

Croider Franco Lacerda

**PERFIL MUTACIONAL DO GENE SUPRESSOR TUMORAL *TP53*
NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE ESÔFAGO
ASSOCIADO AO MEGAESÔFAGO CHAGÁSICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Oncologia

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Denise Peixoto Guimarães

Barretos, SP
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Hospital de Câncer de Barretos

Fundação Pio XII – Barretos – SP

L131p Lacerda, Croider Franco.

Perfil mutacional do gene supressor tumoral *TP53* no carcinoma decélulas escamosas de esôfago associado ao megaesôfagochamagásico. / Croider Franco Lacerda –

Barretos, 2013.

96 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2013.

Orientador: Dr Rui Manuel Vieira Reis

1. Neoplasia de esôfago. 2. Carcinoma de células escamosas do esôfago. 3. Gene *TP53*. 4. Megaesôfago chagásico. 5. Mutação *TP53*. I. Autor. II. Reis, Rui Manuel Vieira. III. Título.

CDD 616.994.3307

Croider Franco Lacerda

**PERFIL MUTACIONAL DO GENE SUPRESSOR TUMORAL *TP53*
NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE ESÔFAGO
ASSOCIADO AO MEGAESÔFAGO CHAGÁSICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Oncologia

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Denise Peixoto Guimarães

Barretos, SP
2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

Croider Franco Lacerda

Perfil mutacional do gene supressor tumoral *TP53* no carcinoma de células escamosas de esôfago associado ao megaesôfago chagásico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 27/03/2013

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Dirce Maria Carraro

Instituição: Fundação Antônio Prudente – Hospital do Câncer A. C. Camargo

Prof. Dr. Eduardo Crema

Instituição: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof.^a Dra. Edenir Inez Palmero

Instituição: Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos

Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Orientador

Prof. Dr. José Humberto T. G. Fregnani

Presidente da Banca Examinadora

“Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertação e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos”.

“Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e sua conclusão são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos”.

Dedico esta dissertação ao meu querido pai **Antônio Lacerda**, minha querida mãe **Chamês Maluf**, meus irmãos: (**Claurea - in memoriam**, **Francilslane** e **Francisberg**), minha amada esposa **Glaucia Bassini** e à meu filho **Davi**, pelo apoio e por entenderem minha ausência em muitos momentos.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis**, pela sabedoria e paciência com que me orientou, pelos ensinamentos e importância de realizar um bom trabalho com qualidade e ética, pelo incentivo aos momentos difíceis, os meus sinceros agradecimentos.

A minha co-orientadora, **Prof^a. Dra. Denise Peixoto Guimarães**, pelos ensinamentos, gentileza e questionamentos dos quais me faziam refletir; importantes para formatação da introdução, resultados e discussão; além do incentivo dado durante todo o projeto.

Ao meu amigo **Prof. Dr. Antônio Talvane Torres de Oliveira**, pelos ensinamentos de como cuidar dos pacientes com câncer e pelo incentivo para a realização deste trabalho.

A Biomédica **Adriana Cruvinel Carloni**, pelos ensinamentos práticos e por apresentar-me a um novo e fascinante mundo dentro do laboratório de biologia molecular, muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Paulo Prata** (*in memoriam*) e à **Dr^a. Scylla Duarte Prata** e ao **Sr. Henrique Duarte Prata** idealizadores do Hospital São Judas Tadeu da Fundação PIO XII de Barretos, sem os quais nada seria possível.

Aos **Prof. Dr. Edmundo Carvalho Mauad** (pró-reitor), **Prof. Dr. André Lopes Carvalho** (presidente da pós-graduação), **Prof. Dr. Adhemar Longatto Filho** (coordenador da pós-graduação), toda a minha admiração e respeito pela coragem de idealizar e manter um programa de pós-graduação em Barretos.

Aos meus amigos do Departamento de Cirurgia do Aparelho Digestivo Alto do Hospital de Câncer de Barretos/SP: **Dr. Durval Renato Wohnrath**, **Dr. Gilberto Fava**, **Dr Paulo Bertulucci**, **Marcela**, **Maria Helena**, **Anilza**, **Sônia**, **Maria Luzia** e **Mariana**, pela ajuda e incentivo durante a elaboração desta dissertação.

Ao **Hospital de Câncer de Barretos**, da **Fundação PIO XII**, e seus **colaboradores**, e ao **Laboratório de Biologia Molecular**, pela disponibilização para realização das análises mutacionais. Meus agradecimentos a **Prof^a. Dra Edenir Inêz Palmero** pelo acompanhamento deste projeto e sugestões.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM – Uberaba/MG, e ao **Prof. Dr. Eduardo Crema** e **Prof^a. Dra. Sheila Jorge Adad**, **Prof. Dr. Aléx Augusto Silva** e **Prof. Dr. Juverson Terra**, pelos ensinamentos e pela contribuição com a casuística de pacientes com megaesôfago chagásico para a realização deste estudo.

À Universidade Estadual Paulista – UNESP/SP, a **Prof^a. Dra. Maria Aparecida Marchesan Rodrigues** e **Prof^a. Dra. Maria Aparecida Coelho Arruda Henry**, pelo acolhimento, acompanhamento, incentivo, e pelas amostras de material biológico e pelo auxílio na coleta de dados nos prontuários médicos dos doentes envolvidos na pesquisa.

Ao Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos, em especial ao **Prof. Dr. Cristovam Scapulatempo Neto**, pela disponibilização de todo material necessário à pesquisa e pela revisão anatomopatológica de todas as lâminas, assim como aos funcionários deste departamento.

Ao Núcleo de Apoio ao Pesquisador (NAP) - **Aline, Rosana, Ana Maria, Silvia, Geisa, Cleyton**, os quais foram brilhantes com os resultados e estatística. Ao departamento de Fotografia (**Everton, Nathan e Anderson**), pela boa vontade sempre quando solicitados. Assim como toda equipe **da pós-graduação**, em especial **Silvana**, pela dedicação e competência em ajudar os alunos.

Ao Biólogo **Thiago Buosi Silva**, pelo apoio dado na realização do trabalho. Aos funcionários do **SAME**, pela seleção dos prontuários com eficiência e prontidão. Aos **funcionários da Biblioteca (Jacqueline e Tatiana)**, pelo bom humor e gentileza nas solicitações dos artigos científicos.

Aos **colegas da pós-graduação**, pelo incentivo constante e por partilharem do mesmo objetivo, em especial **Anderson e Letícia**.

A todos os **pacientes e familiares** que contribuíram com este estudo, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Lacerda CF. **Perfil mutacional do gene supressor tumoral *TP53* no carcinoma de células escamosas de esôfago associado ao megaesôfago chagásico**. Barretos: 2013. [Dissertação de Mestrado – Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII – SP]

INTRODUÇÃO: O câncer de esôfago (CE) está entre os 10 tipos de câncer mais incidentes no mundo e no Brasil. Em nosso país, o carcinoma de células escamosas (CCE) do esôfago é o tipo histopatológico mais frequente e está associado a dois fatores de risco principais, etilismo e tabagismo. Existem, no entanto, diversos outros agentes etiológicos, tais como ingestão de alimentos ou bebidas quentes, vírus e o megaesôfago chagásico (MEC). O MEC é uma manifestação benigna da doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, sendo caracterizada por uma estase alimentar com concomitante supercrescimento bacteriano e inflamação crônica. Estima-se que o MEC esteja associado a um aumento do risco de desenvolver o CCE de esôfago em 3,9% a 10%. Apesar do potencial risco de doença maligna esofágica associado ao MEC, a caracterização clínica destas populações está pouco esclarecida e são praticamente inexistentes estudos moleculares do CCE associado ao MEC (CCE/MEC). O gene supressor de tumor *TP53*, considerado o “guardião do genoma” humano, tem um papel central no CCE de esôfago, com elevada taxa de mutação, sendo estas alterações eventos precoces no processo de tumorigênese. **OBJETIVOS:** i) caracterizar clinicamente o CCE/MEC; ii) investigar a frequência e o impacto clínico-patológico de mutações em regiões *hotspots* do gene *TP53*; iii) e comparar o perfil clínico-patológico e mutacional aos de pacientes com CCE e MEC. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Estudo retrospectivo de 126 pacientes provenientes da região sudeste do Brasil divididos em 3 grupos: CCE (N=59), MEC (N=34) e CCE/MEC (N=33). As características demográficas e clínico-patológicas foram coletadas através da análise de prontuários. Em 100 pacientes a análise mutacional do *TP53* foi realizada pela técnica de PCR, seguida pelo sequenciamento direto dos éxons 5 a 8. O perfil mutacional foi posteriormente correlacionado com as características demográficas e clínico-patológicas dos pacientes. **RESULTADOS:** O grupo MEC apresentou uma menor frequência de história familiar de câncer, em comparação com os restantes grupos. Os principais fatores de risco associados ao CCE/MEC foram o tabagismo e etilismo. A frequência de mutação do *TP53* foi 38,7% no grupo CCE/MEC, 45% no grupo CCE e 10,3% no

grupo MEC. Mutações *missense* foram as mais comuns nos 3 grupos, no entanto, o éxon mutado e tipo mutação variou significativamente entre os grupos. **CONCLUSÃO:** Este trabalho sugere que o tabaco e álcool, são co-fatores importante na carcinogênese do CCE de esôfago associado com MEC. Descrevemos pela primeira vez a análise de mutações do gene *TP53* neste grupo de tumores, e a elevada frequência de mutações encontradas, sugere que o *TP53* desempenha um papel importante no seu processo de carcinogenese. A presença de mutações de *TP53* no grupo MEC, apesar de menos frequente, pode significar que a mutação de *TP53* ocorre já em lesões pre-malignas (esofagite) que na presença de outros fatores poderiam evoluir ao câncer.

ABSTRACT

Lacerda CF. **Mutational profile of *TP53* tumor suppressor gene in squamous cell carcinoma of the esophagus associated with chagasic megaesophagus.** Barretos: 2013. [Dissertation - Barretos Hospital Cancer - Foundation - Pius XII - SP]

BACKGROUND: Esophageal cancer (EC) is among the 10 most incident cancers worldwide and in Brazil. In our country, squamous cell carcinoma (SCC) of the esophagus is the most common pathological type and is associated with two major risk factors, alcohol and tobacco. There are, however, several other infectious agents, such as food or hot beverage, viruses and chagasic megaesophagus (CM). The CM is a benign manifestation of Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, being characterized by food stasis with concomitant bacterial overgrowth and chronic inflammation. It is estimated that the CM is associated with an increased risk of developing esophageal SCC from 3.9% to 10%. Despite the potential risk of esophageal malignancy associated with CM, the clinical characterization of these populations is unclear and molecular studies about SCC associated with CM (SCC/CM) are virtually nonexistent. The tumor suppressor gene *TP53*, considered the "guardian of the human genome", plays a central role in esophagus's SCC with high mutation rate, and these changes are early events in the process of tumorigenesis. **OBJECTIVES:** i) characterize clinically the SCC/CM; ii) investigate the frequency and clinicopathologic impact of mutations in *TP53* hotspots regions; and iii) compare the clinicopathologic mutations of patients with SCC and CM. **MATERIALS AND METHODS:** A retrospective study of 126 patients from southeastern Brazil divided into 3 groups: SCC (N = 59), CM (N = 34) and SCC/CM (N = 33). The demographic and clinicopathologic characteristics were collected through medical records analysis. The *TP53* mutational analysis was performed in 100 patients by polymerase chain reaction, followed by direct sequencing of exons 5-8. The mutational profile was then correlated with patients' demographic and clinicopathologic. **RESULTS:** The CM group exhibited a lower frequency of familiar cancer history, when compared with the other two groups. The main risk factors associated with the SCC/CM were smoking and alcohol consumption. The frequency of *TP53* mutation was 38.7% in group SCC/CM, 45% in the SCC group and 10.3% in the CM. Missense mutations were more common in the three groups,

however, the type and mutated exon mutation varied significantly among the groups.

CONCLUSION: This study suggests that tobacco and alcohol are important cofactors in esophageal SCC associated with MEC carcinogenesis. We describe first the time the analysis of *TP53* mutations in this group of tumors, and the high frequency of mutations found, suggest that *TP53* plays an important role in the process of carcinogenesis. The presence of *TP53* mutations in CM group, though less frequent, may mean that the *TP53* mutation occurs already in pre-malignant lesions (esophagitis) in the presence of other factors could evolve to cancer.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estimativa mundial de câncer de esôfago em 2008. As taxas de incidência foram padronizadas por 100.000 A) homens e B) mulheres (Fonte: ultima atualização *GLOBOCAN 2008*)¹..... 2
- Figura 2** - Casos representativos de CCE de esôfago deste estudo, corados pela hematoxilina e eosina. A) CCE bem diferenciado (grau I). B) CCE moderadamente diferenciado (grau II). C) CCE pouco diferenciado (grau III), (Figuras cedidas pelo Prof. Dr. Cristovam Scapulatempo Neto)..... 4
- Figura 3** – A) Seriografia de esôfago, com megaesôfago grau IV (dolico megaesôfago), presença de falha de enchimento (seta), característico de neoplasia (Figura cedida pelo Prof. Eduardo Crema). B) Tomografia computadorizada de tórax em perfil, demonstrando um megaesôfago, com resíduos alimentares na região inferior do esôfago, com uma massa tumoral (seta) no esôfago médio (foto arquivo dos autores). C) Peça cirúrgica de um paciente com CCE associado ao megaesôfago chagásico (seta) (Figura cedida pela Profa. Dra. Sheila Jorge Adad – UFTM/MG). 9
- Figura 4** - Estimativa mundial de populações infectadas por *Trypanosoma cruzi* (em marrom)^{97, 101, 102}. As rotas de migração (vermelho) da América Latina e estimativa do número total de pessoas infectadas em países não endêmicos (adaptada: Coura et al., 2010¹⁰³)..... 12
- Figura 5** – Fotomicrografias de casos de MEC. A) Plexo mientérico com ganglionite e ausência de neurônios. B) Camada muscular com miosite crônica. C) A imagem representa a muscular com fibrose intensa corada em azul pelo tricrômico de Masson (Adaptada: Adad et al., 1991¹¹³)..... 14
- Figura 6** – Etapas da fisiopatologia do megaesôfago chagásico^{30, 31, 74, 76, 77} 15
- Figura 7** - Imagens endoscópicas A) Aumento no diâmetro do lúmen esofágico com aparecimento de contrações irregulares (após insuflação de ar) em um paciente com MEC. B) Cárdia cêntrica (seta) e permanentemente cerrada com mucosa de coloração róseo-pálida. C) Cromoscopia com solução de lugol: após a absorção do lugol pelas células esofágicas, o iodo desta solução reage com o glicogênio intracelular corando o epitélio em tons de marrom. As áreas de displasia ou câncer, as quais são pobres em glicogênio, permanecem pouco coradas (iodo-claras) ou não coradas (iodo-negativas). Esta técnica visa detectar lesões imperceptíveis ao exame endoscópico convencional (Figuras cedidas pela Profa. Dra. Denise Peixoto Guimarães – HCB - SP)..... 16
- Figura 8** – Classificação radiológica do megaesôfago proposta por Resende et al., (1960)¹²³ (Figuras cedidas pelo Prof. Dr. Eduardo Crema – UFTM/MG)..... 17
- Figura 9** - Sequência temporal de alterações genéticas no CE. A sucessão de fases histopatológicas a partir de epitélio normal até o desenvolvimento de CCE de esôfago

(parte superior da figura) ou ADC de esôfago (parte inferior da figura). As alterações associadas com estas fases estão descritas nos retângulos (Adaptado: Zhi-Qiang Ling et al., 2011⁶)..... 20

Figura 10 - O gene *TP53* está localizado no cromossomo 17 (braço curto, 17p13), uma região que é frequentemente deletada em tumores (Figura cedida pela Profa. Dra. Marjori Leiva Camparoto – HCB/SP). 22

Figura 11 - Proteína humana p53. Ela pode ser dividida em cinco domínios, cada um deles correspondem a funções específicas (www.p53.fr). 23

Figura 12 – Sinais ativadores de p53 e seus efeitos. As vias convergem para o complexo p53-MDM2 (“Unidade molecular central”). As setas indicam indução da atividade ou da transcrição das proteínas envolvidas na via da p53, enquanto as barras indicam inibição (adaptada: Guimarães et al., 2002)¹³⁹ 25

Figura 13 – Exemplos de mutações gênicas. A primeira base do segundo códon está mudada por uma substituição, deleção ou inserção¹⁷⁸. 26

Figura 14 - Distribuição de mutações nos códons *hotspots* e *cold spots*. Acima, demonstrando a distribuição de mutações *missense*, ao longo da sequência de 393 aminoácidos da proteína p53 e os seis códons *hotspots* (175, 245, 248, 249, 273 e 282) mais frequentemente mutados no gene *TP53*. Abaixo na figura, está sendo demonstrado as duas regiões de menor frequência de mutação, conhecidas como *cold spots* (códon 113 a 123 e 326 a 355) (Adaptada: Soussi et al., 2011)¹⁴⁶ 27

Figura 15 - Espectro de mutações do gene *TP53* no câncer humano¹⁸² 28

Figura 16 - Padrão de mutação no gene *TP53* no CCE de esôfago (IARC - R15, 2010)¹⁸². 29

Figura 17 – Efeito de mutação no gene *TP53* no CCE de esôfago (IARC - R15, 2010)¹⁸². 29

Figura 18 - Frequência de mutações em *TP53* no CCE de esôfago, com códons afetados (IARC - R15, 2010)¹⁸² 30

Figura 19 – Mecanismo evolutivo conhecidos da carcinogênese do CCE de esôfago de pacientes com MEC, mostrando a sequencia de eventos relacionados com a inflamação e supercrescimento bacteriano. 31

Figura 20 – A) Mapa do território Brasileiro, apresentando todos os pacientes do estudo e localização de sua naturalidade. B) Representa o endereço atual dos pacientes, no momento do diagnóstico, com as rotas migratórias (setas) para o Sudeste (SP e MG), Norte (Rondônia), Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul). A Região Sudeste (Norte, Noroeste e Sudoeste do Estado de SP e Triângulo Mineiro, MG) está demarcada de vermelho, local de maior concentração de pacientes deste estudo..... 44

- Figura 21** – Curva de Kaplan-Meier para avaliação da probabilidade estimada de sobrevida global, em relação ao tempo de seguimento em doentes com CCE, MEC e CCE/MEC (a partir do diagnóstico do megaesôfago). 50
- Figura 22** – Curva de Kaplan-Meier para avaliação da probabilidade estimada de sobrevida global, em relação ao tempo de seguimento em doentes com CCE e CCE/MEC (a partir do diagnóstico do tumor e não do megaesôfago). 50
- Figura 23** - Modelo esquemático dos eletroferogramas resultantes do sequenciamento direto do gene *TP53*. A) sequência *Wild-type* (selvagem); B) sequência mutada - códon 179 do gene *TP53*, CAT (His – histidina) para TAT (Tyr – tirosina)..... 51
- Figura 24** - Curva de sobrevida associada ao perfil de mutação do gene *TP53* nos 3 grupos de estudo. Em A – grupo CCE de esôfago, B – grupo MEC e C – grupo de CCE associado ao megaesôfago. Azul representa os casos *wild-type* e vermelho, os mutantes..... 55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Principais fatores etiológicos associados ao CE.....	6
TABELA 2 – Alguns exemplos de proto-oncogenes, função e seus mecanismos de ativação.....	18
TABELA 3 – Alguns exemplos de genes supressores de tumor, função e seus mecanismos de inativação.	19
TABELA 4 – Número de pacientes e seus respectivos hospitais de origem dos 3 grupos incluídos no estudo.....	38
TABELA 5 - <i>Primers</i> utilizados e condições de reação de PCR para amplificação dos éxons 5, 6, 7 e 8 do gene <i>TP53</i> ²⁰⁸	40
TABELA 6 – Características gerais entre os pacientes do estudo	43
TABELA 7 – Associação entre os fatores de risco e os diferentes grupos.....	45
TABELA 8 – Associação entre as co-morbidades e os diferentes grupos	45
TABELA 9 – Associação entre os sintomas e os diferentes grupos	46
TABELA 10 – Associação entre o <i>Performance status</i> e os grupos de pacientes.....	46
TABELA 11 – Associação entre o estadiamento (TNM) e os grupos de pacientes	47
TABELA 12 – Associação entre as características do tumor e os grupos CCE e CCE/MEC	47
TABELA 13 – Associação entre as características patológicas e os 3 grupos de pacientes	48
TABELA 14 – Associação entre as modalidades de tratamento e <i>status</i> clínico atual e os grupos de pacientes	49
TABELA 15 – Perfil de mutação do gene <i>TP53</i> nos 3 grupos de pacientes.....	52
TABELA 16 – Frequência de mutações não-silenciosas do gene <i>TP53</i> nos pacientes do estudo	53
TABELA 17 – Distribuição das mutações do gene <i>TP53</i> nos éxons 5, 6, 7 e 8	53
TABELA 18 – Natureza das mutações do gene <i>TP53</i> nos 3 grupos de pacientes	54

TABELA 19 – Frequência do tipo de mutação do gene *TP53* 54

TABELA 20 – Associação do perfil de mutações do gene *TP53* com características clínico-patológicas 56

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ADC	Adenocarcinoma
ARF	<i>Alternative reading frame</i>
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i> (quinase tradutora)
CCE	Carcinoma de células escamosas
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
CDKN2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
CDKs	<i>Cyclin-dependent kinases</i>
CE	Câncer de esôfago
Chk1 e Chk2	<i>Checkpoint kinases</i>
CpG	<i>Cytosine phospho guanine</i> (Dinucleotídeo 5'-CpG-3')
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTPs	<i>Deoxyribonucleotide triphosphates</i> (Desoxirribonucleotídeos fosfatados)
EEl	Esfíncter esofágico inferior
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
Erb-b2	Oncoproteína membro da família do receptor do fator de crescimento
FHIT	<i>Gene FHIT (fragile histidine triad)</i>
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i> (Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência)
HCB-SP	Hospital de Câncer de Barretos - São Paulo
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
HPV	<i>Human papillomavirus</i> (Vírus do papiloma humano)
IARC	<i>International agency for research on cancer</i>
IMC	Índice de massa corpórea
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MDM-2	<i>Murine double minute 2</i>
MEC	Megaesôfago chagásico
MSI	<i>Microsatellite instability</i> (Instabilidade de microssatélites)
NCCN	<i>National comprehensive cancer network</i>
p21	Gene que codifica a proteína p21
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
Rb	Proteína do gene do Retinoblastoma
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SAME	Serviço de Arquivos Médicos e Estatística
TEG	Transição esôfago-gástrica
TGF-α	<i>Transforming growth factor beta</i> (Fator de crescimento tumoral- α)
TNM	Sistema de classificação de tumores de acordo com características de tumor, linfonodo e metástase
TP53	<i>Tumor protein 53</i> (Gene supressor de tumor que codifica a proteína p53).
UFTM/MG	Universidade Federal do Triângulo Mineiro / Minas Gerais

UICC *Union for International Cancer Control*
UNESP/SP *Universidade Estadual Paulista / São Paulo*
VEGF *Vascular endothelial growth factor*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 CÂNCER DE ESÔFAGO	2
1.2 DOENÇA DE CHAGAS.....	11
1.3 MECANISMOS MOLECULARES DA CARCINOGENESE DE CE	17
1.4 GENE SUPRESSOR TUMORAL <i>TP53</i>	21
1.5 MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS E MOLECULARES DA CARCINOGENESE DE CCE DE ESÔFAGO ASSOCIADO AO MEC.....	30
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 DESENHO DO ESTUDO	36
3.2 MÉTODOS.....	38
3.2.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA	38
4 RESULTADOS	43
4.1 CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E CLÍNICO-PATOLÓGICA.....	43
4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	51
5 DISCUSSÃO	58
5.1 ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E CLÍNICO PATOLÓGICO.....	58
5.2 CARACTERIZAÇÃO MUTACIONAL DO GENE <i>TP53</i>	63
6 CONCLUSÃO	66
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
8 ANEXO.....	89

INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Câncer de esôfago

1.1.1 Epidemiologia

O câncer de esôfago (CE) é a 8ª causa mais comum de câncer no mundo, sendo o 6º entre os homens e 8º entre as mulheres (Figura 1)^{1,2}.

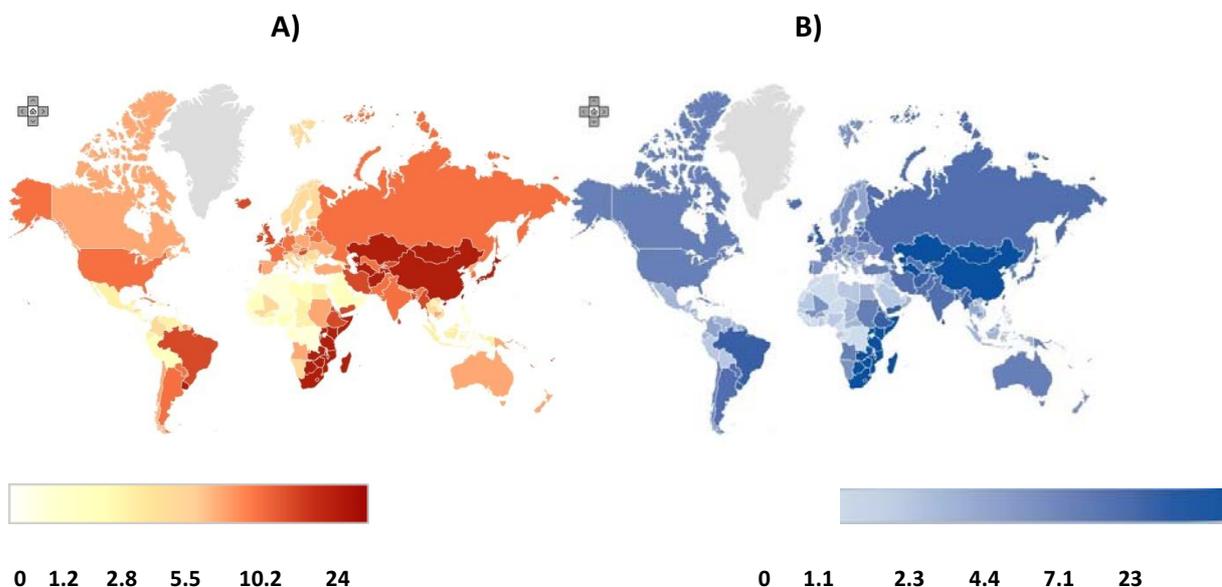


Figura 1 - Estimativa mundial de câncer de esôfago em 2008. As taxas de incidência foram padronizadas por 100.000 A) homens e B) mulheres (Fonte: última atualização *GLOBOCAN 2008*)¹.

Segundo a última revisão do *International Agency for Research on Cancer* (IARC), a incidência global de CE aumentou em 50% nas duas últimas décadas, de 316 mil em 1990 para 481 mil em 2008, provocando 406 mil mortes no mundo¹⁻³. No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para 2012, o CE aparece como a 10ª causa mais comum (6º entre os homens e 9º entre as mulheres), com estimativa de 10 mil novos casos para o ano de 2012⁴. O CE acomete 80% dos pacientes, em especial indivíduos com idade superior a 50 anos de idade com um pico de incidência aos 65 anos⁵⁻⁷. A

incidência do CE possui uma grande variação geográfica, associada ao subtipo histológico e fatores de risco (Figura 1)^{8, 9}. O carcinoma de células escamosas (CCE) de esôfago, cujos principais fatores etiológicos são o consumo de álcool e tabaco, tem aumentado em alguns países asiáticos, como Taiwan, já em outras regiões economicamente desenvolvidas, tem-se observado uma diminuição¹⁰. Nos países ocidentais, o adenocarcinoma (ADC) de esôfago representa hoje o subtipo histológico mais frequente. O aumento significativo da incidência do ADC registrado nas últimas décadas em países como EUA (aumento de 400%) e Oeste Europeu, está associado ao aumento da obesidade².

1.1.2 Patologia

Os tumores malignos esofágicos são na sua grande maioria de origem epitelial. Dentre estes, o CCE representa aproximadamente 95% dos casos, seguido do ADC^{4, 7}. Além destes dois subtipos, podemos citar outras variantes de origem epitelial menos frequentes, tais como, o carcinoma verrucoso, carcinoma epidermóide basalóide, carcinoma de células fusiformes, carcinoma adenoescamoso e carcinoma mucoepidermóide¹¹. Dentre as neoplasias não epiteliais, os tumores gastrointestinais estromais (GIST), sarcomas (leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, sarcoma de Kaposi, fibrossarcoma, mixossarcoma e linfossarcoma) e melanoma maligno, também acometem o esôfago¹².

O CCE surge do epitélio escamoso de revestimento esofágico. Os aspectos histológicos do CCE são muito variáveis. Alguns são bem diferenciados com típicos epidermóides de queratinização, formação de pérolas e pontes intracelulares (Figura 2). Outros, são mal diferenciados, de classificação difícil ou impossível^{13, 14}. O ADC é uma neoplasia epitelial com diferenciação de células glandulares decorrente de epitélio colunar metaplásico intestinal especializado (também chamado de esôfago de Barrett), que se forma na região distal do esôfago ou na transição esôfago-gástrica (TEG). Estes tumores produzem mucina e formam glândulas semelhantes ao tipo intestinal, e menos frequentemente são compostos de células infiltrativas difusas (em “anel de sinete”)¹⁵.

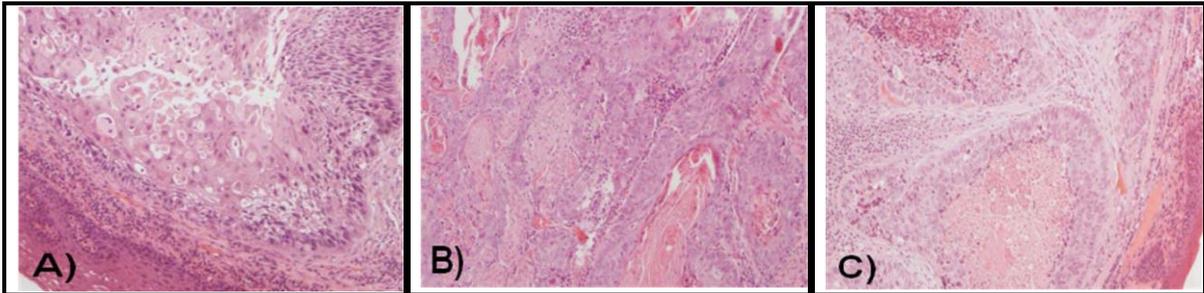


Figura 2 - Casos representativos de CCE de esôfago deste estudo, corados pela hematoxilina e eosina. A) CCE bem diferenciado (grau I). B) CCE moderadamente diferenciado (grau II). C) CCE pouco diferenciado (grau III), (Figuras cedidas pelo Prof. Dr. Cristovam Scapulatempo Neto).

A lesão inicia-se com espessamento da parede do esôfago, como lesão *in situ* ou neoplasia intraepiteial (displasia escamosa) e progride para massa tumoral polipóide ou exofítica que se projeta para o lúmen do esôfago, podendo infiltrar a parede esofágica, sendo a sua localização mais comum no terço médio do esôfago^{1, 16}. A disseminação do carcinoma de esôfago pode ocorrer por contiguidade, por via linfática, hematogênica ou ainda intramural. A rede linfática, do CCE de esôfago, presente na submucosa é rica, promovendo a disseminação circunferencial e longitudinal, mesmo para regiões distantes do tumor principal. Os locais de metástases dependem muito da localização do tumor¹⁷. Tumores no terço proximal favorecem a disseminação para os linfonodos cervicais, aqueles no terço médio disseminam para os linfonodos mediastinais, paratraqueais e traqueobronquiais, e os tumores de terço inferior (distal) se espalham nos linfonodos paraesofágicos, gástricos, celíaco e do hilo esplênico¹⁸. O aparecimento de linfonodos endurecidos, palpáveis na fossa supraclavicular (nódulo de Troisier-Virchow) e na axila (nódulo de Ireland), geralmente significa doença metastática⁵. A disseminação hematogênica ocorre nas fases mais tardias da doença e os principais locais são fígado e pulmão, contudo, qualquer outro órgão ou tecido pode ser acometido por ela¹⁹.

1.1.3 Fatores de risco para o CE

Os dois subtipos histológicos mais comuns do CE (CCE e ADC) possuem etiologias e epidemiologias distintas e definidas²⁰. Enquanto o CCE está relacionado à populações de

países em desenvolvimento e hábitos sociais como tabagismo, etilismo e distúrbios nutricionais, os ADCs estão relacionados com populações de países desenvolvidos, hábitos alimentares e obesidade⁶.

1.1.3.1 Fatores de risco para o ADC de esôfago

O risco aumentado de adenocarcinoma nas últimas décadas, principalmente nos países ocidentais entre os homens brancos, é atribuído a uma combinação de fatores, incluindo a dieta pobre em vegetais e rica em carne vermelha e industrializada, em íntima associação com a obesidade. A obesidade, com índice de massa corpórea (IMC) maior que 30, aumenta em 40 vezes o risco de desenvolver o ADC do esôfago²¹. Este risco está associado ao aumento da incidência de hérnia de hiato (7% da população), podendo levar ao refluxo gastroesofágico e ao esôfago de Barrett. Esta lesão pré-maligna aumenta o risco em 100 vezes de desenvolver o ADC de esôfago, enquanto os pacientes com apenas refluxo tem um risco aumentado de 3,1 vezes em comparação com a população geral^{6, 22, 23}. Além disso, estudos comprovam que o alcoolismo não é fator de risco para o surgimento do esôfago de Barrett ou para o desenvolvimento do ADC do esôfago²⁴. Com isso, é amplamente aceito que o ADC se desenvolve ao longo de uma sequência de alterações genéticas e fenotípicas, chamada de sequência da metaplasia-displasia-neoplasia²⁵. Além destes, outros fatores de risco podem estar relacionados com o ADC de esôfago (Tabela 1)^{10, 17, 24, 26-28}.

1.1.3.2 Fatores de risco para o CCE de esôfago

Evidências epidemiológicas apontam o tabaco e o álcool, como principais fatores de risco²⁹⁻³¹. Regiões do mundo em que o CCE de esôfago é mais incidente, verifica-se relação direta com os hábitos comportamentais e alimentares agressivos ao esôfago. Além destes,

outros fatores podem estar relacionados com o desenvolvimento do CCE quando comparadas com a população geral (Tabela 1)^{10, 26, 32-37}.

O tabagismo é o principal fator de risco associado ao desenvolvimento de CCE de esôfago entre homens e mulheres, aumentando o risco em cerca de 20 vezes³⁸. Os dados epidemiológicos sugerem que o consumo moderado de tabaco durante um longo período de tempo tem um efeito mais nocivo que o seu alto consumo durante um curto período de tempo, existindo assim uma relação direta entre a quantidade de cigarros e o desenvolvimento do CCE de esôfago^{39, 40}.

TABELA 1 – Principais fatores etiológicos associados ao CE.

Fatores de risco	ADC	CCE
Comportamentais:		
Tabaco ⁴¹	+	+
Álcool ³⁶	-	+
Consumo frequente de bebidas muito quentes ⁴²	-	+
Alimentares:		
Nitrosaminas – defumados / conservas ²⁰	-	+
Água potável contaminada com nitrogenados ³⁷	-	+
Alimentos contaminados com fungos ³³	-	+
Sócio-econômico:		
Má-nutrição ³⁶	-	+
Pobreza ¹⁷	-	+
Doenças associadas:		
Megaesôfago ³¹	-	+
Esôfago de Barrett ^{22, 23}	+	-
Obesidade ^{43, 44}	+	-
<i>Nonepidermolytic palmoplantar keratoderma</i> (tilose) ^{17, 45}	-	+
Sintomas semanais de refluxo ^{6, 23}	+	-
Síndrome de Plummer-Vinson ¹⁷	-	+
Hérnia de hiato ²³	+	-
Divertículo de Zencker ^{46, 47}	-	+
Histórico de câncer de cabeça e pescoço ¹⁷	-	+
Histórico de câncer de mama sob radioterapia ⁴⁸	+	+
Agentes infecciosos e físicos:		
HPV ^{49, 50}	-	+
HIV e fungos ³⁵	-	+
<i>Helicobacter pylori</i> ^{51, 52}	P	+
β-bloqueadores, anticolinérgicos e aminofilinas ¹⁷	?	-
Injúria cáustica no esôfago ⁴⁸	-	+

(+) indica fator de risco relatado; (?) indica que há resultados conflitantes na literatura; traço (-) indica que não há risco relatado; e o sinal (P) indica fator protetor; **ADC** – Adenocarcinoma; **CCE** – Carcinoma de células escamas; **HPV** Papilomavírus humano; **HIV** - Vírus da imunodeficiência humana.

Estima-se que os carcinógenos da fumaça do tabaco (nitrosaminas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, aminas aromáticas, além de aldeídos e fenóis) sejam responsáveis por 45% dos casos de CE em homens e 11% em mulheres³⁸. As nitrosaminas são pré-carcinógenos, estáveis em pH fisiológico, sendo incapazes de reagir com macromoléculas celulares. Após seu metabolismo, que visa transformar estes compostos lipofílicos em compostos mais hidrossolúveis, tornam-se mais passíveis de excreção, ocorre a formação de compostos extremamente estáveis, com uma meia-vida bastante curta e altamente reativos. Estes compostos reativos não conseguem escapar do local onde são formados e reagem com várias macromoléculas, entre elas o DNA. Com isso, os produtos do metabolismo de nitrosaminas podem causar danos em diferentes regiões do DNA^{53, 54}.

O IARC classifica a bebida alcoólica e o seu metabólito acetaldeído (que é tóxico) como carcinogênico para os “seres humanos”³⁶. O consumo de álcool aumenta o risco de CCE em 13,9 vezes³⁸. Além de possuir um efeito multiplicativo ao risco da exposição ao tabaco, aumentando a carcinogenicidade de CCE em até 100 vezes⁵⁵. Este risco relaciona-se tanto com a quantidade (mais de 80g/dia) e a duração (5 anos), mesmo com uso de bebidas à base de licor e cerveja^{10, 36, 41, 56}. O álcool atua em vários mecanismos da carcinogênese esofágica. O primeiro deles relaciona-se ao contato direto com o epitélio esofágico, sendo amplificado pelos elevados níveis de acetaldeído intraluminais em consequência do crescimento bacteriano na cavidade oral. Com isso, a geração de oxigênio reativo é afetado, interferindo nas vias de sinalização celular, no sistema imunológico, na apoptose e promovendo lesão no DNA^{41, 57}. Segundo, o álcool e seus metabólitos, podem atuar provocando alterações epigenéticas⁵⁸. Terceiro, atua no aumento do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e poliaminas, promovendo o crescimento e invasão celular⁵⁶.

As bebidas em temperaturas elevadas, superior a 60°C, são também um fator de risco moderadamente alto para CCE de esôfago^{59, 60}. Este efeito ocorre como resultado da irritação hipertérmica crônica e inflamação da mucosa do esôfago e formação de radicais livres, além de potencializar os agentes carcinogênicos, álcool e tabaco, quando em contato com a mucosa esofágica, podendo levar a alteração mutacional^{13, 42}. Isso ocorre em determinadas regiões, como no Sul do Brasil (mate, chimarrão – responsável pela alta prevalência nesta região), no Nordeste da China (chá) e no Nordeste da França^{40, 59, 61-63}. Esta

alta prevalência é decorrente não da erva utilizada nestes chás, mas, sim, da alta temperatura na qual estas bebidas são consumidas^{60, 64}.

Fatores alimentares são também importantes na carcinogênese para o CCE de esôfago, como a ingestão de alimentos ricos em nitrosaminas (os defumados, conservas de peixe, carnes industrializadas e carnes vermelha), condimentos fortes e molhos em grandes quantidades diárias, doces, alimentos contaminados com fungos (que reduzem nitratos a nitritos), alimentos a base de sucos de vegetais conservados e contaminados com fungos (micotoxinas – que reduzem nitratos a nitritos)^{33, 55, 65}. Por outro lado, a baixa ingestão de alguns alimentos como frutas, vegetais frescos, legumes, peixes, aves, micronutrientes (vitaminas A, C, E, riboflavina, zinco e selênio), são considerados também como fatores de risco para o CCE de esôfago^{26, 36, 66}.

Há evidências cada vez maiores que agentes microbianos, como o papiloma vírus humano (HPV) e o vírus da imunodeficiência humana (HIV), fungos e bactérias, desempenham um papel etiológico no desenvolvimento do CCE de esôfago^{16, 17, 49}. Em particular, o HPV aumenta o risco de 15,2% a 22,9% vezes de desenvolver CCE de esôfago, principalmente com os tipos 16 (mais comum) e 18, não havendo hoje dúvidas quanto seu poder carcinogênico^{10, 13, 16, 17, 29, 34, 49, 60, 67}.

Fatores ambientais como lixo doméstico e fertilizantes agrícolas podem levar a contaminação da água potável por compostos nitrogenados, as nitrosaminas (nitratos, nitritos, e amônia). Estes compostos em altas concentrações podem ser um fator de risco significativo para o aumento da incidência de CCE esofágico, como ocorre na região de Shexian na China³⁷. Outros fatores de risco para o desenvolvimento de CCE de esôfago podem incluir o consumo de ópio, má saúde oral, baixo nível socioeconômico, radioterapia mediastinal, histórico de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço, além da associação do carcinoma escamoso com lesões ou doenças crônicas da mucosa esofágica (lesão cáustica e o megaesôfago)⁴⁸.

Dentre as síndromes genéticas podemos citar a tilose como a única associação comprovada com CCE de esôfago (hiperceratose plantopalmar)⁴⁸. Trata-se de enfermidade autossômica dominante rara com alteração no braço longo do cromossomo 17 (17q25)⁶⁸. Os pacientes com tilose palmo-plantar, forma epidermolítica, apresentam uma chance de até 40% maior de desenvolver CCE de esôfago⁶⁹.

Por último, o tema do presente trabalho, o megaesôfago é um fator de risco conhecido para o CCE de esôfago⁷⁰. Apesar da precariedade dos métodos propedêuticos, Fagge CH (1872) publicou o primeiro caso, associando o megaesôfago ao CCE esofágico⁷¹. Décadas após, outros estudos mostraram a sua importância como fator etiológico para o CCE de esôfago, aumentando o risco de 3,9% a 10% dos portadores de megaesôfago de desenvolver CCE quando comparado à população normal^{31, 32, 72-77}. O megaesôfago ou dilatação do esôfago é um distúrbio na motilidade esofágica, caracterizado por sintomas clínicos de disfagia progressiva³⁰. Mundialmente, tais características correspondem à lesão denominada de acalasia, cuja patogênese é pobremente conhecida. Dentre os fatores etiológicos para o megaesôfago, a doença de Chagas é o único comprovado⁷⁸ (Figura 3).

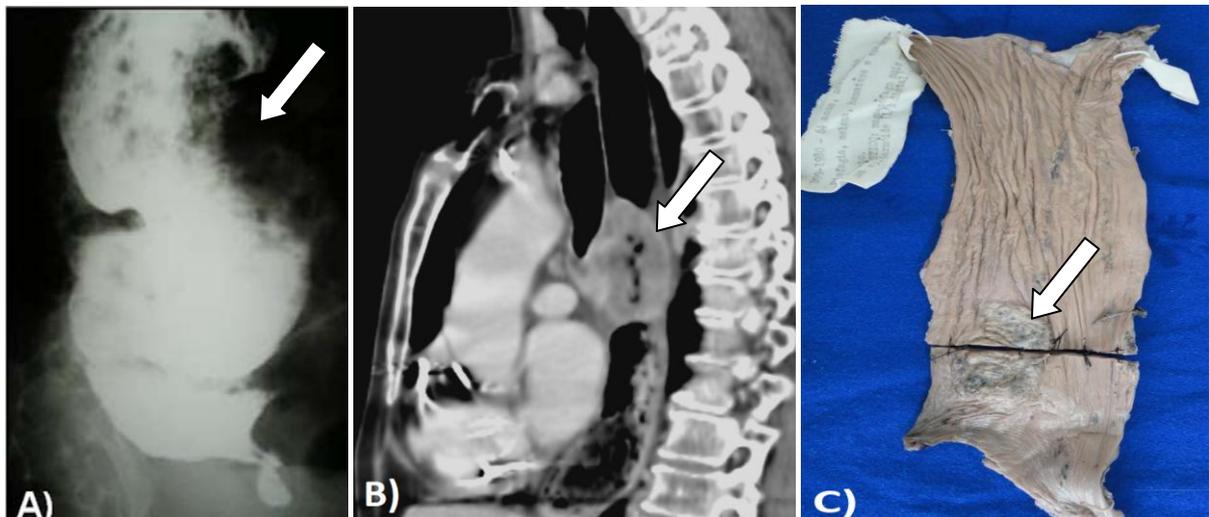


Figura 3 – A) Seriografia de esôfago, com megaesôfago grau IV (dolico megaesôfago), presença de falha de enchimento (seta), característico de neoplasia (Figura cedida pelo Prof. Eduardo Crema). B) Tomografia computadorizada de tórax em perfil, demonstrando um megaesôfago, com resíduos alimentares na região inferior do esôfago, com uma massa tumoral (seta) no esôfago médio (foto arquivo dos autores). C) Peça cirúrgica de um paciente com CCE associado ao megaesôfago chagásico (seta) (Figura cedida pela Profa. Dra. Sheila Jorge Adad – UFTM/MG).

1.1.4 Quadro clínico, estadiamento e tratamento

O CE em sua fase inicial não apresenta sintomatologia, sendo sua detecção apenas incidental quando o paciente é submetido à endoscopia. Os sintomas só aparecem em estágios avançados. Nestes casos, o principal sintoma é a disfagia, presente em 95% dos pacientes, seguido pela perda de peso em 40-50% e por odinofagia 20%^{8, 10}. Em 50% dos

indivíduos sintomáticos, o tumor é geralmente irressecável ou metastático no momento do diagnóstico. Os sintomas tardios, como a caquexia poderão ocorrer em decorrência da invasão mediastinal pelo tumor ou por metastatização para outros órgãos. Além de poder levar a sintomas como tosse, rouquidão, pneumonia, choque hemorrágico, dor óssea, convulsão, cefaléias, insuficiência respiratória e icterícia⁶¹.

Em 1997, o *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* e a *International Union Against Cancer (IACC)* modificaram o sistema de estadiamento TNM para o câncer esofágico, o qual passou a ser uma classificação anatomopatológica universalmente utilizada⁷⁹. As características deste estadiamento correspondem à invasão tumoral (T), presença de metástases em linfonodos regionais (N) ou em órgãos sólidos (M). Atualmente, a importância prognóstica do *status* linfonodal tem sido insistentemente valorizada na classificação TNM, na qual o parâmetro N é considerado mais importante que o T4 no estadiamento da neoplasia^{79, 80}. O estadiamento define se a intenção do tratamento é paliativa ou curativa, além de suas implicações refletir no prognóstico^{79, 81}.

Orientações e diretrizes do *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)*, publicadas em 2012, para o CE e ADC na TEG consideram a ressecção radical como tratamento de escolha para os pacientes com doença locorregional ou estadio I (T1 a N0), excluindo o tumor na região cervical^{81, 82}. Para tumores mais avançados (T1-3 N0-1 M0) e sem evidência de metástases à distância com boa performance clínica, a ressecção cirúrgica radical é atualmente o tratamento preferencial, seja por via aberta, videolaparoscópica ou mais recentemente robótica^{8, 81}. Com relação à quimioterapia neoadjuvante, há controvérsias entre os autores. Alguns defendem a quimioterapia neoadjuvante como tratamento primário preferencial para T2-T4a, em qualquer N, podendo aumentar a sobrevida dos pacientes e facilitar a ressecção cirúrgica, apesar do aumento da morbidade e da mortalidade destes pacientes submetidos a ressecção cirúrgica radical, após radio e quimioterapia⁸²⁻⁸⁴. Outros afirmam que a adjuvância com radio e quimioterapia é indicada em ressecções R0 (T2N0M0), micrometástases, pacientes com margens positivas ou doença residual (após ressecção). Entretanto, não tem mostrado efeitos satisfatórios quanto à sobrevida^{81, 82}. O tratamento do câncer recorrente do esôfago, deverá ser individualizado, podendo-se utilizar qualquer forma de tratamento ainda não utilizada para o paciente, ou inseri-lo dentro de protocolos de pesquisa vigentes na instituição⁸. Os pacientes com câncer disseminado sintomático (disfagia) podem ser paliados dos sintomas com radio e

quimioterapia². Os pacientes com fístula traqueoesofágica podem ser tratados com próteses ou através da interposição com o cólon ou estômago, transposto por via retroesternal, para melhorar a sintomatologia e a qualidade de vida^{85, 86}. De uma forma geral e apesar das possibilidades citadas acima, os pacientes com CE possuem uma elevada mortalidade, alta letalidade, péssimo prognóstico com baixa sobrevida (em média 7 meses, em regiões de alta incidência)².

1.2 Doença de Chagas

1.2.1 Epidemiologia

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é a sexta patologia tropical negligenciada mais importante do mundo, causada pelo *Trypanosoma cruzi*^{87, 88}. Estima-se que 12 a 18 milhões de pessoas estejam infectadas, e entre 28 a 100 milhões permaneçam sob ameaça de infecção, com uma incidência anual de 200 mil casos novos e 14 mil mortes ao ano em todo o mundo, chegando a ser recentemente comparada com a AIDS, em um artigo intitulado, *Chagas Disease: The New HIV/AIDS of the Americas*⁸⁹⁻⁹². No Brasil estima-se que entre 3 a 4 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, com a prevalência de infestação chegando a 25% em alguns municípios Brasileiros^{93, 94}.

Geograficamente, a doença de Chagas é endêmica em toda a América Latina, predominantemente rural, com exceção da República da Guiana, Belize, Suriname e ilhas do Caribe^{87, 95}. As maiores prevalências da infecção encontram-se no Brasil, Argentina e na Venezuela⁹⁶. Migrações para áreas urbanas durante as três últimas décadas do século XX mudaram o padrão epidemiológico tradicional, passando a ser também encontrada na malha urbana^{97, 98}. Atualmente, a doença de Chagas afeta todo o globo, com diversos casos notificados em países considerados não endêmicos, como Espanha, Estados Unidos, Canadá, Austrália e Japão, os principais destinos dos imigrantes latinos (Figura 4)^{87, 99, 100}.



Figura 4 - Estimativa mundial de populações infectadas por *Trypanosoma cruzi* (em marrom)^{97, 101, 102}. As rotas de migração (vermelho) da América Latina e estimativa do número total de pessoas infectadas em países não endêmicos (adaptada: Coura et al., 2010¹⁰³).

1.2.2 Etiologia e Transmissão

A doença de chagas é causada por uma infecção crônica, provocada pelo *Trypanosoma cruzi*, protozoário flagelado parasito (intracelular) descoberto por Carlos Chagas em (1909)¹⁰⁴. A forma clássica de transmissão da doença de Chagas, como descrita por Carlos Chagas, é a vetorial, através de insetos hematófagos, da família *Reduviidae*, pertencentes aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, que são popularmente conhecidos como “barbeiros” ou ainda, “chupança”, “bicudo”, “chupão” ou “procotó”¹⁰⁵. Os parasitos, *Trypanosoma cruzi* são transmitidos entre animais e humanos através deste vetor. O vetor triatomídeo se esconde em rachaduras das casas, se alimentam dos habitantes durante o sono, e eliminam os parasitos em suas fezes, os quais penetram no hospedeiro através de lesão na pele ou através de membranas mucosas (nariz, cavidade oral e conjuntiva)^{87, 106, 107}. Recentemente, novas formas de transmissão foram relatadas, através de transfusão sanguínea e por transplante de órgãos contaminados, que constituem o segundo mecanismo de importância epidemiológica na transmissão mundial do *Trypanosoma cruzi*^{100, 108}. O terceiro mecanismo, com grande importância na transmissão da

doença de Chagas é a transmissão vertical ou congênita⁹⁷. Existem ainda outras vias de transmissões secundárias, como acidentes de laboratório e pela via oral, através da ingestão de água ou alimentos contendo fezes contaminadas de barbeiro^{93, 97, 98}. No Brasil, relatos recentes demonstraram surtos de transmissão oral pela ingestão de açai e caldo de cana¹⁰⁹. Existem ainda relatos do encontro de tripomastigotas em sangue menstrual de mulheres chagásicas. Entretanto, a via de transmissão sexual nunca foi comprovada na espécie humana¹⁰⁵.

1.2.3 Quadro clínico

O sinal da porta de entrada (complexo oftalmoganglionar), complexo de Romaña, localizado na pálpebra, ou chagoma de inoculação (em outras regiões do organismo), podem ser encontrados na fase inicial da doença⁹¹. Após a fase inicial de transmissão, ocorre uma parasitemia transitória que pode levar dias a semanas de duração, momento este que o *Trypanosoma cruzi* se aloja em diferentes órgãos, como o coração, e principalmente, os do aparelho digestivo (estômago, duodeno, cólon e esôfago)^{91, 96-98, 110}. Posteriormente, após um período de 5 a 15 anos da infecção inicial, e em 20% a 30% dos indivíduos infectados, a infecção torna-se crônica e ocorrem as manifestações da doença caracterizadas pela cardiopatia (52,1%) e pelas manifestações benignas no trato digestivo (14,3%) como o megacólon e o megaesôfago, em pacientes entre 20 a 49 anos de idade^{78, 93}.

1.2.4 Megaesôfago chagásico

1.2.4.1 Fisiopatologia

O megaesôfago chagásico (MEC) é uma doença que se caracteriza por sua cronicidade. Não existe cura espontânea e a evolução da doença pode levar à morte por

inanição¹¹¹. Durante a fase crônica da doença de Chagas, nos segmentos do esôfago acometido pelo *Trypanosoma cruzi*, ocorre a destruição dos neurônios mioentéricos intramurais (plexos de Auerbach - parassimpático)¹¹². Destruição atribuída ao parasitismo direto da célula nervosa, ação das neurotoxinas, ação inflamatória e mecanismo auto-imune; levando conseqüentemente ao megaesôfago. Os neurônios encontram-se em diferentes graus de destruição, além de ocorrer uma neurite, perineurite e ganglionite¹¹³ (Figura 5).

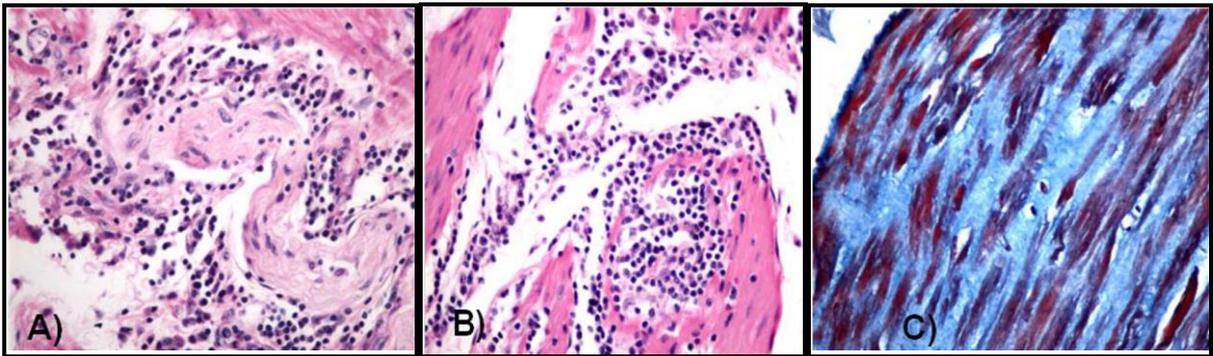


Figura 5 – Fotomicrografias de casos de MEC. A) Plexo mientérico com ganglionite e ausência de neurônios. B) Camada muscular com miose crônica. C) A imagem representa a muscular com fibrose intensa corada em azul pelo tricrômico de Masson (Adaptada: Adad et al., 1991¹¹³).

A ganglionite mesentérica é decorrente de uma imunorreatividade cruzada provocada por antígeno flagelar do parasita, que mimetiza uma proteína expressa pelos neurônios intestinais, o qual atrai as células imunológicas para dentro dos gânglios, levando ao desaparecimento e sua substituição por tecido conjuntivo denso, além de fibrose intersticial entre as fibras musculares^{113, 114}. Como consequência, a musculatura lisa desses órgãos passa a responder com contrações desordenadas e de intensidade variável, tanto hiperreativas quanto hiporreativas, dependendo do estímulo feito¹¹². Conseqüentemente, ocorre o espessamento da parede do esôfago, por hipertrofia das células musculares lisas, e aumento do tecido conjuntivo. Progressivamente, ocorre diminuição da espessura da parede pela substituição da camada muscular por tecido conjuntivo levando a dilatação progressiva (megaesôfago) e a acalasia do esfíncter inferior (EEI) do esôfago^{115, 116}. A acalasia é caracterizada pela “ausência de relaxamento” à deglutição, devido ao aumento da pressão basal do EEI, produzindo uma obstrução funcional do esôfago^{110, 117}. A aperistalse no corpo do esôfago em associação com a obstrução funcional do EEI, conseqüentemente, provoca aumento do diâmetro do esôfago (megaesôfago) (Figura 6)^{30, 31, 74, 76, 77, 93, 94, 118}.

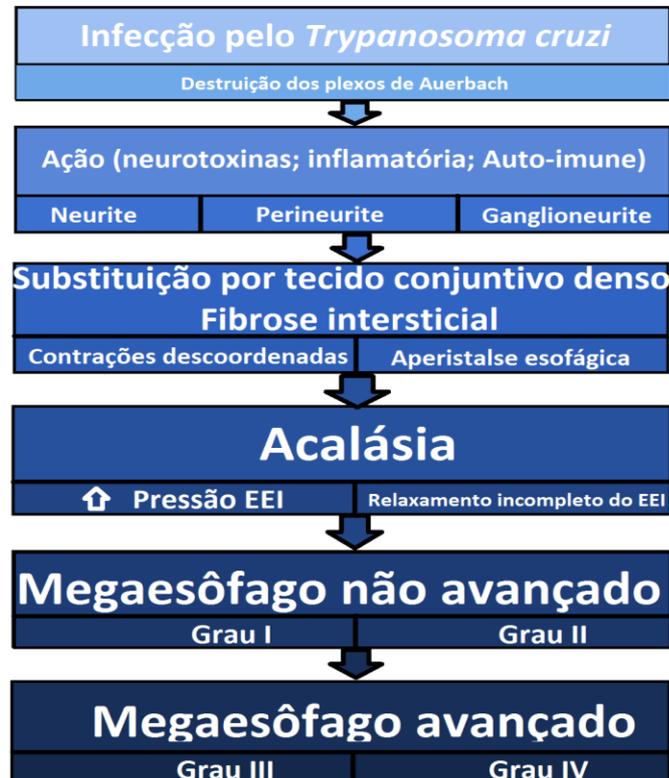


Figura 6 – Etapas da fisiopatologia do megaesôfago chagásico^{30, 31, 74, 76, 77}.

1.2.4.2 Quadro clínico e diagnóstico

Após a evolução para o megaesôfago, na fase crônica da doença, os sintomas mais frequentes são: disfagia progressiva, regurgitação, dor retroesternal, queimação, sialorréia e broncopneumonia de repetição^{30, 74}. Esta fase é caracterizada por baixíssima parasitemia e altos níveis de anticorpos IgG. Portanto, nesta fase o diagnóstico é feito basicamente por testes sorológicos, através das técnicas de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), hemaglutinação indireta (HAI) e imunofluorescência indireta (IFI), que apresentam sensibilidade variando de 95% a 100%^{119, 120}. Métodos parasitológicos como a hemocultura apresentam, nesta fase sensibilidade baixa, variando de 40% a 50%¹²¹. No entanto, para o diagnóstico do megaesôfago, é necessário realizar endoscopia digestiva alta (para avaliar mucosa do esôfago e fazer diagnóstico diferencial com outras lesões estenosantes que provocam dilatação a montante como a neoplasia de esôfago e estenose péptica)¹²².

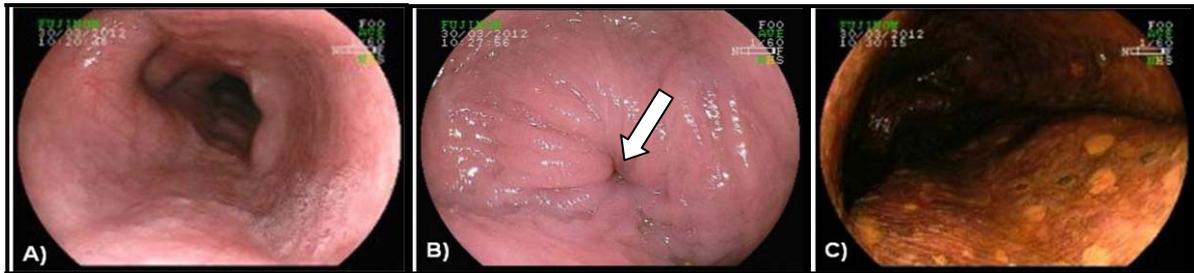


Figura 7 - Imagens endoscópicas A) Aumento no diâmetro do lúmen esofágico com aparecimento de contrações irregulares (após insuflação de ar) em um paciente com MEC. B) Cárdia cêntrica (seta) e permanentemente cerrada com mucosa de coloração róseo-pálida. C) Cromoscopia com solução de lugol: após a absorção do lugol pelas células esofágicas, o iodo desta solução reage com o glicogênio intracelular corando o epitélio em tons de marrom. As áreas de displasia ou câncer, as quais são pobres em glicogênio, permanecem pouco coradas (iodo-claras) ou não coradas (iodo-negativas). Esta técnica visa detectar lesões imperceptíveis ao exame endoscópico convencional (Figuras cedidas pela Profa. Dra. Denise Peixoto Guimarães – HCB/SP).

Ainda, para o diagnóstico, os exames de imagem (radiografia contrastada do esôfago ou tomografia de tórax com contraste) visualizam estase de contraste no esôfago, além de ondas terciárias, floculação do contraste (significa presença de estase alimentar) e ausência de bolha gástrica. O estudo da motilidade esofágica tem importância nos casos em que há dúvida diagnóstica pela ausência de dilatação do esôfago, além de auxiliar na indicação do tratamento³⁰.

1.2.4.3 Classificação e tratamento

A classificação do megaesôfago é feita através da avaliação radiológica pela dilatação e/ou parâmetros manométricos do esôfago. Dentre as várias classificações, no Brasil, a mais utilizada é a proposta por Rezende et al., (1960)¹²³. Ela se baseia em dados radiológicos e valoriza a dilatação e a tonicidade da parede (Figura 8).

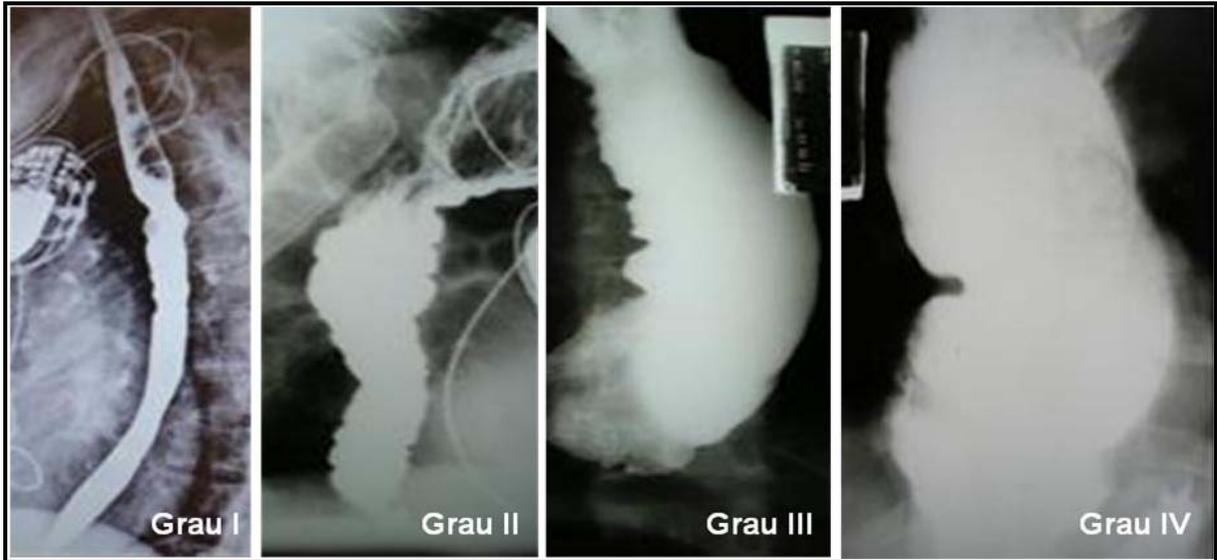


Figura 8 – Classificação radiológica do megaesôfago proposta por Resende et al., (1960)¹²³ (Figuras cedidas pelo Prof. Dr. Eduardo Crema – UFTM/MG).

No tratamento do MEC não se pode atuar no sentido de recompor o esôfago para as suas funções motoras normais, mas podem ser tomadas medidas dietético-comportamentais, drogas que reduzam a pressão do esfíncter esofágico inferior (fugas com efeitos colaterais), dilatação do cárdia por via endoscópica (tem indicação específica), operação sobre a TEG (casos não avançados) e ressecções esofágicas (casos avançados), sendo o objetivo principal do tratamento cirúrgico nos pacientes com MEC o de corrigir a disfagia^{30, 124, 125}.

1.3 Mecanismos moleculares da carcinogênese de CE.

Os mecanismos moleculares da carcinogênese de CE estão diretamente relacionados aos oncogenes aos genes supressores de tumor, que são as duas grandes classes de genes que codificam proteínas que controlam os processos neoplásicos, promovendo-os (oncogenes) ou impedindo-os (genes supressores tumorais). Mutações nestes genes podem contribuir para o desenvolvimento do câncer, através da desregulação do crescimento e a proliferação celular, diferenciação, apoptose, invasão e migração celular e angiogênese desempenhando uma função chave na indução do câncer.

Os oncogenes são proto-oncogenes ativados por alterações genéticas. Os proto-oncogenes são genes que codificam proteínas existentes nas células normais, que em condições fisiológicas promovem o crescimento, diferenciação, regulação positiva da proliferação celular e apoptose¹²⁶. Estas alterações genéticas estão associadas a um ganho de função e são dominantes, ou seja, basta a alteração (ex: mutação) de apenas um dos dois alelos da célula para que haja a manifestação do efeito oncogênico (fenótipo mutado)¹²⁷. As alterações genéticas que levam à ativação dos proto-oncogenes conferem uma vantagem de crescimento à célula tumoral. Os principais mecanismos genéticos que resultam na ativação dos oncogenes nas neoplasias são: mutação, amplificação gênica e rearranjos cromossômicos¹²⁸ (Tabela 2).

TABELA 2 – Alguns exemplos de proto-oncogenes, função e seus mecanismos de ativação.

Proto-oncogenes	Função do Proto-oncogene	Mecanismo de ativação
<i>ABL</i>	Tirosina quinase (sinalização intracelular)	Translocação
<i>AKT</i>	Serina/treonina quinase	Amplificação
<i>BCL-2</i>	Proteína antiapoptótica	Translocação
<i>ERBB-2</i>	Tirosina quinase	Amplificação gênica
<i>C-MYC</i>	Fator de transcrição	Translocação
<i>H-RAS</i>	GTPase	Mutação pontual
<i>K-RAS</i>	GTPase	Mutação pontual
<i>N-RAS</i>	GTPase	Mutação pontual
<i>PDGFR</i>	Receptor de superfície (tirosina quinase)	Translocação

Os genes supressores de tumores (Tabela 3) são encontrados no genoma das células normais e são responsáveis pela produção de proteínas relacionadas ao controle negativo do crescimento celular, ou seja, atuam restringindo a proliferação celular (regulação dos *checkpoints* celulares, inibindo a progressão do ciclo caso o DNA esteja danificado)¹²⁹.

TABELA 3 – Alguns exemplos de genes supressores de tumor, função e seus mecanismos de inativação.

Gene supressor	Função dos supressores de tumor	Mecanismo de inativação
<i>RB1</i>	Regulador do ciclo celular	Deleção, mutação pontual, metilação
<i>WT1</i>	Regulador transcricional	Mutação pontual; deleção, metilação
<i>TP53</i>	Regulador transcricional	Mutação pontual
<i>VHL</i>	Regulador proteólise	Deleção, mutação pontual, metilação
<i>CDKN2A</i>	Regulador do ciclo celular	Mutação pontual, deleção, metilação
<i>BRCA1</i>	Regulador trascricional/Reparo do DNA	Mutação pontual; deleção, metilação
<i>BRCA2</i>	Regulador trascricional/Reparo do DNA	Mutação pontual, deleção
<i>MLH1</i>	Reparo do DNA	Mutação pontual, deleção, metilação

Alterações em genes supressores de tumor são, portanto, na sua maioria recessivas, ou seja, há a necessidade da inativação dos dois alelos para que haja a manifestação do fenótipo, e a perda deste controle pode significar a formação de uma neoplasia¹³⁰. Diversos tipos de alterações genéticas foram descritas para genes supressores de tumores, incluindo mutações pontuais e cromossômicas (translocações e deleções) e alterações epigenéticas (ex: metilação)¹³¹ (Tabela 3).

Os estudos de biologia molecular têm mostrado diversas alterações genéticas que levam ao CE^{132, 133}. Estas alterações genéticas incluem mutações nos genes (*TP53*, *p16* e *p15*), deleção do *RB* (*retinoblastoma*), amplificação de *Ciclina D1* e *c-myc*, perdas alélicas em cromossomos (3q, 4q, 5q, 9p, 9q, 13q, 17q, 17p e 18q), alterações da *COX-2* (*Cyclooxygenase-2*), *BCl-2* (*B-cell lymphoma-2*), *p27*, *erb-b2*, *EGF/EGFR* (*epidermal growth factor receptor*), *TGF- α* , *E-caderina*, α -*caderina* e β -*caderina*¹³⁴⁻¹³⁶. A sequência destas alterações genéticas em relação à progressão do tumor é muito importante para diferenciar a etiopatogenia além de poder definir e diferenciar as alterações moleculares envolvidas nas vias de carcinogênese dos dois principais tipos histológicos de câncer do esôfago (CCE e ADC) (Figura 9)⁶.

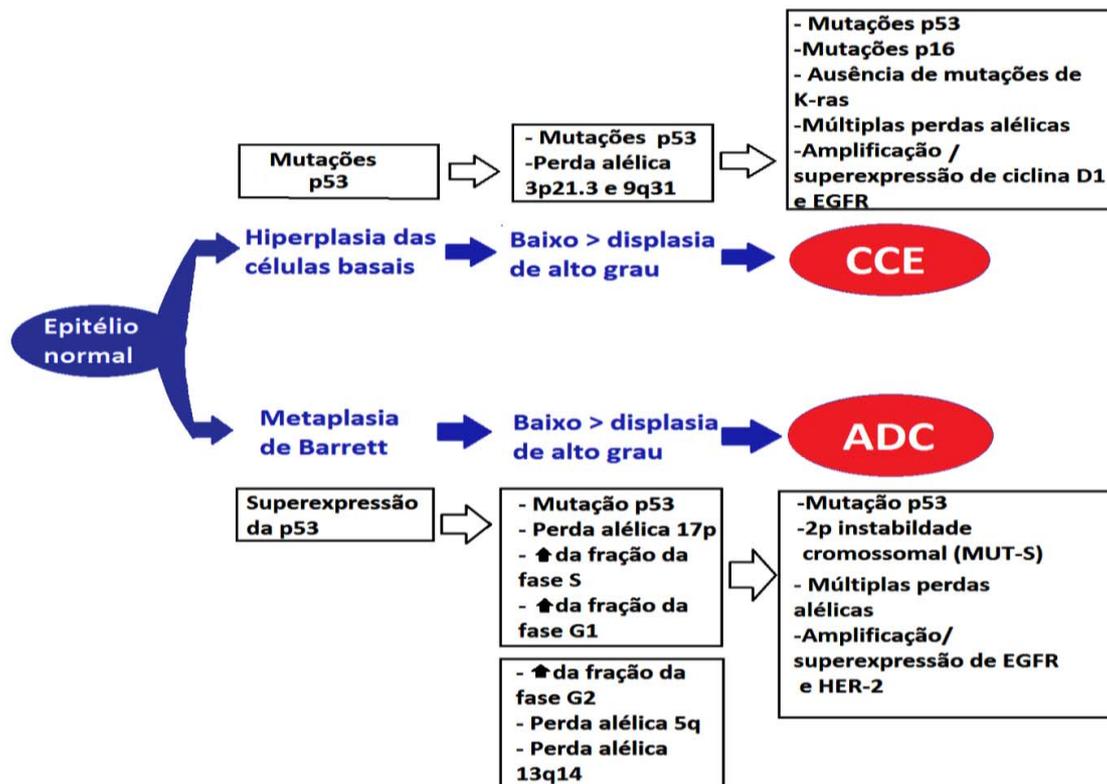


Figura 9 - Sequência temporal de alterações genéticas no CE. A sucessão de fases histopatológicas a partir de epitélio normal até o desenvolvimento de CCE de esôfago (parte superior da figura) ou ADC de esôfago (parte inferior da figura). As alterações associadas com estas fases estão descritas nos retângulos (Adaptado: Zhi-Qiang Ling et al., 2011⁶).

1.3.1 Mecanismos moleculares da carcinogênese do CCE

A carcinogênese de CCE pode ser caracterizada por uma sequência de eventos genéticos que acompanham todas as etapas histopatológicas em uma sequência temporal a partir de epitélio normal, esofagite, seguida de displasia leve a grave, carcinoma *in situ*, até o desenvolvimento de CCE invasivo⁶. Esta sequência temporal está relacionada com alterações envolvendo oncogenes e genes supressores tumorais, anteriormente descritos que codificam diversas proteínas alteradas^{6, 134, 137}.

Dentre os principais genes envolvidos com a carcinogênese de CCE de esôfago destacamos os genes supressores de tumor (*TP53*, *p16*, *p21*, *Rb*, *Ciclina D1*, *MDM2*) e os

oncogenes (*EGFR*, *C-MYC*, *AKT*, *BCL-2*) os quais são genes vitais para o controle da homeostasia das células esofágicas e no processo tumorigênico de CCE de esôfago¹³⁸.

O gene *TP53* é o principal gene alterado no CCE de esôfago, podendo ocorrer mutações em áreas de mucosa normal e de displasia¹³⁹. Alterações no gene *RB*, que podem ser mutações pontuais ou alterações na expressão do gene, estão envolvidas em 30% a 50% dos CCE de esôfago¹³⁸. A amplificação gênica de *cyclin D1 - CCND1*, com a superexpressão do fator nuclear ciclina D1 ocorre frequentemente em 40% nas linhagens celulares de carcinoma escamoso e está associado a um pior prognóstico no CCE de esôfago^{138, 140}. Os genes supressores de tumor e seus produtos *p16* e *p21*, encontram-se frequentemente alterados no CCE. A proteína p21 apresenta-se altamente expressa no CCE e a mutação do gene *p16* ocorre em 50% dos casos de CCE de esôfago^{138, 141, 142}. O gene *p21* é regulado positivamente pela proteína p53, sendo considerado o efetor da parada do ciclo celular desencadeada pela p53⁴⁸. Porém, a avaliação da expressão da proteína p21 não parece ter uma relação com prognóstico para o CCE de esôfago^{48, 138}.

1.4 Gene supressor tumoral *TP53*

O gene *TP53* (*tumor protein 53*), localizado na posição 13.1 do braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) (Figura 10), possui 11 éxons e codifica uma fosfoproteína (p53)^{131, 143, 144}. O gene *TP53* e a sua proteína codificada têm sido o assunto de mais de 30 mil trabalhos de pesquisa que tem surgido na literatura científica, desde a descoberta da proteína p53 em 1979^{145, 146}. Clonado em 1983, o gene *TP53* inicialmente foi descrito como um oncogene¹⁴⁷⁻¹⁵⁰. Posteriormente, ficou claro que este gene atuava como gene supressor de tumor¹⁵¹. O *TP53* está relacionado à maioria dos tumores humanos, sendo um dos genes de maior importância e denominado o “guardião do genoma”, pelo fato de prevenir o avanço do ciclo celular e a replicação do DNA após o dano ao DNA e pela indução da expressão de enzimas de reparo de DNA. Neste contexto, p53 pode reduzir as taxas nas quais as mutações são acumuladas nos genomas celulares e, quando alterado, irá “permitir” o desenvolvimento da neoplasia^{144, 152, 153}.



Figura 10 - O gene *TP53* está localizado no cromossomo 17 (braço curto, 17p13), uma região que é frequentemente deletada em tumores (Figura cedida pela Profa. Dra. Marjori Leiva Comparoto – HCB/SP).

1.4.1 Proteína p53

A p53, possui uma estrutura tetramérica de 53 quiloDaltons (kDa). Desta forma, quando a célula apresenta um alelo mutado e o outro normal, a função da proteína pode estar comprometida, pois cada tetrâmero terá pelo menos uma subunidade defeituosa (efeito dominante negativo)¹⁵⁴. A p53 é composta por 393 aminoácidos na sua extensão e pode ser dividida em 5 regiões funcionais distintas: 1) domínio de ativação transcricional (resíduos 20 a 60), localizado na extremidade amino-terminal (N-terminal), responsável por regular a expressão de genes que atuam na parada do ciclo celular e apoptose; 2) domínio rico em prolina (resíduos 60 a 90); 3) domínio de ligação ao DNA (resíduos 100-300), que possibilita a ligação de p53 em sítios específicos do DNA. 4) domínio de tetramerização (resíduos 320 a 360), responsável pela formação de tetrâmeros de p53, que é a forma mais ativa (selvagem ou *wild-type*) em transativação; 5) domínio de regulação de ligação não-específica ao DNA (resíduos 363 a 393), cuja função é ligar-se ao domínio central de ligação ao DNA, impedindo a interação desta região com promotores de genes relacionados com a supressão e morte celular programada (Figura 11)^{131, 155, 156}.

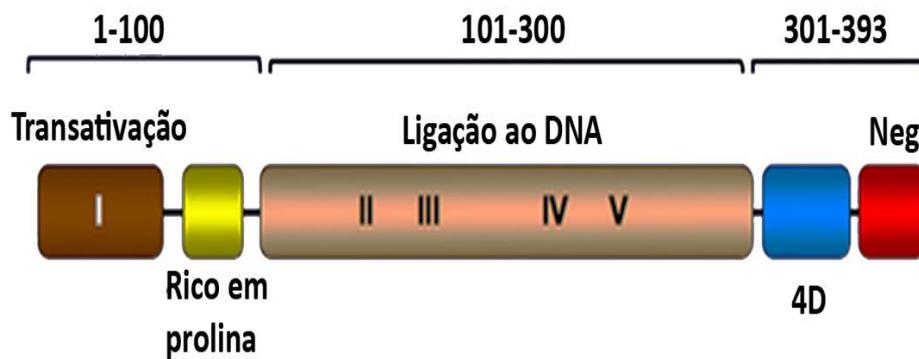


Figura 11 - Proteína humana p53. Ela pode ser dividida em cinco domínios, cada um deles correspondem a funções específicas (www.p53.fr).

1.4.2 Ciclo celular, vias de sinalização e funções da proteína p53

A p53 é um fator de transcrição que está no centro de uma grande rede de sinais que percebem o estresse celular¹⁵⁷ (Figura 12). Ela possui uma meia-vida curta (20 minutos) sendo expressa em baixos níveis e mantendo-se latente em células saudáveis sem estresse. Quando as células são expostas a fatores genotóxicos ou não genotóxicos, a p53 é ativada acumula-se e desencadeia a parada do ciclo celular (em G1, e em alguns casos em G2) e à apoptose^{158, 159}. Os níveis baixos de p53 são mantidos pela proteína MDM2 que é responsável pela exportação de p53 do núcleo para o citoplasma da célula, onde a mesma é degradada¹⁶⁰. Este mecanismo ocorre quando a MDM2 liga-se a p53, bloqueando imediatamente a capacidade de p53 de realizar sua função de ativadora da transcrição, e catalisa a adição de moléculas de ubiquitina, marcando a p53 para degradação no proteossoma citoplasmático¹⁶¹. Como o gene *MDM2* é, por sua vez, transcricionalmente ativado pela p53, isto cria um mecanismo de retroalimentação negativa (p53-MDM2) que geralmente funciona para assegurar que moléculas de p53 sejam degradadas tão logo tenham sido sintetizadas, mantendo seus níveis baixos¹⁶².

Existem três vias de ativação da p53. A primeira via, é desencadeada quando a célula se encontra em condição de estresse pelos agentes genotóxicos - danos ao DNA (radiações UV, raio γ , raio X, calor, choque térmico, certas drogas quimioterápicas que danificam DNA, inibidores da síntese de DNA e agentes que destroem componentes dos microtúbulos do

citoesqueleto)^{163, 164}. A ATM quinase fosforila e, assim ativa a *Cyclin-dependent kinase 2* (Chk2), uma proteína-quinase que fosforila a proteína fosfatase Cdc25A, marcando a degradação mediada por ubiquitina^{163, 165}. As mutações com perda-de-função nos genes *ATM* ou *Chk2* apresentam o mesmo efeito que as mutações no gene *TP53*. A ATM fosforila a p53 que sofre modificações pós-transcricionais que a liberam da MDM2, aumentando sua meia-vida e concentração, tornando-a ativa¹⁶⁵⁻¹⁶⁷.

O segundo caminho é constituído pela proteína p16^{INK4A}/p14^{Arf} (*Alternative Reading Frame* – ARF). Uma variedade de sinais oncogênicos - oncoproteínas E1A de adenovírus, Myc (c-Myc) e RAS, induzem a atividade de E2F, o que leva, por sua vez ao aumento da expressão de p14^{Arf}^{163, 164, 168, 169}. A proteína p14^{Arf} liga-se à MDM2 no nucleoplasma das células e arrasta a MDM2 para os nucléolos, bloqueando a ação de MDM2¹⁷⁰. Com isso, a MDM2 não é capaz de destruir a p53 por ubiquitinação (elevados níveis de p14^{Arf} causam aumento dos níveis de p53 nas células). Em consequência a p53 é acumulada e desencadeia a apoptose, sugerindo que a apoptose induzida por E2F funciona como um mecanismo anti-câncer designado a eliminar células pré-neoplásicas não desejadas^{163, 166, 169}.

A terceira via é a menos compreendida e possivelmente acontece através de sinais não genotóxicos (hipóxia e deleção de nucleotídeos). Há evidências de que a hipóxia pode induzir uma atividade de longa duração da p53 por um mecanismo que é bastante diferente da sinalização por agentes genotóxicos (danos ao DNA), e não parecem envolver a proteína MDM2¹⁶⁴. No entanto, a natureza exata desse mecanismo não é conhecida¹³⁹.

A ativação da p53 normal, acumulada, por agentes genotóxicos, não genotóxicos e oncogênicos, resulta na resposta citostática (“apreensão do ciclo celular”) interrupção do ciclo celular na fase G1 (gene *p21*), podendo ser tanto irreversível (“senescência”) como reversível (retorno à proliferação), bloqueio da angiogênese e indução do reparo (gene *GADD45* – *Growth Arrest DNA Damage Inducible*) do DNA através da regulação transcricional^{155, 167, 171}. O reparo bem sucedido do DNA permite a continuação do ciclo celular; no entanto, se houver qualquer falha no reparo do DNA, a ativação do gene *bax* também induzido pela p53 promove apoptose, evitando a transformação neoplásica (Figura 10)^{155, 171}. Toda esta ação da p53 ocorre antes da síntese de DNA, durante a divisão mitótica, verificando se a molécula de DNA está íntegra para que o ciclo celular possa seguir adiante¹⁷²⁻¹⁷⁴. Nas células com perda ou mutações do gene *TP53*, a lesão do DNA não induz a

interrupção do ciclo celular nem o reparo do DNA, levando a proliferação de células geneticamente lesadas, originando neoplasias malignas¹⁷².

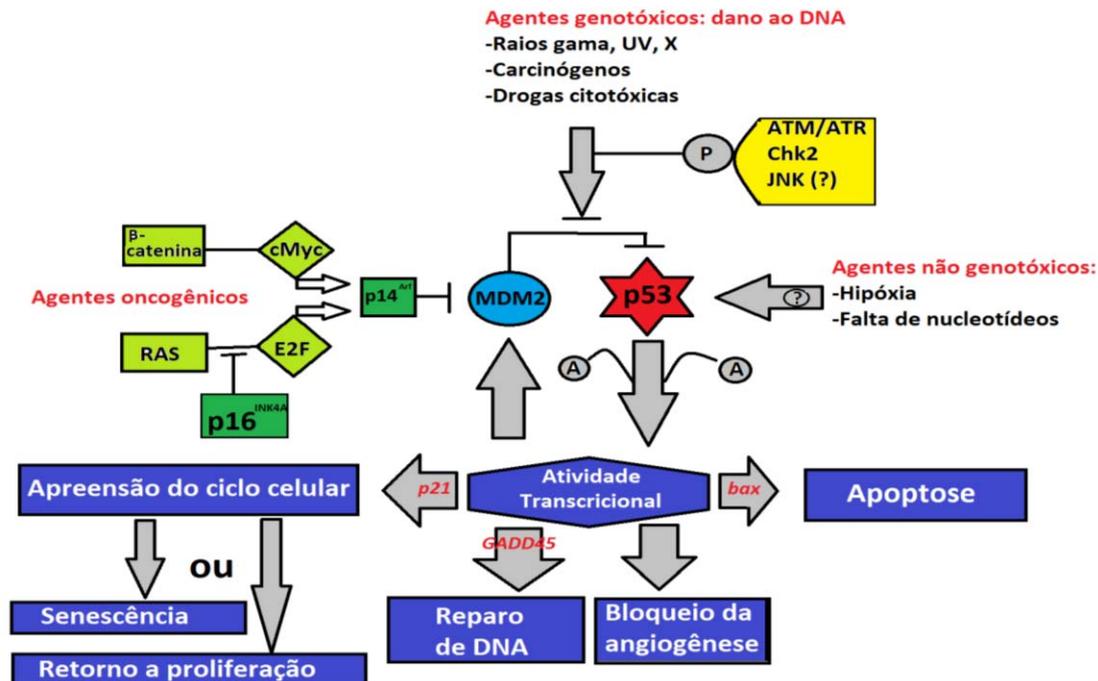


Figura 12 – Sinais ativadores de p53 e seus efeitos. As vias convergem para o complexo p53-MDM2 (“Unidade molecular central”). As setas indicam indução da atividade ou da transcrição das proteínas envolvidas na via da p53, enquanto as barras indicam inibição (adaptada: Guimarães et al., 2002)¹³⁹.

1.4.3 Mutações do gene *TP53*

1.4.3.1 Conceitos

Mutação é uma mudança na estrutura primária do DNA, que consiste de uma sequência linear de pares de nucleotídeos, representando a informação química armazenada levando a alteração permanente e hereditária no material genético (sequência de nucleotídeos ou no arranjo do DNA), podendo alterar ou não o fenótipo¹⁷⁵. O momento em que essas alterações ocorrem durante a progressão do câncer é extremamente variável de um tecido para o outro, podendo ocorrer o acúmulo de mutações ao longo de décadas em alguns tumores, enquanto em outros podem ser caracterizados por uma explosão de mutações em um curto período de tempo¹⁶¹.

As mutações ocorrem durante o processo de divisão celular. As mutações são agrupadas em duas grandes classes distintas de acordo com a sua extensão: mutações cromossômicas ou mutações gênicas. As mutações cromossômicas, podem ser numéricas (poliploidias ou aneuploidias) ou estruturais (duplicação, deleção e translocação). Nas mutações gênicas, as alterações ocorrem na sequência de nucleotídeos que compõe a molécula de DNA, e podem ser divididas por classes, como: mudanças da sequência do DNA – mutações pontuais (deleções, inserções, substituições) e mudanças funcionais (silenciosa - *silent*, sentido trocado - *missense*, sem sentido - *nonsense* e mudança da matriz de leitura - *Frameshift*) (Figura 13)^{176, 177}.

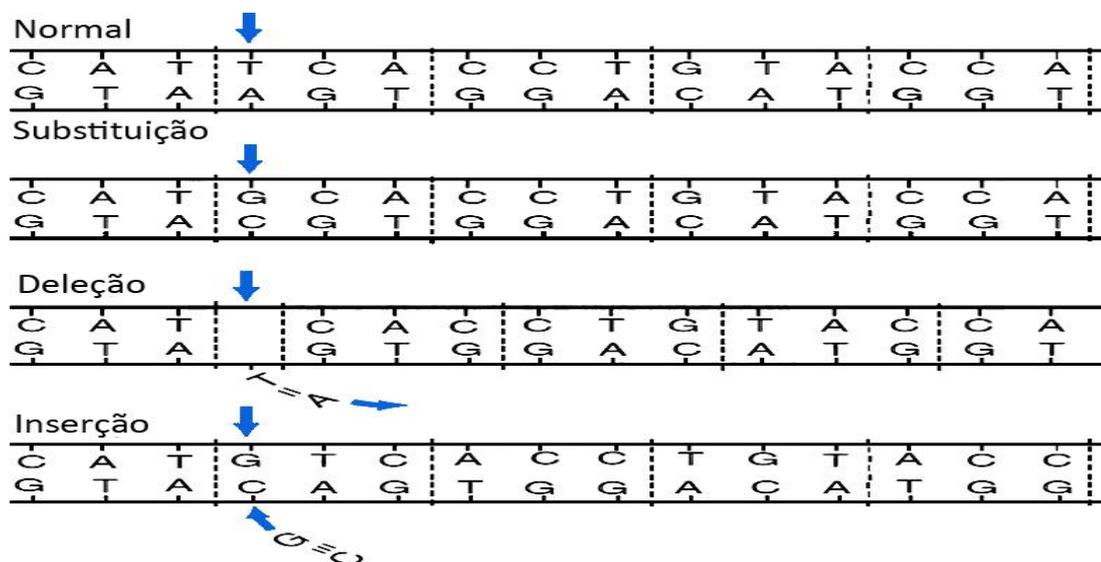


Figura 13 – Exemplos de mutações gênicas. A primeira base do segundo códon está mudada por uma substituição, deleção ou inserção¹⁷⁸.

Nos últimos 20 anos, foram catalogadas mais de 30.000 mutações somáticas do gene *TP53*, em vários tipos de tumores^{146, 179}. O gene *TP53* está mutado em torno de 50% das neoplasias, o que caracteriza como gene mais frequentemente mutado nas neoplasias. De todas as mutações, 80% a 97% do gene *TP53* estão presentes na região que codifica o domínio de ligação da proteína ao DNA e correspondem aos éxons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53*^{132, 155}. Os códons com maior frequência de mutação (30% de todas as mutações na proteína) são seis (175, 245, 248, 249, 273, 282), os quais são chamados de *hotspots* (região do genoma caracterizada por um grande número de mutações) (Figura 14)^{132, 155}.

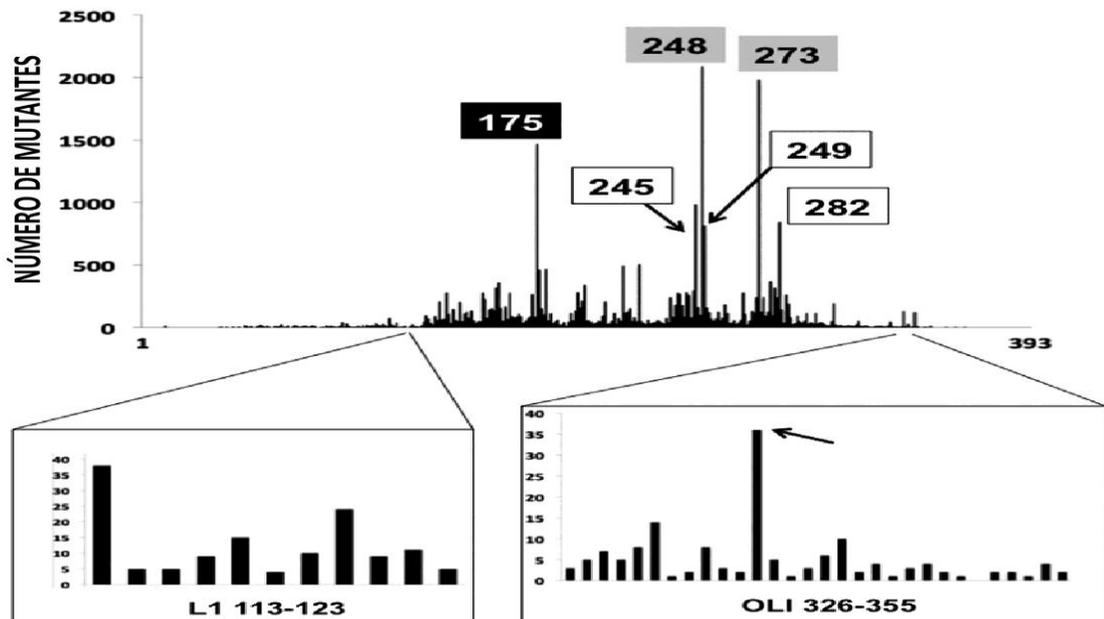


Figura 14 - Distribuição de mutações nos códons *hotspots* e *cold spots*. Acima, demonstrando a distribuição de mutações *missense*, ao longo da sequência de 393 aminoácidos da proteína p53 e os seis códons *hotspots* (175, 245, 248, 249, 273 e 282) mais frequentemente mutados no gene *TP53*. Abaixo na figura, está sendo demonstrado as duas regiões de menor frequência de mutação, conhecidas como *cold spots* (códons 113 a 123 e 326 a 355) (Adaptada: Soussi et al., 2011)¹⁴⁶.

Muitas destas regiões *hotspots*, estão localizadas em sítios CpGs. As citosinas dos sítios CpGs podem estar metiladas (5-metilcitosina). A 5-metilcitosina são propensas a fenômenos de desaminação espontânea (perda do grupamento amino exocíclico) transformando a citosina em timina¹⁸⁰. A sequência codificadora do gene *TP53* contém 42 dinucleótidos CpG que se encontram distribuídos ao longo dos éxons. A desaminação, e a perda de bases ocasiona mutações do tipo substituições¹⁴⁶.

Nos cânceres, 85,4% das mutações encontradas no gene *TP53* são substituições, e 14,6% são mutações mais complexas, como deleções e inserções (IARC 2010). Entre as mutações pontuais, transições G:C→A:T são mais frequentes, seguidas de transversões G:C→T:A e A:T→G:C. Aproximadamente 50% das transições G:C→A:T são em sítios CpG (Figura 15)^{181, 182}.

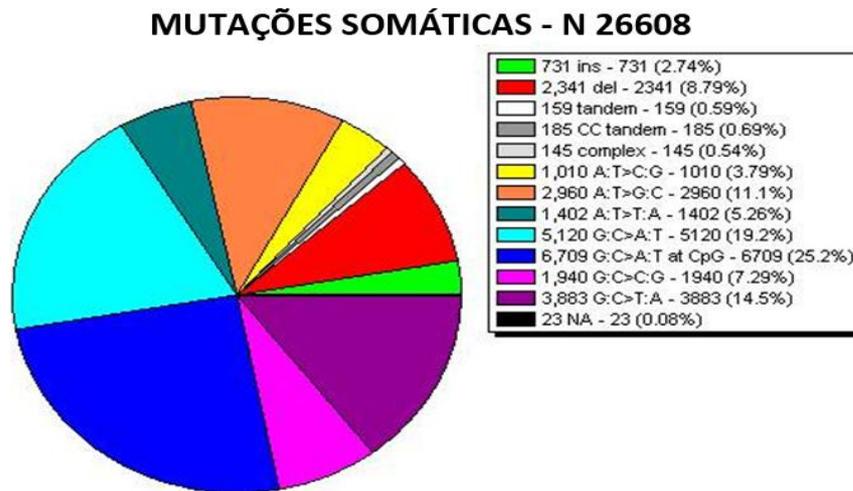


Figura 15 - Espectro de mutações do gene *TP53* no câncer humano¹⁸².

O gene *TP53* tem uma característica peculiar em comparação com outros genes supressores tumorais. Enquanto estes genes supressores são inativados por mutações *frameshift* ou *nonsense* levando à ausência de síntese da proteína, as mutações *missenses* no gene *TP53*, que são a maioria, conduzem à síntese de uma proteína anormal, acumulando-se na célula tumoral¹⁴⁶.

1.4.3.2 Mutações do gene *TP53* no CCE de esôfago

Tal como previamente descrito, o *TP53*, é o principal gene alterado no CE em geral⁴⁸. A prevalência de mutações em *TP53* no CCE de esôfago varia entre 40 e 50% dos casos¹³. O padrão de mutação mais observado no CCE de esôfago é caracterizado pela elevada incidência de mutações G:C→A:T (38,2%), G:C→T:A em sítios CpG (19,4%) e G:C→T:A (18,2%) (Figura 16)¹⁸²⁻¹⁸⁴. O efeito de mutação mais frequente no CCE de esôfago, é a mutação missense (69,4%), seguida em igual frequência (10,5%) pelas mutações *nonsense* e *frameshift* (Figura 17)¹⁸².

PADRÃO DE MUTAÇÃO/ 1201 mutações

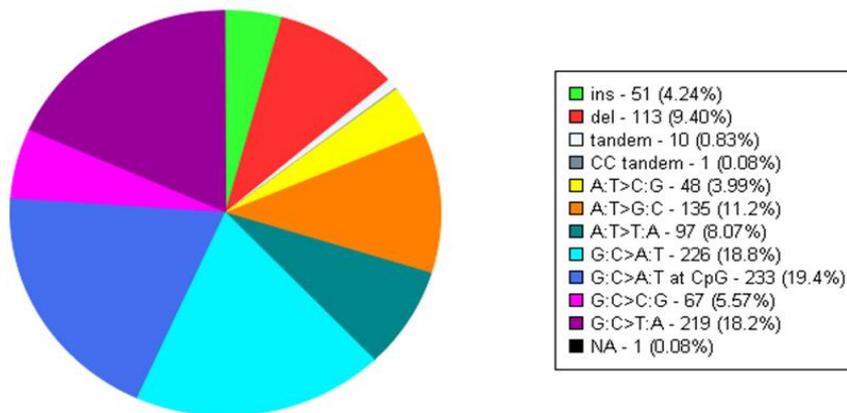


Figura 16 - Padrão de mutação no gene *TP53* no CCE de esôfago (IARC - R15, 2010)¹⁸².

EFEITO DE MUTAÇÃO/ 1201 mutações

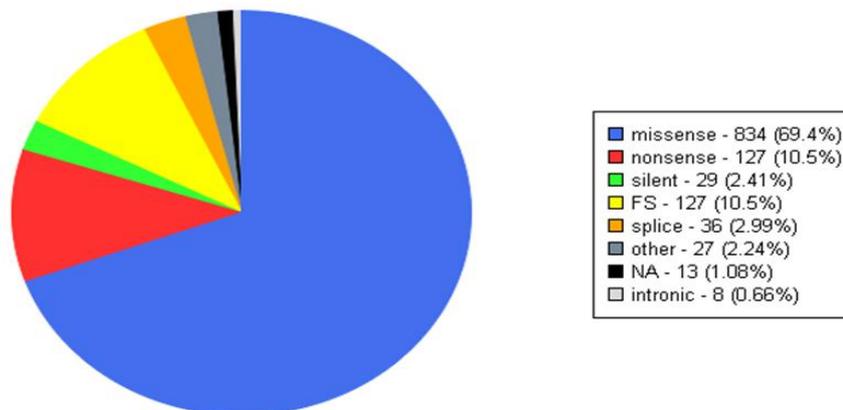


Figura 17 – Efeito de mutação no gene *TP53* no CCE de esôfago (IARC - R15, 2010)¹⁸².

Os códons de *TP53* mais mutados no CCE de esôfago são 170, 175, 179, 193, 220, 245, 248, 273 e 282. Com exceção dos códons 179, 193 e 220, os demais são *hotspots* de *TP53* observados em todos os tipos de câncer¹⁸² (Figura 18).

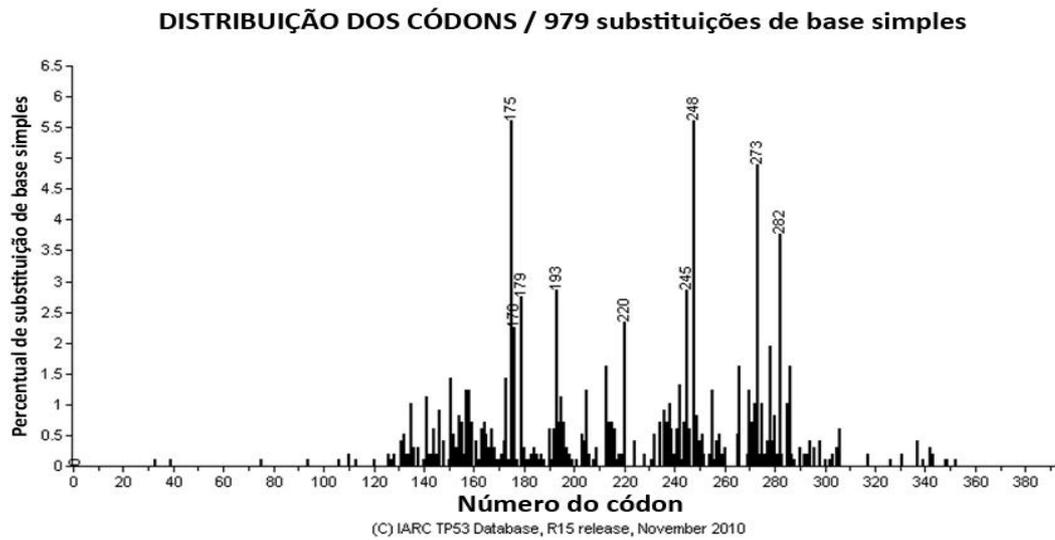


Figura 18 - Frequência de mutações em *TP53* no CCE de esôfago, com códons afetados (IARC - R15, 2010)¹⁸².

A análise do perfil de mutações no gene *TP53* pode indicar quais os carcinógenos que efetivamente contribuíram para a transformação maligna^{137, 139, 185, 186}. Assim, o seu estudo poderá fornecer informações quanto ao dano genotóxico e à sequência genética dos eventos que levam ao aparecimento de células tumorais, bem como auxiliar no diagnóstico e prognóstico⁴⁸.

1.5 Mecanismos fisiopatológicos e moleculares da carcinogênese de CCE de esôfago associado ao MEC

O mecanismo fisiopatológico de desenvolvimento de CCE em pacientes portadores de MEC está pouco esclarecido. Acredita-se que a inflamação crônica e o crescimento bacteriano desempenham um papel importante (Figura 19).

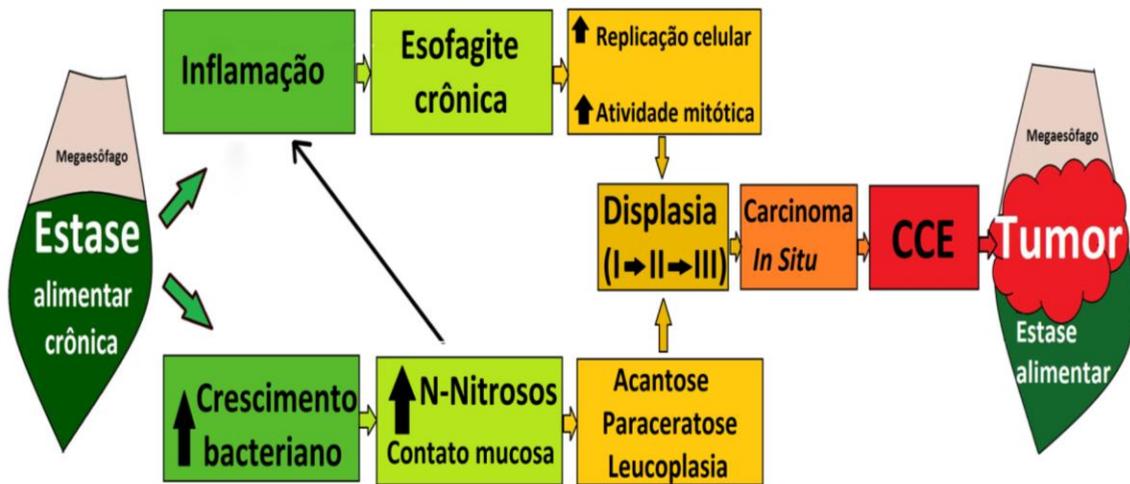


Figura 19 – Mecanismo evolutivo conhecidos da carcinogênese do CCE de esôfago de pacientes com MEC, mostrando a sequência de eventos relacionados com a inflamação e supercrescimento bacteriano.

O primeiro mecanismo estaria relacionado com o processo inflamatório crônico do epitélio consequente à irritação causada pelo conteúdo esofágico estagnado, em contato contínuo com a mucosa^{187, 188}. O processo inflamatório é difuso ao longo da superfície da mucosa esofágica e caracterizado por hiperplasia da camada basal, infiltrado linfocitário em lâmina própria (esofagite linfocítica por linfócitos CD3-positivo) e pela presença de centros germinativos proeminentes^{72, 189, 190}. Consequentemente, a inflamação da mucosa leva a ocorrência de esofagite crônica difusa^{191, 192}. A esofagite é mais frequente nas formas mais avançadas do megaesôfago, nos grupos III e IV da classificação de Resende¹²³, quando comparadas com os grupos I e II, podendo ocorrer em qualquer ponto da superfície mucosa e é considerada por muitos autores como lesão precursora do CE¹⁹³. Além disso, pode estar associada a alterações histológicas, como a atipia nuclear, caracterizada por aumento do tamanho do núcleo, núcleo hiper cromático e replicação celular aumentada (aumento da atividade mitótica), estabelecendo-se a lesão chamada de displasia ou neoplasia intra-epitelial^{191, 194, 195}. A neoplasia intra-epitelial pode ser classificada como grau I, II ou III, de acordo com a espessura do epitélio em que essas alterações são observadas, recebendo o nome de carcinoma *in situ* quando todo o epitélio está acometido, preservando a camada basal, e finalmente podendo evoluir para as formas avançada de CCE de esôfago¹⁹⁶.

O segundo mecanismo envolvido na carcinogênese de CCE de esôfago associado ao MEC está relacionado ao supercrescimento bacteriano decorrente da estase alimentar e salivar^{93, 94, 110, 115-118, 191, 197}. O CCE se instala com maior frequência em esôfago ectasiados

com longa história de disfagia, com tempo estimado entre 15 a 20 anos^{76, 198, 199}. A flora bacteriana encontrada no líquido de estase ou em fragmentos de biópsia dos pacientes portadores de MEC é constituída de microrganismos pertencentes à microbiota normal da boca e orofaringe, que proliferam em meio rico em nutrientes, pH em geral neutro e baixo potencial de oxido-redução o que favorece o crescimento de microrganismos anaeróbios e gram positivos²⁰⁰⁻²⁰³. Muitas destas Bactérias (*Staphylococcus sp*, *Corynebacterium sp*, *Peptostreptococcus sp* e a *Veillonella SP*) tem a capacidade de redução de nitratos a nitritos e a formação de compostos N-nitrosos^{200, 204}. Estas bactérias catalisam a metabolização de nitratos da dieta, levando à formação maciça de nitritos, que, por sua vez, reagem com aminas e amidas também provenientes da dieta e acumuladas no líquido de estase, levando à formação de compostos N-nitrosos^{72, 188, 204}. Estes compostos, são pré-cancerígenos, estáveis em pH fisiológico, sendo então incapazes de reagir com macromoléculas celulares. Após seu metabolismo, que visa transformar estes compostos lipofílicos em compostos mais hidrossolúveis, tornando-os mais passíveis de excreção, ocorre a formação de compostos extremamente instáveis, com uma meia-vida bastante curta e altamente reativos^{53, 54}. A ação bacteriana se faz através da enzima nitrato-redutase, presente também em outros gêneros constituintes da micobiota normal do trato gastrointestinal como a *Escherichia coli*²⁰⁵. A estase alimentar e supercrescimento bacteriano, juntamente com o contato crônico destes carcinógenos com a mucosa, provoca a inflamação da mucosa esofágica, a qual pode determinar o aparecimento de acantose, paraceratose e leucoplasia, predispondo à displasia epitelial e ao CCE de esôfago²⁰⁶. Sabe-se que a superexpressão e mutação do gene *TP53*, ocorrem em até 80% dos tumores esofágicos e parecem ocorrer precocemente no processo de carcinogênese, estando envolvida na sequência displasia – CCE de esôfago^{180, 207}. Entretanto, são escassos os estudos que analisam o envolvimento do gene *TP53* na carcinogênese, de pacientes com MEC, nem mesmo em pacientes com CCE de esôfago associado ao MEC.

Em resumo, a fisiopatologia do desenvolvimento de carcinoma de células escamosas (CCE) de esôfago associado ao megaesôfago chagásico (MEC) e as suas bases moleculares são uma incógnita. O seu conhecimento é fundamental para a identificação de biomarcadores que possam ser utilizados no diagnóstico precoce do câncer esofágico, prevenção e potencialmente utilizados como alvos para fármacos alvo-dirigidos.

OBJETIVOS

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Analisar as características clínicas e alterações moleculares do gene *TP53*, no CCE associado ao MEC e comparar com aquelas dos pacientes com CCE de esôfago sem MEC, e com aquelas dos pacientes com MEC sem CCE.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar o perfil epidemiológico e características clínico-patológicas dos 3 grupos de pacientes estudados.
2. Investigar a frequência e o perfil de mutações da região *hotspots* do gene *TP53*, éxons 5, 6, 7 e 8, nas amostras de esôfago dos 3 grupos de pacientes estudados.
3. Correlacionar o perfil epidemiológico e características clínico-patológicas com o perfil mutacional do gene *TP53* entre os 3 grupos de estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 Materiais e métodos

3.1 Desenho do estudo

Estudo retrospectivo, dividido em duas etapas: A primeira etapa foi estudar os dados epidemiológicos e clínico-patológicos, e uma segunda fase onde foi avaliado o status mutacional do gene *TP53*. O levantamento dos dados epidemiológicos e clínicos foi baseado em uma ficha coleta de dados contendo 362 itens (Anexo 1), incluindo características clínico-demográficas, fatores de risco para câncer de esôfago, história familiar de câncer, anatomo-patológico, exames laboratoriais, tratamento, seguimento, entre outros. Os dados coletados dos prontuários no Serviço de Arquivos Médicos e Estatística (SAME) em cada um dos hospitais foram transferidos para um único banco de dados. O estudo mutacional do gene *TP53* (éxons 5, 6, 7 e 8) foi realizado a partir de tecido parafinado dos pacientes selecionados no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos, São Paulo, Brasil e os resultados foram adicionados ao banco de dados.

Esta estudo faz parte de um projeto maior de caracterização molecular destes tumores e foi previamente analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos, sob o número 409/2010.

3.1.1 População do estudo

Foram incluídos 126 pacientes atendidos no Departamento de Cirurgia do Aparelho Digestivo de três Hospitais (Hospital Unversitário da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) em Uberaba/MG, Hospital de Câncer de Barretos (HCB) em Barretos/SP e Hospital Unversitário da Universidade Estadual de São Paulo – Unesp, Câmpus de Botucatu/SP) entre 1990 e 2012.

3.1.2 Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão

- **Grupo 1** (carcinoma de células escamosas - CCE): 59 pacientes com confirmação histopatológica de CCE de esôfago sem associação com megaesôfago e serologia negativa para Chagas.
- **Grupo 2** (megaesôfago chagásico - MEC): 34 pacientes com confirmação histopatológica e radiológica de MEC sem associação com CCE de esôfago e serologia positiva para Chagas.
- **Grupo 3** (carcinoma de células escamosas associado ao megaesôfago chagásico - CCE/MEC): 33 pacientes com confirmação histopatológica de CCE de esôfago associado ao MEC (histopatológica e radiológica) e serologia positiva para Chagas.

Critérios de exclusão:

- Ausência do exame sorológico de Chagas.
- Pacientes sem exame de imagem (tomografia de tórax, seriografia de esôfago e/ou endoscopia), para comprovar ou afastar o MEC.
- Prontuários extraviados.

Para o estudo mutacional do gene *TP53*, os critérios de exclusão foram:

- Ausência de blocos de parafina insuficiente ou impróprio para extração do DNA.

A população do estudo foi dividida em 3 grupos como detalhado na Tabela 4.

TABELA 4 – Número de pacientes e seus respectivos hospitais de origem dos 3 grupos incluídos no estudo

Grupo	Patologia	HCB-SP	UFTM-MG	UNESP-SP	Total de casos
1	CCE	59 (40)*	0 (0)*	0 (0)*	59 (40)*
2	MEC	2 (1)*	32 (28)*	0 (0)*	34 (29)*
3	CCE/MEC	21 (20)*	2 (1)*	10 (10)*	33 (31)*

*Número de casos selecionados para o estudo mutacional do gene *TP53*.

3.2 Métodos

3.2.1 Amostras

As amostras de parafina dos pacientes selecionados para estudo mutacional do gene *TP53* foram reavaliadas por um patologista experiente para confirmação do diagnóstico e delimitação da área de interesse para macrodissecção. A partir dos blocos selecionados foram realizados 5 cortes de 10 micra de espessura para extração de DNA.

3.2.2 Extração e quantificação de DNA

A extração do DNA foi realizada com o “kit” *QIAamp DNA Microkit® (Qiagen)*, conforme normas do fabricante e a metodologia previamente descrita pelo grupo²⁰⁸. Para a macrodissecção da área de interesse utilizou a lâmina de H&E, previamente avaliada pelo patologista como molde. Ao material macrodissecado foi adicionado 80 µL de tampão ATL, 1 µL de *RNA Carrier* (1 µL /µL) e 15 µL de proteinase K, seguindo incubação *overnight* à 56°C. Após a lise completa, a proteinase K foi inativada à 98°C. E posteriormente foram adicionados 110 µL de tampão AL e 110 µL de etanol a 100%, para precipitação do DNA. Em

seguida o DNA foi transferido para uma coluna *QIAamp DNA Microkit*[®] e lavado com reagentes fornecidos pelo próprio “kit”. Por fim o DNA foi eluído em 50 µL de água “ultra pura” (*nuclease free*) e quantificada no espectrofotômetro *NanoDrop 2000*[®]. A solução estoque foi armazenada à -20°C.

3.2.3 Análise de mutações do gene *TP53*

O estudo dos *hotspots* do gene *TP53* (éxon 5, 6, 7 e 8) foi realizado através da técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction* - PCR), com *primers* específicos, seguido de sequenciamento direto dos produtos de PCR.

3.2.4 Reação em cadeia da polimerase – PCR

A técnica de PCR para os éxons 5 (245 pb), 6 (213 pb), 7 (233 pb) e 8 (210 pb) foi realizado conforme previamente descrito pelo grupo²⁰⁸. As temperaturas de anelamento e a sequência de cada *primer* estão apresentadas na Tabela 5.

A reação de PCR seguiu as seguintes condições: 1X tampão, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de mistura de *dNTPs* (*dATP*, *dCTP*, *dGTP* e *dTTP*), 0,5U de *Taq* DNA polimerase (*QIAamp DNA Microkit*[®] - *Qiagen*), 0,3 µM de cada *primers* (*forward* e *reverse*), 1 µL do DNA extraído para volume final de reação de 15 µL. A ciclagem foi realizada no termociclador *Veriti*[®] 96-Well.

TABELA 5 - *Primers* utilizados e condições de reação de PCR para amplificação dos éxons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53*²⁰⁸

Éxon	Primer	Sequência	Anelamento
5	<i>Forward</i>	5'TTATCTGTTCACTTGTGCC3'	57°C/ 4 seg
	<i>Reverse</i>	5'GGGAACCGTTGGTCGGGAC3'	
6	<i>Forward</i>	5'AGACGACAGGGCTGGTTGCCAGGGT3'	56°C/ 45 seg
	<i>Reverse</i>	5'AATTGGGGAGGAGGGTCTCT3'	
7	<i>Forward</i>	5'ACTGGCCTCATCTTGGGCCT3'	57°C/ 45 seg
	<i>Reverse</i>	5'ACACGTCCCACCGTTCACCG3'	
8	<i>Forward</i>	5'TAAATGGGACAGGTAGGACC3'	56°C/ 45 seg
	<i>Reverse</i>	5'GGAGGTGGCGAAGAACAGGACG3'	

A - Adenina; C - Citosina; G - Guanina; T - Timina.

3.2.5 Avaliação do produto de PCR em gel de agarose

A eletroforese foi realizada em gel de agarose à 1,5% corado com corante fluorescente atóxico *GelRed*[®]. A imagem das bandas do produto de PCR no gel foram capturadas pelo equipamento Transiluminador UVB LTB-20x20HE (Loccus Technology).

3.2.6 Sequenciamento

Após análise dos produtos de PCR em gel de agarose, cada amostra foi sequenciada tanto no sentido *sense* como *anti-sense* dos éxons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53*, conforme orientação do fabricante.

Resumidamente, a técnica seguiu os seguintes passos e condições: os produtos de PCR foram purificados com *EXOSAP-IT* (*GE Technology*) e em seguida, submetidos a uma reação de sequenciamento, utilizando de *BigDye*[®] *Terminator v3.1* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*). Por fim, o produto da reação de sequenciamento foi purificado e ressuspendido em formamida *HiDi* (*Applied Biosystems*). O sequenciamento foi realizado

pelo sequenciador *3500 series Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, USA)*. As sequências foram analisadas em comparação com à sequência de referência do gene *TP53* (Ensembl – ENSG00000141510).

3.2.7 Análise estatística

As informações obtidas dos prontuários foram transcritas para a ficha de coleta, digitadas no banco de dados (*SPSS - Statistical Package for Social Science – SPSS for Windows, versão 19.0*) para análise estatística.

A caracterização da população de estudo, incluindo os resultados demográficos, clínicos, *performance status*, anatomopatológico, tratamento, seguimento e dados moleculares, foram realizadas por meio de estatística descritiva (média e desvio-padrão, mediana, porcentagens), sendo apresentadas em forma de Tabelas.

As associações das variáveis qualitativas foram feitas com testes de associação pelo qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Na análise das variáveis quantitativas foram utilizadas a análise de variância (na comparação de 3 grupos) e teste T-Student (na comparação de 2 grupos), assumindo-se níveis de significância de 5%.

A sobrevida global dos 3 grupos de pacientes foi calculada empregando-se o estimador de produto limite de Kaplan-Meier, usando o teste de *long-rank* para a comparação entre as curvas de sobrevida.

RESULTADOS

4 Resultados

4.1 Caracterização epidemiológica e clínico-patológica

4.1.1 Características gerais e demográficas

A casuística do estudo foi composta de 126 pacientes selecionados em três hospitais referências no tratamento em patologias de esôfago, dois no Estado de São Paulo - Hospital de Câncer de Barretos/HCB e Universidade Estadual Paulista em Botucatu/UNESP e um em Minas Gerais - Universidade Federal do Triângulo Mineiro/UFTM em Uberaba. Os pacientes foram divididos em 3 grupos: carcinoma de células escamosas (CCE) do esôfago; megaesôfago chagásico (MEC) e carcinoma de células escamosas (CCE) do esôfago em pacientes com megaesôfago chagásico (CCE/MEC), como apresentado na Tabela 6. Os indivíduos do grupo MEC apresentaram idade inferior no momento do tratamento ($p=0,027$). Houve associação estatisticamente significativa entre história familiar e o grupo de pacientes, com uma menor frequência no grupo MEC em comparação aos outros 2 grupos ($p=0,004$) (Tabela 6).

TABELA 6 – Características gerais entre os pacientes do estudo

Variável	Categoria	Grupos (N=126)			P
		CCE (N=59)	MEC (N=34)	CCE/MEC (N=33)	
Sexo:	Masculino	50 (84,7%)	29 (85,3%)	29 (87,9%)	0,948 ^(a)
	Feminino	9 (15,3%)	5 (14,7%)	4 (12,1%)	
Idade (anos):	Média (DP)	58,2 (9,6)	52,85 (10,0)	58,43 (9,9)	0,027 ^(b)
	Mínimo-máximo	36-76	35-70	37-76	
HFC ⁽¹⁾ :	Não	18 (37,5%)	9 (90,0%)	3 (25,0%)	0,004 ^(c)
	Sim	30 (62,5%)	1 (10,0%)	9 (75,0%)	

⁽¹⁾ HFC - História familiar de câncer (parentesco consanguíneo até o quarto grau); ^(a) Teste exato de Fisher; ^(b) Análise de Variância; ^(c) Teste de associação pelo qui-quadrado; N – Casuística; DP – Desvio padrão; CCE - Carcinoma de células escamosas; MEC - Megaesôfago chagásico.

O local de nascimento e residência atual dos grupos do estudo encontram-se evidenciados na Figura 20.

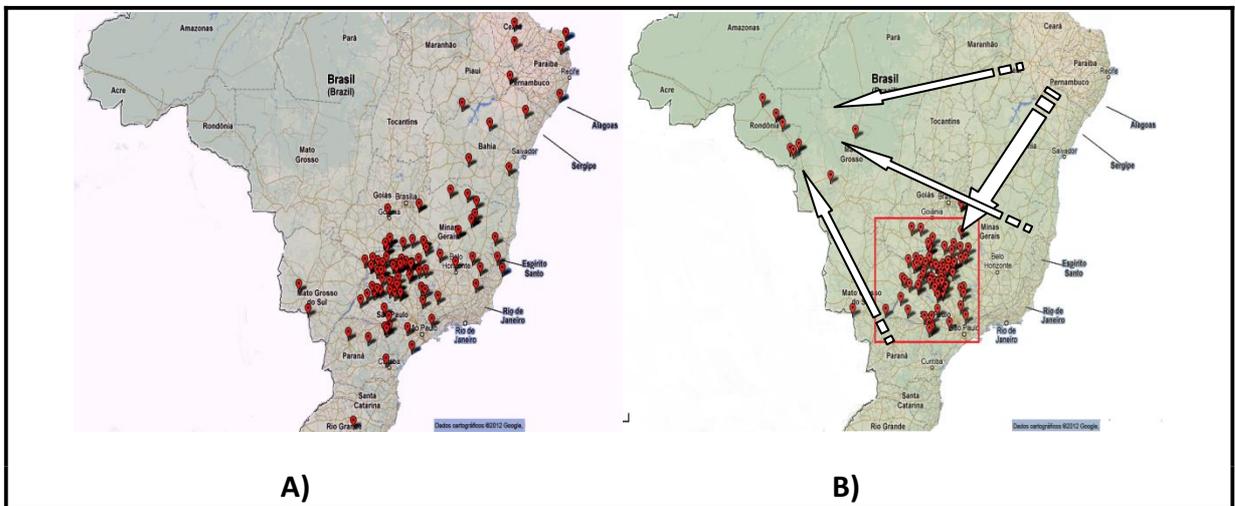


Figura 20 – A) Mapa do território Brasileiro, apresentando todos os pacientes do estudo e localização de sua naturalidade. B) Representa o endereço atual dos pacientes, no momento do diagnóstico, com as rotas migratórias (setas) para o Sudeste (SP e MG), Norte (Rondônia), Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul). A Região Sudeste (Norte, Noroeste e Sudoeste do Estado de SP e Triângulo Mineiro, MG) está demarcada de vermelho, local de maior concentração de pacientes deste estudo.

4.1.2 Fatores de risco e características clínicas

A distribuição dos pacientes baseada nos principais fatores de risco relacionados à carcinogênese do esôfago e do megaesôfago chagásico está resumida na Tabela 7. Houve uma associação significativa entre o tabagismo ($p=0,003$), etilismo ($p<0,001$), e esofagite ($p<0,001$) com os grupos do estudo. Por outro lado, não foi observada associação significativa entre os grupos MEC e CCE/MEC em relação à classificação do megaesôfago.

TABELA 7 – Associação entre os fatores de risco e os diferentes grupos

Variável	Categoria	Grupos			p
		CCE	MEC	CCE/MEC	
Tabagismo:	Nunca fumou	7 (11,9%)	14 (43,8%)	7 (22,6%)	0,003 ^(c)
	Fumou	52 (88,1%)	18 (56,2%)	24 (77,4%)	
Carga tabágica:	Nunca fumou	7 (13,5%)	14 (51,9%)	7 (25,0%)	0,006 ^(c)
	< 20 maços-ano ¹⁸⁶	12 (23,1%)	5 (18,5%)	7 (25,0%)	
	≥ 20 maços-ano ¹⁸⁶	33 (63,5%)	8 (29,6%)	14 (50,0%)	
Etilismo:	Nunca bebeu	11 (18,6%)	20 (64,5%)	5 (16,1%)	<0,001 ^(c)
	Bebeu	48 (81,4%)	11 (35,5%)	25 (83,3%)	
Carga etílica:	Nunca bebeu	10 (18,9%)	20 (66,7%)	5 (20,0%)	< 0,001 ^(c)
	< 80 g etanol/dia ⁴¹	10 (18,9%)	5 (16,7%)	8 (32,0%)	
	≥ 80 g etanol/dia ⁴¹	31 (58,5%)	5 (16,7%)	12 (48,0%)	
Megaesôfago:	Grau I e II ¹²³	NA	4(11,8%)	6 (27,3%)	0,167 ^(a)
	Grau III e IV/Dólico ¹²³	NA	30(88,2%)	16 (72,7%)	
Procedimento na TEG:	Não	54 (96,4%)	14 (41,2%)	16 (53,3%)	<0,001 ^(c)
	Sim	2 (3,6%)	20 (58,8%)	14 (46,7%)	
Hérnia de hiato:	Não	46(82,1%)	30 (93,8%)	27 (93,1%)	0,213 ^(a)
	Sim	10 (17,9%)	2 (6,2%)	2 (6,9%)	
Esofagite ou RGE	Não	35 (79,5%)	3 (18,8%)	22 (81,5%)	<0,001 ^(c)
	Sim	9 (22,0%)	13 (81,3%)	5 (18,5%)	

^(a)Teste exato de Fisher; ^(c)Teste de associação pelo qui-quadrado; RGE – Refluxo Gastroesofágico; Dólico – Dolicomegaesôfago; TEG – Transição esôfago-gástrica; CCE - Carcinoma de células escamosas; MEC - Megaesôfago chagásico; NA – Não aplicável.

As co-morbidades mais frequentes no momento do diagnóstico foram pneumopatia, cardiopatia não hipertensiva e hipertensão arterial sistêmica. A Tabela 8 mostra a prevalência e a associação de cada uma destas co-morbidades nos 3 grupos de estudo.

TABELA 8 – Associação entre as co-morbidades e os diferentes grupos

Variável	Categoria	Grupos			p
		CCE	MEC	CCE/MEC	
Pneumopatias:	Não	23 (41,8%)	26 (76,5%)	11 (36,7%)	0,002 ^(c)
	Sim	32 (58,2%)	8 (23,5%)	19 (63,3%)	
Cardiopatias não hipertensiva:	Não	48 (84,2%)	10 (29,4%)	12 (42,9%)	< 0,001 ^(c)
	Sim	9 (15,8%)	24 (70,6%)	16 (57,1%)	
Hipertensão arterial:	Não	36 (63,2%)	28 (82,4%)	19 (65,5%)	0,141 ^(c)
	Sim	21 (36,8%)	6 (17,6%)	10 (34,5%)	

^(c)Teste de associação pelo qui-quadrado; CCE - Carcinoma de células escamosas; MEC - Megaesôfago chagásico.

Os sintomas mais frequentes, no momento do diagnóstico, associados às patologias estudadas e o intervalo de tempo do início dos sintomas ao diagnóstico e a *performance status* estão apresentados nas Tabelas 9 e 10. O grupo CCE/MEC teve um tempo estimado a

partir do diagnóstico do megaesôfago. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre as médias de tempo de início dos sintomas dos três grupos ($p < 0.001$). Foram encontradas diferenças significativas nas frequências dos sintomas de regurgitação ($p < 0,001$), astenia ($p < 0,001$), epigastralgia ($p = 0,047$), inapetência ($p = 0,007$), e pirose ($p = 0,018$) entre os grupos.

TABELA 9 – Associação entre os sintomas e os diferentes grupos

Variável	Categoria	Grupos			p
		CCE	MEC	CCE/MEC	
Tempo (meses):	Média (DP)	4,2 (4,7)	157,8 (145,3)	34,1 (67,4)	< 0,001 ^(b)
	Mínimo-máximo	1-24	8 – 480	1-240	
Disfagia	Não	4 (7,1%)	0 (0%)	1 (3,3%)	0,312 ^(a)
	Sim	52 (92,9%)	34 (100,0%)	29 (96,7%)	
Perda de peso	Não	9 (16,1%)	5 (14,7%)	2 (6,9%)	0,442 ^(a)
	Sim	47 (83,9%)	29 (85,3%)	27 (93,1%)	
Regurgitação	Não	43 (79,6%)	3 (9,1%)	25 (86,2%)	< 0,001 ^(c)
	Sim	11 (20,4%)	30 (90,9%)	4 (13,8%)	
Astenia	Não	22 (39,3%)	27 (79,4%)	15 (50,0%)	0,001 ^(c)
	Sim	34 (60,7%)	7 (20,6%)	15 (50,0%)	
Epigastralgia	Não	32 (58,2%)	21 (61,8%)	25 (83,3%)	0,047 ^(c)
	Sim	23 (41,8%)	13 (38,2%)	5 (16,7%)	
Inapetência	Não	35 (62,5%)	29 (87,9%)	16 (53,3%)	0,007 ^(c)
	Sim	21 (37,5%)	4 (12,1%)	14 (46,7%)	
Pirose / azia	Não	39 (73,6%)	20 (58,8%)	27 (90,0%)	0,018 ^(c)
	Sim	14 (26,4%)	14 (41,2%)	3 (10,0%)	

^(a)Teste exato de Fisher; ^(b)Análise de Variância; ^(c)Teste de associação pelo qui-quadrado; CCE - Carcinoma de células escamosas; MEC - Megaesôfago chagásico.

TABELA 10 – Associação entre o *Performance status* e os grupos de pacientes

Variável	Categoria	Grupos			p
		CCE	MEC	CCE/MEC	
<i>Status físico</i> (classificação ASA) ²⁰⁹	I	7 (12,3%)	4 (12,1%)	7 (25,9%)	0,009 ^(a)
	II	38 (66,7%)	25 (75,8%)	9 (33,3%)	
	III	11 (19,3%)	4 (12,1%)	7 (25,9%)	
	IV	1 (1,8%)	0 (0%)	4 (14,8%)	
<i>Status nutricional</i> (IMC) ²¹⁰	Sobrepeso ($\geq 25 \text{ kg/m}^2$)	12 (21,8%)	0 (0%)	3 (10,7%)	0,037 ^(c)
	Eutrófico ($\geq 18 \text{ kg/m}^2$ e $< 25 \text{ kg/m}^2$)	27 (49,1%)	18 (56,2%)	14 (50,0%)	
	Desnutrição ($< 18 \text{ kg/m}^2$)	16 (29,1%)	14 (43,8%)	11 (39,3%)	
<i>Status funcional</i> (Karnofsky) ²¹¹ %:	>70	52 (88,1%)	34 (100,0%)	23 (74,2%)	0,001 ^(a)
	≤ 70	7 (11,9%)	0 (0%)	8 (25,8%)	

^(a)Teste exato de Fisher; ^(c)Teste de associação pelo qui-quadrado; CCE - Carcinoma de células escamosas; MEC - Megaesôfago chagásico.

Todos os pacientes foram re-estadiados de acordo com as últimas normas do estadiamento TNM, 7ª edição da UICC (2010)⁷⁹, utilizando parâmetros clínicos e/ou anatomopatológicos. A prevalência de estadios entre os pacientes dos grupos CCE e CCE/MEC encontra-se resumida na Tabela 11. Não houve associação entre o estadiamento e os grupos de pacientes estudados ($p=0,393$).

TABELA 11 – Associação entre o estadiamento (TNM) e os grupos de pacientes

Variável	Categoria	Grupos			p
		CCE	MEC	CCE/MEC	
Classificação (T) ⁷⁹	T1/T2	15 (25,9%)	NA	6 (20,0%)	0,541 ^(c)
	T3/T4	43 (74,1%)	NA	24 (80,0%)	
Classificação(N) ⁷⁹	N0/N1	36 (63,2%)	NA	17 (60,7%)	0,827 ^(c)
	N2/N3	21 (36,8%)	NA	11 (39,3%)	
Classificação (M) ⁷⁹	M0	35 (60,3%)	NA	20 (60,9%)	0,432 ^(c)
	M1	23 (39,7%)	NA	9 (31,0%)	
Classificação (TNM) ⁷⁹	I	10 (17,2%)	NA	3 (9,7%)	0,393 ^(a)
	II	7 (12,1%)	NA	4 (12,9%)	
	III	18 (31,0%)	NA	15 (48,4%)	
	IV	23 (39,7%)	NA	9 (29,0%)	

^(a) Teste exato de Fisher; ^(c) Teste qui-quadrado; (T) - Tumor primário; (N) - Linfonodos regionais; (M) - Metástases à distância; (TNM) - Estadio clínico-patológico, NA – Não aplicável; CCE - Carcinoma de células escamosas; MEC - Megaesôfago chagásico.

4.1.3 Características endoscópicas, radiológicas e anatomo-patológicas

As frequências referentes às características tumorais dos grupos CCE e CCE/MEC estão descritas na Tabela 12. O tamanho tumoral foi considerado em centímetros (cm), avaliado por medida endoscópica, e quando não foi possível progredir o endoscópio devido à estenose causada pelo tumor, foi considerado o maior eixo tumoral avaliado pela tomografia ou pela descrição do anatomopatológico da peça cirúrgica. A presença de tumor sincrônico foi associada significativamente com os grupos de pacientes ($p=0,018$).

TABELA 12 – Associação entre as características do tumor e os grupos CCE e CCE/MEC

Variável	Categoria	Grupos			p
		CCE	MEC	CCE/MEC	
Localização do tumor	Esôfago cervical	2 (3,4%)	NA	2 (6,1%)	0,327 ^(a)
	Torácico proximal	8 (13,6%)	NA	9 (27,3%)	
	Torácico médio	29 (49,2%)	NA	14 (42,4%)	
	Torácico distal	20 (33,9%)	NA	8 (24,2%)	
Tamanho do tumor (cm)	Média (DP)	6,6 (3,3)	NA	6,2 (3,0)	0,649 ^(d)
	Mínimo-máximo	0 – 14	NA	0 – 15	
Circunferência tumoral (%)	Média (DP)	79% (23,4%)	NA	83,4% (20,3%)	0,425 ^(d)
	Mínimo-máximo	20,0% - 100,0%	NA	(50,0% - 100,0%)	
TSE	Não	37 (69,8%)	NA	26 (92,9%)	0,018 ^(c)
	Sim	16 (30,2%)	NA	2 (7,1%)	

^(a)Teste exato de Fisher; ^(c)Teste de associação pelo qui-quadrado; ^(d)Teste T-de Student; NA - Não aplicável; CCE - Carcinoma de células escamosas; MEC - Megaesôfago chagásico; TSE - Tumor sincrônico no esôfago; Esôfago cervical: 15-20 cm; Torácico proximal: 20-25 cm; Torácico médio: 25-30 cm; Torácico distal: 30-40 cm.

Características e as associações patológicas, como a disseminação e diferenciação tumoral nos 3 grupos de estudo são apresentadas na Tabela 13. Não houve qualquer associação estatisticamente significativa.

TABELA 13 – Associação entre as características patológicas e os 3 grupos de pacientes

Variável	Categoria	Grupos			p
		CCE	MEC	CCE/MEC	
Disseminação mais comum ⁽¹⁾ :	Linfonodal (mediastino):				
	Não	31 (52,5%)	NA	17 (56,7%)	0,712 ^(c)
	Sim	28 (47,5%)	NA	13 (43,3%)	
	Órgãos (Pulmão/pleura):				
Não	48 (81,4%)	NA	25 (83,3%)	0,818 ^(c)	
Sim	11 (18,6%)	NA	5 (16,7%)		
Diferenciação tumoral:	Bem dif. (Grau I)	3 (14,3%)	NA	3 (30,0%)	0,660 ^(a)
	Mod. dif. (Grau II)	16 (76,2%)	NA	6 (60,0%)	
	Pouco dif. (Grau III)	2 (9,5%)	NA	1 (10%)	

^(a)Teste exato de Fisher; ^(c)Teste qui-quadrado; ⁽¹⁾Foram utilizados dados anatomopatológicos e tomográficos; Dif. - Diferenciado; Mod.- moderadamente; NA - Não aplicável; CCE - Carcinoma de células escamosas; MEC - Megaesôfago chagásico.

4.1.4 Tratamento e seguimento

Para o presente estudo foram selecionados preferencialmente os pacientes do grupo CCE e MEC que já tinham recebido tratamento cirúrgico, com objetivo de obter material biológico para posterior estudo molecular. Diferentemente, todos os pacientes do grupo CCE/MEC foram incluídos devido à raridade da patologia, sendo que a maioria dos casos de CCE/MEC foram tratados paliativamente (Tabela 14).

TABELA 14 – Associação entre as modalidades de tratamento e *status* clínico atual e os grupos de pacientes

Variável	Categoria	Grupos			p
		CCE	MEC	CCE/MEC	
Tratamento:	Esfagectomia exclusiva	23 (39,0%)	34 (100,0%)	8 (24,2%)	< 0,001 ^(c)
	Paliativo (CR/RT/QT/CL)	36 (61,0%)	0 (0%)	25 (75,8%)	
<i>Status</i> clínico atual da doença ⁽⁴⁾ :	Vivo sem doença	13 (22,0%)	27 (79,4%)	2 (6,5%)	< 0,001 ^(c)
	Vivo com doença	19 (32,2%)	0 (0%)	9 (29,0%)	
	Óbito pela doença	26 (44,1%)	0 (0%)	20 (64,5%)	
	Óbito por outras causas	1 (1,7%)	7 (20,6%)	0 (0%)	

^(c) Teste de associação pelo qui-quadrado; ⁽⁴⁾ “Doença” significa (megaesôfago chagásico ou câncer de esôfago ou associação das duas enfermidades no grupo dos pacientes com CCE/MEC); CR – Cirurgia; RT – Radioterapia; QT – Quimioterapia; CL – Clínico; CCE - Carcinoma de células escamosas; MEC - Megaesôfago chagásico.

A sobrevida global foi estimada para o grupo CCE pelo período de tempo em meses decorrido entre a data do diagnóstico anatomopatológico e a data do óbito ou da última informação no seguimento dos pacientes. Para os outros dois grupos com MEC e CCE/MEC, o período de tempo foi o decorrido entre a data do diagnóstico de megaesôfago e a data do óbito ou da última informação no seguimento. A análise da curva de sobrevida de Kaplan-Meier revelou que há diferença estatisticamente significativa entre os grupos (CCE, MEC e CCE/MEC) ($p < 0,001$) (Figura 21).

A Figura 22 mostra a relação da sobrevida global no grupo CCE/MEC tendo como início o momento do diagnóstico da neoplasia e a data do óbito ou a última informação comparado à sobrevida os pacientes com CCE.

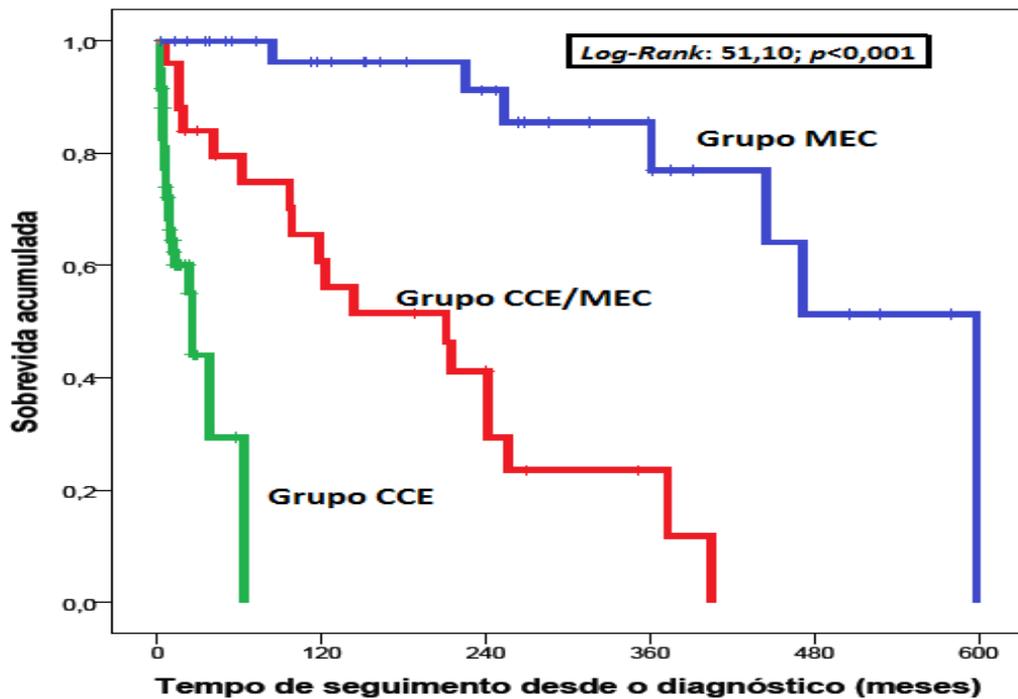


Figura 21 – Curva de Kaplan-Meier para avaliação da probabilidade estimada de sobrevida global, em relação ao tempo de seguimento em doentes com CCE, MEC e CCE/MEC (a partir do diagnóstico do megaesôfago).

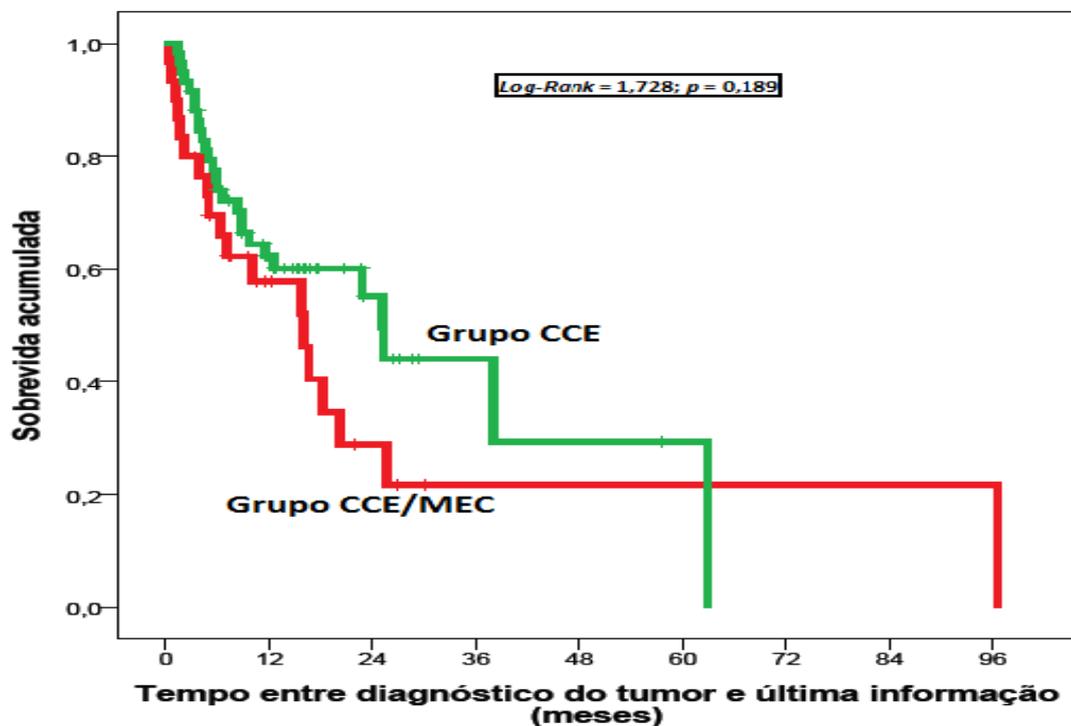


Figura 22 – Curva de Kaplan-Meier para avaliação da probabilidade estimada de sobrevida global, em relação ao tempo de seguimento em doentes com CCE e CCE/MEC (a partir do diagnóstico do tumor e não do megaesôfago).

4.2 Caracterização molecular

4.2.1 Perfil de mutações do gene *TP53*

A partir dos 126 pacientes incluídos para a caracterização epidemiológica e clínico-patológica, 16 casos foram excluídos para a análise mutacional de *TP53* devido à ausência de material biológico adequado. Dos 110 pacientes incluídos para análise mutacional, a taxa de sucesso de genotipagem foi de 90%, o que possibilitou determinar a frequência de mutação em 100 casos (Tabela 15, Figura 23).

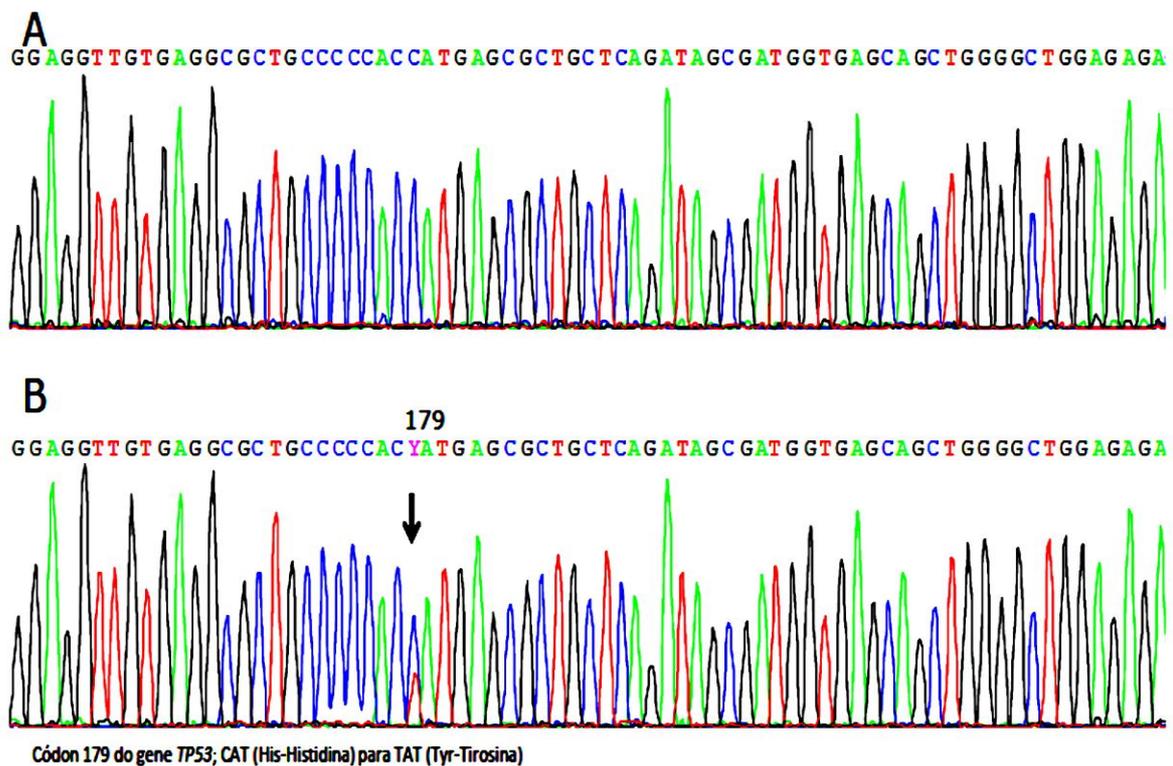


Figura 23 - Modelo esquemático dos eletroferogramas resultantes do sequenciamento direto do gene *TP53*. A) sequência *Wild-type* (selvagem); B) sequência mutada - códon 179 do gene *TP53*, CAT (His – histidina) para TAT (Tyr – tirosina).

TABELA 15 – Perfil de mutação do gene *TP53* nos 3 grupos de pacientes

Grupo	Nº DNA	Éxon	Nº códon	Códon (WT→Mut)	Tipo de mutação	Aminoácidos (WT → Mut)	Natureza da mutação
CCE	2	8	273*	CGT→CTT	G:C→T:A	Arg → Leu	<i>Missense</i>
	3	8	282*	CGG→TGG	G:C→A:T (CpG)	Arg → Trp	<i>Missense</i>
	7	6	196	CGA→TGA	G:C→A:T	Arg → Stop	<i>Nonsense</i>
	9	5	151	CCC→TCC	G:C→A:T	Pro → Ser	<i>Missense</i>
	10	5	164	AAG→AAA	G:C→A:T	Lys → Lys	Silenciosa
		6	217	GTG→GTA	G:C→A:T	Val → Val	Silenciosa
	11	6	220	TAT→TGT	A:T→G:C	Tyr → Cys	<i>Missense</i>
	14	5	151	CCC→CAC	G:C→T:A	Pro → His	<i>Missense</i>
		6	213	CGA→CGG	A:T→G:C	Arg → Arg	Silenciosa
	16	8	279	GGG→GGA	G:C→A:T	Gly → Gly	Silenciosa
			285	GAG→AAG	G:C→A:T	Glu → Lys	<i>Missense</i>
	17	8	275	TGT→TTT	G:C→T:A	Cys → Phe	<i>Missense</i>
	18	8	275	TGT→TTT	G:C→T:A	Cys → Phe	<i>Missense</i>
	22	8	275	TGT→TTT	G:C→T:A	Cys → Phe	<i>Missense</i>
	24	8	273*	CGT→TGT	G:C→A:T	Arg → Cys	<i>Missense</i>
	26	8	286	GAA→GTA	A:T→T:A	Glu → Val	<i>Missense</i>
	27	8	280	AGA→AGC	A:T→C:G	Arg → Ser	<i>Missense</i>
	32	8	298	GAG→TAG	G:C→T:A	Glu→Stop	<i>Nonsense</i>
	34	7	248*	CGG→CAG	G:C→A:T (CpG)	Arg → Gln	<i>Missense</i>
	37	5	179	CAT→TAT	G:C→A:T	His → Tyr	<i>Missense</i>
38	7	248*	CGG→TGG	G:C→A:T (CpG)	Arg → Trp	<i>Missense</i>	
43	5	167	del 1pb	del	Gln → NA	<i>Frameshift</i>	
MEC	74	6	204	GAG→AAG	G:C→A:T	Glu → Lys	<i>Missense</i>
	84	5	151	CCC→CCT	G:C→A:T	Pro → Pro	Silenciosa
		6	273*	CGA→TGA	G:C→A:T	Arg → Stop	<i>Nonsense</i>
	87	6	218	GTG→ATG	G:C→A:T	Val → Met	<i>Missense</i>
	88	6	192	CAG→CAA	G:C→A:T	Glu → Glu	Silenciosa
	94	6	210	AAC→AAT	G:C→A:T	Asn → Asn	Silenciosa
	98	5	185	AGC→AGT	G:C→A:T	Ser → Ser	Silenciosa
103	6	195	ATC→ATT	G:C→A:T	Ile → Ile	Silenciosa	
CCE/MEC	40	8	282*	CGG→TGG	G:C→A:T (CpG)	Arg → Trp	<i>Missense</i>
	114	5	141	TGC→TAC	G:C→T:A	Cys → Tyr	<i>Missense</i>
	120	6	196	del 1 pb	del	Arg → NA	<i>Frameshift</i>
	121	5	145	CTG→CAG	A:T→T:A	Leu → Glu	<i>Missense</i>
	122	6	195	ATC→TTC	A:T→T:A	Ile → Phe	<i>Missense</i>
	123	5	157	GTC→TTC	G:C→T:A	Val → Phe	<i>Missense</i>
	124	8	306	CGA→TGA	G:C→A:T	Arg → Stop	<i>Nonsense</i>
	125	6	214	del 2 pb	del	His → NA	<i>Frameshift</i>
	128	8	272	GTG→GAG	A:T→T:A	Val → Glu	<i>Missense</i>
	129	5	132	AAG→AGG	A:T→G:C	Lys → Arg	<i>Missense</i>
		8	267	del 1 pb	del	Arg → NA	<i>Frameshift</i>
	130	5	172	GTT→TTT	G:C→T:A	Val → Phe	<i>Missense</i>
		8	285	GAG→TAG	G:C→T:A	Glu → Stop	<i>Nonsense</i>
134	7	234	TAC→TAT	G:C→A:T	Tyr → Tyr	Silenciosa	
136	7	237	ATG→AAG	A:T→T:A	Met → Lys	<i>Missense</i>	

A - Adenina; C - Citosina; G - Guanina; T - Timina; CpG - dinucleotídeos CpG; Del - Deleção; NA - Não aplicável; bp - pares de bases; WT - *wild-type* (selvagem); Mut - Mutante; * Códons *hotspots*.

A frequência de mutações não-silenciosas foi mais elevada no grupo CCE (45,0%) seguido dos grupos CCE/MEC (38,7%) e MEC (10,3%), sendo esta associação estatisticamente significativa ($p = 0,007$) (Tabela 16).

TABELA 16– Frequência de mutações não-silenciosas do gene *TP53* nos pacientes do estudo

	Grupos (N Total = 100 casos)			<i>p</i>
	CCE N = 40 casos	MEC N = 29 casos	CCE/MEC N = 31 casos	
<i>TP53</i> WT	22 (55,0%)	26 (89,7%)	19 (61,3%)	0,007 ^(c)
<i>TP53</i> Mut	18 (45,0%)	3 (10,3%)	12 (38,7%)	

^(c) - Teste de associação pelo qui-quadrado; N - Casuística; CCE - Carcinoma de células escamosas; MEC - Megaesôfago chagásico; WT – *Wild-type* (selvagem); Mut – Mutante.

Em seguida, foi comparada a distribuição de mutações do gene *TP53* pelos diferentes éxons entre os 3 grupos de pacientes (Tabela 17). Foram encontradas diferenças significativas na localização exônica das mutações, sendo o éxon 8, o principal afetado no grupo CCE (55,6%). Mutações no grupo MEC ocorreram exclusivamente no éxon 6 e, os éxons 5 e 8, foram os mais mutados no grupo CCE/MEC (Tabela 17).

TABELA 17 – Distribuição das mutações do gene *TP53* nos éxons 5, 6, 7 e 8

Éxons	Grupos			<i>p</i>
	CCE	MEC	CCE/MEC	
5	4 (10,0%)	0 (0,0%)	5 (16,1%)	0,068 ^(a)
6	2 (5,0%)	3 (10,3%)	3 (9,7%)	0,720 ^(a)
7	2 (5,0%)	0 (0,0%)	1 (3,2%)	0,778 ^(a)
8	10 (25,0%)	0 (0,0%)	5 (16,1%)	0,008 ^(a)

^(a) Teste exato de Fisher; CCE - Carcinoma de células escamosas; MEC - Megaesôfago chagásico.

Relativamente à natureza ao efeito das mutações potencialmente patogênicas observadas, as mutações *missenses* foram as mais frequentes nos 3 grupos de estudo (Tabela 18).

TABELA 18 – Natureza das mutações do gene *TP53* nos 3 grupos de pacientes

Natureza	Grupos			<i>p</i>
	CCE	MEC	CCE/MEC	
<i>Missense</i>	15 (83,3%)	2 (66,6%)	9 (64,3%)	0,492 ^(a)
<i>Nonsense</i>	2 (11,1%)	1 (33,3%)	2 (14,3%)	
<i>Frameshift</i>	1 (5,5%)	0 (0%)	3 (21,4%)	

^(a) - Teste exato de Fisher; N – Casuística; CCE - Carcinoma de células escamosas; MEC - Megaesôfago chagásico.

Todas as mutações observadas (incluindo as silenciosas) foram também avaliadas relativamente ao seu tipo e à distribuição (Tabela 19). Mutações do tipo G:C→A:T foram as mais frequentes nos grupos CCE e MEC. No grupo CCE/MEC, as mutações mais frequentes foram do tipo A:T → T:A e G:C → T:A.

TABELA 19 – Frequência do tipo de mutação do gene *TP53*

Tipo de Mutação	Grupos		
	CCE	MEC	CCE/MEC
A:T → C:G	1 (4,5%)	0 (0%)	0 (0%)
A:T → G:C	2 (9,1%)	0 (0%)	1 (6,6%)
A:T → T:A	1 (4,5%)	0 (0%)	4 (26,6%)
G:C → A:T	8 (36,3%)	8 (100,0%)	2 (13,3%)
G:C → A:T (CpG)	3 (13,6%)	0 (0%)	1 (6,6%)
G:C → C:G	0 (0%)	0(0%)	0 (0%)
G:C → T:A	6 (27,2%)	0 (0%)	4 (26,6%)
Del	1 (4,5%)	0 (0%)	3 (20,0%)

A - Adenina; C - Citosina; G - Guanina; T – timina; CpG – citosina fosfo guanina; del – deleção; bp – pares de bases; CCE - Carcinoma de células escamosas; MEC - Megaesôfago chagásico.

4.2.2 Associação do perfil de mutações do gene *TP53* com as características epidemiológicas e clínico-patológicas

Para analisar a associação entre os dados clínicos e moleculares, foram consideradas as mutações potencialmente patogênicas (não-silenciosas) e as diversas variáveis clínicas, como apresentado na Tabela 20.

Os resultados indicam que, entre as diversas variáveis analisadas, dois aspectos clínicos apresentaram associação estatística significativa com o *status* do gene *TP53*. São eles, sexo no grupo MEC ($p = 0,042$) e intervalo de tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico nos grupos CCE ($p = 0,027$) e CCE/MEC ($p < 0,001$).

Apesar da curva de sobrevida não ter apresentado nenhuma significância estatística, houve uma tendência ao óbito entre os indivíduos com mutação no grupo CCE ($p = 0,175$).

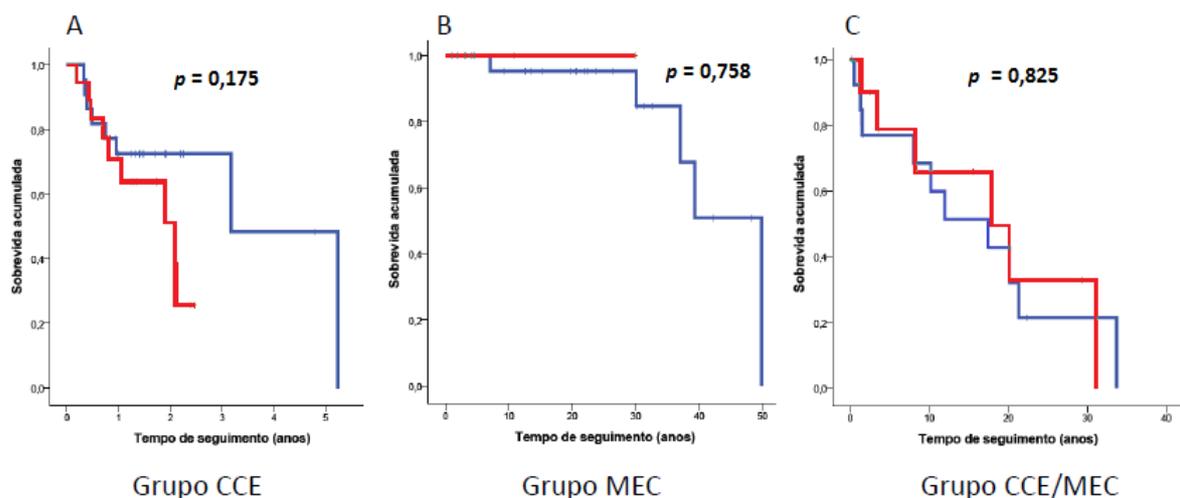


Figura 24 - Curva de sobrevida associada ao perfil de mutação do gene *TP53* nos 3 grupos de estudo. Em A – grupo CCE de esôfago, B – grupo MEC e C – grupo de CCE associado ao megaesôfago. Azul representa os casos *wild-type* e vermelho, os mutantes.

TABELA 20 – Associação do perfil de mutações do gene *TP53* com características clínico-patológicas

Variável	Categoria	CCE			MEC			CCE/MEC		
		TP53 WT	TP53 Mut	p	TP53 WT	TP53 Mut	p	TP53 WT	TP53 Mut	p
Sexo	Masculino	18 (54,5%)	15 (45,5%)	1,000 ^(a)	24 (96,0%)	1 (4,0%)	0,042 ^(a)	17 (63,0%)	10 (37,0%)	0,630 ^(a)
	Feminino	4 (57,1%)	3 (42,9%)		2 (50,0%)	2 (50,0%)		2 (50,0%)	2 (50,0%)	
Idade	Média (DP)	55,8 (8,8)	59,0 (10,1)	0,535	51,1 (9,9)	53,1 (9,9)	0,155	59,7 (8,8)	56,6 (10,9)	0,535
Karnofsky	> 70	20 (52,6%)	18 (47,4%)	0,492 ^(a)	26 (89,7%)	3 (10,3%)	NA	13 (61,9%)	8 (38,1%)	0,683 ^(a)
	≤ 70	2 (100,0%)	0 (0,0%)		0 (0%)	0 (0%)		4 (50,0%)	4 (50,0%)	
IMC	Sobrepeso	7 (63,6%)	4 (36,4%)	0,840 ^(a)	0 (0%)	0 (0%)	0,695 ^(a)	1 (50,0%)	1 (50,0%)	1,000 ^(a)
	Eutrófico	7 (46,7%)	8 (53,3%)		14 (87,5%)	2 (12,5%)		9 (69,2%)	4 (30,8%)	
	Desnutrido	6 (60,0%)	4 (40,0%)		11 (91,7%)	1 (8,3%)		6 (54,5%)	5 (45,5%)	
HFC	Não	4 (66,7%)	2 (33,3%)	0,664 ^(a)	9 (100,0%)	0 (0%)	0,100 ^(a)	2 (66,7%)	1 (33,3%)	1,000 ^(a)
	Sim	13 (52,0%)	12 (48,0%)		0 (0%)	1 (100,0%)		4 (44,4%)	5 (55,6%)	
Tabaco	Nunca fumou	4 (66,7%)	2 (33,3%)	0,673 ^(a)	9 (81,8%)	2 (18,2%)	0,549 ^(a)	3 (42,9%)	4 (57,1%)	0,403 ^(a)
	Fumou	18 (52,9%)	16 (47,1%)		15 (93,8%)	1 (6,2%)		14 (63,6%)	8 (36,4%)	
Etilismo	Nunca bebeu	5 (55,6%)	4 (44,4%)	1,000 ^(a)	14 (87,5%)	2 (12,5%)	1,000 ^(a)	3 (60,0%)	2 (40,0%)	1,000 ^(a)
	Bebeu	17 (54,8%)	14 (45,2%)		9 (90,0%)	1 (10,0%)		14 (58,3%)	10 (41,7%)	
Megaesôfago	Grau I e II	NA	NA	NA	3 (100,0)	0 (0%)	1,000 ^(a)	4 (66,7%)	2 (33,3%)	0,659 ^(a)
	Grau III e IV	NA	NA		23 (88,5%)	3 (11,5%)		8 (53,3%)	7 (46,7%)	
Esofagite	Não	13 (50,0%)	13 (50,0%)	0,413 ^(a)	1 (50,0%)	1 (50,0%)	0,275 ^(a)	11 (52,4%)	10 (47,6%)	0,121 ^(a)
	Sim	5 (71,4%)	2 (28,6%)		11 (91,7%)	1 (8,3%)		5 (100,0%)	0 (0,0%)	
Tempo sintomas	Meses (DP)	6,7 (6,8)	3,0 (1,4)	0,027	181,6 (145,3)	12 (0)	<0,001	49,2 (13,9)	19,5 (13,4%)	0,243
Tumor Sincronico	Não	14 (51,9%)	13 (48,1%)	1,000 ^(a)	NA	NA	NA	13 (54,2%)	11 (45,8%)	1,000 ^(a)
	Sim	5 (55,6%)	4 (44,4%)		NA	NA		1 (50,0%)	1 (50,0%)	
Diferenciação	Grau I	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0,597 ^(a)	NA	NA	NA	1 (33,3%)	2 (66,7%)	1,000 ^(a)
	Grau II	3 (30,0%)	7 (70,0%)		NA	NA		3 (60,0%)	2 (40,0%)	
	Grau III	1 (50,0%)	1 (50,0%)		NA	NA		1 (100,0%)	0 (0,0%)	
Classificação (T)	T1 e T2	9 (75,0%)	3 (25,0%)	0,165 ^(a)	NA	NA	NA	4 (66,7%)	2 (33,3%)	1,000 ^(a)
	T3 e T4	13 (46,4%)	15 (53,6%)		NA	NA		13 (59,1%)	9 (40,9%)	
Classificação (N)	N0 e N1	17 (60,7%)	11 (39,3%)	0,285 ^(a)	NA	NA	NA	10 (66,7%)	5 (33,3%)	0,426 ^(a)
	N2 e N3	4 (36,4%)	7 (63,6%)		NA	NA		5 (45,5%)	6 (54,5%)	
Classificação (M)	M0	17 (63,0%)	10 (37,0%)	0,185 ^(a)	NA	NA	NA	11 (61,1%)	7 (38,9%)	0,448 ^(a)
	M1	5 (38,5%)	8 (61,5%)		NA	NA		4 (44,4%)	5 (55,6%)	
Classificação (TNM)	I	8 (88,9%)	1 (11,1%)	0,125 ^(a)	NA	NA	NA	2 (66,6%)	1 (33,3%)	0,586 ^(a)
	II	3 (50,0%)	3 (50,0%)		NA	NA		3 (100,0%)	0 (0,0%)	
	III	6 (50,0%)	6 (50,0%)		NA	NA		8 (57,1%)	6 (42,9%)	
	IV	5 (38,5%)	8 (61,5%)		NA	NA		4 (44,4%)	5 (55,6%)	
Status atual	- Vivo sem doença	7 (77,8%)	2 (22,2%)	0,304 ^(a)	21 (87,5%)	3 (12,5%)	1,000 ^(a)	1 (50,0%)	1 (50,0%)	1,000 ^(a)
	- Vivo com doença	7 (50,0%)	7 (50,0%)		0 (0,0%)	0 (0,0%)		5 (55,6%)	4 (44,4%)	
	- Óbito pela doença	7 (43,8%)	9 (56,2%)		0 (0,0%)	0 (0,0%)		11 (61,1%)	7 (38,9%)	
	- Óbito por outras causas	1 (100,0%)	0 (0,0%)		5 (100,0%)	0 (0%)		0 (0,0%)	0 (0,0%)	

^(a) Teste exato de Fisher; (T) - Tumor primário; (N) - Linfonodos regionais; (M) - Metástases à distância; (TNM) - Estadio clínico-patológico; HFC - História familiar de câncer; WT - *Wild-type* (selvagem); Mut - Mutante; CCE - Carcinoma de células escamosas; MEC - Megaesôfago chagásico; NA - Não aplicável.

DISCUSSÃO

5 Discussão

O megaesôfago chagásico (MEC), uma complicação da doença de Chagas, é considerado um fator etiológico para o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas (CCE) de esôfago^{74, 188, 212-216}. Apesar desta conhecida associação, os mecanismos de carcinogênese do CCE de esôfago que desenvolvem em pacientes com megaesôfago chagásico, são praticamente desconhecidos. Neste estudo, foi proposto elucidar clínica e molecularmente o carcinoma de células escamosas associada ao megaesôfago chagásico (CCE/MEC) e comparar com o CCE não associado ao megaesôfago e com o MEC. Este trabalho representa a maior série descrita na literatura de CCE/MEC, e pela primeira vez foi avaliado o impacto biológico e clínico-patológico de mutações do gene supressor tumoral *TP53*.

5.1 Estudo epidemiológico e clínico patológico

Os pacientes dos 3 grupos de estudo são provenientes de hospitais de referência, localizados em regiões endêmicas da doença de Chagas (região sudeste do Brasil, Minas Gerais e São Paulo), onde muitos pacientes são encaminhados para tratamento, seja pela complicação da doença benigna esofágica (megaesôfago), seja para tratamento de doença maligna do esôfago. A doença de Chagas nesta região afeta predominantemente os habitantes de áreas rurais, e em geral de baixas condições socioeconômico e cultural, independente de sexo, raça ou cor^{212-214, 217, 218}.

O presente estudo evidenciou que a idade média dos pacientes do grupo com doença benigna (MEC) foi mais baixa (52 anos) quando comparada com os pacientes do grupo com doença maligna (CCE e CCE/MEC) (58 anos), em concordância com o que está descrito na literatura^{16, 219-221}.

Interessantemente, encontramos maior prevalência de câncer na família do grupo CCE (62,5%) e CCE/MEC (75,0%) do que no grupo MEC (10,0%). A maioria dos relatos foi relacionada à neoplasias de cabeça e pescoço, seguido por tumores do trato gastrointestinal.

Estes fatos, apontam para uma etiologia genética do CCE de esôfago, conforme relatos na literatura^{222, 223}. Monteiro NML e co-autores estudaram uma população Brasileira da mesma região e observou que 36 (37,1%) de 97 casos de CCE de esôfago analisados, tinham história positiva para câncer, sendo mais frequente no esôfago, estômago e laringe²²⁴. Um estudo no oeste do Quênia, local com elevadas taxas de CCE, observou uma porcentagem incomum de casos em indivíduos jovens com menos de 30 anos de idade. Além disso, a maioria tinha histórico familiar de câncer e menos de 20% consumiam álcool ou tabaco²²⁵. A suscetibilidade genética ao CCE de esôfago foi também sugerida num estudo que mostra que pacientes negros com exposição aos mesmos fatores de risco que os brancos possuem maior taxa de incidência de CCE de esôfago²²⁶.

Além da etiologia hereditária, existem importantes fatores ambientais que estão associados a maior suscetibilidade para o desenvolvimento de câncer do esôfago (CE). Diversos estudos relataram o tabagismo e a exposição crônica ao álcool como os principais fatores etiológicos, sendo responsáveis por aproximadamente 90% dos casos de CCE de esôfago²²⁷. O MEC é outro fator de risco para CE, estando associado ao risco 33 vezes superior que o da população em geral, para desenvolver câncer esofágico⁷⁵. As principais razões apontadas para esta associação são a irritação crônica da parede esofágica, principalmente no seguimento inferior causada pela estase alimentar e infecção bacteriana^{72, 93, 94, 110, 115-118, 122, 188, 191, 197}. No presente trabalho observamos que estes três fatores de risco estavam presentes. Interessantemente, foi demonstrado que o tabagismo e o etilismo foram significativamente mais frequentes no grupo CCE/MEC do que no grupo MEC, sugerindo que eles possam ser co-fatores que aumentam o potencial do desenvolvimento do câncer de esôfago nos pacientes portadores do megaesôfago chagásico. A ausência destes dois fatores (tabagismo e etilismo) na maioria dos pacientes do grupo MEC poderia explicar porque estes indivíduos, apesar de doença chagásica avançada, não desenvolveram a doença neoplásica. Neste estudo, 88,2% dos pacientes do grupo MEC e 72,7% dos pacientes CCE/MEC apresentavam megaesôfago avançado de etiologia chagásica. Vários autores relacionam a gravidade da doença chagásica no esôfago com a maior prevalência da neoplasia. A presença de neoplasia em casos não avançados foi identificada na minoria de nossa casuística como previamente descrito na literatura²²⁸.

A ocorrência de CE em pacientes submetidos à cirurgia na transição esôfago-gástrica (TEG), como a cirurgia de Heller associada à funduplicatura para tratamento de

megaesôfago, foi detectado durante o seguimento destes pacientes^{215, 229, 230}. Do grupo CCE/MEC, 46,7% dos pacientes relataram cirurgia prévia na TEG, com o objetivo de tratar a disfagia provocada pela acalásia. Por outro lado, 58,8% dos pacientes do grupo MEC relataram procedimentos cirúrgicos na TEG, indicando que estes procedimentos não sejam um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de esôfago.

Segundo vários autores, a estase alimentar e supercrescimento bacteriano, juntamente com o contato da mucosa esofágica aos compostos N-nitrosos (compostos carcinógenos), provoca inflamação, levando a displasia e o aparecimento de CCE de esôfago em pacientes com MEC^{72, 188, 231}. Baseado nestas informações, nossos achados mostram que a esofagite e o refluxo foram mais frequentes no grupo MEC do que nos grupos CCCE e CCE/MEC. A ausência de CE nestes pacientes reforçam a hipótese que a presença de outros fatores de risco relacionados à carcinogênese de CCE de esôfago são necessários.

A endoscopia diagnóstica pode estar associada a ferramentas que aumentam a chance de detecção de áreas de displasia e/ou neoplasia precoce, tal como a cromoscopia com solução de lugol. De acordo com os nossos resultados a vigilância endoscópica com cromoscopia nos pacientes com megaesôfago chagásico deveria ser ainda mais direcionada aos pacientes com MEC que apresentassem outros fatores de risco para o desenvolvimento de CE^{122, 232}.

Em relação aos sintomas, no presente estudo, a disfagia foi o principal sintoma entre os pacientes dos 3 grupos estudados. Dentre eles, o maior tempo estimado foi observado no grupo MEC com média de 157,8 meses (13 anos) e o menor foi encontrado no grupo CCE, com média de 4,2 meses. Estes dados corroboram estudos anteriores, os quais apontam que pacientes com CE evoluem com rápida disfagia progressiva, em torno de 2 a 3 meses, devido à agressividade da neoplasia neste órgão com sintomas agudos e precoces⁵. Os pacientes do grupo CCE/MEC tiveram um tempo de sintomatologia intermediária em relação aos demais grupos, possivelmente explicada pela associação da neoplasia a doença chagásica no esôfago e pela demora no diagnóstico de CE nestes pacientes, devido à atribuição dos sintomas apenas ao megaesôfago por longo período de tempo. A duração da sintomatologia do megaesôfago e o diagnóstico do tumor esofágico é no mínimo de 15 anos²⁰⁴. Além disso, a dificuldade diagnóstica é agravada nesses pacientes com MEC, pois a avaliação radiológica fica prejudicada, uma vez que a ingestão de grande volume da solução baritada recobre a lesão, dificultando o diagnóstico da neoplasia¹⁸⁸.

A pneumopatia teve alta prevalência nos grupos CCE e CCE/MEC e mais baixa nos pacientes do grupo MEC ($p = 0,002$), provavelmente relacionado ao consumo de tabaco nos grupos câncer. Em relação a cardiopatia não hipertensiva, a prevalência no grupo MEC (70,6%) foi significativamente maior quando comparada ao grupo CCE/MEC. Relatos da literatura mostram que 10% a 40% dos portadores da doença de Chagas desenvolverão alguma cardiopatia ao longo da vida, e quanto maior o período da doença crônica maiores são as complicações cardíacas²³³.

A análise da localização do tumor não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ($p = 0,327$). Os 3 grupos mostraram predileção pelo esôfago torácico médio, seguida pelos seguimentos distal e proximal nos grupos CCE e CCE/MEC, respectivamente. Estes dados estão em concordância com estudos anteriores, que relatam uma distribuição das lesões no grupo CCE/MEC nestas mesmas porções²³⁴. No entanto, outros autores sugerem que a distribuição da neoplasia é aleatória, podendo ocorrer em qualquer segmento do esôfago^{216, 228, 235}. Estes dados nos levam a considerar que apesar da estase alimentar ser mais comum no esôfago torácico distal, a prevalência de neoplasia é maior no esôfago torácico médio e proximal, mais uma vez sugerindo a existência de outros fatores de risco para CCE de esôfago em pacientes com MEC.

A presença de tumores sincrônicos no esôfago, geralmente justificada pela exposição de toda a extensão do esôfago aos carcinógenos do álcool e do tabaco, foi significativamente superior no grupo CCE (30,2%) do que no grupo CCE/MEC (7,1%) ($p = 0,018$), sugerindo que o tabagismo e o alcoolismo são fatores de risco comuns no CCE de esôfago, mas são mais preponderantes no grupo CCE. No entanto, estes dados devem ser avaliados com precaução, uma vez que a diferença da prevalência entre os grupos, pode ser atribuída a dificuldade diagnóstica em avaliar toda parede do esôfago nos pacientes com CCE/MEC devido à estase alimentar.

Em relação ao grau de diferenciação tumoral, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Os três graus (bem, moderadamente e pouco diferenciado) foram encontrados nos dois grupos com câncer (CCE/MEC e CCE), sendo o moderadamente diferenciado o mais comum. Estes resultados foram concordantes aos achados de um outro trabalho epidemiológico e clínico publicado na mesma região²³⁴. Em relação aos pacientes com CCE de esôfago, vários autores têm associado o grau de

diferenciação com a localização do tumor e o estadiamento, como fator importante no prognóstico e sobrevida desses pacientes²³⁶⁻²³⁸.

Nos dois grupos com câncer (CCE e CCE/MEC), o estadio avançado foi o mais prevalente. Assim como ocorrido em nosso estudo (27,3%), na literatura há poucos casos de CCE detectados em pacientes com MEC precocemente⁷⁰. Vale ressaltar, que os achados precoces da neoplasia são incidentalmente detectados em peças cirúrgicas do megaesôfago durante avaliação anatomopatológica após esofagectomia. Devido ao diagnóstico tardio, a chance de cura é bastante reduzida e mais de 90% dos pacientes são submetidos ao tratamento paliativo com radioterapia, quimioterapia, cirurgias e próteses esofágicas transpondo o tumor^{2, 85}. Foi observado que 61,0% dos nossos pacientes com CCE de esôfago foram tratados paliativamente e 39,0% foram submetidos ao tratamento cirúrgico radical (esofagectomia exclusiva). Estes achados podem estar superestimados, devido à escolha dos pacientes inseridos no estudo.

Para o tratamento do megaesôfago, a conduta médica também deve ser dependente do grau da esofagopatia. Em fase inicial, o mais apropriado é a cardiomiectomia de Heller associada com válvula antirrefluxo parcial^{239, 240}, enquanto em fase avançada a esofagectomia deve ser a técnica empregada²⁴¹. Todos os nossos pacientes com MEC foram submetidos à esofagectomia, já que apresentaram estado avançado da doença. Os casos de CCE/MEC deste estudo foram, assim como os de CCE, em sua maioria (75,8%) indicados à condutas paliativas como pré-determinado por diversos autores^{75, 188, 234, 242}.

A análise da sobrevida dos pacientes mostrou uma esperada diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos estudados. A maior sobrevida foi observada em pacientes com MEC, enquanto a pior foi mostrada pelos pacientes com CCE, devido à agressividade da doença neoplásica. Quando analisados apenas os grupos com câncer no momento do seu diagnóstico, foi observado que a taxa de sobrevida dos pacientes com CCE/MEC era menor que a dos indivíduos que apresentam somente a neoplasia, entretanto sem diferença estatística significativa.

5.2 Caracterização mutacional do gene *TP53*

Apesar do gene *TP53* ser o principal alvo envolvido na carcinogênese do CCE de esôfago^{186, 243, 244}, na literatura internacional não existe nenhum relato da presença e o perfil de mutações deste gene em pacientes com megaesôfago associado ou não ao desenvolvimento de câncer. Tais estudos são de especial relevância para a América Latina e Brasil, locais em que o CCE de esôfago pode ocorrer num contexto de doença de Chagas²⁴⁵. Diante disso, este estudo se propôs a avaliar o perfil mutacional do gene *TP53* e sua associação com os dados epidemiológicos e clínico-patológicos em pacientes com câncer de células escamosas (CCE) de esôfago, associado ao megaesôfago chagásico (CCE/MEC) e comparar com carcinoma de células escamosas de esôfago (CCE) e megaesôfago chagásico (MEC), para melhor entender a biologia da doença.

O gene *TP53* está frequentemente alterado em tumores humanos²⁴⁶. A maioria destas mutações são do tipo *missense*²⁴⁷ e ocorrem entre os éxons 5 a 8¹⁵⁵. Neste estudo foi observado uma maior prevalência de mutação entre os pacientes do grupo CCE (45%). Este resultado é semelhante ao de países de maior incidência desta neoplasia como China (42% a 70%)^{243, 248, 249} e Irã (50% a 65%)^{244, 250} e superior ao que foi relatado na população Brasileira da região sul (34,8%) e sudeste (34,5%)^{42, 186}.

Ao analisarmos o grupo de CCE/MEC, encontramos uma frequência mutação de *TP53* de 38,7% sendo estatisticamente superior ao grupo MEC (10,3%), e semelhante ao grupo CCE. Estes dados sugerem que o *TP53* é o gene central na carcinogênese do CCE/MEC, e sua presença já no grupo MEC, apesar de menos frequente, pode significar que a mutação de *TP53* ocorre já em lesões pré-malignas (esofagite) que na presença de outros fatores podem evoluir para câncer. Ainda, neste último grupo de pacientes, mutação em *TP53* parece estar relacionada ao comportamento agressivo da doença chagásica no esôfago. De fato, estas lesões MEC com mutação de *TP53* apresentam um significativo menor intervalo de tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico. Como discutido anteriormente não há dados na literatura que evidencie a mutação do gene *TP53* em pacientes com MEC ou CCE/MEC. Entretanto, a análise da expressão da proteína p53 avaliada por Safatle-Ribeiro e co-autores, relatou a superexpressão em 43,7% dos pacientes com MEC, indicando que a inflamação

frequentemente observada nestes indivíduos parece estar associada com alterações desta proteína²⁵¹.

A análise de mutações de *TP53*, além de permitir compreender os mecanismos biológicos que operam na transformação maligna, permite inferir sobre os potenciais agentes carcinogênicos que operaram em cada caso. A análise do espectro de mutação pode funcionar como um *fingerprint* molecular do agente causador da lesão no DNA¹⁵⁵. Segundo dados do IARC, os *hotspots* do gene *TP53* no CCE de esôfago são 170, 175, 179, 193, 220, 245, 248, 273 e 282^{182, 252}. A maioria das mutações identificadas nos nossos casos foram nos códons 273 e 275. O códon 273 está relacionado com a exposição à hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e benzopireno, agentes carcinogênicos presentes em diversos produtos, como o tabaco²⁴⁶, levando à transversões em base G como apresentado em nossos resultados. Apesar do códon 275 não ser referenciado como *hotspot*, a mutação Cys275Phe encontrada em nossos resultados também está reportada como uma mutação somática deletéria, levando a perda funcional da enzima¹⁸².

Os resultados deste estudo demonstraram que o tipo de mutação mais frequente no grupo CCE foi G:C→A:T (36,3%), seguida de G:C→T:A (27,2%). Estas mutações estão associadas ao acetaldeído/nitrosaminas e fumo de tabaco, respectivamente²⁴⁷, havendo assim uma concordância entre os fatores de risco identificados (álcool e tabaco). Este tipo de mutações são as mais frequentemente descritas em CE²⁴⁶.

No grupo MEC, todas as mutações foram do tipo G:C→A:T, associado como descrito acima com acetaldeído e nitrosaminas²⁴⁷. Estes últimos agentes são importantes compostos derivados da estase alimentar observada na luz do megaesôfago²⁰⁴.

Por ultimo, as mutações mais prevalentes no grupo CCE/MEC são G:C→T:A e A:T→T:A (ambas com 26,6%). Como discutido nos parágrafos anteriores, a mutação G:C→T:A está associada ao benzopireno (tabaco)^{247, 253, 254}. A alta prevalência das mutações G:C → T:A tanto nos pacientes do grupo CCE como do grupo CCE/MEC em nossos resultados sugere que o tabaco é um importante cofator para o desenvolvimento de CCE em pacientes com megaesôfago chagásico.

Estudos futuros serão importantes para estender e validar estes importantes achados que podem contribuir para a elucidação da via de carcinogênese associada ao câncer de células escamosas do esôfago, associado ao megaesôfago, uma neoplasia praticamente desconhecida e negligenciada.

CONCLUSÃO

6 Conclusão

Este estudo representa o maior estudo genético realizado em CCE de esôfago associado com MEC.

Os principais fatores de risco para a carcinogênese do esôfago identificados neste trabalho foram o tabaco e o álcool, tanto em pacientes do grupo CCE, como no grupo CCE/MEC.

A presença de mutações do gene *TP53* do grupo MEC, clareia a importância do megaesôfago chagásico na carcinogênese do esôfago, sugerindo uma maior predisposição para o desenvolvimento da neoplasia.

A elevada frequência de mutações do *TP53* no grupo CCE/MEC, e o seu perfil mutacional, corroboram a importância do tabaco como importante agente etiológico.

REFERÊNCIAS

7 Referências bibliográficas

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893-917.
2. Lopes AB, Fagundes RB. Esophageal squamous cell carcinoma - precursor lesions and early diagnosis. *World J Gastrointest Endosc*. 2012 Jan 16;4(1):9-16.
3. Biere SS, van Berge Henegouwen MI, Maas KW, Bonavina L, Rosman C, Garcia JR, et al. Minimally invasive versus open oesophagectomy for patients with oesophageal cancer: a multicentre, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2012 May 19;379(9829):1887-92.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2011.
5. Coelho JCU. Aparelho digestivo: clínica e cirurgia / Digestive system: clinic and surgical. São Paulo: Atheneu; 2006.
6. Ling ZQ, Li P, Ge MH, Hu FJ, Fang XH, Dong ZM, et al. Aberrant methylation of different DNA repair genes demonstrates distinct prognostic value for esophageal cancer. *Dig Dis Sci*. 2011 Oct;56(10):2992-3004.
7. Issaivanan M, Redner A, Weinstein T, Soffer S, Glassman L, Edelman M, et al. Esophageal carcinoma in children and adolescents. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2012 Jan;34(1):63-7.
8. Aghcheli K, Marjani HA, Nasrollahzadeh D, Islami F, Shakeri R, Sotoudeh M, et al. Prognostic factors for esophageal squamous cell carcinoma--a population-based study in Golestan Province, Iran, a high incidence area. *PLoS One*. 2011;6(7):e22152.
9. Messmann H. Squamous cell cancer of the oesophagus. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2001 Apr;15(2):249-65.
10. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
11. Goldman L, D. A. Cecil: Tratado de medicina interna. 22ª ed: Elsevier; 2005.
12. Abbas AK, Aster JC, Fausto N, Kuma V. Pathologic Basis of Diseases. 8th ed: Elsevier 2010.
13. Montesano R, Hollstein M, Hainaut P. Molecular etiopathogenesis of esophageal cancers. *Ann Ist Super Sanita*. 1996;32(1):73-84.

14. Montesano R, Hollstein M, Hainaut P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer*. 1996 Jun 21;69(3):225-35.
15. Kuwano H. [Morphological characteristics of esophageal cancer and its significance]. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 1998 Jun;89(6):159-65.
16. Yang HX, Hou X, Liu QW, Zhang LJ, Liu JG, Lin P, et al. Tumor location does not impact long-term survival in patients with operable thoracic esophageal squamous cell carcinoma in China. *Ann Thorac Surg*. 2012 Jun;93(6):1861-6.
17. Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. *N Engl J Med*. 2003 Dec 4;349(23):2241-52.
18. López M, Laurentys-Medeiros J. *Semiologia Médica: as bases do diagnóstico clínico*. 4a ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2001.
19. Vieira OM, Chaves CP, Manso JEF, Eulálio JMR. *Clínica Cirúrgica: fundamentos teóricos e práticos*. São Paulo: Atheneu; 2002.
20. Morita M, Kumashiro R, Kubo N, Nakashima Y, Yoshida R, Yoshinaga K, et al. Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: epidemiology, clinical findings, and prevention. *Int J Clin Oncol*. 2010 Apr;15(2):126-34.
21. Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. *Ann Surg*. 2001 Mar;233(3):322-37.
22. Picardo SL, Maher SG, O'Sullivan JN, Reynolds JV. Barrett's to oesophageal cancer sequence: a model of inflammatory-driven upper gastrointestinal cancer. *Dig Surg*. 2012;29(3):251-60.
23. Pohl H, Wrobel K, Bojarski C, Voderholzer W, Sonnenberg A, Rosch T, et al. Risk Factors in the Development of Esophageal Adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol*. 2012 Dec 18.
24. Cronin J, McAdam E, Danikas A, Tselepis C, Griffiths P, Baxter J, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed in high-grade dysplasia and adenocarcinoma of the esophagus and may represent a biomarker of histological progression in Barrett's esophagus (BE). *Am J Gastroenterol*. 2011 Jan;106(1):46-56.
25. Steevens J, Schouten LJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Alcohol consumption, cigarette smoking and risk of subtypes of oesophageal and gastric cancer: a prospective cohort study. *Gut*. 2010 Jan;59(1):39-48.

26. Ling Y, Huang G, Fan L, Wei L, Zhu J, Liu Y, et al. CpG island methylator phenotype of cell-cycle regulators associated with TNM stage and poor prognosis in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol*. 2011 Mar;64(3):246-51.
27. Chen H, Ward MH, Graubard BI, Heineman EF, Markin RM, Potischman NA, et al. Dietary patterns and adenocarcinoma of the esophagus and distal stomach. *Am J Clin Nutr*. 2002 Jan;75(1):137-44.
28. Zendejdel K, Nyren O, Edberg A, Ye W. Risk of esophageal adenocarcinoma in achalasia patients, a retrospective cohort study in Sweden. *Am J Gastroenterol*. 2011 Jan;106(1):57-61.
29. Ribeiro Jr U, Posner MC, Safatle-Ribeiro AV, Reynolds JC. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br J Surg*. 1997;84:281-2.
30. Crema E, Lopo PN, Kalinauskas PF, Cunha GR, Silva AA. Esofagopatia chagásica associada ao adenocarcinoma do esôfago distal. Análise de 6 casos [abstract]. *Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Cirurgia; Rio de Janeiro, RJ: Rev Col Bras Cir; 2005. p. 139.*
31. Leeuwenburgh I, Scholten P, Alderliesten J, Tilanus HW, Looman CW, Steijgerberg EW, et al. Long-term esophageal cancer risk in patients with primary achalasia: a prospective study. *Am J Gastroenterol*. 2010 Oct;105(10):2144-9.
32. Park JC, Lee YC, Kim SK, Kim YJ, Shin SK, Lee SK, et al. Achalasia combined with esophageal cancer treated by concurrent chemoradiation therapy. *Gut Liver*. 2009 Dec;3(4):329-33.
33. Gao Y, Hu N, Han XY, Ding T, Giffen C, Goldstein AM, et al. Risk factors for esophageal and gastric cancers in Shanxi Province, China: a case-control study. *Cancer Epidemiol*. 2011 Dec;35(6):e91-9.
34. Castillo A, Koriyama C, Higashi M, Anwar M, Bukhari MH, Carrascal E, et al. Human papillomavirus in upper digestive tract tumors from three countries. *World J Gastroenterol*. 2011 Dec 28;17(48):5295-304.
35. Persson EC, Shiels MS, Dawsey SM, Bhatia K, Anderson LA, Engels EA. Increased risk of stomach and esophageal malignancies in people with AIDS. *Gastroenterology*. 2012 Oct;143(4):943-50 e2.
36. Bravi F, Edefonti V, Randi G, Garavello W, La Vecchia C, Ferraroni M, et al. Dietary patterns and the risk of esophageal cancer. *Ann Oncol*. 2012 Mar;23(3):765-70.
37. Zhang N, Yu C, Wen D, Chen J, Ling Y, Terajima K, et al. Association of nitrogen compounds in drinking water with incidence of esophageal squamous cell carcinoma in Shexian, China. *Tohoku J Exp Med*. 2012;226(1):11-7.

38. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer*. 2001 Oct;37 Suppl 8:S4-66.
39. Zeka A, Gore R, Kriebel D. Effects of alcohol and tobacco on aerodigestive cancer risks: a meta-regression analysis. *Cancer Causes Control*. 2003 Nov;14(9):897-906.
40. Castellsague X, Munoz N, De Stefani E, Victora CG, Castelletto R, Rolon PA, et al. Independent and joint effects of tobacco smoking and alcohol drinking on the risk of esophageal cancer in men and women. *Int J Cancer*. 1999 Aug 27;82(5):657-64.
41. Haas SL, Ye W, Lohr JM. Alcohol consumption and digestive tract cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012 Sep;15(5):457-67.
42. Putz A, Hartmann AA, Fontes PR, Alexandre CO, Silveira DA, Klug SJ, et al. TP53 mutation pattern of esophageal squamous cell carcinomas in a high risk area (Southern Brazil): role of life style factors. *Int J Cancer*. 2002 Mar 1;98(1):99-105.
43. Murray L, Romero Y. Role of obesity in Barrett's esophagus and cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2009 Jul;18(3):439-52.
44. Hayashi Y, Correa AM, Hofstetter WL, Vaporciyan AA, Mehran RJ, Rice DC, et al. Patients with high body mass index tend to have lower stage of esophageal carcinoma at diagnosis. *Dis Esophagus*. 2012 Sep-Oct;25(7):614-22.
45. Munitiz V, Parrilla P, Ortiz A, Martinez-de-Haro LF, Yelamos J, Molina J. High risk of malignancy in familial Barrett's esophagus: presentation of one family. *J Clin Gastroenterol*. 2008 Aug;42(7):806-9.
46. Bowdler DA, Stell PM. Carcinoma arising in posterior pharyngeal pulsion diverticulum (Zenker's diverticulum). *Br J Surg*. 1987;74(7):561-3.
47. Morales Garcia D, Casanova Rituerto D, Garcia de Polavieja M, Rodilla IG, Naranjo Gomez A. [Epidermoid carcinoma on Zenker's diverticulum]. *An Med Interna*. 2002 Jan;19(1):27-30.
48. Lam AK. Molecular biology of esophageal squamous cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000 Feb;33(2):71-90.
49. Herbster S, Ferraro CT, Koff NK, Rossini A, Krueel CD, Andreollo NA, et al. HPV infection in Brazilian patients with esophageal squamous cell carcinoma: interpopulational differences, lack of correlation with surrogate markers and clinicopathological parameters. *Cancer Lett*. 2012 Dec 29;326(1):52-8.
50. Goto A, Li CP, Ota S, Niki T, Ohtsuki Y, Kitajima S, et al. Human papillomavirus infection in lung and esophageal cancers: analysis of 485 Asian cases. *J Med Virol*. 2011 Aug;83(8):1383-90.

51. Take S, Mizuno M, Ishiki K, Nagahara Y, Yoshida T, Yokota K, et al. Helicobacter pylori eradication may induce de novo, but transient and mild, reflux esophagitis: Prospective endoscopic evaluation. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009 Jan;24(1):107-13.
52. Ye W, Held M, Lagergren J, Engstrand L, Blot WJ, McLaughlin JK, et al. Helicobacter pylori infection and gastric atrophy: risk of adenocarcinoma and squamous-cell carcinoma of the esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Mar 3;96(5):388-96.
53. Lijinsky W, Kovatch RM, Saavedra JE. Carcinogenesis and mutagenesis by N-nitroso compounds having a basic center. *Cancer Lett.* 1992 Apr 15;63(2):101-7.
54. Lijinsky W, Thomas BJ, Kovatch RM. Systemic and local carcinogenesis by directly acting N-nitroso compounds given to rats by intravesicular administration. *Carcinogenesis.* 1992 Jul;13(7):1101-5.
55. Lambert R, Hainaut P, Parkin DM. Premalignant lesions of the esophagogastric mucosa. *Semin Oncol.* 2004 Aug;31(4):498-512.
56. Islami F, Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Jenab M, Scotti L, et al. Alcohol drinking and esophageal squamous cell carcinoma with focus on light-drinkers and never-smokers: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 2011 Nov 15;129(10):2473-84.
57. Muwonge R, Ramadas K, Sankila R, Thara S, Thomas G, Vinoda J, et al. Role of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking in the risk of oral cancer in Trivandrum, India: a nested case-control design using incident cancer cases. *Oral Oncol.* 2008 May;44(5):446-54.
58. Mathers JC, Strathdee G, Relton CL. Induction of epigenetic alterations by dietary and other environmental factors. *Adv Genet.* 2010;71:3-39.
59. Victora CG, Muñoz N, Horta BL, Ramos EO. Patterns of maté drinking in a Brazilian City. *Cancer Res.* 1990;50:7112-5.
60. Barros SG, Ghisolfi ES, Luz LP, Barlem GG, Vidal RM, Wolff FH, et al. Mate (chimarrão) é consumido em alta temperatura por população sob risco para o carcinoma epidermóide do esôfago. *Arq Gastroenterol.* 2000;37:25-30.
61. Ribeiro Pinto LF, Teixeira Rossini AM, Albano RM, Felzenszwalb I, de Moura Gallo CV, Nunes RA, et al. Mechanisms of esophageal cancer development in Brazilians. *Mutat Res.* 2003 Nov;544(2-3):365-73.
62. Ghadirian P. Thermal irritation and esophageal cancer in northern Iran. *Cancer.* 1987 Oct 15;60(8):1909-14.

63. Launoy G, Milan C, Day NE, Faivre J, Pienkowski P, Gignoux M. Oesophageal cancer in France: potential importance of hot alcoholic drinks. *Int J Cancer*. 1997 Jun 11;71(6):917-23.
64. Krueel C, Gurski R, Golbert L, Luz LP, Ferreira MA. Effect of thermal injury and the oral administration of diethylnitrosamine in the development of esophageal tumors in mice. In: Peracchia A, editor. *Recent advances in diseases of the esophagus*: Monduzzi Editore; 1996. p. 37-40.
65. Bollschweiler E, Holscher AH. [Carcinoma of the esophagus--actual epidemiology in Germany]. *Onkologie*. 2001 Apr;24(2):180-4.
66. Yang CX, Wang HY, Wang ZM, Du HZ, Tao DM, Mu XY, et al. Risk factors for esophageal cancer: a case-control study in South-western China. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2005 Jan-Mar;6(1):48-53.
67. Franceschi S, Talamini R, Barra S, Baron AE, Negri E, Bidoli E, et al. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Res*. 1990 Oct 15;50(20):6502-7.
68. Langan JE, Cole CG, Huckle EJ, Byrne S, McDonald FE, Rowbottom L, et al. Novel microsatellite markers and single nucleotide polymorphisms refine the tylosis with oesophageal cancer (TOC) minimal region on 17q25 to 42.5 kb: sequencing does not identify the causative gene. *Hum Genet*. 2004 May;114(6):534-40.
69. Iwaya T, Maesawa C, Kimura T, Ogasawara S, Ikeda K, Kimura Y, et al. Infrequent mutation of the human envoplakin gene is closely linked to the tylosis oesophageal cancer locus in sporadic oesophageal squamous cell carcinomas. *Oncol Rep*. 2005;13:703-7.
70. Lamb RK, Edwards CW, Pattison CW, Matthews HR. Squamous carcinoma in situ of the oesophagus in a patient with achalasia. *Thorax*. 1985 Oct;40(10):795-6.
71. Fagge CH. A case of simple stenosis of the oesophagus, followed by epithelioma. *Guys Hosp Rep*. 1872;17:413-21.
72. Camara-Lopes LH. Carcinoma of the esophagus as a complication of megaesophagus. An analysis of seven cases. *Am J Dig Dis*. 1961 Aug;6:742-56.
73. Chuong JJ, DuBovik S, McCallum RW. Achalasia as a risk factor for esophageal carcinoma. A reappraisal. *Dig Dis Sci*. 1984 Dec;29(12):1105-8.
74. Brandalise NA, Andreollo NA, Leonardi LS, Callejas-Neto F. Carcinoma associado a megaesôfago chagásico. *Rev Col Bras Cir*. 1985;12(196-9).
75. Meijssen MA, Tilanus HW, van Blankenstein M, Hop WC, Ong GL. Achalasia complicated by oesophageal squamous cell carcinoma: a prospective study in 195 patients. *Gut*. 1992 Feb;33(2):155-8.

76. Streitz JM, Jr., Ellis FH, Jr., Gibb SP, Heatley GM. Achalasia and squamous cell carcinoma of the esophagus: analysis of 241 patients. *Ann Thorac Surg.* 1995 Jun;59(6):1604-9.
77. Brucher BL, Stein HJ, Bartels H, Feussner H, Siewert JR. Achalasia and esophageal cancer: incidence, prevalence, and prognosis. *World J Surg.* 2001 Jun;25(6):745-9.
78. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol.* 2012 Nov;34(6):753-70.
79. Schuhmacher C, Novotny A, Feith M, Friess H. Die neue TNM-Klassifikation der Tumoren des ösophagogastralen Übergangs. *Der Chirurg.* 2012;83(1):23-30.
80. Peracchia A, Ruol A, Bardini R. Lymph node dissection for cancer of the thoracic esophagus: how extended should it be? Analysis of personal data and review of the literature. *Dis Esophagus.* 1992;5(2):69-78.
81. Villaflor VM, Allaix ME, Minsky B, Herbella FA, Patti MG. Multidisciplinary approach for patients with esophageal cancer. *World J Gastroenterol.* 2012 Dec 14;18(46):6737-46.
82. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN clinical practice guidelines in oncology: esophageal and esophagogastric junction cancers. Fort Washington, PA: NCCN; 2012.
83. Patrìti A, Ceccarelli G, Ceribelli C, Bartoli A, Spaziani A, Cisano C, et al. Robot-assisted laparoscopic management of cardia carcinoma according to Siewert recommendations. *Int J Med Robot.* 2011 Jun;7(2):170-7.
84. Twaddell WS, Wu PC, Verhage RJ, Feith M, Ilson DH, Schuhmacher CP, et al. Barrett's esophagus: treatments of adenocarcinomas II. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Sep;1232:265-91.
85. Lacerda CF, Vazquez VL, Fava G, Wohnrath DR, Filgueiras GB, Oliveira ATT. Isoperistaltic Gastric Tube for Palliative Treatment of Esophageal Cancer - Postlethwait Technique: Proposal for a Videolaparoscopic Approach. *Braz J Video-Sur.* 2010;10(3):191-4.
86. UICC. UICC Manual de Oncologia Clínica. Pollock RE, editor. São Paulo 2006.
87. Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, Jelicks LA, Scherer PE, Mukherjee S, et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cell Microbiol.* 2012 May;14(5):634-43.
88. Hotez PJ, Dumonteil E, Woc-Colburn L, Serpa JA, Bezek S, Edwards MS, et al. Chagas disease: "the new HIV/AIDS of the Americas". *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(5):e1498.

89. Del Grande JC, Herbella FA. Megaesôfago: Perspectivas Futuras. In: Nakano SMS, Faintuch J, Ceconello I, editors. Megaesôfago Chagásico Avaliação e Tratamento Clínico e Cirúrgico. 1st ed. Goiânia: Universidade de Goiás; 2006. p. 375-80.
90. Morel CM, Lazdins J. Chagas disease. *Nat Rev Microbiol*. 2003 Oct;1(1):14-5.
91. Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(3):286-96.
92. Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104 Suppl 1:31-40.
93. Rassi A, Jr., Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010 Apr 17;375(9723):1388-402.
94. Rassi A, Rezende JM, Rassi Jr A. Advanced megaesophagus (Group III) secondary to vector-borne Chagas disease in a 20-month-old infant. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012 Mar-Apr;45(2):266-8.
95. Sztajzel J, Cox J, Pache JC, Badaoui E, Lerch R, Rutishauser W. Chagas' disease may also be encountered in Europe. *Eur Heart J*. 1996 Aug;17(8):1289.
96. Xavier SS, Sousa AS, Vinas PA, Junqueira AC, Boia MN, Coura JR. [Chronic chagasic cardiopathy in the Rio Negro, Amazon State. Report of three new autochthonous cases confirmed by serology, clinical examination, chest X-rays, electro and echocardiography]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006 Mar-Apr;39(2):211-6.
97. Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Oct 30;102 Suppl 1:75-85.
98. Piron M, Verges M, Munoz J, Casamitjana N, Sanz S, Maymo RM, et al. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). *Transfusion*. 2008 Sep;48(9):1862-8.
99. Gurtler RE, Cecere MC, Lauricella MA, Petersen RM, Chuit R, Segura EL, et al. Incidence of *trypanosoma cruzi* infection among children following domestic reinfestation after insecticide spraying in rural northwestern Argentina. *Am J Trop Med Hyg*. 2005 Jul;73(1):95-103.
100. Benjamin RJ, Stramer SL, Leiby DA, Dodd RY, Fearon M, Castro E. *Trypanosoma cruzi* infection in North America and Spain: evidence in support of transfusion transmission. *Transfusion*. 2012 Sep;52(9):1913-21; quiz 2.
101. Guerri-Guttenberg RA, Grana DR, Ambrosio G, Milei J. Chagas cardiomyopathy: Europe is not spared! *Eur Soc Cardiology*. 2008;29:2587-91.

102. Perez de Ayala A, Perez-Molina JA, Norman F, Lopez-Velez R. Chagasic cardiomyopathy in immigrants from Latin America to Spain. *Emerg Infect Dis*. 2009 Apr;15(4):607-8.
103. Coura JR, Vinas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*. 2010 Jun 24;465(7301):S6-7.
104. Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1909;1:159-218.
105. Lana M, Tafuri WL. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: Neves DP, editor. *Parasitologia humana*. 10th ed. São Paulo: Atheneu; 2000.
106. Dias JC. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. Uma Análise de Possibilidades. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2006;28(2).
107. Otero S, Sulleiro E, Molina I, Espiau M, Suy A, Martin-Nalda A, et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in non-endemic areas: evaluation of a screening program in a tertiary care hospital in Barcelona, Spain. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Nov;87(5):832-6.
108. Pereira BI, Nazareth C, Malcata L, Alves H, Fernandez JR, Sargento C, et al. [Transfusion-transmitted protozoal infections: what is the risk in non-endemic countries?]. *Acta Med Port*. 2011 Dec;24 Suppl 4:897-906.
109. Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 Jan;60(1):25-32.
110. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol*. 2006 Dec;22(12):583-8.
111. Bellini MF, Silistino-Souza R, Varella-Garcia M, de Azeredo-Oliveira MT, Silva AE. Biologic and genetics aspects of chagas disease at endemic areas. *J Trop Med*. 2012;2012:357948.
112. Gullo CE, Estofolete CF, Gil CD, Christiano AB, Netinho JG. [Digestive forms of Chagas disease and carcinogenesis: a study of association]. *Rev Col Bras Cir*. 2012 Apr;39(2):146-50.
113. Adad SJ, Andrade DC, Lopes ER, Chapadeiro E. [Pathological anatomy of chagasic megaesophagus]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1991 Nov-Dec;33(6):443-50.
114. Ribeiro-dos-Santos R, Ramos de Oliveira JC, Koberle F. Aspectos imunopatológicos da destruição neuronal na moléstia de Chagas. *Rev Goiana de Med*. 1976;22:235-43.

115. Sandler RS, Nyren O, Ekblom A, Eisen GM, Yuen J, Josefsson S. The risk of esophageal cancer in patients with achalasia. A population-based study. *JAMA*. 1995 Nov 1;274(17):1359-62.
116. Sonnenberg A, Massey BT, McCarty DJ, Jacobsen SJ. Epidemiology of hospitalization for achalasia in the United States. *Dig Dis Sci*. 1993 Feb;38(2):233-44.
117. Massad E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. *Epidemiol Infect*. 2008 Sep;136(9):1153-64.
118. Remes-Troche JM, Torres-Aguilera M, Antonio-Cruz KA, Vazquez-Jimenez G, De-La-Cruz-Patino E. Esophageal motor disorders in subjects with incidentally discovered Chagas disease: a study using high-resolution manometry and the Chicago classification. *Dis Esophagus*. 2012 Oct 22.
119. Langhi Junior DM, Bordin JO, Castelo A, Walter SD, Moraes-Souza H, Stumpf RJ. The application of latent class analysis for diagnostic test validation of chronic *Trypanosoma cruzi* infection in blood donors. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2002;6:181-7.
120. Moraes-Souza H. Transmissão transfusional da doença de Chagas. *Rev Pat Trop*. 2000;29(91):91-100.
121. Chiari E, Brener Z. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1966;8(134-138).
122. Yamamuro EM, Cecconello I, Iriya K, Tomishigue T, Oliveira MA, Pinotti HW. Lugol dye endoscopy for analysis of esophageal mucosa in achalasia. *Hepatogastroenterology*. 1999 May-Jun;46(27):1687-91.
123. Rezende JM, Lauar KM, Oliveira AR. Aspectos clínicos e radiológicos da aperistalse do esôfago. *Rev Bras Gastroenterol*. 1960;12:247-51.
124. Rezende JM. Classificação radiológica do megaesôfago. *Rev Goiana Med*. 1982;28:187-91.
125. Cecconello I, Domene CE, Sallum RAA, Pinotti HW. Esofagectomia transmediastinal no megaesôfago. *Rev Col Bras Cir*. 1988;15:76.
126. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):355-65.
127. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 2008 Jan 31;358(5):502-11.
128. Robertson SC, Tynan J, Donoghue DJ. RTK mutations and human syndromes: when good receptors turn bad. *Trends Genet*. 2000 Aug;16(8):368.
129. Ponder BA. Cancer genetics. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):336-41.

130. Harris CC, Brash DE, Lechner JF, Mark G. Aberrations of growth and differentiation pathways during neoplastic transformation of human epithelial cells. *IARC Sci Publ.* 1988(92):139-48.
131. Williams LJ, Guernsey DL, Casson AG. Biomarkers in the molecular pathogenesis of esophageal (Barrett) adenocarcinoma. *Curr Oncol.* 2006 Feb;13(1):33-43.
132. Kuwano H, Kato H, Miyazaki T, Fukuchi M, Masuda N, Nakajima M, et al. Genetic alterations in esophageal cancer. *Surg Today.* 2005;35(1):7-18.
133. Toh Y, Oki E, Ohgaki K, Sakamoto Y, Ito S, Egashira A, et al. Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: molecular mechanisms of carcinogenesis. *Int J Clin Oncol.* 2010 Apr;15(2):135-44.
134. Mandard AM, Hainaut P, Hollstein M. Genetic steps in the development of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Mutat Res.* 2000 Apr;462(2-3):335-42.
135. Metzger R, Schneider PM, Warnecke-Eberz U, Brabender J, Holscher AH. Molecular biology of esophageal cancer. *Onkologie.* 2004 Apr;27(2):200-6.
136. Stoner GD, Gupta A. Etiology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 2001 Nov;22(11):1737-46.
137. Ohashi S, Natsuzaka M, Wong GS, Michaylira CZ, Grugan KD, Stairs DB, et al. Epidermal growth factor receptor and mutant p53 expand an esophageal cellular subpopulation capable of epithelial-to-mesenchymal transition through ZEB transcription factors. *Cancer Res.* 2010 May 15;70(10):4174-84.
138. Lin DC, Du XL, Wang MR. Protein alterations in ESCC and clinical implications: a review. *Dis Esophagus.* 2009;22(1):9-20.
139. Guimaraes DP, Hainaut P. TP53: a key gene in human cancer. *Biochimie.* 2002 Jan;84(1):83-93.
140. Gamliel Z. Incidence, epidemiology, and etiology of esophageal cancer. *Chest Surg Clin N Am.* 2000 Aug;10(3):441-50.
141. Pera M. Epidemiology of esophageal cancer, especially adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Recent Results Cancer Res.* 2000;155:1-14.
142. Smeds J, Berggren P, Ma X, Xu Z, Hemminki K, Kumar R. Genetic status of cell cycle regulators in squamous cell carcinoma of the oesophagus: the CDKN2A (p16(INK4a) and p14(ARF)) and p53 genes are major targets for inactivation. *Carcinogenesis.* 2002 Apr;23(4):645-55.

143. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 1992 Mar 19;356(6366):215-21.
144. Kuwabara T, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Arihiro K, Chayama K. Genetic pathways of multiple esophageal squamous cell carcinomas. *Oncol Rep*. 2011 Feb;25(2):453-9.
145. DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 May;76(5):2420-4.
146. Soussi T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Adv Cancer Res*. 2011;110:107-39.
147. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 1979 Mar 15;278(5701):261-3.
148. Oren M, Bienz B, Givol D, Rechavi G, Zakut R. Analysis of recombinant DNA clones specific for the murine p53 cellular tumor antigen. *EMBO J*. 1983;2(10):1633-9.
149. Oren M, Levine AJ. Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Jan;80(1):56-9.
150. Pennica D, Goeddel DV, Hayflick JS, Reich NC, Anderson CW, Levine AJ. The amino acid sequence of murine p53 determined from a c-DNA clone. *Virology*. 1984 Apr 30;134(2):477-82.
151. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*. 1989 Jun 30;57(7):1083-93.
152. Frebourg T, Barbier N, Yan YX, Garber JE, Dreyfus M, Fraumeni J, Jr., et al. Germ-line p53 mutations in 15 families with Li-Fraumeni syndrome. *Am J Hum Genet*. 1995 Mar;56(3):608-15.
153. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*. 1991 Jun 6;351(6326):453-6.
154. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010;2(1).
155. Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res*. 2000;77:81-137.
156. Cadwell C, Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene*. 2001 Oct 17;277(1-2):15-30.

157. Rivoire WA, Capp E, Corletae HVE, Silva ISB. Bases biomoleculares da oncogênese cervical. *Rev Bras Cancerol.* 2001;47(2):179-84.
158. Ashcroft M, Vousden KH. Regulation of p53 stability. *Oncogene.* 1999 Dec 13;18(53):7637-43.
159. Malumbres M, Carnero A. Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Prog Cell Cycle Res.* 2003;5:5-18.
160. Fernandes MGM, Ferreira FVA, Ferreira SNH, Lima SMS, Filho FDR, Ribeiro AVM, et al. MIB1 and p53 in penile intraepithelial and invasive squamous HPV related lesions. *Rev Brasil Cancerologia.* 2002;48:29-37.
161. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature.* 2009 Apr 9;458(7239):719-24.
162. Bargonetti J, Manfredi JJ. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol.* 2002 Jan;14(1):86-91.
163. Bartek J, Lukas J. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett.* 2001 Feb 16;490(3):117-22.
164. Hofseth LJ. The adaptive imbalance to genotoxic stress: genome guardians rear their ugly heads. *Carcinogenesis.* 2004 Oct;25(10):1787-93.
165. Neganova I, Vilella F, Atkinson SP, Lloret M, Passos JF, von Zglinicki T, et al. An important role for CDK2 in G1 to S checkpoint activation and DNA damage response in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2011 Apr;29(4):651-9.
166. Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Oct;2(10):731-7.
167. Glanzer JG, Carnes KA, Soto P, Liu S, Parkhurst LJ, Oakley GG. A small molecule directly inhibits the p53 transactivation domain from binding to replication protein A. *Nucleic Acids Res.* 2012 Dec 24.
168. Chau BN, Wang JY. Coordinated regulation of life and death by RB. *Nat Rev Cancer.* 2003 Feb;3(2):130-8.
169. Chene P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003 Feb;3(2):102-9.
170. Ozenne P, Eymin B, Brambilla E, Gazzeri S. The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer. *Int J Cancer.* 2010 Nov 15;127(10):2239-47.
171. Sidransky D, Hollstein M. Clinical implications of the p53 gene. *Annu Rev Med.* 1996;47:285-301.

172. Taghavi N, Biramijamal F, Sotoudeh M, Moaven O, Khademi H, Abbaszadegan MR, et al. Association of p53/p21 expression with cigarette smoking and prognosis in esophageal squamous cell carcinoma patients. *World J Gastroenterol*. 2010 Oct 21;16(39):4958-67.
173. Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature*. 2003 Jan 23;421(6921):436-40.
174. Mathon NF, Lloyd AC. Cell senescence and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001 Dec;1(3):203-13.
175. Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol*. 2011 Jan;223(2):116-26.
176. Carlsson J, Soussi T, Persson B. Investigation and prediction of the severity of p53 mutants using parameters from structural calculations. *FEBS J*. 2009 Aug;276(15):4142-55.
177. Hernandez-Boussard T, Montesano R, Hainaut P. Analysis of somatic mutations of the p53 gene in human cancers: a tool to generate hypotheses about the natural history of cancer. *IARC Sci Publ*. 1999(146):43-53.
178. Nussbaum R, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson genetics in medicine: Saunders*; 2007.
179. Edlund K, Larsson O, Ameer A, Bunikis I, Gyllensten U, Leroy B, et al. Data-driven unbiased curation of the TP53 tumor suppressor gene mutation database and validation by ultradeep sequencing of human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jun 12;109(24):9551-6.
180. Ferreira CG, da Rocha JCC. *Oncologia molecular: Atheneu*; 2004.
181. Kleihues P, Schauble B, zur Hausen A, Esteve J, Ohgaki H. Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am J Pathol*. 1997 Jan;150(1):1-13.
182. International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC TP53 database: version R15, November 2010. Lion: IARC; 2010 [cited 2012 11/11/2012]; Available from: <http://www-p53.iarc.fr>.
183. Harris CC. Molecular basis of multistage carcinogenesis. *Princess Takamatsu Symp*. 1991;22:3-19.
184. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*. 2002 Oct 21;21(48):7435-51.
185. Oliveira I, Martinho O, Small I, Paiva G, Souza D, Olmedo D, et al. Correlation between the interferon (IFN) regulated protein GBP-2 and TP53 mutations in squamous cell

carcinoma of the esophagus (SCCE). 2nd International Cancer Control Congress; Rio de Janeiro, Brazil 2007. p. 25-8.

186. Rossini A, de Almeida Simao T, Marques CB, Soares-Lima SC, Herbster S, Rapozo DC, et al. TP53 mutation profile of esophageal squamous cell carcinomas of patients from Southeastern Brazil. *Mutat Res*. 2010 Feb;696(1):10-5.

187. Pinotti HW, Ceconello I, Zilberstein B. Megaesôfago. In: Pinotti HW, editor. *Tratado de clínica cirúrgica do aparelho digestivo*. São Paulo: Atheneu; 1994. p. 316-45.

188. Pinotti HW, Pollara WM, Gemperli R, Raia AA. O problema do câncer no megaesôfago. *Rev Assoc Med Bras*. 1980;26:379-81.

189. Lehman MB, Clark SB, Ormsby AH, Rice TW, Richter JE, Goldblum JR. Squamous mucosal alterations in esophagectomy specimens from patients with end-stage achalasia. *Am J Surg Pathol*. 2001 Nov;25(11):1413-8.

190. Zucoloto S, de Rezende JM. Mucosal alterations in human chronic chagasic esophagopathy. *Digestion*. 1990;47(3):138-42.

191. Loviscek LF, Cenoz MC, Badaloni AE, Agarinakazato O. Early cancer in achalasia. *Dis Esophagus*. 1998 Oct;11(4):239-47.

192. Goldblum JR, Whyte RI, Orringer MB, Appelman HD. Achalasia. A morphologic study of 42 resected specimens. *Am J Surg Pathol*. 1994 Apr;18(4):327-37.

193. Yamamuro EM. Megaesôfago - mapeamento histológico da mucosa esofágica [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1998.

194. Chang-Claude JC, Wahrendorf J, Liang QS, Rei YG, Munoz N, Crespi M, et al. An epidemiological study of precursor lesions of esophageal cancer among young persons in a high-risk population in Huixian, China. *Cancer Res*. 1990 Apr 15;50(8):2268-74.

195. Watanabe H, Kato H, Tachimori Y. [Some problems of the surgical treatment of thoracic esophageal cancer in patients over 70 years of age]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 1990 Apr;17(4 Pt 2):839-42.

196. Mandard AM, Marnay J, Gignoux M, Segol P, Blanc L, Ollivier JM, et al. Cancer of the esophagus and associated lesions: detailed pathologic study of 100 esophagectomy specimens. *Hum Pathol*. 1984 Jul;15(7):660-9.

197. Dias JC, Prata A, Correia D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008 Mar-Apr;41(2):193-6.

198. Norton GA, Postlethwait RW, Thompson WM. Esophageal carcinoma: a survey of populations at risk. *South Med J*. 1980 Jan;73(1):25-7.

199. Aggestrup S, Holm JC, Sorensen HR. Does achalasia predispose to cancer of the esophagus? *Chest*. 1992 Oct;102(4):1013-6.
200. Crema E, Madureira AB, Lima VGF, Castro AMW, Silva AA, Junqueira IS. Estudo da microflora do megaesôfago chagásico. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;1:1-7.
201. Finlay IG, Wright PA, Menzies T, McArdle CS. Microbial flora in carcinoma of oesophagus. *Thorax*. 1982 Mar;37(3):181-4.
202. Lau WF, Wong J, Lam KH, Ong GB. Oesophageal microbial flora in carcinoma of the oesophagus. *Aust N Z J Surg*. 1981 Feb;51(1):52-5.
203. Pajecki D, Zilberstein B, dos Santos MA, Ubriaco JA, Quintanilha AG, Cecconello I, et al. Megaesophagus microbiota: a qualitative and quantitative analysis. *J Gastrointest Surg*. 2002 Sep-Oct;6(5):723-9.
204. Pajecki D, Zilberstein B, Santos MAA, Quintanilha AG, Cecconello I, Gama-Rodrigues J. Microbiota do megaesôfago e carcinogênese. *Arq Gastroenterol* 2003;40(1):16-9.
205. Calmels S, Bereziat JC, Ohshima H, Bartsch H. Bacterial formation of N-nitroso compounds from administered precursors in the rat stomach after omeprazole-induced achlorhydria. *Carcinogenesis*. 1991 Mar;12(3):435-9.
206. Calmels S, Ohshima H, Bartsch H. Nitrosamine formation by denitrifying and non-denitrifying bacteria: implication of nitrite reductase and nitrate reductase in nitrosation catalysis. *J Gen Microbiol*. 1988 Jan;134(1):221-6.
207. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*. 1994 Sep 15;54(18):4855-78.
208. Reis RM, Konu-Lebleblicioglu D, Lopes JM, Kleihues P, Ohgaki H. Genetic profile of gliosarcomas. *Am J Pathol*. 2000 Feb;156(2):425-32.
209. Mak PH, Campbell RC, Irwin MG. The ASA Physical Status Classification: inter-observer consistency. *American Society of Anesthesiologists. Anaesth Intensive Care*. 2002 Oct;30(5):633-40.
210. Barao K, Forones NM. Body mass index: different nutritional status according to WHO, OPAS and Lipschitz classifications in gastrointestinal cancer patients. *Arq Gastroenterol*. 2012 Apr-Jun;49(2):169-71.
211. Terret C, Albrand G, Moncenix G, Droz JP. Karnofsky Performance Scale (KPS) or Physical Performance Test (PPT)? That is the question. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011 Feb;77(2):142-7.

212. Huggins D. Carcinoma do esôfago associado ao megaesôfago chagásico (relato de um caso). *An Inst Hig Med Trop*. 1976;4:57-62.
213. Rocha A, Almeida HO, Esper FE, Moraes DM, Santos EP, Teixeira VPA. Associação entre megaesôfago e carcinoma de esôfago. *Rev Soc Bra Med Trop*. 1983;16:94-7.
214. Rocha A, Henrique D, Borges EG, Oliveira VL, Soares VMG, Moraes AT, et al. Complicações do megacólon e megaesôfago chagásicos observadas em necrópsia. *Rev Goiana Med*. 1981;27:53-62.
215. Herbella FAM, Del Grande JC, Lourenço LG, Mansur CM, Haddad CM. Resultados tardios da operação de Heller associada à funduplicatura no tratamento do megaesôfago: análise de 83 casos. *Rev Ass Med Brasil*. 1999;45(4):317-22.
216. Reynolds JC, Parkman HP. Achalasia. *Gastroenterol Clin North Am*. 1989 Jun;18(2):223-55.
217. Chapadeiro E, Lopes ER, Miziara LJ. Incidência de neoplasias malignas em 7,000 biópsias realizadas no Triângulo Mineiro. *O Hosp*. 1965;68:225-38.
218. Adad SJ, Etchebehere RM, Hayashi EM, Asai RK, de Souza Fernandes P, Macedo CF, et al. Leiomyosarcoma of the esophagus in a patient with chagasic megaesophagus: case report and literature review. *Am J Trop Med Hyg*. 1999 May;60(5):879-81.
219. Queiroga RC, Pernambuco AP. Câncer de esôfago: epidemiologia, diagnóstico e tratamento. *Rev Bras Cancerol*. 2006;52(2):173-8.
220. Oliveira GC, Lopes LR, Andreollo NA, Coelho Neto Jde S. [Surgically treated megaesophagus: epidemiological profile of patients operated in the Clinical Hospital of the State University of Campinas between 1989 and 2005]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008 Mar-Apr;41(2):183-8.
221. Terra Junior JA, Terra GA, da Silva AA, Crema E. Evaluation of anatomical and functional changes esophageal stump of patients with advanced megaesophagus submitted to subtotal laparoscopic esophagectomy. *Acta Cir Bras*. 2012 Sep;27(9):650-8.
222. Jain M, Kumar S, Upadhyay R, Lal P, Tiwari A, Ghoshal UC, et al. Influence of apoptosis (BCL2, FAS), cell cycle (CCND1) and growth factor (EGF, EGFR) genetic polymorphisms on survival outcome: an exploratory study in squamous cell esophageal cancer. *Cancer Biol Ther*. 2007 Oct;6(10):1553-8.
223. Sudo T, Mimori K, Nagahara H, Utsunomiya T, Fujita H, Tanaka Y, et al. Identification of EGFR mutations in esophageal cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2007 Feb;33(1):44-8.
224. Monteiro NML, Araújo DF, Basseti Soares E, Vieira J, Santos MRM, Junior P. Câncer de Esôfago: Perfil das Manifestações Clínicas, Histologia, Localização e Comportamento

Metastático em Pacientes Submetidos a Tratamento Oncológico em um Centro de Referência em Minas Gerais. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2009;55(1):27-32.

225. Dawsey SP, Tonui S, Parker RK, Fitzwater JW, Dawsey SM, White RE, et al. Esophageal cancer in young people: a case series of 109 cases and review of the literature. *PLoS One*. 2010;5(11):e14080.

226. Brown LM, Hoover R, Silverman D, Baris D, Hayes R, Swanson GM, et al. Excess incidence of squamous cell esophageal cancer among US Black men: role of social class and other risk factors. *Am J Epidemiol*. 2001 Jan 15;153(2):114-22.

227. Tettey M, Edwin F, Aniteye E, Sereboe L, Tamatey M, Ofosu-Appiah E, et al. The changing epidemiology of esophageal cancer in sub-Saharan Africa - the case of Ghana. *Pan Afr Med J*. 2012;13:6.

228. Feldman M. Southwestern internal medicine conference: esophageal achalasia syndromes. *Amer J Med Sci*. 1988;295(1):60-81.

229. Pinotti HW, Ellenbogen G, Rodrigues JG, Raia A. Surgical treatment of the megaesophagus. *Chir Gastroent*. 1977;11(1):7-14.

230. Csendes A. Results of surgical treatment of achalasia of the esophagus. *Hepatogastroenterology*. 1991 Dec;38(6):474-80.

231. Pajecki D, Zilberstein B, Cecconello I, Dos Santos MA, Yagi OK, Gama-Rodrigues JJ. Larger amounts of nitrite and nitrate-reducing bacteria in megaesophagus of Chagas' disease than in controls. *J Gastrointest Surg*. 2007 Feb;11(2):199-203.

232. Khaliq A, Rao C, Dutta U, Kochhar R, Vaiphei K, Singh K. Pay attention to esophageal mucosa in achalasia. *Indian J Gastroenterol*. 2012 Jan;31(1):30-1.

233. Braga JCV, Reis F, Aras R, Costa ND, Bastos C, Silva R, et al. Aspectos clínicos e terapêuticos da insuficiência cardíaca por doença de Chagas. *Arq Bras Cardiol*. 2006;86(4):297-302.

234. Henry MACA, Lerco MM, Oliveira WK. Esophageal cancer in patient with chagasic megaesophagus. *Arquivos de Gastroenterologia*. 2007;44(2):151-5.

235. Oelschlager B, Pellegrini CA. Surgical management of achalasia. *MedGenMed*. 2003 Dec 15;5(4):31.

236. Rice TW, Blackstone EH, Rybicki LA, Adelstein DJ, Murthy SC, DeCamp MM, et al. Refining esophageal cancer staging. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003 May;125(5):1103-13.

237. Rice TW, Rusch VW, Apperson-Hansen C, Allen MS, Chen LQ, Hunter JG, et al. Worldwide esophageal cancer collaboration. *Dis Esophagus*. 2009;22(1):1-8.

238. Siewert JR, Stein HJ, Feith M, Bruecher BL, Bartels H, Fink U. Histologic tumor type is an independent prognostic parameter in esophageal cancer: lessons from more than 1,000 consecutive resections at a single center in the Western world. *Ann Surg.* 2001 Sep;234(3):360-7; discussion 8-9.
239. Silva CM, Souza FAA, Cruz CAT, Torres AV, Barbosa CO, Magalhães VSF, et al. Laparoscopic cardiomyotomy with fundoplication in non advanced megaesophagus. *ABCD Arq Bras Cir Dig.* 2011;24(3):195-9.
240. Lopes LR, Braga Nda S, Oliveira GC, Coelho Neto Jde S, Camargo MA, Andreollo NA. Results of the surgical treatment of non-advanced megaesophagus using Heller-Pinotti's surgery: Laparotomy vs. Laparoscopy. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(1):41-6.
241. Crema E, Lopo PN, Kalinauskas PF, Cunha GR, Silva AA. Estudo da imunossupressão dos portadores de esofagopatia chagásica por meio da avaliação das citocinas (MIG, IL-4, IL-5, IFN-G, TNF-A) [abstract]. *Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Cirurgia; Rio de Janeiro, RJ: Rev Col Bras Cir;* 2005. p. 77.
242. Gockel I, Muller M, Schumacher J. Achalasia--a disease of unknown cause that is often diagnosed too late. *Dtsch Arztebl Int.* 2012 Mar;109(12):209-14.
243. Lung ML, Chan WC, Zong YS, Tang CM, Fok CL, Wong KT, et al. p53 mutational spectrum of esophageal carcinomas from five different geographical locales in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996 Apr;5(4):277-84.
244. Biramijamal F, Allameh A, Mirbod P, Groene HJ, Koomagi R, Hollstein M. Unusual profile and high prevalence of p53 mutations in esophageal squamous cell carcinomas from northern Iran. *Cancer Res.* 2001 Apr 1;61(7):3119-23.
245. Bellini MF, Leite KR, Cury PM, Silva AE. p53, p16 and Fhit proteins expressions in chronic esophagitis and Chagas disease. *Anticancer Res.* 2008 Nov-Dec;28(6A):3793-9.
246. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Jan;2(1):a001008.
247. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Human mutation.* 2002;19(6):607-14.
248. Cao W, Chen X, Dai H, Wang H, Shen B, Chu D, et al. Mutational spectra of p53 in geographically localized esophageal squamous cell carcinoma groups in China. *Cancer.* 2004 Aug 15;101(4):834-44.
249. Zhang JH, Li Y, Wang R, Wen DG, Wu ML, He M. [p53 gene polymorphism with susceptibility to esophageal cancer and lung cancer in Chinese population]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2003 Jul;25(4):365-7.

250. Sepehr A, Taniere P, Martel-Planche G, Zia'ee AA, Rastgar-Jazii F, Yazdanbod M, et al. Distinct pattern of TP53 mutations in squamous cell carcinoma of the esophagus in Iran. *Oncogene*. 2001 Nov 1;20(50):7368-74.
251. Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro U, Jr., Sakai P, Clarke MR, Fylyk SN, Ishioka S, et al. Integrated p53 histopathologic/genetic analysis of premalignant lesions of the esophagus. *Cancer Detect Prev*. 2000;24(1):13-23.
252. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*. 2007 Jun;28(6):622-9.
253. LL H. Characteristics of mutations in the p53 gene in oral squamous cell carcinoma associated with betel quid chewing and cigarette smoking in Taiwanese. *Carcinogenesis*. 2001;22.
254. Harris CC. p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and molecular epidemiology. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 1996 Apr;1(2):115-8.

ANEXO

8 Anexo

f	Identificação	1	
2	Número do DNA	2	
3	Grupo 1- CEC e Mega; 2- Só Câncer; 3- Só Megaesôfago	3	
4	Instituição 1- Pio XII; 2- UFMT -MG 3- UNESP -SP	4	
5	Nome	5	
6	Registro Hospitalar	6	
7	Data de nascimento DD/MM/AAAA	7	
8	Sexo 1- Feminino; 2- Masculino	8	
9	Escolaridade 0- Analfabeto; 1- Fundamental Incompleto; 2- Fundamental Completo; 3- Médio Incompleto; 4- Médio Completo; 5- Superior Incompleto; 6- Superior Completo; 99- Ignorado	9	
10	ASA 1- I; 2- II; 3- III; 4- IV; 99- Ignorado	10	
11	Data do diagnóstico do tumor DD/MM/AAAA	11	
12	Data do diagnóstico do Megaesôfago DD/MM/AAAA	12	
13	Data da primeira consulta DD/MM/AAAA	13	
14	Telefone	14	
15	Endereço	15	
16	Número	16	
17	Bairro	17	
18	Local de nascimento – Cidade	18	
19	Local de nascimento – Estado	19	
20	Endereço atual – Cidade	20	
21	Endereço atual – Estado	21	
22	Peso KILOS	22	
23	Altura ALTURA	23	
24	Índice De K %	24	
25	Desnutrição 1- Leve; 2- Moderada; 3- Grave	25	
26	Tempo início dos sintomas MESES	26	
27	Disfagia – Sólidos 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	27	
28	Disfagia – Pastoso 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	28	
29	Disfagia – Líquido 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	29	
30	Disfagia Total 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	30	
31	Pirose/Azia 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	31	
32	Perda de peso 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	32	
33	Se perdeu peso, quantos kilos por mês KG/MESES	33	
34	Regurgitação 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	34	
35	Rouquidão 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	35	
36	Dor torácica 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	36	

37	Halitose	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	37	
38	Epigastria	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	38	
39	Astenia	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	39	
40	Inapetência	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	40	
41	Outras	DESCREVER	41	
42	Uso de SNE pré-operatório	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	42	
43	Se usou SNE pré-operatório, por quanto tempo	MESES	43	
44	Jejunostomia	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	44	
45	Suporte Nutricional Pré	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	45	
46	Exame Físico	0- Sem achados significativos; 1- Com achados significativos	46	
47	Se achados significativos no EF, descrever	DESCREVER	47	
48	Incisões Abdominais	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	48	
49	Tabagismo (Atual ou no Passado)	0- Não; 1- Sim Papel; 2-Sim Palha; 3- Sim Não Especificado; 4- Sim Papel e Palha; 5- Charuto; 6- Cachimbo; 7- Cigarilha; 99- Ignorado	49	
50	Número de Cigarros Papel por dia	88- Não se aplica; 99- Ignorado	50	
51	Número de Cigarros Palha por dia	88- Não se aplica; 99- Ignorado	51	
52	Tempo de tabagismo	ANOS	52	
53	Parou de fumar	0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	53	
54	Se parou de fumar, há quanto tempo parou	MESES	54	
55	Continuou a fumar após diagnóstico de neoplasia	0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	55	
56	Continuou a fumar após (tratamento ou em vigência) cirurgia ou RT ou QT	0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	56	
57	Etilismo	0- Não; 1- Sim, Pinga; 2- Sim, Cerveja; 3- Sim, Destilados não especificado; 4-Sim, Outros ; 5- Vinho; 99- Ignorado	57	
58	Número de doses por dia	88- Não se aplica; 99- Ignorado	58	
59	Tempo de Etilismo	ANOS	59	
60	Parou de beber	0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	60	
61	Se parou de beber, há quanto tempo	MESES	61	
62	Continuou a beber após o diagnóstico da neoplasia	0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	62	
63	Continuou a beber durante ou após (tratamento ou em vigência) cirurgia ou RT ou QT	0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	63	
FATORES DE RISCO				
64	Alcool	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	64	
65	Fumo	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	65	
66	Bebidas quentes	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	66	
67	Condimentos/sal	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	67	
68	Megaesôfago	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	68	
69	Esôfago de barrett	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	69	
70	Esofagite erosiva e/ou R.G.E	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	70	
71	Asbestos	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	71	
72	Radiação	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	72	

73	Deficiências vitamínicas	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	73	
74	Deficiências minerais	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	74	
75	Tilose	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	75	
76	Síndrome de plummer-virson	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	76	
77	Lesões cáusticas	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	77	
78	Divertículo de zencker	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	78	
79	Ingesta de soda cáustica	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	79	
80	Hernia de hiato	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	80	
81	Obesidade	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	81	
82	Candidíase esofágica	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	82	
DOENÇAS (COMORBIDADES) PREEXISTENTES				
83	Doença de chagas	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	83	
84	Cardiopatía	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	84	
85	Diabetes	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	85	
86	HAS	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	86	
87	Malária	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	87	
88	Hipotireoidismo	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	88	
89	Reumática	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	89	
90	Ortopédica	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	90	
91	Neurológica	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	91	
92	Pancreatite	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	92	
93	DPOC ou Pneumopatias	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	93	
94	Desnutrição	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	94	
95	Renal crónico	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	95	
96	Outros	DESCREVER	96	
97	Uso crónico de medicamentos	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	97	
98	Cirurgias anteriores	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	98	
99	Qual cirurgia	DESCREVER	99	
100	Transusão de sangue	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	100	
101	Internações anteriores	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	101	
102	Se houve internações anteriores, qual o motivo	DESCREVER	102	
HISTÓRIA FAMILIAR PARA CÂNCER				
103	Pai	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	103	
104	Mãe	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	104	
105	Avô paterno	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	105	
106	Avô materno	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	106	
107	Avó materna	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	107	
108	Avó paterna	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	108	

109	Irmão(s)	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	109	
110	Tio (s)	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	110	
111	Primos 1º grau	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	111	
TIPO DE CÂNCER FAMILIAR				
112	Mama	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	112	
113	Pele	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	113	
114	Gastrointestinal	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	114	
115	Geníto-urinário	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	115	
116	SNC	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	116	
117	Pulmão	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	117	
118	CP	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	118	
119	Hematológicos	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	119	
120	Outros	DESCREVER	120	
121	Presença de segundo tumor primário	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	121	
122	Local do segundo tumor primário	DESCREVER	122	
EXAMES PRE-OPERATÓRIO				
123	Hb		123	
124	Ht		124	
125	Leucograma		125	
126	Plaquetas		126	
127	Albumina		127	
128	Proteína		128	
129	Chagas EIE - Enzimaimunoensaio (Elisa)	0- Negativo; 1- Positivo	129	
130	Chagas IF – Imunofluorescencia	0- Negativo; 1- Positivo	130	
131	CHAGAS HÁ	0- Negativo; 1- Positivo	131	
132	CHAGAS RFC	0- Negativo; 1- Positivo	132	
133	Espirometria 0- Normal; 1- Distúrbio respiratório leve; 2- Distúrbio respiratório Moderado; 3- Distúrbio respiratório Grave		133	
134	EDA	1- Lesão Inicial Superficial; 2- Avançada	134	
135	Local tumor 1- Cervical; 1- Torácico superior; 2- Torácico médio; 3- Torácico inferior; 4- Cárdia		135	
136	Siewirt	1- I; 2- II; 3- III	136	
137	Sincrônico (____ e ____ CM ADS)	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	137	
138	Se sincrônico, descrever cm ADS	CM ADS	138	
139	Extensão do menor tumor	CM	139	
140	Extensão do maior tumor	CM	140	
141	Circunferência	%	141	
142	Passa aparelho	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	142	
143	Presença de megaesôfago	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	143	
144	Restos alimentares ou estase alimentar	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	144	

145	Características da lesão 1- Ulcerosa; 1- Polipoide (protusa); 2- Infiltrativa	145	
TC TÓRAX			
146	Local tumor 1- Cervical; 2- Torácico superior; 3- Torácico médio; 4- Torácico inferior; 5- Cardia	146	
147	Tamanho da lesão CM	147	
148	Contato com aorta GRAUS (ÂNGULO DE PICUS)	148	
149	Contato com pericárdio GRAUS	149	
150	Carina CM	150	
151	Contato com brônquio 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	151	
152	Dilatação esôfago 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	152	
153	Estase esofágica 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	153	
154	Infiltra estruturas 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	154	
155	Metástase 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	155	
156	Local da metástase DESCREVER	156	
157	Linfonomegalia Mediastinal 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	157	
TC ABDOME			
158	Metástase Hepática 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	158	
159	Gangliomegalia Abdominal 0- Não; 1- Suspeita; 3- Inespecífica	159	
160	Carcinomatose 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	160	
161	Infiltração Gástrica 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	161	
162	Broncoscopia 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	162	
163	Presença de fistula-traqueoesofágica 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	163	
164	Local da fistula-traqueoesofágica DESCREVER	164	
165	Presença de abaulamento 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	165	
166	Presença de infiltração brônquica ou traquéia 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	166	
SERIOGRAFIA			
167	Megaesôfago 1- G1; 2- GII; 3- GIII; 4- GIV; 5- Dólico	167	
168	Local da neoplasia – Cervical 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	168	
169	Local da neoplasia – Torácico alto 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	169	
170	Local da neoplasia – Torácico médio 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	170	
171	Local da neoplasia – Torácico distal 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	171	
172	Tamanho da maior lesão CM ADS	172	
173	Restos alimentares ou extase 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	173	
174	Manometria 1- Baixa amplitude; 2- Anisoperistática; 3- Normal	174	
175	E EI CM	175	
176	E ES CM	176	
177	Ph metria	177	
178	RGE 0- Não; 1- Sim; 3- Não mensurável	178	
179	PH	179	
180	Data diagnóstico segundo tumor DD/MM/AAAA	180	

181	Indicação de cirurgia - Megaesôfago avançado radiológico 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	181	
182	Indicação de cirurgia - Megaesôfago avançado funcionalmente (aperistalse, amplitude de contração do corpo menor que 20mmHg) 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	182	
183	Indicação de cirurgia - Recidiva do megaesôfago após cirurgias sobre a junção esofágica 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	183	
184	Indicação de cirurgia - Associação de displasia grave e/ou neoplasia associada com megaesôfago 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	184	
185	Indicação de cirurgia - Associação de displasia grave e/ou neoplasia associada com megaesôfago 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	185	
186	Indicação de cirurgia - Neoplasia de esôfago CEC 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	186	
187	Não indicado tratamento cirurgico (esofagectomia) para o tratamento (mega e/ou CEC) 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	187	
188	Se não indicado, quais eram as condições clínicas 1- Irressecabilidade; 2- Estadio avançado da doença; 88- Não se aplica (pac. sub. à cir.); 99- Ignorado	188	
189	Data da cirurgia DD/MM/AAAA	189	
190	Tipo de cirurgia 1- Radical; 2- Paliativa; 88- Não se aplica (pac. não operado); 99- Ignorado	190	
191	Técnica cirúrgica ou alternativas paliativas 0- Nenhum tratamento; 1- Esofagectomia Trans-Mediastinal Aberta; 2- Esofagogastrrectomia Transhiatal Aberta C/Reconstrução Colon; 3- Esofagectomia Transhiatal Video; 4 - Esofagectomia Toracosopia +Laparotomia; 5- Esofagectomia Toracosopia + Laparoscopia; 6- Esofagogastrrectomia Transhiatal Video C/Reconstrução; 7- Protese Esofago; 8- Jejunostomia; 9- Gastrostomia; 10- SNE; 11- Dilatação Balão E/Ou Savary; 11- Outros	191	
192	Linfadenectomia 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	192	
193	UTI 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	193	
194	UTI – Dias	194	
195	Data de inicio da dieta VO DD/MM/AAAA	195	
196	Data de inicio da dieta ENTERAL DD/MM/AAAA	196	
197	Data de inicio da dieta PARENTERAL DD/MM/AAAA	197	
198	Data da alta Hospitalar DD/MM/AAAA	198	
COMPLICAÇÕES CIRÚRGICAS IMEDIATAS ATE 30 DIAS			
199	Óbito 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	199	
200	Fistula cervical 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	200	
201	Data da fistula cervical DD/MM/AAAA	201	
202	Estenose anastomose esofagojejunal 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	202	
203	Data da estenose anastomose esofagojejunal DD/MM/AAAA	203	
204	Pulmonar (pneumonia) 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	204	
205	Data da complicação pulmonar (pneumonia) DD/MM/AAAA	205	
206	Cardiológicas 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	206	
207	Data da complicação cardiológica DD/MM/AAAA	207	
208	Outras complicações DESCREVER	208	
209	Data da outra complicação DD/MM/AAAA	209	
300	Tratamento DESCREVER	300	
COMPLICAÇÕES TARDIAS > 30 DIAS			
301	Óbito 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	301	

302	Fistula cervical	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	302	
303	Data da fistula cervical	DD/MM/AAAA	303	
304	Estenose anastomose esofagojejunal	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	304	
305	Data da estenose anastomose esofagojejunal	DD/MM/AAAA	305	
306	Pulmonar (pneumonia)	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	306	
307	Data da complicação pulmonar (pneumonia)	DD/MM/AAAA	307	
308	Cardiológicas	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	308	
309	Data da complicação cardiológica	DD/MM/AAAA	309	
310	Disfagia	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	310	
311	Data da disfagia	DD/MM/AAAA	311	
312	Desnutrição	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	312	
313	Data da desnutrição	DD/MM/AAAA	313	
314	Outras complicações	DESCREVER	314	
315	Data da outra complicação	DD/MM/AAAA	315	
316	Tratamento	DESCREVER	316	
ANATOMO-PATOLÓGICO				
317	Histopatologia	1- C.E.C; 2- Adenoca	317	
318	Grau de diferenciação	1- GI; 2- GII; 3- GIII; 4- GIV; 99- Gx	318	
319	Grau de diferenciação (descritivo)	1- Bem diferenciado; 2- Moderadamente diferenciado; 3- Indiferenciado	319	
320	Classificação de Lauren	1- Intestinal; 2- Difuso	320	
321	Esofago de barrett	0- Não; 1- Sim	321	
322	Nível de infiltração da parede	1- Lamina própria; 2- Muscular própria; 3- Adventícia; 4- Submucosa; 5- Intraepitelial; 6- Estruturas adjacentes	322	
323	Tamanho do tumor no maior eixo	CM	323	
324	Número de linfonodos positivos		324	
325	Número de linfonodos dissecados		325	
326	Invasão venosa	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	326	
327	Invasão linfática	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	327	
328	Margens proximal	1- Livres; 2- Comprometidas	328	
329	Margens distal	1- Livres; 2- Comprometidas	329	
330	T	0- T0; 1- T1; 2- T2; 3- T3-; 4- T4; 99- Ignorado	330	
331	N	0- N0; 1- N1; 2- N2; 3- N3; 99- Ignorado	331	
332	M	0- M0; 1- M1; 99- Ignorado	332	
333	Estadio patológico	0- 0; 1- I; 2- IIA; 3- IIB; 4- III; 5- IV; 6- IVA; 7- IVB; 99- Ignorado	333	
334	Número do bloco da biópsia (anatomopatológico) da endoscopia diagnóstica		334	
335	Número do bloco da peça-cirúrgica (anatomopatológico)		335	
TRATAMENTO ADJUVANTE				
336	Radioterapia – adjuvante pós-operatorio	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	336	

337	Indicação da radioterapia 1- Tumor residual; 2- Margens comprometidas; 3- Tumor Localmente avançado; 4- Condições clínicas insatisfatórias para cirurgia; 5- Condições clínicas insatisfatórias para QT; 6- Neoplasia cervical; 7- Sangramentos; 8- Metastase óssea; 9- Disfagia; 10- Tumor residual pós-cirurgia	337	
338	Dose total eCy	338	
339	Braquiterapia 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	339	
340	Quimioterapia adjuvante 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	340	
341	Esquema quimioterapia adjuvante DESCREVER	341	
342	Número de ciclos	342	
343	Recidiva loco-regional 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	343	
344	Data da recidiva DD/MM/AAAA	344	
345	Metastase à distância 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	345	
346	Data da metástase DD/MM/AAAA	346	
347	Local da metástase – Mediastinal 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	347	
348	Local da metástase - Pulmonar / Pleura 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	348	
349	Local da metástase – Hepática 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	349	
350	Local da metástase – Óssea 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	350	
351	Local da metástase – SNC 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	351	
352	Local da metástase - Adominal (Carcinomatose, Supra Renal, Etc) 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	352	
353	Local da metástase – Cervical 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	353	
354	Tratamento paliativo – Radioterapia 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	354	
355	Tratamento paliativo – Quimioterapia 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	355	
356	Tratamento paliativo – Cirurgia 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	356	
357	Tipo de cirurgia paliativa 0- Sem cirurgia paliativa; 1- Postlethwait; 2- Derivação c/ cólon; 3- Prótese; 4- Jejunostomia; 5- Gastrostomia	357	
358	Tratamento paliativo – SNG/SNE 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	358	
359	Tratamento paliativo – Outro tratamento DESCREVER	359	
360	Status atual 1- Vivo sem doença; 2- Vivo com doença; 3- Morto por câncer; 4- Morto por outras causas; 5- Morto por causas desconhecidas	360	
361	Perda de seguimento 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	361	
362	Data da última informação ou óbito DD/MM/AAAA	362	