelotype study of esophageal carcinoma. **Genes Chrom. Cancer**, v.10, p.177-182, 1994.

ARBER, N. et al. Overexpression of cyclin D1 occurs in both squamous carcinomas and adenocarcinomas of the esophagus and in adenocarcinomas of the stomach. **Human Pathology**, v.30, n.9, p.1087-1092, sept. 1999.

BARBOSA FRANCA S.; XAVIER de ABREU, D.M. Hospital morbidity for Chagas disease in Brazil. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.29, p.109-115, 1996.

BARRANCO, M.A. et al. Numeric alterations in chromosome 7 and 8 detected by fluorescent in situ hybridization correlate with high-grade localized prostate câncer. **Eur. Urol.**, v.34, p.419-425, 1998.

BARROS, S.G.S. de et al. Mate (chimarrão) é consumido em alta temperatura por população sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago. **Arq Gastroenterol**, v.37, n.1, p.25-30, jun./mar. 2000.

BEKTAS, A. et al. Flow Cytometric DNA analysis and immunohistochemical p53, PCNA and histopathologic study in primary achalasia: preliminary results. **Hepatogastroenterology**, v.48, p.408-412, 2001.

BENNETT, W.P et al. p53 mutation and protein accumulation during multistage human esophageal carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.52, p.6092-6097, 1992.

BIZARI, L. **Detecção de aneuploidias pela técnica FISH em núcleos interfásicos de lesões da bexiga**. São José do Rio Preto. 2000. 93f.. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP de São José do Rio Preto.

BORIM, A.A. **Megaesôfago chagásico: fundamentação epidemiológica para orientação terapêutica**. Niterói-RJ. 1988. 132f.. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense.

BOSCH, F. et al. PRAD-1/Cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. **Blood**, v.84, p.2726-2730, 1994.

BROTHMAN, A.R. et al. Evaluation fo 20 archival prostate tumor specimens by Fluorescence in situ Hybridization (FISH). **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.75, p.40-44, 1994.

BRÜCHER, B.L.D.M. et al. Achalasia and esophageal cancer: incidence, prevalence and prognosis. **World J Surg**, v.25, p.745-749, 2001

CHINO, O. et al. Clinicopathological studies of esophageal carcinoma in achalasia: analysis of carcinogenesis using histological and immunohistochemical procedures. **Anticancer Res**, v.20, p.3717-3722, 2000.

CHINO, O. et al. Accumulation of p53 in esophageal squamous cell carcinoma. **Int J Mol Med**, v.8, p.359-363, 2001.



CIANCIULLI, A.M. et al. DNA aberrations in urinary bladder cancer detected by flow cytometry and FISH: prognostic implications. **Eur. J. Histochem.**, v.45, p.65-71, 2001.

COGGI, G. et al. p53 protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma. **Cancer**, v.79, p.425-432, 1997.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Pathologic basis of disease**. 6.ed. Philadelphia: WB Saunders Company. 1999. 1425p.

DE-VITA, V.T.JR.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer – Principles e Practice of Oncology**. New York: Lippincott-Raven, v.1, 7^a ed., Philadelphia, 1997. 1539p.

DI VINCI, A. et al. Intratumor heterogeneity of chromosome 1, 7, 17 and 18 aneusomies obtained by FISH and association with flow cytometry DNA index in human colorectal adenocarcinomas. **Cytometry**, v.35, p.369-375, 1999.

DU PLESSIS, L. et al. Mapping of novel regions of DNA gain and loss by Comparative Genomic Hybridization in esophageal carcinoma in the black and colored populations of South Africa. **Cancer Res.**, v.59, p.1877-1883, 1999.

EASTMOND, D. A. , SCHLER, M. , RUPA, D.S. Advantages and limitations of using fluorescence in situ hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells. **Mut. Res.**, v.348, p.153-162, 1995.

FUJII, M. et al. Cyclin D1 amplification correlates with early recurrence of squamous cell carcinoma of the tongue. **Cancer Lett.**, v.172, p.187-192, 2001.

GAUR, D. et al. High prevalence of p53 gene alterations and protein overexpression in human esophageal cancer: correlation with dietary risk factors India. **Clin. Cancer Res.**, v.3, p.2129-2136, 1997.

GOMYO, Y et al. Numerical aberration and point mutation of *p53* gene in human gastric intestinal metaplasia and well-differentiated adenocarcinoma: analysis by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) and PCR-SSCP. **Int. J. Cancer**, v.66, p.594-599, 1996.

GRAMLICH, T.L. et al. Differential polymerase chain reaction assay of Cyclin D1 gene amplification in esophageal carcinoma. **Diagn Mol Pathol**, v.3, p.255-259, 1994.

HARADA, H. et al. Lymph node metastasis is associated with allelic loss on chromosome 13q12-13 in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Research**, v.59, p.3724-3729, 1999.

HARTIG, G. et al. Fluorescent *in situ* Hybridization evaluation of *p53* gene deletions at tumor interface of lingual carcinoma. **Laryngoscope**, v.110, p.1474-1478, 2000.

HAUBRICH, W.S., SCHAFFNER, F., BERK, J.E. **Gastroenterology**. 5.ed. Philadelphia: WB Saunders Company, v.1. 1995. 881p.

HAUSEN, A.Z. et al. Retinoblastoma-protein (pRb) expression and prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Int J Cancer**, v.84, p.618-622, 1999.

HE, D. et al. Prevalence of HPV infection in esophageal squamous cell carcinoma in Chinese patients and its relationship to the *p53* gene mutation. **Int. J. Cancer**, v. 72, p.959-964, 1997.

HIRSCH, F.R. et al. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas. **Brit. J. Cancer**, v.86, p.1449-1456, 2002.

HU, N. et al. Allelic loss in esophageal squamous cell carcinoma patients with and without family history of upper gastrointestinal tract cancer. **Clin Cancer Res.**, v.5, p.3476-3482, 1999.

HU, N. et al. Frequent inactivation of the tp53 gene in esophageal squamous cell carcinoma from a high-risk population in China. **Clin Cancer Res.**, v.7, p.883-891, 2001.

HUANG, S.F.; HSU, H.H.; FLETCHER, J.A. Investigation of chromosomal aberrations in hepatocellular carcinoma by fluorescence in situ hybridization. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.111, p.21-27, 1999.

IGAKI, H. et al. Mutation frequency of the *p16/CDKN2* gene in primary cancers in the upper digestive tract. **Cancer Res**, v.55, p.3421-3423, 1995.

IKEDA, G. et al. Prognostic significance of biologic factors in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Cancer**, v.86, p.1396-1405, oct. 1999.

IKEGUCHI, M. et al. Detection of loss of heterozygosity at microsatellite loci in esophageal squamous cell carcinoma. **Oncology**, v.56, p.164-168, 1999.

IKEGUCHI, M. et al. Combined analysis of p53 and retinoblastoma protein expressions in esophageal cancer. **Ann Thorac Surg**, v.70, p.913-917, 2000.

IKEGUCHI, M. et al. Cyclin D1 expression and retinoblastoma gene protein (pRB) expression in esophageal squamous cell carcinoma. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.127, p.531-536, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER-INCA, 2002. Disponível em: <http://www.inca.org.br>. Acesso em 18 de maio de 2002.

ISHIKAWA, T. et al. Cyclin D1 overexpression related to retinoblastoma protein expression as a prognostic marker in human oesophageal squamous cell carcinoma. **Brit. J. Cancer**, v.77, n.1, p.92-97, 1998.

ISOLA, J. et al. Genetic alterations in *ERBB2*-amplified breast carcinomas. **Clin. Cancer Res.**, v.5, p.4140-4145, 1999.

ITAMI, A. et al. Prognostic value of p27^{Kip1} and Cyclin D1 expression in esophageal cancer. **Oncology**, v.57, p.311-317, 1999.

JIANG, W. et al. Altered expression of the cyclin D1 and retinoblastoma genes in human esophageal cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.90, p.9026-9030, 1993.

JIN, Y. et al. Cyclin D1 amplification in chromosomal band 11q13 is associated with overrepresentation of 3q21-q29 in head and neck carcinomas. **Int. J. Cancer**, v.98, p.475-479, 2002.

JONES, E. et al. Aneusomy of chromosomes 7 and 17 detected by FISH in prostate cancer and the effects of selection in vitro. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v.11, p.163-170, 1994.

KAMITANI, S. et al. Intratumoral regional variations in copy number of the chromosomal part revealed by microdissection and combined ploidy and in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.132, p.30-35, 2002.

KANDA, Y. et al. Analysis of gene amplification and overexpression in human esophageal-carcinoma cell lines. **Int. J. Cancer**, v.58, p.291-297, 1994.

KATO, H. et al. An immunohistochemical study of p16, pRb, p21 and p53 proteins in human esophageal cancers. **Anticancer Res.**, v.20, p.345-349, 2000.

LAM, K.Y. et al. Prevalence and predictive value of p53 mutation in patients with oesophageal squamous cell carcinomas: a prospective clinico-pathological study and survival analysis of 70 patients. **Int. J. Cancer**, v.74, p.212-219, 1997.

LAM, C.T. et al. Loss of heterozygosity on chromosome 11 in esophageal squamous cell carcinomas. **Cancer Lett**, v.178, p.75-81, 2002.

LAMB, P; CRAWFORD, L. Characterization of the human p53 gene. **Mol. Cell. Biol.**, v.6, p.1379-1385, 1986.

LAZARIODU, A. et al. Simultaneous detection of BCL-2 protein, trisomy 12, retinoblastoma and p53 monoallelic gene deletions in B-cell chronic lymphocytic leukemia by fluorescence in situ hybridization (FISH): relation to disease status. **Leuk. Lymphoma**, v.36, p.503-512, 2000.

LEHMAN, M.B. et al. Squamous mucosal alterations in esophagectomy specimens from patients with end-stage achalasia. **Am J Surg Pathol**, v.25, p.1413-1418, 2001.

LI, G. et al. Allelic loss on chromosome bands 13q11-q13 in esophageal squamous cell carcinoma. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v.31, p.390-397, 2001.

LIU, Q. et al. MTS-1 (CDKN2) tumor suppressor gene deletions are a frequent event in esophagus squamous cancer and pancreatic adenocarcinomas cell lines. **Onogene**, v.10, n.10, p.619-622, 1995.

LU, S.H. Alterations of oncogenes and tumor suppressor genes in esophageal cancer in China. **Mutation Res**, v.462, p.343-353, 2000.

MACLEOD, R.A.F. et al. Similar cytogenetic changes in esophageal squamous carcinoma cell lines. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.112, 1999. p.87. Abstracts.

MANDARD, A-M.; HAINUT, P.; HOLLSTEIN, M. Genetic steps in the development of squamous cell carcinoma of the esophagus. **Mutation Res.**, v.462, p.335-342, 2000.

MARK, H.F.L. et al. Fluorescence in situ Hybridization study of *HER-2/neu* oncogene amplification in prostate cancer. **J. Exp. Mol. Pathol.**, v.66, p.170-178, 1999.

MATSUMOTO, M. et al. Comparison of deregulated expression of cyclin D1 and cyclin E with that of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and CDK2

in human oesophageal squamous cell carcinoma. **British J Cancer**, v.80, p.256-261, 1999.

MATSUO, K. et al. Gene-environment interaction between an aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) polymorphism and alcohol consumption for the risk of esophageal cancer. **Carcinogenesis**, v.22, p.913-916, 2001.

MENKE-PLUYMERS, M.B.E. Cytogenetic analysis of Barrett's mucosa and adenocarcinoma of the distal esophagus and cardia. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.90, p.109-117, 1996.

MIZOBUCHI, S. et al. Association between p53 immunostaining and cigarette smoking in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Jpn. J. Clin. Oncol.**, v.30, p.423-428, 2000.

MONTESANO, R.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. **Int J Cancer**, v.69, p.225-253, 1996.

MONTESANO, R.; HAINAUT, P.; HALL, J. The use of biomarkers to study pathogenesis and mechanisms of cancer: oesophagus and skin cancer as models. **IARC Scientific Publications**, n.142, p.291-301, 1997.

MORGAN, R.J. et al. Amplification of *cyclin D1* and *MDM-2* in oesophageal carcinoma. **Eur. J. Surg. Oncol.**, v.25, p.364-367, 1999.

MORI, T. et al. Frequent loss heterozygosity in the region including BRCA1 on chromosome 17q in squamous cell carcinomas of the esophagus. **Cancer Res**, v.54, p.1638-1640, 1994.

MOSKALUK, C.A. et al. Comparative Genomic Hybridization of Esophageal and gastroesophageal adenocarcinomas shows consensus areas of DNA gain and loss. **Genes Chromosomes Cancer**, v.22, p.305-311, 1998.

MUZEAU, F. et al. Loss of heterozygosity on chromosome 9 and *p16* (*MST1*, *CDKN2*) gene mutations in esophageal cancers. **Int. J. Cancer**, v.72, p.27-30, 1997.

NAGASAWA, S. et al. Cyclin D1 overexpression as a prognostic factor in patients with esophageal carcinoma. **J Surg Oncol**, v.78, p.208-214, 2001.

NAKAGAWA, H. et al. Human cyclin D1 oncogene and esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer**, v.76, p.541-549, 1995.

NAKAJIMA, Y. et al. Evaluation of an indicator for lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma invading the submucosal layer. **Jpn. J. Cancer Res.**, v.93, p.305-312, 2002.

NANASHIMA, A. et al. Analysis of p53 gene deletions in colorectal cancers using Fluorescence in situ Hybridization. **Surg. Today**, v.27, p.999-1004, 1997.

OGASAWARA, S. et al. Frequent microsatellite alterations on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Res**, v.55, p.981-894, 1995.

OGASAWARA, S. et al. Common deleted region on the long arm of chromosome 5 in esophageal carcinoma. **Gastroenterol.**, v.110, p.52-57, 1996.

OKADA, K. et al. Sequential numerical changes of chromosomes 7 and 8 in diffuse-type stomach cancer cell lines: combined Comparative Genomic Hybridization, Fluorescence In Situ Hybridization and ploidy analyses. **Cancer Genet. Cytogenet.** V.118, p.99-107, 2000.

OLIVEIRA, R.B. de et al. Gastrointestinal manifestations of Chagas' Disease. **Am. J. Gastroenterol.**, v.93, p.884-889, 1998.



T1106/02

PAULETTI, G. et al. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence *in situ* hybridization. **Oncogene**, v.13, p.63-72, 1996.

PERALTA, et al. Distinct regions of frequent loss of heterozygosity of chromosome 5p and 5q in human esophageal cancer. **Int. J. Cancer**, v.78, p.600-605, 1998.

PERSONS, D.L. et al. Interphase cytogenetics of esophageal adenocarcinoma and precursor lesions. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.106, p.11-17, 1998.

PINOTTI, H.W. et al. Megaesôfago Chagásico. In: Coelho, J.C.U. **Aparelho Digestivo**. 2.ed. Rio de Janeiro: MDESI, 1996, v.1, p.61-67.

POLJAK, M.; CERAR, A; SEME, K. Human papillomavirus infection in esophageal carcinomas: a study of 121 lesions using multiple broad-spectrum polymerase chain reactions and literature review. **Hum. Pathol.**, v.29, p.266-271, 1998.

PUTZ, A. et al. TP53 mutation pattern of esophageal squamous cell carcinomas in a high risk area. **Int J Cancer**, v.98, p.99-105, 2002.

RAO, P.H. et al. Interphase cytogenetics of gastric and esophageal adenocarcinomas. **Diagn. Mol. Pathol.**, v.2, p.264-268, 1993.

ROSENBLUM-VOS, L.S. et al. Cytogenetic studies of primary cultures of esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.70, p.127-131, 1993.

RUBIN, E.; FARBER, J.L. **Patologia**. Interlivros, 1ª ed., 1990. p.562-570.

SAFATLE-RIBEIRO, A.V. et al. Integrated p53 histopathologic/genetic analysis of premalignant lesions of the esophagus. **Cancer Detect Prev.**, v.24, p.13-23, 2000.

SELIGER, G.; LEE, T.; SCHWARTS, S. Carcinoma of the proximal esophagus, a complication of long-standing achalasia. **Am. J. Gastroenterol.**, v.57, p.20-25, 1972.

SETA, T. et al. Expression of p53 and p21^{WAF1/CIP1} proteins in gastric and esophageal cancers: comparison with mutations of the p53 gene. **Dig Disc Sciences**, v.43, p.279-289, 1998.

SHAMMA, A. et al. Effect of cyclin D1 associated proteins on proliferation of esophageal squamous cell carcinoma. **Int J Oncol**, v.13, p.455-460, 1998.

SHAMMA, A. et al. Cyclin D1 overexpression in esophageal dysplasia: a possible biomarker for carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinoma. **Int J Oncol**, v.16, p.261-266, 2000.

SHEYN, I. et al. Amplification and expression of the cyclin D1 gene in anal and esophageal squamous cell carcinomas. **Hum. Pathol.**, v.28, p.270-276, 1997.

SHI, S. et al. Role of p53 gene mutations in human esophageal carcinogenesis: results from immunohistochemical and mutation analyses of carcinomas and nearby non-cancerous lesions. **Carcinogenesis**, v.20, p.591-597, 1999.

SHIBAGAKI, I. et al. Allelotype analysis of esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Res.**, v.54, p.2996-3000, 1994.

SHIMADA, Y.; IMAMURA, M. Prognostic factors for esophageal cancer - from the viewpoint of molecular biology. **Gan To Kagaku Ryoho**, v.23, p.972-981, 1996.

SHIMADA, Y. et al. Prognostic factors of esophageal squamous cell carcinoma from the perspective of molecular biology. **Br. J. Cancer**, v.80, p.1281-1288, 1999.

SHINOZAKI, H. et al. *Cyclin D1* amplification as new predictive classification for squamous cell carcinoma of the esophagus, adding gene information. **Clin. Cancer Res.**, v.2, p.1155-1161, 1996.

SKACEL, M. et al. Aneusomy of chromosomes 7, 8 and 17 and amplification of HER-2/neu and epidermal growth factor receptor in Gleasons score 7 prostate carcinoma: a differential fluorescent in situ hybridization study of Gleason pattern 3 and 4 using microarray. **Hum. Pathol.**, v.32, p.1392-1397, 2001.

STEMMERMANN, G. et al. The molecular biology of esophageal and gastric cancer and their precursors: oncogenes, tumor suppressor genes, and growth factors. **Hum. Pathol.**, v.25, p.968-981, 1994.

SUZUKI, H. et al. Gene amplification of *int-2* and *erbB2* in human esophageal cancer: relationship to clinicopathological variables. **Cancer Invest**, v.15, p.411-415, 1997.

TADA, K. et al. Gains of 8q23-qter and 20q and loss of 11q22-qter in esophageal squamous cell carcinoma associated with lymph node metastasis. **Cancer**, v.88, p.268-273, 2000a.

TADA, K. et al. Cytogenetic analysis of esophageal squamous cell carcinoma cell lines by comparative genomic hybridization: relationship of cytogenetic aberrations to in vitro cell growth. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.117, p.108-112, 2000b.

TAKAHASHI, Y. et al. Detection of aberrations of 17p and *p53* gene in gastrointestinal cancers by dual (two-color) Fluorescence in situ Hybridization and Genechip *p53* assay. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v.121, p.38-43, 2000.

TAKEUCHI, H. et al. Altered *p16/MST1/CDKN2* and *cyclin D1/PRAD-1* gene expression is associated with the prognosis of squamous cell carcinoma of the esophagus. **Clin Cancer Res.**, v.3, p.2229-2236, 1997.

TANNER, M.M. et al. Genetic aberrations in hypodiploid breast cancer: frequent loss of chromosome 4 and amplification of cyclin D1 gene. **Am. J. Pathol.**, v.153, p.191-199, 1998.

TARMIN, L. et al. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 9 in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus. **Cancer Res.**, v.54, p.6094-6096, 1994.

TIAN, D. et al. Multifocal accumulation of p53 protein in esophageal carcinoma: evidence for field cancerization. **Int J Cancer**, v.78, p.568-575, 1998.

TOYODA, H. et al. Cyclin D1 expression is useful as a prognostic indicator for advanced esophageal carcinomas, but not for superficial tumors. **Diagn. Dis. Sci.**, v.45, p.864-869, 2000.

TSUJI, T. et al. Numerical aberrations of chromosome 17 detected by FISH with DNA-specific probe in oral tumors. **Anticancer Res.**, v.14, p.1689-1693, 1994.

UDART, M. et al. Chromosomes 7 aneusomy. A marker for metastatic melanoma? Expression of the epidermal growth factor receptor gene chromosome 7 aneusomy in nevi, primary malignant melanomas and metastases. **Neoplasia**, v.3, p.245-254, 2001.

VAN DEKKEN, H. et al. Clonal analysis of a case multifocal oesophageal (Barrett's) adenocarcinoma by comparative genomic hybridization. **J. Pathol.**, v.188, p.263-266, 1999.

VIEIRA, S. **Introdução à Bioestatística**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Campus. 1985. 294p.

VIRMANI, A.K.; TONK, V.; GAZDARI, A. Comparison between fluorescence in situ hybridization and classical cytogenetics in human tumours. **Anticancer Res.**, v.18, p.1351-1356, 1998.



XIAO, F. et al. Molecular cytogenetic study on four human esophageal cancer cell lines. **Chang Hua I Hsueh I chuan Hsueh Tsa Chih**, v.15, p.75-77, 1998.

WAGATA, T. et al. Loss of 17p, mutation of the *p53* gene, and overexpression of *p53* protein in esophageal squamous cell carcinomas. **Cancer Res.**, v.53, p.846-850, 1993.

WANG, L.D. et al. Changes in *p53* and cyclin D1 protein levels and cell proliferation in different stages of human esophageal and gastric-cardia carcinogenesis. **Int. J. Cancer**, v.59, p.514-519, 1994.

WANG, S. et al. Aneusomy 17 in breast cancer: its role in HER-2/neu protein expression and implication for clinical assessment of HER-2/neu status. **Mod. Pathol.**, v.15, p.137-145, 2002.

WATANABE, M. et al. A significant morphological transformation is recognized in human esophageal cancer cells with an amplification/overexpression of the cyclin D1 gene. **Int. J. Oncol.**, v.15, p.1103-1108, 1999.

WILLIAMS, et al. Fluorescence *in situ* Hybridization analysis of *HER-2/neu*, *c-myc*, and *p53* in endometrial cancer. **Exp. Mol. Pathol.**, v.67, p.135-143, 1999.

WORLD CANCER RESEARCH FUND. **Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective**. Washington, DC: World Cancer Research Fund, 1997. p.118-129.

YAKUT, T. et al. Evaluation of relationship between chromosome 22 and *p53* gene alterations and the subtype of meningiomas by interphase-FISH technique. **Teratog. Carcinog. Mutagen**, v.22, p.217-225, 2002.

YASUDA, M. et al. *p53* expression in squamous dysplasia associated with carcinoma of the oesophagus: evidence for field carcinogenesis. **Brit. J. Cancer**, v.83, p.1033-1038, 2000.

YOSHIOKA, K.; NAKAMURA, S. Chromosome 9 and 17 aberrations and p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization in renal-cell carcinoma. **Mol. Urol.**, v.5, p.11-17, 2001.

ZHOU, X. et al. Genomic DNA and messenger RNA expression alterations of the *CDKN2B* and *CDKN2* genes in esophageal squamous carcinoma cell lines. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v.13, p.285-290, 1995.



ANEXO

I. IDENTIFICAÇÃO

Nome:.....Prontuário:.....
Data de Nascimento:...../...../.....Sexo: () F () M
Grupo étnico: () caucasóide () negróide () mongolóide
Endereço atual:.....Fone:
Cidade:.....Estado:.....
Procedência:.....
Profissão atual:.....Tempo de atuação:.....
Profissão anterior:.....Tempo de atuação:.....

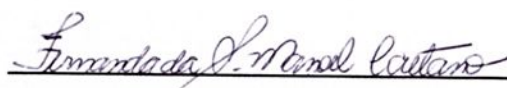
II. DADOS PESSOAIS E FAMILIAIS

- Consumo de bebida alcoólica: () Sim () Não
Há quantos anos:.....Tipo de bebida:.....
- Consumo de cigarro: () Sim () Não
Há quantos anos:.....Quantidade (unid./dia):.....
- Doenças anteriores do aparelho digestivo:
() esôfago () estômago (tipo:.....) () outras (tipo:.....)
- Tratamentos anteriores para Mega: () Sim () Não
Tipo:.....
- Cirurgias anteriores: () Sim () Não
Tipo:.....
- História de tumor de esôfago ou outras doenças na família (grau de parentesco):
() Sim () Não (tipo:.....)

Data:...../...../.....

Responsável pelo procedimento:.....

Autorizo a reprodução deste trabalho.
São José do Rio Preto, 23/08/2002.



Fernanda da Silva Manoel Caetano

